

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07182

研究課題名(和文)尿を用いて簡便推定したキサンチン酸化酵素活性とその概日リズムを考慮した尿酸値制御

研究課題名(英文) Control of uric acid by considering the change xanthine oxidase activity with the circadian rhythm

研究代表者

田山 剛崇 (Tayama, Yoshitaka)

広島国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：80389121

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)：尿酸代謝に関わるxanthine oxidoreductase (XOR)の日内変動を検討した。雄性ラットを用いてXOR活性の変動を検討したところ、肝では2時にトラフ、14時にピークを示した。その活性差は1.4倍であった。また、XORタンパク発現も同様の変動を示した。肝におけるXOR活性の日内変動は、タンパク発現変動に起因したものであった。一方、血漿XOR活性は日内変動を示さなかった。さらに、肝XOR活性は、血漿に比べ、高値を示した。さらに、XOR活性の日内変動に影響を及ぼす可能性のあるsirtuin-1タンパクに関しては、わずかな日内変動を示す傾向が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高尿酸血症の一因として、尿酸の過剰生産がある。尿酸の前駆物質であるxanthineは、xanthine oxidoreductase (XOR)にて尿酸へと酸化代謝される。今回、ラット肝を用いた検討であるが肝XORの日内変動を観察した。血漿XOR活性は肝に比して低値を示した。ヒトにおいても同様に日内変動が生じている可能性が高い。尿酸を多く含む食事の摂取やXORにて代謝される医薬品を投与する際には肝臓中XOR活性の日内変動を考慮することが重要である。XOR活性が高い時間帯にプリン体摂取を控えるなどの指導に役立てたい。

研究成果の概要(英文)：Hyperuricemia is caused in part by the overproduction of uric acid. Xanthine, a precursor of uric acid, is oxidatively metabolized to uric acid by xanthine oxidoreductase (XOR). The purpose of this study is to provide guidance on how to reduce purine intake during times of high XOR activity.

We observed the circadian rhythm XOR in the rat liver. The variation was high during the day and low at night. The activity difference was 1.4-fold. Further, the circadian rhythm of XOR activity in the liver was also associated with changes in protein expression. On the other hand, the XOR activity of the plasma fraction showed no circadian rhythm. Since the pharmacokinetics of drugs metabolized by XOR may reflect the circadian rhythm of XOR activity in the liver more than in the plasma, caution should be exercised when consuming a diet high in uric acid or administering drugs that are metabolized by XOR.

研究分野：臨床薬学

キーワード：キサンチンオキシドレダクターゼ 日内変動

1. 研究開始当初の背景

高尿酸血症の初期治療として、食事・運動指導が行われている。患者は一定期間これらの指導に従うが、時間の経過とともに、制限のストレスを招き、治療に失敗するケースも多い。高尿酸血症の一因として、尿酸の過剰生産がある。尿酸は、xanthine oxidoreductase (XOR)により xanthine から生合成される。XORには酸素を電子受容体とする xanthine oxidase (XO)および nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)を電子受容体とする xanthine dehydrogenase (XDH)の2つの型が存在し、それぞれ異なる反応様式をとる¹⁾。高尿酸血症の治療を行う上で、XOR活性が高い時間帯にプリン体の摂取を控えるなどの患者個々の酵素活性に応じた生活リズムの改善を提案することで高尿酸血症を改善できる可能性がある。

2. 研究の目的

- (1) 尿酸代謝に関与する XOR、XO、XDHの日内変動を明らかにするとともに、活性に影響を及ぼしている因子も検討する。
- (2) 将来的には、生体内物質である xanthine や尿酸を用いて生体内 XOR 活性を推定したい。しかし、xanthine や尿酸濃度測定は多くは吸光度測定器を使用した方法である。これら機器は健康サポート薬局にはない。従って、まず、xanthine や尿酸の濃度を測定できる簡便で迅速なツールを開発したい。
- (3) そして、最終的には、(1)および(2)を通じて、簡便な方法にて、患者個々の XOR 活性およびその時間位相を確認し、高尿酸血症を是正する生活指導情報を薬局に提供したい。

