

博士論文（要約）

プリンサルベージ経路の解析

関根 舞

「やむを得ない事由」を具体的に説明する資料

東京大学大学院農学生命科学研究科長殿

私は、博士論文のインターネット公表に関し、確認表に記した以下の「やむを得ない事由」により、博士論文の内容についてインターネット公表をすることができません。

公表を保留するやむを得ない事由：

- ・現在、博士論文第4章の内容について特許申請中であるため。
6カ月以内に特許公開予定。
- ・博士論文の全部について、学術雑誌に掲載予定であるため、公表することができません。

公表の予定：“Analysis of the purine metabolic effect of allopurinol and its derivative”
(M Sekine et al, in preparation)

投稿先ならびに、その他の著者の詳細は未決定です。

令和元年 12月 13日

農学生命科学研究科 応用生命化学専攻

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 29 年度博士課程入学

氏名 関根 舞

指導教員名 永田 宏次

論文題目 プリンサルベージ経路の解析

プリンサルベージ経路の中心的な酵素である Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) はプリンヌクレオチドの分解で生じた Hypoxanthine (Hx) を利用して IMP を生成する。この経路は、プリン骨格を新規合成して IMP をつくる *de novo* 合成経路よりもはるかにエネルギー効率がよく多量の ATP を節約できる。エネルギー状態の指標として Energy Charge (EC) が用いられ、 $EC = ([ATP] + 0.5[ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$ の式で表される。細胞は、ATP 合成が不十分な場合、AMP 分解を促し Hx に変換することで、 $[ATP] + [ADP] + [AMP]$ を低下させて EC を一定に維持している。生じた Hx は、Xanthine oxidoreductase (XOR) を持たない神経細胞では細胞外に排出され、XOR が発現している細胞では尿酸まで分解された後に細胞外に排出される。XOR 阻害薬は尿酸生成を抑えるため、高尿酸血症・痛風治療薬として用いられている。代表的な XOR 阻害薬として、プリン骨格をもつ Hx の類似体 Allopurinol とプリン骨格をもたない Febuxostat が挙げられる (図 2)。これまで、神経変性疾患 (筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病) モデルマウスに対し Febuxostat を投与すると、神経細胞における凝集タンパク質の蓄積抑制、疾患発症の遅延、寿命の延長が観察されることが論文および公開特許にて報告された。一方、Allopurinol にはそのような効果は認められない。これは、プリン骨格の有無による両分子の代謝の違いを反映していると考えられており、以下の仮説が立てられた (図 1)。①XOR 阻害薬は尿酸生成を抑制し、血中 Hx 濃度を上昇させる。②神経細胞内への Hx 流入量が増加し、プリンサルベージ経路が活性化され ATP 濃度維持に寄与し、変性タンパク質の分解が進む。③ただし、Allopurinol の場合、Hx の類似体であるためプリンサルベージ経路の基質かつ阻害薬となり、エネルギー状態の改善が起こらない。しかし、この仮説は検証が必要である。

本研究では、2 種類の XOR 阻害薬、Febuxostat と Allopurinol のプリンサルベージ経路への影響を解析し、神経細胞におけるエネルギー状態改善の有無をより明確にするとともに、Allopurinol に効果がない理由を明らかにすることを目的とした。

