

平成21年度名古屋市立大学医学会賞
受賞論文

腎シュウ酸カルシウム結晶の形態学的変化における
オステオポンチン機能の解明

岡田 淳志

名古屋市立大学大学院医学研究科 腎・泌尿器科学分野

Morphological conversion of calcium oxalate crystals into stones is regulated
by osteopontin in mouse kidney

ATSUSHI OKADA

Department of Nephro-urology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

SUMMARY

An important process in kidney stone formation is the conversion of retentive crystals in renal tubules to concrete stones. Osteopontin (OPN) is the major component of kidney calcium-containing stone matrix. In the present study, we estimated OPN function in early morphological changes of calcium oxalate crystals using OPN knockout mice: 100 mg/kg glyoxylate were intraabdominally injected into wild-type mice (WT) and OPN knockout mice (KO) for a week, and 24hr urine oxalate excretion showed no significant difference between WT and KO. Kidney crystal depositions were clearly detected by Pizzolato staining but not by von Kossa staining in both genotypes, and the number of crystals in KO was significantly fewer than in WT. Morphological observation by polarized light optical microphotography and scanning electron microphotography (SEM) showed large flower-shaped crystals growing in renal tubules in WT, whereas small and uniform crystals in KO. X-ray diffraction detected the crystal components as calcium oxalate monohydrate in both genotypes. Immunohistochemical staining of OPN demonstrated that the WT crystals contained OPN protein but not KO crystals. We concluded that OPN plays a crucial role in the morphological conversion of calcium oxalate crystals to stones in mouse kidneys.

はじめに

わが国の尿路結石症の発生頻度は、男性では7人に1人、女性では15人に1人にも達し、5年再発率も40~50%と高く、形成機序の解明と再発予防法の確立が急務である。これまでの尿路結石の予防法は、飲水指導や食事指導といった、尿中の無機物質の制御が目的であったが、依然として尿路結石の罹患率は増加している。尿路結石には数%の有機物質（結石マトリックス）が含まれているが、私たちはその主成分と

してオステオポンチン（OPN）を同定し、腎結石形成に重要な役割を持つ可能性を示してきた¹⁾。

OPNは骨より同定された44kDaのリン酸化糖タンパク質で、細胞接着ドメインとしてRGD（アルギニン-グリシン-アスパラギン酸）アミノ酸配列を有し、インテグリンやCD44と結合するだけでなく、Ca結合ドメインとしてアスパラギン酸連続配列を有し、ハイドロキシアパタイトと高い親和性も有する²⁻⁵⁾。OPNの発現

Table 1. Preliminary data of osteopontin knockout mouse kidney crystal formation induced by three types of oxalate precursor

administered oxalate precursor			length of administration				
			3days	7days	14days	28days	56days
ethylene glycol							
FD	1%	(0.16mol/l)	0 [0/5]	0 [0/10]	0 [0/8]	0 [0/20]	0[0/4]
	5%	(0.81mol/l)	0 [0/3]	0 [0/5]	0 [0/5]	0 [0/8]	not alive
	10%	(1.61mol/l)	0 [0/3]	0 [0/3]	not alive	not alive	not alive
IAI	100mg/kg (1.61mmol/kg)		0 [0/3]	0 [0/7]	0 [0/5]	0 [0/5]	No data
	1000mg/kg (16.1mmol/kg)		0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/4]	0 [0/3]	No data
	5000mg/kg (80.6mmol/kg)		0 [0/3]	0 [0/3]	not alive	not alive	No data
glycolate							
FD	1%	(0.13mol/l)	0 [0/3]	0 [0/5]	0 [0/3]	0 [0/5]	0 [0/3]
	5%	(0.66mol/l)	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/6]	0 [0/3]
	10%	(1.31mol/l)	0 [0/3]	0[0/5]	not alive	not alive	not alive
IAI	60mg/kg (0.78mmol/kg)		0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/4]	No data
	100mg/kg (1.31mmol/kg)		0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	No data
	120mg/kg (1.57mmol/kg)		0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	not alive	No data
glyoxylate							
FD	1%	(0.14mol/l)	0 [0/5]	0 [0/5]	0 [0/5]	0 [0/5]	0[0/5]
	5%	(0.68mol/l)	0 [0/5]	0 [0/5]	0 [0/5]	0 [0/5]	not alive
	10%	(1.35mol/l)	0 [0/5]	0 [0/5]	not alive	not alive	not alive
IAI	60mg/kg (0.81mmol/kg)		0 [0/3]	0 [0/3]	0 [0/3]	0[0/3]	No data
	80mg/kg (1.08mmol/kg)		0 [0/5]	0.20 [1/5]	0 [0/5]	0 [0/3]	No data
	100mg/kg (1.35mmol/kg)		0.20 [1/5]	1.00 [5/5]	0.40 [2/5]	0 [0/3]	No data
	120mg/kg (1.62mmol/kg)		0.20 [1/5]	not alive	not alive	not alive	No data

