

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591195

研究課題名(和文)尿酸産生酵素並びに尿酸の虚血性腎障害、メタボリックシンドロームにおける役割

研究課題名(英文) Role of xanthine oxidoreductase enzyme and uric acid in ischemic renal damage and metabolic syndrome

研究代表者

大坪 俊夫 (Ohtsubo, Toshio)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：30423974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：尿酸産生酵素(XOR)遺伝子改変マウスを用いてXORの役割を検討した。

1.一酸化窒素産生酵素阻害薬投与により、XORヘテロマウスは野生型マウスに比較し収縮期血圧の上昇、大動脈の内皮依存性弛緩反応の低下を認めた。2.虚血再灌流腎障害モデルに関しては、野生型マウスがXORヘテロマウスに比べ腎障害が高度であった。3.高脂肪食負荷モデル実験では、XORヘテロマウスは、野生型マウスに比べ有意な体重増加を認め、脂肪肝、内臓脂肪の増加、インスリン抵抗性を認めた。4.XORヘテロマウスは、野生型マウスに比べ、加齢に伴い有意な体重増加、インスリン抵抗性、血圧上昇を認めた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to examine the roles of XOR in various tissues using XOR genetically modified mice. 1. Treatment with NOS inhibitor showed the increase in systolic blood pressure and the decrease in endothelium-dependent vasodilation in aorta of XOR heterozygous (XOR+/-) mice compared to WT mice. 2. In the model of renal ischemic-reperfusion, renal damage level was higher in WT mice than XOR+/- mice. 3. Experiments with high-fat diet exhibited that body weight, visceral fat, fat storage in hepatic cells and insulin resistance were significantly higher in XOR+/- mice than WT mice. 4. XOR+/- mice exhibited significantly increased body weight with aging, and also showed higher rates of insulin resistance and higher blood pressure levels compared to WT mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 腎臓内科学

キーワード：尿酸産生酵素 肥満 メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

(1) XOR 蛋白質は、プリン体代謝の最終段階でヒポキサンチンからキサンチン、キサンチンから尿酸への代謝を調節している。その他、病態によっては活性酸素や一酸化窒素 (NO) を産生し、虚血再灌流障害、肺高血圧、動脈硬化、メタボリックシンドロームなど多くの病態への関与が報告されている。特に、XOR と虚血再灌流障害に関する研究は歴史が古く、小腸の虚血状態において XOR が尿酸産生と同時に活性酸素を産生し、組織障害に関与する報告が発表されて以来、腎臓や心臓、脳、肝臓など様々な臓器で非常に多くの研究報告が発表されてきた。しかし、相反する結果も報告されいまだ結論に達していない。

(2) 一方、XOR 蛋白質によって産生が制御されている尿酸に関しては、結晶化・炎症の惹起などを介して尿路結石・痛風の病態に関与する他に、平滑筋細胞の増殖、レニン・アンジオテンシン系の活性化、血管内皮 NO 減少による内皮機能障害などにより、腎障害並びに心血管病の病態進展に関与することが報告されている。その他、強い抗酸化作用を持ち、神経変性疾患などにおいて組織保護的に働く作用も報告もされている。大規模な疫学研究でも、高尿酸血症が痛風のみならず腎臓病・心血管疾患発症進展の独立した危険因子であることが報告されている。さらに、メタボリックシンドロームとの関連でも高尿酸血症の関与が注目を集めている。

(3) 我々は、XOR 並びに尿酸の生体における役割を明らかにするため XOR 遺伝子欠損マウスを作成した。XOR^{-/-}マウスはキサンチン・ヒポキサンチン結石の形成に加え、尿細管管腔内に中性脂肪に富んだ物質が沈着し腎不全で死亡した。腎障害の進展には、炎症・酸化ストレス・虚血・脂質代謝・脂肪分化異常などの関与が示唆された。19ヶ月齢の XOR^{+/-}マウスは、XOR^{+/+}マウスに比べ体組成に占める脂肪の割合が約2倍高かった。

