

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08200

研究課題名(和文) 構造活性相関に基づく新規腎尿管尿酸トランスポーターMCT9を分子標的とする創薬

研究課題名(英文) New drug development targeting novel renal tubular rate transporter MCT9 based on the structure-activity relationship

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では(A)新規尿酸トランスポーターMCT9による尿酸輸送の構造活性相関の解明からの阻害化合物合成、(B)MCT9結合タンパク質同定と輸送制御機構の詳細、の2点の解析を行った。(A)ではMCT9全長配列を有する発現用plasmidの構築とMCT9発現HEK293細胞の作成に成功し、Chiba Chemical Libraryを用いた化合物スクリーニングを実施した。(B)ではMCT9の細胞内C末端配列をもつベイトベクターの作成と酵母細胞でのタンパク質発現の確認から腎臓cDNAライブラリーのスクリーニングを行った結果、結合タンパク質の候補と思われる陽性クローンの取得に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では痛風患者は100万人を越えるとされ、痛風発症の基盤となる高尿酸血症患者に至っては1,000万人いると推定されている。痛風発症機序は未だに明らかにされておらず、その発症予防には血清尿酸値を低く保つことが必要である。そのため副作用の少ない新規の尿酸降下薬開発は今後も必須の課題である。本研究で新規尿酸トランスポーターMCT9の結合タンパク質候補の同定に迫ったことは新たな治療標的の解明につながることを期待される。また今回明確なMCT9阻害候補化合物の同定に至らなかったものの、阻害しないという構造情報も新規化合物合成に活用可能であり、創薬の基盤情報として貢献できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed two points: (A) synthesis of inhibitory compounds based on the elucidation of the structure-activity relationship of uric acid transport by the novel uric acid transporter MCT9, and (B) identification of MCT9-binding protein and details of transport control mechanism. In (A), we succeeded in constructing an expression plasmid having a full-length MCT9 sequence and producing MCT9-expressing HEK293 cells. We performed compound screening using the Chiba Chemical Library. In (B), as a result of screening the kidney cDNA library from the preparation of a bait vector having the intracellular C-terminal sequence of MCT9 and the confirmation of protein expression in yeast cells, we obtained a positive clone that seems to be a candidate for MCT9-binding protein.

研究分野：生理学・薬理学

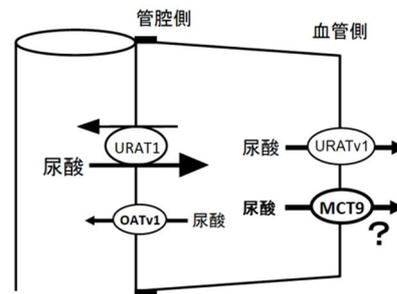
キーワード：トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

尿酸は、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ヒトおよび類人猿において、プリン体代謝の最終産物となる。これら霊長類では、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、痛風や高血圧、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¹⁾。ヒトの血中尿酸値は男性で3-5 mg/dl 程度に維持されており、7 mg/dl を越えると高尿酸血症と診断される。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、高尿酸血症発症に関してはその9割以上の患者で腎臓での尿酸排泄低下が認められ、腎臓の関与が大きいと言える。

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原尿中に排泄された後、糖やアミノ酸と同様に尿細管細胞での経細胞性の再吸収を受けることが知られていたが、長らくこの分子実体は不明であった。申請者らのグループは2002年世界に先駆けて、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²⁾。URAT1は尿細管の管腔側に存在し、細胞内から細胞外に向かう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分子であった(図1)。続いて2008年申請者らはそれまでグルコーストランスポーターに分類される*SLC2A9* 遺伝子が、尿細管基底側膜の電位依存性の尿酸排出トランスポーターURATv1 であることを見出すとともに、本遺伝子の変異により家族性腎性低尿酸血症を発症することから、URAT1と同様に血中尿酸値を制御する重要な分子であることを報告した³⁾(図1)

図1. MCT9は腎近位尿細管基底側膜での尿酸の細胞外排泄に関与？



2. 研究の目的

尿酸トランスポーターURAT1 及び URATv1 の分子同定は、遺伝子病である特発性腎性低尿酸血症発症の理解に貢献した。しかし患者数も低尿酸血症より多く生活習慣病にも上げられる「高尿酸血症」の発症機序の本態は殆ど不明である。本研究は、痛風・高尿酸血症患者に対する GWAS から高尿酸血症関連因子である事が報告されたが、長らくその役割の不明であったオーファントランスポーターMCT9 の尿酸輸送特性の解明を突破口として、高尿酸血症発症の分子機序の全貌解明を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、大きく分けて以下の2点についての解析を行った。

