

令和 3 年 8 月 16 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09868

研究課題名(和文) 若年性排泄低下型高尿酸血症の病態解明

研究課題名(英文) Mechanism of genetic hypouricosuric hyperuricemia

研究代表者

櫻井 裕之 (Sakurai, Hiroyuki)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：00508294

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)：腎臓からの排泄が低下することによる高尿酸血症の病態を明らかにするため、遺伝性高尿酸血症患者で、その血縁者とともに、腎臓の尿酸輸送体SLC2A9の遺伝子解析を行った。これまでの研究で、SLC2A9の活性上昇や過剰発現が腎臓での尿酸再吸収を増加させるであろうと予想されるからである。そのような1家系の解析で見いだされた2つの輸送体遺伝子の変異は機能に影響がなく、輸送体発現を制御する領域の変異では、転写活性が上がるものが2つ発見されたが、それらの変異を組み込んだ細胞株で、SLC2A9の発現上昇は見られず、この遺伝子の変異が、輸送体の活性や発現を上げている直接的な証拠は見いだせなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓での尿酸再吸収の調節に最も重要であると考えられる輸送体SLC2A9の機能や発現の上昇が高尿酸血症の大部分を占める排泄低下型の病態を説明できるのではないかと考えて研究を行ったが、この仮説を直接的に支持する結果は得られなかった。さらに症例をふやして解析していく必要はあるものの、今回の研究からは、この輸送体を高尿酸血症の創薬標的にするモチベーションにはつながらなかった。

研究成果の概要(英文)：Several genome wide association studies have suggested that SLC2A9 gene plays an important role in hyperuricemia/gout. Around 80% of patients with hyperuricemia are reported to have decreased urinary excretion of urate. Because SLC2A9 is a urate reabsorptive transporter, we hypothesized that gain-of-function mutation and/or overexpression of SLC2A9 can explain low urinary excretion of urate in such patients. Genome sequence was obtained from a hyperuricemic patient and his father, who is also hyperuricemic, and his mother, who had normal urate levels. The patient had 2 mutations in SLC2A9 and these mutations did not affect urate transport activity. Two rare variants in the enhancer region of SLC2A9, existing both in the patient's and his father's, but not in his mother's genome showed increased promoter activity in luciferase assay. We knocked in these 2 variants into HepG2 cells by CRISPR-Cas9 but the cells failed to show increased expression of SLC2A9.

研究分野：薬理学

キーワード：尿酸 尿酸輸送体 遺伝子変異

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、ゲノムワイド関連解析により、高尿酸血症や痛風に関連する遺伝子が同定された。中でも ABCG2 と SLC2A9 の 2 つの尿酸トランスポーター遺伝子領域の一塩基多型 (SNP) と尿酸値との関連が強いことが報告されている。ABCG2 の主な機能部位は腸管であり、その機能低下は、腎排泄低下型でなく、腎負荷型の高尿酸血症となる。一方 SLC2A9 は尿酸再吸収トランスポーターであるが、尿酸の腎排泄低下を説明できる変異は同定されておらず、臨床で大多数を占める排泄低下型高尿酸血症の原因は未だ解明されていなかった。

### 2. 研究の目的

尿酸排泄低下型高尿酸血症では、尿酸の腎におけるハンドリング、すなわち尿酸トランスポーターの何らかの異常が想定されるので、それを解明することを目指した。

### 3. 研究の方法

候補とする尿酸トランスポーターを絞り込むために、遺伝性の尿酸排泄低下型高尿酸血症の患者家系で尿酸トランスポーター遺伝子とその発現調節領域まで含めて詳細に解析し、トランスポーター自体の機能変異、発現量の異常が説明できる変異がないかを調べた。前半でトランスポーター自体の機能変異は同定できなかったため、後半では調節領域の変異について細胞モデルで遺伝子改変を行い、それにより尿酸トランスポーターの発現量に変化が起こるかを調べた。

