

機関番号：32610

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890245

研究課題名（和文） ヒト電位依存性有機酸輸送体 OATv1 による尿酸輸送：利尿薬性高尿酸血症発症機序

研究課題名（英文） Urate transport via human voltage-driven organic anion transporter OATv1: Mechanism for diuretics-induced hyperuricemia

研究代表者

JUTABHA Promsuk (JUTABHA PROMSUK)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：90541748

研究成果の概要（和文）：ヒト腎近位尿細管管腔側膜の Na<sup>+</sup>依存性リン酸トランスポーター-NPT が、電位依存性の有機酸排出を担う分子 OATv1 と考えられ、その尿酸排出機能について検討するとともに、ヒト OATv1 を作用点とする利尿薬による高尿酸血症発症機序解明を目指した。

本研究期間中に、NPT は RI 標識 PAH および尿酸を電位依存性に輸送すること、さらに利尿薬による濃度依存性に抑制を見出した。OATv1 を作用点とする尿酸と利尿薬の競合による尿酸分泌低下が、利尿薬性高尿酸血症発症に関与するものと示唆された。

研究成果の概要（英文）： Since sodium-dependent phosphate transporter NPT at the apical membrane of renal proximal tubules in human is considered to be OATv1 which mediates the extrusion of organic anions with voltage-dependent manner, I analyzed its urate-transport properties to clarify the molecular mechanism for diuretics-induced hyperuricemia targeting human OATv1. During this period, I observed voltage-dependent transport of both PAH and urate labeled with radio isotope and concentration-dependent inhibition on OATv1-mediated transport by diuretics. Thus, it is suggested that reduction of urate secretion by the competition between urate and diuretics targeting OATv1 leads to the development of diuretics-induced hyperuricemia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	840,000	252,000	1,092,000
総計	1,890,000	567,000	2,457,000

研究分野：腎生理・薬理学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：トランスポーター、有機酸、電位依存性、尿酸、利尿薬、パラアミノ馬尿酸

## 1. 研究開始当初の背景

利尿薬はうつ血性心不全、腎疾患、肝疾患に伴う浮腫などに対して用いられるが、中でも特にサイアザイド系利尿薬はその Na<sup>+</sup> 排泄作用と関連した血圧降下作用を持つため、むしろ降圧薬として腎不全のない本態性高血圧症で使用される。また最も強力な利尿薬であるループ利尿薬は腎血流量や糸球体濾過値を減少させないため腎障害時にも適し、利尿薬の第一選択薬となっている。

臨床的に極めて使用頻度の高い利用薬であるが、その副作用として、最も多い水・電解質異常に続き、特にサイアザイド系およびループ利尿薬では、「高尿酸血症」を認める。これらの利尿薬投与時、初期には、尿中 Na 排泄が増加し、尿酸の腎よりの排出は促進され尿酸値は低下するとされるが、継続投与後は細胞外液量、腎血流量、糸球体濾過量の減少により、尿酸の再吸収は亢進することに加え、また近位尿細管において、利尿薬

が競合的に排泄低下を起し、尿酸分泌経路を停止させることで血清尿酸値を上昇させると考えられている。

サイアザイド系およびループ利尿薬による血清尿酸値上昇を引き起こす原因となる腎近位尿細管での尿酸分泌経路の分子実体は未だ明らかではない。腎臓での尿酸輸送は両方向性であるとされるが、申請者らはこれまでに尿細管管腔側膜に存在する尿酸取込みトランスポーターのURAT1および血管側の尿酸排出トランスポーターURATv1を続けて固定し、さらにそれらの遺伝子変異が腎性低尿酸血症を来たすことから、尿酸の再吸収は、URAT1-URATv1がタンデムとなって寄与することを明らかにしている。これに対し、尿酸分泌経路については、血管側の有機酸トランスポーターOAT1およびOAT3がその取込みに関与することを *in vitro* で証明したが、尿細管腔に尿酸を排泄する分子実体については未解明のままである。

しかし申請者は2003年に発現クローニング法によりブタ腎近位尿酸管管腔側に存在する電位依存性有機酸トランスポーターのpOATv1を同定し、pOATv1はPAH等の外来性有機酸に加えて尿酸等の内因性有機酸を輸送し、その輸送は利尿薬のfurosemideおよびbumetanideにより強力に抑制されることを示した。続けて申請者は尿酸管管腔側に存在するヒト有機酸トランスポーターOAT4は利尿薬と相互作用を示さないことを見出し、ヒトにおいてもブタOATv1様の機能を持つ分子が管腔側に存在し、尿酸および利尿薬を含む薬物輸送を担うことを想定した。

