

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890073

研究課題名(和文)インスリン抵抗性獲得における尿酸の寄与とその分子機序解明

研究課題名(英文)Exploration of association mechanism between hyperuricemia and insulin resistance

研究代表者

小森 久和 (Komori, Hisakazu)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：00634180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では腎近位尿細管での尿酸再吸収モデルURAT1/GLUT9共発現MDCK2細胞を用いて、インスリンが尿酸の再吸収に及ぼす影響を検討した結果、インスリンによる解糖系の亢進に依存して尿酸再吸収を促進することが示された。URAT1の尿酸輸送の交換基質であるlactateが解糖系による増大することが考えられることから、URAT1単発現HEK293細胞を用いた検討を行った結果、同様に解糖系の亢進が尿酸の細胞内取り込みに寄与することが示された。

研究成果の概要(英文)：To determine the effect of insulin on urate reabsorption, renal reabsorption model MDCK2 cells, which co-express URAT1 and GLUT9 at apical and basolateral side of the cells, were treated with insulin in the presence or absence of glycolysis inhibitor. It was suggested that urate permeability was increased by insulin-induced glycolysis. Since URAT1 takes up urate into cells by exchanging transport with lactate, elevated lactate in consequence of glycolysis might be facilitated urate reabsorption. So, we performed urate uptake test by using URAT1-expressed HEK293 cell. Insulin significantly increase urate uptake. These data shows that insulin enhanced transcellular transport of urate, depending on glucose metabolism.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：尿酸輸送体 尿酸 インスリン 解糖系

1. 研究開始当初の背景

食生活やライフスタイルの変化に伴い、生活習慣病患者は年々増加しており、メタボリックシンドロームに起因する心疾患・脳卒中は死因の1/4以上に上る。中でも高血糖は高血圧及び脂質代謝異常をさらに増悪させるため、医療経済学的・予防医学的側面からもその対策が急務である。一方、高尿酸血症はこれら慢性疾患の原因あるいは危険因子とされ、尿酸値コントロールの必要性が推奨されている。しかし、未だ高尿酸血症とこれら疾患との関係については不明確な点が多く、予防的観点からその関係を機構論的に明確にする必要がある。

メタボリックシンドロームによって引き起こされる糖尿病の発症は高尿酸血症と高く相関する。すなわち、糖尿病患者には血清尿酸値が高い場合が多く、高尿酸血症の人は糖尿病や耐糖能障害を合併しやすい。これには、尿酸が骨格筋において血流を阻害することや、脂肪細胞においてアディポネクチンの産生を抑制することで、インスリン抵抗性を引き起こすという説がある (Johnson *et al.*, *Endocrine Review*, 2009)。グルコース輸送体の中でも、インスリン感受性で糖代謝が行われる脂肪組織と骨格筋に発現するのが GLUT4 であり、血糖値調節に深く関わる。正常時には、インスリンがその受容体に結合すると PI3K/Akt 経路が活性化され、GLUT4 は細胞質から細胞膜へ移行し、グルコースを細胞内へ取り込む。インスリン抵抗性時には、インスリン刺激下においても PI3K/Akt 経路が活性化されず、GLUT4 が膜上へ移行できないことで高血糖状態となる。しかしながら、尿酸が PI3K/Akt 経路に及ぼす影響は研究開始当初は明らかにされていなかったが、後にインスリン誘導性の Akt のリン酸が尿酸に起因する酸化ストレスによって阻害されることが示された (Zhu *et al.*, *BBRC*, 2014)。

また、血清尿酸値は糖尿病の進行段階によって上下する。実際、インスリン抵抗性が生じると上昇し、さらに尿糖の出現段階では減少することから、インスリン抵抗性時の血清尿酸値の上昇は腎臓における尿酸排泄量の低下に起因すると考えられる。そこで、尿酸排泄量の調節に大きく関与する尿酸再吸収過程の変動が起きていると仮説を立てた。