2. 研究の目的

(1) 虚血性腎障害における XOR・尿酸の役割を、XOR 遺伝子欠損 (XOR^{+/+}, XOR^{+/-}) マウスを用いて明らかにする。虚血再灌流障害モデルマウスと一酸化窒素 (NO) 阻害による高血圧性腎虚血モデルマウスを作成し、XOR と尿酸の役割を検討する。

(2) XOR・尿酸とメタボリックシンドロームに関しては、高脂肪食負荷メタボリックシンドロームモデルマウスを作成し、XOR 及び尿酸の腎臓における脂質代謝、脂肪分泌、脂肪分化への影響を中心に、メタボリックシンドローム病態における役割などを明らかにしていく。

(3) XOR 遺伝子欠損ヘテロマウスの加齢に伴う体重増加 (肥満) のメカニズムを解明し、XOR 遺伝子の生体における役割を検討する。

3. 研究の方法

(1) 虚血性腎障害における XOR・尿酸の役割
虚血再灌流障害 (急性虚血) モデル

虚血性腎障害の急性虚血モデルに関しては、XOR^{+/-}と XOR^{+/+}マウスの両腎動脈を60分クランプ後、24時間再灌流し虚血再灌流モデル動物を作成する。虚血再灌流に伴う両群における腎臓障害の程度、虚血再灌流前後の血清尿酸値、XOR 活性、NO 産生酵素 (NOS) などの遺伝子・蛋白質発現の変化などを比較検討し XOR・尿酸の急性虚血性腎障害における役割を明らかにする。

高血圧性腎障害 (亜急性から慢性虚血) モデル

8~10週齢の XOR^{+/+}, XOR^{+/-}マウスに、NO 合成酵素阻害薬である L-NAME (30mg/kg/日) を8週間投与し、亜急性から慢性の腎虚血障害における XOR・尿酸の役割、特に XOR による NO 産生を介した腎組織保護や血管内皮機能への影響に注目し検討する。

(2) XOR・尿酸のメタボリックシンドロームにおける役割。

10-12週齢のXOR+/+及びXOR+/-マウスに通常食(10%脂肪)または高脂肪食(60%脂肪)を投与し、高脂肪食負荷メタボリックシンドロームモデルマウスを作成し、両群での体重増加の違いや、インスリン抵抗性、脂肪細胞における脂肪細胞の分化に關与する遺伝子の発現レベルの違いなどについて検討する。

(3) 加齢に伴うXORと肥満の關係。

XOR+/-マウスで認める加齢に伴う肥満のメカニズムを解明するために、2か月齢、4か月齢、18か月齢のXOR+/+, XOR+/-マウスを用いて体重、組織重量、血圧、血液生化学、遺伝子発現、組織変化などを比較検討する。また、XORマウス由来の脂肪前駆細胞を用いて、脂肪細胞への分化誘導を行いXOR遺伝子発現の違いによる分化の速さ並びに分化に關与する遺伝子発現の違いなどについても検討する。

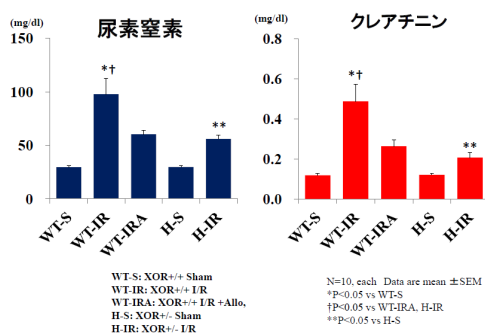
4. 研究成果

(1) XOR・尿酸の虚血性腎障害における役割

虚血再灌流障害(急性虚血)モデル

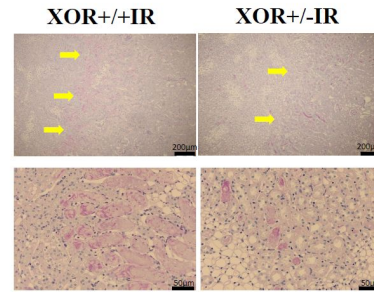
XOR+/+マウスでは、XOR+/-マウスと比較し再灌流後の血清BUN, Cr値の有意な増加(図1)、