最近申請者は、アフリカツメガエル卵母細胞での有機酸の輸送特性解析の結果、Na<sup>+</sup>依存性リン酸トランスポーターNPT1がブタOATv1のヒトのホモログである可能性を見出した (*Experimental Biology 2006, San Francisco, USA* にて発表)。そこで、ヒトのOATv1であるNPT1は、腎尿細管管腔側膜での尿酸排出を担うと同時に、サイアザイド系およびループ利尿薬と相互作用することで、薬物誘発性高尿酸血症の原因となる可能性に着目し、本研究課題の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、利尿薬による副作用軽減に向けた新規治療法開発を最終目的とし、その実現に向けた基盤確立のために、(a) ヒト電位依存性有機酸排出トランスポーターOATv1(NPT1)による尿酸排出特性の検討、(b) ヒト電位依存性有機酸排出トランスポーターOATv1と利尿薬の相互作用、(c) ヒト電位依存性有機酸排出トランスポーターOATv1による利尿薬輸送、(d) 管腔側膜のヒト尿酸トランスポーターURAT1と利尿薬の相互作用についての解析を行う事を目的とする。

## 3. 研究の方法

上記の目的のために、まず保有するヒトOATv1 plasmid から T7 promoter を用いた *in vitro* transcription 法により OATv1 cRNA を作成し、マイクロインジェクション法によりアフリカツメガエルから取り出した卵母細胞に注入を行う。注入から2-3日後経過後、OATv1 タンパク質が発現したと思われる時期に、<sup>14</sup>C 尿酸をトレーサーとした取込み実験を行い、その細胞内の蓄積量を液体シンチレーションカウンターにより測定する。この際に、細胞外液中のイオン組成を変換することで、Na<sup>+</sup>依存性、電位依存性、Cl<sup>-</sup>交換輸送特性などや pH 依存性などを検討することで、尿酸取込みの駆動力を明らかにする。

また一部の卵母細胞では cRNA 注入後2-3日経過後に <sup>14</sup>C 尿酸自体を卵母細胞内に注入して、一定時間経過後の細胞外液中の RI 標識尿酸量を同様に測定する。この際、取り込み実験の際と同様に、細胞外液イオン組成の変換等を行い、尿酸排出の駆動力を明らかにする。

上記の実験によりヒト OATv1 による尿酸輸送を確認した後、同様にアフリカツメガエル卵母細胞発現系での RI 標識尿酸をトレーサーとした輸送実験を行う。ここでは、各種利尿薬が OATv1 によって認識されるか否か、すなわち各種利尿薬が NPT1 による尿酸輸送を抑制し、ひいては尿酸の分泌経路を阻害することで高尿酸血症を誘発する可能性があるかどうかを検討するために、各種利尿薬を細胞外液中に付加して、RI 標識尿酸の取り込み量の減少度(抑制率)を調べる。

対象とする利尿薬としては、申請者が2004年の *J Pharmacol Exp Ther* 論文公表に用いた、(1) サイアザイド系利尿薬

(Chlorothiazide, hydrochlorothiazide, cyclothiazide, trichlorothiazide)、(2) ループ利尿薬 (Bumetanide, furosemide, ethacrynic acid)、そして (3) 炭酸脱水素酵素阻害薬 (Acetazolamide, methazolamide) の計9種を用いる。これらの薬物を用いて初めに OATv1 による尿酸輸送に与える抑制効果として IC<sub>50</sub> 値を測定し、強い相互作用(抑制)を認めたものに対しては、さらに阻害定数 (Ki 値) を求め、その阻害様式(競合阻害か否か)などを分析する。

さらに上記の実験で OATv1 と強く相互作用をすることが示された利尿薬について、OATv1 が実際に輸送を行うかどうかを確認する。ここでは、RI 標識体の存在する Bumetanide をループ利尿薬の代表的薬物として実験を進める。さらに NPT1 と強く相互作用をするサイアザイド系利尿薬が見出された際には、同薬物の細胞内取込み量および細胞外排出量を、HPLC を用いた手法により測