FD, free drink; IAI, intraabdominal injection; the value of oxalate precursors indicates the daily injection dose. Square brackets indicate stone formation rates [number of mice showing kidney stone formation / total number of mice administered each oxalate precursor].

は、生理的環境のみでなく粥状動脈硬化、肺癌、歯石、腎結石などの病的石灰化でも認められる⁶⁻⁸⁾。特に腎結石に関しては、OPN アンチセンス発現プラスミド (pTet-OPNas) を導入した腎尿細管培養細胞 (NRK-52E もしくは MDCK) を用いた研究において、OPN アンチセンスを発現した細胞を用いてシュウ酸カルシウムの結晶の付着が抑制されることを報告した⁹⁾。

近年私たちは、遺伝子改変マウスによる尿路結石関連遺伝子の研究に取り組むべく、マウスに腎結石を生じさせる手法を開発した¹⁰⁾。具体的には、尿路結石の成分の一つであるシュウ酸前駆物質グリオキシル酸を連日腹腔内投与することによって、腎尿細管内に結石を形成させる方法である。またこのモデルにおける腎結石形成に際しても、腎尿細管細胞で OPN の発現増加を認めた。

本研究では、OPN ノックアウトマウスを作成し、正常マウスとの結石形成過程を比較することによって、OPN の尿路結石形成における役割を検討した。

1. OPN ノックアウトマウスの作成と genotyping

OPN ノックアウトマウスは、マウス ES 細胞のゲノムの OPN 遺伝子 exon4-7 をネオマイシン耐性遺伝子 (Neo^r) に組変えることによって作成された。マウスの Genotyping は、OPN 遺伝子と Neo^r 遺伝子の存在を PCR 法によって同定することにより行った。産出された OPN ノックアウトマウスは、外観上の特徴や生理的・解剖学的性質に wild-type マウスと有意な差異を認めなかった。

2. 準備実験：シュウ酸前駆物質の投与による結石形成条件の同定

マウスでは、これまで結石を形成させることができないと信じられてきたが、私たちの研究において、シュウ酸前駆物質であるグリオキシル酸の腹腔内投与によってのみ結石形成が認められることが判明している¹⁰⁾。OPN ノックアウトマウスにおいても同様の研究条件が適応できるかを検証するため、シュウ酸前駆物質であるエチレングリコール、グリコール酸、グリオ

キシル酸を自由飲水もしくは腹腔内注射により投与し、準備実験を行った。その結果、80mg/kg以上の濃度のグリオキシル酸の腹腔内投与においてのみ、腎結石の形成を認めた (Table 1)。このため、本実験では、安定した結石形成を観察するために100mg/kgのグリオキシル酸の腹腔内投与を行うこととした。

3. OPN ノックアウトマウスにおける腎結石形成研究

8週齢雄 Wild-type マウスと OPN ノックアウトマウスに対し、生理食塩水 (control) および100mg/kg グリオキシル酸を1週間連日腹腔内投与し腎組織を採取した。腎結石は Pizzolato 染色 (シュウ酸カルシウム染色) で検出され (Figure 1A), von Kossa 染色 (リン酸カルシウム染色) では染色されなかった (Figure 1B)。腎結石は wild-type マウスでは皮髄境界部を中心に扇形に形成され、ノックアウトマウスでは散在性に形成された。結石形成量は、wild-type マウスがノックアウトマウスに比して有意に多かった (Figure 1C)。形成された結石を X 線回折分析にて定性解析したところ、wild-type とノックアウトで形成された結石成分は両群ともシュウ酸カルシウム 1 水和物であることが同定され (Figure 2)、ヒトで形成される結石と同等であることが示された。

