

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08418

研究課題名(和文) 痛風における動脈硬化促進の分子機序の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of uric acid for promoting atherosclerosis

研究代表者

河野 肇 (Kono, Hajime)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：60585074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：痛風患者では心血管イベントが高頻度に発生する。しかし尿酸が動脈硬化を促進させるその分子機構は明らかではなかった。尿酸が炎症を惹起する分子機構としてAMPK、mTOR、ミトコンドリア活性酸素、HIF-1 を介したインフラマソームとIL-1の活性化が示され、尿酸低下マウスを用いて尿酸の動脈硬化における重要性を示され、さらにヒトにおける尿酸低下療法とその炎症への関与が示された。以上により、痛風患者における重要な予後規定因子である動脈硬化、および尿酸が惹起する炎症性病態分子メカニズムとそれによる新たな介入点、さらにヒト臨床におけるその重要性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高尿酸血症は動脈硬化における増悪因子と想定されており、実際痛風患者では心血管イベントが高頻度に発生する。しかし動脈硬化を阻止するために尿酸を低下させるのが良いのかどうかは明らかではなかった。我々はマウスと細胞を用いた基礎実験において尿酸が炎症を引き起こし、動脈硬化を促進させる事を解明した。また、その分子機序も明らかとなった。本研究の結果、動脈硬化の進展阻止において尿酸降下療法の裏付けが得られ、新たな治療介入点も明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Uric acid is supposed but not yet determined to be associated with atherosclerosis. We determined whether the physiological level of soluble uric acid promotes inflammation and develops atherosclerosis. The secretion of IL-1 from human peripheral blood mononuclear cells mediated by NLRP3 (NACHT, LRR, and PYD domain-containing protein 3) inflammasome was promoted by physiological levels in serum uric acid. This augmentation of inflammation was mediated by the regulation of the AMPK (AMP-activated protein kinase)-mTOR (mammalian target of rapamycin) mitochondrial reactive oxygen species and HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) pathway. The data indicate that the development of atherosclerosis and inflammation is promoted by uric acid in vivo. Moreover, the lowering of uric acid levels attenuated inflammation via the activation of the AMPK pathway. This study provides mechanistic evidence of uric acid-lowering therapies for atherosclerosis.

研究分野：動脈硬化

キーワード：動脈硬化 尿酸 AMPK インフラマソーム HIF-1 ミトコンドリア活性酸素 IL-1

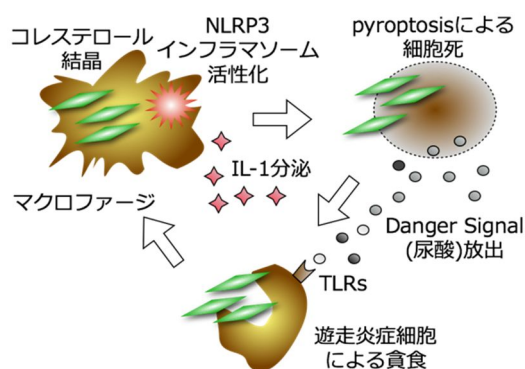
## 1. 研究開始当初の背景

痛風は、長期にわたり高尿酸血症が持続することで、関節腔内に尿酸ナトリウム結晶(MSU 結晶)が沈着し、関節炎を来す疾患である。本邦において、痛風の有病率は 30 歳以降の男性では 1%を超え、その原因となる高尿酸血症は 30 代以降の男性の 30%に認められる。また、これらの有病率は年々増加傾向にある。痛風・高尿酸血症は生活習慣病の1つと考えられており、プリン体の多い肉類の摂取、アルコール摂取、フルクトースの過量摂取などが痛風発症のリスクとして知られ、逆に適度な運動は発症リスクが抑制される。また高血圧等の生活習慣病、メタボリックシンドロームとの合併も多く、血清尿酸値の上昇とともに、メタボリックシンドロームの頻度が上昇する。そして、痛風および高尿酸血症はその他の生活習慣病と同様に、動脈硬化症と関連し心血管・脳血管イベントのリスクである可能性が高いことが知られている。

