

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	機能再建・再生科学領域 泌尿器移植再生医学分野 氏名 阿南 剛
<p>(論文題目)</p> <p>The Impact of Glycosylation of Osteopontin on Urinary Stone Formation. (尿路結石形成に関連するオステオポンチン糖鎖変異)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>【背景】</p> <p>尿路結石症は、生活習慣病の一疾患であり、本邦では尿路結石罹患数が年間約 11 万人、5 年で約 45% の人が再発する。そのため、尿路結石症の成因の究明と再発予防法の確立は喫緊の課題であるが、画期的な診断法、再発予防、治療薬などは開発されていない。オステオポンチン(OPN)は尿路結石形成に必要なマトリックスタンパク質の 1 つで N 型糖鎖・O 型糖鎖が修飾された糖タンパク質である。これまでタンパク質、遺伝子に焦点をあてた OPN と尿路結石に関する研究は報告されているが、OPN 糖鎖と尿路結石の関連を検討した研究はない。</p> <p>本研究では、尿路結石患者と健常者の OPN の糖鎖変化と尿中 OPN の糖鎖変化が尿路結石形成に関連するか検討した。</p> <p>【方法】</p> <p>① 後ろ向き横断研究として、尿路結石患者 110 名と健常者 157 名の尿中 OPN 濃度を ELASA 法で測定し、尿中 OPN 糖鎖をレクチンアレイおよびレクチンブロッティングにて検索した。267 名の尿検体 15mL を VIVASPIN TURBO 15 (分画分子量 3000) にて濃縮し、凍結乾燥、BCA 法でタンパク質濃度を測定した。尿中タンパク質濃度として、2 mg/mL に調製した。尿中タンパク質濃度を調整した尿中 OPN 濃度を ELISA 法で測定し、尿中 OPN 糖鎖プロファイルをレクチンアレイ、ウェスタンブロッティング、レクチンブロッティングで解析した。</p> <p>② 前向き縦断研究にて、尿路結石患者 21 名の経尿道的尿管碎石術 (TUL) 前後の尿を採取し、尿中 OPN 濃度および尿中 OPN の糖鎖変異を検索した。後ろ向き研究から得られた Gal3C-S レクチン反応性 OPN 測定値より尿路結石を感度 90% で予測できる値を cut off 値とし、TUL 後残石なし群 (14 例) と TUL 後残石あり群 (7 例) に分けて経時的に比較検討した。</p> <p>③ 統計学的解析は Graphpad Prism 8、XLSTAT-Biomed、R を用いて行った。群間比較は Mann-Whitney U-検定、複数グループの差異については Kruskal-Wallis 検定を用いて分析した。尿中 OPN 濃度と糖鎖変異 OPN の検討は receiver operating characteristic (ROC) 曲線を用いて行った。P<0.05 を統計的有意と判定した。</p> <p>【結果】</p> <p>① 後ろ向き研究から、尿路結石患者は健常者と比べ尿中 OPN 濃度は有意に減少した (p<0.001)。</p>	

- ② 一方、レクチンアレイにて 21 種類の糖鎖変異 OPN 量を測定したが、4 種類のレクチン反応性 OPN が尿路結石群で増加を認めた。ROC 解析の結果から、尿路結石予測における AUC が最も高い、Gal3C-S レクチン反応性 OPN (Gal3C-S-OPN) に注目した。Gal3C-S レクチンの反応性から、ムチン型 O 結合型糖鎖が修飾された OPN が結石患者で増加していることが示唆された。さらにポリラクトサミン糖鎖を認識するトマトレクチン (LEL レクチン) によるレクチンブロッティングにて、尿路結石患者では健常者と比較して、LEL レクチン反応性 OPN のバンド強度が出て増加していることを確認した。ポリラクトサミン構造は、ムチン型 O 結合型糖鎖に修飾される事がよく知られており、結石患者では、ポリラクトサミン構造を有するムチン型 O 結合型糖鎖に修飾された OPN が増加することが示唆された。以上より、Gal3C-S-OPN は尿路結石患者で有意に増加し、尿路結石患者の尿中 OPN の糖鎖構造変化が明らかとなった($p<0.001$)
- ③ Gal3C-S-OPN と OPN 濃度から尿路結石患者を感度 90%、特異度 92%(AUC0.953) で予測可能であった。
- ④ 前向き縦断研究から、TUL 後残石なし群 (14 例) では 92.8%で結石治療後 Gal3C-S-OPN が cut off 値を下回り、TUL 後残石あり群 (7 例) では 71.4%で結石治療後 Gal3C-S-OPN が cut off 値を上回った。このことから尿路結石消失とともに Gal3C-S-OPN は減少し、尿路結石残存症例では Gal3C-S-OPN が高値であることが明らかとなった。

【結論】

尿路結石患者では健常者と比較して、尿中 OPN 濃度は有意に減少したにも関わらず糖鎖変異 OPN(Gal3C-S-OPN)が有意に増加していた。尿路結石の有無と Gal3C-S-OPN 量が関連していることから、OPN 糖鎖変異が尿路結石診断、再発予測に関する糖鎖性バイオマーカーに成り得る可能性が示唆された。今後さらに検討を重ね、尿中 OPN の糖鎖構造解析、Gal3C-S-OPN に関わる糖転移酵素の解析を行い、Gal3C-S-OPN が結石形成過程においてどのような意義を持つのか詳細に検討する必要がある。