結晶の形態学的な検討において、Pizzolato 染色では両群間に差異は認めなかったが (Figure 3AB)、偏光顕微鏡による観察では、有意な差を認めた。すなわち wild-type 群では結晶は花弁状に大きく成長し、ノックアウト群では均一な砂状の結晶の集簇であることが判明した (Figure 3CD)。免疫染色では、OPN 発現は wild-type 群の尿細管管腔側に強く認め、管腔内物質にも OPN が含有されることが認められたが、ノックアウト群では認めなかった (Figure 3EF)。走査型電子顕微鏡の観察では、偏光顕微鏡の特徴と同様に、wild-type 群では結晶が一塊となり放射状に成長した結石像を認める一方、ノックアウト群では、均一な結晶の集簇であった (Figure 4)。

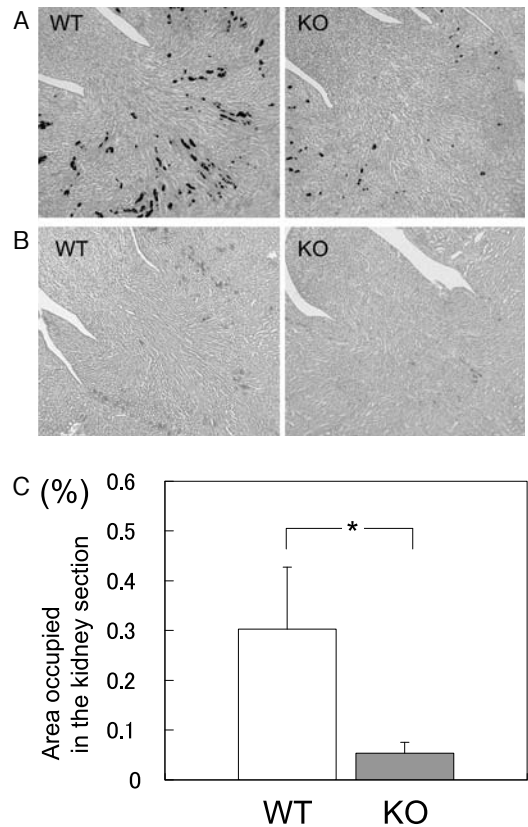


Figure 1. Kidney crystal deposition in wild-type and osteopontin knockout mouse kidney (A) Kidney sections after administration of glyoxylate for one week underwent Pizzolato staining for the detection of calcium oxalate crystals (magnification, x 40). Kidney crystal deposition was detected at the border between the cortex and medulla in wild-type (WT) and osteopontin knockout mice (KO) with 100mg/kg glyoxylate. No kidney crystals were detected in both genotypes administrated saline (data not shown). (B) Von Kossa staining for calcium phosphate crystals could not demonstrate any clearly stained deposits. (C) Differences in the amount of kidney crystals generated by the administration of glyoxylate in wild-type and osteopontin knockout mouse kidneys. The amount of crystallization in each kidney section was quantified by calculating the ratio of Pizzolato-stained regions to the kidney section using NIH image 1.61. Data are presented as the mean \pm SE. * $p < 0.05$ vs. wild-type mice with 100mg/kg glyoxylate.

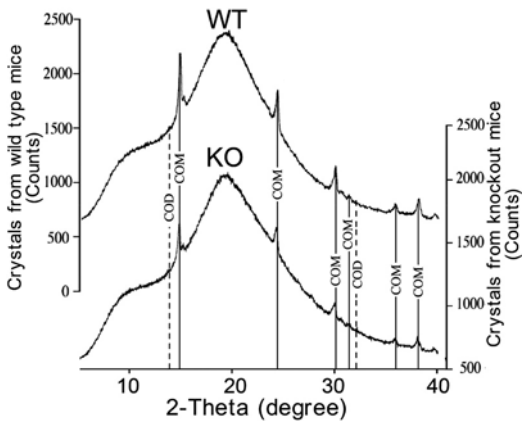


Figure 2. Qualitative analysis of crystals formed by the administration of glyoxylate with X-ray diffraction. Crystal components in wild-type (WT) and osteopontin-knockout (KO) mice kidneys were isolated as calcium oxalate monohydrate crystals (COM) with X-ray diffraction (XRD) analysis. XRD patterns of whole kidney tissue from WT and KO mice are XRD patterns having multiple diffraction peaks characteristic of the registered patterns of calcium oxalate monohydrate in the XRD peak pattern database and no peaks characteristic of calcium oxalate dihydrate (COD) or calcium oxalate trihydrate.

