

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05937

研究課題名(和文)尿酸、尿毒症物質の腸管排泄動態のin vivo測定と関連トランスポーターの解析

研究課題名(英文) In vivo measurement of intestinal excretion of uric acid and uremic toxin and analysis of related transporters

研究代表者

藤田 恭子 (FUJITA, Kyoko)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90447508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：高尿酸血症の高リスク因子である尿酸の腎外排泄、特に腸管排泄動態について解析するため、尿酸を高感度に検出可能な微小電極の作製に成功した。尿酸降下薬を投与したラットや慢性腎臓病モデルラットを用いて腸管内における尿酸排泄速度をリアルタイムに測定し、腸管に発現している関連トランスポーターと尿酸排泄動態との相関について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管における尿酸や尿毒症物質の排泄動態の重要性が注目されているが、腎排泄に比較すると知見も少ない。本研究では、解析のための有効な手法の確立を試み、腸管において尿酸や尿毒症物質の一つであるインドキシル硫酸を高感度に検出可能な電極を作製した。ラットを用いた測定や、培養細胞に遺伝子組み換えを行いターゲットとするトランスポーターの排泄動態解析をリアルタイムかつ簡便に行えることを示した。これまで知見の少なかった腸管における尿酸やインドキシル硫酸の排泄動態の解析は、高尿酸血症や尿毒症治療につながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：A sensitive electrode was constructed to analyze the uric acid excretion from extra-renal, especially from intestine which is one of high risk factors of hyperuricemia. Excretion rate of uric acid in the rat intestine was calculated using time course data. A decrease in uric acid excretion rate was observed after administration of serum uric acid lowering drugs (benzbromarone, febuxostat, and topiroxostat). On the other hand, an increase in excretion rate of uric acid was observed in the rat model of chronic renal failure.

研究分野：生物電気化学、生体高分子

キーワード：腸管排泄 尿酸 尿毒症物質 リアルタイム測定 トランスポーター

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

血清尿酸値が 7.0 mg/dl 以上となる高尿酸血症は、痛風や、腎障害、高血圧症などの合併症を引き起こしやすいことが知られており、その患者数は増加している。尿酸体外排泄の約 3 分の 2 は腎臓から、残りの 3 分の 1 が腸管から進むものの、尿酸排泄に関する研究は長い間、腎臓からの排泄が着目され、腎外排泄経路はほとんど考慮されていなかった。近年、尿酸の腎外排泄の重要性に関する報告が続いており、腎外排泄、主に腸管からの尿酸排泄の重要性に注目が集まっている。また、尿毒症を引き起こす尿毒症物質に関しても、慢性腎臓病との関連性が報告されており、腸管におけるトランスポーターを介した排泄についても示唆されている。しかし尿酸や尿毒症物質であるインドキシル硫酸等の腸管トランスポーターに関する研究は、*in vitro* での検討がほとんどであり、腸管における尿酸や尿毒症物質の詳細な排泄動態やトランスポーターの機能解明には至っていなかった。

### 2. 研究の目的

ラットの腸管ループ法を用いて、腸管における尿酸および尿毒症物質であるインドキシル硫酸の排泄量をリアルタイムモニタリングするセンサーを構築する。構築したセンサーにより排泄量の測定を行うと共に腸管における各種トランスポーターの発現量を測定し、併せた解析を行うことで、これまで明確にできなかった腸管における尿酸と尿毒症物質の排泄動態、機構について明らかにする。具体的にはラットの腸管における尿酸、インドキシル硫酸排泄量を *in vivo* 測定するための電極作製し、腸管排泄量とトランスポーター発現量の解析による排泄に関与するトランスポーターと排泄動態について解明する。尿酸の腸管排泄動態の解析では、尿酸生成降下薬や尿酸排泄促進薬の事前投与や腸管部位が排泄動態に及ぼす影響についても検討する。さらに、培養細胞に遺伝子組み換えを行うことで輸送トランスポーターを発現させ、尿酸や尿毒症物質であるインドキシル硫酸の輸送について *in vitro* での検討を行い、輸送に関与するトランスポーターを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1)尿酸およびインドキシル硫酸を高感度に検出する電極の作製

