

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591205

研究課題名(和文) 血清尿酸値に影響を及ぼす遺伝子の同定と解析

研究課題名(英文) Identification and analysis of genes influencing serum uric acid levels

研究代表者

市田 公美 (Ichida, Kimiyoshi)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80183169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：尿酸排泄性トランスポーターのABCG2の機能は、機能が喪失するQ126Xと半減するQ141Kの組み合わせにより推定可能である。ABCG2機能低下に従い尿中尿酸排泄量が増加することとAbcg2ノックアウトマウスの検討から、ABCG2の機能低下により腸管からのABCG2を介した尿酸排泄が減少し高尿酸血症をきたし、代わりに腎臓からの尿酸排泄が増加する(腎外尿酸排泄低下型)という新たな高尿酸血症発症機序を明らかにした。さらに、ABCG2機能低下は痛風の若年発症に関与し、軽度のABCG2機能低下は排泄低下型高尿酸血症を発症しやすく、高度になると顕著な腎外排泄低下型高尿酸血症を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A function of ABCG2, urate excretive transporter, is evaluated by the combination of the no-functional SNP, Q126X and the half functional SNP, Q141K. The estimated ABCG2 dysfunction leads to the urinary urate excretion increase and this mechanism was elucidated using Abcg2 knock-out mice. As a new mechanism for hyperuricemia, we demonstrated that hyperuricemia results from the intestinal urate excretion decrease via ABCG2, leading to urinary urate excretion increase (extra-renal urate underexcretion type hyperuricemia). We also indicated that ABCG2 dysfunction is related with early-onset gout and that the slight and mild dysfunctions mainly cause underexcretion type hyperuricemia, while severe dysfunction causes extra-renal urate underexcretion type hyperuricemia.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓学

キーワード：高尿酸血症 痛風 尿酸トランスポーター ABCG2 腎外排泄低下型高尿酸血症

1. 研究開始当初の背景

高尿酸血症は痛風や尿路結石の原因となるだけでなく、心血管疾患発症に関する危険因子または腎疾患における腎障害の促進因子となることが明らかになっている。一方、腎臓からの尿酸の排泄が亢進し、低尿酸血症を来す先天性疾患である腎性低尿酸血症では、運動により高率に運動後急性腎不全を発症することが明らかになっている。このように血清尿酸値を一定の範囲に制御することが重要である。血清尿酸値は、飲酒や肥満等の環境因子の影響を受けるが家系内発症が多く、遺伝因子の影響も強く受けることが知られている。これが同様な環境因子にありながら、高尿酸血症を認める人と認めない人がいる理由となっている。したがって、血清尿酸値に影響を与える遺伝子を明らかにすることが、効率の良い高尿酸血症治療や生活指導に結びつくことになる。血清尿酸値は、尿酸の産生量と排泄量のバランスにより決定され、尿酸産生量の増加による高尿酸血症を産生過剰型高尿酸血症、尿酸排泄能の低下によるものを排泄低下型高尿酸血症という。軽度の尿酸産生量増加の場合、尿酸排泄が増加することにより血清尿酸値の上昇を抑制できるため、尿酸排泄能低下が高尿酸血症の主な原因となっている。そして、尿酸排泄の70-80%が腎臓を介して行われるため、腎臓における尿酸排泄能が主に血清尿酸値を規定している。腎臓において、尿酸は再吸収と分泌の両方向性のトランスポーターによる輸送が行われ、糸球体を通じた尿酸の約90%は再吸収される。したがって、尿酸再吸収の亢進または分泌の低下が存在すると、高尿酸血症をきたすことになる。この腎臓における尿酸輸送の機序や高尿酸血症の原因を明らかにするために、尿酸トランスポーターの同定が必要であった。我々は、2002年に近位尿細管の管腔側膜に発現し、尿酸の再吸収に働くトランスポーターであるurate transporter 1 (URAT1)のクローニングに成功した (Nature, 417, 447, 2002)。同時にURAT1が、尿中への尿酸排泄が亢進する腎性低尿酸血症の責任遺伝子であり、血清尿酸値を規定する主なトランスポーターであることを示した。その後、URAT1についての基礎的検討を行い、さらに腎性低尿酸血症症例を集め、病態及びURAT1の遺伝子変異の特徴を明らかにし、疾患概念を確立した (J Am Soc Nephrol 15, 164, 2004, J Am Soc Nephrol 15, 261, 2004, Clin Genet 74, 243, 2008)。