### 4. 研究成果

高尿酸血症と慢性腎機能障害の 20 代男性患者とその父、母である。患者は尿酸排泄低下型の高尿酸血症と臨床診断されていた。患者の父と父方の祖父に高尿酸血症と痛風があり、患者の母の尿酸値は正常であった。血清尿酸値と関連するアミノ酸置換をとともなう既知の SNP で、母にはなく父と患者にあるものを調べたら、ABCG2 の Q141K 変異と SLC16A9 の K258T 変異が同定された。いずれも腎負荷型の高尿酸血症と関連する変異であり、この患者の尿酸排泄低下は説明し難い。

そこで、SLC2A9 のアミノ酸置換を伴う SNP について解析したところ、患者と母で P350L が、患者と父 (ホモ) と母 (ヘテロ) で G25R が見つかった。これらの変異 mRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させて、野生型の SLC2A9 と尿酸輸送機能の解析を行ったが、親和性、最高輸送速度とも変化が見られなかった (図 1)。

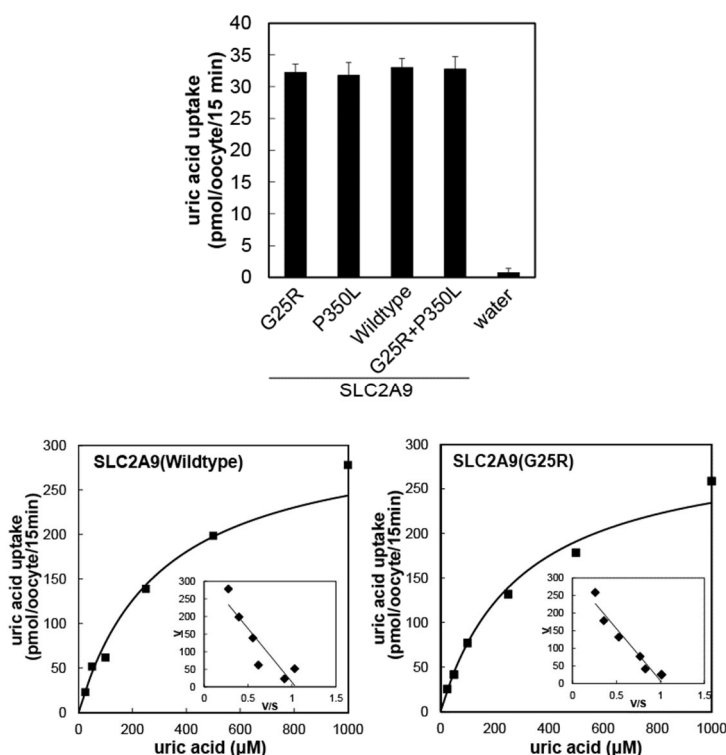
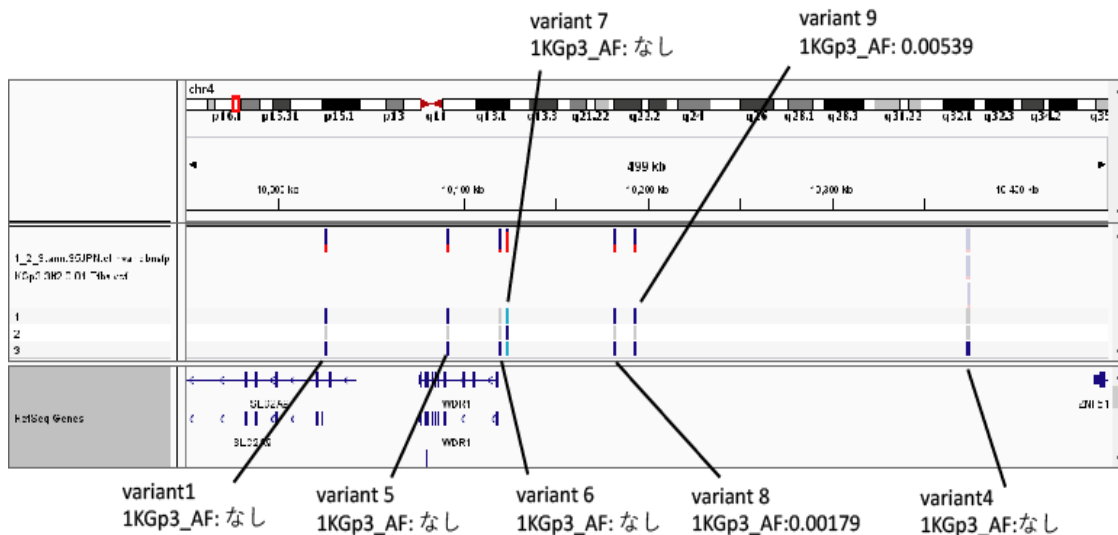