3. 研究の方法

動物(in vitro の検討)

実験対象として jcl:Wistar 雄系ラット(6週齢、120~130 g、日本クレア株式会社)を2時(AM 2)、8時(AM 8)、14時(PM 2)および20時(PM 8)に屠殺後屠殺し肝臓を摘出した。同時に血液の採取し、血漿を作成した。摘出した肝臓は4倍量の1.15% KClを加えてホモジナイズし、遠心分離(9,000 g、20分)を行った後、さらにその上清を遠心分離(100,500 g、60分)し、得られた上清を cytosol 画分とした。なお、XDH から XO への変換を阻害する目的で各サンプルにプロテアーゼ阻害剤を添加した。

動物 (in vivo の検討)

使用したラットは jcl:Wistar 雄系ラット(12週齢、300~340 g、日本クレア株式会社)であり、AM 群ラット4匹には8時に、PM 群ラット4匹には20時に、XOR の probe 化合物である caffeine(1.25 mg/mL /体重 kg)を経口投与した。

肝臓中 XOR、XO、XDH 活性の測定

XOR 活性、XO 活性は、肝 cytosol および血漿に基質ある 1-methylxanthine (1-MX)を最終濃度がおおよそ 1.0×10^{-4} mol/L になるように加え、インキュベーション(37℃、30分)を行い、High performance liquid chromatography (HPLC)で 1-methyluric acid (1-MU)生成量を測定することで推定した。XOR 活性は NAD⁺ (最終濃度おおよそ 6.0×10^{-4} mol/L)存在下における 1-MX 酸化活性で評価し、XO 活性は NAD⁺非存在下における 1-MX 酸化活性で評価した。XDH 活性は XOR 活性と XO 活性の差により算出した。なお 1-MU 濃度定量時における HPLC システムは、使用カラム Mightysil RP-18(4.6 mm×150 mm)、溶媒 0.5% acetic acid-methanol(92:8、v/v)、流速 0.5 mL/min、温度 40℃、20 μL インジェクション、波長 280 nm とした。

尿中代謝物を用いた XOR 酵素活性の推定

採取された尿試料に、内標準物質として acetaminophen(AA ; 2 mg/mL、200 μL)を加えた。その後、ammonium sulfate 0.6 g を加えた後、dichloromethane : isopropanol (9 : 1、5 mL)にて抽出した。抽出液をエバポレーションした後、沈殿を 0.1 N NaOH で溶解し、caffeine の代謝物である 1-MU を、HPLC で測定した。HPLC 測定時、使用カラム Mightysil RP-18(4.6 mm×150 mm)、溶媒 0.5% acetic acid-methanol(92 : 8、v/v、(0-40min) 0 : 100(41-55min))、流速 0.4 mL/min、温度 40℃、10 μL インジェクション、波長 280 nm とした。

タンパク発現量

XOR タンパク質の定量を行った。ラット肝 cytosol 画分の総タンパク質の定量は、Bradford 法にて行った。1レーン 5 μg タンパク量となるように調整し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)にて分離後、poly vinylidene difluoride (PVDF)転写膜へ転写し、Western Blotting 法にてタンパク発現量を検討した。同様に、gephyrin タンパクおよび Sirtuin-1 タンパクの定量を行った。

4. 研究成果

肝 cytosol 中 XO、XDH そして XOR 活性の変化を Figure 1 に示す。XO 活性において PM2 群は、他の群に比して高値を示す傾向にあった。一方、XDH 活性は AM2、AM8、PM2、PM8 群間において差は認めなかった。また、XO 活性と XDH 活性を合わせた XOR 活性において PM2 群は高値を AM2 群は低値を示し、日内変動を観察した。PM2 群の活性は、AM2 群のおよそ 1.4 倍であった。また、XO 活性はおよそ 1.2 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein/ 30 min の活性を示したのに対し XDH はおよそ 1.7 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein/ 30min であり、XO 活性は XDH 活性のおよそ 0.7 倍であり同程度の活性を示した。