ま と め

本研究において、私たちは形態学的特徴とシュウ酸カルシウム結晶の構造に及ぼす OPN 機能を評価するために、OPN ノックアウトマウスに対してグリオキシル酸投与結石モデルマウスの手法を用いた¹⁰⁾。これまでの報告では、尿管腔内に形成された尿中結晶が、関連無機物質の濃度変化のみで尿管腔内を閉塞させるほど大きく成長することは不可能であるとされている¹¹⁾。このため結晶が結石へと成長する形成起点として、結晶の尿管細胞膜への接着 (crystal-cell interaction) が重要であると考えられており、その中心的役割を果たすのが OPN であると考えられる。一方、諸家においては OPN を結石形成の抑制因子とするとの報告もあり、結石形成への正確な関与に関する議論は未だ結論をみていない¹²⁾。

本研究では、OPN の存在がシュウ酸カルシウム結晶の増大に与える影響を観察した。OPN

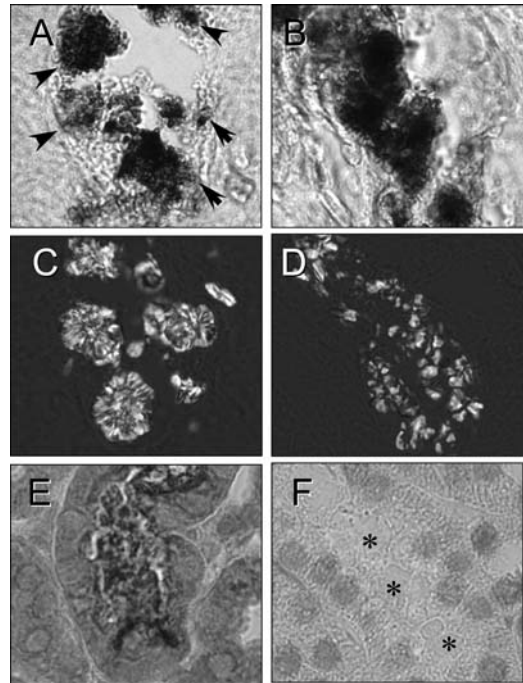


Figure 3. Morphological differences of intratubular calcium oxalate crystals between wild-type (WT) and osteopontin knockout (KO) mouse kidney by the high magnified observation of Pizzolato staining, polarized light optical microphotography and immunohistochemical staining

The indicated sequential sections were obtained from a 100mg/kg glyoxylate-administered mouse kidney (WT: (A), (C) and (E); KO: (B), (D) and (F)) and the same fields were observed (magnification x800). Pizzolato-stained wild-type mouse crystals seemed to adhere to the tubular inner wall (arrows) (A), and knockout mouse crystals seemed to obliterate tubular lumens closely (B). Polarized light optical microscopy showed large rosette and radial-shaped crystals in wild-type mouse kidney (C), whereas small and uniform crystals in the OPN-knockout mouse (D). Immunohistochemical staining showed that OPN protein was involved in wild-type mouse crystals (E), with no involvement of OPN protein in OPN-knockout mouse crystals (F). Asterisks indicate crystal ghosts generated in knockout mouse kidneys (magnification, x100).

が強発現する環境で形成された wild-type マウスの結晶は、花弁状に大きく成長し、ヒトにおける原発性高シュウ酸尿症の結晶形態に非常に類似していた¹³⁾。一方、OPN ノックアウトマウスで形成された結晶は、in vitro において実

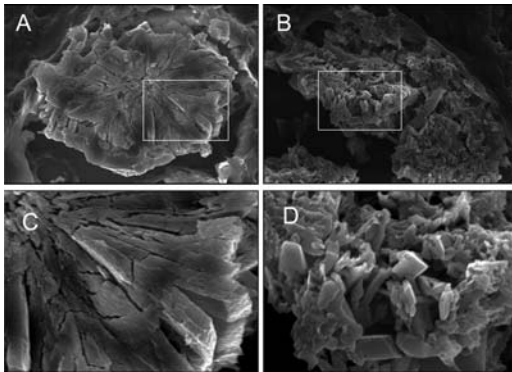


Figure 4. Scanning electron microscopy (SEM) observation of kidney crystal deposition in wild-type and OPN-knockout mice

Crystals generated by intraabdominal injection of 100 mg/kg glyoxylate in wild-type mice and knockout mice (magnification, (A) (B) x6,000, (C) (D) x15,000).