図 1. SLC2A9 の野生型と変異体の尿酸輸送能

SLC2A9 の機能そのものに変異がないとすると、その発現量の変化が、尿酸再吸収の亢進に関わっているのではないかと考えた。つまり、腎排泄低下型高尿酸血症を呈する患者では、腎臓近位尿細管基底側で尿酸の再吸収にかかわる SLC2A9 の発現が亢進している可能性があるのではということである。

そこで、遺伝子発現量を制御するプロモーター領域およびエンハンサー領域での遺伝子解析を行うことにした。同部位で、ともに血清尿酸値の高い父と患者にみられ、母にはみられない変異を、公共ゲノムデータベースと比較し、転写因子結合部位上にある変異のうち、アレル頻度が 0.01 未満のレアバリエーションにしばりこんだところ、エンハンサー領域に 7 か所の変異が見出された (図 2)。



variant1: TTTCTTTT ->TTTTTTTT

variant4:

CAGATGCTCTTGTGCAGATGAGGGAACCTGCCAGGGCCTTGCTGAGCCTGCCACATGCGCACTGGGGGACTGGGGTGGA ->  
CAGGTGCTTTTGTGCAGATGAGGGAACCTGCCAGGGCCTTGCTGAGCATGCCACGTGAACCTGGGGGAATGGGGCAGA

variant5: TCAGGTGCCTGGGGGTCCCAAG -> TCAGGTGCCTGGGGGTCCCAAG

variant6: CAAAGGCGTGGGGAGAGGGGTA -> CAAAGGCGTGGGAGAGAGGGGTA

variant7: TTCCCCTGTCCCATTCTTCTTAACTCCCATA -> TTCCCCTGTCCCATCTTCTTCTTAACTCCCATA

variant8 (rs193219610): TGGTCAGTTATGGTTTCTGGG -> TGGTCAGTTAGGGTTTCTGGG

variant 9: TGACAGGGCCTCTAGGCTACAGT -> TGACAGGGCCTGTAGGCTACAGT

図 2. SLC2A9 の遺伝子発現量を制御することが予測される転写因子結合部位上に存在するレアバリエーションの位置とその配列

これらの変異が SLC2A9 の転写活性に影響を与えるか検討するため、プロモーターの上流に組み込み、Dual-Luciferase レポーターアッセイを行ったところ、2つの変異で Luciferase 活性の上昇が見られた ( 図 3 )

(b)

