

財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2012 年 3 月 14 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：安井 孝周
所属機関名：名古屋市立大学大学院医学研究科
所属部署名：腎・泌尿器科学分野 職名：講師
所在地：名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄 1
電 話：(052)851-5511 内線：8266



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

尿路結石の一塩基多型を用いた遺伝子診断方法の開発と人種差の検討

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：安井孝周

職名：講師

所属機関名：名古屋市立大学大学院医学研究科

部署名：腎・泌尿器科学分野

中国側研究者氏名：高兵

職名：教授

所属機関名：瀋陽医学院

部署名：細胞生物与遺伝学研
究室

4. 当該研究における発表論文等

Genome-wide association study of nephrolithiasis in the Japanese population

identifies novel susceptible loci. (投稿準備中)

Role of osteopontin in early phase of renal crystal formation (投稿準備中)

5. 成果の概要

尿路結石患者に特徴的な遺伝子多型をオステオポンチン(OPN)と matrix Gla protein で同定し、遺伝子多型により、OPN プロモーター活性が変化することを確認した。さらに、全ゲノムの網羅的探索によって尿路結石と強い関連を示す 2 領域を同定した。

6. 本研究における中国人共同研究者の役割及び業績

中国瀋陽市内の泌尿器科病院と連携し、尿路結石患者の検体を収集した。

MGP の SNPs 解析および、オステオポンチンの SNPs によるプロモーター解析を行った。

2011年6月19日～22日 申請者とともに瀋陽医学院にて、共同研究の結果と内容、今後の研究の進め方について、ディスカッションを行った。中国瀋陽市内の泌尿器科医師にも共同研究についての説明を行った

2011年6月20日 中日尿路結石中心の設立記念講演を行った。

尿路結石の一塩基多型を用いた遺伝子診断方法の開発と人種差の検討

研究者氏名 安井 孝周
所属機関 名古屋市立大学大学院医学研究科
腎・泌尿器科学分野 講師
共同研究者名 高兵

要旨

尿路結石は遺伝因子に食生活などの生活習慣である環境因子が重なり、発症すると考えられる。遺伝子の一塩基多型 (SNPs) は個体差を形成し、多因子疾患の原因となることが報告されている。疾患に相関する特定遺伝子の SNPs が半別出来れば、個体レベルでの発症リスクを推測し、疾患の早期診断、予防に有用である。本研究では、osteopontin (OPN) と matrix Gla protein の SNPs 解析により結石発生のリスクとの関係を検討し、機能解析を中国人共同研究者とともに行った。さらに、ゲノムワイドな網羅的探索によって、新規の関連遺伝子領域を同定した。

OPN、MGP で、結石患者に特徴的な SNPs を同定したが、人種差を同定できなかった。OPN のプロモーター解析によって結石と健常者に特徴的な SNPs によって発現変化が生じることを確認し、機能に変化が生じることが推察された。2011 年 6 月に訪中のうえ、共同研究の方法、結果についてディスカッションした。今後も共同研究を継続していく予定である。大規模なゲノムワイドに網羅的解析を行い、日本人において尿路結石症と強い関連を示す 2 領域を同定した。今後、遺伝子領域の中で、特定遺伝子を同定し、機能解析を行うことと、各遺伝子型における再発率を検討することで、遺伝子診断への応用が期待できる。

Key Words 尿路結石, オステオポンチン, 遺伝子多型, ゲノムワイド

緒言:

尿路結石は遺伝因子に食生活などの生活習慣である環境因子が重なり、発症すると考えられる。尿路結石症の生涯罹患率は急増し、我が国では 100 人中 6 人、欧米では 20 人にも達する国もみられ、生産年齢の男性に多く、その成因の究明と再発予防法の確立は急務であるが、遺伝子レベルに研究が進んでからも画期的な再発予防法は開発されていない。

オステオポンチン (OPN) はカルシウム結石のマトリクスとして同定され、結石モデルラットでは結石形成に先行して発現し、尿細管細胞と尿酸カルシウム結晶の接着、結晶の成長に関与し、結石形成に重要な役割を果たすと考えられている。

