

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790160

研究課題名(和文)高尿酸血症治療薬のレドックス解析とCKD・CVDに対する抗酸化治療への応用

研究課題名(英文)Redox analysis of antihyperuricemic agent and application to CKD/CVD treatment

## 研究代表者

門脇 大介(Kadowaki, Daisuke)

熊本大学・薬学部・准教授

研究者番号：70433000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：高尿酸血症は心血管疾患(CVD)および慢性腎臓病(CKD)の危険因子であり、これらに共通する病態メカニズムとして酸化ストレスによる血管内皮障害がある。本研究では酸化ストレスの観点からCVDおよびCKDの予防に最適な高尿酸血症治療薬の探索を行うことを目的とし、in vivoおよびin vitroから解析を行った。その結果、高尿酸血症治療薬の一つであるbenzbromaroneがスーパーオキシドラジカルに対して直接的なラジカル消去能を有すること、また尿酸だけでなくアンジオテンシンIIによる酸化ストレスの増大をBNZは抑制できることを見出し、マルチな抗酸化剤となる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Hyperuricemia, begins with induction of oxidative stress which closely related to the renin angiotensin system, is related to the onset and the progression of cardiovascular disease (CVD) and chronic kidney disease (CKD). Therefore, reduction of oxidative stress is important in hyperuricemia. In the present study, we evaluate the antioxidant effects of uricosuric agent benzbromarone. As a result, Benzbromarone has a direct radical scavenging activity against superoxide radicals and reduced oxidative stress induced by angiotensin II in the endothelial cell. Furthermore, benzbromarone exerts a direct antioxidant action in angiotensin II and salt induced-hypertension model rats. These results revealed that benzbromarone exerts a direct antioxidant action in the body. It is expected in the future that benzbromarone may be useful agent as a multiple antioxidants for the prevention of CVD and CKD.

研究分野：医療薬学

キーワード：高尿酸血症 ベンズブロマロン 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

高尿酸血症は、尿酸の産生過剰か、もしくは尿中への排泄低下により体内に尿酸が蓄積することが原因の病態である。厚生労働省の調査では、痛風患者は 90 万に達し、高尿酸血症患者は 600 万人以上と推定されている。これは、食生活や生活習慣の変化に伴うものでメタボリックシンドローム (Mets) や糖尿病と同様に急速に増加しており、高尿酸血症が種々の病態や合併症のリスクファクターとなることが報告されている。さらに、血清尿酸値が総死亡と関連することが複数の研究により報告されている。実際、最近の臨床研究において、高尿酸血症は高血圧や動脈硬化等の心血管疾患 (CVD) や慢性腎臓病 (CKD), Mets と密接に関連することが明らかとなってきた (図 1)。従来より、高尿酸血症, CVD, CKD, Mets の発症や進展には多様な病態メカニズムが提唱されてきたが、近年、これらの病態に共通するメカニズムの 1 つとして酸化ストレスに注目が集まっており、有効な抗酸化治療戦略の開発が切望されている。また、尿酸トランスポーター (URAT1) が血管内皮に存在することが最近明らかにされ、尿酸と内皮障害の関係性が注目されている。これは、URAT1 により尿酸が細胞内に取り込まれ高濃度蓄積することで、元来は抗酸化物質である尿酸が逆にプロオキシダントとして作用する結果、内皮障害を引き起こすためと考えられている。したがって、高尿酸血症に伴う酸化ストレス、ひいては内皮障害を軽減するためには、URAT1 による尿酸取り込みの阻害、あるいは尿酸により誘導される活性酸素 (ROS) の消去、の 2 つの治療戦略が考えられる。もし、の両者を併せ持つ高尿酸血症治療薬があれば、優れた抗酸化効果により、高尿酸血症における CKD および CVD 予防の観点からもさらなる有効性が期待される。しかしながら、現時点では高尿酸血症治療薬の抗酸化作用に関する報告はアロプリノール以外皆無である。

