

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461232

研究課題名(和文)尿酸産生酵素由来一酸化窒素の腎血管系における役割

研究課題名(英文)The role of nitric oxide derived from xanthine oxidoreductase in renal vascular system

研究代表者

大坪 俊夫(Ohtsubo, Toshio)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：30423974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：キサンチン酸化還元酵素(XOR)遺伝子改変マウスを用いた検討。1)腎虚血再灌流障害においてXOR+/+マウスはXOR+/-マウスと比べ有意な腎障害を認めた。XORは、活性酸素の産生、炎症関連遺伝子発現の亢進を介して、腎皮質尿細管障害を引き起こした。2)腎虚血再灌流において、亜硝酸前投与は腎保護効果を示した。3)低酸素再酸素化は、ヒト血管内皮細胞におけるXOR遺伝子の発現を亢進した。4)LNAME投与は、XOR+/-マウスにおいてXOR+/+マウスよりも有意な収縮期血圧の増加、胸部大動脈の血管拡張、中膜壊死を引き起こした。5)XOR遺伝子、eNOS遺伝子ダブル欠損は、有意に寿命を短縮した。

研究成果の概要(英文)：Study using XOR gene disrupted mice. 1) Renal ischemia reperfusion induced severe renal damage in XOR+/+ mice compared to XOR+/- mice. ROS generated by XOR increased the expression of inflammation related genes and induced the damage to the cortical region in kidney. 2) Administration of nitrite before ischemia protected renal tissue from ischemia reperfusion injury. 3) Hypoxia/reoxygenation induced the expression of XOR mRNA in human endothelial cells. 4) Administration of LNAME increased the systolic blood pressure in XOR+/- mice compared to XOR+/+ mice and induced vascular dilatation and degeneration of the media at thoracic aorta wall in XOR+/- mice. 5) The deletion of both XOR and eNOS gene showed significant decrease in life span.

研究分野：高血圧・血管

キーワード：虚血再灌流障害 活性酸素 キサンチンオキシドリダクターゼ 血管

1. 研究開始当初の背景

キサンチン酸化還元酵素 (Xanthine Oxidoreductase: 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 (reactive oxygen species: ROS) や一酸化窒素 (nitric oxide: NO) を産生し、虚血再灌流障害、心不全、動脈硬化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、1981 年に小腸の虚血再灌流状態において、XOR が尿酸産生と同時に活性酸素を産生し、組織障害を引き起こす報告が発表されて以来、非常に多くの組織で XOR の活性酸素産生と虚血再灌流障害に関する研究報告が発表されてきた。XOR の阻害薬であるアロプリノールを用いて、XOR が産生する活性酸素が虚血再灌流障害に関与していることを報告している。一方虚血条件下においては内皮一酸化窒素合成酵素 (endothelial Nitric Oxide Synthase: eNOS) の活性が低下するが、代わりに XOR を介した NO 産生が増加し組織保護的に働くことや、亜硝酸投与による更なる臓器保護効果を認めることが報告されている。

その他、XOR の阻害薬であるアロプリノールを用いた検討では、XOR の阻害による腎障害進展抑制、血圧低下、心不全改善、血管内皮機能改善など多くの病態改善効果が報告されているが、その機序に関してはあまり明らかとなっていない。

2. 研究の目的

XOR の生体における役割、特に心腎血管系における役割を明らかにする目的で、XOR 遺伝子欠損マウスを用いて、加齢に伴う変化や、腎虚血再灌流障害モデルを作成し検討を行った。また、XOR と eNOS 又は

ApoE のダブル遺伝子欠損マウスを作成し、血管内皮機能における XOR と eNOS、動脈硬化における XOR と ApoE の相互関係などを明らかにする目的で研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 腎虚血再灌流 (ischemia reperfusion: IR) 障害における XOR の役割 (in vivo) :

XOR+/+, XOR+/- の sham 治療群 (XOR+/+S, XOR+/-S)、IR 群 (XOR+/+IR, XOR+/-IR) 又はアロプリノール投与 IR マウス (XOR+/+IRA) の 5 群のマウスを用いて、XOR 遺伝子部分欠損並びに薬理的 XOR 酵素活性阻害による IR 腎障害への影響を検討した。また、障害部位、活性酸素産生・炎症に關与する遺伝子発現の変化などを比較検討した。

(2) 亜硝酸前投与による腎虚血再灌流障害保護効果の検討 :

野生型マウスを用いて、亜硝酸前投与の有無による腎虚血再灌流障害の程度を比較検討した。

(3) 低酸素再酸素化における XOR 遺伝子の発現変化 (in vitro) :

