

## 審査の結果の要旨

氏名 木村 佳貴

本研究は高尿酸血症が動脈硬化症の病態に直接関与するかを明らかにするため、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ける動脈硬化病変の進展に与える尿酸の影響について検討したものである。また尿酸と動脈硬化の進展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* の実験を行い、尿酸の炎症への影響を検討し、またヒトにおいて尿酸降下療法の PBMC からの炎症性サイトカイン分泌への影響を検討したものである。下記の結果を得ている。

1. 高脂肪食摂取下の LDLR<sup>-/-</sup>マウスに対し、尿酸トランスポーターURAT1 阻害薬であるベンズブロマロンおよびキサンチンオキシダーゼ阻害薬であるアロプリノールを投与することで、大動脈洞での粥状動脈硬化病変の進展が有意に抑制されることが示された。
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<sup>Tg</sup> マウス、細胞内のウリカーゼ発現により細胞内の尿酸を減少させる intUOX<sup>Tg</sup> 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、これらと動脈硬化モデルマウス(ApoE<sup>-/-</sup>マウス, LDLR<sup>-/-</sup>マウス)を交配させたマウスにおいて粥状動脈硬化病変の進展が検討された。大動脈洞において、ApoE<sup>-/-</sup>intUOX<sup>Tg</sup> マウス、ApoE<sup>-/-</sup>ssUOX<sup>Tg</sup> マウス、LDLR<sup>-/-</sup>ssUOX<sup>Tg</sup> マウスが ApoE<sup>-/-</sup>マウス、LDLR<sup>-/-</sup>マウスと比較し有意に動脈硬化の進展が抑制された。また大動脈についても LDLR<sup>-/-</sup>ssUOX<sup>Tg</sup> マウスにおいて動脈硬化の占める割合の有意な抑制がみられた。よってウリカーゼトランスジェニックマウスでは動脈硬化の進展が抑制されることが示された。
3. ウリカーゼトランスジェニックマウス(ssUOX<sup>Tg</sup> マウス、intUOX<sup>Tg</sup> マウス)およびコントロール(C57BL/6)にコレステロール結晶を腹腔内投与したところ、ウリカーゼトランスジェニックマウスにおいて、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示された。
4. 異なる尿酸濃度下において培養したヒト PBMC を LPS およびコレステロール結晶で刺激したところ、尿酸濃度の上昇に伴い、IL-1 $\beta$  の分泌が亢進することが示された。ウリカーゼを添加し、尿酸濃度を低下させると、IL-1 $\beta$  の分泌も低下することが示された。
5. ヒト PBMC において LPS 刺激により産生される pro-IL-1 $\beta$  の mRNA, 蛋白量が尿酸濃度に影響されないことが示された。
6. 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。尿酸を添加した環境で培養し、nigercin で NLRP3 インフラマソームを活

性化させると、NLRP3 インフラマソームの形成が亢進することが示され、溶解した尿酸が NLRP3 インフラマソームの活性化を亢進させることが示唆された。

7. HEK293T 細胞に尿酸を添加し培養すると、細胞内の活性酸素(ROS)の産生が亢進することを示した。インフラマソーム活性化レポーター細胞に ROS スカベンジャーである N-acetyl cysteine を加えると、尿酸添加によって亢進した NLRP3 インフラマソームの形成が抑制されることが示され、尿酸が ROS を介して NLRP3 インフラマソームを活性化する可能性が示された。
8. ヒト PBMC において尿酸を添加するだけでは ROS の産生がみられないものの、LPS で刺激を行うと、尿酸を添加し培養した場合に ROS の産生が亢進することが示された。

PBMC からの IL-1 $\beta$  分泌については N-acetyl cysteine の投与により尿酸の添加の有無による分泌量の差は検出されなくなったが、ベースラインの IL- $\beta$  の分泌量も減少し、尿酸が ROS の産生を介して IL-1 $\beta$  の分泌を亢進させたかは判らなかった。

9. 健常成人 8 名にベンズブロマロン 150 mg/日を約 2 週間内服させ、その前後で採取した PBMC の LPS およびコレステロール結晶による炎症性サイトカインの分泌を検討したところ、ベンズブロマロン投与により IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  の分泌が有意に抑制されることが示された。

以上、本論文は尿酸が NLRP3 インフラマソームの活性化による炎症誘導を介し動脈硬化症の病態に関与する可能性を示した。また尿酸降下薬であるベンズブロマロンの投与によりヒト PBMC からの炎症性サイトカインの分泌が抑制されることを示した。これらの結果は高尿酸血症の動脈硬化症の病態における役割を明らかにする上で、重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。