

令和元年6月18日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15200

研究課題名（和文）痛風発作発症の病態メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of gout attacks

研究代表者

沢村 達也（Sawamura, Tatsuya）

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：30243033

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：痛風発作は尿酸結晶により引き起こされる激しい炎症により激痛を伴う関節炎である。しかし、その炎症のメカニズムはいまだ不明である。本研究では、この炎症メカニズムと痛風発作の病態生理の解明を目指して研究を行い、尿酸結晶を認識する受容体Xを見出した。さらに、受容体Xがマクロファージや好中球において機能し、尿酸結晶により引き起こされる炎症反応を促進することが明らかとなった。尿酸結晶による関節炎モデルで実験を行うと、受容体X遺伝子欠損マウスでは症状が軽減されることを示した。これらのデータから受容体Xが痛風発作の病態生理に重要である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

痛風は100万人近い患者が通院し、原因となる高尿酸血症も500万人以上の患者がいる疾患である。しかし、痛風への治療は、高尿酸血症を対象としたものが主体となり、痛風発作に関してはコルヒチンがヒポクラテス以来数千年間使用され続けている。本研究により、痛風発作のメカニズムが解明できれば、コルヒチン効果を説明するのみにならず、新規メカニズムに基づく痛風発作治療薬を創出できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Acute gout attack is an arthritis accompanied with severe pain. The severe inflammation in the gout attack is thought to be triggered by uric acid crystals. However, it is still unclear how the inflammation is triggered. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of promoting inflammation by uric acid crystals and the pathophysiology of gout attack. Here, we found receptor X recognizes uric acid crystals. We also found that receptor X functioned in macrophages and neutrophils to promote the inflammatory response triggered by uric acid crystals. Furthermore, receptor X-gene deletion alleviated the symptoms of uric acid crystal-induced mouse arthritis model. These data suggested the involvement of the receptor in the pathogenesis of gout attack.

研究分野：血管医学、薬理学

キーワード：痛風 尿酸結晶 受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

痛風は100万人近い患者が通院し、その原因となる高尿酸血症も500万人以上の患者がいる疾患である。痛風の原因としての高尿酸血症を理解するため、ヒトにおけるプリン体の代謝最終産物である尿酸の代謝は、その排泄・再吸収のトランスポーターを含め多くの検討がなされてきた。一方で、痛風発作の発症には尿酸結晶が大きな役割を果たしていると考えられているが、それによる発作のメカニズムは明らかではない。

これまでに、TLR4が尿酸を認識するという話や、尿酸結晶のエンドサイトーシスにより、ライソゾームが傷害され、それが炎症につながるという考え方はあった。しかし、近年になり、シリカ、アスベスト、コレステロール結晶、尿酸結晶によりインフラマソームが活性化することが見出されたことにより、尿酸結晶がシグナル伝達のエフェクターとしてのインフラマソームを活性化することが重要であるというコンセンサスができてきた。ところが、肝心の尿酸結晶認識からインフラマソーム活性化の間のメカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、尿酸結晶を認識する受容体を明らかにし、尿酸結晶による炎症促進メカニズムと痛風発作の病態生理を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 尿酸結晶作製: MilliQ水80mlにNaOH80mgを溶解後、尿酸336mg(Sigma U2625)を入れ、60の水浴中で加温しながら溶解した。ろ過滅菌後、4で冷却し結晶化させた。これにより針状の尿酸結晶が得られ、動物への投与または細胞へ添加の前に、1分間超音波処理し、断片化・均一化させて使用した。

(2) 尿酸結晶を認識する受容体同定: 受容体細胞外ドメインにタグを付加した蛋白質をコードするcDNAを発現ベクターに入れ、培養哺乳動物細胞にトランスフェクションした。培養上清中に分泌された可溶性の組換え受容体蛋白質を精製した後、組換え受容体蛋白質の尿酸結晶への結合を解析した。また、受容体cDNAの強制発現細胞への尿酸結晶の結合を検討した。