(A)MCT9による尿酸輸送特性の更なる解析によるその構造活性相関の解明からの阻害化合物合成、および(B)MCT9 結合タンパク質同定と輸送制御機構の詳細

そこでそれぞれの解析のために、以下の実験方法を用いた。

(A)

- ・アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて MCT9 による尿酸輸送特性の解析
- ・ほ乳類培養細胞 HEK293 に、Lipofection 法を用いた MCT9 遺伝子導入による MCT9 の

発現細胞 (HEK-MCT9) の作成

- ・新規尿酸降下薬候補低分子化合物ライブラリーの入手
- ・HEK-MCT9 細胞を用いた少量規模の新規尿酸降下薬候補低分子化合物ライブラリーのスクリーニング

(B)

- ・MCT9 タンパク質大量発現および酵母 Two-hybrid 法のための発現用 plasmid 作成
- ・局在および機能解析のための抗 MCT9 特異的抗体の作成
- ・酵母 Two-hybrid 法を用いる MCT9 結合機能制御タンパク質同定

4 . 研究成果

平成 30 年度は (A) についての解析を実施した。(1)新規尿酸トランスポーターMCT9 の尿酸輸送特性の更なる解析、および(2)MCT9 阻害候補化合物スクリーニング系の確立を目指し、Chiba Chemical Library の化合物を入手したのに加え、卵母細胞入手のためのアフリカツメガエル飼育を開始し、かつ定法に従いほ乳類培養細胞 HEK293 に、Lipofection 法を用いて MCT9 遺伝子導入を行った結果、の MCT9 安定発現 HEK293 細胞の樹立に成功した。また MCT9 特異的抗体の作成および MCT9 の構造解析を実施するための基盤となる(3)MCT9 タンパク質の大量発現および精製に関し、昆虫細胞および哺乳類細胞発現用 plasmid への MCT9 全長配列の導入に成功し、哺乳類細胞発現用 plasmid に組み込まれた MCT9 は、同細胞にて細胞膜上にタンパク質を発現することが共焦点レーザー顕微鏡を用いた発現解析により確認された。

令和元年度は(A)の研究を継続するとともに、(B)についての検討を進めた。(B)のMCT9 結合タンパク質同定には研究代表者が実績を持つ酵母 Two-hybrid 法を用いる。そのために(1)新規尿酸トランスポーターMCT9 の細胞内 C 末端配列をもつベイトベクターの作成、(2)ベイトベクターの酵母細胞でのタンパク質発現の確認、および(3)MCT9 C 末端をベイトとした腎臓 cDNA ライブラリーのスクリーニング、を行った。その結果、(1)の MCT9 C 末端配列を持つ plasmid の作成に成功し、(2)同ベクターの酵母細胞でのタンパク質発現を Western blot 法により確認し、(3) 腎臓 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った結果、結合タンパク質の候補と思われる陽性クローンの取得に成功した。

最終年度となる令和 2 年度はこれまでの成果の上に立ち、平成 30 年度に実施した(A) についての継続課題と、令和元年度に実施した(B)についての継続課題に取り組んだ。(A)では、ほ乳類培養細胞 HEK293 に、Lipofection 法を用いて MCT9 遺伝子導入を行って作成した MCT9 発現 HEK293 細胞を用いて、Chiba Chemical Library の化合物付加による、MCT9 阻害候補化合物スクリーニングを実施したが、これまでのところ、有意な阻害効果を示す化合物の同定には至らなかった。初年度より進めてきた MCT9 タンパク質の発現および精製に関しても種々の条件検討を行ったが、少量調整では成功するものの大量調整には至らなかった。継続課題(B)MCT9 結合タンパク質候補陽性 83 クローンの酵母への再導入を行い、17 クローンが再び陽性を示したため、この後のシーケンス解析によるタンパク質の同定に向けた酵母プラスミドの調整まで実施した。