次に、肝 cytosol 中 XOR タンパク発現量の各時間帯における発現量を検討した(Figure 2)。XOR タンパク発現量は PM2 に高値を示し、AM2 に低値を示した。PM2 における発現量は AM2 における発現量のおよそ 2.4 倍であった。Figure 1 と 2 より、XOR 活性の日内変動はタンパク発現に伴う変動であった。

一方で、probe 薬である caffeine を投与後その尿中代謝物より推定した in vivo XOR 活性の検討において、AM 投与群は PM 群に比しておよそ 1/4 低値を示した。In vitro の結果と異なる傾向を示した (Figure 3)。

この要因として、生体内代謝タイミングと probe 薬が尿中排泄されるまでの時間において time lag が影響しているかもしれない。また、XOR 活性の probe 薬として覚醒作用の有する caffeine を使用した影響の可能性も考えられる。

Gephyrin は モリブデン(Mo)含有薬物酵素である XOR を構成するドメインの 1 つである。XOR タンパク発現に日内変動を観察したことから gephyrin の日内変動も検討した。しかし、日内変動は認められなかった。

Sirtuin-1 はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) 依存性のタンパク質脱アセチル化酵素で、SOD などの抗酸化遺伝子の転写を促進することが知られている。Sirtuin-1 が酸化作用を呈する XOR 活性やそのタンパク発現の日内変動に影響を及ぼしている可能性があることから、sirtuin-1 タンパク発現の日内変動を検討した。暗期に低値を、明期に高値を示す傾向を示したものの有意な日内変動を認めなかった。Sirtuin-1 の影響については今後も検討を要すると考える。

尿を用いた簡便な XOR 活性測定において、尿酸やキサンチンの発色の程度が不十分であるため、CCD (Charge Coupled Device) カメラ撮影画像と解析ソフトを用いて解析することで、高感度の検出を試みた。しかし、実用に使用できる感度での検出が行えていない。

XOR には日内変動が生じており、それに応じた高尿酸血症の食事療法の可能性を示せた。一方で、XOR 活性の日内リズムの位相が不明瞭な部分もあり、さらなる検討が必要と考える。