(3) 尿酸結晶誘発性関節炎モデルの作製: 野生型マウス(C57BL/6J, 雄性, 8週齢)の足関節に尿酸結晶を投与し、時間経過を追って足浮腫を測定した。対照として、尿酸結晶を注射した側とは別の足に生理食塩水を投与し比較した。

尿酸結晶誘発性関節炎への受容体Xの関与について検討するため、本モデルを用いて、受容体X遺伝子欠損マウスとの比較を行った。

(4) 尿酸結晶依存性の細胞応答解析: 痛風発作時、尿酸結晶はマクロファージや好中球に作用し、インフラマソーム活性化やNETs放出(クロマチンの細胞外放出)を引き起こすことが知られている。そこで、マウスからマクロファージを単離培養し、尿酸結晶刺激による炎症性サイトカインIL-1産生を、ELISA法を用いて測定した。また、マクロファージ様に分化させたTHP-1細胞でも同様の実験を行った。

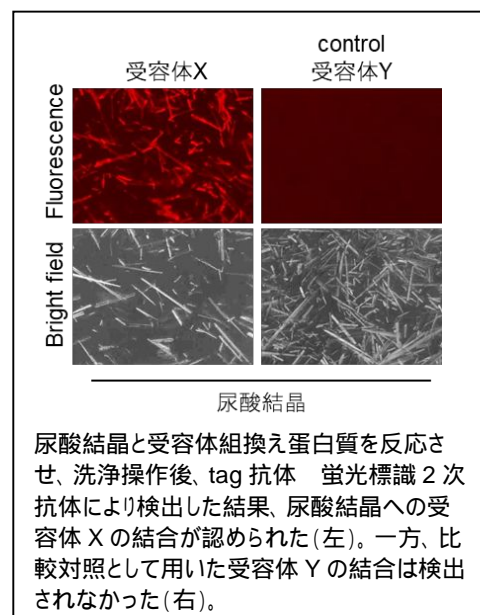
好中球については、ヒト末梢血由来好中球を用いて、尿酸結晶によるNETs形成を顕微鏡下で形態学的に観察・評価した。

4. 研究成果

(1) 尿酸結晶を認識する受容体について検討した結果、炎症促進性分子として知られている受容体Xが、尿酸結晶を認識することを明らかにした(右図)。

(2) 尿酸結晶誘発性関節炎モデル解析の結果、野生型マウスでは、足関節に尿酸結晶を投与すると、対照の生理食塩水を投与した場合に比べ、時間経過とともに足関節浮腫が増大し、炎症を引き起こしていることが観察された。一方、受容体X欠損マウスでは、尿酸結晶投与後の時間経過に伴う浮腫が、野生型に比べて優位に抑制されていた。このことから、受容体Xが尿酸結晶誘発性関節炎に関与していることが示唆された。

(3) 尿酸結晶依存性の細胞応答解析の結果、野生型マウスから単離したマクロファージでは、尿酸結晶刺激によりIL-1産生亢進が認められた。一方、受



容体 X 欠損マウス由来のマクロファージでは、尿酸結晶依存性の IL-1 産生が抑制された。また、マクロファージ様に分化させた THP-1 細胞でも、尿酸結晶刺激により受容体 X 依存的な IL-1 産生亢進が認められた。好中球では、尿酸結晶刺激により、やはり受容体 X 依存的な NETs 形成が認められた。

以上より、受容体 X はマクロファージや好中球において尿酸結晶の受容体として機能し、尿酸結晶依存性の炎症反応を促進している可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 21 件)

