

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09023

研究課題名(和文) 肥満脂肪組織における代謝異常と臓器連関；プリン代謝およびコリン代謝異常に着目して

研究課題名(英文) Increased plasma XOR activity induced by NAFLD/NASH and its possible involvement in vascular neointimal proliferation ~Impact of high plasma XOR on vascular injury in NAFLD~

研究代表者

西澤 均 (NISHIZAWA, Hitoshi)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20379259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：尿酸産生阻害薬の標的であるXOR(キサンチン酸化還元酵素、xanthine oxidoreductase)に着目し、本研究では、最近測定が可能となった血漿XOR活性の病態生理学的意義を検討した。肥満2型糖尿病患者および高度肥満症の外科手術前後において血漿XOR活性は肝酵素と強く連関すること、脂肪肝モデルマウスで血中XOR活性および新生内膜増殖が亢進し、XOR阻害剤で抑制されることを報告した。これらの結果より脂肪肝で上昇する血中XOR活性が動脈硬化症に連関することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、脂肪肝を有する人では血中XOR活性が高く、動脈硬化性疾患に至る可能性があることが示唆される。これまで脂肪肝は動脈硬化性疾患のハイリスク病態であることが報告されてきたが、本研究の成果により、血中XORおよび高XOR血症がそれらを結ぶ鍵分子であり治療標的であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Xanthine oxidoreductase (XOR) is an enzyme that catalyzes hypoxanthine to xanthine and uric acid. Plasma XOR activity has recently been measured in human subjects. In this study, a close relationship was observed between plasma XOR activity and liver transaminases in patients with type 2 diabetes, cross-sectionally, and also across hospitalized treatment. Furthermore, we found that changes in plasma XOR activity after bariatric surgery closely associated with those in liver enzymes, but not with those in body mass index (BMI). In a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis (NAFLD/NASH), plasma XOR activity markedly increased. In NASH mice, we observed increased vascular neointimal formation consisted of dedifferentiated vascular smooth muscle cells, which was significantly attenuated by a selective XOR inhibitor.

Collectively, these results suggest that increased plasma XOR activity in NAFLD/NASH is involved in the pathogenesis of vascular injury.

研究分野：内分泌・代謝内科学

キーワード：XOR 脂肪肝、NAFLD/NASH 動脈硬化症 内臓脂肪蓄積 プリン代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、肥満脂肪組織における“代謝異常”に着目し、肥満脂肪組織では、糖脂質代謝異常に加え、アミノ酸・プリン代謝異常が生じていることを報告してきた(Tsushima Y J.Biol.Chem. 2013, Nagao H J.Biol.Chem.2017, Obesity 2018)。XOR (キサンチン酸化還元酵素、xanthine oxidoreductase) はプリン代謝の最終段階であるヒポキサンチン (HX)、キサンチンを尿酸に変換する酵素であり、最近ヒト血漿 XOR 活性が測定可能となったが、その病態生理学的意義は十分明らかになっていなかった。さらに申請者らは、プロテオミクスを用いて代謝物の輸送に関わるトランスポーターの網羅的発現解析を行い、肥満脂肪組織において対照マウスと比し、SLC5A7 というコリンの細胞内取り込みに関わるトランスポーターの遺伝子及び蛋白発現が著増していることを見出した。コリンはこれまで主に神経系での研究が多く、代謝学的意義は十分明らかではなく、脂肪組織のコリン代謝は全く不明であった。

## 2. 研究の目的

### (1) 血漿 XOR の生理病態学的意義と臓器連関

本研究では臨床、基礎研究により、血中 XOR 活性の上昇と強く関連する病態及びその動脈硬化症への関与を明らかとすることを目的とした。

### (2) 脂肪細胞 SLC5A7 の生理病態学的意義と脂肪組織コリン代謝の解明

肥満脂肪組織での SLC5A7 のその発現変化を介したコリン代謝動態や代謝物量の変化が、脂肪細胞機能異常等の病態に関連しているかを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 糖尿病治療のために入院した 2 型糖尿病の日本人患者 28 名 (男性 10 名/女性 18 名) および減量代謝改善手術を施行した高度肥満症患者 12 名において、トリプル四重極質量分析および液体クロマトグラフィー (LC / TQMS) によって測定された血漿 XOR 活性およびその他の臨床パラメーターを経時的に観察し、血漿 XOR 活性の変化および関連する臨床パラメーターを評価した。脂肪肝モデルマウスを作製し、その血中 XOR 活性と肝臓 XOR 発現、活性を経時的に検討し、頸動脈結紮による新生内膜増殖過程に対する XOR 阻害薬である topiroxostat (TPX) の混餌投与による効果を検討した。細胞実験として、ヒト由来血管内皮細胞とヒト平滑筋細胞に対し、ヒト肝臓より抽出した (XOR 活性を有する) S9 分画と TPX の共添加による酸化ストレスの産生や細胞増殖に与える影響を検討した。