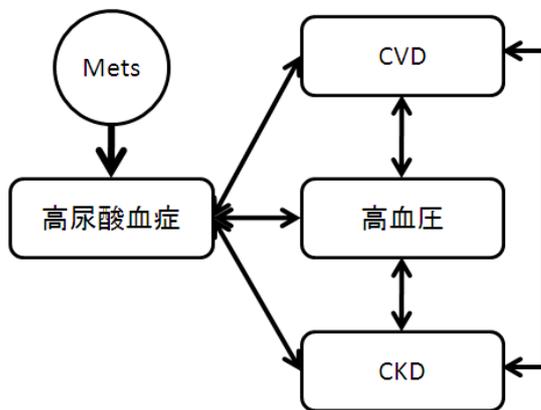


図1 高尿酸血症と密接に関連する病態

2. 研究の目的

既存の高尿酸血症治療薬の抗酸化活性を多角的に解析し、その結果に基づき CKD および CVD の発症予防のための高尿酸血症に対する新たな抗酸化治療戦略を提案することを最終目的とする (図 2)

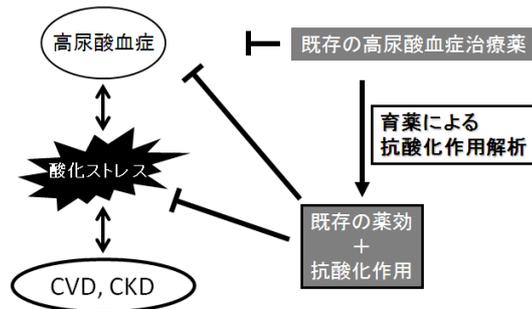


図2 抗酸化作用を加味した高尿酸血症に対する治療戦略

3. 研究の方法

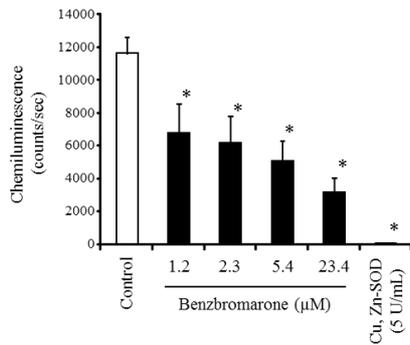
本研究では、本邦で高尿酸血症治療薬として用いられている薬剤 (プロベネシド, ベンズプロマロン) についてプレオトロピック効果である抗酸化作用の有無、あるいは それと主作用である尿酸低下効果との関連性について、スピントラップ剤による ESR 解析により評価した。加えて、CVD, CKD, Mets の発症や進展には、酸化ストレスの亢進による血管内皮傷害が重要な役割を果たしていることが指摘されているため、血管内皮細胞モデルを用いた培養細胞系で、各種ラジカルに対する酸化ストレス抑制効果や細胞保護効果についても検討を行った。さらに、アンジオテンシン II 誘発高血圧・酸化ストレスモデルを用いた *in vivo* 実験で薬物の抗酸化作用を検証した。

4. 研究成果

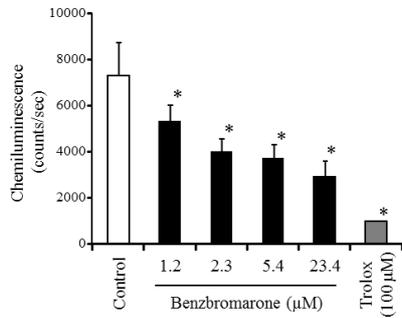
高尿酸血症治療薬の 1 つであるベンズプロマロンは、高尿酸血症時に過剰産生されるスーパーオキシド (図 3 A) やアルコキシラジカル (図 3 B) を直接的にスカベンジすることが示唆された。一方、同様の治療薬であるプロベネシドでラジカルスカベンジ能は観察されなかった。また、ベンズプロマロンはその臨床血中濃度においても、有意な ROS 産生抑制効果が観察された。更に、臓器障害の際に炎症形成を誘発する好中球由来ラジカルに対しても、ベンズプロマロンは優れた抗酸化作用を有することが確認された。

