

[別紙1]

論文内容の要旨

論文題目 活性型ビタミン D₃ 投与ラットの慢性酸負荷による腎結石形成の検討と再発性尿路結石患者におけるクエン酸トランスポーターhNaDC-1 の遺伝子多型について

氏名 岡本直彦

緒言

活性型ビタミン D である calcitriol の副作用として高カルシウム尿がよく知られている。高カルシウム尿は腎結石形成のリスク因子であるが、calcitriol 単独では尿路結石症のリスク因子となるかは定かでない。一方、尿路結石症のリスク因子として酸の前駆物質となる食品を多く摂取することが上げられる。尿路結石症は多因子性疾患であり、様々な代謝性疾患により引き起こされる。このため calcitriol の内服に加え、他の因子が加わることで尿路結石症のリスクが増大する可能性が考えられる。

代謝性アシドーシスは腎結石形成を促進する因子であり、尿中クエン酸排泄の低下と尿中カルシウム排泄の増加が代謝性アシドーシスにおける腎結石形成の 2 大要因である。尿中クエン酸は強力な尿路結石形成抑制因子であり、その作用はカルシウム含有結石の過飽和度を上昇させることによる。尿中クエン酸排泄量の減少は腎近位尿細管の apical membrane におけるクエン酸再吸収の増加により起こると考えられている。腎糸球体でろ過されたクエン酸はその 65~90%が近位尿細管で Na⁺/citrate cotransporter (NaDC-1) により再吸収される。代謝性アシドーシスでは、NaDC-1 の m-RNA および protein 発現量の増加を認め、NaDC-1 が活性化される。代謝性アシドーシスにおける尿中カルシウム排泄量の増加は、腎尿細管でのカルシウム再吸収の減少と骨吸収の増加によると考えられている。我が国では近年尿路結石症患者数が増加しているが、その原因の一つとして食生活の欧米化による動物タンパク摂取の増加が考えられる。食生活の変化による慢性的な酸負荷が calcitriol 投与患者における腎結石形成を促進している可能性が考えられる。

一方、尿路結石症は家族性発症も頻繁に見られることから遺伝的要素も示唆される。再発性尿路結石患者の多くに尿中クエン酸の排泄低下が認められる。これらの原因には様々な代謝異常を認める場合もあるが、明らかな代謝異常を有しないものも多く、遺伝的素因の関与も示唆される。しかしこれまでに尿中クエン酸排泄低下に関与する遺伝子異常の報告はない。

本研究では尿路結石に関し、2つの研究を行った。1つは慢性酸負荷が calcitriol 投与ラットの腎結石形成にどのような影響を与えるか調査することである。2つめは再発性尿路結石患者に多く認められる低クエン酸尿症への遺伝的要素の関与を調査するため、h NaDC-1 遺伝子に認められる I550V 遺伝子多型が尿中クエン酸排泄に与える影響を検討した。

対象と方法

1.ラットをそれぞれ、飲料水として蒸留水を投与される C-C (Control)群、calcitriol を $0.5 \mu\text{g}$ 週3回強制胃内投与され、飲料水として 0.21M NH_4Cl 水を投与される A-V (Acid-Vitamin D)群、A-V 群同様に calcitriol を投与され、飲料水として蒸留水を投与される C-V (Control-Vitamin D)群に分けた。4週間経過後に24時間尿を2回連続で採取した。ラットは麻酔下で sacrifice し、両側の腎臓を摘出した。摘出した左腎を半分に切断し、一方より total RNA を抽出した。もう一方は固定標本とし、腎組織内に沈着した結石の有無を確認した。右腎より凍結組織標本を作成し、カルシウム含有量を測定した。腹部大動脈を穿刺して動脈血ガス分析および血清クレアチニン、カルシウム、リン酸塩、骨吸収マーカーNTXを測定した。左大腿骨を摘出して骨密度を DXA (dual-energy X-ray absorptiometry)法により測定した。Northern blot 法を用い、ラット腎の NaDC-1、osteopontin、18S rRNA の発現量を評価した。

Urinary supersaturation を評価するため、リン酸カルシウムとシュウ酸カルシウムの ion-activity products を Tiselius により提唱された、AP(CaP)、AP(CaOx) インデックスで計算した。

2.再発性カルシウム含有腎結石患者 (RSF) 105 人と年齢を適合させた結石形成を認めない健常対照者 (NSF) 107 人に対し、PCR restriction fragment length polymorphism 法を用いて exon12 を含む fragment を作成し、I550V 遺伝子多型を認識する endonuclease Bcl- I にて genotype を解析した。また24時間尿を2回採取して尿中クエン酸排泄量を計測した。