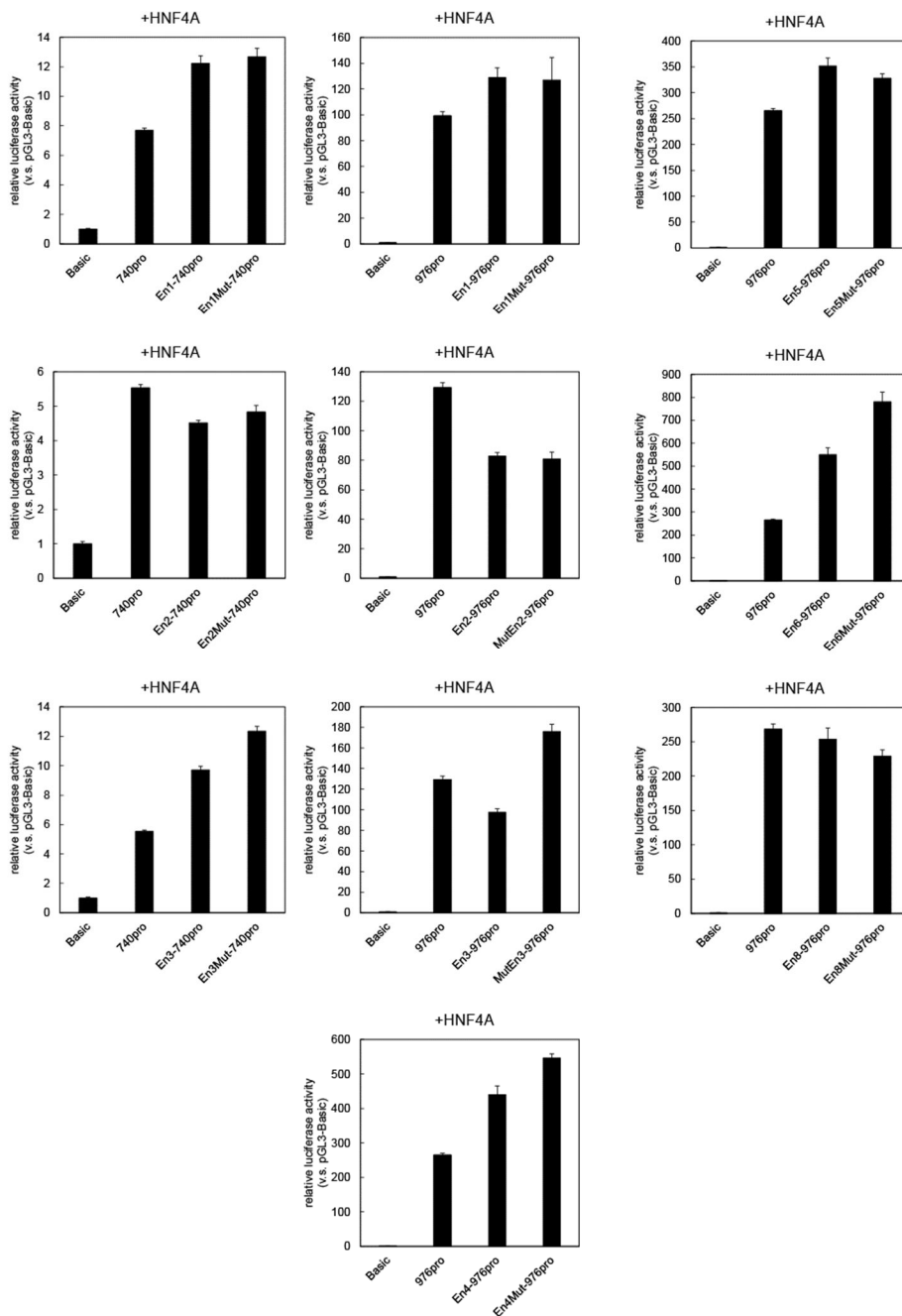


図 3. 変異配列を上流に組み込んだ SLC2A9 のプロモーター活性の測定。SLC2A9 のプロモーター (-976pro もしくは-740pro) の上流に、変異部位を中心に 1000bp 程度の配列(En1-En8)を組み込み、Dual-Luciferase アッセイでプロモーター活性を比較した。SLC2A9 の転写を活性化することが知られている転写因子 HNF4A を co-transfection している。

この二か所の変異が、実際に細胞内で SLC2A9 の転写活性を上昇させるか検討を行うため、CRISPR-Cas9 システムを利用し HepG2 細胞株のゲノムにこれらの変異の導入を試みた。Cas9/sgRNA の複合体と、変異を含む ssDNA のドナーDNA を、エレクトロポレーション法により HepG2 細胞内に導入した。ゲノム編集の効率は T7E1 アッセイにより評価し、25%程度であった。

