

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461258

研究課題名(和文) 血清尿酸値上昇回避のための創製基盤としての腎尿酸輸送3ファクターモデルの検証

研究課題名(英文) Evaluation of 3-factor model (3F) of renal urate transport that may avoid less side-effect of drug-induced hyperuricemia.

研究代表者

安西 尚彦 (Anzai, Naohiko)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70276054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は新たな概念「3ファクターモデル(3F)」の有用性を検証と、副作用としての血清尿酸値上昇を回避する創薬への利用を目的とする。研究代表者らがこれまでに同定した腎尿細管に発現する複数の尿酸トランスポーター分子(URAT1, URATv1, NPT4)の3重発現細胞の樹立に関し、連携研究者である鳥取大学の大林徹也氏の持つ哺乳類人工染色体ベクターを用いて研究代表者らのマウス腎尿細管由来細胞S2への複数遺伝子導入に実験に成功し、今後の利用が可能となった。また3Fモデル概念の確認に関し、ピラジナミド投与による腎排泄低下型高尿酸血症マウスモデルの創生に成功し、今後の研究に利用することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to investigate the effectiveness of a novel concept "3-factor model (3F)" and to make an alternative possibility for the development of new drugs that have less side effects regarding drug-induced hyperuricemia. For developing appropriate materials for evaluating this concept that may express triple urate transporters such as URAT1, URATv1, and NPT4, we performed a collaborative study with Dr. Tetsuya Ohbayashi who is a specialist of a mammalian artificial chromosome vector that can be used for introducing multiple genes and succeeded to express several kidney-derived genes using his system onto our mouse-derived renal tubular cell named S2. We will use this protocol for further analysis. In addition, we could raise a new animal model that can be used for analyzing the concept of 3F by using pyrazinamide-loading method for creating renal-underexcretion hyperuricemia model.

研究分野：薬理学、生理学

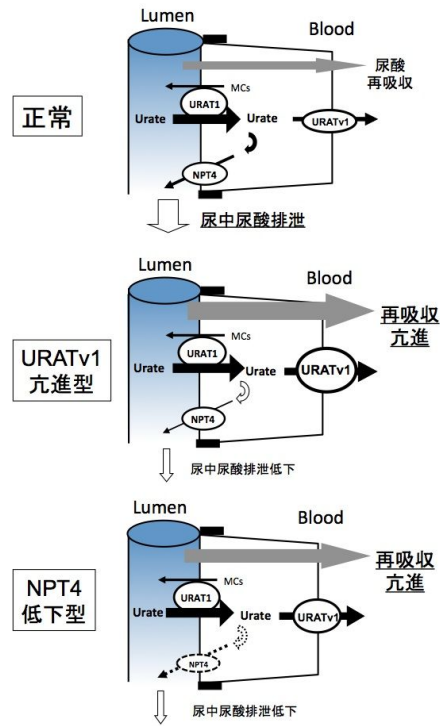
キーワード：尿酸 高尿酸血症 膜輸送 トランスポーター 創薬

1. 研究開始当初の背景

ヒトは肝臓の尿酸酸化酵素（ウリカーゼ）を変異により欠失しているため、尿酸はプリン体代謝の最終産物となる。またヒトは同時に腎臓の尿酸再吸収機構を備えているため、他の哺乳類に比し血中尿酸値は高値を示す。これがヒトに特徴的な高尿酸血症発症の原因と考えられ、痛風のみならず高血圧、心血管疾患、腎不全、尿路結石など多くの疾患を引き起こす事が知られている。一般に血中尿酸値は肝臓での尿酸産生と腎臓での尿酸排泄のバランスの上に成り立っているとされるが、特に高尿酸血症患者に関してはその9割以上に腎臓での尿酸排泄低下が認められている事から、腎臓の寄与度が高いと言える。