URAT1の同定はその後の尿酸輸送研究の契機となり、尿酸輸送能を持つトランスポーターとして、我々は基底側膜に発現するOAT1 (Kidney Int 63, 143, 2003)と管腔側膜に発現するOAT4 (痛風と核酸代謝 25, 113, 2001)を報告し、他のグループにより管腔側膜に発現するMRP4とNPT1と基底側膜に発現するOAT3が報告された。しかし、種々

のトランスポーターの尿酸輸送能を確認するにとどまり、それらがそれぞれ生体内においてどの程度尿酸輸送を行っているのかは明らかではなかった。

2007年以降、全ゲノム関連解析により血清尿酸値への関連が推定される遺伝子が検討され、本年までに新たな遺伝子としてGLUT9/URATv1、ABCG2、NPT1、NPT4、PDZK1、MCT9、GKRP、LRP2が報告され、その多くがトランスポーターである。我々は、そのデータを元に、グルコーストランスポーターのファミリーとして同定されていたGLUT9/URATv1が、尿酸再吸収性トランスポーターとして働き、腎性低尿酸血症のもう一つの責任遺伝子であることを明らかにした (J Biol Chem 283, 26834, 2008)。最近では、抗癌剤の耐性に関与するとして同定されていたABCトランスポーターであるABCG2が尿酸輸送能を持ち、高頻度に認められる機能低下性のABCG2のSNPsが高尿酸血症発症に強く関与していることを明らかにした (Science Transl Med 1, 5ra11, 2009)。ABCG2に関する解析結果は、高尿酸血症に関連するトランスポーターの初めての同定であると同時に、生活習慣の影響で高尿酸血症が発症したと判断される患者の多くにも、ABCG2機能低下が多く含まれ、高尿酸血症発症に遺伝因子が想像以上に強く関与していることを示した。

2. 研究の目的

血清尿酸値は、遺伝的素因と環境因子の両方の影響を受ける。現在、高尿酸血症は、痛風だけでなく、心血管疾患や腎疾患等の発症に関する危険因子または促進因子であることが明らかになっている。本研究は、痛風・高尿酸血症発症における各尿酸トランスポーター異常の関与の程度などの詳細を解明する。これにより、各個人の痛風・高尿酸血症の発症リスクを明らかにすることが可能となり、効率の良い生活指導を行える。

3. 研究の方法

研究参加に対し、文章により同意の得られた575例の痛風患者を含む644例の男性高尿酸血症患者に対し、ABCG2のSNPsとしてQ126XとQ141K、薬物治療開始前の血清尿酸値、尿中尿酸排泄量 (UUE) 及び尿酸クリアランス、尿酸クリアランスの分画排泄率 (Cua/Ccr) を検討した。統計分析として、ハプロタイプ推定はEMアルゴリズムを用いた。ABCG2機能とUUEの関連を調べるために、UUEを従属変数として、ABCG2の推定機能を独立変数として用い、単純線形回帰分析を行った。ABCG2機能と産生過剰型高尿酸血症との関連を評価するために、それぞれの機能カテゴリーでの産生過剰型高尿酸血症の割合を、完全機能カテゴリーでのそれで割って、リスク比 (RR) とその95%CIを求めた。産生過剰型高尿酸血症に対するABCG2機能低下の補正RRを得るために、ポアソン回帰分析を行

った。考えられる交絡因子として、body mass index (BMI)、アルコール摂取、尿酸関連遺伝子の一塩基多型 (rs11722228 (GLUT9/SLC2A9)、rs506338 (URAT1/SLC22A12)、rs12129861 (PDZK1)) を用いた。今回の統計分析で行ったすべての計算は、ソフトウェア R (バージョン 2.8.1) と SPSS (Windows 版バージョン 16.0J) (SPSS) を用いて行った。