2. 研究の目的

インスリン抵抗性と高尿酸血症が相互に病態の進展を引き起こす機序を明らかにする。インスリン抵抗性を示すのは骨格筋や脂肪細胞であるため、腎臓などのその他の臓器に対してはインスリンの作用が亢進する。そこで、本検討ではインスリン抵抗性によって高尿酸血症が誘導される機序について尿酸再吸収過程に及ぼす影響を評価する。

尿酸の再吸収には近位尿細管に発現する複数のトランスポーター(輸送体)が関与し、我々はその中でも尿細管管腔側 (apical 側) に発現する URAT1 と血管側 (basolateral 側) に発現する GLUT9 の介在が不可欠であることを報告した。そこで、我々の樹立した URAT1/GLUT9 共発現細胞及び URAT1 単発現細胞を用いてインスリンの影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 尿酸透過試験

URAT1/GLUT9 共発現させたイヌ腎臓由来細胞株 MDCK2 を Transwell に播種して 5 日間培養後、insulin を含む D-PBS で 30 分間インキュベートした後、apical 側を ^{14}C -urate を含む D-PBS に置換して 60 分間インキュベートした。試験開始直後の apical 側及び経時的に basal 側の溶液を回収し、透過量を測定した。

(2) 尿酸取り込み試験

ヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293 を plate に播種して 24 時間培養後、URAT1/pcDNA3.1(+) をトランスフェクションした。さらに 48 時間培養後、insulin を含む D-PBS で 30 分間インキュベートした後、 ^{14}C -urate を含む D-PBS に置換して 60 分間インキュベートし、細胞内に蓄積した ^{14}C -urate の放射活性から取り込み量を評価した。

(3) データ解析

見かけの尿酸透過性 (cm/sec) は単位時間あたりの尿酸透過量 (pmol/sec) を transwell の表面積 (cm²) 及び初期濃度 (μmol/sec) で除して算出した。

取り込み活性は細胞内 ^{14}C -urate 量 (dpm/μL cell lysate) を初期濃度 Co (dpm/μL) 及び細胞溶解液タンパク質量 (mg protein/μL cell lysate) で除して算出した。

有意差検定は Student's t-test を用いて行い、 $p < 0.05$ で統計的に有意な差があると判断した。

4. 研究成果

糖代謝異常時の尿細管再吸収に及ぼす影響を評価するために、URAT1/GLUT9 共発現細胞における尿酸透過性に対して insulin が与える影響を検討した。30 分間の preincubation 及び試験中の insulin 処理濃度に依存して尿酸透過性は有意に増大し、0.1 nM をピークに減少傾向に転じた。insulin 抵抗性時には insulin 濃度は 0.1 nM 以上に達することから、insulin によって尿酸の再吸収が増大する可能性が示された。

続いて、insulin による尿酸透過性促進効果が糖代謝の異常に起因するかどうかを検証するため、glucose を除いた条件下での尿酸透過性を評価した。その結果、insulin 処

理によって誘導された透過性の増大は glucose 非存在下で減少した(Figure 1A) . よって, insulin による尿酸透過の亢進は glucose の供給なしでは引き起こされないことが示唆された . それでは, glucose が尿酸輸送体に対して直接影響を及ぼすか検討したところ, 尿酸透過性は各 glucose 濃度で大きな変化が見られなかったことから (Figure 1B), insulin による尿酸透過性の増大は糖代謝の亢進に起因して生じることが示唆された .