この腎臓での尿酸排泄機序であるが、血中の尿酸は一度糸球体濾過を受け尿原中に排泄された後、近位尿細管細胞での経細胞性の再吸収を受ける。2002年、研究代表者らのグループは世界に先駆けて、腎臓特異的尿酸トランスポーターURAT1 (SLC22A12)の分子同定に成功した。URAT1は腎近位尿細管の管腔側に存在し、細胞内から細胞外に向かう乳酸などの有機酸の外向き勾配を利用して尿酸を細胞内に取込む役割を担う。このURAT1が取込んだ尿酸を血管側へと排出する分子に関しては、グルコーストランスポーターに分類されるSLC2A9が、尿細管基底側膜の電位依存性の排出トランスポーターURATv1として働くことを申請者が見出した。URAT1、URATv1ともに、それぞれの機能喪失(Loss-of-function)遺伝子変異により特発性腎性低尿酸血症を引き起こすことから、両者は血中尿酸値を制御する重要な分子であると考えられた。このURATv1 (SLC2A9)であるが、2007年11月のLiらのGWAS (全ゲノム関連解析)により高尿酸血症との関連が初めて報告4)されて以降、同様の報告が続いたことで、SLC2A9が最も重要な高尿酸血症発症因子であると考えられるに至った。研究代表者は平成21年度から平成23年度まで科学研究費基盤研究B「新規尿酸排出トランスポーターURATv1を分子標的とする高尿酸血症治療薬創製」による助成を受け、この新規尿酸トランスポーターURATv1 (SLC2A9)の高尿酸血症発症への関与の解明、そしてURATv1を分子標的とした新規高尿酸血症治療薬創製、の2つを目標とした研究を行い、URAT1およびURATv1トランスジェニックマウスの解析から、血管側のURATv1が尿酸再吸収のゲートキーパーとなっている可能を見出し、さらに既存の尿酸降下薬ベンズプロマロンよりもURAT1阻害効果の強い化合物の同定を達成した。

その後さらに研究代表者らはGWASで痛風発症因子とされた基質未同定トランスポーターNPT4が、電位駆動性の有機酸排出を行い、腎尿細管管腔側の尿酸の排出(リーク)経路として働くことを見出した。このNPT4



の役割を考える中で、研究代表者は図のような腎尿酸輸送の「3ファクターモデル」を描くに至り、本モデルの有用性の検討と、同モデルを基にしてチアジドやループ利尿薬などいくつかの薬物で認められる高尿酸血症を惹起しない、すなわち尿細管の尿酸分泌を抑制しない新規薬物開発を可能にする基盤確立を目指す本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

上述の通り、研究代表者らはこれまでに、管腔側の尿酸トランスポーターURAT1と基底側の尿酸トランスポーターURATv1の分子同定に成功し、低尿酸血症を引き起こす遺伝子変異の存在から、糸球体濾過後の尿酸が生理的には、管腔側膜のURAT1と基底側膜のURATv1の2分子が中心となりタンデムに働く経細胞性尿酸輸送機序を明らかにした。再吸収に加えて、腎近位尿細管では経上皮性分泌も存在するとされたが、最近のGWASの結果から、血管側の尿酸取込みを担う有機酸トランスポーターの血中尿酸値制御に関連する報告は無いことから、先述の管腔側の尿酸排出トランスポーターNPT4同定をふまえ、「3ファクターモデル」の着想につながった。しかし管腔側にはNPT4以外にもNPT1やMRP4などの分泌への関与が示唆されている分子が存在する。そこで本研究において、3ファクター(3F)モデルのin vitroにおける検証を行うとともに、3Fモデルのコンセプトを基にした尿酸排泄促進薬候補物質の同定にむけた基盤の確立を目指す。

### 3 . 研究の方法

尿酸の体外排泄を担う腎尿管細胞の尿酸輸送を、主に3分子の視点でとらえる「3ファクターモデル」の検証を進めると同時に、同モデルのコンセプトを基盤とした創薬を目指すべく、(1)3F構成腎臓尿酸トランスポーターURAT1-URATv1-NPT4 3重安定発現細胞樹立に向けた導入プロトコール作成、(2)3Fモデルの評価を可能にする高尿酸血症モデル動物の確立、(3)「高尿酸血症を誘発しない」化合物の合成に必要なNPT4低阻害化合物構造基盤情報の取得、を遂行した。