1. Kakino, A., Usami, Y., Horiuchi, S., Fujita, Y., Kotani, K., Chen, C.H., Okamura, T. and Sawamura, T.: A novel cell-free, non-fluorescent method to measure LOX-1-binding activity corresponding to the functional activity of HDL. *J Atheroscler Thromb*, 2019. (in press) doi: 10.5551/jat.47183. 査読有
2. Shih, C.M., Lin, F.Y., Yeh, J.S., Lin, Y.W., Loh, S.H., Tsao, N.W., Nakagami, H., Morishita, R., Sawamura, T., Li, C.Y., Lin, C.Y. and Huang, C.Y.: Dysfunctional high density lipoprotein failed to rescue the function of oxidized low density lipoprotein-treated endothelial progenitor cells: a novel index for the prediction of HDL functionality. *Transl Res*, 205:17-32, 2019. doi: 10.1016/j.trsl.2018.09.005. 査読有
3. Wang, Y.C., Lee, A.S., Lu, L.S., Ke, L.Y., Chen, W.Y., Dong, J.W., Lu, J., Chen, Z., Chu, C.S., Chan, H.C., Kuzan, T.Y., Tsai, M.H., Hsu, W.L., Dixon, R.A.F., Sawamura, T., Chang, K.C. and Chen, C.H.: Human electronegative LDL induces mitochondrial dysfunction and premature senescence of vascular cells in vivo. *Aging Cell*, e12792, 2018. doi: 10.1111/accel.12792. 査読有
4. Moriguchi, T., Takeda, S., Iwashita, S., Enomoto, K., Sawamura, T., Koshimizu, U. and Kondo, T.: Ecr4 peptide is the ligand of multiple scavenger receptors. *Sci Rep*, 8:4048, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-22440-4. 査読有
5. Nakano, A., Kawashima, H., Miyake, Y., Zeniya, T., Yamamoto, A., Koshino, K., Temma, T., Fukuda, T., Fujita, Y., Kakino, A., Kanaya, S., Sawamura, T. and Iida, H.: ¹²⁵I-labeled oxLDL is widely distributed throughout the whole body in mice. *Nucl Med Mol Imaging*, 52:144-153, 2018. doi: 10.1007/s13139-017-0497-2. 査読有
6. Ke, L.Y., Chan, H.C., Chan, H.C., Kalu, F.C.U., Lee, H.C., Lin, I.L., Jhuo, S.J., Lai, W.T., Tsao, C.R., Sawamura, T., Dixon, R.A., Chen, C.H., Chu, C.S. and Shin, S.J.: Electronegative Low-density Lipoprotein L5 induces adipose tissue inflammation associated with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 102:4615-4625, 2017. doi: 10.1210/jc.2017-01657. 査読有
7. Sawamura, T., Fujita, Y., Horiuchi, S., Kakino, A.: L5: an LDL fraction in which pathogenic activity of LDL is concentrated. *Trends Cardiovasc Med*, 27:247-248, 2017. doi: 10.1016/j.tcm.2016.12.004. 査読有
8. Sawamura, T., Fujita, Y., Horiuchi, S., Kakino, A.: LOX-1 in ischemic stroke. *J Atheroscler Thromb*, 24:566-568, 2017. doi: 10.5551/jat.ED071. 査読有
9. PrabhuDas MR, Baldwin CL, Bollyky PL, Bowdish DME, Drickamer K, Febbraio M, Herz J, Kobzik L, Krieger M, Loike J, McVicker B, Means TK, Moestrup SK, Post SR, Sawamura T., Silverstein S, Speth RC, Telfer JC, Thiele GM, Wang XY, Wright SD, and El Khoury J.: A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease. *J Immunol*, 198:3775-3789, 2017. doi: 10.4049/jimmunol.1700373. 査読有
10. Kakino, A., Fujita, Y., Nakano, A., Horiuchi, S. and Sawamura, T.: Developmental endothelial locus-1 (Del-1) inhibits oxidized low-density lipoprotein activity by direct binding, and its overexpression attenuates atherogenesis in mice. *Circ J*, 80:2541-2549, 2016. doi: 10.1253/circj.CJ-16-0808. 査読有
11. Yokoyama, C., Aoyama, T., Ido, T., Kakino, A., Shiraki, T., Tanaka, T., Nishigaki, K., Hasegawa, A., Fujita, Y., Sawamura, T. and Minatoguchi, S.: Deletion of LOX-1 protects against heart failure induced by doxorubicin. *PLoS One*, 11:e0154994, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0154994. 査読有
12. Yokota, C., Sawamura, T., Watanabe, M., Kokubo, Y., Fujita, Y., Kakino, A., Nakai, M., Toyoda, K., Miyamoto, Y. and Minematsu, K.: High levels of soluble lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in acute stroke: an age- and sex-matched cross-sectional study. *J Atheroscler*

