

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15070

研究課題名(和文) XORのC末端領域は、血管内皮障害をもたらすXORの活性変換のトリガーとなるか

研究課題名(英文) Does the C-terminal region of the XOR trigger active conversion of the XOR resulting in vascular endothelial damage

研究代表者

藤原 めぐみ (Fujiwara, Megumi)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：30648605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：当初HUVECにおけるGFP-fusionXOR発現自体が細胞致死的であり、C末端領域の局在検討が困難であったため、XOR阻害剤の組織保護効果の機序について検討を行った。その結果、サルベージ経路の基質となるヒポキサンチン添加に伴うATP合成の活性化が急性的なエネルギー低下の病態において細胞保護効果をもつことが明らかとなった。さらに、慢性的な細胞内ATPの低下を病態とするアルツハイマー病やダウン症におけるエネルギー代謝動態を検証するため、GFP融合アミロイドの発現系と凝集形成およびその定量法を確立した。また、DSマウスの海馬領域における変性ニューロンの増加を確認した。今後は投薬効果を検証する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、急性的なATP不足の病態として放射線性皮膚炎を対象とし、サルベージ経路の活性化によるATPの増強が病態抑制に効果的であることを証明した。さらに慢性的にATPが低下する病態の例としてアルツハイマー(AD)およびダウン症がある。AD患者数は2025年には700万人に達する予想がされる一方で、治療法はまだない。一方、ダウン症では若年性AD発症が60%と高く、早いと20代で脳内に病変が認められる。DSでは全身および神経系のATPの低下が知られており、我々は若年性ADの病因が慢性的なATP不足にあると考えている。こういった慢性的なATP不足に対する新たな戦略の確立はADの発症予防に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Since GFP-fusionXOR expression in HUVECs is cell lethal and it was difficult to localize the C-terminal region, we investigated the mechanism of the tissue-protective effect of XOR inhibitors. We found that the activation of ATP synthesis by the addition of hypoxanthine, a substrate of the salvage pathway, has a cytoprotective effect in the pathogenesis of acute energy deprivation. Furthermore, we established an expression system and aggregation formation of GFP-fused amyloid- and its quantification method to examine the dynamics of energy metabolism in Alzheimer's disease and Down's syndrome, which are pathological conditions of chronic intracellular ATP depletion. We also confirmed the increase of degenerated neurons in the hippocampal region of DS mice. In the future, we will verify the effect of medication

研究分野：生化学

キーワード：ATP 変性蛋白質 ATP不足 アミロイド プロテアソーム系 ヒポキサンチン サルベージ経路 Den ovo抑制

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1)キサンチン酸化還元酵素(XOR)は核酸代謝に関わる酵素であるが、その反応過程で酸化ストレスの発生にも関与する。XOR は ATP などの核酸が尿酸まで代謝される過程で、キサンチンからヒポキサンチンおよび尿酸に分解される最終二段階に作用する酵素であるが、その反応代謝産物として活性酸素種(ROS)を生成する。XOR は、キサンチンデヒドロゲナーゼ(XDH)およびキサンチンオキシダーゼ(XO)の2つの形態で存在する。生体内では通常 XDH として存在するが、特定の条件下でジスルフィド結合を形成し、XO に変換する(DO 変換)。XDH は NAD^+ を電子受容体とするが、XO は酸素分子を電子受容体とし、 H_2O_2 と O_2^- を産生する。 O_2^- は組織を障害するとともに、NO 存在下でパーオキシナイトライトという強いラジカルとなる。そのため、DO 変換は炎症や虚血および再灌流障害を増悪する。虚血再灌流後では、ヒト大動脈内皮細胞において XO 活性および代謝産物である尿酸濃度が増加し、DO 変換の増加が示唆され XOR は DO 変換を起こして酸化酵素型(XO)をとると、 H_2O_2 と O_2^- を産生して血管内皮障害に寄与し得るが、その機序は不明である。本研究では、C 末端領域が関与すると思われる DO 変換について、局在変化との関連性およびプリン代謝変化の解析を行った。

