

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08605

研究課題名(和文)キサンチンデヒドロゲナーゼ発現抑制によるヒト尿酸代謝完全モデルマウスの作出

研究課題名(英文)Generation of human urate metabolism complete model mice by suppressing xanthine dehydrogenase expression

研究代表者

細山田 真 (Hosoyamada, Makoto)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：00291659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ウリカーゼ(Uox)欠失、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)高活性、キサンチンオキシドレダクターゼ(XOR)発現抑制により、ヒト尿酸代謝完全モデルマウスの作出に取り組んだ。その結果、ヒトXOR発現量が異なるHPRT高活性Uox-Xor-ダブルノックアウトマウス-ヒトXORトランスジェニックマウスが2系統得られた。どちらも尿中ヒポキサンチン、キサンチン排泄が残存するものの、ヒトXOR活性が低い系統では、血中クレアチニンが上昇し腎障害を呈したが、ヒトXOR活性が高い系統では血中クレアチニン上昇を認めず、腎障害を生じないヒト尿酸代謝完全モデルマウスが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義は3つの遺伝子発現をヒト化することによりプリン代謝の分野で初めてヒトの病態を反映する疾患モデル動物が得られた点である。社会的意義は、(1)環境要因に伴う高尿酸血症の発症メカニズム解明が可能となり、生活習慣病の新薬開発に繋がる。(2)家族性若年性高尿酸性血症性腎症や腎性低尿酸血症のモデルマウスの作出により、治療法の無い尿酸関連遺伝性疾患の治療薬開発に結びつく。(3)すべての研究用マウスはHPRT低活性でレスシュ=ナイハン症候群様であることから、高次脳機能の研究のためにHPRT高活性ヒトXDH低発現マウスが有用となる。

研究成果の概要(英文)：We tried to create human urate metabolism complete model mice by uricase (Uox) deletion, hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT) high activity, and suppression of xanthine oxidoreductase (XOR) expression.

As a result, two strains of HPRT highly active Uox-Xor-double knockout mouse-human XOR transgenic mice having different human XOR expression levels were obtained. Although urinary hypoxanthine and xanthine excretion remained in both strains and blood creatinine was elevated and showed renal damage in a strain with low human XOR activity, but in a strain with high human XOR activity, blood creatinine was not elevated. In summary, human uric acid metabolism complete model mice that do not cause renal damage were obtained.

研究分野：核酸代謝学

キーワード：キサンチンオキシドレダクターゼ ウリカーゼ ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高尿酸血症の罹患患者数は増大しており、痛風や尿路結石の原因となるだけでなく、心血管障害や腎障害の独立した危険因子でもあるため、高尿酸血症の発症メカニズムを明らかにする研究の重要性が高まっている。しかしながら、ヒトでは進化に伴い偽遺伝子化したために尿酸分解酵素ウリカーゼの機能が喪失しているのに対し、ウリカーゼ遺伝子(Uox)が保存されているために血清尿酸値がヒトの25分の1しかないマウスは、高尿酸血症の研究に用いることができなかった。

ヒト尿酸代謝モデルとなるマウスを作出するために平成23~25年度科研費によりUoxノックアウトマウス(Uox-KOマウス)を導入した。Uox-KOマウスの血清尿酸値はヒトの2分の1に上昇し、それまでin vivoでの機能が認められなかった尿酸トランスポーターURAT1の機能をUox-KOマウスを用いて明らかにすることができた。しかし、Uox-KOマウスの尿中尿酸排泄量は体重当たりヒトの25倍と過剰であるという問題点が明らかになった。アロプリノールやフェブキソスタットなどキサンチンデヒドロゲナーゼ(XDH)阻害薬を投与しても尿中尿酸排泄量はヒトの10倍、ヒポキサンチン、キサンチンを含めた尿中プリン排泄量はヒトの25倍と不変であり、過剰な尿中尿酸排泄による腎障害が問題であった。

尿中プリン排泄量の過剰はヒポキサンチンを変換するヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)の欠損症(レッシュ=ナイハン症候群)でも認めることから、マウスのHPRTについて検討したところ、HPRTタンパクのN末から2番目のアミノ酸がアラニンであるヒトおよび野ネズミとは異なり、プロリンであるC57BL/6系統などの研究用マウスではHPRTタンパクの分解亢進によりHPRT活性が野ネズミの30分の1と低活性であると報告されていた。そこで平成26~28年度科研費によりHPRT遺伝子座位のあるX染色体中央部分のみ野ネズミ由来で、他の染色体はC57BL/6由来であるB6コンソミック系統MSMマウス(XC-MSMマウス)を導入し、XC-MSMマウスがHPRT高活性であることを確認した。XC-MSMマウスの遺伝的背景を持つHPRT高活性Uox-KOマウスにXDH阻害薬を投与すると尿中尿酸排泄量がヒトの25倍から3倍へと減少し、HPRTによるプリン体生合成基質であるホスホリボシルピロリン酸(PRPP)の消費に伴い尿中プリン排泄量もヒトの25倍から15倍へと6割に減少した。しかし、過剰量のXDH阻害薬を投与してもこれ以上は減少しなかった。

