

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 11 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：26460347

研究課題名(和文) ヒト尿酸代謝完全モデル動物を用いた高尿酸血症発症に關与する環境要因の解明

研究課題名(英文) Elucidation of environmental factors involved in the onset of hyperuricemia using complete model animals of human uric acid metabolism

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：1. C57BL/6 などの実験用マウスよりもHPRT活性が高いことが報告されている B6/XcMSMマウスの繁殖と、亜種差に伴う生殖隔壁を超えた継代飼育に成功した。2. B6/XcMSMマウスがHPRT高活性アレルを持つことを確認すると共に、HPRTアレルのジェノタイピング法を確立した。3. B6/XcMSMマウスを用いることによりXor活性のない血球において、HPRT高活性にともなうプリンサルベージ系の充進によるヒポキサンチン放出の抑制を認めた。4. UoxKO-XcMSMマウス作出により、Xorが高活性であることを除いてヒト尿酸代謝に近づいたマウスを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：1. Successful breeding of B6/XcMSM mice reported to have a higher HPRT activity than experimental mice such as C57BL/6 and successive breeding exceeding reproductive septa associated with subspecies differences. 2. We confirmed that B6/XcMSM mice have HPRT high activity allele and established genotyping method of HPRT allele. 3. By using B6/XcMSM mouse, suppression of hypoxanthine release by blood purinergic system with HPRT high activity was observed in blood cells without Xanthine oxidoreductase (Xor) activity. 4. UoxKO-XcMSM mouse creation enabled us to obtain mice that were close to human uric acid metabolism except that Xor was highly active.

研究分野：核酸代謝

キーワード：尿酸

1. 研究開始当初の背景

高尿酸血症は痛風や尿路結石の危険因子としてだけでなく、心血管障害や腎障害の独立した危険因子であることが疫学研究により明らかとなり、高尿酸血症の発症要因に関する研究の重要性が高まっている。国内外の研究動向として、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) の手法が導入されたことにより、高尿酸血症の発症要因として遺伝要因の解明が大きく進歩し、血清尿酸値に關与する 28 の遺伝子が既に同定されている。一方、現在わが国の成人男性の 5 人に 1 人が高尿酸血症であり、1990 年代に比べて罹患率が増加していることから、環境要因による高尿酸血症が現在増加しており、その発症メカニズムを明らかにすることが必要である。

高尿酸血症の環境要因については、実験動物を用いて食事や運動などの環境要因を制御した研究により明らかにできるはずである。ところが、ヒトでは尿酸分解酵素 Urikase の遺伝子がノックアウトされているのに対し、マウスなどの高等霊長類以外の全ての哺乳類では Urikase 遺伝子 (Uox) が保存されているため、尿酸 (UA) が分解されてしまい高尿酸血症の研究に用いることが出来なかった。この問題を解決するため、我々は平成 23~25 年度科研費により、Uox ノックアウトマウス (UoxKO マウス) をジャクソン研究所から導入して繁殖維持することにより、高尿酸血症の環境要因を研究するためのヒト尿酸代謝モデルマウス作出を試みた。その結果、UoxKO マウスはヒトと比べて体重当たり約 25 倍の尿酸を排泄して腎障害を生じてしまうため、繁殖維持に尿酸産生阻害薬アロプリノールの投与が必要であり、ヒトの尿酸代謝を研究するための動物モデルとしては不完全であることが明らかになった。