遺伝子の一塩基多型 (SNPs) は個体差を形成し、多因子疾患の原因となることが報告されている。疾患に相関する特定遺伝子の SNPs が半別出来れば、個体レベルでの発症リスクを推測し、疾患の早期診断、予防に有用である。本研究では、OPN の SNPs 解析により結石発生のリスクとの関係を検討した。さらに、同定されていない遺伝子を含めたゲノムワイドに遺伝子解析を行うため、タグ SNP を用いた網羅的探索法にて検討した。

対象と方法:

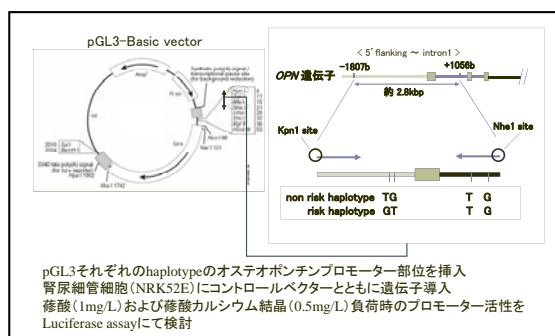
SNP の同定と解析

カルシウム結石患者 126 名 (平均 57.6 ± 13.5 歳、男性 93 名、女性 33 名) と結石既往のない健常者 214 名 (平均 68.6 ± 11.8 歳、男性 165 名、女性 49 名) を対象とした。まず、99 例で血液よりゲノム DNA を抽出し、OPN 遺伝子の全配列を決定した。連鎖不均衡解析を行い、結石患者に特徴的な haplotype

tagging SNPs (htSNPs)について全例でSNPsを検査、解析した。ANKHでは全ゲノムの遺伝子配列を同定し、同様に解析を行った。

OPNプロモーター活性の検討

特徴的なhtSNPsについて、蔞酸(1mM)および蔞酸カルシウム一水和物(COM)結晶(500μg/ml)添加時のプロモーター活性を検討した。それぞれのhtSNPsについて、-1807bpから1056bp領域をプラスミドpGL3 basic vectorに組み込み、HK-2細胞(ヒト腎尿細管細胞由来)にコントロールプラスミド(pRL-TK)とともにco-transfectionした。蔞酸(1mM)または蔞酸カルシウム一水和物(COM)結晶(500・g/ml)を添加し、OPNプロモーター活性を1, 3, 6, 12, 24時間後にLuciferase assayにて経時的に検討した。



結石関連遺伝子のゲノムワイドな網羅的探索

カルシウムを主成分とする尿路結石の形成機序は、食事などの環境因子に加えて、遺伝因子が重要であると考えられる。遺伝因子としては、「個人差程度の違い」である遺伝子多型(SNP)が、いくつも複雑に関連して疾患が発症していると考えられている。ハプロタイプブロックの領域には、「タグSNP」と呼ばれる、その領域を代表するSNPが存在しており、約20万ヶ所のタグSNPをタイピングすることで、尿路結石関連遺伝子の一次スクリーニングを行い、インフォームドコンセントのうえ、収集した結石患者のゲノム遺伝子を、4000名で三次スクリーニングまで行った。

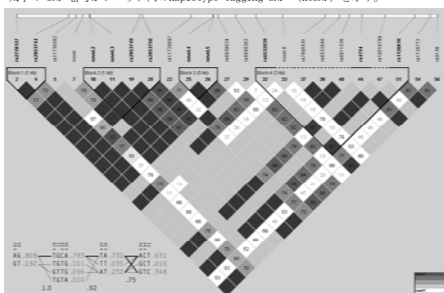
さらに、別の結石患者群、健常者群で再スクリーニングを行っている。

結果:

SNPの同定と解析

61ヶ所のSNPsを確認し、連鎖不均衡解析にて4つのblockを同定した(図1)。Block2で結石患者および健常者に特異的なハプロタイプを同定した。結石患者と健常者の遺伝子型を比較すると、ハプロタイプG-T-T-Gは結石患者に多く($p=0.0227$ odds比1.676)、ハプロタイプT-G-T-Gは健常者に多く($p=0.016$ odds比0.351)みられた。日本人と中国人での差異については明らかにならなかった。

99名のOPN SNPについて連鎖不均衡解析を行った。太枠の内部がhaplotype blockを示し、太字のSNP番号がブロック内のhaplotype tagging SNP(htSNP)を示す。