Thromb, 23:1222-1226, 2016. doi: 10.5551/jat.32466. 査読有

13. Hashimoto, K., Mori, S., Oda, Y., Nakano, A., Sawamura, T. and Akagi, M.: Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1-deficient mice show resistance to instability-induced osteoarthritis. Scand J Rheumatol, 45:412-422, 2016. doi: 10.3109/03009742.2015.1135979. 査読有
14. Okamura, T., Miura, K., Sawamura, T., Kadota, A., Hisamatsu, T., Fujiyoshi, A., Miyamatsu, N., Takashima, N., Miyagawa, N., Kadowaki, T., Ohkubo, T., Murakami, Y., Nakamura, Y., Ueshima, H. and Group, S.R.: Serum level of LOX-1 ligand containing ApoB is associated with increased carotid intima-media thickness in Japanese community-dwelling men, especially those with hypercholesterolemia. LOX-1 ligand and IMT in Japanese. J Clin Lipidol, 10:172-180. e1, 2016. doi: 10.1016/j.jacl.2015.10.010. 査読有
15. Stancel, N., Chen, C.C., Ke, L.Y., Chu, C.S., Lu, J., Sawamura, T. and Chen, C.H.: Interplay between CRP, atherogenic LDL, and LOX-1 and its potential role in the pathogenesis of atherosclerosis. Clin Chem, 62:320-327, 2016. doi: 10.1373/clinchem.2015.243923. 査読有

〔学会発表〕(計 28 件)

1. 沢村達也, 藤田佳子, 堀内清香, 垣野明美: 変性 LDL 受容体を利用した心血管病リスク評価方法の開発, 第 36 回日本臨床化学会甲信越支部総会, 松本, 2018 年 7 月 7-8 日
2. Sawamura, T.: Modified Lipoproteins and LOX-1 in Cardiovascular Disease. 23rd Annual Scientific Meeting of the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy (23rd ISCP), Kyoto, 2018 年 5 月 26-27 日
3. 沢村達也: 血管内皮型スカベンジャー受容体 LOX-1 と腎疾患, 第 45 回関東腎研究会, 東京, 2018 年 1 月 20 日
4. 沢村達也, 岡村智教, 藤田佳子, 堀内清香, 垣野明美: 受容体結合活性で測定する変性 LDL:LAB, 第 49 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 広島, 2017 年 7 月 6-7 日
5. Sawamura, T.: LOX-1: the link between endothelial dysfunction and cardiovascular events. International Society for Laboratory Hematology Annual Meeting, Honolulu, 2017 年 5 月 4-6 日
6. Sawamura, T., Fujita, Y., Kakino, A.: Understanding LOX-1 to Unlock Cardiovascular Diseases. 第 81 回日本循環器学会学術集会, 金沢, 2017 年 3 月 17-19 日
7. 沢村達也, 藤田佳子, 垣野明美: LOX-1: 血管内皮受容体から生体防御受容体へ 第 26 回日本循環薬理学会, 松本, 2016 年 12 月 2 日
8. Sawamura, T.: LOX-1 in cardiovascular disease. 第 52 回高血圧関連疾患モデル学会学術会, 東京, 2016 年 9 月 22-23 日

6 . 研究組織
なし