ベンズプロマロンは、HUVEC や HK-2 において尿酸刺激による ROS 産生を抑制する効果が示唆された (図 4 A)。更に、尿酸により誘発された細胞傷害性を、ベンズプロマロンは有意に改善した。また、尿酸は局所のレニン・アンジオテンシン系を活性化させることで、アンジオテンシン (A) が産生され細胞内 ROS を誘発することが報告されており、ベンズプロマロンは A 誘発の ROS に対しても有

図3 A)



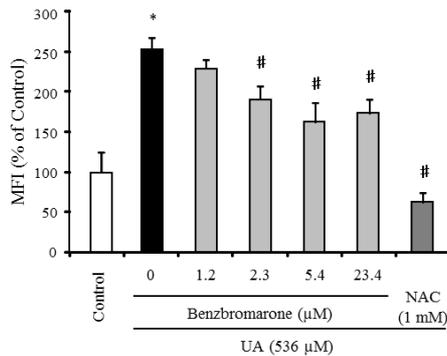
B)



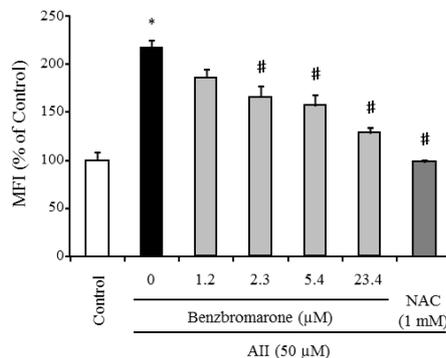
用であることが示唆された(図4 B)。

次に, *in vivo* におけるベンズブロマロンの抗酸化作用を評価することを目的に、アンジオテンシン II と食塩の負荷による高血圧モデルラットに対してベンズブロマロンの4週間連日経口投与を行った。その結果、ベンズブロマロン投与は血圧および尿酸値に影響を与えないものの、酸化ストレスマーカー

図4 A)



B)



である蛋白質過酸化物を有意に低下させ、尿中 8 - ヒドロキシデオキシグアノシンの減少傾向を示した。また、腎組織 DHE 染色においても酸化ストレスの抑制が示され、生体内でも直接的な抗酸化作用を発揮することが明らかとなった。(投稿準備中)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)

1. Direct radical scavenging activity of benzbromarone provides beneficial antioxidant properties for hyperuricemia treatment. Kadowaki D, Sakaguchi S, Miyamoto Y, Taguchi K, Muraya N, Narita Y, Sato K, Chuang VT, Maruyama T, Otagiri M, Hirata S. *Biol Pharm Bull*. 2015;38(3):487-92. (査読有)
2. p-Cresyl sulfate, a uremic toxin, causes vascular endothelial and smooth muscle cell damages by inducing oxidative stress. Watanabe H, Miyamoto Y, Enoki Y, Ishima Y, Kadowaki D, Kotani S, Nakajima M, Tanaka M, Matsushita K, Mori Y, Kakuta T, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T. *Pharmacol Res Perspect*. 2015 ;3(1):e00092. (査読有)
3. Establishment of a model of acetaminophen-induced hepatotoxicity in different weekly-aged ICR mice. Taguchi K, Tokuno M, Yamasaki K, Kadowaki D, Seo H, Otagiri M. *Lab Anim*. 2015 Feb 12. pii: 0023677215573041. (査読有)
4. Awareness and current implementation of drug dosage adjustment by pharmacists in patients with chronic kidney disease in Japan: a web-based survey. Kondo Y, Ishitsuka Y, Shigemori E, Irikura M, Kadowaki D, Hirata S, Maemura T, Irie T. *BMC Health Serv Res*. 2014;14:615. (査読有)
5. Possible false-negative results on therapeutic drug monitoring of phenytoin using a particle enhanced turbidimetric inhibition immunoassay in a patient with a high level of IgM. Hirata K, Saruwatari J, Enoki Y, Iwata K, Urata Y, Aizawa K, Ueda K, Shirouzono T, Imamura M, Moriuchi H, Ishima Y, Kadowaki D, Watanabe H, Hirata S, Maruyama T, Fukunaga E. *Ther Drug Monit*. (査読有) 2014;36(5):553-5.
6. Differential effects of methoxy group on the interaction of curcuminoids with two major ligand binding sites of human serum albumin. Sato H, Chuang VT, Yamasaki K, Yamaotsu N, Watanabe H, Nagumo K, Anraku M, Kadowaki D, Ishima Y, Hirano S, Otagiri M, Maruyama T. *PLoS One*. 2014;9(2):e87919. (査読有)