尿路結石患者(126名)と健常者(214名)でBlock2にあるhaplotypesについて解析を行った。GITGは結石患者に多く、TGTGは健常者(非結石患者)に多い**。

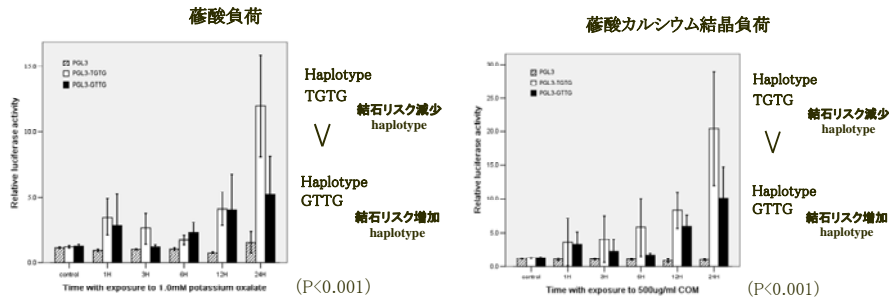
Block 2 Haplotypes (SNP Frequency 10-11-19-20)	Cases (n=126)	Controls (n=214)	OR	95% CI	Chi square	P value	
TGCA	0.756	192.0 / 60.0	321.9 / 106.1	1.054	0.659-1.364	0.080	0.7777
GTTG	0.132	43.0 / 209.0	46.8 / 381.2	1.676	1.072-2.621	5.189	0.0227*
TGTG	0.088	11.0 / 241.0	49.2 / 378.8	0.351	0.179-0.689	9.978	0.0016**
TGCG	0.012	4.0 / 248.0	3.8 / 424.2	1.801	0.438-7.395	0.667	0.414

* $P<0.05$. ** $P<0.01$.

ANKH遺伝子で、SNPsを同定したが、結石患者と健常者に特徴的なSNPsは同定できなかった。

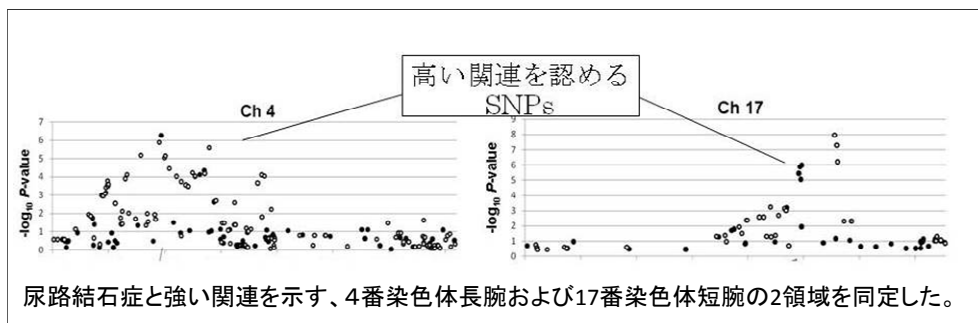
OPNプロモーター活性の検討

Luciferase assay では、尿酸およびCOM 結晶の刺激により、OPN プロモーター活性は経時的に上昇し、24 時間後にピークを認めた。ハプロタイプ T-G-T-G はハプロタイプ G-T-T-G と比較して、尿酸または COM 結晶刺激による、OPN プロモーター活性が有意に上昇していた。



結石関連遺伝子のゲノムワイドな網羅的探索

多因子疾患として OPN 以外の遺伝因子を探索するため、ゲノムワイド解析を行った。同定されていない関連遺伝子も含めた全ゲノムの網羅的探索として、尿路結石患者と健常者の大規模ゲノムワイド関連解析を行い、日本人において尿路結石症と強い関連を示す、4 番染色体長腕および 17 番染色体短腕の 2 領域を同定した。



考 察 :

カルシウム結石は単一の遺伝子異常で説明ができていないが、近年、遺伝子多型(一塩基多型、single nucleotide polymorphism: SNP) を中心とした解析が行われ、カルシウム代謝に関係する Vitamin D 受容体、カルシウム感受性受容体、ウロキナーゼ等について報告されてきている。

