

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 年～2008 年

課題番号：19590954

研究課題名（和文）キサンチンオキシドリダクターゼ遺伝子の生体における役割

研究課題名（英文）Physiological role of xanthine oxidoreductase

研究代表者

大坪 俊夫（OOTSUBO TOSHIO）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30423974

研究成果の概要：

キサンチンオキシドリダクターゼ(XOR)遺伝子欠損マウスの腎障害の機序は、多量のキサンチン・ヒポキサンチンと中性脂肪に富んだ物質の尿細管管腔内への蓄積により、炎症・酸化ストレス・虚血・アポトーシスなどが引き起こされ腎障害が進展したと考えられた。虚血再灌流障害に関しては、XOR+/-は XOR+/+マウスに比べ虚血再灌流による腎障害が軽度であった。また、腎障害の程度は、再灌流後血清尿酸値が高いほど軽かった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成 20 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：キサンチンオキシドリダクターゼ、尿酸、腎臓、脂肪、活性酸素、尿細管上皮間葉形質転換、虚血再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

(1) キサンチンオキシドリダクターゼ(XOR)蛋白質は、1902 年にミルク中に始めて酵素活性が証明された非常に古い酵素で、プリン体代謝の最終段階でヒポキサンチンからキサンチンを経て尿酸を産生する。1960 年代に、XOR 蛋白質が尿酸産生と同時に活性酸素を生じることが明

らかとなり、現在までに虚血再灌流障害・生体防御・動脈硬化・高血圧・心不全など様々な病態における役割が報告されてきた。その他、乳腺の構造蛋白質としてミルク産生に関与していることも報告されている。

ヒトにおいてプリン代謝の最終代謝産物である尿酸は、血中及び組織中の尿酸濃度が上昇

すると、痛風発作や腎結石を生じる他、平滑筋細胞を増殖させ動脈硬化を促進することが報告されている。また、高尿酸血症は、高血圧・糖尿病・高脂血症・肥満などの合併が非常に多く、最近ではメタボリックシンドロームとの関係でも注目を集めている。

(2) 非常に興味深いことに、ヒトは進化の過程で尿酸を代謝する酵素(ユリケース)を消失し血中の尿酸値を高くした。その理由のひとつとして、低食塩摂取状態においては尿酸が血圧の調節に重要な役割を行なっているという報告がある。また、大規模疫学研究において心血管疾患発症と血清尿酸値との間にJもしくはUカーブが存在し指摘血清尿酸値の存在が示唆されている。しかし、これらはまだ結論に至っていない。

(3) XOR 蛋白質の研究に関しては、XOR 蛋白質が構造上3つの活性ドメインを持ち、*in vitro*で活性を持った形での発現が困難であることや、精製過程において多くが活性を消失するか機能が変化するため、研究期間の長さに比べ多くの疑問は未解決のまま残っている。尿酸に関する研究では、XOR 蛋白質の阻害剤であるアロプリノール(又は代謝産物であるオキシプリノール)を用いて検討されてきたが、アロプリノールの持つ XOR 蛋白質阻害作用以外の作用(抗酸化作用)や、完全に XOR 活性の阻害が困難なことより、XOR の持つ本来の生理的及び病的状態における役割の検討が困難であった。XOR 遺伝子と虚血再灌流障害に関しては、非常に多くの研究が行われてきたが、XOR が組織保護的に働いているのか、それとも障害を引き起こしているのか、いまだ結論に至っていない。これは、XOR が活性酸素産生と抗酸化物質産生(尿酸産生)という相反する性質を有することに由来していると思われる。

(4) そこで、我々は XOR 蛋白質及び尿酸の生理的・病的状態における役割を明らかにするため

に、XOR 蛋白質並びに尿酸を欠失するマウスを作成し研究を行ってきた(Ohtsubo T. et al. *Circ. Res.* 95:1118-1124, 2004.)。作成した XOR 遺伝子欠損マウス(F1)は、血中及び組織中の XOR 酵素活性・尿酸値がヘテロマウス(XOR+/-)で野生型(XOR+/+)の約半分、ホモマウス(XOR-/-)では測定感度以下であった。胎児死亡は認めないが、XOR-/-マウスは生後8日目より死亡を認め、ほとんどが1ヶ月以内に死亡した。肉眼的・組織学的に大きな変化を認めたのは腎臓のみであった。腎臓は肉眼的には黄白色調を示し、組織学的には、尿細管の拡張、尿細管細胞の幼弱化などの異常を認めた。血液検査では著明な BUN, Cr の上昇を認めた。