腎虚血再灌流障害モデルで傷害を認めた尿細管細胞と虚血時に XOR 発現の亢進が指摘されている血管内皮細胞に関して、低酸素再酸素化モデルを用いて、HK-2 ヒト近位尿細管培養細胞と HUVEC ヒト内皮培養細胞を用いて XOR 遺伝子発現の変化の検討を行った。

(4) LNAME 投与 eNOS 酵素活性阻害による XOR 遺伝子欠損マウスへの影響 :

16 週齢の XOR 遺伝子改変マウス (XOR+/+, XOR+/-) に、30mg/kg/day で NOS 阻害薬の N⁶-nitro-L-arginine methylester (LNAME) を投与し、血圧、XOR 活性、内皮機能への影響などを検討した。

(5) XOR/eNOS, XOR/ApoE ダブル遺伝子欠

損マウスの樹立、生後発育、心腎血管系の観察：

XOR 遺伝子欠損マウスと Jackson 研究所より購入した eNOS 遺伝子欠損マウス、ApoE 遺伝子欠損マウスを交配し、XOR/ApoE, XOR/eNOS のダブル遺伝子欠損マウスの作成を行った。最初に通常食摂取下における寿命を検討した。

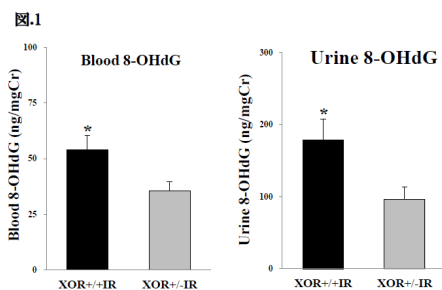
(6) XOR/eNOS マウスを用いて虚血再灌流障害における XOR を介した組織保護効果の検討：

(7) XOR/ApoE マウスを用い動脈硬化モデルマウスを作成し、XOR の役割を検討：

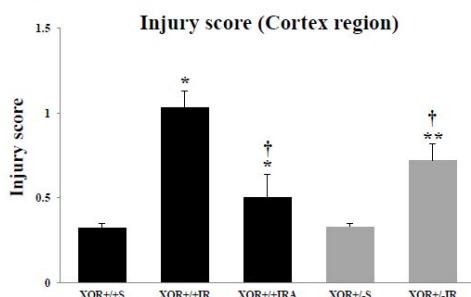
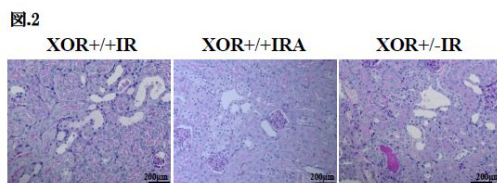
4. 研究成果

(1) 腎虚血再灌流(IR)障害における XOR の役割(in vivo)：

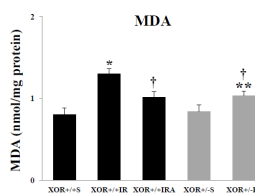
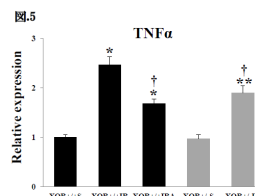
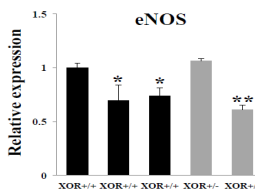
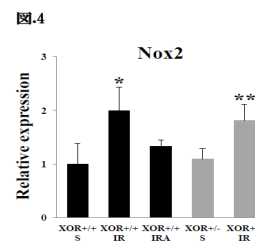
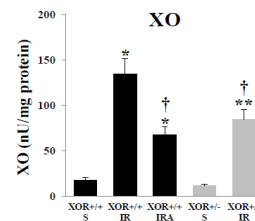
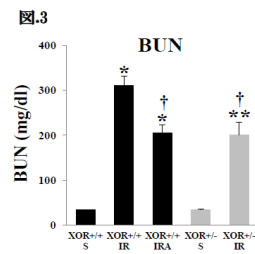
腎虚血再灌流 (IR) マウスでは、sham 治療群と比較して、著明な血液中の BUN, Cr、酸化ストレスマーカーの増加を認めた(図 1)。組織学的には腎臓の皮質の尿細管を



中心に、尿細管の拡張、尿細管上皮の障害や尿細管腔内に細胞や蛋白の蓄積などを認めた(図 2)。XOR+/-IR マウスとアロプ



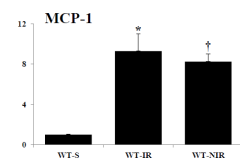
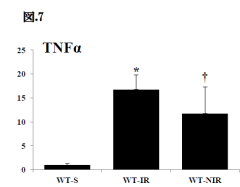
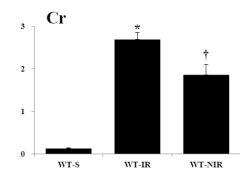
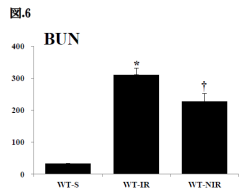
リノール投与 XOR+/+IR (XOR+/+IRA) マウスでは、