近年高尿酸血症と動脈硬化性疾患との関連について複数のメタ解析の結果が報告され、高尿酸血症群では、心血管イベント関連死 相対リスク比 1.37 (95% CI 1.19-1.57)と有意な相対リスク比の上昇が認められた(Zhao G et al. *Atherosclerosis*; 231: 61-8, 2013)。また Li らは、高尿酸血症が脳卒中発症(相対リスク比 1.22 [95% CI 1.02-1.46])および脳卒中関連死(相対リスク比 1.33 [95% CI 1.24-1.43])の、いずれにおいても独立したリスク因子であることを報告している (Li M et al. *Atherosclerosis*; 232: 265-70, 2014)。このようなメタ解析の結果は、高尿酸血症を有することが動脈硬化性疾患の独立したリスク因子であることを支持している。しかし、尿酸低下療法によって虚血性心疾患や脳卒中の発症が抑制されることを示す前向き臨床研究は行われておらず、動脈硬化性疾患の予防として高尿酸血症をターゲットにすべきとのエビデンスは得られていない。

動脈硬化症は心筋梗塞や脳梗塞の原因となる基礎疾患であり、非がん疾患死における生命予後を規定する主要因子である。さらには死に至らないまでも心血管イベントを通じて心肺機能低下による行動制限、麻痺、認知症など、ADL 低下を引き起こし健康長寿の実現の妨げとなる。動脈硬化症のリスク因子としては高血圧、脂質異常症、糖尿病、喫煙などが挙げられているが、それらのリスク管理による心血管イベント抑制の効果には天井効果があることが知られており、薬物療法による残余リスク(residual risk)と呼ばれている。この残余リスクの解消には、新規の動脈硬化症のメカニズム解明に基づいた治療の実現が求められている。しかし前述したように、前方視的な介入研究は行われておらず、現時点では尿酸が残余リスクの一因子であるかは明らかではない。

動脈硬化は元来、動脈壁の内皮下における脂質蓄積がその病態のすべてと考えられてきたが、その発症、進展、アテロームコアの破綻と閉塞性機転に至るまでのほぼすべての病態において炎症が重要な役割をはたしている疾患であることが明らかとなってきた。特にマクロファージを始めとする自然免疫系細胞、接着分子、IL-1などのサイトカインの重要性の理解が進んだ。その結果、動脈硬化をおこしている動脈壁においては低レベルの自然炎症が持続していることが推察される一方、その開始、維持メカニズムについての統合的な理解は得られていない。



進展した粥状硬化巣にはコレステロール結晶が集積していることは以前より知られていたが、脂質蓄積の無害な最終形態であると想定されていた。申請者らコレステロール結晶が動脈硬化の病初期から認められること、コレステロール結晶はインフラマソーム活性化により IL-1 を始めとした炎症性サイトカインを誘導すること、さらにはインフラマソーム活性化が動脈硬化において重要な役割を果たしていること明らかにした(研究業績 25)。インフラマソーム活性化はパイロプトシスと呼ばれる炎症性の細胞死を惹起し、danger signal を放出し、さらなる炎症細胞をリクルートする。このように脂質の蓄積がコレステロール結晶の形をとった際に持続的炎症サイクルが開始すると考えられる(図)。上述したように尿酸は danger signal であるが、動脈硬化においてその炎症持続に関与するかは明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究においては、尿酸が動脈硬化を促進させる因子であるかどうかについて、そのメカニズムをインフラマソーム活性化にあると仮説を立て、基礎的メカニズムの検討を行うとともに、マウスにおける動脈

硬化の検討を行い、ヒトにおける投薬による尿酸降下療法の炎症に与える意義の検討も行う。この研究を通じて、danger signal でもある尿酸が動脈硬化における役割を明らかとする。尿酸降下薬は長年一般臨床において用いられており、その高い安全性が確立しているため、残余リスクを減少させることが明らかとなった場合には治療介入として広く用いられることは想像に固くない。また、IL-1 阻害薬は自己炎症性疾患を対象として既に上市されており、ハイリスク例においてはその適応が想定される。