金表面に単一構造を有する金ボール電極<sup>1</sup>あるいは金ナノ粒子を修飾した電極<sup>2</sup>を用い、電極表面に自己組織化単分子膜(SAM)を修飾することで、尿酸あるいは尿毒症物質であるインドキシル硫酸と電子授受が可能な電極を作製した。それぞれの系で良好な酸化電流を検出可能とする SAM の組成について検討した。ラットの腸管内に固定化して測定するため、電極サイズは 1mm 以下となるように設計した。

#### (2)培養細胞への遺伝子組み換えと尿酸およびインドキシル硫酸の輸送測定

ヒト胎児腎細胞 293 (HEK293) を培養し、遺伝子導入を行うことで尿酸輸送関連トランスポーターを発現させた。経細胞輸送測定系を用いることで、基底膜側から細胞内に取り込んだターゲット分子の頂側膜側からの排泄を(1)で作製した電極を頂側膜側に固定化することで検出した。

#### (3)ラット腸管内での尿酸排泄動態の測定

ラットに腸管ループを作製し、(1)で作製した電極を腸管内に固定化して尿酸排泄動態をリアルタイムに測定した。また、尿酸降下薬である尿酸生成抑制薬や尿酸排泄促進薬を事前に投与したラットや慢性腎臓病モデルラットを用いて、同様に腸管ループ内での尿酸濃度変化を測定することで、投薬による尿酸排泄動態への影響について解析した。

#### (4)腸管に発現する尿酸輸送トランスポーターの確認

(3)で排泄動態測定を行った後の腸管を採取し、mRNA 発現量を解析することで腸管に発現する尿酸輸送トランスポーターの確認を行った。また、(3)の尿酸降下薬投与後のラットや慢性腎臓病モデルラットの腸管でも同様に mRNA 発現量を解析し、その影響について検討を行った。

### 4. 研究成果

(1)ラットの腸管内に固定化するための電極には直径 0.2mm の金線から作成した金ボール電極を用い、遺伝子組み換え細胞を用いた経細胞輸送モデルを用いた *in vitro* 測定では、金ナノ粒子修飾電極を用いた。尿酸を検出するため、金電極上にフェロセンとアルカンチオールからなる混合自己集積化膜を修飾した。金ボール電極には 6-Ferrocenyl-1-hexanthiol : 6-Hydroxyl-1-hexanthiol = 1 : 3 で混合したチオール溶液に 1 時間浸漬することで、1  $\mu\text{g/ml}$  の尿酸濃度変化を 1E-7 A の電流値変化として検出可能とした。金ナノ粒子修飾電極では、1:1 混合 SAM で尿酸 1  $\mu\text{g/ml}$  を 5E-7 A で検出した。

上記のフェロセンアルカンチオールを用いた修飾電極では、尿酸とアスコルビン酸の検出電位を分離することができなかった。ラットの腸管内測定では、測定前に腸管内を緩衝液で洗浄し、培養細胞を用いた測定では培養液内にアスコルビン酸は存在しないため、尿酸排泄動態の解析には直接的な影響はないが、今後の展開を踏まえて、尿酸とアスコルビン酸の検出電位を分離できる SAM の検討を行った。既報<sup>3</sup>を参考に 2-メルカプトベンズイミダゾールを用いて SAM を形成し、トリートメント処理を行うことで、アスコルビン酸と尿酸、さらにインドキシル硫酸を

それぞれ別の電位で検出することが可能であることを明らかにした。検出感度はそれぞれ  $4E-7$ 、 $3E-7$ 、 $1E-6$  A/ $\mu$ g であり in vivo 測定でも十分使用できることを確認した(Fig.1)。

