

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591340

研究課題名(和文) 肥満・メタボリックシンドロームにおける高尿酸血症発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenic mechanism of hyperuricemia in obesity and metabolic syndrome

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) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：肥満・メタボリックシンドロームにおける高尿酸血症の発症メカニズムについて、肥満モデルマウスであるob/obマウスと高脂肪食投与マウスを用いて検討した。これらのマウスの腎臓における尿酸トランスポーターURAT1、GLUT9、ABCG2の発現のうち、尿酸再吸収トランスポーターであるURAT1の発現がmRNA量不変のままタンパク量が有意に増加していた。

さらに高脂肪食投与による血漿尿酸値の変化を見るために、ヒトと同様にウリカーゼ遺伝子が欠損したウリカーゼノックアウトマウスの繁殖維持の方法を確立するとともに、ウリカーゼ-URAT1ダブルノックアウトマウスの系統を樹立した。

研究成果の概要(英文)：It was studied using a high-fat diet-treated mice and obesity model of ob/ob mice to elucidate mechanism for the development of hyperuricemia in obesity and metabolic syndrome. Among the expression of urate transporters URAT1, GLUT9, ABCG2 in the kidney of these mice, urate reabsorptive transporter URAT1 was significantly increased in the amount of protein expression while the amount of mRNA expression was invariant.

In order to see the changes in plasma uric acid by high-fat diet administration, we conducted the establishment of the method of breeding maintenance of uricase knockout mice which is lost uricase activity like humans, and we also established a strain of uricase-URAT1 double knockout mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：高尿酸血症

1. 研究開始当初の背景

高尿酸血症は1960年以前のわが国ではほとんど認められなかったが、高度経済成長期以降に罹患率が増加し続け、現在は成人男性の約5人に1人が罹患する頻度の高い生活習慣病である。これまで痛風の原因疾患としてのみ捉えられていたが、高尿酸血症そのものが心血管障害の独立したリスクとなることが示唆されており、高尿酸血症の罹患率増加のメカニズムの解明は心血管障害の予防の点からも意義がある。

高尿酸血症の増加した高度経済成長期以降のカロリー摂取量は横ばいであるものの、脂質摂取量が増加しており肥満の増加とも一致している。さらにメタボリックシンドロームと高尿酸血症が高頻度に合併することが明らかになっていることから、肥満・メタボリックシンドロームによる高尿酸血症の発症メカニズムの解明が必要である。高尿酸血症のメカニズムとして、体内での尿酸合成増加による尿酸産生過剰が原因であるものは4割を占めるにすぎず、腎臓からの尿酸排泄の低下が原因となる排泄低下型高尿酸血症が9割近くを占めることから、脂質摂取および肥満・メタボリックシンドロームにより腎臓の尿酸トランスポーターの発現が変化し、排泄低下型高尿酸血症をもたらすメカニズムを解明することが必要である。

近年のゲノムワイド関連解析により、血清尿酸値に関連する遺伝子が明らかとなり、高尿酸血症の遺伝的要因の解明は大きく進歩した。一方、1)性差、2)肥満・メタボリックシンドローム、3)脱水(利尿薬投与)の3つの環境要因が高尿酸血症を惹起するメカニズムの解明は進んでおらず、特に高度経済成長期以降に認められる高尿酸血症患者の増加は遺伝的要因ではなく環境要因の変化によるものであることから、実験動物を用いて環境要因を変化させるアプローチが不可欠である。

国内外では尿酸トランスポーターの転写レベルに及ぼす1)性差、3)脱水の検討は行われているものの、2)肥満・メタボリックシンドロームの検討はまだ行われていない。特にマウス尿酸トランスポーターUrat1の蛋白レベルの評価は国内外で応募者のみが報告しており、応募者が所持する抗Urat1抗体(平成17-19年度科学研究費補助金基盤Cの研究成果として作出したUrat1ノックアウトマウスを用いて特異性を確認したもの)と市販のGlut9抗体、Smct1抗体を用いて、マウス腎臓の尿酸トランスポーターの性ホルモンによる発現変化を検討したところ、男性ホルモンは尿酸トランスポーターの転写レベルを変化させ、女性ホルモンは尿酸トランスポーターの蛋白分解を促進する結果を得た(Hosoyamada M, et.al. NNA 29(7): 574-79, 2010)。この研究の過程で、尿酸再吸収トランスポーターUrat1のみが転写レベルの増加にもかかわらず蛋白レベルの増加を認

めなかった。この現象についてさらに研究を進めるうちに、男性ホルモンの溶媒として使用したヒマワリ油に尿酸再吸収トランスポーターUrat1の転写レベルを変えなく蛋白レベルを増加させる作用があることが明らかになった。したがって、油脂が尿酸再吸収トランスポーターUrat1の蛋白分解を抑制して発現を増加させることにより、腎臓における尿酸再吸収が亢進して排泄低下型高尿酸血症をもたらすメカニズムを着想するに至った。