(2)XOR は ATP の再利用経路としてのサルベージ経路にも関わっている。組織の保護や修復には多くの ATP を必要とするため、ヒトではより効率的な ATP 合成経路として、ATP の分解過程で生じたヒポキサンチン(Hx)という塩基を効率的かつ速やかに ATP の形に戻す経路が存在する。XOR はこの経路の基質として必要な Hx を分解してしまうため、XOR 阻害剤により組織内 Hx を増加させることでサルベージ経路を増強し、その結果として ATP が増加することが組織修復を促進するかどうかについても検証した。

2. 研究の目的

(1)本研究の目的は、XOR による組織障害における役割を明らかにするために、特に血管内皮細胞の病態形成時において、細胞および組織レベルで何が XOR の DO 変換を惹き起こすか、またその際の C 末端領域の役割を明らかにすることであった。

(2)XOR 阻害は組織保護効果をもつが、その機序については不明な点が多い。XO 活性阻害による抗酸化ストレスを機序とする説が多くあるが、我々は XOR 阻害剤が Hx を増加させることでサルベージ経路を活性化させ、その結果として細胞修復や保護にはたらく ATP を多く供給できるという機序を予想している。本研究では、XOR 阻害剤による組織保護効果とサルベージ経路との関連性について検証を行った。

3. 研究の方法

初年度は目的(1)のために、GFP fusion-XOR および C 端欠損型 GFP fusion-XOR を発現させるための発現ベクターを作製した。これらのベクターを HEK293 細胞およびヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)に発現させて細胞イメージングによる解析を実施した。

2 年目以降は目的(2)のために、ATP が急激に減少する病態モデルとして放射線の組織障害を再現するために、放射線性皮膚炎モデルマウスを作製し、XOR 阻害剤による組織保護効果とその機序について検証した。最終年度には、ATP の慢性的な減少が病態機序の根幹にある病態モデルとして、老年性アルツハイマー病およびダウン症患者における若年性アルツハイマー病を

ターゲットとして、XOR 阻害によるサルベージ経路を介した ATP 増強が効果的に病態を改善するかどうかを検証するための基礎検討を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞内 XOR の局在変化および膜との相互作用解析

初年度は、HUVEC に GFP fusion-XOR を発現させ、D/O 変換時細胞内 XOR の局在変化および膜との相互作用解析のため強制発現を試みたが、細胞イメージングによる局在の確認に至ったものの、XOR の発現自体が細胞に致死的ダメージを与え供試できなかった。

(2) XOR 阻害薬による内皮保護効果の機序の検証

2 年目は XO による血管内皮障害の機序に着眼し、放射線被曝後の一過性の細胞内 ATP 濃度低下に着目し、放射線による組織障害に対する Hx の保護作用を検討した。放射線性皮膚炎モデルマウスへの XOR 阻害薬の投薬は血中ヒポキサンチン(Hx)濃度を増加させ、重度の皮膚炎が抑制され、回復が早まった(図 1)。この機序を探るため、細胞内アデニンヌクレオチドの分解で生じる Hx の再利用(サルベージ経路)の活性化を想定し、血中プリン代謝物の変化および細胞障害マーカーを測定した。Hx はプリン分解系の中間代謝物であり、サルベージ経路を介した ATP 合成の基質となる。ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に X 線照射を行い、Hx 濃度を変えて細胞生存率、アポトーシスと DNA 二本鎖切断 (DSB) の発生率を評価した。その結果、2-100 μ M の Hx 存在下では、2, 6, 10Gy 照射後の DSBs(図 2)とアポトーシス細胞の割合が有意に減少(図 3)し、一方、細胞生存率は濃度依存的に上昇することがわかった。さらに、Hx の添加により、照射後 2 時間の細胞内の AMP、ADP、ATP のレベルが上昇した(図 4)ことから、Hx がサルベージ経路を通じてアデニンヌクレオチドの合成に利用されたことが示唆された。また、放射線性皮膚炎モデルマウスにおける XOR 阻害剤投与時における ATP 合成系と利用系のバランスを示すエネルギーチャージ(EC)は、放射線照射後において Hx 添加の有無で変化がなかった。Hx 添加群では修復が進んでおり、ATP 利用系が増加していたと考えられるが、EC は変化しなかったことから、ATP 利用の増加にともない生理的な範囲で ATP 合成系が増加したことが示唆された。結論として、今回の研究結果は、Hx の蓄積量を増やすことで ATP を補充することは、放射線照射のように急激な組織内 ATP が低下する病態における臓器障害に対して有効な戦略であると推察された。