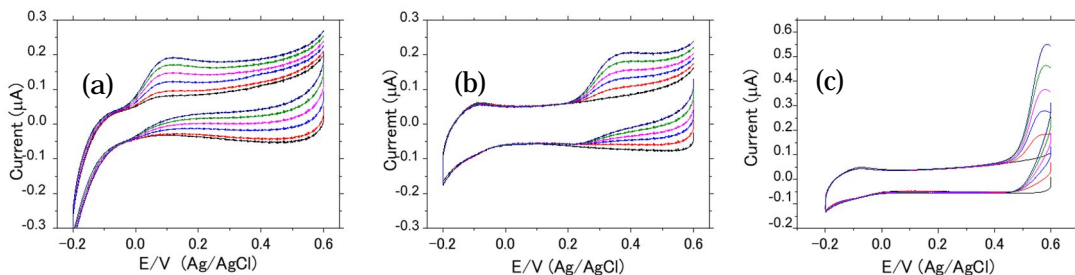


Fig.1 2-メルカプトベンズイミダゾールからなる自己集積化単分子膜修飾金電極によるアスコルビン酸(a)、尿酸(b)、インドキシル硫酸(c)の濃度変化に伴うサイクリックボルタモグラム

(2)培養した HEK293 に尿酸排泄トランスポーターの一つとして知られる ATP-binding cassette sub-family G member2 ( ABCG2 ) の遺伝子を導入した。経細胞輸送測定系を用いて、基底膜側を尿酸入り培地に交換し、頂側膜側に作成した SAM/金ナノ粒子修飾電極を固定化して、経時的な電流値変化の測定を行った。その結果、頂側膜側の尿酸濃度の上昇を示す電流値の上昇が観測された。遺伝子導入を行っていない細胞では、電流値変化は観測されなかった ( Fig.2 )。細胞に存在するタンパク量で補正を行うと 1 秒あたり、 $20E-3$  nmol/g protein の尿酸排泄が示唆された。

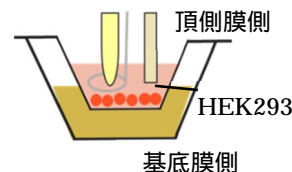


Fig.2 経細胞輸送測定系を用いたトランスポーターを介した尿酸排泄動態の解析模式図

また、基底膜側の尿酸入り培地に尿酸産生抑制薬であるアロプリノールとフェブキソスタットを溶解して、尿酸排泄動態への影響について解析を行った。その結果、アロプリノールを溶解した系では頂側膜への尿酸排泄動態には大きな変化は観測されなかった。これに対して、フェブキソスタットを溶解した系では頂側膜への尿酸排泄動態の大幅な低下が確認された。これは ABCG2 を発現させた反転膜小胞を用いて、上記の尿酸産生抑制薬の尿酸排泄能への影響を検討した報告<sup>4</sup>と一致しており、本実験系で同様の検討を簡便に行えることを確認した。

さらに、ABCG2 遺伝子を導入した HEK293 を用いて、基底膜側をインドキシル硫酸入り培地に交換して頂側膜側への排泄の測定を行った。その結果、インドキシル硫酸の排泄を示す経時的な電流値の上昇が観測された。遺伝子導入を行わなかった場合には、このような電流値変化は観測されなかった。以上の結果から、ABCG2 が尿酸およびインドキシル硫酸を輸送するトランスポーターであることを示した。