参考文献

- 1) Kutzing MK, Firestein BL. *J Pharmacol Exp Ther.* 324: 1-7, 2008.
- 2) Enomoto A, et al. *Nature* 417: 447-452, 2002.
- 3) Anzai N, et al., *J Biol Chem.* 283: 26834-26838, 2008.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Otsuka Y, Furihata T, Nakagawa K, Ohno Y, Reien Y, Ouchi M, Wakashin H, Tsuruoka S, Anzai N.	4. 巻 69
2. 論文標題 Sodium-coupled monocarboxylate transporter 1 interacts with the RING finger- and PDZ domain-containing protein PDZRN3.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Physiol Sci	6. 最初と最後の頁 635-642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-019-00681-w	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 -
1. 著者名 Gottier Nwafor J, Nowik M, Anzai N, Endou H, Wagner CA.	4. 巻 45
2. 論文標題 Metabolic Acidosis Alters Expression of Slc22 Transporters in Mouse Kidney.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney Blood Press Res	6. 最初と最後の頁 263-274.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000506052	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 -
1. 著者名 Fu Y, Breljak D, Onishi A, Batz F, Patel R, Huang W, Song P, Freeman B, Mayoux E, Koepsell H, Anzai N, Nigam SK, Sabolic I, Vallon V.	4. 巻 315
2. 論文標題 Organic anion transporter OAT3 enhances the glucosuric effect of the SGLT2 inhibitor empagliflozin.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Physiol Renal Physiol.	6. 最初と最後の頁 F386-F394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00503.2017	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 該当する
1. 著者名 Morio H, Sun Y, Harada M, Ide H, Shimozato O, Zhou X, Higashi K, Yuki R, Yamaguchi N, Hofbauer JP, Guttman-Gruber C, Anzai N, Akita H, Chiba K, Furihata T.	4. 巻 41
2. 論文標題 Cancer-Type OATP1B3 mRNA in Extracellular Vesicles as a Promising Candidate for a Serum-Based Colorectal Cancer Biomarker.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 445-449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b17-00743	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 該当する

1. 著者名 Hori T, Ouchi M, Otani N, Nohara M, Morita A, Otsuka Y, Jutabha P, Shibasaki I, Matsushita Y, Fujita T, Fukuda H, Anzai N.	4. 巻 136
2. 論文標題 The uricosuric effects of dihydropyridine calcium channel blockers in vivo using urate under-excretion animal models.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci	6. 最初と最後の頁 196-202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2017.11.011	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 -

1. 著者名 Otani N, Toyoda S, Sakuma M, Hayashi K, Ouchi M, Fujita T, Anzai N, Tanaka A, Node K, Uemura N, Inoue T.	4. 巻 41
2. 論文標題 Effects of uric acid on vascular endothelial function from bedside to bench.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hypertens Res	6. 最初と最後の頁 923-931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-018-0095-4	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 Ohe T, Umezawa R, Kitagawara Y, Yasuda D, Takahashi K, Nakamura S, Abe A, Sekine S, Ito K, Okunushi K, Morio H, Furihata T, Anzai N, Mashino T.	4. 巻 28
2. 論文標題 Synthesis of novel benzbromarone derivatives designed to avoid metabolic activation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorg Med Chem Lett	6. 最初と最後の頁 3708-3711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2018.10.023	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 -

1. 著者名 Srivastava S, Nakagawa K, He X, Kimura T, Fukutomi T, Miyauchi S, Sakurai H, Anzai N.	4. 巻 69
2. 論文標題 Identification of the multivalent PDZ protein PDZK1 as a binding partner of sodium-coupled monocarboxylate transporter SMCT1 (SLC5A8) and SMCT2 (SLC5A12).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Physiol Sci	6. 最初と最後の頁 399-408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-018-00658-1	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 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Anzai N
2. 発表標題 Hyperuricemia as a risk factor for CKD: Improvement of acidic urine by basic alkalogenic-drug and urate transporters
3. 学会等名 ISARSH2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Anzai N
2. 発表標題 New Drug Development targeting Membrane Transporters
3. 学会等名 The Chiba-Ottawa Joint Session of Pharmacology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安西尚彦
2. 発表標題 腎尿酸トランスポーターと血清尿酸値異常
3. 学会等名 日本薬学会東海支部講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安西尚彦
2. 発表標題 URAT1: 尿酸輸送体か有機酸輸送体か
3. 学会等名 第41回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安西尚彦
2. 発表標題 トランスポーター：疾患発症と治療薬作用の分子機序
3. 学会等名 第29回臨床内分泌代謝Update MTE16（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安西 尚彦, 大内 基司
2. 発表標題 腎尿細管トランスポーターによる尿酸・グルコース輸送とSGLT2阻害薬tofogliflozinの阻害効果
3. 学会等名 第52回 日本痛風・核酸代謝学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安西 尚彦, 大内 基司
2. 発表標題 栄養代謝における腸管トランスポーターの働き
3. 学会等名 第41回日本栄養アセスメント研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naohiko Anzai
2. 発表標題 Renal tubular transporters: relation to renal drug disposition and drug-induced nephropathy
3. 学会等名 第7回日中腎病理カンファレンス（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naohiko Anzai
2. 発表標題 Renal tubular urate transporters as targets of drug development
3. 学会等名 第22回日韓薬理学合同セミナー（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019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	大内 基司 (Ouchi Motoshi) (20409155)	獨協医科大学・医学部・准教授 (32203)	

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