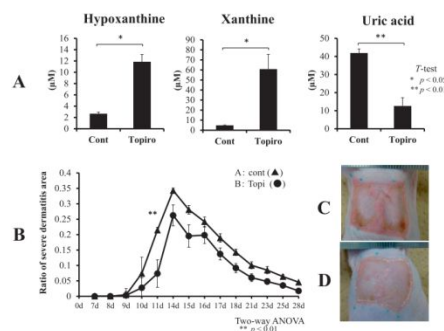


図 1.

A: 血中ヒポキサンチンおよびキサンチン濃度: XOR 阻害剤投与 1 時間後に上昇した。
 B: マウスに 40Gy の放射線を 1 回照射した後 0~28 日目の治癒経過のグラフ。メチルセルロースまたはトピロキソスタットの投薬を受けているマウスにおける全照射面積に対する重症皮膚炎の面積の相対比 *p=0.05, **p=0.01
 C: コントロール群および D: XOR 阻害剤投与群に重度皮膚炎の写真。

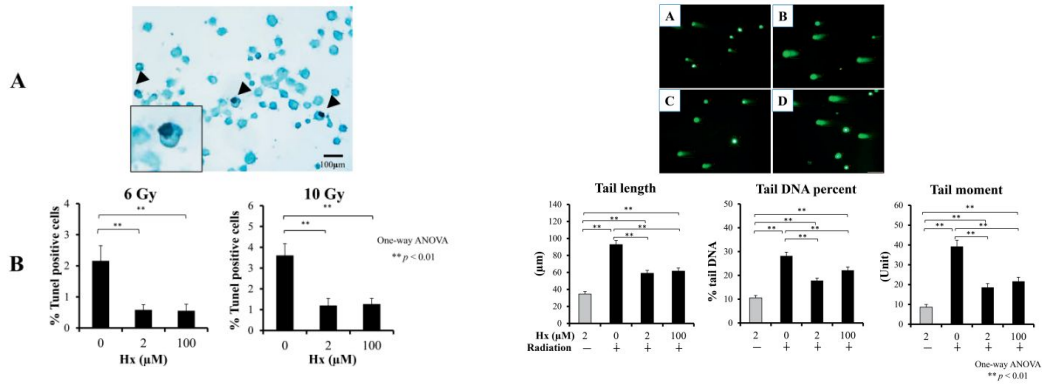


図 2(左): Hx は HUVEC の 6Gy または 10Gy の放射線照射後にアポトーシスを減少させた。
 A : 10Gy の放射線照射後、TUNEL 染色によってアッセイされた。矢印 : アポトーシス細胞。
 B : 放射線照射後 2 uM の Hx を添加すると、24 時間後の TUNEL 陽性は 25% に減少した

図 3(右): 6Gy 照射から 18 時間後のコメットアッセイの写真。
 A: 未照射, B: 6Gy 照射および 0uMHx, C: 6Gy 照射および 2uM Hx, D: 6Gy 照射および 100uMHx
 下段: サンプルおよび実験ごとに少なくとも 300 個の細胞を採点した。* $p < 0.01$.