Abcg2 ノックアウトマウスは、以前の報告に従い作成し、体重 27-33g の雄の *Abcg2* ノックアウトマウス (FVB.129P2-*Abcg2*、Taconic) と対照群の FVB マウスに対して、2.0% (w/w) のオキソソ酸カリウムを一週間以上食べさせた。採取した血清と尿サンプル中の尿酸とクレアチニン濃度は、QuantiChrom Uric Acid Assay Kit (Bioassay systems) と Creatinine Assay Kit (Cayman Chemical Company) を用いて測定した。腸管尿酸排泄は、十二指腸の上部と空腸の中部にポリエチレンチューブを挿入して、腸の上半分で腸管のループを形成し、尿酸濃度を定量した。

4. 研究成果

高尿酸血症症例における *ABCG2* の SNP である Q126X のアレル頻度は 4.1% であり、Q141K のアレル頻度は 45.9% であった。この結果は、Q126X 及び Q141K とともに、既知の健常者における両アレル頻度よりも高い値であった。Q126X により *ABCG2* の機能は約 50% に低下し、Q141K により *ABCG2* の機能は欠損する。これら Q126X 及び Q141K のアレル頻度が、高尿酸血症症例において高いことは、高尿酸血症の発症に *ABCG2* の機能低下が深く関わっていることを示していた。*ABCG2* の機能低下は痛風や高尿酸血症のリスクを上昇させることを以前報告した。*ABCG2* 遺伝子において、頻度が高く機能低下をきたす機能欠失型変異 Q126X と機能半減型変異 Q141K の組み合わせを用い、高尿酸血症男性 644 人の *ABCG2* 機能を推定し、尿中尿酸排泄量と尿酸クリアランスと比較検討した。*ABCG2* の機能低下により、排泄低下型高尿酸血症が増加することが予想されたが、逆に *ABCG2* の尿酸排泄機能低下は、尿への尿酸排泄量を有意に増加させ、尿酸産生過剰による高尿酸血症 (産生過剰型及び混合型高尿酸血症) の頻度を増加させた。特に重度の *ABCG2* の機能低下では、産生過剰による高尿酸血症のリスクが増加し、リスク比 (RR) は 2.35 (95% CI 1.86 - 2.97; $P=3.32 \times 10^{-7}$) を示した。さらに、中程度と軽度の機能低下でも、それぞれ RR が 1.66 (95% CI 1.32 - 2.10; $P=8.58 \times 10^{-6}$) と 1.36 (95% CI 1.09 - 1.71; $P=4.55 \times 10^{-3}$) であった。

これらの結果は、尿酸の腎外排泄が関与している可能性を示していたが、腸管内の尿酸は、細菌叢によって速やかに代謝されるため、ヒトで腸管からの尿酸排泄評価は困難であった。そのため、尿酸分解酵素ウリカーゼ阻害剤であるオキソソ酸処理を行った *Abcg2* ノ

ックアウトマウスを用いた。*Abcg2* ノックアウトマウスでは、血清尿酸値上昇および腎臓からの尿酸排泄量増加と、腸管からの尿酸排泄量の低下が見られた。腎外組織での *ABCG2* 発現レベルが高いことから、今回のデータは、従来の概念における尿酸産生過剰型高尿酸血症は、腎外排泄低下型という新しい病型と、真の尿酸産生過剰型の 2 つのサブタイプからなる腎負荷型であることを示していた。