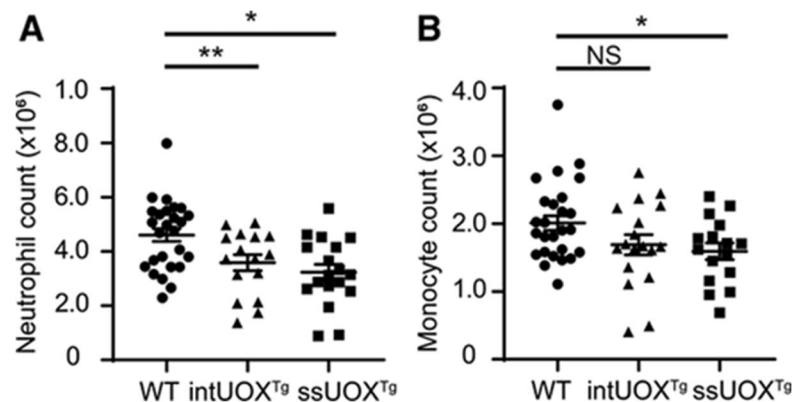
### 3. 研究の方法

- (1) ヒト末梢血単核球、インフラマソーム活性化レポーター細胞(RAW264.7細胞とHEK293T細胞)を用いての、尿酸による炎症反応の分子機構、特に IL-1 分泌とインフラマソーム活性化機構の解明 (in vitro)
- (2) マウス動脈硬化モデル(LDL 受容体欠失、ApoE 欠失マウス)において、血清尿酸値への介入による動脈硬化の検討を行う。血清尿酸値介入の方法として、(a)ウリカーゼトランスジェニック、ウリカーゼ欠失の遺伝子改変を重ねて導入、(b)薬剤(アロプリノール、プロベネシド)投与を行う。
- (3) ヒト生体内における血清尿酸値のインフラマソーム活性化への影響の検討。

### 4. 研究成果

#### 1) ウリカーゼ遺伝子導入マウスではコレステロール結晶による急性炎症が抑制される

動脈硬化病変では、プラーク進行の初期段階からコレステロール結晶が沈着し、IL-1 やNLRP3インフラマソームを介した炎症を介して病態に重要な役割を果たしている。コレステロール結晶による炎症における尿酸の役割を明らかにするために、尿酸の代謝が亢進し、体内の尿酸量が減少したウリカーゼトランスジェニックマウスの腹腔内にコレステロール結晶を注入した。