### 4 . 研究成果

(1)URAT1/URATv1/NPT4 の3重発現細胞の樹立に関し、連携研究者として参画した鳥取大学生命機能研究支援センターの大林徹也氏の持つ哺乳類人工染色体ベクターを用いて複数遺伝子の導入を目指した。大林氏の協力の下、以前から研究代表者らがトランスポーター遺伝子発現に用いていたマウス腎尿管由来細胞 S2 への複数遺伝子導入のcontrol としての実験に成功した。この手法を用いてURAT1/URATv1/NPT4 の3重発現細胞の樹立のプロトコール作成が完了し、今後の樹立を目指す実験継続の基盤を得ることができた。

(2)当初研究代表者が既に確立したUrat1およびURATv1トランスジェニック(Tg)マウスを検討することで3Fモデルの評価を可能にする高尿酸血症モデル動物とする予定であったが、それらは高尿酸血症を示さないことが明らかになり、その変更が必要となった。そこでその代替として新たなモデル動物の樹立に着手し、尿酸を上昇させる薬物ピラジナミドの短期投与による腎排泄低下型高尿酸血症マウスモデルの創生を試み成功した。これにより今後3Fモデル検討に値する化合物が入手できた際の対応が可能となった。

また(3)NPT4阻害候補化合物のURAT1/URATv1阻害効果の確認に関し、継続してそのプロファイルの検討を行った。

### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Otani N, Ouchi M, Hayashi K, Jutabha P, Anzai N. Roles of organic anion transporters (OATs) in renal proximal tubules and their localization. *Anat Sci Int*. 査読有, 2017; 92(2): 200-206. doi: 10.1007/s12565-016-0369-3.

Kokura K, Kuromi Y, Endo T, Anzai N, Kazuki Y, Oshimura M, Ohbayashi T. A kidney injury molecule-1 (Kim-1) gene

reporter in a mouse artificial chromosome: the responsiveness to cisplatin toxicity in immortalized mouse kidney S3 cells. *J Gene Med*. 査読有, 2016; 18(10): 273-281. doi: 10.1002/jgm.2925.

Breljak D, Ljubojević M, Hagos Y, Micek V, Balen Eror D, Vrhovac Madunić I, Brzica H, Karaica D, Radović N, Kraus O, Anzai N, Koepsell H, Burckhardt G, Burckhardt BC, Sabolić I. Distribution of organic anion transporters NaDC3 and OAT1-3 along the human nephron. *Am J Physiol Renal Physiol*. 査読有, 2016; 311(1): F227-38. doi: 10.1152/ajprenal.00113.2016.

Mishima M, Hamada T, Maharani N, Ikeda N, Onohara T, Notsu T, Ninomiya H, Miyazaki S, Mizuta E, Sugihara S, Kato M, Ogino K, Kuwabara M, Hirota Y, Yoshida A, Otani N, Anzai N, Hisatome I. Effects of Uric Acid on the NO Production of HUVECs and its Restoration by Urate Lowering Agents. *Drug Res (Stuttg)*. 査読有, 2016; 66(5): 270-4. doi: 10.1055/s-0035-1569405.

Otsuka Y, Ohno Y, Morita A, Otani N, Jutabha P, Ouchi M, Tsuruoka S, Anzai N. Molecular mechanism of urate-lowering effects of anserine nitrate. *Gout Nucleic Acid Metabol*. 査読有, 2016; 40: 137-143.

Ljubojević M, Breljak D, Herak-Kramberger CM, Anzai N, Sabolić I. Expression of basolateral organic anion and cation transporters in experimental cadmium nephrotoxicity in rat kidney. *Arch Toxicol*. 査読有, 2016; 90(3): 525-41. doi: 10.1007/s00204-015-1450-8.

Tsuchiya G, Hori T, Onizawa N, Omani N, Tanaka-Nakadate S, Iseki T, Ouchi M, Hayashi K, Jutabha P, Oba T, Fukuda H, Anzai N. Molecular mechanism of the urate-lowering effects of calcium channel blockers. *Dokkyo J Med Sci*. 査読有, 2016; 43: 23-29.

Jaiyen C, Jutabha P, Anzai N, Lungkaphin A, Soodvilai S, Srimaroeng C. Interaction of green tea catechins with renal organic cation transporter 2. *Xenobiotica*. 査読有, 2016; 46(7): 641-650. doi: 10.3109/00498254.2015.1107785.

