

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 2 5 年 5 月 1 0 日現在

機関番号: 12601

研究種目: 挑戦的萌芽研究

研究期間: 2012 ~ 2012

課題番号: 24659144

研究課題名 凝集蛋白質の蓄積とプリン代謝物質との関連性はあるか

研究課題名 Effects of Change in Purine Metabolism on Accumulation of Aggregated Proteins in the Cell.

研究代表者

西野武士 (Takeshi Nishino)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任教授

研究者番号: 40094312

研究成果の概要: 機構が解明されている新規キサンチン酸化還元酵素の強い阻害剤を ALS の G1H-G93A モデルマウスに経口投与し、その病状の進展遅延効果が確認された。効果の機構として、活性酸素生成抑制による可能性、またはプリン代謝効果による変性タンパクの蓄積抑制の可能性を考え、モデル実験により予備的検討を行った。プリン代謝産物の濃度変化を追跡しアデニンヌクレオチドの分解によるヒポキサンチンの増加が認められた。

研究成果の概要(英文):

We orally administered recently introduced potent xanthine oxidoreductase inhibitors, whose mechanisms of inhibition are well characterized, to ALS G1H-G93A mice. The results of model experiments indicated that orally administered non-purine analogue XOR inhibitors significantly delay the disease progression. The protective effect is suggested to be due to increased removal of aggregated protein accompany with change in purine metabolism by the experiment with model systems.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 基礎医学・病態医化学

キーワード: 筋萎縮性側索硬化症, キサンチン酸化還元酵素, 抗痛風剤, 活性酸素

1. 研究開始当初の背景: 筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, 通称 ALS) は、脊髄前角細胞死による運動ニューロン麻痺を引き起こす神経変性疾患の難病である。近年日本

各社で新規開発された抗痛風薬を ALS のモデルマウスに投与したところ、発症・死亡遅延などの顕著な効果が確認され、治療薬として使用の可能性が期待される。

## 2. 研究の目的

ALSマウスに対するXORの阻害剤の効果の機構については不明である。XORの阻害剤の効果には2つの可能性が仮説として成り立つ。(1) XORが阻害され、その酵素が生成する活性酸素(スーパーオキシドおよび過酸化水素)の生成を抑制することによりSOD1変性タンパクの凝集の抑制する可能性(2) XORの阻害により、活性酸素とは別のなんらかの代謝的な効果に基づく、SOD1変性タンパクの凝集の抑制である。本格的な研究取り組み前に、本研究に基づき1年間間に、研究方向を探る予備的研究を行う。

## 3. 研究の方法

- 1) ALS G1H-G93Aモデルマウスに阻害剤を投与しその病理像を観察する。
- 2) ウェスタンブロットによるXORの検出
- 3) インビトロ系によるプリン代謝中間物質の変化を図1のスキームに従いHPLCを用いて観察する。

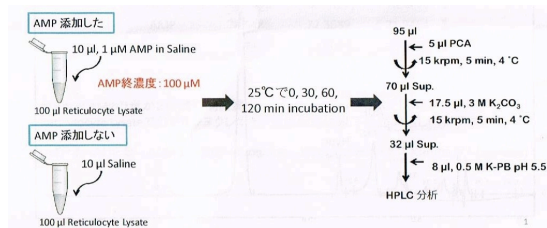


図1 プリン分解系の代謝産物測定

## 4. 研究の成果

- 1) ALS G1H-G93Aモデルマウス阻害剤TEI-6720およびアロプリノールを投与し、発症後15日目の脊髄前角細胞の病理組織像を比較すると、非投与群(プラセーボ)およびアロプリノール投与群に比すると著しく細胞の生存率が高い(図2)。また細胞にはタンパク質の凝集像が顕著であった。
- 2) XORの抗体を用いて染色を試みたが、瀰漫性の弱い染色像が見られたものの神経組織のウェスタンブロットでは検出されず、酵素活性の検出もできなかった。活性酸素である $O_2^-$ は膜の

通過が出来難いことを考慮すると細胞内での活性酸素による細胞死は考え難いと言える。

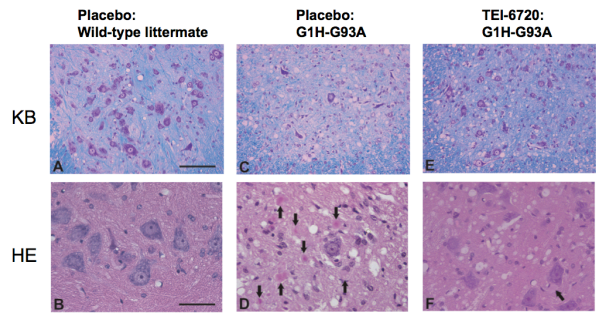


図2 発症後15日の組織像(プラセーボおよび阻害剤投与マウス)