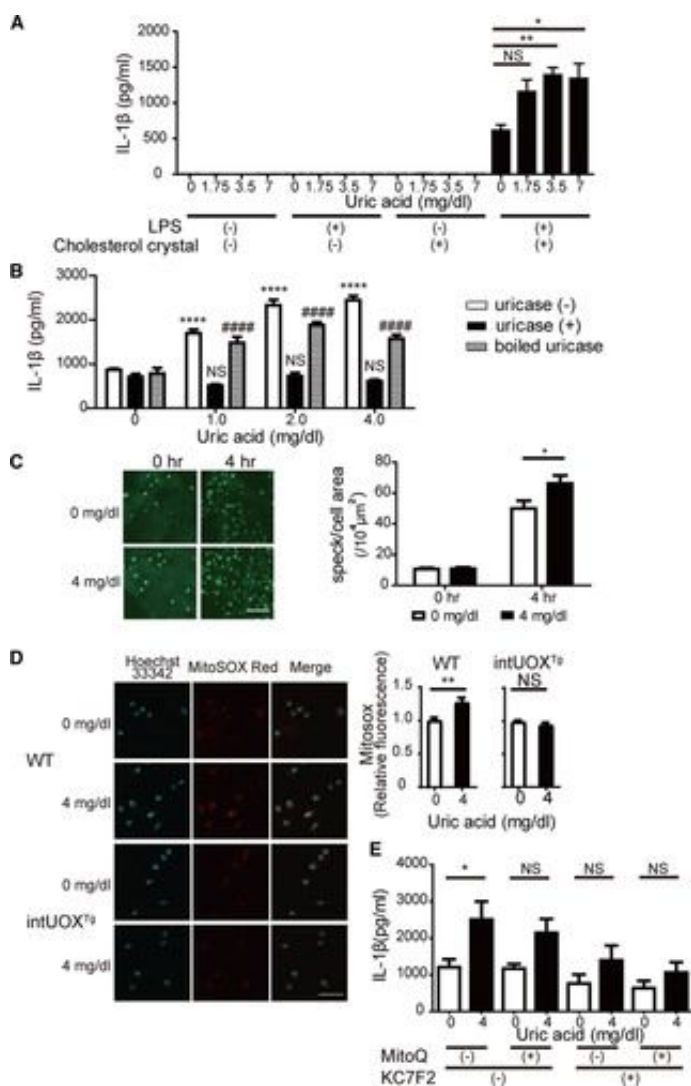
ウリカーゼトランスジェニックマウスには、2種類(分泌型と細胞内型)を使用した。前者(ssUOX<sup>Tg</sup>)のマウスは、細胞外に分泌するためのシグナルペプチドを持つウリカーゼを発現しており、トランスジェニックのSUA値はコントロールよりも低い値を示した。後者(intUOX<sup>Tg</sup>)は、シグナルペプチドを持たないウリカーゼを発現しているため、ウリカーゼが細胞内に留まり、細胞内の尿酸プールが減少している。私たちは、この2種類のウリカーゼトランスジェニックマウスを用いて、尿酸が細胞外や細胞内の炎症経路のどこに影響を与えるのかを明らかにした。

コレステロール結晶に反応した好中球の浸潤が、ウリカーゼトランスジェニックマウスの両系統で有意に減少した(図1A)。単球については、ssUOX<sup>Tg</sup>マウスでは細胞の浸潤が有意に減少したのに対し、intUOX<sup>Tg</sup>マウスでは浸潤した細胞の数が減少したが、WT(野生型; 図1B)との有意差はなかった。

#### 2) 可溶性尿酸は、HIF-1 とミトコンドリア活性酸素の活性化を介して、NLRP3インフラマソームに依存したIL-1の分泌を促進する

炎症細胞からのIL-1の分泌は、シグナル1とシグナル2の2つの経路を介して行われる。シグナル1の経路では、プロ-IL-1 やNLRP3が産生される。シグナル2経路では、NLRP3インフ

ラマソームの活性化を介して、プロ-IL-1 が成熟型 IL-1 に変換される。我々は、ヒト hPBMC を生理的レベルの尿酸を含む培地で培養した後、シグナル 1 の活性化物質であるリポ多糖とシグナル 2 の活性化物質であるコレステロール結晶で刺激した。リポ多糖とコレステロール結晶のどちらか一方だけで刺激した hPBMC では、IL-1 は分泌されなかった。リポ多糖とコレステロール結晶の両方で刺激すると、IL-1 の分泌が誘導され、尿酸値の上昇に伴って IL-1 の分泌促進が認められた (図 2A)。ウリカーゼを添加して尿酸値を低下させると、IL-1 の分泌が有意に抑制された (図 2B)。次に、可溶性尿酸とシグナル 1 経路の関連性を調べた。プロ-IL-1 の mRNA およびタンパク質、NLRP3 タンパク質の発現は、リポ多糖単独での刺激では、尿酸値の影響を受けなかった。しかし、リポ多糖とコレステロール結晶の両方で刺激すると、プロ-IL-1 の発現が尿酸によって有意に増加した。尿酸は、HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) の発現を増強することが示されている。HIF-1 は、そのエンハンサー要素と結合することでプロ-IL-1 の発現を増加させる。尿酸によるプロ-IL-1 の増加は、HIF-1 阻害剤である KC7F2 の添加によって抑制されたが、IL-1 の分泌は KC7F2 の影響を受けなかった。