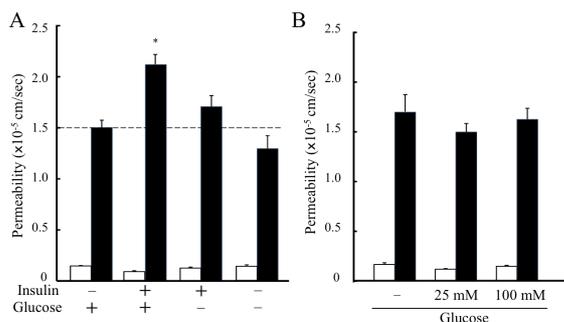


Figure 1. Effect of glycolysis on transcellular transport of ¹⁴C]urate in U/Uv Cells. U/Uv cells (closed column) and Mock cells (opened column) were pretreated with 0.1 nM insulin for 30 min in the presence or absence of 25 mM glucose (A) or each indicated concentration of glucose (B), subsequently treated with 5 μM [¹⁴C]urate for 60 min. Each point represent the mean ± S.E.M (n=3). (*)Statistically significant increase compared with untreated sample (P<0.05).

URAT1はlactateを交換基質として細胞内に尿酸を輸送することが知られていることから(Enomoto *et al.*, *Nature*, 2002), 糖代謝によって産生される lactate が URAT1 の輸送活性を亢進していると考えた . そこで, insulin が URAT1 の尿酸取り込み活性に及ぼす影響を検討することを企図した . ヒト由来腎臓細胞株において URAT1 のみを発現する細胞を探索したところ, URAT1 を発現する細胞株が見つからなかったことから, URAT1 及び GLUT9 の発現が観察され, かつ insulin 受容体を発現する HEK293 細胞に URAT1 を強制発現させ, URAT1 の取り込み活性を評価することとした (Figure 2) .

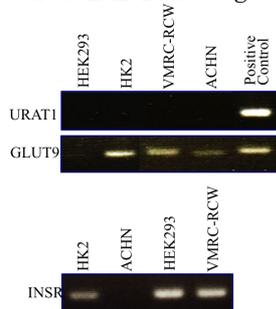


Figure 2. Expression of URAT1, GLUT9

and insulin receptor (INSR). mRNAs was confirmed in various human kidney cell lines. Plasmid DNA of URAT1 or GLUT9 was used as positive control.

URAT1 強制発現 HEK293 細胞において, insulin による尿酸の取り込みは共発現細胞と同様に有意に増大し, glucose 非存在下で減少した . さらに, 解糖系阻害剤 2-deoxy glucose を存在下でインスリンによって増大した尿酸取り込みはさらに減少した(Figure 3) . これらの結果から, インスリンによる解糖系の亢進によって URAT1 の取り込み活性が増大することが示唆された .

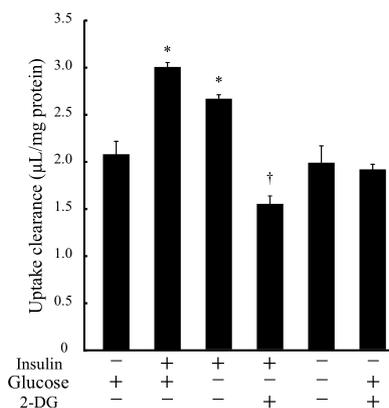


Figure 3. Effect of Insulin on Uptake of ¹⁴C-Urate in URAT1-expressed HEK293 cells. URAT1-expressed HEK293 cells were pretreated with 0.1 nM insulin for 30 min in the presence or absence of 25 mM glucose and/or 25mM 2-deoxy glucose, subsequently treated with 20 μM ¹⁴C-urate for 1 min. Each points represent the mean ± S.E.M (n=3). Statistically significant increase (*) or decrease (†) compared with untreated sample (P<0.05).

以上の検討から, インスリンによって尿酸再吸収が増加する機序として, インスリンにより解糖系が亢進することによって, 細胞内で lactate 量が増大し, 尿細管管腔側の尿酸と細胞内 lactate が URAT1 によって交換輸送され, 細胞内で増大した尿酸は促進拡散型輸送体の GLUT9 によって血中へ輸送されることで血清尿酸値が上昇する可能性が考えられた (Figure 4) . 現在, insulin 刺激した共発現細胞においてによって細胞内 lactate 量が増大するか評価しているところであり, それによってこの仮説の妥当性を評価できると考えられる .