2. 研究の目的

(1) XOR 遺伝子欠損マウス及び XOR 遺伝子欠損マウス由来の培養尿細管上皮細胞を用いて、XOR 遺伝子欠損マウスで認める腎障害の機序を明らかにする。

(2) 虚血再灌流障害において、XOR は活性酸素産生を介して組織障害的に働いているのか、それとも尿酸産生を介して組織保護的に働いているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) XOR 欠損マウスにおける腎障害の機序。

XOR+/+, XOR+/-, XOR-/-の3種類の XOR 活性の異なるマウスを使用し比較検討を行う。過去の検討で明らかとなった XOR-/-マウス腎臓の特徴としては、概観が黄白色を呈し黄色物質の沈着・尿細管の拡張を認めることより、血流の低下・脂肪成分を含んだ物質の沈着・尿細管細胞の障害・間質の線維化などの関与が示唆される。よって以下に示す方法を用いてそれぞれの項目を評価していく。

① 腎機能に関連する血液・尿の生化学的解

析:血液中の濃度、尿中の排泄量

*血液:BUN, Cr, 尿酸, xanthine,
hypoxanthine

*尿:電解質, xanthine, hypoxanthine

② 黄色沈着物の評価:組織学・生化学的解析

*脂肪染色(Oil Red O 染色)

*血液・腎組織中脂肪含量(中性脂肪・総コレステロール・遊離脂肪酸・リン脂質)の測定

③ 虚血領域の評価:分子生物学・免疫組織学的解析

*Hif1 α mRNA・蛋白質の発現量及び局在

*虚血領域に集積する pimonidazole の同定

④ 尿管間質の線維化:組織学的解析・分子生物学・免疫組織学的解析

*Masson Trichrome 染色

* mRNA(real time RT-PCR 法), 蛋白質(Western Blot 法)の定量, 線維化領域の検討; α -SMA, TGF- β , CTGF

⑤ 細胞増殖(修復)・アポトーシス:分子生物学・免疫組織学的解析

*細胞増殖(修復):PCNA の発現と局在

*細胞増殖:Ki67 の発現分布

*アポトーシス:TUNEL 染色

⑥ 活性酸素の関与:分子生物学・免疫組織学的検討

*脂質酸化物(4-HNE, MDA)・DNA 酸化物(8-oxodG)の定量・局在

(2)虚血再灌流障害における XOR の役割

12~15 週齢の XOR+/-と XOR+/+マウスの両腎動脈を60分クランプ後、24時間再灌流し虚血再灌流モデル動物を作成する。虚血再灌流に伴う両群における腎障害の程度を比較検討し、障害メカニズムを明らかにする。

① 虚血再灌流後の尿酸値

② 腎障害の程度の評価

*血液:BUN, Cr の測定、組織:PAS 染色

③ 虚血領域の評価:免疫組織学的解析

*pimonidazole 染色

④ 活性酸素の測定:分子生物学・免疫組織学的検討

*脂質酸化物(4-HNE, MDA)・DNA 酸化物(8-oxodG)の定量・局在

⑤ 虚血再灌流に伴う遺伝子発現の変化:分子生物学・免疫組織学的解析

*TGF- β , TNF- α , Hif1 α 遺伝子発現量の変化の時間経過を検討する。

これらの検討により、虚血再灌流障害における XOR 蛋白質の役割を明らかにする。

4. 研究成果

(1)XOR 遺伝子欠損に伴う腎障害の機序。

①血液中の BUN, Cr は生後 7 日以降上昇し、xanthine, hypoxanthine は生後すぐより血中・尿中高値を認めた。尿生化では電解質排泄亢進を認めたが尿蛋白はむしろ低下し、糸球体障害よりも間質障害が示唆された(下表)。