2. 研究の目的

心血管障害予防のために、肥満・メタボリックシンドロームが高尿酸血症を惹起するメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肥満モデルマウス(ob/obマウス)を用いて、腎臓での各種尿酸トランスポーターの発現レベルを解析して尿酸トランスポーターURAT1の発現亢進を明らかにする。次に正常マウスに油脂を投与し、腎臓での各種尿酸トランスポーターの発現レベルを解析してURAT1の発現亢進を明らかにする。さらに血液よりURAT1発現亢進時の血中遊離脂肪酸増加を明らかにする。

(2) ウリカーゼノックアウトマウスに油脂を投与し、URAT1の発現亢進とともに排泄低下型高尿酸血症が生じることを明らかにし、Urat1-ウリカーゼダブルノックアウトマウスでは油脂投与による排泄低下型高尿酸血症が認められず、油脂投与による排泄低下型高尿酸血症の原因分子はURAT1であることを明らかにする。

(3) ヒトURAT1安定発現細胞株を樹立し、遊離脂肪酸を添加して培養することによりURAT1蛋白レベルが増加することを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 肥満および油脂投与マウス腎臓における各種尿酸トランスポーターの発現解析と発現変化遺伝子の網羅的探索(研究代表者):尿酸再吸収経路として働くURAT1、GLUT9と、尿酸分泌経路として働くABCG2についてmRNAレベルと蛋白レベルを評価し、肥満モデルマウス(ob/obマウス)と油脂投与マウスの腎臓における尿酸トランスポーター遺伝子発現変化を解析した。その結果、mRNAレベルの変化を伴わない蛋白レベルの変化がURAT1に認められた。肥満により約70kDの2種類のURAT1遺伝子産物のうち、低分子量側の産物の発現量が増えることが認められた。しかしながら、ウリカーゼKOマウスの検討により血漿尿酸値や尿中尿酸排泄量を含む尿酸動態の変化が尿酸トランスポーターの発現に影響を与えることが示唆されたため、よりヒトに近い尿酸動態モデル動物の開発を先に進めることにし、その後発現変化

遺伝子の網羅的探索を行うことに計画を変更した。

(2) ウリカーゼノックアウトマウスの飼育条件の確定と繁殖(研究代表者): ウリカーゼノックアウトマウスのホモ個体を維持繁殖させるために、高尿酸血症による腎障害を予防する飼育条件として、尿アルカリ化薬投与のみで飼育する方法を確立したが、キャンパス移転に伴う飼育施設の自動給水への変更により繁殖効率の大幅な低下が生じた。尿酸合成阻害薬アロプリノールの使用により繁殖効率が回復した。ウリカーゼノックアウトマウスの C57B6 系への戻し交配を進め、各染色体で4つのマーカーを選んでスピードコンジェニックのための検出系を確立した。スピードコンジェニック後5回の戻し交配が完了し、C57BL/6 バックグラウンドのウリカーゼノックアウトマウスの系統を樹立し、ホモ同士のペアで繁殖を進めている。ウリカーゼノックアウトマウスはヒトの3倍を超える尿中尿酸排泄速度を示すことが明らかになり、繁殖のための飼育条件としてアロプリノールの用量および投与必要期間を決定した。さらに非致死量的微量採血法による血漿尿酸値定量法を確立し、ウリカーゼノックアウトマウスでは野生型マウスと異なり、血漿尿酸値に雌雄差が認められることが示唆され、ヒトの尿酸動態を研究するための動物モデルとしてウリカーゼノックアウトマウスが必要不可欠であることが明らかになった。また、ヒト尿酸代謝における尿酸トランスポーターURAT1の寄与を研究するための動物モデルとして、ウリカーゼ-URAT1-ダブルノックアウトマウスを作出に成功した。

(3) ヒト URAT1 安定発現細胞株の樹立(研究分担者): URAT1 分解機構の解明のために、ヒト URAT1cDNA を哺乳類細胞発現ベクターに連結したコンストラクトを作成し、直鎖化後、エレクトロポレーション法によりヒト腎臓由来の HEK293 細胞に遺伝子を導入して、ネオマイシン耐性形質を利用することによりヒト URAT1 安定発現細胞株を樹立した。URAT1 を介した尿酸輸送活性を定量化するために取り込み尿酸量に比例して産生される過酸化水素を蛍光として検出するウリカーゼ-過酸化水素感受性蛍光タンパクの融合タンパクを発現させた分析系を確立した。さらに尿酸の代替となる蛍光輸送基質の検索を行った。

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 5 件)

