

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460105

研究課題名(和文)慢性腎臓病の進行阻止のためのアンドロゲン系およびアンジオテンシン系阻害薬の検討

研究課題名(英文) Studies on androgenic and angiotensin system inhibitors for inhibiting the progression of chronic kidney disease

研究代表者

渡部 多真紀 (WATANABE, Tamaki)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：40453691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：HPRTの活性が低いC57BL/6Jとは異なり、B6-ChrXCMSM はHPRT活性が高いタンパクが発現していると考えられる。尿酸値は、採血直後のB6/Uox-KOにおいてC57BL/6Jより約10倍高いことが認められた。30分放置およびアロプリノール添加30分後ではC57BL/6JマウスとB6-ChrXCMSMマウスのように尿酸値の増加は認められなかった。

マウス血漿尿酸値のin vitro上昇はマウス赤血球のHPRT活性が低く、血中尿酸値が低いためにヒポキサンチンが放出され、血漿内のキサンチンオキシダーゼ活性が高いために尿酸に変換されることが原因であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of “false in vitro elevation of uric acid level” is clarified using mice with highly active hypoxanthine phosphoribosyl transferase (Hprt) of B6-ChrXC-MSM, a consomic mouse strain with the chromosome portion of Mus musculus morocinus in the Hprt gene site, or urate oxidase gene (Uox) targeted mice (Uox-KO). Uric acid level of B6-ChrXC-MSM blood tended to be lower than those of control blood. Those data were significantly lower than that of control. Moreover, uric acid level of Uox-KO blood, which was about 10 times higher than that of control, did not elevated after incubation in the test tube. Those data were also significantly lower than that of control. In conclusion, “false in vitro elevation of uric acid level” seems to be caused by the low levels of erythrocyte HPRT activity and high plasma uric acid level of laboratory mice.

研究分野：薬理系薬学

キーワード：尿酸

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)の早期に見られる症状である高尿酸血症は、痛風腎や尿路結石の危険因子であるだけでなく、尿酸生成阻害薬アロプリノールによる介入試験によってCKDの悪化要因であることも明らかになっている。高尿酸血症が腎障害を惹起する遺伝性疾患として家族性若年性高尿酸血症性腎症(familial juvenile hyperuricemic nephropathy: FJHN)という稀な遺伝性疾患があり、FJHNのうちFJHN1型の原因は腎臓のヘンレループ細胞に発現するウロモジュリン遺伝子(UMOD)の変異であり、変異UMODを用いた vivo および vitro の研究が国内外で行われている。

さらにゲノムワイド関連解析(GWAS)によって、UMOD が腎機能低下に関連する遺伝子であることが明らかになり、変異がなくてもUMODの尿中排泄量が多いとCKDが進行しやすいことも明らかになった。したがって、UMODはCKDの進行を阻止するための研究対象として重要であることが明らかになってきた。

2. 研究の目的

本研究は、高尿酸血症から慢性腎臓病(CKD)になる家族性若年性高尿酸血症性腎症(FJHN)のモデルマウスと、CKD進行要因であるウロモジュリン排泄増加モデルマウスのどちらも尿酸トランスポーターSlc22a12 遺伝子発現が亢進し、アンドロゲン作用を増強する Srd5a2 遺伝子の発現が前者では亢進、後者では不変であった研究結果を発展させ、2つのモデルマウスのSlc22a12 発現亢進に対してアンドロゲン系とアンジオテンシン系阻害薬を用いた抑制効果について明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

マウス：血漿尿酸値のばらつきの検討では、ICR()マウスを使用した。血漿尿酸値の in vitro 上昇メカニズムに関する検討では、コントロールとして C57BL/6J ()マウスを用い、比較対象として B6-ChrXCMSM ()マウスと B6/Uox-KO ()マウスを用いた。B6-ChrXCMSM マウスは、赤血球中におけるヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)活性が C57BL/6J マウスより高い活性をもつマウスである。B6/Uox-KO ()マウスは、尿酸オキシダーゼを欠損し、ヒトのプリン体代謝に近いマウスである。

尿酸値の測定：マウスをエーテル+ペントバルビタール麻酔下で開腹し下大静脈から採血した。採血した血液は凝固促進剤入りもしくは抗凝固剤入りチューブに分注し、血液の状態を一定時間放置後に血清もしくは血漿を遠心分離し、アセトニトリル除蛋白後 HPLC により尿酸・ヒポキサンチン・クレアチニン

を測定した。ヒトにおいては、肘静脈より採血を行い(帝倫 No15-185)尿酸・ヒポキサンチン・クレアチニンの測定はマウスと同様におこなった。

ジェノタイピング：マウス HPRT 遺伝子について TaqMan GTXpress Master Mix を用いたアレル識別プロットにより行った。

4. 研究成果

HPRT b アレルを持ち低い活性の HPRT B タンパクを発現する C57BL/6J とは異なり、B6-ChrXCMSM は HPRT a アレルを持ち高い活性の HPRT A タンパクを発現していると考えられる。さらに HPRT 遺伝子を含む染色体の部位が M. m. morocinus と同じコンソミックマウスである B6-ChrXCMSM でも、赤血球の HPRT 活性が高いと考えられる。