結果

1.動脈血 pH と血清 HCO_3^- 濃度は3群で差が認められなかった。尿 pH は C-V ラット、A-V ラットではコントロール群に比べて有意に低下していた ($p < 0.05$)。血清カルシウム濃度 ($p < 0.05$)、尿中カルシウム排泄量 ($p < 0.05$) は A-V ラットでは他群に比べ有意に上昇していた。血清リン酸濃度は3群で差が認められず、尿中リン酸排泄量は A-V ラットで他群に比べ有意に増加していた ($p < 0.05$)。A-V ラットのクエン酸排泄量は、他群に比べ有意に低下していた ($p < 0.05$)。

尿中 NTX/Cr 値 (nmol BCE/mmol Cr) は A-V ラットで他の2群に比べ有意に上昇 ($p < 0.05$) し、骨密度は有意に減少 ($p < 0.05$) していた。

C-V、A-V ラットの AP(CaP) 値はコントロール群より低い傾向であり、AP(CaOx) 値は高い傾向であったが、有意差は認められなかった。

腎組織カルシウム含有量は A-V ラットでは他群より有意に多かった ($p < 0.05$)。

摘出した腎組織切片標本を von Kossa 染色することによりカルシウム含有結石の確認を行った。A-V ラットの4匹で腎髄質遠位尿細管内腔や腎盂内に結石の沈着を認めたが、他群ではほとんど認められなかった。結石成分分析の結果はリン酸カルシウムであった。A-V ラットの NaDC-1 および、osteopontin の m-RNA 発現は他群に比べ増加していた ($p < 0.05$)。

2.全体および RSF 群で BB (Bcl- I endonuclease により homozygous に切断される) genotype の者では、bb (Bcl- I により homozygous に切断されない) genotype の者に比べ有意に尿中クエン酸排泄量が低下していた(それぞれ $p<0.01$, $p<0.05$)。さらに低クエン酸尿を呈する群とそうでない群では genotype の distribution が異なっており、全体および RSF 群、NSF 群それぞれでも、BB genotype は低クエン酸尿を呈する群ではそれ以外の群に比べて有意に多かった(それぞれ $p=0.0007$, $p=0.017$, $p=0.028$)。BB genotype の頻度は NSF 群より RSF 群で多かったが、RSF 群と NSF 群の間で BB, Bb および bb genotype の distribution に有意な差を認めなかった。

考察

1.本実験では慢性的な NH_4Cl 摂取により calcitriol 投与ラットの血清カルシウム濃度の上昇と尿中カルシウム排泄量の増加を認めた。骨吸収マーカーである血清 NTX/Cr 値が上昇し、骨密度が減少していることからそのカルシウムの供給源の 1 つとして骨が考えられた。

A-V ラットのリン酸カルシウム尿中過飽和度は低下し、蔭酸カルシウム過飽和度は上昇していたが、有意差を認めなかった。しかし A-V ラットで形成された結石の成分はリン酸カルシウムであった。過飽和度の結果と結石成分の矛盾の原因は明らかではない。

一般的に慢性代謝性アシドーシスにおける尿中クエン酸排泄量低下は腎代謝によるとされている。本実験ではこれまでの報告と同様、ラットでは慢性的に NH_4Cl 摂取させることで、尿中クエン酸排泄量の減少とともに腎 NaDC-1 m-RNA 発現の増加を認めた。これまでの研究でも代謝性アシドーシスにおいて NaDC-1 protein 発現および活性の増加が報告されている。

腎結石形成を認めた A-V ラットで osteopontin m-RNA の発現が増加していた。osteopontin は結石のマトリックスであり、結石形成に伴って認められる。最近の研究では、osteopontin は CaOx の結晶化を抑制することが示されており、本研究でリン酸カルシウム結石形成ラットでも osteopontin m-RNA 発現の増加を認めたことから、腎におけるリン酸カルシウム結石形成を抑制する作用も担っている可能性が考えられる。

2.hNaDC-1 遺伝子の I550V 遺伝子多型では B allele が尿中クエン酸排泄量低下に影響し、このアミノ酸の変化がクエン酸輸送機能に影響を及ぼしている可能性が考えられた。また本研究では RSF において各 genotype の尿中クエン酸排泄量に有意差を認めたが、NSF ではこの差は有意でなかった。この原因として両群の食事内容の差異が考えられ、これらが両群における尿中クエン酸、シュウ酸、カルシウム排泄量の差異に影響を与えていると推察された。

まとめ

calcitriol 投与ラットにおいて慢性酸負荷により腎にリン酸カルシウム結石の形成を認め、血清カルシウム濃度、尿中カルシウムおよびリン酸排泄量、尿中 NTX/Cr 値の上昇とともに、尿中クエン酸排泄量、骨密度の低下を認めた。このことから calcitriol を処方されている患者では酸前駆物質の豊富な食事を慢性的に摂取することが、リン酸カルシウム腎結石形成のリスク因子となると考えられる

h NaDC-1 遺伝子の I550V 遺伝子多型では B allele が尿中クエン酸排泄量低下に寄与している可能性が示唆された。