また, 上述のように insulin は PI3K/Akt 経路の活性化を介して GLUT4 をはじめ様々な輸送体の膜移行を促進する . 実際, Na⁺/K⁺-ATPase の膜上発現が亢進することが報告されていることから, 膜電位依存的に輸送する GLUT9 の活性が過分極によって亢進することも推察され, 今後 GLUT9 に及ぼ

す insulin の影響も検討する必要があると考えられる。

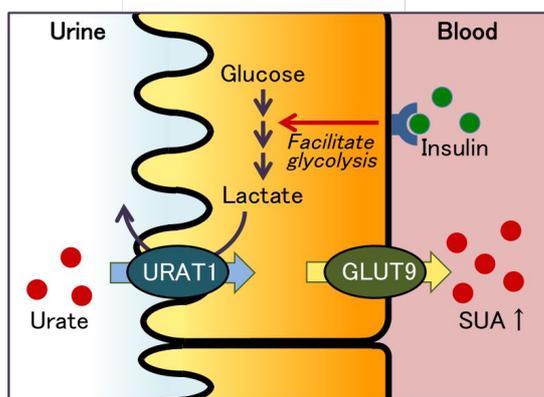


Fig. 4 Hypothesis of Enhanced Urate Reabsorption by Alternation of Glucose Metabolism

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1件)

- (1) Hisakazu Komori and Ikumi Tamai. Transporter-mediated drug interaction. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 143, 243-248 (2014) (査読有り)
<http://dx.doi.org/10.1254/fpj.143.243>

〔学会発表〕(計8件)

- (1) 小森久和, 大箭考平, 中西猛夫, 玉井郁巳, Involvement of renal reabsorptive transporters in insulin-dependent increase of serum uric acid. 日本薬物動態学会第28年会, 2013.10.9., タワーホール船堀
- (2) 生川幸司, 小森久和, 中西猛夫, 玉井郁巳. A possible enhanced effect of coffee constituents on intestinal urate excretion via BCRP. 日本薬物動態学会第28年会, 2013.10.9., タワーホール船堀
- (3) 小森久和, 安西尚彦, 中西猛夫, 玉井郁巳. 血管内皮細胞障害への尿酸輸送体の関与, 第23回北陸尿酸談話会, 2013.3.2., KKR ホテル金沢
- (4) 小森久和, 安西尚彦, 中西猛夫, 玉井郁巳. 血管内皮細胞における尿酸輸送体を介した酸化ストレス調節, 第46回日本痛風・核酸代謝学会総会, 2013.2.14., 京王プラザホテル
- (5) 生川幸司, 御勢智香, 小森久和, 中西猛夫, 玉井郁巳. OATP transporters is involved in intestinal absorption of urate. 日本薬物動態学会第27年会, 2012.11.20., タワーホール船堀
- (6) 大箭考平, 中西猛夫, 小森久和, 玉井郁巳. Effect of drugs on renal urate

reabsorption: evaluation by URAT1/URATv1 co-expressing cells. 日本薬物動態学会第27年会, 2012.11.20., タワーホール船堀

- (7) 盧楊, 中西猛夫, 小森久和, 玉井郁巳. In vitro evidence for functional interplay of SMCT1 and URAT1 for renal reabsorption of urate. 日本薬物動態学会第27年会, 2012.11.20., タワーホール船堀
- (8) 小森久和, 渡邊博志, 首藤剛, 小玉あずさ, 甲斐博文, 小田切優樹, 玉井郁巳, 丸山徹. α -acid glycoprotein exerts protective effect against hemolysis-induced oxidative stress via the enhancement of CD163 expression. 日本薬物動態学会第27年会, 2012.11.20., タワーホール船堀

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~doutai/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小森 久和 (KOMORI HISAKAZU)
金沢大学・薬学系・助教
研究者番号: 00634180

(2)研究協力者

玉井 郁巳 (TAMAI IKUMI)
金沢大学・薬学系・教授
研究者番号: 20155273