ヒポキサンチンを基質としてHPRTと競合するのはXDHであり、マウス肝臓のXDH転写量はヒト肝臓の100倍であることが報告されている。したがってXDHの発現が過剰であるため、アロプリノールやフェブキソスタットの過剰量でも阻害が不十分であると考えられた。これまでの研究でHPRT高活性Uox-KOマウスにおいてXDH活性を下げれば尿中プリン体排泄量は減少することが確認された。したがって、遺伝子を改変してXDHの発現量を100分の1に低下させたHPRT高活性Uox-KOマウスを作出することにより、尿中プリン体排泄量をさらに減少させてヒトと同レベルとし、腎機能が低下しないヒト尿酸代謝完全モデルマウスを作出できると想定した。

### 2. 研究の目的

Xdhノックアウトマウス(Xdh-KO)とHPRT高活性Uox-KOマウスとを交配させることにより、HPRT高活性Xdh-KOマウスおよびHPRT高活性Uox-Xdh-ダブルKOマウスを作出する。さらにヒトXDH低発現トランスジェニックマウスを新規に作出し、HPRT高活性Uox-Xdh-DKOマウスと交配させることによりHPRT高活性Uox-Xdh-DKO-ヒトXDH低発現マウス(ヒト尿酸代謝完全モデルマウス)を作出することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

(1) 連携研究者の大坪との共同研究としてXdhノックアウトマウス(ヘテロ)を導入し、XdhノックアウトマウスとHPRT高活性Uox-KOマウスとを交配し、産仔の耳パンチ片よりHprt(TaqMan MGBプローブ法)、Xdh、Uox各遺伝子のジェノタイプングによりHprt(a/b)/Xdh(-/+)/Uox(-/+)[但しHprt-aアレルは高活性型、bアレルは低活性型]を得たのち、交配を重ねてHPRT高活性Xdh-KOマウス(Hprt(a/a)/Xdh(-/-))およびHPRT高活性Uox-Xdh-DKOマウス(Hprt(a/a)/Xdh(-/-)/Uox(-/-))を得る。特にHprt(a/a)のマウスは種間の生殖的隔離による繁殖困難があり、X染色体の種差がその原因であるため、Hprt(a/b)においてX染色体の組換えを進めるためにHprt(b/b)/Xdh(-/-)との交配を繰り返す。Hprt(a/a)/Xdh(-/-)マウスを得た後、尿中ヒポキサンチン、キサンチン濃度をクレアチニン濃度と共にHPLCを用いて測定し、尿中プリン体排泄量がヒトの尿中尿酸排泄量である0.3(モル/モルCr)よりも低値となることを確認する。

(2) ヒトXDH遺伝子プロモーターは-463から-842の間に抑制配列があるため、上流0.9kbまでのプロモーター配列をヒトゲノムDNAからPCRクローニングし、ヒトXDH cDNAをヒト肝臓total RNAからRT-PCRクローニングする。ミニサークルparentプラスミドに対して5'-ヒトXDHプロモーター配列XDH cDNA-3'となるようにギブソン=アセンブリー法にて挿入し、ミニサークル化して原核生物由来のDNA配列を除去する。制限酵素処理により直鎖化し、トランスジェニックマウス作製用トランスジーンとする。マウス受精卵前核へのインジェクションは国立遺伝学研究所に依頼する。トランスジェニックマウスが得られたら交配により子孫伝達を確認し、HPRT高活性Uox-Xdh-DKOマウスと交配させてHPRT高活性Uox-Xdh-DKO-ヒトXDHトランスジェニックマウスを作成し、尿中プリン排泄量が低減している系統を選別して樹立する。

#### 4. 研究成果

平成 29 年度は HPRT 高活性 Uox ノックアウトマウスと Xdh ノックアウトマウスの交配による 187 匹の産仔のうち、HPRT 低活性 Xdh ノックアウトマウスが 2 匹、HPRT 高活性 Xdh ノックアウトマウスが 2 匹得られた。HPRT 低活性 Xdh ノックアウトマウスは既存の報告通り 7 週齢で死亡した。そのため、HPRT 高活性 Xdh ノックアウトマウスで繁殖を試みたが、それぞれ 12 週齢と 23 週齢で死亡し、HPRT の発現量増強によって寿命の延長は認められたものの、繁殖には至らなかった。先に HPRT 高活性 Uox ノックアウト Xdh ヘテロマウスを系統樹立した。

平成 30 年度はヒト XOR 低発現トランスジェニックマウスの作出を進めた。前年度にクローニングしたヒト XDH プロモーター領域-1~-842 の下流にヒト XDH cDNA を挿入し、トランスジェニックマウス作製用の導入遺伝子断片を作成した。導入遺伝子断片を共同研究先である国立遺伝学研究所に送付し、DBA マウス受精卵へのインジェクションを行った。雄 8 匹、雌 3 匹の産仔が得られた。HPRT 高活性 Uox ノックアウト-Xdh ヘテロマウスと交配させることにより、雄由来 7 系統、雌由来 2 系統、計 9 系統のヒト XDH トランスジェニックマウス系統が得られた。