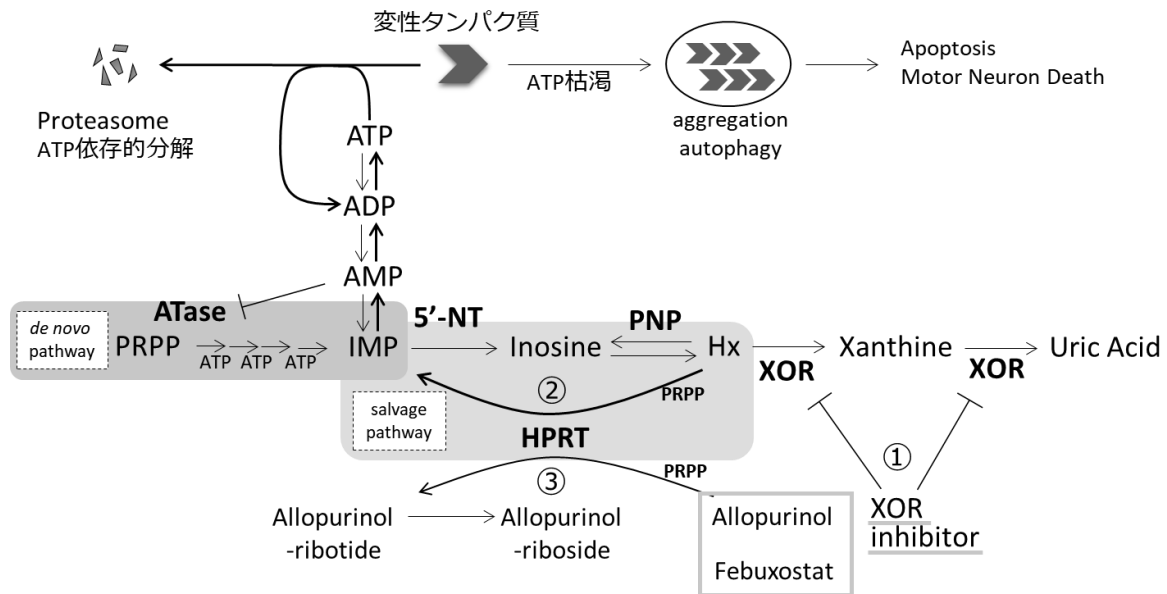


図 1. プリン代謝作業仮説

1. プリンサルベージ経路の種差とプリン代謝解析

プリン代謝には種差があり、哺乳動物では一般に尿酸酸化酵素により尿酸がアラントインへ分解されるが、霊長類の一種であるヒトではこの酵素が欠損しており、尿酸が最終産物である。プリンサルベージ酵素の種差を明らかにするために、赤血球を用いて HPRT 活性の比較を行った。その結果、ヒトとウサギでは HPRT が高活性であり、マウスでは低活性であったことから、XOR 阻害薬がマウスに比べヒトやウサギで効果的に働く可能性が示唆された。ウサギ網状赤血球を用いて *de novo* 合成経路とプリンサルベージ経路の相互調節について解析したところ、XOR 阻害薬による Hx の増加は両経路の共通の基質である PRPP を取り合いにより *de novo* 合成経路を有意に抑制することが示された。

2. プリンサルベージ経路によるエネルギー状態の改善

ヒトは他の動物とプリン代謝が異なるため、ヒトの細胞を用いた実験が望まれた。そこで、ヒト iPS 細胞を神経細胞に分化させ、より病態に近づけたモデルを構築した。ヒト神経細胞におけるプリンサルベージ経路と *de novo* 経路の寄与を調べるために、通常培養条件下および低酸素ストレス条件下にて、Hx (サルベージ経路の基質) と Formate (*de novo* 経路の基質) の安定同位体標識体を添加して ATP への取り込み量を解析した。その結果、通常培養条件下では、Hxの方が効率よく ATP へ取り込まれ、ヒト神経細胞においてはサルベージ経路が主要であることが示された。一方、低酸素条件下では、両基質の取り込みは確認できず、Total adenylate ($[ATP]+[ADP]+[AMP]$) が減少したが、Febuxostat を加えた場合には通常培養条件と有意差がないほど Total adenylate の減少が抑えられた。次に、生体内で XOR が主に働いている肝臓細胞のモデルとして XOR を添加した HepG2 細胞を用いて、両阻害薬の影響を検

討した。その結果、Febuxostat および低濃度 Allopurinol によりエネルギー改善効果が認められたものの、高濃度 Allopurinol ではエネルギー改善効果が認められず、疾患モデルマウスで報告された結果と一致した。

HPRT の欠損症は、*de novo* 経路の亢進による高尿酸血症と神経症状を呈する。このことは、プリンサルベージ経路が *de novo* 経路の調節と神経細胞にとって重要であることを示唆する。HPRT 欠損症に対し XOR 阻害薬が有効であるか検討するため、HPRT 活性が低いマウスの赤血球を HPRT 部分欠損モデルとして、両阻害薬の効果を調べた。XOR 存在下で HPRT による IMP 生成はみられないほど HPRT 活性が低いマウスの場合でも、XOR 阻害薬により HPRT 活性が検出された。しかし、この実験においては、Allopurinol と Febuxostat の違いは認められず、Allopurinol による HPRT 阻害作用も確認できなかった。赤血球には *de novo* 経路が存在しないため、疾患モデルマウスに Allopurinol が有効でない理由として *de novo* 経路の関与が示唆された。

3. Allopurinol とその誘導体の HPRT に対する効果

疾患モデルマウスに Allopurinol が効果的でない理由を明らかにするために、まず Allopurinol 誘導体の代謝について調べた (図 2)。Allopurinol は HPRT によって IMP の類似体である Allopurinol-ribotide に変換されるがその生成効率は乏しいことが分かった。しかし、Allopurinol-ribotide は血漿におけるプリン分解系において容易に Allopurinol-riboside (Inosine の類似体) へ変換された。Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) は Hx を Inosine に変換するためプリンサルベージ酵素の一つとされるが、PNP は Inosine から Hx への分解反応も触媒する。同様に Allopurinol と Allopurinol-riboside も PNP によって相互変換すると考えられたが、反応は認められなかった。次に、Allopurinol 誘導体の HPRT 阻害効果を調べたところ、Hx に対し Allopurinol は競合阻害、Allopurinol-ribotide は非競合阻害様式を示したが、Allopurinol-riboside の阻害効果は確認できなかった。X 線結晶構造解析においても Allopurinol の HPRT への結合は今回確認できず、その阻害効果が弱いことが示された。しかし、Allopurinol が PNP により Allopurinol-riboside に変換されないことと、Allopurinol 投与時の生体内における Allopurinol-riboside の占める割合 (約 10%) を考慮すると、Allopurinol は PRPP 消費に働き、結果として Hx のサルベージや *de novo* 経路を阻害する可能性が示唆された。

