

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590647

研究課題名(和文)尿酸降下薬の分子標的：新規腎臓尿酸トランスポーターURAT2の同定と機能解析

研究課題名(英文)Molecular target of urate-lowering drugs: Identification and functional characterization of a novel renal urate transporter URAT2

研究代表者

JUTABHA Promsuk (JUTABHA, PROMSUK)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：90541748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：有機酸トランスポーターOAT10は高親和性ニコチン酸輸送とともに低親和性尿酸輸送を担うことが報告された。申請者はOAT10が尿酸トランスポーターURAT2である可能性に着目し、URAT2による尿酸輸送活性の詳細な解析による確認、及びURAT2を分子標的とする新規尿酸降下薬創製のための基盤の確立を目的として本研究を行った。その結果URAT2の輸送特性がURAT1に類似の有機酸交換輸送であるが、基質認識はURAT1よりもより広いという相違点を明らかにし、URAT2標的阻害薬創製の基本骨格に関する情報を得た。

研究成果の概要(英文)：Organic anion transporter OAT10 was reported to mediate high-affinity nicotinate transport as well as low-affinity urate transport. Since I noticed that OAT10 may function as a second apical urate transporter URAT2, here I performed the experiments 1) to clarify the precise mechanisms of urate transport via URAT2 and 2) to accumulate the basic information for the new drug development for urate-lowering agents. As a results, I could find that URAT2 has an exchange mode for intracellular organic anions similar to URAT1 and broader substrate recognition to that of URAT1. In addition, I could get the fundamental structural information to raise novel urate-lowering agents.

研究分野：薬理学

キーワード：トランスポーター 尿酸 有機酸 痛風 尿酸降下薬

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は、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(Anzai N, Jutabha P, Endou H. Renal Solute Transporters and Their Relevance to Serum Urate Disorder. *Curr Hypertens Rev.* 6: 1-7, 2010.)。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ていることから、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、血中尿酸は一度糸球体濾過を受け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。2002年、申請者は世界に先駆けて、腎尿細管管腔側の尿酸/陰イオン交換輸送体(トランスポーター)URAT1 (SLC22A12)の分子同定に成功した(Enomoto A, Jutabha P, et al. Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 417: 447-452, 2002.)の続き、2008年に申請者らはグルコーストランスポーターに分類される GLUT9 遺伝子 (SLC2A9)が、尿細管基底側膜の電位依存性尿酸排出トランスポーターURATv1であることを見出した(Anzai N, Jutabha P, Kimura T, et al. Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter URATv1 (SLC2A9) in humans. *J Biol Chem.* 283: 26834-26838, 2008.)。両遺伝子の変異が家族性腎性低尿酸血症患者より見出されたことから、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、URAT1が尿細管腔より取込んだ尿酸をURATv1が血管側へと排出させるタンデムモデルを提案した。

しかしその後の解析で、URAT1(管腔側)ないしURATv1(血管側)のどちらにも遺伝子変異の無い腎性低尿酸血症患者の存在が明らかになったため、申請者は両者以外の第3の尿酸トランスポーターの存在を推測した。文献的な検索を行った所、過去のヒト腎近位尿細管膜小胞を用いた実験で、管腔側膜には尿酸に対し異なる親和性を示す2つの尿酸/陰イオン交換輸送体があることが報告されていた(Roch-Ramel F, et al. Renal Transport of Urate in Humans. *News*

Physiol Sci. 14:80-84, 1998.)。特徴として尿酸高親和性のトランスポーターは、細胞内のClイオンとの交換特性を持つのに対し、尿酸低親和性トランスポーターは、幅広いモノカルボン酸との交換特性を持つことがあげられる。そのKmからURAT1が高親和性トランスポーターであると考えられるが、低親和性トランスポーターURAT2の分子実体は不明のままであり、それが腎性低尿酸血症の第3の発症因子となる可能性に着目した。

