

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08222

研究課題名(和文)キサンチンオキシドレダクターゼノックアウトマウスにおける腎不全死起因物質の探索

研究課題名(英文)Study for substances responsible for renal failure death in xanthine oxidoreductase knockout mice

研究代表者

渡部 多真紀 (WATANABE, Tamaki)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：40453691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果として、ヒポキサンチントランスポーター遺伝子Aをノックアウトマウス単独では尿中オキシプリン排泄の減弱は認められなかったため、A遺伝子-Xorダブルノックアウトマウスを作出した。作出したマウスはHPRT高活性Xor-KOマウスより1週長く生存し、尿中オキシプリン排泄量も半減した。また、SLC23A3がヒトの腎臓におけるヒポキサンチントランスポーターであることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内外でHPRT高活性マウスを用いた研究はなく、他にXOR-KOマウスを生存させた報告もないことから、私たちがプリン代謝関連酵素の活性を変えることで腎障害を回避することに世界で初めて成功したことになる。慢性腎臓病における腎障害の進行因子としてプリン代謝を検討した研究はなく、腎障害の新規バイオマーカーの発掘と腎障害進行の新たなメカニズムの解明を目指す点から、本研究は新規性の高い研究という位置づけにある。

研究成果の概要(英文)：As a research result, since the hypoxanthine transporter gene A knockout mouse alone did not attenuate the excretion of urinary oxypurine, an A gene-Xor double knockout mouse was created. The generated mice survived for one week longer than the HPRT highly active Xor-KO mice, and the amount of urinary oxypurine excreted was halved. We also confirmed that SLC23A3 is a hypoxanthine transporter in the human kidney.

研究分野：医療薬学

キーワード：腎不全 腎毒性 プリン代謝関連物質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プリン代謝酵素 XOR のノックアウトマウスは生後腎不全死するが、別のプリン代謝酵素 HPRT を高活性にすると尿中キサンチン排泄量不変で腎不全死を回避して生存したことから、腎毒性あるいは腎保護作用を持つキサンチン以外のプリン代謝関連物質が存在する。本研究では HPRT 高活性と低活性の XOR ノックアウトマウスで含有量に差のある物質を同定し、同定された物質の腎への作用を検討し、腎毒性あるいは腎保護作用を持つプリン代謝関連物質を明らかにする。次に、XOR 下流のプリン代謝酵素である UOX のノックアウトマウスおよび遺伝性腎不全のアルポート症候群モデルマウスにおいて、この物質が原因疾患に関わらず腎障害の進行を示す普遍的なバイオマーカーであること明らかにし、さらに慢性腎臓病患者の尿検体において腎障害の進行を示すバイオマーカーであることを示す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腎不全死する HPRT 低活性 XOR-KO マウスと生存する HPRT 高活性 XOR-KO マウスの尿中、血中および臓器中プリン体含量の差を調べることにより、HPRT 低活性 XOR-KO マウスにおいて蓄積する腎毒性物質および欠乏する腎保護物質を同定し、他の腎不全モデルマウスにおいて腎障害のバイオマーカーとして機能するかどうか検討することである。

本研究の学術的独自性と創造性は、ヒトと症状の異なるプリン代謝疾患モデルマウスにおいて、マウスのプリン代謝をヒトに近づけることによって、よりヒト患者に近い疾患モデルマウスの作出を試みている点にある。HPRT 高活性 XOR-KO マウスは我々が世界で初めて作出し、特許出願 (特願 2017-157930) も完了している。

3. 研究の方法

(1) HPRT 低活性 XOR-KO マウスに蓄積する腎毒性および欠乏する腎保護の候補物質の同定

HPRT 活性の高低で生死が決まることから、HPRT 低活性 XOR-KO マウスの腎不全死の原因としてプリン代謝関連物質が関与している可能性が高い。まず HPRT 低活性および高活性それぞれの XOR-KO マウスの尿サンプルについて、HPLC を用いてプリン体を分離し、複数の UV 波長を用いたクロマトグラムを得る。HPRT 高活性に比べて HPRT 低活性 XOR-KO マウスの方が多く尿中排泄されているクロマトピークを腎毒性候補物質とし、少なく尿中排泄されているクロマトピークを腎保護候補物質として探索する。

