

令和 5 年 3 月 16 日現在

機関番号：32823

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04702

研究課題名(和文) 蛋白凝集神経変性疾患に対するキサンチン酸化酵素阻害剤の病変進行遅延効果の機構解明

研究課題名(英文) Mechanism of effect of XOR inhibitors on delay of progress of neurodegenerative diseases

研究代表者

西野 武士(Nishino, Takeshi)

東京医療学院大学・保健医療学部・客員教授

研究者番号：40094312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ECを設定にてAMPを添加し、ECの数値の低さと相関しXORの気質であるHXの増加が観られた。1) XORが脳中にはXORが存在しないことが確定された。2) AMP, IMPはそれぞれプリン合成の初期反応酵素を阻害することが確認された。allopurinolはsalvage反応阻害作用であることが判明した。3) メタボローム解析をマウスの脳を用い、purine salvageの基質や阻害剤にならない物質では有意にアデニンヌクレオチドの上昇を認めた。なおEC低下は正常ヒトでは急速に回復され、発症が進むのは脳血流の低下や老化が関連すると思われる。分担研究者はさらに老化に関連した解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は2つの神経変性疾患(ALS及びアルツハイマー病)についての進行抑制をマウスモデルばかりでなく、ヒト疾患をモデルとしてiPS由来神経細胞でもより効果的な方法を見出した。この方法は基本特許として各国で査定された。さらにより効果的と考える複数の天然物を加えることにより効果的な方法を見出し追加実験を行い新しく特許を出願した。これらの特許は制約企業の参入を促し、実際に治験を促し、患者のみならず家族や社会の貢献となると考える。研究途上にてさらにS-S構造を持つウイルス疾患の予防または進行の抑止が想定される。

研究成果の概要(英文)：Hypoxanthine was accumulated under the condition of lower EC values. It was also found that XOR enzyme was not exist in neuronal cell, i.e. no activity, no protein and no uric acid were detected. It was also found by metabolome analyses (LC Mass, HPLC analyses) total adenine nucleotide was elevated by addition of hypoxanthine, a substrate of purine salvage system. Thus, it was suggested that the inhibition of XOR activated salvage pathway and lead to accumulated adenine nucleotide, particularly ATP. It was also analyzed the aging analysis using other brain-hearing ability system by another co-worker. From our research work it was shown that accumulated misfolded proteins are due to lowered ATP in neuronal cells, that is accumulated misfolded proteins is not the reason of those diseases but the consequences of lowered ATP concentration. We expect that usage of XOR inhibitors is useful for delay of those diseases.

研究分野：病態生化学

キーワード：神経変性疾患 アルツハイマー病 ALS キサンチン脱水素酵素 XOR阻害剤 COVID-19

1. 研究開始当初の背景

既に研究代表者は長年による高尿酸血症・痛風の治療薬をその対象酵素タンパク質であるキサンチン酸化還元酵素(XOR と呼ぶ)の構造と機能の基礎研究の成果と一体となり、日本発の新薬2種(フェブキソスタット、トピロキソスタット)の治療薬の開発に成功し(20年以上を要した長期研究の成果である)日本の2社から販売するまでに貢献してきた。その治療薬を神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症(ALS)のモデルマウスに投与したところ、思いもよらず病気の進行の遅延効果を示した(国際特許取得済み)。更に認知症の中で最も割合の多いアルツハイマー病のモデルマウスにも投与したところ、同様の効果を示した。いずれも長期間の投与を要し、しかも再現性を確かめるため長年を要し、やっとALSについて本課題の始まった時点で米国病理学会誌に発表され、その号の表紙となった。しかし、その機構は十分解明されておらず、病気の進行と異常変性タンパク質の蓄積が協同して疾病進行の遅延効果が怒る。その薬の効果の機構を代謝的・酵素学的に解明することが実際の治療薬として用いるためには必須であることから、本課題に取り組んだ。ALSについては上述した通り既に特許が取られており、また長年の動物実験から得られたアルツハイマー病への適用については鳥取大学・日本医科大学の共同出願を控えていた。この臨床試験または治験のための科学的な根拠を得るための機構解明ともなっている。