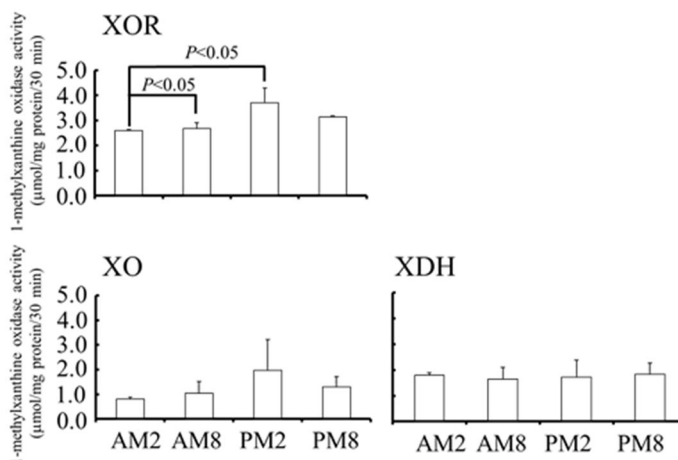


Figure 1 Circadian rhythm of XOR, XO, and XDH activity in rat liver cytosol

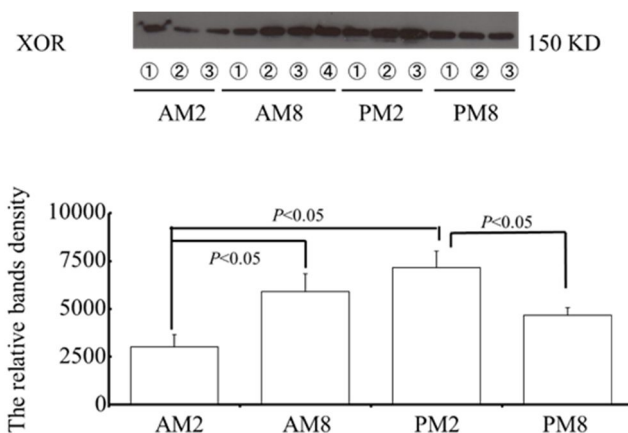


Figure 2 Circadian Rhythm of XOR protein expression in rat liver cytosol

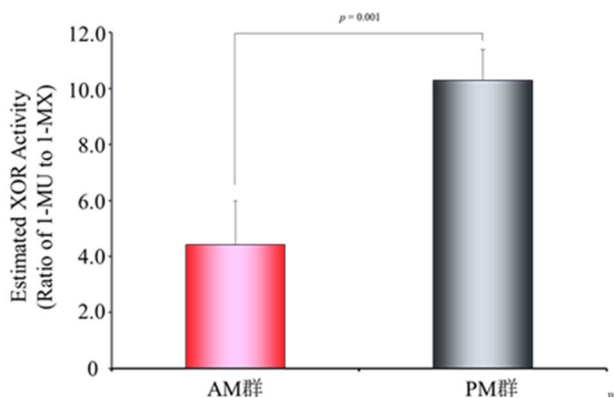


Figure 3 Circadian Rhythm of the in vivo XOR activity

<引用文献>

- (1) Nadiezhda Cantu-Medellin, Eric E Kelley. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: insights regarding where, when and how, *Nitric Oxide*. **34**; 19-26. (2013)
- (2) Grant DM, Tang BK, Kalow W. Variability in Caffeine Metabolism. *Clin Pharmacol Ther*. **33**(5); 591-602. (1983)

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 Tayama Yoshitaka, Sugihara Kazumi, Sanoh Seigo, Miyake Katsushi, Kitamura Shigeyuki, Ohta Shigeru	4. 巻 8
2. 論文標題 Xanthine oxidase and aldehyde oxidase contribute to allopurinol metabolism in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40780-022-00262-x	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田邊 建志, 田山 剛崇, 前田 志津子, 西村 さとみ, 喜多 智生, 岡村 友理香, 杉原 数美, 三宅 勝志
2. 発表標題 血漿中xanthine oxidoreductaseタンパク発現 における概日変動の検討
3. 学会等名 第31回 日本医療薬学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田山 剛崇, 前田 志津子, 田邊 建志, 岡村 友理香, 杉原 数美, 三宅 勝志
2. 発表標題 ラットにおける肝臓および血漿中xanthine oxidoreductaseの活性とタンパク発現に及ぼす概日リズムの影響
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田山 剛崇, 喜多 智生, 西村 さとみ, 岡本 友理香, 前田 志津子, 杉原 数美, 三宅 勝志
2. 発表標題 Xanthine oxidaseおよび xanthine dehydrogenase活性における概日変動の検討
3. 学会等名 第30回日本医療薬学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田山剛崇, 喜多 智生, 西村 さとみ, 前田 志津子, 杉原 数美, 佐和 章弘, 三宅 勝志
2. 発表標題 薬物代謝酵素aldehyde oxidaseにおける概日リズムの検討
3. 学会等名 第29回 日本医療薬学会年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 喜多智生, 西村 さとみ, 田山 剛崇, 岡村 友理香, 大松 秀明, 覚前 美希, 前田 志津子, 佐和 章弘, 三宅 勝志
2. 発表標題 Xanthine oxidaseおよびxanthine dehydrogenaseのサーカディアンリズムにおける要因の検討
3. 学会等名 第29回 日本医療薬学会年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 田山 剛崇, 前田 志津子, 岡村 友理香, 喜多 智生, 杉原 数美, 三宅 勝志
2. 発表標題 モリブデン含有薬物代謝酵素における概日リズムの検討
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2019年～2020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	佐能 正剛 (Sanoh Seigo) (00552267)	広島大学・医系科学研究科(薬)・助教 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	杉原 数美 (Sugihara Kazumi) (20271067)	広島国際大学・薬学部・教授 (35413)	
研究分担者	岡村 友理香 (Okamura Yurika) (20645890)	広島国際大学・健康科学部・助教 (35413)	
研究分担者	太田 茂 (Ohta Shigeru) (60160503)	広島大学・医系科学研究科(薬)・名誉教授 (15401)	

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