

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16273

研究課題名(和文)細胞培養系を用いた尿酸動態機能検定系の構築と天然物・食品由来成分の作用解析

研究課題名(英文) Assay system for screening food and natural substances that have antihyperuricemic activity: uric acid production in cultured hepatocytes

研究代表者

安達 真一 (Adachi, Shin-ichi)

宇都宮大学・学内共同利用施設等・特任助教

研究者番号：10747041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：痛風の主要原因である高尿酸血症の予防・改善に効果的な天然物・食品由来成分を新たに見出すために、培養肝細胞における尿酸産生抑制能検定系を用いて、ポリフェノールを中心に尿酸産生を阻害する化合物の探索を行った。その中で複数の新規の有効な化合物を見出した。次にそれらの化合物をプリン体誘導性高尿酸血症モデルマウスに経口投与し、動物個体レベルでも有効であるかどうか検討を行った。その結果、タキソフォリン、イソラムネチンおよびウロリチンAが投与量依存的に血漿尿酸値の上昇を抑制することが認められた。その作用機序は、肝臓におけるキサンチンオキシダーゼの活性の抑制によるものであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We tried to search for compounds that inhibit uric acid (UA) production in an in vitro assay system employing the cultured hepatocytes in order to quest novel factors in foods and natural resource effective for prevention and remediation of hyperuricemia. We found several candidates and attempted to examine the effects of them on antihyperuricemia in the model mice by purine-bodies administration. As a result, taxifolin, isorhamnetin and urolithin A dose-dependently and significantly suppressed the increase in plasma UA concentration. They demonstrated to show antihyperuricemic effect by directly suppressing xanthine oxidase activity.

研究分野：生活科学

キーワード：高尿酸血症

1. 研究開始当初の背景

痛風は糖尿病と同じく現代において代表的な生活習慣病であり、激しい関節痛を生じ高血圧や腎臓病などの合併症を引き起こすことが知られている。近年我が国では痛風患者が100万人を超えている(2013年度国民生活基礎調査)。また痛風の基礎病態である高尿酸血症患者は現在500万人いると言われ、現在も増加傾向にあると推定されている(富田眞佐子等、痛風と核酸代謝、2006)。痛風は患者の生活の質を著しく低下させる疾患であり、効果的な治療法や予防法の確立が望まれている。

高尿酸血症および痛風はプリン体を多く含む食品、エネルギーの過剰摂取、過剰な飲酒による尿酸の過剰産生や加齢による尿酸の排泄能の低下により起こる。高尿酸血症および痛風患者は、尿酸の産生が亢進している尿酸産生過剰型、尿中尿酸排泄能が低下している尿酸排泄低下型、およびその両方が混在した混合型に大別される。

現在、高尿酸血症および痛風の治療薬として主に広く用いられているのはアロプリノールおよびベンズプロマロンである。前者は尿酸産生抑制剤であり、ヒポキサンチンからキサンチンへの代謝およびキサンチンから尿酸への代謝を触媒する酵素であるキサンチンオキシダーゼ(XO)を阻害することで尿酸値を低下させる。一方、後者は腎臓の尿細管に発現するUrate Transporter 1(URAT1)を阻害することにより、尿酸の血中への再吸収を阻害し、尿酸の尿中への排泄を促進させることで血中尿酸値を低下させる。これらの薬は強力な尿酸値低下作用を有し、血中尿酸濃度を正常値まで低下させるが、高尿酸血症は薬の服用を中止すると再び元の高尿酸血症に戻ってしまう。そのため、高尿酸血症を根本的に治療するためには長期間の薬の服用が必要である。またアロプリノールおよびベンズプロマロンの副作用により肝および腎機能に負担が掛かり、長期に渡ってそれらを服用すべきでないと考えられている。従って高尿酸血症の根本治療には天然物・食品由来成分の摂取による体内環境の改善が最善である。