(3) 麻酔下でラットに腸管ループを作製し、電極を固定化した状態で腸管内の尿酸濃度変化測定を行った。尿酸の酸化電位におけるアンペロメトリー測定により、尿酸濃度の上昇を示す電流値増大 (  $1.8$  ng/ml/sec ) を観測した。尿酸産生抑制薬( フェブキソスタット、トピロキソスタット )、尿酸排泄促進薬 ( ベンズブロマロン ) を事前投与したラットおよび慢性腎不全モデルラット ( Nx ) を用いて腸管ループ内における尿酸排泄動態の測定を行った。その結果、尿酸降下薬の事前投与による尿酸排泄速度の低下が観測された。1 秒当たりの尿酸濃度変化はフェブキソスタットが最も低下しており、次いでトピロキソスタット、ベンズブロマロンの順であった。これは in vitro において、ABCG2 による尿酸排泄を抑制する順序と一致していた。これに対して、慢性腎不全モデルラットでは、1 秒当たりの尿酸濃度変化の増加が観測された。腎臓からの尿酸排泄が低下しているため、腸管からの尿酸排泄量が增大して

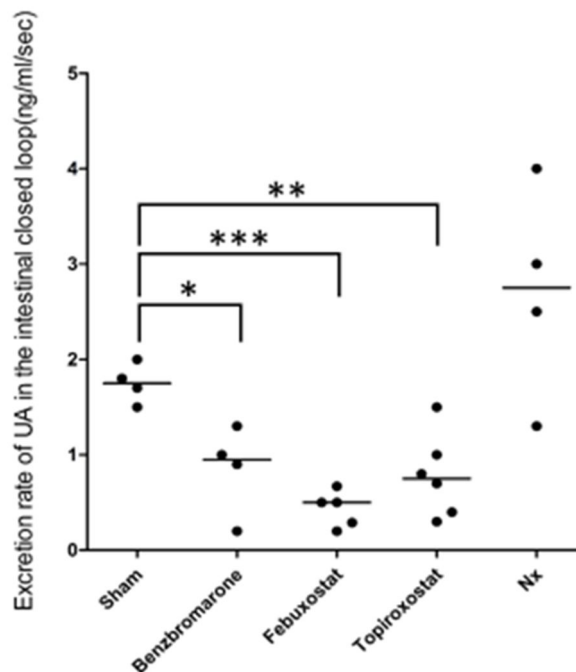


Fig.3 腸管における尿酸濃度変化速度

いることが示唆された(Fig.3)。

(4) 尿酸排泄動態についてアンペロメトリー測定を行った腸管を用いて、発現している尿酸トランスporterについて mRNA の発現量から検討した。腎臓に発現している尿酸輸送関連トランスporterを中心に、腸管での発現の検討を行った。その結果、ABCG2 の他 organic anion transporter 1 (OAT1)、organic anion transporter 3 (OAT3)、multidrug resistance protein 4 (MRP4)の発現が確認された。これらのトランスporterについて、尿酸降下薬投与後の mRNA 発現量を解析した結果、ABCG2 及び MRP4、OAT1 の発現量は Sham 群と比較して、検討を行った尿酸降下薬の投与や慢性腎不全モデル群において大きな変化は見られなかった。これに対して、OAT3 の発現量は Sham 群と比較して尿酸降下薬投与群、慢性腎不全モデル群において増加傾向が確認された。OAT3 は上皮細胞の基底膜側に発現していることが知られていることから、OAT3 発現量の増加が示唆された群では腸管上皮細胞内への尿酸吸収の亢進が示唆された。しかしながら、尿酸降下薬投与群では ABCG2 の尿酸排泄を阻害するため、細胞内への尿酸吸収の程度に関わらず、腸管への尿酸排泄が低下したと考えられる。これに対して、慢性腎不全モデルでは ABCG2 による尿酸排泄の阻害は生じないため、細胞内の尿酸吸収の亢進を受けて腸管内への尿酸排泄量が増大したと示唆された ( Fig.4 )。