カルシウム結石患者と健常者を比較し、結石マトリクスである OPN について有意に、ハプロタイプ G-T-T-G では結石発症のリスクが高く、ハプロタイプ T-G-T-G では健常者(非結石患者)である可能性が高いことを示した。さらに、それぞれのハプロタイプでプロモーター活性が変化することを確認した。採血による遺伝子解析によって、特定のハプロタイプで尿路結石の発症リスクが診断できる可能性があり、再発予防に有用であることが示唆された。日本人と中国人の尿路結石患者における人種差による SNPs の違いは、確認できなかった。

ゲノムワイドな網羅的探索で得られた関連遺伝子領域については、特定遺伝子を同定し、今後機能解析と、尿路結石患者と健常者における再発について検討することで、新規関連遺伝子の同定、再発リスク診断が可能となる将来性が期待される。

参考文献

1. Hirose M, Yasui T, Okada A, Hamamoto S, Shimizu H, Itoh Y, Tozawa K, Kohri K. Renal tubular epithelial cell injury and oxidative stress induce calcium oxalate crystal formation in mouse kidney. *Int J Urol.* 2010;17(1):83-92.

2. Lu X, Wang J, Cao X, Li M, Xiao C, Yasui T, Gao B. Gender and urinary pH affect melamine-associated kidney stone formation risk. *Urol Ann.* 2011;3(2):71-4.
3. Gao B, Yasui T, Lu X, Zhou H, Liu J, Liu P, Okada A, Xiao C, Kohri K. Matrix Gla protein expression in NRK-52E cells exposed to oxalate and calcium oxalate monohydrate crystals. *Urol Int.* 2010;85(2):237-41.
4. Gao B, Yasui T, Lu X, Zhou H, Liu J, Liu P, Okada A, Xiao C, Kohri K. Matrix Gla protein expression in NRK-52E cells exposed to oxalate and calcium oxalate monohydrate crystals. *Urol Int.* 2010;85(2):237-41.
5. Okada A, Yasui T, Hamamoto S, Hirose M, Kubota Y, Itoh Y, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. Genome-Wide Analysis of Genes Related to Kidney Stone Formation and Elimination in the Calcium Oxalate Nephrolithiasis Model Mouse: Detection of Stone-Preventive Factors and Involvement of Macrophage Activity. *J Bone Miner Res.* 2010;25(12):2425-35.
6. Gao B, Yasui T, Itoh Y, Li Z, Okada A, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. Association of osteopontin gene haplotypes with nephrolithiasis. *Kidney Int.* 72(5):592-8, 2007.
7. Gao B, Yasui T, Itoh Y, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. A polymorphism of matrix Gla protein gene is associated with kidney stones. *J Urol.* 177(6):2361-5, 2007.
8. Gao B, Yasui T, Okada A, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. A polymorphism of the osteopontin gene is related to urinary calcium stones. *J Urol.* 174(4 Pt 1):1472-6, 2005.
9. Vezzoli G, Soldati L, Proverbio MC, Adamo D, Rubinacci A, Bianchi G, Mora S: Polymorphism of vitamin D receptor gene start codon in patients with calcium kidney stones. *J Nephrol.* 158-164, 2002.
10. Nishijima S, Sugaya K, Naito A, Morozumi M, Hatano T, Ogawa Y: Association of vitamin D receptor gene polymorphism with urolithiasis. *J Urol.* 167: 2188-2191, 2002.
11. Vezzoli G, Tanini A, Ferrucci L, Soldati L, Bianchin C, Franceschelli F, Malentacchi C, Porfirio B, Adamo D, Terranegra A, Falchetti A, Cusi D, Bianchi G, Brandi ML: Influence of calcium-sensing receptor gene on urinary calcium excretion in stone-forming patients. *J Am Soc Nephrol.* 13: 2517-2523, 2002

学会発表：

Takahiro Yasui, Atsushi Okada, Jun Ichikawa, Kazumi Taguchi, Yasuhiko Hirose, Yasuhiro Fujii, Koshiro Niimi, Masayuki Usami, Ryosuke Ando, Shuzo Hamamoto, Takahiro Kobayashi, Masahito Hirose, Yasunori Itoh, Keiichi Tozawa, Bing Gao, Kenjiro Kohri. Bisphosphonate prevents urolithiasis in men with osteoporosis. 1st Meeting of the EAU Section of Urolithiasis (EULIS) (London, United Kingdom) Sep. 7-10, 2011 (Sep 9)

作成日：2012年3月14日