## 3) アデニンヌクレオチド分解に伴うプリン分解産物の変化

網状赤血球をモデルとして、アデニンヌクレオチド、IMP、ヒポキサンチン、キサンチン、イノシン、尿酸、の濃度変化をHPLCを用い、追跡したところアデニンヌクレオチドの分解とともにヒポキサンチンの増加が認められた(図3、表1)。

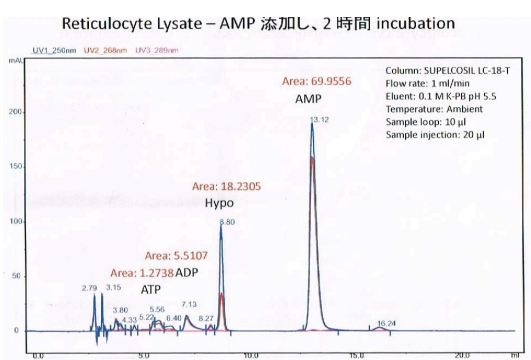
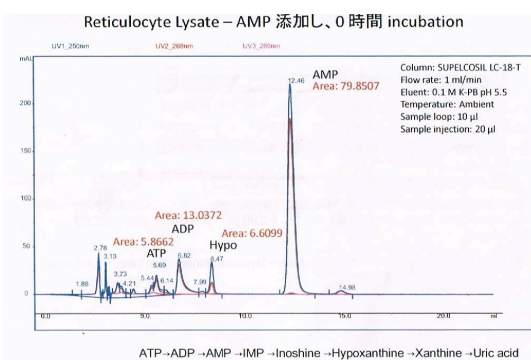


図3 プリン分解産物の変動のHPLC像  
網状赤血球に於けるプリン代謝産物の変化(上;0時間、下;2時間後)

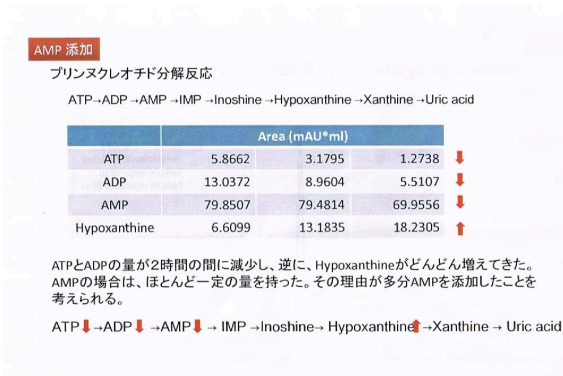


表 1 ヌクレオチド分解系におけるアデニンヌクレオチドの変化とヒポキサンチンの蓄積

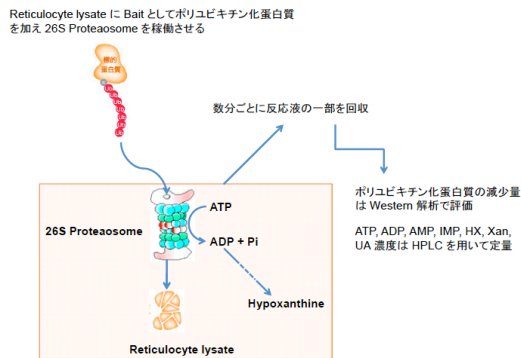
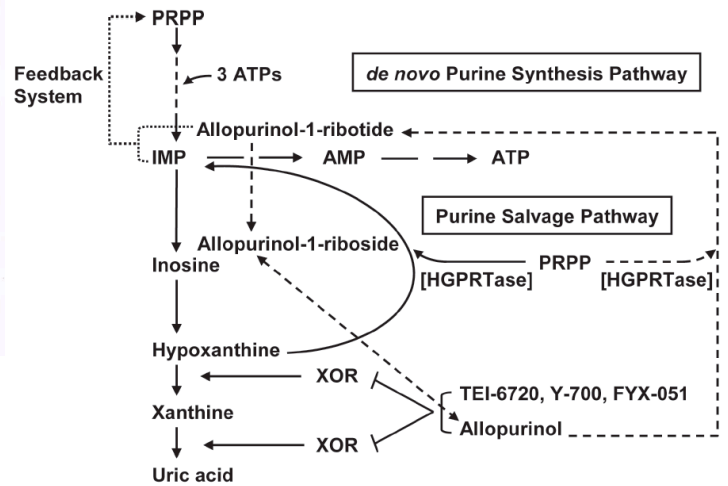