Tomioka NH, Nakamura M, Doshi M, Deguchi Y, Ichida K, Morisaki T, Hosoyamada M. Ependymal cells of the mouse brain express urate transporter 1 (URAT1). *Fluids Barriers CNS*. 10(1). 31. 2013

Matsuo H, Ichida K, Takada T, Nakayama A, Nakashima H, Nakamura T, Kawamura Y, Takada Y, Yamamoto K, Inoue H, Oikawa Y, Naito M, Hishida A, Wakai K, Okada C, Shimizu S, Sakiyama M, Chiba T, Ogata H, Niwa K, Hosoyamada M, Mori A, Hamajima N, Suzuki H, Kanai Y, Sakurai Y, Hosoya T, Shimizu T, Shinomiya N. Common dysfunction variants in ABCG2 are a major cause of early-onset gout. *Sci Rep*. 3. 2014, 2013

Watanabe T, Tomioka NH, Doshi M, Watanabe S, Tsuchiya M, Hosoyamada M. Macrophage migration inhibitory factor is a possible candidate for the induction of microalbuminuria in diabetic db/db mice. *Biol Pharm Bull*. 36(5). 741-747. 2013

Ichida K, Matsuo H, Takada T, Nakayama A, Murakami K, Shimizu T, Yamanashi Y, Kasuga H, Nakashima H, Nakamura T, Takada Y, Kawamura Y, Inoue H, Okada C, Utsumi Y, Ikebuchi Y, Ito K, Nakamura M, Shinohara Y, Hosoyamada M, Sakurai Y, Shinomiya N, Hosoya T, Suzuki H. Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia. *Nat Commun*. 3. 764-770. 2012

Doshi M, Takiue Y, Saito H, Hosoyamada M. The increased protein level of URAT1 was observed in obesity/metabolic syndrome model mice. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 30(12): 1290-4. 2011

[学会発表](計 10 件)

渡部 多真紀, 富岡 直子, 渡辺 茂和, 土屋 雅勇, 細山田 真. マウスにおける採血前および採血後偽高尿酸血症. 日本薬学会第 134 年会. 2014 年 03 月 28 日. 熊本

富岡 直子, 中村 真希子, 出口 芳春, 市田 公美, 森崎 隆幸, 細山田 真. Urate transporter 1 (URAT1) は脳室上衣細胞に発現する. 第 87 回日本薬理学会年会. 2014 年 03 月 21 日. 仙台

富岡 直子, 中村 真希子, 市田 公美, 森崎 隆幸, 内田 俊也, 細山田 真. マウス脳内 URAT1 は脳室上衣細胞脳室側膜に局在する. 第 47 回日本痛風核酸代謝学会. 2014 年 02 月 21 日. 神戸

渡部 多真紀, 富岡(原) 直子, 道志 勝, 渡辺 茂和, 細山田 真, 土屋 雅勇. マウスの採血前および採血後偽高尿酸血症. 第 57 回日本薬学会関東支部大会. 2013 年 10 月 26 日. 東京

Hosoyamada-M, Watanabe-T, Tomioaka-NH, Doshi-M, Watanabe-S, Tsuchiya-M. FALSE INCREASE OF URIC ACID LEVEL OF MOUSE BLOOD IN VITRO. 15th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man. 2013年06月10日. Madrid, Spain

細山田 真、富岡 直子、道志 勝. 家族性若年性高尿酸血症性腎症1型モデルマウス腎臓では5'-レダクターゼ2発現が増加する. 第56回日本腎臓学会総会. 2013年05月11日. 東京

細山田 真、渡部 多真紀、富岡 直子、道志 勝、土屋 雅勇. ヘパリン加マウス血液の受容体刺激による尿酸生成. 第86回日本薬理学会. 2013年03月21日. 福岡

渡部 多真紀、富岡 直子、中村 真希子、道志 勝、金子 希代子、内田 俊也、藤森 新、市田 公美、土屋 雅勇、細山田 真. マウス血清尿酸値のインビトロ上昇. 第46回日本痛風・核酸代謝学会総会. 2013年02月14日. 東京

中村 真希子、荒川 伸介、松尾 広大、細山田 真、安西 尚彦、市田 公美. Fluoresceinを用いた尿酸トランスポーター機能評価法の開発. 第45回日本痛風・核酸代謝学会総会. 2012年2月17日. 奈良

細山田 真、金子 希代子、内田 俊也、藤森 新. ウリカーゼノックアウトマウスにおけるアロプリノール投与の影響. 第45回日本痛風・核酸代謝学会総会. 2012年2月17日. 奈良

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

中村 真希子 (NAKAMURA MAKIKO)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80447557

市田 公美 (ICHIDA KIMIYOSHI)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80183169

(3)連携研究者

なし