



Title	Mechanism Underlying the Low Prevalence of Pediatric Calcium Oxalate Urolithiasis
Author(s)	桃原, 実大
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54229
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	桃原実大
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 23458 号
学位授与年月日	平成22年2月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Mechanism Underlying the Low Prevalence of Pediatric Calcium Oxalate Urolithiasis (蔞酸カルシウム結石形成メカニズムの解明—小児期における蔞酸カルシウム結石低発生率との関連—)
論文審査委員	(主査) 教授 奥山 明彦 (副査) 教授 大藪 恵一 教授 楽木 宏実

論文内容の要旨

[目的]

我が国における上部尿路結石症の年間罹患率は年々増加傾向にあり、一貫して男性が高率である。年齢別年間罹患率の年次推移では、各年齢層が上昇傾向を示す中、19歳以下の若年層は極めて低率で安定している。また、尿中高分子物質(urinary macromolecules; UMMs)は蔞酸カルシウム結石形成過程(結晶の凝集、成長、細胞との付着)において強い抑制効果をもつことが知られている。最近の研究から蔞酸カルシウム結石形成の初期過程において、誘導された活性酸素種により酸化ストレスが亢進しアポトーシスをきたし尿細管上皮細胞傷害に至るとされる。さらに、細胞傷害により誘導された osteopontin(OPN)や calprotectin(CPT)が結石核を形成し結石原基に至ると考えられている。以上から、小児と成人の UMMs を用い、父子間で細胞傷害抑制効果の相違を検討し、さらに、UMMs 中の成分分析から結石形成に関与する因子を解明し小児低罹患率の原因を究明する。

[方法]

対象は尿路結石症の既往や先天性代謝異常のない男児とその父親。成人 12 名(平均 40.5 歳)、小児 14 名(平均 9.8 歳)。24 時間尿をサンプルとし、尿中生化学検査を施行。酸化ストレスおよび尿細管細胞傷害のマーカーとして、それぞれ 8-Hydroxy-2' deoxyguanosine(8-OHdG)、N-Acetylglucosaminidase (NAG) を測定した。残った尿から UMMs (cut off 値 3kD) を作製し、酸性ムコ多糖(glycosaminoglycans; GAGs) と蛋白質を定量した。尿細管上皮細胞傷害抑制の検討は MDCK 細胞に UMMs を添加し、蔞酸曝露後の上清 LDH で評価した。アポトーシス、酸化ストレスに関しても同様の処理後、それぞれ TUNEL 染色、抗 8-OHdG 免

疫染色にて組織学的検討を行った。また、家系ごとに抽出した蛋白質の SDS-PAGE を行い、発現の相違を検討した。結石核を成す inner core matrix protein である OPN と CPT(calgranulin A(Ca1A) と calgranulin B(Ca1B)の複合蛋白質)や、その他 human serum albumin(HSA), prothrombin fragment 1(PF1), Tamm-Horsfall glycoprotein(western blotting(WB)にて解析した。さらに、蛋白質個々の発現の関連や蛋白質の発現と LDH との関連も統計学的処理にて解析した。

[成績]

小児尿では結石形成促進因子である尿酸、蔞酸、抑制因子であるマグネシウム、ともに有意に高濃度であったが、その他には有意差を認めなかった。UMMs と GAGs は小児で有意に高濃度であったが、UMMs あたりの蛋白質質量では有意差を認めなかった。LDH assay の結果、UMMs 濃度依存的に LDH 値は抑制され、かつ小児 UMMs 処理後では有意に強く抑制された。TUNEL 染色、抗 8-OHdG 免疫染色は、核陽性率にて評価した。いずれも、小児 UMMs 処理後では有意に核陽性が低率であった。SDS-PAGE の結果、25kDa と 50kDa 付近で、父子間にわずかな相違を認めた。WB の結果、OPN, Ca1B, Ca1A では父子間に発現の相違を認めたが、HSA, PF1, THG には相違は認められなかった。特に、OPN と Ca1B の発現は全家系で成人に強く、optical density の評価でも有意差を認めた。さらに、相関係数検定にて OPN と Ca1B の発現、OPN の発現と LDH 値に正の相関を認めた。また、OPN の発現強度により LDH assay を評価したところ、OPN 弱発現では有意に低い LDH 値であった。

[総括]

小児 UMMs は成人 UMMs よりも酸化ストレスおよびアポトーシスを抑制することで蔞酸による尿細管上皮細胞傷害を有意に抑制することが示唆された。小児尿路結石罹患率が低い原因として、尿細管上皮細胞傷害に対し抑制作用を有す UMMs が有意に高濃度であることが関与すると考えられた。さらに、小児 UMMs の尿細管上皮細胞傷害抑制作用により、結晶核形成に協調して作用する OPN と Ca1B は共に downregulation されていることが証明された。特に、小児、成人によらず尿細管上皮細胞傷害の抑制は、inner core matrix protein である OPN の downregulation と相関し、密接に関連していた。以上から、小児尿では、蔞酸カルシウム結石形成の初期段階において、蔞酸による酸化ストレスがもたらすアポトーシスを抑え、尿細管上皮細胞傷害をより強く抑制し、その結果、結晶核形成を成す OPN や Ca1B の downregulation を招き、結石原基の形成が抑えられていると考えられた。

論文審査の結果の要旨

上部尿路結石症の年間罹患率が極めて低率で安定している小児期に着目し、蔞酸による尿細管上皮細胞傷害抑制効果の相違を検討し、さらに、尿中高分子物質(urinary macromolecules; UMMs)の成分分析から結石形成に関与する因子を解明する。

結石形成を抑制する UMMs 量自体が小児で高濃度であった。細胞実験にて小児 UMMs が有意に酸化ストレスを抑制し細胞傷害を抑制した。また、結晶核形成に協調して作用する osteopontin(OPN) と calgranulin B(Ca1B) は共に小児期に downregulation されていることが証明された。さらに OPN と細胞傷害の結果は正の相関を示した。

小児尿では、蔞酸カルシウム結石形成の初期段階において、蔞酸による酸化ストレスがもたらす尿細管上皮細胞傷害をより強く抑制し、その結果、結晶核形成を成す OPN や Ca1B の downregulation を招き、結石原基の形成が抑えられていると考えられた。

こうした内容は結石形成メカニズムの一因を分子生物学的側面から証明できた点で意義深く、学位に値すると思われる。