2. 研究の目的

私達が見出した XOR 阻害剤の神経変性疾患の効果の機構を生化学的・細胞生物学的視点から解明することである。既に ALS の遅延効果にプリン異性体である XOR 阻害剤であるアロプリノールはマウスでは効かず、フェブキソスタットのような非プリン体である阻害剤の効果から、代表者らはプリンサルベージ回路の重要性を想定し、発表した論文でもその代謝の差から ATP の細胞内濃度を想定し、その差異を代謝的に且つ細胞生物学的に解明することの重要性を指摘し、本課題である機構解明に重点的に取り組んだ。なお、再現性を確認するため、動物実験を繰り返すことも目的とした。

3. 研究の方法

科研費申請書には限られた文書量のため、極めて概略的に記述したが、ここでも簡略して概説する。主要には1)動物実験系 2)代謝の実験系 3)細胞生物学的系(赤血球ライゼートを含む)とともに酵素反応速度論的解析など多様な実験方法とともに、機器分析的には HPLC, NMR, LC-Mass など様々な分析方法を用いて行った。具体的には成果の項

を参照されたい。

4. 研究成果

追加の傍証となる動物実験により確認できた重要事項の概略を述べる。

1)サルベージ回路であるヒポキサンチンホスフォリボシルトランスフェラーゼ(サルベージ回路)により ATP 濃度が高まるとすれば、ヒポキサンチンやその前駆体であるイノシンを加えれば ATP の回収は増加すると想像したが、意外にもマウスではその試みは予想に反し加算効果はなかった。この事実は仮説に反する結果であった。しかし、その後の検討でマウスはヒトに比べこのサルベージ回路活性が桁違いに低く、XOR 阻害によりこの回路は既に飽和状態であるためと考えられた。実際マウスのヒポキサンチン濃度は十分高く、その濃度はヒトの XOR 欠損症報告例(海外からの1990年代報告)に比して桁違いに高くなっていた。

このことは実際赤血球中の HPRTase 活性(すなわちサルベージ活性)はマウスとヒトでは10倍以上ヒトでは高かったことから確認できた。しかし、当初(申請時)培養細胞としてマウス由来の神経細胞を予定していた。しかしこれらの事実の発見すなわち、プリン喪失と回収の理屈からすれば、サルベージ回路の弱いマウスの神経細胞はヒトとは大きく異なり不適切であることが判明した。従ってヒト網状赤血球を用いるほうが脳との類似性が高く適切と考えられた。すなわち、網状赤血球 XOR は存在しないこと、

プリン分解系は脳と同じように存在すること、新合成系は存在すること、などである。なお、アロプリノールは基質となるもののその活性は低く、むしろ HPRTase のやや強い阻害剤であることが判明した。それにも関わらず一定の薬効を示したことは貴重な知見であると確信した。なおサルベージ回路はヒトではマウスより有効であり、ヒト疾病への適用の可能性は高いと予想できた(以上西野らの実験研究:今後論文投稿予定)。一方 XOR から発生されるスーパーオキシドがなんら神経変性疾患の症状を示さないという傍証する検討も XOR 改変トランスジェニックマウスの2年以上の間の飼育実験(誕生から死ぬまで)から得られた(発表のため論文執筆中で、岡本らと共同した論文として近々投稿予定である)。

2)マウス脳の XOR は発現していないことがそのタンパク質の抗体染色によるウエスタンブロットによる検出、酵素活性の測定、オキシニン(マウスには存在する尿酸分解酵素阻害剤)存在下でも検出できなかったことから確認された(岡本西野の共同実験)。すなわち脳からは、プリン分解はヒポキサンチンであり、それが血流に出されると確認され

た。なおヒトの髄液には尿酸はマウスと同様低く、やはりヒト XOR 酵素は発現していないことが予想できた。脳においては ATP 分解により生じるヒポキサンチンまでが脳で起こり、大量のヒポキサンチンが失われることとなる。このことは血流のヒポキサンチンを増加させなければ、脳におけるプリン回収を新合成させなければならず、さらに ATP を失うこととなる。これは一種の ATP 喪失の雪崩現象である。このことは脳でのサルベージ回路の重要性を一層示すと想定させた極めて重要な知見である（今後サルベージ回路欠損症例と合わせて加藤らと共同発表予定である）。