	XOR ^{+/+}	XOR ^{+/-}	XOR ^{-/-}
1-week old			
Na/Cr (mEq/mg)	1.72 ± 0.16	1.71 ± 0.29	1.84 ± 0.40
K/Cr (mEq/mg)	8.02 ± 0.86	7.96 ± 0.89	8.79 ± 0.71
Cl/Cr (mEq/mg)	6.67 ± 0.29	6.70 ± 0.66	6.84 ± 0.39
Xanthine/Cr	0.68 ± 0.09	0.80 ± 0.08	16.08 ± 1.48
Hypoxanthine/Cr	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.31 ± 0.04
Protein/Cr	NE	NE	NE
4-week old			
Na/Cr (mEq/mg)	2.96 ± 0.66	2.94 ± 0.63	11.86 ± 0.60***††
K/Cr (mEq/mg)	7.10 ± 1.13	6.71 ± 1.63	17.43 ± 1.20***††
Cl/Cr (mEq/mg)	3.61 ± 0.43	3.72 ± 0.66	13.70 ± 0.67***††
Xanthine/Cr	0.66 ± 0.07	0.64 ± 0.07	36.39 ± 4.19***††
Hypoxanthine/Cr	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.02	40.37 ± 6.36***††
Protein/Cr	0.43 ± 0.16	0.40 ± 0.09	<0.06
8-week old			
Na/Cr (mEq/mg)	4.02 ± 1.80	4.02 ± 0.80	12.34 ± 2.42***††
K/Cr (mEq/mg)	6.83 ± 0.82	7.16 ± 0.69	11.84 ± 0.96*
Cl/Cr (mEq/mg)	4.13 ± 1.03	4.06 ± 0.63	8.82 ± 1.79*
Xanthine/Cr	0.24 ± 0.12	0.19 ± 0.06	60.90 ± 9.26***††
Hypoxanthine/Cr	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	14.90 ± 2.03*†
Protein/Cr	14.60 ± 3.87	14.40 ± 4.94	6.76 ± 1.94*

*Values are means ± SEM of 6-7 mice per each group; †samples at 1 week old were pooled from 4 to 6 mice; ††p<0.05, **p<0.001 and ***p<0.0001 vs age-matched XOR^{+/+} mice; †p<0.01 and ††p<0.0001 vs 1-week old XOR^{-/-} mice; NE means "not estimated".