ゲノムへの組み込みには成功したが、この変異プロモーター領域をもつ HepG2 細胞では、HNF4A のトランスフェクションによつての SLC2A9 の転写活性が、野生型に比較しての上昇は認められず(図4) これらの変異が SLC2A9 の転写活性上昇に関与したとは考えにくいと結論付けられた。他に尿酸排泄低下型で、家族のゲノム採取可能な症例が得られず、残念ながら SLC2A9 の発現調節領域の変異による同蛋白の過剰発現が高尿酸血症の発症の原因であろうとの仮説の検証には至らなかった。

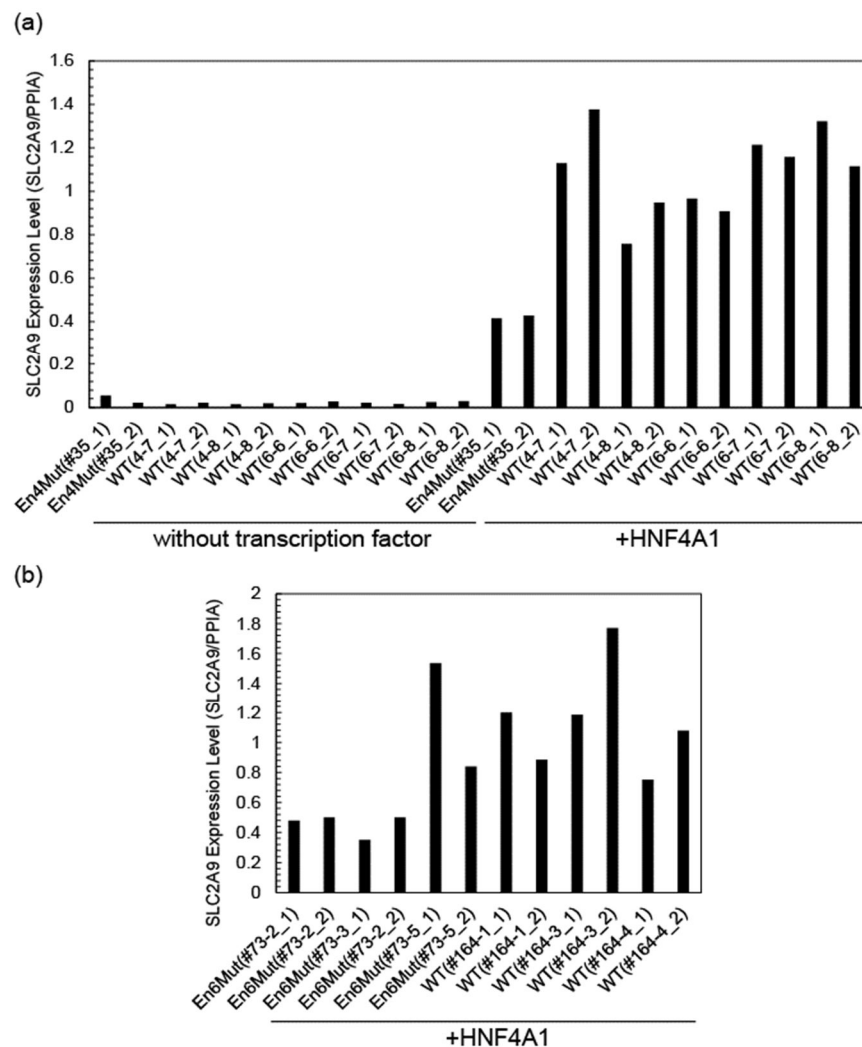


図4. ゲノム編集により HepG2 細胞に変異を導入した細胞クローンと野生型のクローンの SLC2A9 転写量の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------