脳は酸素消費量が高い。そのことは脳内 ATP 濃度が重要であることと符合する。膜電位の維持のための ATPase や様々なシグナル物質の放出が盛んに行われ、ミトコンドリアの機能の重要性は言うまでもない。少量の負荷が神経細胞内では致命的なことはよく知られていることである。様々な不溶性タンパク質の分解に ATP を使用することは致命的であり、お結果として不溶性タンパク質が蓄積したと考えることがより合理的と考えられる。サルベージ回路による ATP 濃度維持による不溶性タンパク質の蓄積現象はむしろ神経細胞のそのような性質を間接的に説明できることと考察できる。

3) プリン新合成の初発段階は AMP で強く IMP では弱いことが判明した。このことはアデニンヌクレオチドを考慮した場合、何れにしてもその濃度が高ければプリン新合成の初発段階は阻害され、サルベージ回路は優先的に効果を示すと想定され、動物実験と符合した。

4) 田之倉らはアルツハイマー病とは別の角度から老化に取り組んだ。主に難聴との関連性があり、聴覚喪失はいうまでもなく、神経変性疾患とも言える。この疾患モデルと薬効との関連はまだ行われていないが、将来続けて実行される予定である。聴覚には ATP の関与は重要であり、効果は十分期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計17件：内原著12、総説5)
(原著論文)

1. White K, Kim MJ, Han C, Park HJ, Ding D, Boyd K, Walker L, Linser P, Meneses Z, Slade C, Hirst J, Katherine S, Miyakawa T, Tanokura M, Terada N, Salvi R, Someya S. Loss of IDH2 accelerates age-related hearing loss in male mice. *Sci Rep*. in press
2. Xu Y, Liu L, Nakamura A, Someya S, Miyakawa T, Tanokura M. Studies on the regulatory mechanism of isocitrate

dehydrogenase 2 using acetylation mimics. *Sci Rep*. 7(1): 9785 (2017)

3. Kwon Y, Natori Y, Tanokura M. New approach to generating insights for aging research based on literature mining and knowledge integration. *PLoS One*. 12(8): e0183534 (2017).

4. Han C, Kim MJ, Ding D, Park HJ, White K, Walker L, Gu T, Tanokura M, Yamasoba T, Linser P, Salvi R, Someya S. GSR is not essential for the maintenance of antioxidant defenses in mouse cochlea: Possible role of the thioredoxin system as a functional backup for GSR. *PLoS One*. 12(7): e0180817 (2017).

5. White K, Kim MJ, Ding D, Han C, Park HJ, Meneses Z, Tanokura M, Linser P, Salvi R, Someya S. *G6pd* deficiency does not affect the cytosolic glutathione or thioredoxin antioxidant defense in mouse cochlea. *J Neurosci*. 37(23): 5770-5781 (2017)

6. Han C, Ding D, Lopez MC, Manohar S, Zhang Y, Kim MJ, Park HJ, White K, Kim YH, Linser P, Tanokura M, Leeuwenburgh C, Baker HV, Salvi RJ, Someya S. Effects of long-term exercise on age-related hearing loss in mice. *J Neurosci*. 36(44): 11308-11319 (2016)

7. S. Kato, M. Kato, T. Kusano, T. Nishino: New Strategy That Delays Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis in G1H-G93A Transgenic Mice: Oral Administration of Xanthine Oxidoreductase Inhibitors That Are Not Substrates for the Purine Salvage Pathway, *J. Neuropathology and Experimental Medicine*. *J. Neuropathology Exp. Med*, 75, 1124-1144 (2016)

8. T. Matsuda Y, Okamoto K, Suzuki G, Fuse A, Yokota H The Effects of Xanthine Oxidoreductase Inhibitors on Oxidative Stress Markers following Global Brain Ischemia Reperfusion Injury in C57BL/6 Mice. *PLoS One*, 10:e0133980 (2015)

9. Nishino T, Okamoto K, Kawaguchi Y,

Matsumura T, Eger BT, Pai EF, Nishino T The C-terminal peptide plays a role in the formation of an intermediate form during the transition between xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase. *FEBS J*, 282:3075-90 (2015)

10. Suzuki G, Okamoto K., Kusano T, Matsuda Y., Fuse A., Yokota H. Evaluation of Neuronal Protective Effects of Xanthine Oxidoreductase Inhibitors on Severe Whole-brain Ischemia in Mouse Model and Analysis of Xanthine Oxidoreductase Activity in the Mouse Brain. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 55:77-85

(総説)

