

論文の内容の要旨

論文題目 動脈硬化における尿酸の関与

氏名 木村佳貴

(序文)

動脈硬化症の危険因子として、高 LDL コレステロール血症などの脂質異常症が知られている。しかし、十分に LDL コレステロールを低下させても、心血管イベントの抑制効果には限界があり、新たにコントロール可能な残余リスクを探索することが重要な課題となっている。

これまでの疫学研究により高尿酸血症が動脈硬化症の独立した危険因子の一つであるとの知見が明らかになっている。しかし、高尿酸血症が動脈硬化症のマーカーであるか、それ自体が病態形成に関わっているかは、未だ明らかになっていない。

高尿酸血症と動脈硬化症はともに炎症の関与が報告されており、高尿酸血症が炎症を介して動脈硬化症の進展に影響を与える可能性が考えられている。

尿酸は、細胞死に伴い細胞内から放出され炎症を惹起する分子、“danger signal”としての役割を持つことが知られている。Danger signal はマクロファージなどに認識され、インフラマソームの活性化などを介し、パイロトーシスを誘導し、IL-1 β や IL-18 などの炎症性サイトカインを放出させる。

動脈硬化症では病初期よりコレステロール結晶が病変部に沈着し、NLRP3 インフラマソームの活性化を介し、動脈硬化の進展に寄与することが判っている。我々はコレステロール結晶によって惹起された炎症がパイロトーシスを誘導し、それにより放出される尿酸が danger signal としてその後の持続的炎症の維持を担うとする仮説を立てた。

本研究は、薬剤および尿酸酸化酵素ウリカーゼトランスジェニックマウスを用いた尿酸低下モデルマウスにおいて、尿酸が動脈硬化病変の進展に与える影響について検討した。また尿酸と動脈硬化の関連について炎症を介したメカニズムの観点から、ウリカーゼトランスジェニックマウスを用いた *in vivo* の実験及びヒト末梢血単核細胞(PBMC)を用いた *in vitro* の実験を行った。最後にヒトにおいて尿酸降下療法がヒト PBMC の炎症性サイトカインの分泌に与える影響について調べた。

(方法)

1. LDLR^{-/-}マウスを、生後 8 週から飲料水をアロプリノール溶液、ベンズブロマロン溶液に置換した群、通常の飲料水群の 3 群に分け、高脂肪食を 16 週間摂取させた。
2. 尿酸酸化酵素ウリカーゼを細胞外に分泌し細胞外液(血清)の尿酸値を下げる ssUOX^{Tg} マウス、細胞内にウリカーゼを発現し細胞内の尿酸量を減少させる intUOX^{Tg} マウスの、2 種類のウリカ

ーゼトランスジェニックマウスを用い、動脈硬化モデルマウス(ApoE^{-/-}マウス, LDLR^{-/-}マウス)と交配させた。生まれた仔に生後 6 週より 16 週間高脂肪食を摂取させた。

2. ともに 16 週間飼育後、心臓と大動脈を摘出し、心臓については大動脈洞で連続凍結切片を作製、HE 染色し、粥状動脈硬化病変の体積を積算した。大動脈については oil red O 染色を行い、粥状動脈硬化病変の占める割合を算出した。
- ウリカーゼトランスジェニックマウスの腹腔内にコレステロール結晶 2mg を投与し、6 時間後に腹腔内へ遊走した好中球数・単球数を、FACS を用いて測定した。
- ヒト PBMC を異なる尿酸濃度下で培養し、LPS およびコレステロール結晶で刺激し、培養上清中の IL-1 β を測定した。
- ヒト PBMC を尿酸(UA)濃度 0, 4 mg/dl で培養し、LPS で刺激し、pro-IL-1 β の発現を RT-PCR および ELISA を用いて検討した。
- HEK293T 細胞に、NLRP3 および ASC-cerulean 発現ベクターをトランスフェクションし、ASC-cerulean, NLRP3 安定発現 HEK293T 細胞(インフラマソーム活性化レポーター細胞)を作製した。この細胞を UA 0, 4 mg/dl で培養し、nigericin で NLRP3 インフラマソームを活性化したときの細胞面積当たりのインフラマソーム形成を測定した。
8. UA 0, 4 mg/dl での HEK293T 細胞およびヒト PBMC の細胞内活性酸素(ROS)を、DCFDA を用いて測定した。またインフラマソーム活性化レポーター細胞およびヒト PBMC に ROS スカベンジャーである N-acetyl cysteine を加え、インフラマソームの形成や IL-1 β 分泌への影響を検討した。
- 健全成人にベンズブロマロン 150 mg/日を約 2 週間投与し、血清尿酸値を低下させた。投与前後で採取した PBMC を LPS およびコレステロール結晶で刺激し、培養上清中の IL-1 β や TNF α を測定した。

(結果)