次に、可溶性尿酸のシグナル 2 経路への影響を調べた。シグナル 1 の影響を受けずにシグナル 2 経路を擾乱するために、NLRP3 とセルリアンに結合した ASC を含むアポトーシス関連スベック様タンパク質を安定的に過剰発現させた HEK293T 細胞 (ASC-セルリアン) を用いて、インフラマソーム活性化レポーター細胞を開発した。

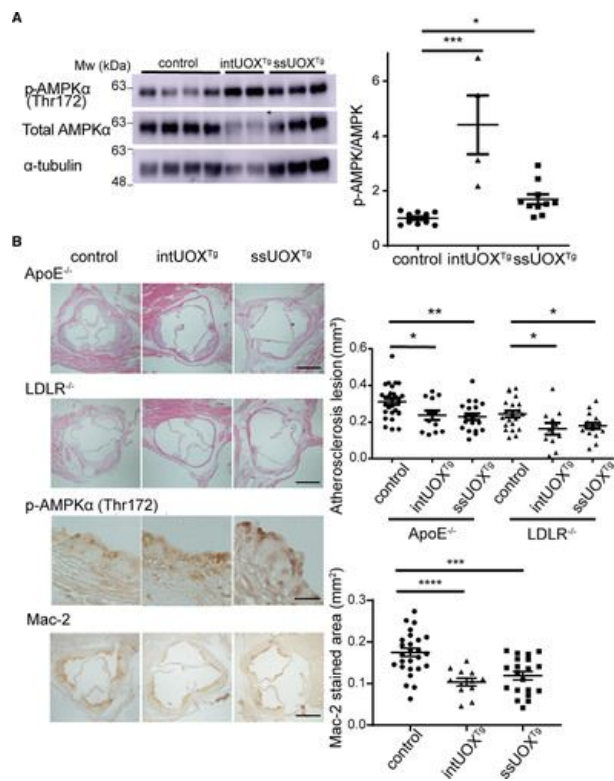
まず、レポーター細胞を、尿酸を含むまたは含まない培地でインキュベートした。尿酸のみのインキュベーションでは、インフラマソーム複合体の形成に影響を与えなかった。次に、0 または 4mg/dL の尿酸を含む培地でレポーター細胞を培養した後、NLRP3 インフラマソーム活性化剤であるニゲリシンで細胞膜を損傷して刺激した。ニゲリシンで刺激した後、尿酸を添加したレポーター細胞では、インフラマソームの形成が有意に増加した (図 2C)。

活性酸素は、NLRP3 インフラマソームの活性化に関与することが報告されている<sup>22</sup>。我々は、リポ多糖刺激後の hPBMCs の細胞質における活性酸素の発生が、尿酸によって有意に上昇することを見出した (図 IIA in the online-only Data Supplement)。さらに、活性酸素消去剤である N-アセチルシステインは、NLRP3 活性化レポーター細胞における NLRP3 インフラマソーム複合体の形成が尿酸によって増加するのを抑制した (図 IIB in the online-only Data Supplement)。尿酸とインキュベートした hPBMCs 間の IL-1 の分泌量の増加は、N-アセチルシステインの添加により減少した。また、HIF-1 が NLRP3 インフラマソームに及ぼす影響を調べたところ、KC7F2 は尿酸による NLRP3 インフラマソーム複合体の形成に影響を及ぼさなかった。その結果、WT マクロファージでは、可溶性尿酸がミトコンドリア活性酸素の産生を促進することがわかった。しかし、可溶性尿酸は intUOX $^{1-/-}$  トランスジェニックマクロファージには影響を与えなかった (図 2D)。ミトコンドリア活性酸素阻害剤であるミトキノン<sup>23</sup>を hPBMCs に添加したところ、尿酸による IL-1 の増強を部分的に減少させることができた。また、KC7F2 をさらに加えると、尿酸による IL-1 の増強が弱まった (図 2E)。