2008年、Bahnらは、SLC22有機酸トランスポーターに属するOAT10が高親和性のニコチン酸トランスポーターであると同時に低親和性に尿酸を輸送することを報告した(Bahn A, et al. Identification of a new urate and high affinity nicotinate transporter, hOAT10 (SLC22A13). *J Biol Chem.* 82: 139-149, 2008.)。申請者もアフリカツメガエル卵母細胞を用いてOAT10の尿酸輸送を解析した所、URAT1よりも低い親和性を示す尿酸輸送を確認した。東京薬科大学の市田教授らとの共同研究によりURAT1とURATv1遺伝子変異の無い腎性低尿酸血症患者よりOAT10のloss-of-function変異を見出した(Jutabhaら、第123回日本薬理学会関東部会にて発表, 2010)。そこでOAT10がその分子実体の不明であった尿酸/陰イオン交換輸送体：新規尿酸トランスポーターURAT2であることの証明と、新たな尿酸降下薬の分子標的である可能性を想定し、創薬の基盤情報の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、申請者らはこれまでに、尿酸再吸収経路を構成する管腔側の尿酸トランスポーターURAT12と基底側の尿酸トランスポーターURATv13の分子同定に成功し、管腔側膜のURAT1と基底側膜のURATv1がタンデムに働く経細胞性尿酸輸送機序を明らかにした。しかし両分子に遺伝子変異の無い腎性低尿酸血症患者症例の発見から第3の分子であるURAT2の存在が示唆され、OAT10 (SLC22A13)がその一番の候補と考えられた。本研究では、このOAT10の尿酸輸送特性の詳細な解析を行うことで、URAT2標的尿酸降下薬の創製を目指す。具体的には(1)アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いたOAT10(URAT2)の輸送特性解析(2)同URAT2発現細胞を用いた、URAT2由来尿酸輸送活性阻害薬の解析(3)(2)の阻害薬構造を基盤としたURAT2阻害候補化合物の作成とURAT2発現細胞を用いたスクリーニング。(4)URAT2トランスジェニック(Tg)マウスの血液・尿生化学分析について検討した。

3. 研究の方法

1) アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用

いた OAT10(URAT2)の輸送特性解析

申請者はこれまでに OAT10 が低親和性の尿酸トランスポーターであることを確認しているが、過去のヒト腎近位尿細管膜小胞を用いた実験で低親和性トランスポーターが有するとされる乳酸やケトン体などの幅広いモノカルボン酸による交換輸送機序の詳細は未解明である。また URAT2 の候補である OAT10 の種々の薬物との相互作用に関しても、最初の Bahn らの報告では全く検討されていない。

そこで OAT10 が URAT2 であることの実証を目指し、申請者が得意とするアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた OAT10 による尿酸輸送活性の測定を行った。初めに常法に従い、OAT10 cRNA を in vitro transcription 法により調整後、microinjection により卵母細胞に遺伝子導入を行う。2-3 日経過後、RI 標識尿酸を用いるトレーサー実験によりその輸送特性の詳細な分析を行った。

2) URAT2 阻害作用候補低分子化合物の作成 (Jutabha・Wempe)

1)で行った URAT2 による尿酸輸送阻害薬物の情報を海外研究協力者である Colorado 大学の Michael F. Wempe 准教授に送付し、それら物質の化学構造を基にした構造活性相関の検討から URAT2 による尿酸輸送阻害候補低分子化合物ライブラリー(少量規模)の作成を依頼した。

3) URAT2 発現細胞を用いた阻害候補低分子化合物のスクリーニング (Jutabha)

アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた URAT2 発現細胞を用いて、ラジオアイソトープ標識尿酸の輸送活性の阻害作用(IC50 値等)を指標として、2)で合成され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を行った。この際、管腔側タイプの URAT1 発現細胞も同時に比較検討を行った。

4) 尿酸トランスポーターURAT2 Tg マウスの解析

2010 年の URAT2 の候補分子 OAT10 の解析開始後、連携研究者の安西はヒト URAT2 遺伝子を過剰発現させるトランスジェニックマウスを作成し、現在杏林大学にて維持中である。当初は URAT2 尿酸輸送阻害化合物の in vivo 効果判定のために利用する予定であったが、出生直後からの体重や尿酸およびクレアチニン等を中心とした血液・尿生化学検査データの変動を解析した。

4 . 研究成果

これまでに、腎尿細管の尿酸再吸収は管腔側の尿酸トランスポーターURAT1 と血管側の尿酸トランスポーターURATv1 がタンデムになって担う事を明らかにしているが、この両者に遺伝子変異のない家族性腎性低尿酸血症患者が確認されたことで、第三の分子"URAT2"の存在が推測された。本研究は、

URAT2 による尿酸輸送活性の詳細な解析による確認と、URAT2 を分子標的とする新規尿酸降下薬創製のための基盤の確立を目的として行われた。

平成 23 年度は OAT10 の輸送特性が同じく腎臓尿細管管腔側に発現する URAT1 に類似の有機酸交換輸送であることを解明し、平成 24 年度は OAT10 の輸送特性と URAT1 と基質認識の相違点について明確化が可能となり、URAT2 による尿酸輸送阻害薬物の化学構造情報を得るに至った。平成 25 年度は海外研究協力者である Colorado 大学の Wempe 准教授にその情報を送付することで作成された URAT2 による尿酸輸送阻害候補低分子化合物ライブラリー(少量規模)が利用可能となったため、アフリカツメガエル卵母細胞を用いたスクリーニングを実施し、候補化合物の絞り込みを行った。