(2) 肥満モデルマウスの脂肪組織での各種コリントランスポーターの発現解析およびコリン代謝物のメタボローム解析、脂肪細胞特異的 SLC5A7 ノックアウトマウスの作製と表現型解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 糖尿病教育入院患者および減量・代謝改善手術を施行した高度肥満症患者において、LC / TQMS 法により測定した血漿 XOR 活性は、治療介入後に有意に低下し、その変化は血糖指標や BMI の変化とは相関せず、肝逸脱酵素 (AST/ALT) の変化のみと強く正相関した。マウスにコリン欠乏メチオニン減量高脂肪食 (CDAHFD) を負荷し、非アルコール性脂肪性肝疾患/肝炎 (NAFLD/NASH) を惹起したところ、血中 XOR 活性は NAFLD/NASH の病態進展に伴い著明に上昇し、肝逸脱酵素と強い正相関を認めた。以上より、血中 XOR 活性は NAFLD/NASH に代表される肝疾患において上昇

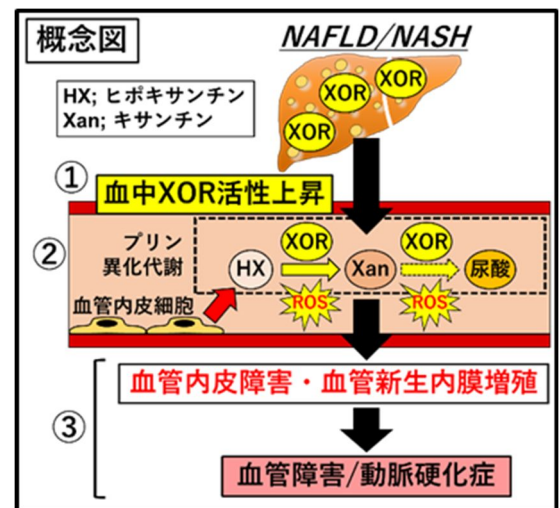
すると考えられた。次に、XOR が血中でその酵素活性を發揮するかを検討するため、マウスの血漿サンプルに HX を添加し、その後の各プリン代謝物の濃度変化を LC/MS 法にて経時的に測定した。その結果、NASH マウスの血中では HX Xan 尿酸へのプリン異化代謝が顕著に亢進しており、このような血中での代謝反応は、ヒトでは高 XOR 血症を呈する NAFLD 症例においてのみ特異的に観察された。

続いて、ヒト肝臓より抽出した S9 分画を、NAFLD 患者血漿と同程度の XOR 活性となるよう 1% に希釈調製することにより、肝由来 XOR の血管構成細胞への作用を検討した。ヒト血管内皮細胞からは比較的高濃度の HX が培養上清中へ分泌されていることが明らかとなり、肝由来 XOR 添加により培養上清中で HX が Xan および尿酸へと代謝された。さらにこのとき、培養上清中では ROS が産生され、VCAM-1 を初めとした単球接着因子の遺伝子発現の有意な上昇を認めたが、これらはいずれも XOR 阻害薬 TPX により抑制された。また、肝由来 XOR はヒト血管平滑筋細胞 (SMC) の脱分化と増殖を惹起したが、TPX 添加で同様にキャンセルされた。

頸動脈結紮による増殖型 SMC を主体とした新生内膜増殖は、NASH マウスにおいて顕著に亢進したが、本マウスに対して TPX 混餌投与を行った結果、血中 XOR 活性の抑制とともに、健常マウスと同程度まで進展が抑制された。

#### 【考察とまとめ】

(1) 血中 XOR 活性は NAFLD/NASH 病態において上昇し ( ), 血中でその代謝活性を發揮することで ( ), 血管内皮障害や新生内膜増殖に寄与することを初めて明らかにした ( ) (概念図)。これまでの疫学研究において、NAFLD/NASH の合併は心血管疾患の独立した危険因子となることが知られている。本研究結果は、肝臓由来の過剰な XOR が、「肝臓-血管連関機構」の新たな因子として、血管障害・動脈硬化性症の進展に直接的に