定して分析する。非標識サイアザイド系利尿薬を、上述のRI標識 Bumetanide と同様に細胞外液中に付加した後の細胞内移行量を、また卵母細胞内に注入して一定時間経過後の外液中への排出量を HPLC により測定し、ループ利尿薬同様のサイアザイド系利尿薬の輸送(排出)が行われるか否かを解析する。

#### 4. 研究成果

まず機能の確認として、腎特異的有機酸である PAH をトレーサーとした取込み実験を行った結果、OATv1 による PAH 輸送は電位依存性であり、Na<sup>+</sup>依存性および Cl<sup>-</sup>交換輸送特性は認められなかった。また cRNA 注入後 2-3 日経過後の卵母細胞に [<sup>14</sup>C] PAH 自体を注入すると時間依存性に PAH の排出を認めた。

続いて今回のメインである尿酸の RI 標識体をトレーサーとして用いる取込み実験を行った。その結果、PAH と同様に尿酸でも OATv1 による輸送は電位依存性であり、Na<sup>+</sup>依存性および Cl<sup>-</sup>交換輸送特性は認められなかった。また cRNA 注入後 2-3 日経過後の卵母細胞に [<sup>14</sup>C] 尿酸自体を注入すると時間依存性に尿酸の排出を認めた。以上の結果より NPT はヒト電位依存性有機酸(尿酸)トランスporterとして相応しいものと考えられた。

そこで、(1) サイアザイド系利尿薬 (Chlorothiazide, hydrochlorothiazide, cyclothiazide, trichlorothiazide)、(2) ループ利尿薬 (Bumetanide, furosemide, ethacrynic acid)、そして(3)炭酸脱水素酵素阻害薬 (Acetazolamide, methazolamide) の計 9 種を用いて、OATv1 による尿酸輸送に与える抑制効果を調べたところ、サイアザイドおよびループ利尿薬の強力な阻害作用を見出した。

最終的に OATv1 は直接利尿薬の輸送を担うかどうかを検討するため、RI 標識体の存在する Bumetanide をループ利尿薬の代表的薬物として実験を進めたところ、時間依存性および濃度依存性の [<sup>3</sup>H] Bumetanide の取込み量の増加を認め、実際に OATv1 は利尿薬をも輸送する事が明らかになった。

以上の結果から、ヒト OATv1 を作用点とする尿酸と利尿薬の競合による尿酸分泌低下が、利尿薬性高尿酸血症発症に関与する可能性が明らかとなり、2010 年には *J Biol Chem* 誌に成果を公表した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

① Jutabha P, Anzai N, Kimura T, Taniguchi A, Urano W, Yamanaka H, Endou H, Sakurai

H. Functional Analysis of Human Sodium-Phosphate Transporter 4 (NPT4/SLC17A3) Polymorphisms. *J Pharmacol Sci.* 査読有、115 巻、2011、249-253

② Wempe MF, Jutabha P, Quade B, Iwen TJ, Frick MM, Ross IR, Rice PJ, Anzai N, Endou H. Developing Potent Human Uric Acid Transporter 1 (hURAT1) Inhibitors. *J Med Chem.* 査読有、54 巻、2011、2701-2713

③ Miura D, Anzai N, Jutabha P, Chanluang S, He X, Fukutomi T, Endou H. Human urate transporter 1 (hURAT1) mediates the transport of orotate. *J Physiol Sci.* 査読有、61 巻、2011、253-257

④ Jutabha P, Anzai N, Kitamura K, Taniguchi A, Kaneko S, Yan K, Yamada H, Shimada H, Kimura T, Katada T, Fukutomi T, Tomita K, Urano W, Yamanaka H, Seki G, Fujita T, Moriyama Y, Yamada A, Uchida S, Wempe MF, Endou H, Sakurai H. Human sodium-phosphate transporter 4 (hNPT4/SLC17A3) as a common renal secretory pathway for drugs and urate. *J Biol Chem.* 査読有、285 巻、2010、35123-35132, 2010

⑤ Nakamura M, Anzai N, Jutabha P, Sato H, Sakurai H, Ichida K. Concentration-dependent inhibitory effect of irbesartan on renal uric acid transporters. *J Pharmacol Sci.* 査読有、114 巻、2010、115-118