C57BL/6J よりも HPRT 活性が高い B6-ChrXCMSM は、赤血球中においてヒポキサンチンからイノシン酸(IMP)への変換が亢進し、赤血球内のヒポキサンチン濃度がより低くなり、ヒポキサンチンの赤血球外への放出が少なくなることが予想された。ヒトと同様に尿酸分解酵素ウリカーゼの遺伝子を欠損した B6/Uox-KO により血漿中尿酸濃度をヒトと同じレベルにすると、室温放置 30 分およびアロプリノール添加 30 分放置による血漿中ヒポキサンチン濃度の上昇が抑えられた。高濃度の血漿中尿酸により赤血球からのヒポキサンチン放出が抑制された可能性が考えられる。従って、マウス血液で見られる採血後の試験管内での尿酸の偽上昇は、マウス赤血球の HPRT 活性が低く、血中尿酸値が低いためにヒポキサンチンが放出され、血漿内のキサンチンオキシダーゼ活性が高いために尿酸に変換されることが原因であると考えられた。今後は新規転写産物が尿酸トランスポーターとしての機能を持つかどうか検討する予定である。

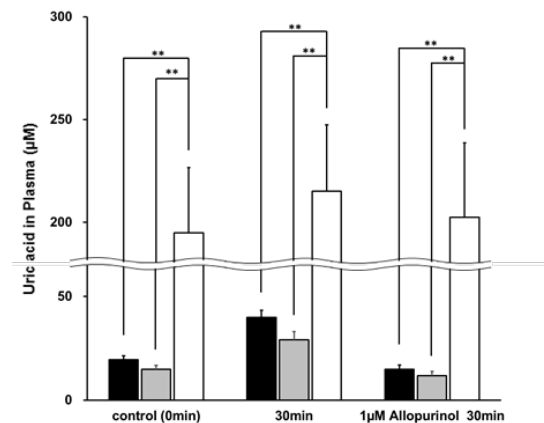


Fig.1 False elevation of uric acid and hypoxanthine levels in vitro.

<引用文献>

Watanabe T, Tomioka N.H, Watanabe S, Tsuchiya M, Hosoyamada M. False in

vitro and in vivo elevations of uric acid levels in mouse blood. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids., 33, 192-198 (2014).
Tax W.J., Veerkamp J.H. Phosphoribosylpyrophosphate in erythrocytes of ten mammalian species: concentration, synthesis and degradation. Comp. Biochem. Physiol. B., 59, 219-222 (1978).
Oda M, Satta Y, Takenaka O, Takahata N. Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications. Mol. Biol. Evol., 19, 640-653 (2002).
Johnson G.G, Kronert W.A, Bernstein S.I, Chapman V.M, Smith K.D. Altered turnover of allelic variants of hypoxanthine phosphoribosyltransferase is associated with N-terminal amino acid sequence variation. J. Biol. Chem., 263, 9079-9082 (1988).
Takada T, Mita A, Maeno A, Sakai T, Shitara H, Kikkawa Y, Moriwaki K, Yonekawa H, Shiroishi T. Mouse inter-subspecific consomic strains for genetic dissection of quantitative complex traits. Genome Res., 18, 500-508 (2008).
Wu X, Wakamiya M, Vaishnav S, Geske R, Montgomery C, Jr. Jones P, Bradley A, Caskey C.T. Hyperuricemia and urate nephropathy in urate oxidase-deficient mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91, 742-746 (1994).
Johnson G.G, Larsen T.A, Blakely P, Chapman V.M. Elevated levels of erythrocyte hypoxanthine phosphoribosyltransferase associated with allelic variation of murine Hprt. Biochemistry (Mosc)., 24, 5083-5089 (1985).
Johnson G.G, Chapman V.M. Altered turnover of hypoxanthine phosphoribosyltransferase in erythroid cells of mice expressing Hprt a and Hprt b alleles. Genetics, 116, 313-320 (1987).
Kay Overgaard-Hansen., Ulrik V. Lassen. Active Transport of Uric Acid Through the Human Erythrocyte Membrane. Nature, 184, 553-554 (1959)

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)

Tamaki Watanabe, Naoko H. Tomioka, Shigekazu Watanabe, Yoshihiko Suzuki, Masao Tsuchiya, Makoto Hosoyamada. The mechanism of false in vitro elevation of uric acid level in mouse blood. Biological & pharmaceutical bulletin. 査読有、39(7), 1081-1084 (2016).
DOI:10.1248/bpb.b15-01046

〔学会発表〕(計 1 件)

渡部多真紀、HPRT 高活性マウスを用いた血漿尿酸値の *in vitro* 上昇メカニズムに関する検討、第 50 回日本痛風・核酸代謝学会総会、2017 年 2 月 16 日～17 日、東京都新宿区

〔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

渡部 多真紀 (WATANABE, Tamaki)
帝京大学・薬学部・助教
研究者番号：40453691

(2) 研究分担者

細山田 真 (HOSOYAMADA, Makoto)
帝京大学・薬学部・教授
研究者番号：00291659

土屋 雅勇 (TSUCHIYA, Masao)
帝京大学・薬学部・教授
研究者番号：80398586

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()