現在、食品および植物成分でアロプリノールと同様に尿酸産生を抑制するものとして、タマネギなどに含まれるケルセチン、イチゴやザクロなどに含まれるエラグ酸などが挙げられる。尿酸排泄を促進するものとしては報告が少ないが菊花由来ポリフェノールが発見されている。さらに菊花由来ポリフェノールは尿酸産生も抑制することが明らかとなっている(Honda *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2014)。以上のように食品中において尿酸値を低下させる成分が発見されているが、未だ食品成分中に顕著な尿酸値抑制作用を有しているものは見出されていない。従って、血中尿酸濃度の上昇を顕著に抑制するポリフェノールをはじめとし

た天然物・食品由来成分が新たに発見されれば、この問題の解決に資すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、細胞培養系および動物実験系を用いて高尿酸血症の予防・改善に効果的な天然物・食品由来成分を新たに見だし、その作用メカニズムについて明らかとすることで、ヒトへ応用するための基礎的知見を得ることを目的とした。尿酸の主たる生産工場は肝臓である(Lima *et al.*, *Biochimie*, 2015)。そこで研究代表者は株化培養肝細胞であるAML12における尿酸産生抑制能検定系を構築した(Adachi *et al.*, *Cytotechnology*, 2017)。この検定系は、培養肝細胞を尿酸の前駆体であるイノシンとグアノシンで処理し、同時に候補物質を作用させ、その際に産生された尿酸量を測定し、その検体の尿酸産生抑制能を評価する系である。この方法では、*in vitro*でXOの阻害活性を直接評価する従来の方法とは異なり、XOを直接阻害する検体はもちろん、間接的に阻害する検体や他の標的に作用して尿酸の産生を阻害する検体も探索することが可能となる。本研究では、まず尿酸産生抑制能検定系を用いて、天然物・食品由来成分を中心に尿酸産生を阻害する候補物質のスクリーニングを行った。次に一次スクリーニングで陽性であった検体をプリン体誘導性高尿酸血症マウスに経口投与し、二次スクリーニングとして動物レベルにおいても有効であるか検討を行い、その作用機序についての解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 培養肝細胞を用いた尿酸産生抑制能を有する天然物・食品由来成分の探索

株化培養肝細胞であるAML12細胞に尿酸の前駆体であるイノシンとグアノシンを添加し、同時に検体を作用させ、その際に産生された尿酸量を測定し、検体無添加群と比較することで、その検体の尿酸産生抑制能を評価した。検体は、フラボノイドなどのポリフェノールを中心に抗高尿酸血症作用が報告されている既知の物質および未知の物質、計40種類程度を用いた。

(2) プリン体誘導性高尿酸血症モデルマウスを用いた抗高尿酸血症作用を有する天然物・食品由来成分の探索および作用解析

(1)の検定系で陽性を示した検体が動物個体レベルで有効であるか調べるため、プリン体誘導性高尿酸血症モデルマウスに検体を経口投与し、血漿中尿酸レベルが低下するか検討を行った。マウス(雄性ICRマウス、5週齢)に3日間連続で検体を経口投与した。3日目の検体投与の1時間後に、尿酸前駆体としてグアノシン-1-リン酸(GMP)とイノシン-1-リン酸(IMP)を腹腔内投与した。その1時間後に下大静脈より採血、肝臓および腎臓の採取を行った。なお、有効性既知のアロプリノールを陽性対照とした。測定項目は、血

漿中尿酸濃度、肝臓中尿酸レベル、肝臓 XO 活性、肝臓中 XO タンパク発現量とした。一部の検体については、尿酸トランスポーターである URAT1 および GLUT9 の腎臓でのタンパク発現量および腎臓における尿酸排泄関連遺伝子発現量も測定項目とした。