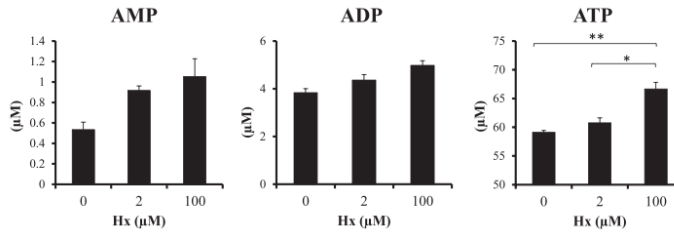


図 4. 6Gy 後 2 時間の HUVEC におけるアデニンヌクレオチド濃度

(3) 老年性アルツハイマーおよびダウン症における ATP の慢性的な低下と病態との関係

- ・ ダウン症児の線維芽細胞では細胞内 ATP 量の慢性的な低下が認められ、Hx を添加するとサルベージ経路の増強を介して ATP 産生を増加することを確認した(図 5)
- ・ GFP 融合アミロイド ペプチド発現細胞のタイムラプス解析で、細胞内で A ペプチドが凝集する様子を観察し、3D 解析により凝集体の大きさを定量評価する系を確立した(図 6)
- ・ 今後は Salvage 経路の増強薬を添加して、凝集体の形成が抑制されるかを解析する。

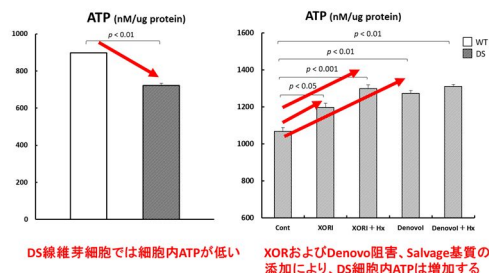


図 5 : ダウン症患者の線維芽細胞における ATP の慢性的な低下と Hx 添加による ATP 増強効果

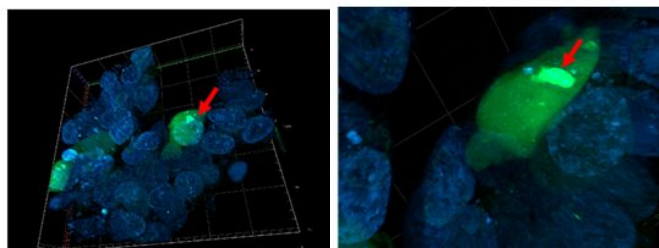


図 6 : HEK293 細胞における Amyloid beta1-42 ペプチドの発現系と細胞内凝集体形成像

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 3件）

1. 著者名 Megumi Fujiwara, Nana Sato, Ken Okamoto	4. 巻 197
2. 論文標題 Hypoxanthine Reduces Radiation Damage in Vascular Endothelial Cells and Mouse Skin by Enhancing ATP Production via the Salvage Pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Radiation research	6. 最初と最後の頁 583-593
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Takashi Tani, Ken Okamoto, Megumi Fujiwara, Akira Katayama, Shuichi Tsuruoka	4. 巻 25
2. 論文標題 Metabolomics analysis elucidates unique influences on purine / pyrimidine metabolism by xanthine oxidoreductase inhibitors in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Tani T, Fujiwara M, Orimo H, Shimizu A, Narisawa S, Pinkerton AB, Millan JL, Tsuruoka S	4. 巻 250
2. 論文標題 Inhibition of tissue-nonspecific alkaline phosphatase protects against medial arterial calcification and improved survival probability in the CKD-MBD mouse model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of pathology	6. 最初と最後の頁 30 - 41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤原めぐみ、岡本研、佐藤奈々
2. 発表標題 血管内皮細胞の放射線障害に対するヒポキサンチンの防護的役割
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 キサントニン酸化還元酵素阻害剤を含む皮膚障害の予防または治療のための医薬組成物	発明者 2019	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許権	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------