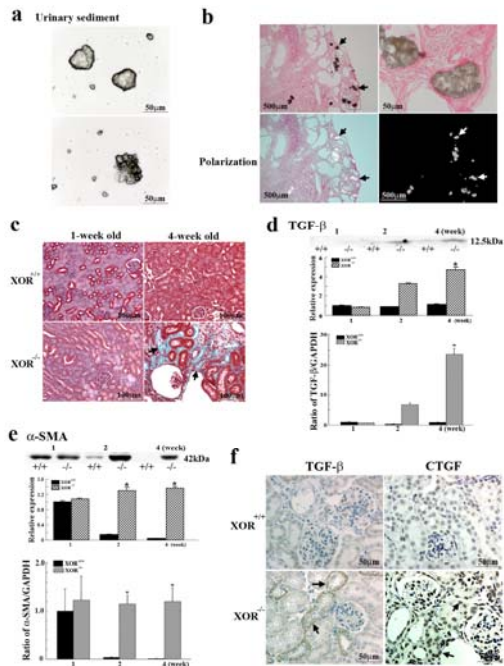
②尿沈渣では結晶成分の排泄を認め(図 a)、

偏光顕微鏡では、尿細管腔内を占拠する結晶成分の沈着を認めた(図 b)。Masson

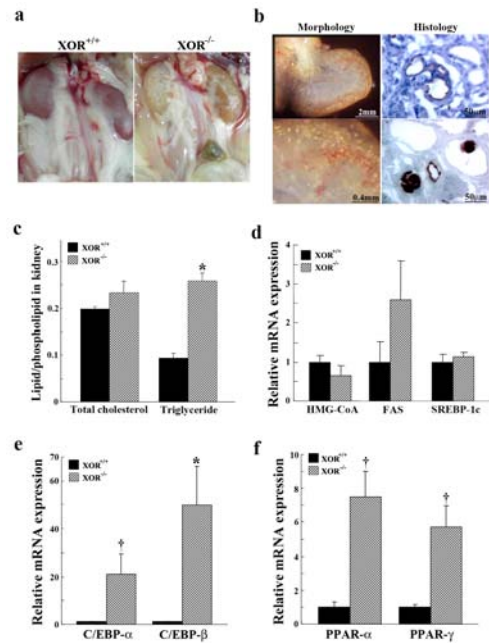
Trichrome 染色では生後 2 週くらいより間質に線維化領域を認めた(図 c)。real time

RT-PCR 法・Western Blot 法・免疫組織染色を用いた検討では、線維化に関与する遺伝子

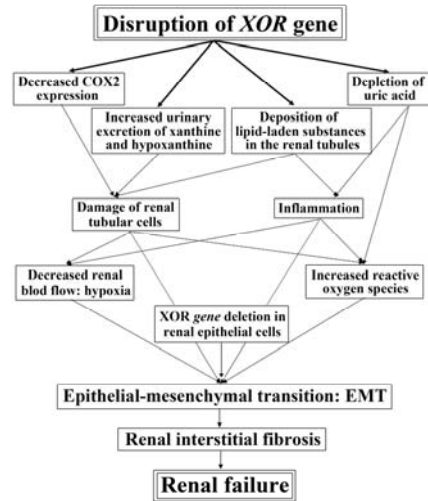
TGF- β , CTGF, α -SMA の発現亢進を認めた(図 d, e, f)。



- ③炎症の関与に関しては、osteopontin, F4/80 の発現亢進を認めマクロファージの関与が示唆された。また、TNF- α , MCP1, gp91phox mRNA の発現亢進も認めた。
- ④活性酸素に関しては、DNA の酸化障害 (8-oxodG)、脂質の酸化障害 (4-HNE, MDA) や蛋白質の酸化障害 (ニトロタイロシン) 産物の著明な蓄積をホモマウスで認めた。
- ⑤さらに、ホモマウスでは虚血部位に蓄積する pimonidazole、虚血で発現が亢進する Hif1 α の発現亢進を認めた。
- ⑥細胞増殖に関しては PCNA, Ki67 の発現亢進を、アポトーシスに関しては TUNEL 陽性細胞の増加をホモマウスで認めた。
- ⑦興味深いことに、ホモマウスは野生型に比べ体重が軽く、腹腔内脂肪も減少していたが(図 a)、腎臓尿管管腔内に Oil Red O 染色陽性の脂肪の沈着を認め(図 b)、腎組織中の中性脂肪含量が有意に増加していた。脂肪分化に関与する C/EBP- α , β , PPAR- α , γ の発現がホモマウスで著明に亢進していた(図 e, f)。



- ⑧ ホモマウス由来の初代培養尿管上皮細胞は、培養中 TGF- β , α -SMA, ビメンチンなどの発現を伴って線維芽細胞への形質転換を認めた。



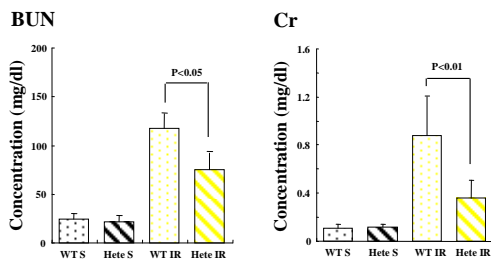
以上の結果より、XOR ホモマウスの腎障害の機序としては、XOR 遺伝子欠損により I) 尿酸欠失、II) 尿中キサンチン・ヒポキサンチン排泄亢進、III) 脂質異常が惹起され、その結果炎症・酸化ストレス・虚血・細胞増殖・アポトーシス