図4. ユビキチン化されたミスフォールドタンパク質のプロテオゾームによる分解とアデニンヌクレオチドの変動

系においては尿酸の生成は見られず、ヒポキサンチンのみの上昇が認められ、系に XOR が存在しないことに由来する。このように XOR が存在しないことは神経細胞の系と類似し、モデルとして適切と考えられた。凝集タンパク質の除去は ATP 依存のプロテアーゼにより行われることが知られており(図4)、今回の研究によりそれがヒポキサンチン産生にと傾く。それらは通常は XOR により尿酸になり捨てられる。しかし、阻害剤存在すればその排泄は防がれる。ヌクレオチド維持のためには、プリンの再利用かサルベージ回路による。ヒポキサンチンの再利用がエネルギー的に遊離であり、それが XOR 阻害剤により促されるという仮説が最も考えられる。アロプリノールはサルベージ回路の利用が阻害するため、効果が見られないという仮説に一致する結果である。今後より詳細な検討が必要である。



### 上記、想定された阻害剤の機構

全身で蓄積したヒポキサンチンは血流を介して神経細胞に流入し、細胞中で HGPRTase により IMP 合成に再利用されると考えられる。IMP の新生 (de novo 合成) を阻害する。このサルベージ回路はエネルギー的に有利である。なお、アロプリノール自身はサルベージ回路の基質となるため、このサルベージ系を阻害するため効果は少ないと推定できる。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2件)

1. Ichida K, Amaya Y, Okamoto K, Nishino T. (Review) (2012) Mutations associated with functional disorder of xanthine oxidoreductase and hereditary xanthinuria in humans. *International Journal of Molecular Science* 13, 15475-15495, doi:10.3390/ijms131115475
2. Okamoto K, Kusano T, Nishino T. (Review) (2012) Chemical Nature and Reaction Mechanisms of the Molybdenum Cofactor of Xanthine Oxidoreductase. *Current Pharmaceutical Design*, 19, 2606-2614, doi: 10.2174/1381612811319140010

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 西野武士(招待講演)キサンチン酸化還元酵素の構造とプリン水酸化反応機構、第46回日本痛風核酸代謝学会、2013年2月、東京
2. 草野輝男、加藤信介、加藤雅子、宮川拓也、西野武士「G1H-G93A 遺伝子導入マウスの呈する筋萎縮性側索硬化症へのキサンチン酸化還元酵素阻害剤の影響」  
第85回日本生化学会、2012年12月、福岡

〔図書〕(計1件)

1. Okamoto, K., Kondo, S. and Nishino, T. A New-Generation Uric Acid Production Inhibitor: Febuxostat, in Analogue-based Drug Discovery III (eds. J. Fischer, C. R. Canellin and D. P. Rotella ) pp365-376, Wiley-VCH, 2013

〔産業財産権〕

○取得状況(計 2件)

1. 名称: Therapeutic agent for amyotrophic lateral sclerosis  
発明者:Takeshi Nishino, Yasuko Abe Shinsuke Kato  
権利者: Nippon Medical School Foundation and National University Corporation Tottori University  
種類: United States Patent 用途特許  
番号: US 8,318,792B  
取得年月日: Nov. 27, 2012  
国内外の別: 国外
2. 名称: 筋萎縮性側索硬化症治療薬  
発明者: 西野武士, 阿部靖子、加藤信介  
権利者: 学校法人日本医科大学  
国立大学法人鳥取大学  
種類: 用途特許  
番号: 5110536号  
取得年月日: 平成24年10月19日  
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

西野武士 (NISHINO TAKESHI)  
東京大学大学院・農学生命科学研究科  
・特任教授  
研究者番号: 40094312

(2)研究分担者

草野輝男 (KUSANO TERUO)  
日本医科大学・医学部・助教

研究者番号: 30434129

(3) 研究分担者

宮川拓也 (MIYAGAWA TAKUYA)  
東京大学大学院・農学生命科学研究科  
・助教

研究者番号: 50596559