7. Comparative Effects of Phosphoenolpyruvate, a Glycolytic Intermediate, as an Organ Preservation Agent with Glucose and N-Acetylcysteine against Organ Damage during Cold Storage of Mouse Liver and Kidney. Ishitsuka Y, Fukumoto Y, Kondo Y, Irikura M, Kadowaki D, Narita Y, Hirata S, Moriuchi H, Maruyama T, Hamasaki N, Irie T. *ISRN Pharmacol.* 2013; 2013: 375825. (査読有)
  8. Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. Nagumo K, Tanaka M, Chuang VT, Setoyama H, Watanabe H, Yamada N, Kubota K, Tanaka M, Matsushita K, Yoshida A, Jinnouchi H, Anraku M, Kadowaki D, Ishima Y, Sasaki Y, Otagiri M, Maruyama T. *PLoS One.* 2014;9(1):e85216. (査読有)
  9. Comparative effects of respiratory stimulants on hypoxic neuronal cell injury in SH-SY5Y cells and in hippocampal slice cultures from rat pups. Tanaka K, Ishitsuka Y, Kurauchi Y, Yamaguchi K, Kadowaki D, Irikura M, Katsuki H, Irie T. *Pediatr Int.* 2013;55(3):320-7. (査読有)
  10. Phosphoenolpyruvate, a glycolytic intermediate, as a cytoprotectant and antioxidant in ex-vivo cold-preserved mouse liver: a potential application for organ preservation. Kondo Y, Ishitsuka Y, Kadowaki D, Fukumoto Y, Miyamoto Y, Irikura M, Hirata S, Sato K, Maruyama T, Hamasaki N, Irie T. *J Pharm Pharmacol.* 2013;65(3):390-401. (査読有)
  11. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. Watanabe H, Miyamoto Y, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, Noguchi T, Kadowaki D, Ishima Y, Kotani S, Nakajima M, Kataoka K, Kim-Mitsuyama S, Tanaka M, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T. *Kidney Int.* 2013;83(4):582-92. (査読有)
  12. [Drug induced nephropathy and appropriate use of drugs]. Hirata S, Kadowaki D, Narita Y. *Nihon Jinzo Gakkai Shi.* 2012;54(7):999-1005. (査読有)
  13. Effect of acetaminophen on the progression of renal damage in adenine induced renal failure model rats. Kadowaki D, Sumikawa S, Arimizu K, Taguchi K, Kitamura K, Ishitsuka Y, Narita Y, Irie T, Chuang VT, Maruyama T, Otagiri M, Hirata S. *Life Sci.* 2012;91(25-26):1304-8. (査読有)
  14. A uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate induces cell damage to proximal tubular cells via the generation of a radical intermediate. Miyamoto Y, Iwao Y, Mera K, Watanabe H, Kadowaki D, Ishima Y, Chuang VT, Sato K, Otagiri M, Maruyama T. *Biochem Pharmacol.* 2012 ; 84 (9) :1207-14. (査読有)
  15. Appropriate drug dosing in patients receiving peritoneal dialysis. Hirata S, Kadowaki D. *Contrib Nephrol.* 2012 ;177:30-7. (査読有)
  16. Interaction between two sulfate-conjugated uremic toxins, p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate, during binding with human serum albumin. Watanabe H, Noguchi T, Miyamoto Y, Kadowaki D, Kotani S, Nakajima M, Miyamura S, Ishima Y, Otagiri M, Maruyama T. *Drug Metab Dispos.* 2012;40(7):1423-8. (査読有)
  17. Phosphoenolpyruvic acid, an intermediary metabolite of glycolysis, as a potential cytoprotectant and anti-oxidant in HeLa cells. Kondo Y, Ishitsuka Y, Kadowaki D, Kuroda M, Tanaka Y, Nagatome M, Irikura M, Hirata S, Sato K, Maruyama T, Hamasaki N, Irie T. *Biol Pharm Bull.* 2012;35(4):606-11. (査読有)
  18. 尿酸と酸化ストレスの関連とベンズプロマロン,基礎から臨床へ 門脇 大介 医薬の門, 2012;52:374-377. (査読無)
- 〔学会発表〕(計 5 件)
1. 高尿酸血症治療薬ベンズプロマロンの抗酸化作用と血管内皮保護作用, 門脇大介, 坂口翔一, 宮本洋平, 佐藤圭創, 丸山徹, 小田切優樹, 成田勇樹, 平田純生, 第 55 回日本腎臓学会学術総会, パシフィコ横浜 (2012 年 6 月 1 日)
  2. 高血圧モデルラットの酸化ストレスに対するベンズプロマロンの効果, 村谷菜々子, 門脇大介, 北村健一郎, 成田勇樹, 丸山徹, 小田切優樹, 平田純生, 第 23 回日本医療薬学会年会, 仙台国際センター (2013 年 9 月 21 日)
  3. 高血圧モデルラットの酸化ストレスに対するベンズプロマロンの効果, 村谷菜々子, 門脇大介, 北村健一郎, 成田勇樹, 丸山徹, 小田切優樹, 平田純生, 第 7 回日本腎臓病薬物療法学会 学術集会・総会 2013, 広島国際会議場 (2013 年 10 月 5 日)
  4. 高血圧モデルラットの酸化ストレスに対するベンズプロマロンの効果, 村谷菜々子, 門脇大介, 成田勇樹, 北村健一郎, 丸山徹, 小田切優樹, 平田純生, 日本薬学会第 134 年会, 熊本大学 (2014 年 3 月 27 日)
  5. Radical scavenging activity of