さらに、*ABCG2* 機能異常が排泄低下型高尿酸血症の発症に関与しているかについても検討した。その結果、高尿酸血症全体でみた場合、*ABCG2* 機能が低下するに従い、高尿酸血症のリスクが上昇していた。同様に、排泄低下型高尿酸血症だけで検討しても、腎外排泄低下型高尿酸血症ほどではないものの *ABCG2* 機能低下は、排泄低下型高尿酸血症発症のリスクになっていることが明らかになった。しかし、*ABCG2* 機能が 25% 以下に限っては症例数が少なく、有意ではなかった。以上のことから、*ABCG2* 機能低下は腎外排泄低下型と排泄低下型高尿酸血症の両方に対してリスクとなり、著しい機能低下に関しては、腎外排泄低下型が強くなることから排泄低下型ではなく腎外排泄低下型のリスクとなることが明らかになった。さらに、*ABCG2* 機能と痛風発症年齢の関係を 705 人の男性痛風患者と 1887 人のコントロールで検討した。その結果、*ABCG2* 機能が低下するに従い、痛風発症年齢が若年化することが明らかになった。

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 63 件)

平成 23 年度

1. Novel homozygous insertion in SLC2A9 gene caused renal hypouricemia. Stiburkova B, Ichida K, Sebesta I. Mol Genet Metab. 2011; 102(4):430-5.
2. Prenatal brain disruption in molybdenum cofactor deficiency. Carmi-Nawi N, Malinge G, Mandel H, Ichida K, Lerman-Sagie T, Lev D. J Child Neurol. 2011; 26(4):460-4.
3. Simultaneous determination of selenomethionine enantiomers in biological fluids by stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry.

Matsukawa T, Hasegawa H, Shinohara Y, Kobayashi J, Shinohara A, Chiba M, **Ichida K**, Yokoyama K. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011; 879(29):3253-8.

4. Two cases of nephrotic syndrome (NS)-induced acute kidney injury (AKI) associated with renal hypouricemia. Takeda Y, Abe A, Nakanishi S, Umezumi M, Hirano K, Hayakawa H, Ohno I, **Ichida K**, Yamaguchi Y, Hosoya T, Fukagawa M. *Clin Nephrol.* 2011; 76(1):78-82.

平成24年度

5. Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia. **Ichida K**, Matsuo H, Takada T, Nakayama A, Murakami K, Shimizu T, Yamanashi Y, Kasuga H, Nakashima H, Nakamura T, Takada Y, Kawamura Y, Inoue H, Okada C, Utsumi Y, Ikebuchi Y, Ito K, Nakamura M, Shinohara Y, Hosoyamada M, Sakurai Y, Shinomiya N, Hosoya T, Suzuki H. *Nat Commun.* 2012; 3:764.

平成25年度

6. Novel allelic variants and evidence for a prevalent mutation in URAT1 causing renal hypouricemia: biochemical, genetics and functional analysis. Stiburkova B, Sebesta I, **Ichida K**, Nakamura M, Hulkova H, Krylov V, Kryspinova L, Jahnova H. *Eur J Hum Genet.* 2013; 21(10):1067-73.
7. Common dysfunctional variants in ABCG2 are a major cause of early-onset gout. Matsuo H, **Ichida K**, Takada T, Nakayama A, Nakashima H, Nakamura T, Kawamura Y, Takada Y, Yamamoto K, Inoue H,

Oikawa Y, Naito M, Hishida A, Wakai K, Okada C, Shimizu S, Sakiyama M, Chiba T, Ogata H, Niwa K, Hosoyamada M, Mori A, Hamajima N, Suzuki H, Kanai Y, Sakurai Y, Hosoya T, Shimizu T, Shinomiya N. *Sci Rep.* 2013; 3:2014.