我々は別の研究により、マウスでは採血後に試験管内で血中尿酸値が上昇する現象を明らかにした。このメカニズムとしてマウス赤血球から放出されるヒポキサンチン (HX) がマウス血清中のキサンチンオキシドレダクターゼ (XOR) によって尿酸に変換されるためであり、同様の処理をしてもヒト血液では赤血球から HX が放出されないことを明らかにした。赤血球内の HX はヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) によりイノシン酸 (IMP) へ変換されるプリンサルベージ経路によって再利用される。HPRT 遺伝子産物の N 末から 2 番目のアミノ酸がヒトや野ネズミがアラニンであるのとは異なり、C57BL/6 系統などの研究用マウス (Mus musculus) ではプロリンに変異しており、HPRT の分解速度が亢進するために、研究用マウス赤血球の HPRT 活性は野ネズミ赤血球の HPRT 活性の 30 分の 1 と報告されている。従って、研究用マウスと交配させた低活性 HPRT を持つ UoxKO マウスは、健全なヒトのモデルというよりも、HPRT の活性低下によりプリン de novo 合成系が亢進して高尿酸尿

症を呈する軽症型 レッシー=ナイハン症候群患者のモデルであることが明らかになった。

上述の経緯から、X 染色体の HPRT 遺伝子を含む部分だけが野ネズミ (Mus musculus molossinus) の染色体に置換された C57BL/6 系統マウスである B6 コンソミック系統 MSM マウス (XC-MSM マウス) を国立遺伝学研究所から導入し、交配によって N 末から 2 番目のアミノ酸がヒトと同じアラニンである高活性 HPRT を持つ UoxKO マウスを作出することにより、ヒトの尿酸代謝を研究するための完全なモデルマウスが得られるという着想に至った。

2. 研究の目的

野ネズミの HPRT 高活性アレルを持つ B6 コンソミック系統である Xc-MSM マウスとの交配により得られる HPRT 高活性 UoxKO マウスを、ヒト尿酸代謝の完全なモデルマウスとして系統樹立し、環境要因による高尿酸血症の発症メカニズムを明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

維持繁殖をしている UoxKO マウスに、遺伝病より導入した Xc-MSM を交配させて、UoxKO-Xc-MSM マウスを作出する。ジェノタイプは耳パンチ片を用いて抽出したゲノム DNA に対して、HPRT 遺伝子の変異塩基を含む TaqMan MGB プローブを用い、B6 アレルと MSM アレルを VIC および FAM の蛍光で検出した。作出したマウスに XOR 阻害剤のアロプリノールもしくはフェブキソスタットを混餌にて投与し、血漿尿酸濃度および尿中尿酸排泄量/クレアチニン排泄量比を C18 カラムを用いた HPLC 法にて定量した。

4. 研究成果

(1) C57BL/6 などの実験用マウスよりも HPRT 活性が高いことが報告されている B6/XcMSM マウスの繁殖に成功した。一般的に種間では生殖隔壁が存在するため、交配させても仔が生まれないことが多いが、亜種差に伴う生殖隔壁を超えて継代飼育に成功した。

(2) B6/XcMSM マウスが HPRT 高活性アレルを持つことをダイレクトシーケンシング法で確認すると共に、TaqMan プローブを用いた 1 塩基変異の同定手法を利用した HPRT アレルのジェノタイプング法を確立した。

(3) B6/XcMSM マウスを用いることにより Xor 活性のない血球において通常の B6 マウスに比べてヒポキサンチン放出の抑制を認めた。このことから B6/XcMSM マウスでは HPRT 高活性にともなうプリンサルベージ系の亢進が存在すると考えられた。

(4) UoxKO-XcMSM マウス作出により、Xor が高活性であることを除いてヒト尿酸代謝に近づいたマウスを得ることができた。今後は UoxKO-XcMSM マウスにおいて Xor 活性の消失および減弱を試みる予定である。

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, Tamura Y, Takada T, Shibata S, Suzuki H, Uchida S, Hosoyamada M. Immunohistochemical and in situ hybridization study of urate transporters GLUT9/URATv1, ABCG2, and URAT1 in the murine brain. *Fluids Barriers CNS*. 2016; 査読有 13(1):22.

Hosoyamada M, Tsurumi Y, Hirano H, Tomioka NH, Sekine Y, Morisaki T, Uchida S. Urat1-Uox double knockout mice are experimental animal models of renal hypouricemia and exercise-induced acute kidney injury. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2016; 査読有 35(10-12):543-549.