令和 1 年度は 9 系統のヒト XDH トランスジェニックマウスから HPRT 高活性 Uox ノックアウト-Xdh ノックアウト-ヒト XDH トランスジェニックマウスの作出を進め、マウスの Xor 活性に比べて低減した活性を示すヒト XOR 低発現マウスが得られ、ヒト XOR 低発現マウスの中でより XOR 低活性の 1 系統と、それに比べて XOR 高活性の 1 系統がそれぞれ樹立された。前者の低活性系統は尿中にヒポキサンチン、キサンチン排泄が残存し、血中クレアチニン上昇を認め、腎障害を発症すると考えられた。後者の高活性系統も尿中ヒポキサンチン、キサンチン排泄が残存するものの前者の系統よりは少なく、さらに血中クレアチニン上昇を認めず、腎障害が認められなかった。今後は、尿中オキシプリンをほぼ尿酸で排泄されるようにするべく、得られた 2 系統のトランスジェニックアレルを homozygote にするための交配を続け、C57BL/6 の遺伝的バックグラウンドとなるようにバッククロスを進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawamorita Yosuke, Shiraishi Takeshi, Tamura Yoshifuru, Kumagai Takanori, Shibata Shigeru, Fujigaki Yoshihide, Hosoyamada Makoto, Nakagawa Takahiko, Uchida Shunya	4. 巻 5
2. 論文標題 Renoprotective effect of topiroxostat via antioxidant activity in puromycin aminonucleoside nephrosis rats	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e13358 ~ e13358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.13358	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 -

1. 著者名 Toyoki Daigo, Shibata Shigeru, Kuribayashi-Okuma Emiko, Xu Ning, Ishizawa Kenichi, Hosoyamada Makoto, Uchida Shunya	4. 巻 313
2. 論文標題 Insulin stimulates uric acid reabsorption via regulating urate transporter 1 and ATP-binding cassette subfamily G member 2	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F826 ~ F834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00012.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asakawa Shinichiro, Shibata Shigeru, Morimoto Chikayuki, Shiraishi Takeshi, Nakamura Takashi, Tamura Yoshifuru, Kumagai Takanori, Hosoyamada Makoto, Uchida Shunya	4. 巻 2017
2. 論文標題 Podocyte Injury and Albuminuria in Experimental Hyperuricemic Model Rats	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oxidative Medicine and Cellular Longevity	6. 最初と最後の頁 1 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2017/3759153	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 細山田 真、福内 友子、富岡 直子、市田 公美、金子 希代子、大坪 俊夫
2. 発表標題 Hprt高活性Xorノックアウトマウスの寿命延長メカニズムの検討
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	Makoto Hosoyamada, Naoko H Tomioka, Tomoko Fukuuchi, Toshio Ohtsubo, Kiyoko Kaneko, Kimiyoshi Ichida
2. 発表標題	Life span extension of xanthine oxidoreductase knockout mouse by increase of HPRT activity
3. 学会等名	18th World Congress of basic and clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	細谷 拓司、内田 俊也、柴田 茂、富岡 直子、細山田 真
2. 発表標題	新規高尿酸血症モデル HPRT高活性Uox-KOマウスに対する プリン型および非プリン型XOR阻害薬の尿酸代謝に与える影響
3. 学会等名	第52回日本痛風核酸代謝学会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	細山田 真、渡部 多真紀、富岡 直子、渡辺 茂和、大坪 俊夫、市田 公美
2. 発表標題	HPRT高活性XDHノックアウトマウスの寿命延長
3. 学会等名	第92回日本薬理学会年会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	細谷 拓司、富岡 直子、細山田 真
2. 発表標題	新規高尿酸血症モデルHPRT高活性Uox-KOマウスに対するプリン型及び非プリン型キサンチン酸化還元酵素阻害薬の効果
3. 学会等名	日本薬学会第139年会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名 細山田 真、富岡 直子、大坪 俊夫、市田 公美、内田 俊也、鎌谷 直之
2. 発表標題 ヒボキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Hprt)高活性キサンチンデヒドロゲナーゼ(Xdh) ノックアウトマウスの作出
3. 学会等名 第51回日本痛風核酸代謝学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安藤 太介, 細山田 真, 福内 友子, 藤田 恭子, 富岡 直子, 金子 希代子, 細山田 真, 市田 公美
2. 発表標題 キサンチンデヒドロゲナーゼノックアウトマウスが 短命である理由の検討
3. 学会等名 日本薬学会138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ヒト尿酸代謝モデルマウス	発明者 細山田 真	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-157930	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 ヒト尿酸代謝モデル動物	発明者 細山田 真	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特開2019-33708号	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔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	富岡 直子  (Tomioka Naoko)  (60525814)	帝京大学・薬学部・講師    (32643)	