並行して連携研究者に解析依頼していた Urat2-transgenic (Tg) mice は Urat2 発現が得られなかったことで、オキシニン酸投与により誘発される高尿酸血症モデルマウスの確立を目指したが、時間経過を調べた所、高尿酸血症は一過性であることがわかり、平成 26 年度、さらに新たなモデル動物の確立を目指し、pyrazinamide 投与マウスが一過性など、腎排泄低下型モデルとして相応しいものであることを見出した。補助事業延長期間は終了を迎えたが、前年度に絞り込んだ化合物、そして腎排泄低下型モデルの樹立までたどり着くことができたことは、今後の発展につながる基盤の形成という意味で有意義であった。

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 20 件)

1. Lee EY, Kaneko S, Jutabha P, Zhang X, Seino S, Jomori T, Anzai N, Miki T. Distinct action of the alpha-glucosidase inhibitor miglitol on SGLT3 and GLP1 secretion. *J Endocrinol*. 査読有, 224(3): 205-214, 2015. doi: 10.1530/JOE-14-0555
2. Hayashi K, Jutabha P, Kamai T, Endou H, Anzai N. LAT1 is a central transporter of essential amino acids in human umbilical vein endothelial cells. *J Pharmacol Sci*. 査読有, 124(4):511-3, 2014.
3. Hayashi K, Jutabha P, Endou H, Sagara H, Anzai N. LAT1 Is a Critical Transporter of Essential Amino Acids for Immune Reactions in Activated Human T Cells. *J Immunol*. 査読有, 191(8):4080-5, 2013. doi: 10.4049/jimmunol.1300923
4. Wakui S, Takahashi H, Mutou T, Shirai