Inazawa K, Yamaguchi S, Hosoyamada M, Fukuuchi T, Tomioka NH, Yamaoka N, Kaneko K. Urinary excretion of uric acid, allantoin, and 8-OH-Deoxyguanosine in uricase-knockout mice. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2016; 査読有 35(10-12):559-565.

Watanabe T, Tomioka NH, Watanabe S, Suzuki Y, Tsuchiya M, Hosoyamada M. The Mechanism of False in Vitro Elevation of Uric Acid Level in Mouse Blood. *Biol Pharm Bull*. 2016; 査読有 39(7):1081-4.

Watanabe T, Tomioka NH, Watanabe S, Tsuchiya M, Hosoyamada M. False in vitro and in vivo elevations of uric acid levels in mouse blood. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2014; 査読有 33(4-6):192-8.

[学会発表](計11件)

腎性低尿酸血症と運動後急性腎不全の疾患モデル動物としての Urat1 Uox ダブルノックアウトマウス。鶴見ゆう，富岡直子，関根祐子，細山田真。日本薬学会第135年会。2015年3月28日、神戸

脳室上皮細胞における尿酸トランスポーターの発現解析。富岡直子，道志勝，渡部多真紀，土屋雅勇，細山田真。日本薬学会第135年会。2015年3月28日、神戸

マウス脳内における尿酸トランスポーターの発現解析。富岡直子，田村好古，高田龍平，内田俊也，細山田真。第49回日本痛風・核酸代謝学会総会。2016年2月18日、大阪豊中

Urat1 Uox ダブルノックアウトマウスの尿中尿酸排泄量に対するフェブキソスタットの作用。細山田真，富岡直子，金子希代子。第49回日本痛風・核酸代謝学会総会。2016年2月19日、大阪豊中

ウリカーゼ欠損マウスの脳内尿酸濃度に対する尿酸トランスポーターURAT1の関与。富岡直子，青木小海，道志勝，細山田真。日本薬学会第136年会。2016年3月29日、横浜

腎性低尿酸血症モデル Urat1 Uox double KO マウスにおけるアロプリノール中断後急性腎障害の経日的経過。平野秀憲，関根祐子，富岡直子，細山田真。日本薬学会第136年会。2016年3月29日、横浜

腎性低尿酸血症モデル Urat1 Uox ダブルノックアウトマウスにおけるアロプリノール中断後急性腎障害の経日的変化。細山田真，平野秀憲，富岡直子，関根祐子，内田俊也。第59回日本腎臓学会総会。2016年6月18日、横浜

腎性低尿酸血症1型モデルマウスの作出と最適化。細山田真。第50回日本痛風・核酸代謝学会総会。2017年2月16日、東京新宿

Uox KO マウスにおけるクエン酸Naおよびクエン酸K負荷による血漿尿酸値の変化。細山田真，高橋蓮，富岡直子，関根祐子，内田俊也。第50回日本痛風・核酸代謝学会総会。2017年2月17日、東京新宿

Urat1 Uox ダブルノックアウトマウスの脳内尿酸濃度解析。富岡直子，細山田真。第50回日本痛風・核酸代謝学会総会。2017年2月17日、東京新宿

HPRT 高活性マウスを用いた血漿尿酸値のinvitro上昇メカニズムに関する検討。渡部多真紀，富岡直子，土屋雅勇，細山田真。第50回日本痛風・核酸代謝学会総会。2017年2月17日、東京新宿

[その他]
ホームページ等

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

富岡 直子 (TOMIOKA NAOKO)
帝京大学・薬学部・助教
研究者番号：60525814

金子 希代子 (KANEKO KIYOKO)
帝京大学・薬学部・教授
研究者番号：9 0 1 4 7 0 7 5

関根 祐子 (SEKINE YUKO)
千葉大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：3 0 5 6 7 3 5 0