8. Common missense variant of monocarboxylate transporter 9 (MCT9/SLC16A9) gene is associated with renal overload gout, but not with all gout susceptibility. Nakayama A, Matsuo H, Shimizu T, Ogata H, Takada Y, Nakashima H, Nakamura T, Shimizu S, Chiba T, Sakiyama M, Ushiyama C, Takada T, Inoue K, Kawai S, Hishida A, Wakai K, Hamajima N, **Ichida K**, Sakurai Y, Kato Y, Shimizu T, Shinomiya N. *Hum Cell.* 2013;26(4):133-6.
9. Ependymal cells of the mouse brain express urate transporter 1 (URAT1). Tomioka NH, Nakamura M, Doshi M, Deguchi Y, **Ichida K**, Morisaki T, Hosoyamada M. *Fluids Barriers CNS.* 2013; 10(1):31.
10. A common variant of organic anion transporter 4 (OAT4/SLC22A11) gene is associated with renal underexcretion type gout. Sakiyama M, Matsuo H, Shimizu S, Nakashima H, Nakayama A, Chiba T, Naito M, Takada T, Suzuki H, Hamajima N, **Ichida K**, Shimizu T, Shinomiya N. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2014; 29(2):208-10.
11. A common variant of leucine-rich repeat-containing 16A (LRRC16A) gene is associated with gout susceptibility. Sakiyama M, Matsuo H, Shimizu S, Chiba T, Nakayama A, Takada Y, Nakamura T, Takada T, Morita E, Naito M, Wakai K, Inoue H, Tatsukawa S, Sato J, Shimono K, Makino T, Satoh T, Suzuki H, Kanai Y, Hamajima N, Sakurai Y, **Ichida K**, Shimizu

- T, Shinomiya N. Hum Cell. 2014; 27(1):1-4.
12. ABCG2 dysfunction causes hyperuricemia due to both renal urate underexcretion and renal urate overload. Matsuo H, Nakayama A, Sakiyama M, Chiba T, Shimizu S, Kawamura Y, Nakashima H, Nakamura T, Takada Y, Oikawa Y, Takada T, Nakaoka H, Abe J, Inoue H, Wakai K, Kawai S, Guang Y, Nakagawa H, Ito T, Niwa K, Yamamoto K, Sakurai Y, Suzuki H, Hosoya T, **Ichida K**, Shimizu T, Shinomiya N. Sci Rep. 2014; 4:3755.

〔学会発表〕(計 120 件)

平成 23 年度

1. Changes in uric acid levels with dysfunctional ABCG2 and novel pathophysiological model of hyperuricemia, Nakayama A, Matsuo H, **Ichida K**, Takada T, Takada Y, Nakashima H, Nakamura T, Sakurai Y, Hamajima N, Suzuki H, Shinomiya N, 4th Federation of European Biochemical Societies (FEBS) special meeting on ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins (ABC2012), Innsbruck, Austria
2. 新規ヒト尿酸ノ有機酸トランスポーター-URAT2 の分子同定, 安西尚彦, Jutabha P, 木村徹, 北村健一郎, **市田公美**, 第 54 回日本腎臓学会学術総会, 横浜
3. 大規模健診サンプルを用いた ABCG2 遺伝子多型と血清尿酸値との関連解析, 中山昌喜, 松尾洋孝, 市田公美, 高田龍平, 井上寛規, 岡田千沙, 四ノ宮成祥, 第 45 回日本痛風・核酸代謝学会学術集会, 奈良

平成 24 年度

4. Novel common mechanism of hyperuricemia by decreased extra-renal urate excretion, **Ichida K**, Matsuo H,

- Takada T, Nakayama A, Murakami K, Shimizu T, Yamanashi Y, Kasuga H, Nakashima H, Nakamura T, Takada Y, Kawamura Y, Utsumi Y, Nakamura M, Hosoyamada M, Sakurai Y, Shinomiya N, Hosoya T, Suzuki H, European Human Genetics Conference 2012, Nürnberg, Germany
5. Common dysfunctional variants of ABCG2 decrease extra-renal urate excretion and cause hyperuricemia, Matsuo H, Takada T, Nakayama A, Shimizu T, Kasuga H, Nakashima H, Nakamura T, Takada Y, Kawamura Y, Utsumi Y, Ogata H, Nakamura M, Sakurai Y, Hosoya T, Shinomiya N, Suzuki H, **Ichida K**, 62nd The American Society of Human Genetics Annual Meeting, San Francisco, USA
 6. 腎外排泄低下型高尿酸血症, **市田公美**, 第 45 回日本痛風・核酸代謝学会総会, 東京
 7. 尿酸の腸管排泄低下は高尿酸血症の主要な新規機序である, **市田公美**, 松尾洋孝, 高田龍平, 中山昌喜, 清水徹, 春日裕志, 中島宏, 中村好宏, 高田雄三, 河村優輔, 内海由貴, 中村真希子, 櫻井裕, 細谷龍男, 四ノ宮成祥, 鈴木洋史, 第 99 回日本消化器病学会総会, 鹿児島