次にプリン代謝関連物質の標品を用いて、探索されたクロマトピークの保持時間と複数波長によるスペクトログラムとの一致を検討することによってクロマトピークに対応する物質を同定する。さらにどの標品とも一致しなかったクロマトピークについては、LC-MS/MS を用いて得られる分解ピークのマスデータによって物質を同定するとともに、同定された物質の標品を用いて保持時間の一致を確認する。また、標品によって同定されたクロマトピークが単一成分由来であることを LC-MS を用いて確認する。

同様の手法にて、80%アセトニトリルで除タンパクした血清および臓器 (腎臓および肝臓) の各サンプルを用いて、HPRT 低活性および高活性それぞれの XOR-KO マウスで含有量に差のある物質を同定し、腎毒性候補物質および腎保護候補物質について体内動態の情報を取得するとともに、HPRT 低活性 XOR-KO マウスの週齢と共に増加あるいは減少することを確認する。

(2) 腎毒性候補物質による腎毒性惹起能の検討

HPRT 低活性である C57BL/6 マウスを用いて、上記 1. で同定された腎毒性候補物質を腹腔内投与し、HPLC で測定した血清クレアチニン濃度の上昇を指標に腎障害を惹起する能力の有無について検討する。ただし、尿酸を分解するウリカーゼを持つ C57BL/6 マウスは、HPRT 低活性でも腎障害を示すことはない。一方、ウリカーゼノックアウトマウス (UOX-KO マウス) は、アロプリノールを用いなければ XOR-KO マウスよりも早く生後 2 週間~1 か月で腎不全死することから、腎毒性物質に対してより脆弱な可能性のある UOX-KO マウスを用いて、腎毒性候補物質の腎障害を惹起する能力の有無について検討する。HPRT 低活性 XOR-KO マウスで週齢と共に蓄積して腎不全死をもたらす腎毒性物質を明らかにする。

(3) 腎保護候補物質による腎障害回避能の検討

HPRT 低活性 XOR-KO マウスに腎保護候補物質を餌に混入する、または浸透圧微量ポンプ用いて持続投与することにより、2. と同様に腎障害を回避する能力の有無について検討する。

また、ヒポキサンチンは XOR によって尿酸に代謝される過程で NADH を生成するか、HPRT によってイノシン酸を生成することにより、どちらも ATP 産生を促進する。したがって、HPRT 低活性 XOR-KO マウスでは ATP 産生が障害されている可能性が考えられる。HPRT 高活性および低活性それぞれの XOR-KO マウスの腎臓内 ATP 含量について、組織用 ATP 含量測定キットを用いて測定し、HPRT 高活性 XOR-KO マウスと比べて HPRT 低活性 XOR-KO マウスの腎臓で ATP 含量が低下しているかどうかを明らかにする。

(4) 同定された腎毒性物質および腎保護物質について他の腎不全モデルマウスでの検討

ウリカーゼノックアウトマウス (UOX-KO マウス) を用いた検討

UOX-KO マウスは母体へのアロプリノール投与によって、産仔が生後 2 週齢以降も生存できるようになる。これはアロプリノールの XOR 阻害によって尿中尿酸排泄量の減少が腎保護に働いたためと考えられているものの、XOR の下流の UOX 遺伝子のノックアウトでもあり、HPRT 低活性 XOR-KO マウスと同じメカニズムで腎障害を起こしている可能性がある。逆に、アロプリノールは XOR 以外のプリン代謝酵素にも作用を持つことから、XOR 活性の無い HPRT 低活性 XOR-KO マウスでもアロプリノールの投与が XOR 阻害以外の作用で腎障害を回避する可能性は否定できない。