XOR+/+IR マウスに比べ XO 活性の低下と一致して腎障害が軽減した(図 3)。活性酸素産生に関わる Nox2 遺伝子の発現は IR で増加したが、eNOS の発現は逆に IR で有意な低下を認めた(図 4)。炎症に関わる TNF- α や MCP-1 の遺伝子発現、腎組織中の脂質酸化障害のマーカーである MDA の産生(図 5)も、XO 活性の増加とともに増加した。以上の結果より、XO は腎虚血再灌流障害において、活性酸素を産生し炎症を惹起

して組織障害に関与することが示唆された。低酸素再酸素化をきたす、急性腎障害、睡眠時無呼吸症候群や臓器移植などの病態では、XOR の阻害が病態改善につながる可能性が示唆され、今後の更なる検討が必要である。

(2) 亜硝酸前投与による腎虚血再灌流障害保護効果の検討：

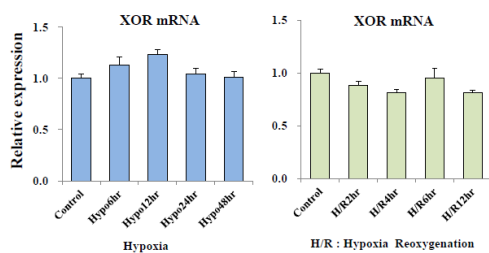


た NO 産生の増加が組織保護的に働いた可能性もあり、今後の検討が必要である。

(3) 低酸素・再酸素化における XOR 遺伝子の発現変化 (in vitro):

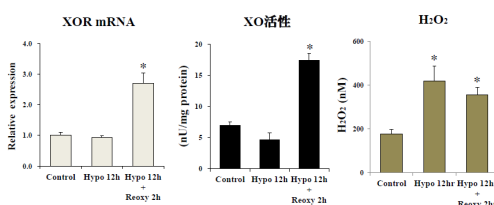
ヒト尿管培養細胞 HK-2 細胞を用いた検討 (図 8) では、低酸素 (2%O₂) 24 時間

図.8 HK-2 cell



後に再酸素化を行うと、XOR mRNA 発現はわずかに増加傾向を認めたが、低酸素再酸素化による有意な発現の変化は認めな

図.9 HUVEC cell



虚血前に亜硝酸を投与した (WT-NIR) マウスでは、投与しなかった (WT-IR) マウスに比べて、有意な BUN, Cr の低下を認めた (図 6)。炎症に関連する TNF、MCP-1 の遺伝子発現も WT-NIR マウスでは WT-IR マウスと比較し有意な低下を認めた (図 7)。亜硝酸の前投与により、虚血時に XOR を介

った。ヒト血管内皮細胞 HUVEC を用いた検討 (図 9) では、低酸素再酸素化により XOR の遺伝子発現および活性は増加したが、過酸化水素の産生量には有意な差は認めなかった。HK-2 細胞に関しては、虚血の影響を受けにくいことが過去に報告されており、虚血条件を変更し今後の検討が必要である。HUVEC 細胞に関しては、虚血時間、再酸素化時間などの再検討を行う必要がある。

(4) LNAME 投与による eNOS 阻害の XOR 遺伝子欠損マウスへの影響:

LNAME 投与により XOR^{+/+}-マウス (Hete-L)において、XOR^{+/+}マウス (WT-L) よりも有意な収縮期血圧の上昇を認めた。しかし、LNAME 投与は腎組織中の XO 活性に影響を及ぼさなかった (図 10)。生理

学的には、XOR^{+/+}-マウスで胸部大動脈の内皮依存性血管弛緩反応の低下を認めたが、LNAME 投与の影響は明らかでなかつ

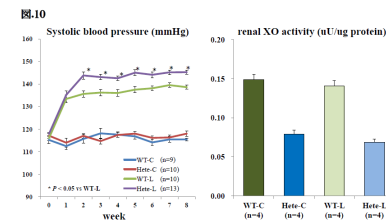
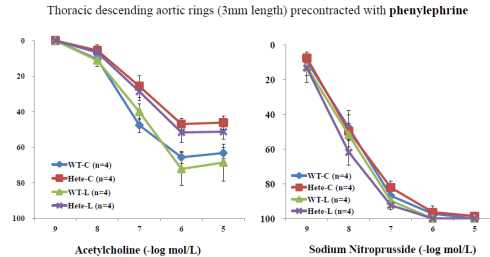
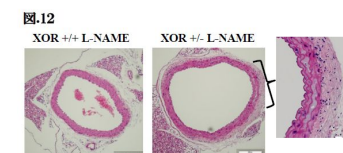