的に関与することを示唆した。阻害薬による血中 XOR の抑制は、NAFLD/NASH 患者の心血管疾患の進展を抑制する上で重要な治療戦略となり得る可能性がある。(Kawachi Y et al. *J Diabetes Investig* 2021, *JCI Insight* 2021. Nishizawa H et al, *Hypertens Res* 2022)

(2) 遺伝性肥満モデルマウス (ob/ob マウス) と食事誘導性肥満モデルマウス (高脂肪高シヨ糖食負荷マウス) の脂肪組織、特に成熟脂肪細胞画分において SLC5A7 の遺伝子発現量および膜画分における蛋白量が著増していることを見出した。また、ob/ob マウスの脂肪組織に対するメタボロームスナップショット解析により、肥満に伴いコリン、ホスホコリン、ホスファチジルコリンといったコリン代謝物の有意な増加を認めた。以上の結果を、第 92 回内分泌学会総会において発表した (藤島裕也ら, 2019)。Adiponectin-Cre マウスと SLC5A7-flox マウスを交配し、脂肪細胞特異的 SLC5A7 ノックアウトマウスを作製まで終了し、脂肪組織特異的に KO できていることを確認し、表現型解析を開始した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawachi Yusuke, Fujishima Yuya, Nishizawa Hitoshi, Nagao Hirofumi, Nakamura Takashi, Akari Seigo, Murase Takayo, Taya Naohiro, Omori Kazuo, Miyake Akimitsu, Fukuda Shiro, Takahara Mitsuyoshi, Kita Shunbun, Katakami Naoto, Maeda Norikazu, Shimomura Iichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Plasma xanthine oxidoreductase activity in Japanese patients with type 2 diabetes across hospitalized treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1512 ~ 1520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13467	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 -

1. 著者名 Kawachi Yusuke, Fujishima Yuya, Nishizawa Hitoshi, Nakamura Takashi, Akari Seigo, Murase Takayo, Saito Takuro, Miyazaki Yasuhiro, Nagao Hirofumi, Fukuda Shiro, Kita Shunbun, Katakami Naoto, Doki Yuichiro, Maeda Norikazu, Shimomura Iichiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Increased plasma XOR activity induced by NAFLD/NASH and its possible involvement in vascular neointimal proliferation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 144762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.144762	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 -

1. 著者名 Nishizawa Hitoshi, Maeda Norikazu, Shimomura Iichiro	4. 巻 45
2. 論文標題 Impact of hyperuricemia on chronic kidney disease and atherosclerotic cardiovascular disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 635 ~ 640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-021-00840-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川知祐介、藤島裕也、西澤 均、中村敬志、西塔拓郎、喜多俊文、前田法一、下村伊一郎
2. 発表標題 NAFLDにおける血中XOR活性の上昇と、その血管障害への関与
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川知祐介、藤島裕也、村瀬貴代、中村敬志、田矢直大、大森一生、片上直人、喜多俊文、西澤 均、前田法一、下村伊一郎
2. 発表標題 2型糖尿病患者の教育入院における血漿XOR活性の変化
3. 学会等名 第57日本糖尿病学会近畿地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西澤 均、下村伊一郎
2. 発表標題 内臓脂肪蓄積・メタボリックシンドローム (MetS) の病態から考える保健指導
3. 学会等名 第41回日本肥満学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川知祐介、藤島裕也、村瀬貴代、中村敬志、宮崎安弘、西澤 均、喜多俊文、前田法一、土岐祐一郎、下村伊一郎
2. 発表標題 2型糖尿病・高度肥満症の治療による血漿XORの変化
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤島裕也、川知祐介、長尾博文、西澤 均、中山康宗、馬場健史、永森収志、金井好克、喜多俊文、前田法一、福崎英一郎、下村伊一郎
2. 発表標題 肥満脂肪組織におけるコリントランスポーター発現とコリン代謝動態の変化
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西澤 均
2. 発表標題 内臓脂肪蓄積とXOR・高尿酸血症～地域での予防から高度肥満症まで～
3. 学会等名 第53回日本痛風・尿酸核酸学会総会（招待講演）
4. 発表年 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	前田 法一  (MAEDA Norikazu)  (30506308)	大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授   (14401)	
研究分担者	藤島 裕也  (FUJISHIMA Yuya)  (10779789)	大阪大学・医学系研究科・助教   (14401)	

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