などが引き起こされる。また、XOR 遺伝子欠損により尿細管上皮細胞から線維芽細胞への形質転換も誘導されやすくなり、尿細管間質の線維化が進展し腎障害が引き起こされると考えられた。腎臓における XOR 遺伝子の役割として、I) マウス腎臓の生後発育に必須。II) 脂肪分化などに関与。III) 尿細管上皮細胞の線維芽細胞への形質転換に関与していることが明らかとなった。

(2) XOR と虚血再灌流障害

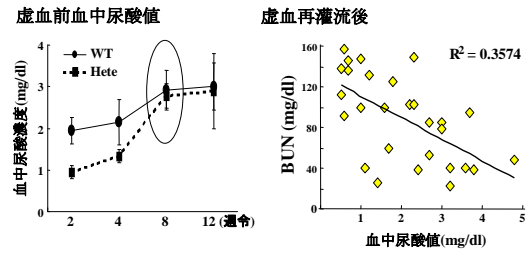
虚血再灌流障害モデルマウスでは、血中 BUN, Cr の増加、組織学的には皮髄境界を中心に尿細管上皮の壊死・剥離などを認めた。免疫組織学的には線維化に関連する TGF- β , α -SMA, ビメンチンなどの発現亢進、マクロファージの浸潤を意味する F4/80 陽性細胞の増加、ニトロタイロシンや 4-hydroxy-2-nonenal などの活性酸素障害に伴う産物の増加を認めた。XOR+/+ と XOR+/- マウスの比較では、XOR+/+ マウスは虚血再灌流後の BUN, Cr の増加が有意で(図)、組織学的にも免疫組織学的にも組織障害が顕著であった。

XORヘテロマウスは野生型に比べ、虚血再灌流障害による腎障害に抵抗性である。



虚血再灌流後の血清尿酸値と BUN, Cr 値の間には有意な負の相関、つまり虚血再灌流後の血清尿酸値が高いほど組織障害が軽度であった(図)。

虚血再灌流後の腎障害の程度は、再灌流後血中尿酸値と負の相関がある



以上の結果より1) XOR+/-マウスは野生型マウスに比べ、腎臓の虚血再灌流障害に対して抵抗性である。2) 虚血再灌流後の血清尿酸値と腎組織障害との間には負の相関を認めることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Cheung KJ, Tzamei I, Pissios P, Rovira I, Gavrilova O, **Ohtsubo T**, Chen Z, Finkel T, Flier JS, Friedman JM. : Xanthine oxidoreductase is a regulator of adipogenesis and PPARgamma activity. *Cell Metab.* 5:115-128, 2007.

[学会発表] (計 5 件)

1. **Toshio Ohtsubo**, Kiyoshi Matsumura, Hideko Noguchi and Mitsuo Iida. Physiological role of xanthine oxidoreductase in kidney. The 22nd Scientific Meeting of the international Society of Hypertension. June 16, 2008, Berlin, Germany
2. **大坪俊夫** メタボリックシンドロームモデルマウスにおけるキサンチンオキシドリダクターゼの役割 第 42 回日本痛風・核酸代謝学会総会 東京 2008, 2, 19
3. **大坪俊夫**, 坂上香苗, 松村潔, 飯田三雄 キサンチンオキシドリダクターゼ(XOR)と腎

虚血再灌流障害—XOR遺伝子欠損マウス
を用いて— 第31回日本高血圧学会総会
札幌 2008, 10, 9

4. **大坪俊夫** Xanthine oxidoreductase 遺伝子
欠損マウスの解析 第41回日本痛風・核酸
代謝学会総会 福井 2008, 2, 14
5. **大坪俊夫**、松村潔、飯田三雄 キサンチン
オキシドリダクターゼ遺伝子欠損は尿細管
上皮間葉転換を介した腎間質線維化を引
き起こす。第30回日本高血圧学会総会 沖
縄 2007, 10, 25

[その他]

ホームページ等

[http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/det
ails/K002991/research.html](http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K002991/research.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大坪 俊夫 (OOTSUBO TOSHIO)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号:30423974