4. 研究成果

(1) 培養肝細胞を用いた尿酸産生抑制能を有する天然物・食品由来成分の探索

AML12 尿酸産生抑制能検定系を用いてポリフェノールなどの天然物・食品由来成分を中心に尿酸産生を阻害する候補物質のスクリーニングを行った。その中で複数の新規の有効な化合物を見いだした。本研究では、その中で以下の3つの化合物に絞り、動物レベルでの有効性の検討を行うことにした。一つ目の化合物は、タキシフォリン (taxifolin, TXF) である。TXF は、シベリアカラマツなどの森林樹木やイチゴの花托に含まれるフラボノノールである。二つ目は、イソラムネチン (isorhamnetin, IsR) である。IsR は、O-メチル化フラボノールに分類されるポリフェノールで、タマネギ、アーモンドやワインなどに含まれていることが報告されている。三つ目の化合物は、ウロリチン A (urolithin A, UrA) である。UrA は、イチゴやザクロに多く含まれるエラグ酸の生体内代謝物のひとつである。TXF、IsR および UrA は、添加濃度依存的に AML12 細胞の尿酸産生を有意に抑制した (図 1)。

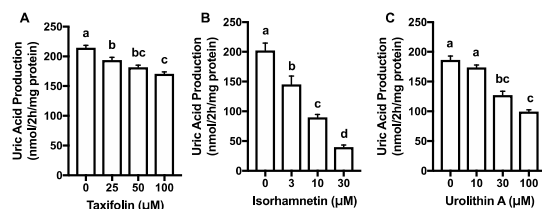


図1 Effects of taxifolin, isorhamnetin and urolithin A on uric acid production in AML12 hepatocytes. AML12 cells were treated with 25, 50, 100 μM taxifolin (A), 3, 10, 30 μM isorhamnetin (B), or 10, 30, 100 μM urolithin A (C) for 2 h in balanced salt solution containing guanosine + inosine (100 μM each). Each value represents mean ± SEM for six wells. Values not sharing a common letter are significantly different at $P < 0.05$ (Tukey's test). A, Adachi *et al.*, Cytotechnology, 2017, 一部改変; B, 安達等, 日本農芸化学会2018年度大会; C, 安達等, 第71回日本栄養・食糧学会大会, 2017.

(2) プリン体誘導性高尿酸血症モデルマウスを用いた抗高尿酸血症作用を有する天然物・食品由来成分の探索および作用解析

尿酸産生抑制能検定系で陽性を示した TXF、IsR および UrA が抗高尿酸血症作用を有するか調べるため、プリン体誘導性高尿酸血症モデルマウスに検体を経口投与し、血漿中尿酸レベルが低下するか検討を行った。その結果、陽性対照であるアロプリノール (Positive control, PC) と同様にこれら3検体の経口投与によりモデルマウスの血漿尿酸濃度の上昇が有意に抑制され、TXF、IsR および UrA に抗高尿酸血症作用があることが示唆された (図 2)。次にその作用機序について検討を行ったところ、TXF および IsR 投与群の肝臓尿酸レベルは、モデルマウスと比べて

有意に低い値を示した。また肝臓 XO 活性は、TXF、IsR および UrA 投与により有意に抑制された。さらに IsR の肝臓 XO タンパク発現抑制作用を調べると、IsR 投与による XO タンパク発現の抑制作用は見られなかった。UrA 投与群については、尿酸トランスポーターである URAT1 および GLUT9 の腎臓中タンパク発現量を測定した。結果、UrA の投与による URAT1 および GLUT9 タンパク発現量に影響は見られなかった。また UrA 投与群の URAT1、GLUT9、OAT1 および OAT3 などの腎臓における尿酸排泄関連遺伝子レベルの変動を調べると、UrA 投与による変動は認められなかった。このことから、UrA は腎臓における尿酸排泄促進作用を有する可能性が低いと考えられる。

以上の結果より、TXF、IsR および UrA には抗高尿酸血症作用があることが示唆された。その作用機序は、肝臓における XO 活性の低下によるものであることが示された。