- M, Jutabha P, Anzai N, Wempe MF, Kansaku N, Hano H, Inomata T, Endou H. Atypical Leydig cell hyperplasia in adult rats with low T and high LH induced by prenatal Di(n-butyl) phthalate exposure. *Toxicol Pathol.* 査読有, 41(3):480-6, 2013. doi: 10.1177/0192623312457272
5. Wempe MF, Lightner JW, Miller B, Iwen TJ, Rice PJ, Wakui S, Anzai N, Jutabha P, Endou H. Potent human uric acid transporter 1 inhibitors: in vitro and in vivo metabolism and pharmacokinetic studies. *Drug Des Devel Ther.* 査読有, 6:323-39, 2012. doi: 10.2147/DDDT.S35805
 6. Hayashi K, Jutabha P, Endou H, Anzai N. c-Myc is crucial for the expression of LAT1 in MIA Paca-2 human pancreatic cancer cells. *Oncol Rep.* 査読有, 28(3):862-6, 2012.
 7. Anzai N, Jutabha P, Amonpatumrat-Takahashi S, Sakurai H. Recent advances in renal urate transport: characterization of candidate transporters indicated by genome-wide association studies. *Clin Exp Nephrol.* 査読有, 16(1): 89-95, 2012. doi: 10.1007/s10157-011-0532-z
 8. Wempe MF, Rice PJ, Lightner JW, Jutabha P, Hayashi M, Anzai N, Wakui S, Kusuhara H, Sugiyama Y, Endou H. Metabolism and pharmacokinetic studies of JPH203, an L-amino acid transporter 1 (LAT1) selective compound. *Drug Metab Pharmacokinet.* 査読有, 27(1): 155-61, 2012.
 9. Kimura T, Amonpatumrat S, Tsukada A, Fukutomi T, Jutabha P, Thammaprati T, Lee EJ, Ichida K, Anzai N, Sakurai H. Increased expression of *SLC2A9* decreases urate excretion from the kidney. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 査読有, 30(12): 1295-1301, 2011. doi: 10.1080/15257770.2011.628354
 10. Anzai N, Wakui S, Jutabha P, Muto T, Hayashi M, Hayashi K, Domae M, Uchida K, Wempe MF, Endou H. Usefulness of human drug transporter gene-expressing cells for alternatives of pharmacokinetics in man. *AATEX* 査読無, 16(2): 66-73, 2011.
 11. Wakui S, Muto T, Anzai N, Takahashi H, Jutabha P, Sakata A, Wempe MF, Hano H, Endou H. *In vitro* Thermoreversible gel disc quantitative assay of rat angiogenesis. *AATEX* 査読無, 16(2): 59-65, 2011.
 12. Tasic V, Hynes AM, Kitamura K, Cheong HI, Lozanovski VJ, Gucev Z, Jutabha P, Anzai N, Sayer JA. Clinical and functional characterization of URAT1 variants. *PLoS One.* 査読有, 6(12):e28641, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0028641
 13. Wakui S, Motohashi M, Muto T, Takahashi H, Hano H, Jutabha P, Anzai N, Wempe MF, Endou H. Sex-associated difference in estrogen receptor β expression in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric cancers in rats. *Comp Med.* 査読有, 61(5):412-8, 2011.
 14. Wempe MF, Quade B, Jutabha P, Iwen T, Frick M, Rice PJ, Wakui S, Endou H. Human uric acid transporter 1 (hURAT1): An inhibitor structure-activity relationship (SAR) study. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 査読有, 30(12): 1312-23, 2011. doi: 10.1080/15257770.2011.594031
 15. Jutabha P, Anzai N, Wempe MF, Wakui S, Endou H, Sakurai H. Apical voltage-driven urate efflux transporter NPT4 in renal proximal tubule. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 査読有, 30(12): 1302-11, 2011. doi: 10.1080/15257770.2011.616564
 16. Jutabha P, Anzai N, Hayashi K, Domae M, Uchida K, Endou H, Sakurai H. A novel human organic anion transporter NPT4 mediates the transport of ochratoxin A. *J Pharmacol Sci.* 査読有, 116(4): 392-6, 2011.
 17. Wempe MF, Jutabha P, Quade B, Iwen TJ, Frick MM, Ross IR, Rice PJ, Anzai N, Endou H. Developing Potent Human Uric Acid Transporter 1 (hURAT1) Inhibitors. *J Med Chem.* 査読有, 54(8): 2701-13, 2011. doi: 10.1021/jm1015022
 18. Anzai N, Jutabha P, Kimura T, Fukutomi T. Urate Transport: Regulators of serum urate levels in humans. *Curr Rheumatology Rev.* 査読有, 7(2): 123-131, 2011.
 19. Miura D, Anzai N, Jutabha P, Chanluang S, He X, Fukutomi T, Endou H. Human urate transporter 1 (hURAT1) mediates the transport of orotate. *J Physiol Sci.* 査読有, 61(3): 253-7, 2011. doi: 10.1007/s12576-011-0136-0
 20. Jutabha P, Anzai N, Kimura T, Taniguchi A, Urano W, Yamanaka H, Endou H, Sakurai H. Functional analysis of human sodium-phosphate transporter 4 (NPT4/SLC17A3)

polymorphisms. *J Pharmacol Sci.* 査読有, 115(2): 249-53, 2011.

[学会発表](計 2 1 件)