Bulacio RP, Anzai N, Ouchi M, Torres AM. Organic Anion Transporter 5 (Oat5) Urinary Excretion Is a Specific Biomarker of Kidney Injury: Evaluation of Urinary Excretion of Exosomal Oat5 after N-Acetylcysteine Prevention of Cisplatin Induced Nephrotoxicity. *Chem Res Toxicol*.

査読有, 2015; 28(8): 1595-602. doi: 10.1021/acs.chemrestox.5b00176.

Ouchi M, Oba K, Saigusa T, Watanabe K, Ohara M, Matsumura N, Suzuki T, Anzai N, Tsuruoka S, Yasutake M. Association between pulse wave velocity and a marker of renal tubular damage (N-acetyl-β-D-glucosaminidase) in patients without diabetes. J Clin Hypertens (Greenwich). 査読有, 2015; 17(4): 290-7. doi: 10.1111/jch.12492.

〔学会発表〕(計 8 件)

安西尚彦. 近位尿細管上皮輸送:有機溶質の再吸収と分泌. 第94回日本生理学会大会. 2017年3月28日~30日, アクトシティ浜松(静岡県浜松市)

安西尚彦, Jutabha Promsuk, 大内基司. 尿酸代謝と腎尿細管尿酸トランスポーター. 第50回日本痛風・核酸代謝学会総会. 2017年2月16日~17日, 京王プラザホテル(東京都新宿区)

Anzai N, Ouchi M, Otani N, Jutabha P. Uricosuric agents and renal tubular urate transporters. 第6回日中薬理学・臨床薬理学ジョイントミーティング, 2016年12月3日, 米子コンベンションセンター(鳥取県米子市)

安西尚彦, 大内基司, 大谷直由, JUTABHA Promsuk. ヒトの血清尿酸値制御の分子機序. 第39回日本高血圧学会総会. 2016年9月30日~10月2日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

JUTABHA Promsuk, 大内基司, 大谷直由, 安西尚彦. Monocarboxylate transporter 9 is a novel urate transporter in kidney. 第93回日本生理学会大会. 2016年3月22日~24日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Anzai N. Renal tubular urate transporters as targets for new drug discovery and development. The 13th Asia Pacific Federation of Pharmacologists (APFP) meeting, 2017年2月1日~3日, Bangkok, Thailand.

安西尚彦, 大内基司, 大谷直由, JUTABHA Promsuk. ヒトの尿酸代謝:オーバービュー. 第88回日本薬理学会年会. 2016年3月18日~20日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

安西尚彦, 大内基司, 大谷直由, JUTABHA Promsuk. 尿酸トランスポーター研究:最近の話題. 第48回日本痛風・核酸代謝学会総会. 2016年2月19日~20日, 京王プラザホテル(東京都新宿区)

安西 尚彦 (ANZAI Naohiko)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号: 70276054

#### (2)研究分担者

ジュタバ プロムスク (JUTABHA Promsuk)  
獨協医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 90541748

大内 基司 (OUCHI Motoshi)  
獨協医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 20409155

大谷 直由 (OTANI Naoyuki)  
獨協医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 60711819

#### (3)連携研究者

佐藤 元康 (SATO Motoyasu)  
獨協医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 20418891

大林 徹也 (OHBAYASHI Tetsuya)  
鳥取大学・生命機能研究支援センター・准教授  
研究者番号: 80348804

#### (4)研究協力者

林 啓太郎 (HAYASHI Keitaro)

森田 亜洲華 (MORITA Asuka)

野原 正勝 (NOHARA Masakatsu)

若新 英史 (WAKASHIN Hidefumi)

土屋 豪 (TSUCHIYA Go)

堀 貴行 (HORI Takayuki)

加納 優治 (KANO Yuji)

鬼澤 信之 (ONIZAWA Nobuyuki)

大塚 裕介 (OTSUKA Yusuke)

大野 雄太 (OHNO Yuta)

Michael F. Wempe

遠藤 仁 (ENDO Hitoshi)

木村 徹 (KIMURA Toru)

玉井 郁巳 (TAMAI Ikumi)

#### 6. 研究組織 (1)研究代表者