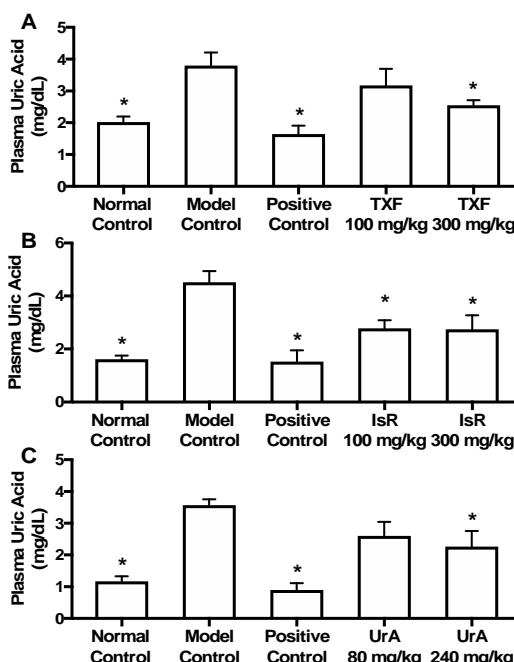


図2 Effects of taxifolin, isorhamnetin and urolithin A on plasma uric acid levels in hyperuricemic mice. The mice were perorally administered with taxifolin (TXF, A), isorhamnetin (IsR, B), or urolithin A (UrA, C) at the different doses indicated. Positive control group were administered with 10 mg/kg BW allopurinol. The mice were then intraperitoneally injected with both IMP and GMP (300 mg/kg body weight) to induce hyperuricemia. Normal control and model control groups were treated with 0.5% CMC-Na instead of test samples. Normal group was injected with PBS (-) instead of nucleotides. Each value represents mean ± SEM for 8–12 mice (duplicate measurement per mouse). For statistical significance, * $P < 0.05$ when the treated groups were compared with the model control group (Dunnett's test). A, Adachi *et al.*, Cytotechnology, 2017, 一部改変; B, 安達等, 日本農芸化学会2018年度大会; C, 安達等, 第71回日本栄養・食糧学会大会, 2017.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Shin-ichi Adachi, Ken-ichi Nihei, Yoshiyuki Ishihara, Fumiaki Yoshizawa, Kazumi Yagasaki. Anti-hyperuricemic effect of taxifolin in cultured hepatocytes and model mice. 査読有, Cytotechnology 69(2):329-336.

doi: 10.1007/s10616-016-0061-4.

〔学会発表〕(計 5 件)

Yagasaki Kazumi, Kondo Shinji, Adachi Shin-ichi, Yoshizawa Fumiaki. Antidiabetic and antihyperuricemic effects of taxifolin, a polyphenol present in octaploid strawberry, in cultured L6 myotubes and type 2 diabetic model KK-Ay mice. IUNS 21st International Congress of Nutrition, 2017 年 10 月 16 日, Buenos Aires, Argentina.

安達真一, 吉澤史昭, 矢ヶ崎一三. 培養肝細胞を用いた天然物・食品由来成分の尿酸産生抑制能の評価. 日本動物細胞工学会 2017 年度大会, 2017 年 7 月 20 日, 松山.

安達真一, 小松渡, 吉澤史昭, 矢ヶ崎一三. 培養肝細胞と高尿酸血症マウスにおけるウロリチン A の抗高尿酸血症作用の検討. 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 20 日, 京都.

Shin-ichi Adachi, Fumiaki Yoshizawa, Kazumi Yagasaki. Assay System for Screening Anti-hyperuricemic Food and Natural Substances: Anti-hyperuricemic Effect of Taxifolin in Cultured Hepatocytes and Model Mice. The 29th Annual and International Meetings of the Japanese Association for Animal Cell Technology, 2016 年 11 月 12 日, Kobe, Japan.

安達真一, 高見有希, 吉澤史昭, 矢ヶ崎一三. 培養肝細胞と高尿酸血症マウスにおけるタクシフォリンの抗高尿酸血症作用の検討. 第 70 回日本栄養・食糧学会大会, 2016 年 5 月 14 日, 神戸.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

安達 真一 (ADACHI, Shin-ichi)
宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・特任助教
研究者番号：10747041

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()