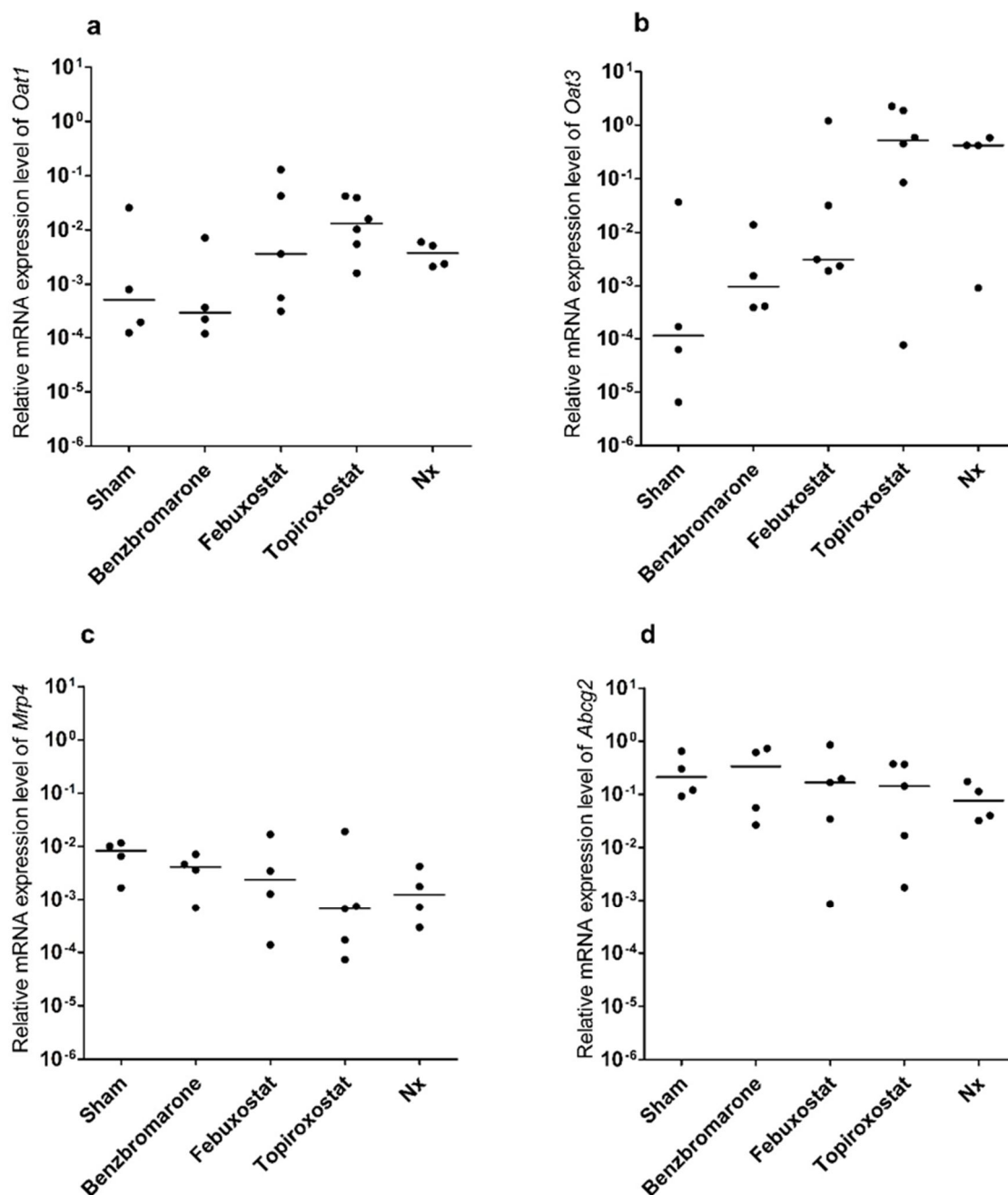


Fig.4 採取した腸管における尿酸輸送関連トランスporterの mRNA 発現量

以上のように、金電極上に SAM を修飾することで、尿酸およびインドキシル硫酸を高感度に検出可能な電極を作製し、in vivo、in vitro での濃度変化をリアルタイム測定可能とした。アスコルビン酸、尿酸、インドキシル硫酸をそれぞれ別の電位で検出可能な電極の作成にも成功した。作製した電極を用いて、遺伝子導入によりトランスポーターを細胞に発現させ、ターゲットとなる物質の輸送能について、簡便に評価可能であることを示した。ラットの腸管ループ内における尿酸排泄動態の解析では、事前に尿酸降下薬を投与したり慢性腎不全モデルラットを用いたりすることで、腸管排泄動態への影響についても解析した。また、測定後の腸管を採取して mRNA 発現量を解析することで、腸管における尿酸排泄動態に影響を及ぼすトランスポーターについて検討可能であることを示した。

Fujita, K. *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* 126, 13954–13961 (2004).

Murata, K. *et al.*, *Electroanalysis*, 22, 185–190 (2010).

Raj, C., *et al.*, *Analyst*, 127, 1155–1158 (2002).

Miyata, H. *et al.*, *Front. Pharmacol.*, 7, 518 (2016)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Fujita Kyoko, Ichida Kimiyoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 ABCG2 as a therapeutic target candidate for gout	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Expert Opinion on Therapeutic Targets	6. 最初と最後の頁 123 ~ 129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1420167">https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1420167</a>	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 Nakamura Makiko, Fujita Kyoko, Toyoda Yu, Takada Tappei, Hasegawa Hiroshi, Ichida Kimiyoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Investigation of the transport of xanthine dehydrogenase inhibitors by the urate transporter ABCG2	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 77 ~ 81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2017.11.002">https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2017.11.002</a>	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 藤田恭子、市田公美	4. 巻 75
2. 論文標題 高尿酸血症治療薬の作用機序	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 1782 ~ 1786