benzbromarone as a novel property in vitro , Daisuke Kadowaki, Shoichi Sakaguchi, Yohei Miyamoto, Nanako Muraya, Yuki Narita, Keizo Sato, Yu Ishima, Victor Chuang, Toru Maruyama, Masaki Otagiri, Sumio Hirata , 5th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress ( PSWC2014 ) , Melbourne Convention and Exhibition Centre( 2014 年 4 月 12 日 ),メルボルン( オーストラリア)

〔図書〕(計 5 件)

1. 門脇大介, 腎疾患の服薬指導 Q&A ~CKD から透析患者まで ~ 改訂版, Q154: 327-328, Q177: 369, Q211: 438-440, Q214: 449-45 ,医薬ジャーナル社 (2012)
2. 門脇大介, 平田純生, 透析患者の薬物適正使用 ,変革する透析医学, 365-370, 医薬ジャーナル社 (2012)
3. 平田純生, 門脇大介, 成田勇樹, 章 1. 総論 透析患者における薬剤使用について. 224-232, 章 1.総論 透析患者における心血管系薬剤の使い方. 233-244 血液透析患者における心血管合併症の評価と治療, 医薬ジャーナル社 (2012)
4. 門脇大介, 腎臓・尿路疾患, visual core pharma 薬物治療学 改訂 3 版, 250-256, 南山堂 (2013)
5. 門脇大介, 腎臓・尿路疾患, visual core pharma 薬物治療学 改訂 4 版, 222-234, 南山堂 (2014)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

特になし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

門脇 大介 (KADOWAKI DAISUKE)

熊本大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 70433000

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし