

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19372

研究課題名（和文）CKD予防・治療手法の提唱を目指した尿毒症物質の腎毒性トリガータンパク質の同定

研究課題名（英文）Identification of nephrotoxic trigger proteins of uremic toxins for advocacy of CKD prevention and treatment methods

研究代表者

荒川 大（Arakawa, Hiroshi）

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：40709028

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：尿毒症物質である尿酸の結合タンパク質の探索を行った結果、NAD+分解酵素CD38と結合することを明らかとし、尿酸はCD38の阻害を介してマクロファージにおける免疫炎症反応を調節する働きがあることを見出した。また有機アニオントランスポーターNPT4ノックアウトマウスを用いたメタボローム解析の結果、NPT4がインドキシル硫酸を生理的な基質とし、NPT4の機能低下はインドキシル硫酸の血中濃度上昇を引き起こすことを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿酸の生理的意義は抗酸化作用以外不明であったが、本研究により尿酸はNAD+の細胞内濃度の調節に関与し、急性炎症反応を抑制する働きがあることが示された。またインドキシル硫酸の尿中排泄に関わる輸送機構を明らかとしたことで、尿毒症物質の体内蓄積を低下させる治療・予防手法へ発展させられる可能性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：This study searched for binding proteins of uric acid, a uremic substance, and found that it binds to an NAD⁺-degrading enzyme CD38, indicating that uric acid modulates the immune-inflammatory response through inhibition of CD38 in macrophages. This study also found that NPT4, an organic anion transporter, transports indoxyl sulfate as a physiological substrate, and that a decrease in NPT4 function causes an increase in the blood concentration of indoxyl sulfate.

研究分野：薬物動態学

キーワード：腎臓 トランスポーター 尿毒症物質 尿中排泄 炎症 CD38 NPT4

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD)は高齢者で多くみられる慢性的な腎機能の低下病態であり、近年では世界人口の **10 %**以上が **CKD** に罹患していると推定されている。**CKD** では腎機能低下のみならず、血中の老廃物蓄積により脳血管障害などの発症リスクが増大する。このため人工透析と併発疾患の治療が必要となり、厚生労働省の調査では本邦で毎年 **1.6** 兆円程度の医療費がかかっていると推定されている。本邦のみならず世界的な高齢化を迎えた人類において、**CKD** の予防・治療手法の構築は喫緊の課題である。しかし、現在 **CKD** に対しては **SLGT2** 阻害薬やアンギオテンシン受容体阻害薬の投与により腎機能の低下速度を緩和する療法のみが臨床適応されており、腎臓病進行を抑制あるいは腎機能を回復させる有効な予防・治療法は存在しない。

CKD の発症に関わる要因として糖尿病や薬剤性腎症などがあるが、腎臓病の増悪要因として腎機能低下に伴い増加したインドキシル硫酸などの尿毒症物質が挙げられる。これら物質は近位尿細管上皮細胞や血管内皮細胞へ蓄積し、細胞毒性作用を示す。特に、インドキシル硫酸などの有機アニオン性尿毒症物質は血中でタンパク質と強固に結合し、人工透析による除去が難しく、その除去は臨床的な課題となっている。一方、これまでの尿毒症物質の毒性発現機序は、酸化ストレスやそれに伴う炎症反応など表面的な言及にとどまり、その分子機序の詳細は明らかとされていない。このため、尿毒症物質の毒性発現に関わる分子の同定は、**CKD** およびその併発疾患治療において重要な情報となると考えられる。本研究では、尿毒症物質が腎毒性を示すに至る過程において、尿毒症物質が直接反応しトリガーとなるタンパク質が介在するという「トリガータンパク質仮説」を立て、その同定が **CKD** 対策に有用であると考えた。

また尿毒症物質の毒性メカニズムの解明において、尿毒症物質の細胞動態に関わる輸送タンパク質の同定は重要と考えられる。これまで主要な尿毒症物質であるインドキシル硫酸の近位尿細管上皮細胞への血液側取り込みは有機アニオントランスポーター **OAT1** が関わることが知られている。一方、近位尿細管上皮細胞から尿中への排泄メカニズムは明らかとされていなかった。一方、同様に低分子有機アニオン性尿毒症物質である尿酸は、尿中からの再吸収に尿酸再吸収トランスポーター **URAT1** および **GLUT9** が関わるが、分泌も受けることが知られ、そのメカニズムとして血液側から細胞内へは **OAT1** を介し、さらに細胞から尿中への排出には **NPT4 (SLC17A3)** が関わることを示唆されている。**NPT4** は有機アニオン性化合物であるブメタニドやパラアミノ馬尿酸などを輸送することから、インドキシル硫酸などの有機アニオン性尿毒症物質を輸送することが想定された。

2. 研究の目的

尿毒症物質のうちインドキシル硫酸および尿酸に着目し、その毒性発現機序や細胞内蓄積に関するメカニズム解明を目的とした (図1)。

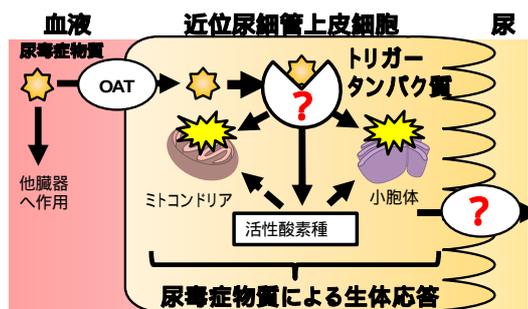


図1 研究目的

3. 研究の方法

(1) 尿酸の結合タンパク質の探索

尿酸のアミン誘導体 **8-オキソグアニン**を用い、尿酸結合磁気ビーズを合成した。合成した磁気ビーズを大腸がん由来 **Caco-2** 細胞のホモジネート溶液とインキュベーションした。所定時間後、磁気ビーズを回収し、結合したタンパク質を質量分析装置を用いて探索した。抽出されたタンパク質は *in vitro* 合成し、尿酸結合ビーズとの結合試験を行った。タンパク質の結合は特異的抗体を用いた **western blotting** により評価した。

(2) インドキシル硫酸の尿中排泄トランスポーターの同定

有機アニオン輸送体 **NPT4** の全身ノックアウトマウスを **CRISPR/Cas9** システムにより作成した。野生型および **NPT4** ノックアウトマウスを同じケージで **2** 週間飼育後、血液および膀胱尿を取得した。得られた血漿および尿サンプルを用い、メタボローム解析を実施した。**NPT4** を介した輸送活性は、**NPT4** を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を用いた取り込み試験により評価した。取り込まれた化合物は四重極型質量分析装置を用いて定量した。

4. 研究成果

(1) 尿酸の結合タンパク質の探索

Caco-2 細胞ホモジネートと尿酸との結合試験を行ったところ、ニコチンアミドジヌクレオチド (**NAD+**) 分解酵素 **CD38** が抽出された。**CD38** と尿酸結合ビーズを用いて結合試験を行い、磁気ビーズに結合したタンパク質を **SDS** ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、**CD38** の特異的

抗体を用いて **western blotting** を行った。その結果、尿酸結合ビーズのサンプルでのみ **CD38** のバンドが確認され、対象群であるブランクビーズでは確認されなかった。このため、**CD38** は尿酸と結合することが示された¹⁾。**CD38** はマクロファージなどに発現し **NAD⁺** 分解酵素活性を有する。そこでマウス骨髄から分化させて得たマクロファージに尿酸を曝露し、細胞内 **NAD⁺** 濃度を測定した。その結果、尿酸の曝露により細胞内 **NAD⁺** 濃度が上昇することが示された。さらに **CD38** に対する尿酸の阻害は可逆的な非競合阻害であること、またその親和性は 60 μM 程度と見積もられた。尿酸の生理的な血漿中濃度は 300 μM 程度であることを考慮すると、尿酸は **CD38** の生理的な阻害剤であることが示された。以前の著者らのグループの研究で、尿酸塩結晶はマクロファージにおける **CD38** のタンパク質発現量を誘導することで細胞内 **NAD⁺** 量の低下を引き起こし、炎症性サイトカイン **IL-1** 分泌を促進することを見出した²⁾。そこで溶液状態の尿酸をマクロファージに曝露し、尿酸結石により誘発した **IL-1** 分泌への影響を調べた。その結果、溶液状態の尿酸は **IL-1** 分泌を抑制することが明らかとなった。この現象は **CD38** ノックアウトマウス由来のマクロファージでは観察されず、**CD38** を介していることが裏付けられた。以上から、溶液状態の尿酸は **CD38** の阻害を介して急激な炎症惹起を抑制する作用があることが示唆された。

(2) インドキシル硫酸の尿中排泄メカニズムの同定

インドキシル硫酸と同様に有機アニオン系尿毒症物質である尿酸の尿中排泄には、有機アニオントランスポーター **NPT4** が関わるのが広域ゲノム解析により示されていた。**NPT4** はブメタニドなど有機アニオン系化合物を輸送することから、有機アニオン系の尿毒症物質を輸送することが想定された。

そこで **NPT4** のノックアウトマウスを作成し、血液および尿サンプルのメタボローム解析を行った。その結果、尿酸に加えインドキシル硫酸の血中濃度が野生型と比較し **NPT4** ノックアウトマウスで上昇した。さらに、尿中濃度を血液中濃度で除することで尿中排泄活性を評価したところ、インドキシル硫酸の尿中排泄活性が **NPT4** ノックアウトマウスで低下した(図2)。このため **NPT4** ノックアウトマウスでは尿中排泄の低下により、インドキシル硫酸の血中濃度が上昇していると想定された。そこで、**NPT4** によるインドキシル硫酸の基質認識を裏付けるため **NPT4** 発現アフリカツメガエル卵母細胞を用いた取り込み試験をおこなった。その結果、**NPT4** 発現系へのインドキシル硫酸の取り込みは対象群である水注入卵母細胞と比較し有意に高く、インドキシルは **NPT4** の基質であることが明らかとなった(図3)。過去に **NPT4** の遺伝子変異は脳卒中のリスク遺伝子として報告されており、**NPT4** の機能低下に伴い上昇した血中インドキシル硫酸が血管内皮細胞に作用し、脳卒中を引き起こしている可能性が示された。以上より、**NPT4** はインドキシル硫酸を基質とし近位尿細管上皮細胞から尿中への排泄を担うことで、その血中濃度を調節していることが示された。今後、**NPT4** の機能を向上させる手法を開発することにより、血中のインドキシル硫酸を減少させることが期待される。

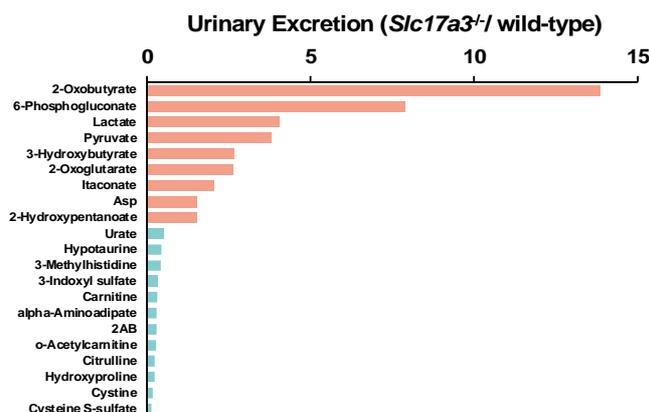


図2 Npt4ノックアウトマウス (*slc17a3^{-/-}*)を及び野生型マウスにおける生体内化合物の尿中排泄活性の比較

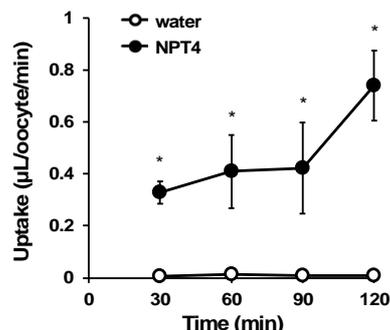


図3 NPT4発現系を用いたインドキシル硫酸の取り込み活性評価

引用文献

- 1) Wen S, Arakawa H, Yokoyama S, Shirasaka Y, Higashida H, Tamai I. Functional identification of soluble uric acid as an endogenous inhibitor of CD38. *eLife*, in press.
- 2) Wen S, Arakawa H, Tamai I. CD38 activation by monosodium urate crystals contributes to inflammatory responses in human and murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021,581:6-11.
- 3) Imamura R, Sugimoto M, Horike SI, Terakawa J, Fujita K, Tamai I, Daikoku T, Kato Y, Arakawa H. Role of organic anion transporter NPT4 in renal handling of uremic toxin 3-indoxyl sulfate. *J Pharm Sci*, in press.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 荒川大	4. 巻 55
2. 論文標題 尿酸の炎症反応を介した慢性腎臓病進展メカニズムと腎臓病態評価モデルの構築	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 43-46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imamura Rikako, Sugimoto Masahiro, Horike Shin-ichi, Terakawa Jumpei, Fujita Kazuki, Tamai Ikumi, Daikoku Takiko, Kato Yukio, Arakawa Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Role of Organic Anion Transporter NPT4 in Renal Handling of Uremic Toxin 3-indoxyl Sulfate	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xphs.2024.04.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shijie Wen, Hiroshi Arakawa, Shigeru Yokoyama, Yoshiyuki Shirasaka, Haruhiro Higashida, Ikumi Tamai	4. 巻 -
2. 論文標題 Functional identification of soluble uric acid as an endogenous inhibitor of CD38	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.96962.1.sa3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Rikako Imamura, Yumi Aizawa, Kazuki Fujita, Ikumi Tamai, Masahiro Sugimoto, Yukio Kato, Hiroshi Arakawa
2. 発表標題 Functional analysis of the organic anion transporter NPT4 by metabolomics approach
3. 学会等名 2023 International Joint Meeting of 23rd ICCP450/38th JSSX（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔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
研究 分担 者	藤田 光 (Fujita Hikaru) (40782850)	金沢大学・薬学系・助教 (13301)	

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
---------	---------