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 Fujita Kyoko, Yamada Hiroki, Iijima Masahiro, Ichida Kimiyoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Electrochemical analysis of uric acid excretion to the intestinal lumen: Effect of serum uric acid-lowering drugs and 5/6 nephrectomy on intestinal uric acid levels	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0226918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226918">https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226918</a>	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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤田恭子, 山田博貴, 森優貴, 市田公美
2. 発表標題 尿酸降下薬投与によるラット腸管内における尿酸排泄変化と関連トランスポーターの解析
3. 学会等名 電気化学会 第87回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅野皓平, 涌井友里, 市田公美, 藤田恭子
2. 発表標題 電気化学的測定法を用いたインドキシル硫酸のトランスポーターを介する分泌の解析
3. 学会等名 日本化学会 第100回春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森優貴, 山田博貴, 市田公美, 藤田恭子
2. 発表標題 電気化学的手法を用いたラット腸管内における尿酸排泄動態の解析
3. 学会等名 日本化学会 第100回春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 涌井友里, 波多江貴生, 藤田恭子, 市田公美
2. 発表標題 電気化学的測定法を用いたABCG2トランスポーター発現細胞における尿酸排泄動態の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻中里穂、中野太幹、藤田恭子、市田公美
2. 発表標題 腎虚血再灌流障害の性差における腎Ca <sup>2+</sup> 輸送体の発現量への影響
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田博貴、飯島雅博、藤田恭子、市田公美
2. 発表標題 電気化学的手法を用いたラット腸管内の尿酸排泄動態の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田恭子、山田博貴、飯島雅博、市田公美
2. 発表標題 自己集積化単分子膜修飾電極を用いたラット腸管内の尿酸排泄のリアルタイム解析
3. 学会等名 電気化学会第86回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kyoko FUJITA, Kimiyoshi ICHIDA
2. 発表標題 Development of Electrochemical Sensor for Uric Acid Detection in Intestinal Closed Loop
3. 学会等名 232nd ECS Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 飯島雅博、藤田恭子、市田公美
2. 発表標題 ラット腸管内の尿酸排泄動態を観測するための方法の構築
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 波多江貴生、藤田恭子、市田公美
2. 発表標題 電気化学測定法を用いた尿酸高感度検出の検討
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018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