4. Allopurinol と Oxypurinol の XOR と PNP に対する阻害効果の比較

高尿酸血症・痛風患者に Allopurinol を投与すると、主に Oxypurinol (約 80%)、Allopurinol-riboside (約 10%) に代謝される。Allopurinol は自身が XOR の基質となり XOR がもつ Mo (VI) を還元し、一過性に生じた Mo (IV) と Oxypurinol が共有結合することにより XOR-Oxypurinol 複合体を形成し強い阻害を示す。Oxypurinol は尿酸と同様に尿細管で再吸収を受け、長い間排泄されずに蓄積するため、尿

酸低下作用の主体と考えられている。そこで Oxypurinol の XOR 阻害作用を調べたところ、Oxypurinol が阻害作用を示すには XOR の還元剤として、Hx または Xanthine が必要であるため、Allopurinol に比べて阻害に時間を要し、阻害効果も弱いことが示された。XOR-Oxypurinol 複合体は不安定であり、Mo (IV) の再酸化に伴い Oxypurinol は解離する。生体条件における XOR-Oxypurinol 複合体の半減期を求めたところ、約 70 min であり、阻害効果は持続しないことが分かった。Allopurinol は重篤な副作用 (Stevens-Johnson 症候群、中毒性表皮壊死症) が報告されており、Oxypurinol の高濃度蓄積が関与している可能性が示唆されている。欠損症が免疫不全を惹起する PNP は Allopurinol-riboside によって阻害を受けることが報告されているため、Allopurinol と Oxypurinol についても PNP 阻害作用を調べた。その結果、Oxypurinol が PNP を非常に強く阻害する可能性が示唆された。以上より、低用量の Allopurinol を投与することにより尿酸値低下を達成することができ、Oxypurinol による副作用も回避できるので、Allopurinol の消失時間と XOR-Oxypurinol 半減期を考慮して、酵素学的には少量の Allopurinol を数回に分けて摂取することが望ましいと考えられる。

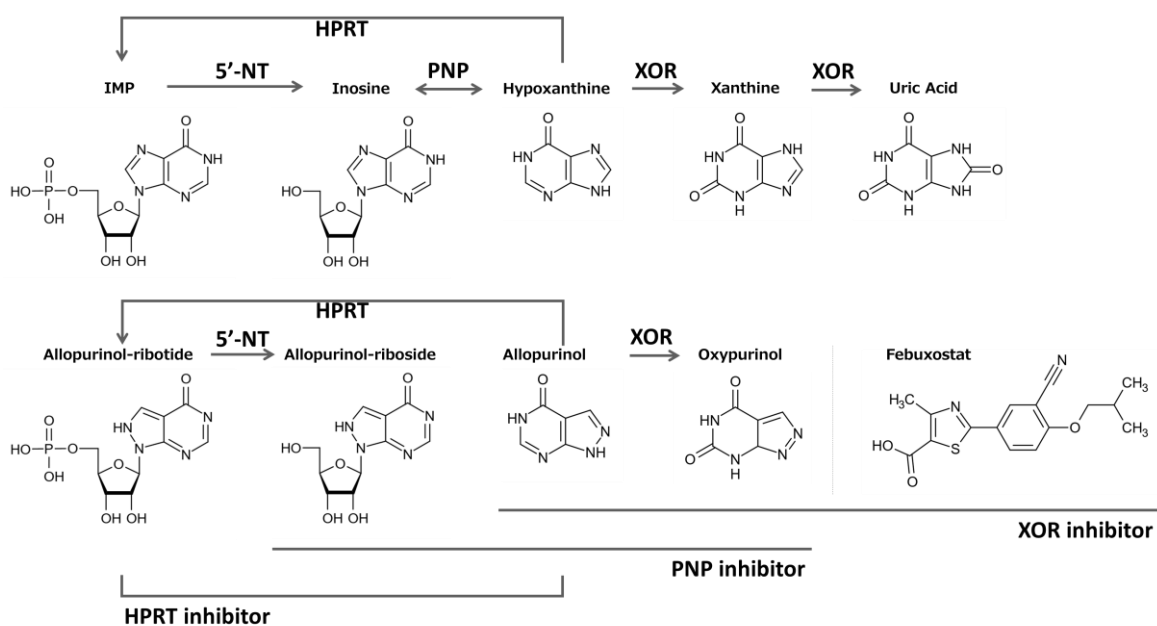


図2. HPRT、PNP、5'-NT および XOR の基質と阻害薬の化学構造

以上より、プリンサルベージ経路の活性化は神経細胞にとって保護的に働くことが示され、Allopurinol が PRPP 消費することによって両経路を阻害していることが分かった。XOR 阻害薬の神経変性疾患に対する病変進行遅延効果は、すでに認可されている医薬の更なる難治疾患への応用研究であり、早期の利用が期待されている。プリンサルベージ経路の欠損により、プリン排泄系だけでなく神経系、免疫系も影響を受けることから、この経路が広範な調節に関わっていると考えられる。プリンサルベージ経路の意義を明らかにすることで、エネルギー枯渇や虚血の病態を持つ多くの疾患 (脳血管疾患、心血管疾患、糖尿病など) への治療薬の新たな開発の基礎となると考えている。