⑥ Shiraya K, Hirata T, Hatano R, Nagamori S, Wiriyasermkul P, Jutabha P, Matsubara M, Muto S, Tanaka H, Asano S, Anzai N, Endou H, Yamada A, Sakurai H, Kanai Y. A novel transporter of SLC22 family specifically transports prostaglandins and co-localizes with 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in renal proximal tubules. *J Biol Chem.* 査読有、285 巻、2010、22141-51

⑦ Anzai N, Jutabha P, Endou H. Renal solute transporters and their relevance to serum urate disorder. *Curr Hypertens Rev.* 査読有、6 巻、2010、148-154

⑧ Anzai N, Jutabha P, Endou H. Molecular mechanism of ochratoxin A transport in the kidney. *Toxin.* 査読有、2 巻、2010、1381-1398

⑨ Tsuchida H, Anzai N, Shin HJ, Wempe MF, Jutabha P, Enomoto A, Cha SH, Satoh T, Sakurai H, Endou H. Identification of a novel organic anion transporter mediating carnitine transport in mouse liver and kidney. *Cell Physiol Biochem.* 査読有、25 巻、2010、511-522

⑩ Jutabha P, Wempe MF, Anzai N, Otomo J,

Kadota T, Endou H. *Xenopus laevis* oocytes expressing human P-glycoprotein: probing trans- and cis-inhibitory effects on [3H]vinblastine and [3H]digoxin efflux. *Pharmacol Res.* 査読有、61 巻, 2010, 76-84

〔学会発表〕(計 37 件)

- ① Promsuk Jutabha : Mutations in renal drug efflux transporter hOATv1 cause hyperuricemia, 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology、京都、平成 22 年 3 月 28 日
- ② Promsuk Jutabha : Apical voltage-driven urate efflux transporter NPT4 in renal proximal tubule. Session 8 Transport of Purine and Pyrimidine. 14<sup>th</sup> International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man, PP11、新宿、平成 23 年 2 月 20 日
- ③ Promsuk Jutabha : A novel human urate/anion exchanger URAT2 identified as a novel target of uricosuric agents, 20<sup>th</sup> Japan-Korea Joint Seminar on Pharmacology、鹿児島、平成 22 年 11 月 26 日
- ④ Promsuk Jutabha : 新規ヒト電位依存性有機酸トランスポーターhOATv1 の分子同定: ループ利尿薬排出経路の解明、トランスポーター研究会第 3 回九州部会、鹿児島、平成 21 年 11 月 21 日
- ⑤ Promsuk Jutabha: Molecular identification of a novel human voltage-driven organic anion transporter hOATv1: a luminal exit path of loop diuretics. American Society of Nephrology Renal Week 2009, San Diego, 平成 21 年 10 月 29 日
- ⑥ Promsuk Jutabha : A novel human urate/anion exchanger URAT2 identified as a novel target of uricosuric agents、第 123 回日本薬理学会関東部会、宇都宮、平成 22 年 10 月 23 日
- ⑦ Promsuk Jutabha: アフリカツメガエル卵母細胞における新規ヒト尿酸排出トランスポーターURATv1 の電位依存性尿酸輸送特性の解析、第 82 回日本生化学会大会合同大会、神戸、平成 21 年 10 月 22 日
- ⑧ Promsuk Jutabha : Molecular identification of a novel human voltage-driven organic anion transporter hOATv1: a luminal exit path of loop diuretics、第 15 回分子腎臓研究会、京都、平成 21 年 9 月 5 日
- ⑨ Promsuk JUTABHA : The voltage-driven organic anion transport of type I sodium-phosphate cotransporter and OATv1、36<sup>th</sup> International Congress of

Physiological Sciences、京都、平成 21 年 7 月 29 日

⑩ Promsuk Jutabha : Neutral amino acid uptake in epithelial cells and its diseases: novel amino acid transporter SLC6 family、第 4 回トランスポーター研究会年会 シンポジウム II、文京区、平成 21 年 5 月 24 日

⑪ Promsuk Jutabha : Mutations in renal drug efflux transporter hOATv1 cause hyperuricemia, Experimental Biology 2010、Anaheim、平成 22 年 4 月 25 日

〔図書〕(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

JUTABHA Promsuk (JUTABHA PROMSUK)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号 : 9 0 5 4 1 7 4 8