UOX-KO マウスの尿、血液、臓器のサンプルにて、上記 2. および 3. で同定された腎毒性物質および腎保護物質について定量を行うとともに、アロプリノールの投与によって腎毒性物質の減少あるいは腎保護物質の増加をもたらしていることを確認する。

アルポート症候群モデルマウス (Col4a5-KO マウス) を用いた検討

Col4a5-KO マウスは 18 週齢でタンパク尿を発症し、25 週齢で血清クレアチニン上昇が始まり、30 週齢以降で腎不全によって死亡する遺伝性腎疾患モデルマウスである。腎障害の進行は原因疾患に関わらず、血清クレアチニン値の逆数が年月とともに直線的に低下することが知られており、腎障害の進行に共通のメカニズムが存在する可能性が考えられる。この共通のメカニズムが HPRT 低活性 XOR-KO マウスにおける腎障害のメカニズムと同一である可能性は否定できない。同腹の Col4a5-KO マウスと野生型マウスを用いて、上記 2. および 3. で同定された腎毒性物質および腎保護物質について、尿、血液、臓器のサンプルにて定量を行うことにより、野生型マウスと比べて、Col4a5-KO マウスで腎毒性物質が増加している、あるいは腎保護物質が減少していることを確認することにより、HPRT 低活性 XOR-KO マウスにおいて増加する腎毒性物質あるいは減少する腎保護物質が、原因疾患に関わらず腎障害の進行を示す普遍的なバイオマーカーであることを明らかにする。

慢性腎臓病患者の尿検体を用いた検討

慢性腎臓病における腎障害進行のバイオマーカーとして、プリン代謝産物が注目されたことはこれまでになかった。上記の腎障害モデルマウスを用いて確立した腎障害の進行を示す普遍的なバイオマーカーについて、慢性腎臓病患者の尿検体を用いて検討する価値がある。慢性腎臓病患者と健常成人の尿検体を用いて、HPRT 低活性 Xor-K0 マウスにおいて増加する腎毒性物質および減少する腎保護物質を定量することにより、マウスだけでなくヒトにおいても腎障害の進行を示すバイオマーカーであることを示す。

4. 研究成果

研究成果として、腎毒性候補物質であるヒポキサンチンが体内のプリン分解で生じるのみならず、体外からの流入が影響している可能性が考えられたため、ヒポキサンチントランスポーター遺伝子 A をロックアウトすることにより、体内への流入抑制を試みることにした。A 遺伝子ノックアウトマウス単独では尿中オキシプリン排泄の減弱は認められなかった。次に A 遺伝子-Xor ダブルノックアウトマウスを作出した。作出したマウスは HPRT 高活性 Xor-K0 マウスより 1 週長く生存し、尿中オキシプリン排泄量も半減したが、ヒトと同レベルには至らなかった。SLC23A3 がヒトの腎臓におけるヒポキサンチントランスポーターであることを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Makoto Hosoyamada, Naoko H. Tomioka, Tamaki Watanabe, Nobuhiro Yasuno, Shunya Uchida, Shigeru Shibata	4. 巻 -
2. 論文標題 SLC23A3 is a renal hypoxanthine transporter	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15257770.2022.2028826	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 細山田 真、渡部 多真紀、富岡 直子、安野 伸浩）、柴田 茂、内田 俊也
2. 発表標題 Na+依存性腎ヒポキサンチントランスポーター同定の試み
3. 学会等名 第54回日本痛風・尿酸核酸学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細山田 真、福内 友子、富岡 直子、市田 公美、金子 希代子、大坪 俊夫
2. 発表標題 HPRT高活性Xorノックアウトマウスの寿命延長メカニズムの検討
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細山田 真、渡部 多真紀、富岡 直子、渡辺 茂和、大坪 俊夫、市田 公美
2. 発表標題 HPRT高活性XDHノックアウトマウスの寿命延長
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究 分 担 者	細山田 真 (HOSOYAMADA Makoto) (00291659)	帝京大学・薬学部・教授 (32643)	

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