11. Nishino T and Okamoto K Mechanistic Insights into Xanthine Oxidoreductase from Development Studies of Candidate Drugs to Treat Hyperuricemia and Gout : *J . Biol. Inorg. Chem.* 20:195-207 (2015)

12. Nishino T and Okamoto K Mechanistic Insights into Xanthine Oxidoreductase from Development Studies of Candidate Drugs to Treat Hyperuricemia and Gout : *J . Biol. Inorg. Chem.* 20:195-207(2015)

13. 染谷慎一, 宮川拓也, 田之倉 優. ミトコンドリアと老化. *医学のあゆみ* 253: 733-738 (2015)

14. 岡本研 (2016) キサンチン尿症・モリブデンコファクター欠損症
日本臨床 74; : 382-385

15. 岡本研 (2015)_XO 阻害薬と酸化ストレス
尿酸と血糖 1: 14-17

16. Teruo Kusano, Tomoko Nishino, Ken Okamoto, Russ Hille, Takeshi Nishino, The mechanism and significance of the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in mammalian secretory gland cells., *Redox Biology* (2023) **59**, 102573
(査読あり)

17. Teruo Kusano, Driss Ehrichtiou, Tomohiro Matsumura, Veronique Chobaz, Sonia Nasi, Mariela Castelblanco, Alexander So, Christine Lavanchy, Hans Acha-Orbea, Takeshi Nishino, Ken Okamoto, Nathalie Busso, Targeted knock-in mice expressing oxidase fixed form of xanthine oxidoreductase favor tumor growth., *Nature Communications*, (2019) **10**, Article number: 4904, doi: 10.1038/s41467-019-12565-z
(査読あり)

(図書)(計 1 件)

1. Takeshi Nishino, Ken Okamoto, and Silke Leimkuhler, *Enzymes of the Xanthine Oxidase Family*. RSC Metallobiology Series No. 5, Molybdenum and Tungsten Enzymes: Biochemistry. Edited by Russ Hille, Carola Schulzke, and Martin L. Kirk, The Royal Society of Chemistry 2017, Published by the Royal Society of Chemistry, pp192-239, 2017

(主な学会発表)(計 1 1 件)

1. Takeshi Nishino (invited): The Strategy That Delays Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis in G1H-G93A Transgenic Mice: Oral Administration of Xanthine Oxidoreductase Inhibitors that are Not Substrates for the Purine Salvage Pathway
Annual World Congress of NeuroTalk -2017
May 21th-23th 2017 Barcelona , Spain

2. Takeshi Nishino (invited): The Strategy That Delays Progression of Neuro-Degenerative Diseases due to Accumulation of Misfolded Protein such as ALS and Alzheimer: Oral administration of xanthine oxidoreductase inhibitors that are not substrates for the purine salvage pathway to the transgenic mouse models.

June 18th-23rd, 2017, Sante Fe, New Mexico, USA

3. 田之倉 優. 聴覚と免疫機能に関わる老化の分子機構と食物質による調節. 日本食品免疫学会講演記録集 第2巻 49, 日本食品免疫学会, 東京 (2016)

4. 岡本研, 菊地浩人, 藤崎弘士, 古田忠臣, 西野武士. 第49回日本痛風・核酸代謝学会総会 米子、2018年2月

5. 加藤 雅子、加藤 信介、岡本 研、西野 武士 : 非プリン型キサンチン酸化還元酵素阻害剤によるアルツハイマー病モデル マウスの病理組織学的抑制効果の証明:アルツハイマー病新規治療薬開発への新戦略、第49回日本痛風・核酸代謝学会総会 米子、2018年2月

6. 鎌谷 直之、細山田 真、西野 武士 : ヒトが、高尿酸血症を呈するようになった理由の新たな説明 第49回日本痛風・核酸代謝学会総会、米子、2018年2月

7. 加藤 信介、加藤 雅子、西野 武士 : 非プリン型キサンチン酸化還元酵素阻害剤によるアルツハイマー病モデル マウスの臨床症候学的改善効果の証明:アルツハイマー病新規治療薬開発への新戦略

8. 西野 武士、細山田 真、鎌谷 直之 : エネルギー代謝から見た XOR(XDH/XO)の臓器間局在性とプリンサルベージ回路の重要性についての仮説

9. Mai Sekine, T. Kusano, T. Nishino, K. Nagata, K. Okamoto : Regulation of purine metabolism in rabbit reticulocytes 第88回日本生化学会大会 合同大会 15年12月04日 神戸市ポートピア