図1. 虚血再灌流障害モデル



組織学的に皮髓境界を中心とした高度な腎障害(図2)を認めた。

図2. 虚血再灌流障害モデル: PAS染色



XOR+/+マウスに虚血後、再灌流開始時より尿酸産生酵素阻害薬のアロプリノールを投与すると腎障害の程度が軽減された。急性期モデルである虚血再灌流障害モデルに関しては、今後は、現在作成中のXOR/eNOS double KOマウスを用いてXORとeNOSの關係を検討していく。今回XOR遺伝子改変マウス(XOR+/+, XOR+/-, XOR-/-)より作成した初代培養内皮細胞を用いて、虚血並びに再酸化状態におけるXOR・尿酸の役割を検討しようと試みたが、内皮細胞の培養がうまくいかなかった。今後 Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)細胞を用いて、虚血再酸化に伴うXORの役割をeNOSとの關係を中心に検討を行っていく。

高血圧性腎障害(亜急性から慢性虚血)モデル

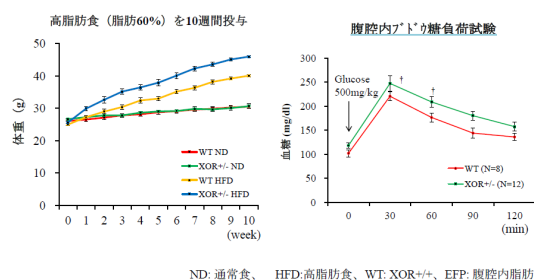
L-NAME(NOS阻害薬)投与により収縮期血圧はXOR+/-マウスにおいて有意な上昇を認めたが、血清BUN, Cr値、腎組織障害の程度に関してはXOR+/+, XOR+/-マウス群間で明らかな差を認めなかった。大動脈における内皮依存性の血管弛緩反応は、L-NAME投与によりXOR+/-マウスでXOR+/+マウスより有意に低下した。組織学的には、L-NAME投与XOR+/-マウスでは大動脈弾性線維の進展および断裂を認め、血管内皮細胞にMDA, 4-HNEなどの脂質酸化物の蓄積亢進を認めた。NOS阻害状況下においては、血管局所におけるXORを介したNO産生などが血管緊張の維持に關与している可能性が示唆された。今後は、現在作成中のeNOS KOマウスとXOR KOマウスを掛け合わせたeNOS/XOR

double KOマウス、並びにApoE KOマウスとXOR KOマウスを掛け合わせたApoE/XOR double KOマウスを用いて研究を継続する予定である。

(2) XOR・尿酸のメタボリックシンドロームにおける役割。

高脂肪食負荷によりXOR+/-マウスは、XOR+/+マウスに比べ有意な体重増加を認め、血糖値の上昇、インスリン抵抗性を認めた。(図3)。脂肪組織では炎症に関与する遺伝子

図3. 高脂肪食負荷肥満モデルマウス

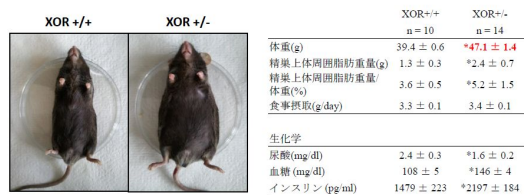


やインスリン抵抗性に関与する遺伝子の発現亢進を認めた。肝臓においてもXOR+/-マウスで有意な肝細胞内への脂肪の蓄積を認めた。

(3) 加齢に伴う XOR の役割。

XOR の生理的役割を検討するために、通常食にて加齢に伴う変化を検討すると、XOR+/-マウスは XOR+/+マウスと比較し、2ヶ月齢では耐糖能、血圧、血清脂質などに差は認めなかったが、脂肪細胞分化に関連する C/EBP β 、PPAR γ 、FABP4 の発現が亢進していた。4ヶ月齢では体重差は認めなかったが、耐糖能検査で有意な高血糖、血圧上昇を示し、精巣上体周囲白色脂肪組織の重量も増加し、組織学的には炎症所見を認めた。また、18ヶ月齢では XOR ヘテロマウスで有意な体重増加を認め(図4)、空腹時血糖も高値であった。2ヶ月齢マウスの白色脂肪組織より分離した血管間質分画に脂肪細胞への分化誘導を行うと、XOR ヘテロマウス由来の血管間質分画では脂肪合成の主要調節因子である PPAR γ 、脂肪合成マーカーである FABP4 および C/EBP β の有意な発現亢進を認め、分化誘導中の過酸化水素ならびにスーパーオキシド