図.11 Thoracic descending aortic rings (3mm length) precontracted with phenylephrine



た (図 11)。組織学的には LNAME 投与により



XOR^{+/+}-マウスでのみ、胸部大動脈の血管拡張、中膜壊死を認めた (図 12)。今後は XOR/eNOS 遺伝子欠損モデルマウス

を用いて、XOR と eNOS の血管における相互関係を検討していく。

(5) XOR/eNOS, XOR/ApoE ダブル遺伝子欠損マウスの樹立、生後発育、心腎血管系の観察：

XOR 遺伝子欠損マウス, XOR/ApoE, XOR/eNOS の遺伝子ダブル欠損マウスに関して、寿命への影響を検討した。XOR 遺伝

子欠損マウスでは (図 1 3)、XOR^{-/-}マウスは 54 ± 28 日で死亡したが、XOR^{+/+}と XOR^{+/-}マウスの寿命に有意な差は認めなかった。XOR/ApoE マウスの寿命に関しては (図 1 4) 通常食摂取下においては、XOR 遺伝子、ApoE 遺伝子の組み合わせによる

寿命への影響は認めなかった。一方、XOR/eNOS マウスの寿命に関しては (図 1 5) XOR 遺伝子、eNOS 遺伝子の組み合わせにより寿命に有意な

差を認め、XOR と eNOS の相互作用が、寿命に影響を与える可能性が示唆された。

(6) XOR/eNOS マウスを用いて虚血再灌流障害における XOR を介した組織保護効果の検討：

XOR/eNOS double 遺伝子欠損マウスの樹立に時間がかかり、今後これらのマウスを用いて、心腎血管における XOR, eNOS

の相互作用の検討を行っていきたい。

(7) XOR/ApoE マウスを用い動脈硬化モデルマウスを作成し、XOR の役割を検討：

XOR/ApoE double 遺伝子欠損マウスの樹立に時間がかかった。今後これらのマウスを用いて動脈硬化モデルマウスを作成し、動脈硬化における XOR の役割を検討したい。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Haga Y, Ohtsubo T, Murakami N, Noguchi H, Kansui Y, Goto K, Matsumura K, Kitazono T; Disruption of xanthine oxidoreductase gene attenuates renal ischemia reperfusion injury in mice. *Life Sci.* 2017. [Epub ahead of print] 査読あり

DOI: 10.1016/j.lfs.2017.06.011.

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 4 件)

芳賀祥江、大坪俊夫、関拓紀、寒水康雄、後藤健一、松村潔、北園孝成 腎虚血再灌流障害における Xanthine Oxidoreductase の役割 38 回日本高血圧学会総会 松山 2015.10.9-11 ポスター

芳賀祥江、大坪俊夫、土橋卓也 腎虚血再灌流障害における Xanthine

Oxidoreductase の 2 つの働き 第 48 回

日本痛風・核酸代謝学会 東京
2015.2.19/20 一般口演
芳賀祥江、大坪俊夫、関拓紀、寒水康雄、
後藤健一、松村潔、北園孝成 腎臓の虚
血再灌流障害における Xanthine
Oxidoreductase と亜硝酸の役割
Opposing Roles of Xanthine
Oxidoreductase and Nitrite in Renal
Ischemia/Reperfusion Injury 第37回
日本高血圧学会総会 横浜

2014.10.17-19.

Yoshie Haga, Toshio Ohtsubo, Noboru
Murakami, Yasuo Kansui, Kenichi Goto,
Takunori Seki, Kiyoshi Matsumura and
Takanari Kitazono Disruption of
xanthine oxidoreductase gene
attenuates renal
ischemia-reperfusion injury in mice.
The 25nd Scientific Meeting of the
international Society of Hypertension.
Jun 13th to 16th 2014, Athens, Greece.

〔その他〕

ホームページ等

<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 (OHTSUBO, Toshio)
九州大学・大学院医学研究院・
病態機能内科学・准教授
研究者番号：30423974

(2) 研究協力者

芳賀 祥江 (HAGA, Yoshie)
村上 昇 (MURAKAMI, Noboru)
寒水 康雄 (KANSUI, Yasuo)
後藤 健一 (GOTO, Kenichi)
松村 潔 (MATSUMURA, Kiyoshi)
野口 英子 (NOGUCHI, Hideko)