平成 25 年度

8. ABCG2 dysfunction increases the risk of renal overload hyperuricemia, Matsuo H, Takada T, Nakayama A, Shimizu T, Sakiyama M, Hosoya T, Shinomiya N, **Ichida K**, 15th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man, Madrid, Spain
9. Dysfunction of a urate exporter ABCG2 as a major risk factor of hyperuricemia and gout, Takada T, **Ichida K**, Matsuo H, Nakayama

- A, Suzuki H, 15th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man, Madrid, Spain
10. Common Dysfunctional Variants of ABCG2 Decrease Extra-renal Urate Excretion and Cause Hyperuricemia, **Ichida K**, Matsuo H, Takada T, Nakayama A, Shimizu T, Nakashima H, Nakamura T, Takada Y, Kawamura Y, Sakurai Y, Shinomiya N, Suzuki H, Hosoya T, The 2nd International Congress on Personalized Medicine, Paris, France
 11. ABCG2/BCRP dysfunction as a major risk factor of gout, Takada T, Matsuo H, **Ichida K**, Nakayama A, Suzuki H, BioMedical Transporters 2013, St. Moritz, Switzerland
 12. Common dysfunctional variants of ABCG2 cause renal overload hyperuricemia, Matsuo H, Takada T, Nakayama A, Shimizu T, Nakashima H, Nakamura T, Takada Y, Hosoya T, Shinomiya N, **Ichida K**, Symposium of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology 2013, Bali, Indonesia
 13. Common dysfunctional variants of urate exporter gene ABCG2/BCRP are a major cause of early-onset gout, Matsuo H, **Ichida K**, Takada T, Nakayama A, Nakashima H, Nakamura T, Kawamura Y, Takada Y, Yamamoto K, Shimizu S, Sakiyama M, Chiba T, Hamajima N, Sakurai Y, Shinomiya N, The American Society of Human Genetics 63rd Annual Meeting, Boston, USA
 14. A common mechanism of gout/hyperuricemia with decreased urate excretion from intestine, Nakayama A, Matsuo H, Hosoya T, Shinomiya N, **Ichida K**, 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会/第 22 回国際リウマチシンポジウム,

京都

15. OAT4 遺伝子変異は腎排泄低下型の痛風と関連する, 崎山真幸, 松尾洋孝, 清水聖子, 中山昌喜, 高田龍平, **市田公美**, 清水徹, 四ノ宮成祥, 第 47 回日本痛風・核酸代謝学会総会, 神戸
16. ABCG2 遺伝子の機能低下型変異は若年発症痛風の主要な病因である, 中山昌喜, 松尾洋孝, **市田公美**, 高田龍平, 高田雄三, 井上寛規, 清水聖子, 崎山真幸, 細山田真, 横尾隆, 細谷龍男, 清水徹, 四ノ宮成祥, 第 47 回日本痛風・核酸代謝学会総会, 神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市田 公美 (ICHIDA KIMIYOSHI)
東京薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 80183169

(2) 研究分担者

JUTABHA Promsuk ()
獨協医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90541748

木村 徹 (KIMURA TORU)

杏林大学・医学部・講師
研究者番号: 30433725

(3) 連携研究者

細山田 真 (HOSOYAMADA MAKOTO)
帝京大学・薬学部・教授
研究者番号: 00291659

松尾 洋孝 (MATSUO HIROTAKA)

防衛医科大学校・医学部・講師
研究者番号: 00528292

中村 真希子 (NAKAMURA MAKIKO)

東京薬科大学・薬学部・助教
研究者番号: 80447557

中村 好宏 (NAKAMURA YOSHIHIRO)

防衛医科大学校・医学部・准教授
研究者番号: 60415255