3) 尿酸値を下げると AMPK が活性化され、HFD を摂取したマウスの動脈硬化病変の進展が抑制される

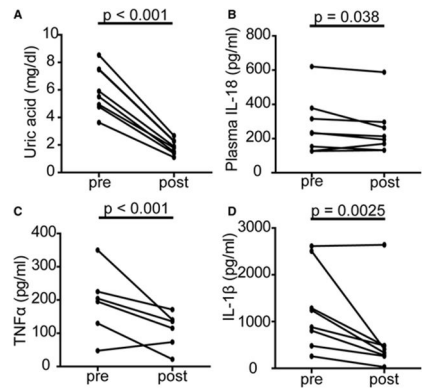


ウリカーゼのトランスジェニックマウスにおける動脈硬化性プラークの形成を検討した。ssUOXTg および intUOXTg の両系統は、動脈硬化モデルマウス (ApoE<sup>-/-</sup> および Ldlr<sup>-/-</sup>) と数回交配し、ApoE<sup>-/-</sup>/Ldlr<sup>-/-</sup>ウリカーゼトランスジェニックを作製した。その後、これらを再び C57BL/6J ApoE<sup>-/-</sup> または C57BL/6J Ldlr<sup>-/-</sup> マウスと戻し交配し、子孫に HFD を 16 週間与えた。ApoE<sup>-/-</sup> または Ldlr<sup>-/-</sup>ウリカーゼトランスジェニックマウスの SUA 濃度は、対照マウスよりも低い傾向にあった。intUOXTg マウスおよび ssUOXTg マウスと交配した ApoE<sup>-/-</sup> マウスの白血球の AMPK 活性は、対照マウスよりも高かった (図 4A)。大動脈根の動脈硬化プラークの大きさは、intUOXTg マウスと ssUOXTg マウスの両方で、対照の ApoE<sup>-/-</sup> マウスと LDLr<sup>-/-</sup> マウスに比べて有意に小さかった (図 4B)。免疫染色で phospho-AMPK (Thr172) を検出すると、AMPK の活性化はプラークの表層でのみ観察され、ウリカーゼトランスジェニックマウスの両系統で増強されていた (図 4B)。



#### 4) ベンズプロマロンはヒトの炎症細胞の活性化を低下させた

次に、体内の尿酸量の減少が生体内の炎症誘導に及ぼす影響をヒトで測定しました。高尿酸血症や痛風などの基礎疾患を持たない健康な成人 8 名 (男性 4 名、女性 4 名、年齢 21~50 歳、平均  $29.5 \pm 4.1$ ) を対象とした。高尿酸血症や痛風などの基礎疾患を持たない成人 (男性 4 名、女性 4 名、年齢 < 50 歳、平均  $29.5 \pm 4.1$ ) を対象に、尿酸降下薬であるベンズプロマロン (150mg/日、1 回あたり) を 2 週間投与した。また、ベンズプロマロン投与の前後に血液を採取した。血漿中の平均尿酸値は、ベンズプロマロン投与後、 $6.0 \pm 0.6$  mg/dL から  $1.9 \pm 0.2$  mg/dL に低下した (図 5A)。平均血漿中の IL-18 濃度は  $273 \pm 59$  から  $248 \pm 53$  pg/mL へと有意に低下した (図 5B)。IL-18 は、NLRP3 インフラマソームの活性化に関係するサイトカインである 27。また、血漿中の IL-18 レベルは、血漿中の尿酸レベルと有意ではないが正の相関があることがわかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kimura Yoshitaka, Yanagida Tamiko, Onda Akiko, Tsukui Daisuke, Hosoyamada Makoto, Kono Hajime	4. 巻 40
2. 論文標題 Soluble Uric Acid Promotes Atherosclerosis via AMPK (AMP-Activated Protein Kinase)-Mediated Inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 570 ~ 582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/ATVBAHA.119.313224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	本田 善一郎  (Honda Zen-ichiro)  (70238814)	お茶の水女子大学・保健管理センター・教授    (12611)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------