10. 岡本 研 , 菊地 浩人 , 藤崎 弘士 , 古

田 忠臣 , 西野 武士 キサンチン酸化還元酵素の基質ガイド機構の解析

第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会

11. 川口 裕子, 西野 朋子 , 岡本 研 , 西野 武士 キサンチン脱水素酵素(XDH)のNAD⁺ の結合による反応調節

第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会 15年12月04日 神戸市ポートピア

〔主な産業財産権〕

出願状況(計 6 件)

1. (PTC 特許)発明の名称: 認知症治療薬または予防薬(特許出願中).

発明者: 西野武士、加藤信介、加藤雅子、鈴木秀典、岡本 研.

出願国: PTC(特許協力条約).

特許権者: 鳥取大学, 日本医科大学, 帝人ファーマ.

出願日: 2017年2月17日.

出願番号: PCT/JP2017/006007

2. 2. 発明の名称: AGENTE TERAPÉUTICO O PROFILÁCTICO PARA LA DEMENCIA (認知症治療薬または予防薬) (特許出願中).

発明者: 西野武士、加藤信介、加藤雅子、鈴木秀典、岡本 研:

出願国: アルゼンチン(Argentina).

特許権者: 鳥取大学, 日本医科大学, 帝人ファーマ.

出願日: 2017年2月17日.

出願番号: P170100407

3. 3. 発明の名称: 失智症治療薬或予防薬 (認知症治療薬または予防薬) (特許取得).

発明者: 西野武士、加藤信介、加藤雅子、鈴木秀典、岡本 研.

出願国: 台湾(Taiwan).

特許権者：鳥取大学,日本医科大学、帝人
ファーマ.

出願日：2017年2月18日.

出願番号：106105469

4. 発明の名称：認知症の予防及び/又は治療の
ための医薬(特許出願中).

発明者：西野武士、加藤信介、加藤雅子、
鈴木秀典、岡本 研.

出願国：日本.

特許権者：鳥取大学,日本医科大学、日本
ケミファ.

出願日：2017年8月23日.

出願番号：2017-502378

5. 発明の名称：認知症の予防及び/又は治療の
ための医薬(特許取得).

発明者：西野武士、加藤信介、加藤雅子、
鈴木秀典、岡本 研.

出願国：日本.

特許権者：鳥取大学,日本医科大学、日本
ケミファ.

出願日：2017年8月3日.

出願番号：15/548,550

6. 発明の名称：認知症の予防及び/又は治療の
ための医薬(特許取得).

発明者：西野武士、加藤信介、加藤雅子、
鈴木秀典、岡本 研.

出願国：日本.

特許権者：鳥取大学,日本医科大学、日本
ケミファ.

出願日：2017年8月24日.

出願番号：201680012029.9

【特許・国際特許】

国際出願番号：PCT/JP2021/003756

出願日：2021.02.02

発明者：西野武士、草野輝男

発明の名称：抗ウイルス剤

出願人：日本医科大学

国際公開番号：WO 2022/168169 A1

国際公開日：2022.08.11

国際出願番号：PCT/JP2022/004661

出願日：2022.02.07

発明者：西野武士、関根舞

発明の名称：神経変性疾患の進行遅延及び
防御剤

出願人：NeSA 合同会社

発明者：西野 武士，関根 舞

出願人/特許権者：NeSA 合同会社

代理人(1件)：特許業務法人アルガ特許事
務所

公報種別：公開公報

発明の名称：レッシュ・ナイハン症候群治
療薬

出願番号(国際出願番号):特願 2020-005445

公開番号(公開出願番号):特開 2021-113161

出願日：2020年01月16日

公開日(公表日)：2021年08月05日

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者 西野武士

(東京大学農学生命科学研究科、中途所属変
更：東京医療学院大学・客員教授)

研究者番号：40094312

(2) 研究分担者：田之倉優

(東京大学農学生命科学研究科・特任教授)

研究者番号：60136786

(3) 研究分担者：岡本研

(日本医科大学医学部・准教授)

研究者番号：60267143

(4) 研究協力者：加藤信介

(鳥取大学医学部・准教授)