- 高脂肪食摂取下 LDLR^{-/-}マウスにおけるベンズブロマロンおよびアロプリノール投与の動脈硬化病変の進展に対する影響
LDLR^{-/-}マウスにアロプリノール、ベンズブロマロンを投与した群では大動脈洞における粥状動脈硬化病変の進展はコントロールと比較し有意に抑制された。大動脈についても粥状動脈硬化部位の占める割合は小さい傾向にあり、特にアロプリノール投与群では有意に抑制された。
- ウリカーゼトランスジェニックマウスにおける動脈硬化病変の進展
大動脈洞において、ApoE^{-/-}intUOX^{Tg} マウス、ApoE^{-/-}ssUOX^{Tg} マウス、LDLR^{-/-}ssUOX^{Tg} マウスでは ApoE^{-/-}マウス、LDLR^{-/-}マウスと比較し有意に粥状動脈硬化病変の進展が抑制された。また大動脈についても LDLR^{-/-}ssUOX^{Tg} マウスにおいて粥状動脈硬化病変の占める割合が有意に抑制された。
- ウリカーゼトランスジェニックマウスにおける腹腔内への炎症細胞浸潤

ssUOX^{Tg} マウス、intUOX^{Tg} マウスともにコントロールと比較し、腹腔内への好中球の浸潤が抑制された。ウリカーゼトランスジェニックマウスでは、コレステロール結晶によって誘導される急性炎症が抑制されることが判った。

4. 結晶化していない尿酸のヒト PBMC からの IL-1 β 分泌への影響

尿酸濃度 0、1.75、3.5、7.0 mg/dl 下で培養したヒト PBMC を LPS 300 pg/ml およびコレステロール結晶 100 μ g/ml で刺激したところ、尿酸 3.5 mg/dl 以上で有意に IL-1 β 分泌の亢進がみられた。またウリカーゼを添加し尿酸濃度を低下させると、IL-1 β 分泌の亢進は抑制された。

5. 尿酸の IL-1 β 分泌における signal 1 経路への影響

IL-1 β の分泌には NF- κ B の活性化を介し pro-IL-1 β を産生する signal 1 の経路と、NLRP3 インフラマソームの活性化により pro-IL-1 β を IL-1 β にプロセッシングする signal 2 の経路の 2 つが必要である。

Signal 1 への尿酸の影響を検討するため、ヒト PBMC を UA 0、4 mg/dl 培養下に LPS で刺激したが、尿酸濃度によって pro-IL-1 β の産生に差は見られなかった。

6. 尿酸の IL-1 β 分泌における signal 2 経路への影響

NLRP3 の発現が NF- κ B によって制御されているため、signal 2 は signal 1 に依存性である。Signal 2 の経路のみを検討するため、HEK293T 細胞に、NLRP3 を恒常的に発現させ、また ASC に蛍光蛋白 cerulean を融合させた遺伝子を導入し NLRP3 インフラマソーム形成を可視化した、インフラマソーム活性化レポーター細胞を作製した。

この細胞を UA 0、4 mg/dl で培養し、nigercin 刺激で NLRP3 インフラマソームを活性化させると、UA 4 mg/dl において NLRP3 インフラマソームの形成が亢進することが判った。

7. 尿酸の HEK293T 細胞における活性酸素(ROS)産生への影響および ROS の NLRP3 インフラマソーム形成に対する関与

NLRP3 インフラマソームの形成に ROS が関与することが判っている。HEK293T 細胞に対する尿酸の ROS 産生への影響を検討すると、尿酸存在下で ROS 産生が亢進することが判った。またインフラマソーム活性化レポーター細胞に N-acetyl cysteine を加えると、尿酸によって亢進した NLRP3 インフラマソームの形成が抑制された。

8. 尿酸のヒト PBMC に対する ROS 産生への影響

ヒト PBMC における ROS 産生を検討したところ、培地に尿酸を添加するのみでは ROS の産生に影響は見られなかったが、LPS 刺激を加えると、UA 4 mg/dl において ROS 産生が亢進した。

N-acetyl cysteine を加えると、PBMC からの IL-1 β 分泌が尿酸濃度に関わらず著明に抑制されたため、PBMC における IL-1 β 分泌に対する尿酸の作用が ROS の産生に由来するかは判断できなかった。

9. ベンズブロマロン投与によるヒト PBMC の炎症性サイトカイン分泌への影響

既往症のない健康な成人 8 名にベンズブロマロン 150 mg/日を約 2 週間内服させ、その後で採取した PBMC の LPS およびコレステロール結晶刺激に対する反応性の違いを検討した。

血漿尿酸値は有意な低下が見られ、ベンズブロマロン投与後の PBMC より分泌される IL-1 β 、TNF α は有意に低下した。

(考察)

本研究はマウスにおいて尿酸が動脈硬化病変の形成において重要な役割を果たしている可能性が高いことを示した。また尿酸が生体内において **danger signal** としてコレステロール結晶による炎症に関与し、尿酸濃度の上昇が炎症細胞からの IL-1 β 分泌を亢進させ、炎症を誘導することを示唆する結果が得られた。さらにヒトを対象とした *ex vivo* の実験において、ベンズブロマロンの個体への投与が PBMC からの炎症性サイトカインの分泌を抑制することも明らかにした。これらの結果が尿酸による作用であると判断するには、未だ多数の検討すべき課題が残っている。しかし、血清尿酸値を下げることで動脈硬化症の残余リスクに対する有効な治療法となる可能性を示唆するものであり、今後尿酸降下薬を用いた大規模臨床試験による動脈硬化進展の予防効果に関する検討が必要である。