Wild-type crystals were rock-like and rosette-like (A) (C); however, in OPN knockout mice, disordered small crystals aggregated but were discrete, and there were no rosette-shaped large crystals like those easily seen in wild-type kidneys (B) (D).

験的に形成されたシュウ酸カルシウム一水和物の結晶形態と類似していた¹⁴⁾。免疫組織学的な所見も併せると、wild-type マウスの結晶は、OPN を含有することにより「結石」として成長しつつあるが、ノックアウトマウスでは「結晶」の段階で留まっているものと考察される。

本研究の成果より、OPN が腎尿管腔内におけるシュウ酸カルシウム結晶の形態学的変化において、重要な役割を有することが証明された。

謝 辞

このたびは、私たちの研究に対しまして第60回名古屋市立大学医学会賞という大変栄誉な賞を頂き、心より感謝申し上げます。また研究の指導を頂きました郡健二郎先生を始め、結石研究グループの諸先生方、実験助手の皆様、ならびに本研究の根幹となるノックアウトマウスの作成・繁殖および分子生物学的手技のご指導を賜りました大阪大学大学院医学系研究科病理学教室野村慎太郎准教授に対しまして、深く感謝申し上げます。

Reference

- 1) Kohri K, Suzuki Y, Yoshida K, Yamamoto K, Amasaki N, Yamate T, Umekawa T, Iguchi M, Sinozono H, Kurita T: Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding urinary stone protein, which is identical to osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* **184**: 859-864. 1992
- 2) Oldberg A, Franzen A, Heinegard D: Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci* **83**: 8819-8823. 1986
- 3) Ruoslahti E, Pierschbacher MD: New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **238**: 491-497. 1987
- 4) Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H: Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* **26**: 509-512. 1996
- 5) Hunter GK, Kyle CL, Goldberg HA: Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J* **300**: 723-728. 1994
- 6) Kido J, Kasahara C, Ohishi K, Nishikawa S, Ishida H, Yamashita K, Kitamura S, Kohri K, Nagata T: Identification of osteopontin in human dental calculus matrix. *Archs Oral Biol* **40**: 967-972. 1995
- 7) Hirota S, Ito A, Nagoshi J, Takeda M, Kurata A, Takatsuka Y, Kohri K, Nomura S, Kitamura Y: Expression of bone matrix protein messenger ribonucleic acid in human breast cancers. -Possible involvement of osteopontin in development of calcifying foci-Lab. *Invest* **72**: 64-69. 1995
- 8) Hirota S, Imakita M, Kohri K, Ito A, Morii E, Adachi S, Kim HM, Kitamura Y, Yutani C, Nomura S: Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in atherosclerotic plaques. A possible association with calcification. *Am J Pathol* **143**: 1003-1008. 1993
- 9) Yasui T, Fujita K, Asai K, Kohri K: Osteopontin regulates adhesion of calcium oxalate crystals to renal epithelial cells. *Int J Urol*, **9**: 100-108. 2002

- 10) Okada A, Nomura S, Saeki Y, Higashibata Y, Hirose M, Gao B, Yoshimura M, Itoh Y, Yasui T, Tozawa K, Kohri K: Successful formation of calcium oxalate stone in mouse kidney by the injection of glyoxylate intraperitoneally. *Urol Res* **35**: 89-99. 2007
- 11) Finlayson B, Reid F: The effect of allopurinol on calcium oxalate (whewellite) precipitation. *Invest Urol* **15**: 489-492. 1978
- 12) Wesson JA, Johnson RJ, Mazzali M, Beshensky AM, Stietz S, Giachelli C: Osteopontin is a critical inhibitor of calcium oxalate crystal formation and retention in renal tubules. *J Am Soc Nephrol*, **14**: 139-147. 2003
- 13) Kincaid-Smith P, Whitworth JA: Oxalosis. In: *The Kidney*, 2nd ed., edited by Mead O, Oxford, Blackwell Scientific Publications, pp270-271. 1987
- 14) Grases F, Costa-Bauza A, March JG: Artificial simulation of the early stages of renal stone formation. *Br J Urol* **74**: 298-301. 1994