1. Jutabha P, Ouchi M, Otani N, Anzai N. Transport of 4-boronophenylalanine, a BNCT delivery agent, by L-type amino acid transporters 1 and 2. *Experimental Biology 2015*. March 28-April 1, 2015. Boston MA.
2. Jaiyen C, Jutabha P, Srimaroeng C, Anzai N. Inhibition of the organic cation transporter 2 function by green tea catechins. *The 88th Annual meeting of the Japanese Pharmacological Society*. March 18-20, 2015, Nagoya.
3. Jutabha P, Anzai N. Comparison of NPT1 and NPT4: renal drug excretion. *Annual meeting of Dokkyo Medical University, December 6, 2014.*
4. Jutabha P, Anzai N. Inhibitory Effect of Febuxostat, a Non-purine Xanthine Oxidase Inhibitor, on Renal Urate Transporters. *ASN Kidney week 2014*. November 12-15, 2014 Philadelphia, PA.
5. Jutabha P, Anzai N. Inhibitory Effect of Febuxostat, a Non-purine Xanthine Oxidase Inhibitor, on Renal Urate Transporters. *The 130th Kanto Regional Pharmacology meeting*. July 5, 2014, Shinagawa.
6. Jutabha P, Wempe MF, Endou H, Anzai N. Renal secretion of diuretics: Transcellular transport and diuretic-induced hyperuricemia. *APCN 2014*, May 14-17, 2014, Shinagawa.
7. Jaiyen C, Jutabha P, Anzai N, Srimaroeng C. Interaction of green tea catechins with renal organic cation transporter 2. *APCN 2014*, May 14-17, 2014, Shinagawa.
8. Jutabha P, Wempe MF, Endou H, Anzai N. Transcellular secretory transport of diuretic drugs in renal proximal tubule. *The 87th Annual meeting of the Japanese Pharmacological Society*. March 19-21, 2014, Sendai.
9. Jaiyen C, Jutabha P, Anzai N, Srimaroeng C. Interaction of green tea catechins with renal organic cation transport in rat. *The 129th Kanto Regional Pharmacology meeting*. October 20, 2013, Tokyo
10. Jutabha P, Wempe MF, Endou H, Anzai N. Role of a voltage-driven organic anion transporter NPT4 (SLC17A3) for diuretics secretion from renal proximal epithelial cells. *Biomedical Transporters 2013*, August 11-15, 2013. St. Moritz, Switzerland.
11. Jutabha P, Anzai N. Modulation of renal apical voltage-driven organic anion transporter NPT4 function by PDZ domain-containing proteins. *Gordon Conference-Membrane Transport Mechanism 2013*. June 16-23, 2013, Mt. Holyok, MA.
12. Jutabha P, Endou H, Anzai N. Probing *trans*- and *cis*-inhibitory effect of benzbromarone and its metabolite on URAT1-mediated urate uptake. *The 86th Annual meeting of the Japanese Pharmacological Society*. March 21-23, 2013, Fukuoka
13. Jutabha P, Endou H, Anzai N. Comparison of transport properties and expressions of L-type amino acid transporters in human pancreatic cancer-derived cell lines. *The 90th Annual meeting of the Japanese society of Physiology*. March 29-31, 2013. .
14. Jutabha P, Kusuhara H, Sugiyama Y, Endou H, Anzai N. Diuretics transport mediated by human voltage-driven organic anion transporter NPT4: molecular mechanism of diuretics-induced hyperuricemia. *The 46th annual meeting of Japanese Society of Gout and Nucleic Acid Metabolism*. February 2013.
15. Jutabha P, Kusuhara H, Sugiyama Y, Endou H, Anzai N. Transport of angiotensin receptor blocker losartan by human voltage-driven organic anion transporter NPT4: molecular mechanism of its uricosuric effect. *The 46th annual meeting of Japanese Society of Gout and Nucleic Acid Metabolism*. February 2013.
16. Jutabha P, Wempe MF, Endou H, Anzai N. Two renal apical urate transporters demonstrated different transport property for urate. *The 127th Kanto Regional Pharmacology meeting*. October 20, 2012.
17. Jutabha P, Endou H, Anzai N. The different mode of organic anion transport in NPT1/SLC17A1 and NPT4/SLC17A3. *Experimental Biology 2012*, April 21-25, 2012, San Diego.
18. Jutabha P, Endou H, Anzai N. Functional characteristics of sodium-phosphate cotransporters NPT1/SLC17A1 and NPT4/SLC17A3:

The different mode of action for organic anions transport. *The 89th Annual meeting of the Japanese society of Physiology. March 29-31, 2012, Matsumoto*

19. Jutabha P., Kusuhara H, Sugiyama Y, Endou H, Anzai N. An angiotensin receptor blocker, losartan, is transported by human voltage-driven organic anion transporter NPT4. *The 85th Annual meeting of the Japanese Pharmacological Society. March 14-16, 2012, Kyoto*
20. Jutabha P., Kusuhara H, Sugiyama Y, Endou H, Anzai N. Diuretics-induced hyperuricemia: The interaction on renal proximal tubule organic anion efflux transporter NPT4/SLC17A3. *The 85th Annual meeting of the Japanese Pharmacological Society. March 14-16, 2012, Kyoto*
21. Jutabha P., Endou H, Anzai N. Variations of transport properties and expressions of L-type amino acid transporters in human pancreatic cancer cells. *The 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 3-5, 2011, Nagoya*

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等：該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

Jutabha Promsuk (JUTABHA PROMSUK)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号： 9 0 5 4 1 7 4 8

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

安西 尚彦 (ANZAI NAHIKO)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号： 7 0 2 7 6 0 5 4

木村 徹 (KIMURA TORU)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号： 3 0 4 3 3 7 2 5

(4) 研究協力者

Michael F. Wempe (WEMPE MICHAEL F.)

米国 Colorado 大学薬理学・教授

Ormjai Taejarernwiryakul (TAEJARERN
WIRIYAKUL ORMJAI)

獨協医科大学・医学部・研究生

Chaliya Jaiyen (JAIYEN CHALIYA)

獨協医科大学・医学部・研究生