図4. 18か月齢XOR遺伝子欠損マウス



*P < 0.05 compared with WT

産生の増加を認めた。これらの結果は、XORヘテロマウス由来の血管間質分画細胞では脂肪細胞分化が亢進していることを示している。加えて、XORヘテロマウス由来の血管間質分画細胞では、分化誘導刺激によるC/EBP β の発現変化は認めなかったが、発現レベルは常にワイルドタイプより高値を示した。今回の研究では、マウス XOR 遺伝子の発現低下により脂肪蓄積が促進され、活性酸素の増加、マクロファージの浸潤およびインスリン抵抗性を介して、加齢に伴い肥満を呈した。XOR 遺伝子は C/EBP β の発現を介して脂質代謝を制御している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- Murakami N, Ohtsubo T, Kansui Y, Goto K, Noguchi H, Haga Y, Nakabeppu Y, Matsumura K, Kitazono T; Mice heterozygous for the Xanthine Oxidoreductase Gene Facilitate Lipid Accumulation in Adipocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34:44-51, 2014. 査読あり
DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.302214

〔学会発表〕(計 7 件)

- Noboru Murakami, Toshio Ohtsubo, Yasuo Kansui, Kenichi Goto, Kiyoshi Matsumura and Takanari Kitazono Heterozygous deletion of xanthine oxidoreductase augments adipogenesis in white adipose tissue and induces obesity with insulin resistance. The 24th Scientific Meeting

of the international Society of Hypertension. September 30-October 4, 2012, Sydney, Australia.

2. Toshio Ohtsubo, Kiyoshi Matsumura, Kenichi Goto, Hideyuki Oniki, Tomoko Ymasaki, Masayo Fukuhara, Yuko Ohta and Mitsuo Iida. Role of xanthine oxidoreductase in high fat diet-induced obesity mice. The 23rd Scientific Meeting of the international Society of Hypertension. September 26-30, 2010, Vancouver, Canada.
3. Toshio Ohtsubo, Kiyoshi Matsumura, Kenichi Goto, Hideko Noguchi, Hideyuki Oniki, and Mitsuo Iida. The association between serum uric acid and blood pressure in Japanese men. The 23rd Scientific Meeting of the international Society of Hypertension. September 26-30, 2010, Vancouver, Canada.
4. 芳賀祥江、村上昇、大坪俊夫、寒水康雄、後藤健一、松村潔、北園孝成 Xanthine Oxidoreductase は、酸化ストレスを介して腎臓の虚血再灌流障害を引き起こす 第36回日本高血圧学会総会 大阪 2013,10.24~26
5. 村上昇、大坪俊夫、土橋卓也 加齢における xanthine oxidoreductase の役割：XOR 遺伝子改変マウスを用いた検討 第45回日本痛風・核酸代謝学会総会 奈良県新公会堂 2012.2.16~17
6. 村上昇、大坪俊夫、寒水康雄、後藤健一、松村潔、北園孝成 一酸化窒素合成阻害による血圧上昇におけるキサンチンオキシドリダクターゼ(XOR)の役割：XOR 遺伝子改変マウスを用いた検討 第34回日本高血圧学会総会 宇都宮 2011,10.20~22
7. 村上昇、大坪俊夫、土橋卓也 長期高脂肪食負荷による脂肪性肝障害の進行におけるキサンチンオキシドリダクターゼ(XOR)の役割 第44回日本痛風・核酸代謝学会総会 東京 2011, 2.18

〔その他〕

ホームページ等

[http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search](http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K002991/research.html)

[h/details/K002991/research.html](http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K002991/research.html)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大坪 俊夫

九州大学病院腎高血圧脳血管内科

講師

研究者番号：30423974