

令和元年5月27日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15500

研究課題名(和文) 高尿酸血症によるABCG2の翻訳後修飾異常と代謝性疾患の連関による血管障害機構

研究課題名(英文) Mechanism of vascular injury due to interaction between hyperuricemia and metabolic diseases

研究代表者

小森 久和 (Komori, Hisakazu)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：00634180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：高尿酸血症は心血管疾患の危険因子の一つと考えられていることから、本研究では尿酸が血管内皮細胞内の尿酸濃度の調節機構に及ぼす影響を検討した。高尿酸血症時の尿酸濃度処置によりABCG2の内在化が引き起こされ、形質膜での発現減少することで尿酸の細胞外排出が低下して細胞が障害されることを見出した。また、高尿酸血症モデルラットの腎臓においてMate1およびOct2の発現減少が基質化合物の体内動態を変化させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高尿酸血症はメタボリックシンドロームをはじめ、様々な慢性炎症性疾患と併発することで病態の悪循環を引き起こすと考えられている。本検討で尿酸により内在化することが示されたABCG2は尿酸以外にも慢性腎臓病時に増加する尿毒症物質などの生体化合物や抗がん剤等の薬物を基質とすることから、高尿酸血症時のABCG2の内在化が他の病態進展や薬物動態変動に寄与している可能性が考えられる。今後、ABCG2におけるどのような翻訳後修飾が局在を変化させるかを明らかにし、その修飾を調節する薬物を見出すことで、高尿酸血症に併発する疾患の増悪を抑制に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Since hyperuricemia is considered to be one of the risk factors for cardiovascular disease, this study examined the effect of uric acid on the regulation mechanism of uric acid concentration in vascular endothelial cells. It was found that the treatment with uric acid at hyperuricemia caused internalization of ABCG2, and the decrease in the expression at the plasma membrane reduced the extracellular excretion of uric acid and resulted in cell damage. In addition, it was suggested that decreased expression of Mate1 and Oct2 alters the pharmacokinetics of the substrate compound in the kidney of hyperuricemia model rats.

研究分野：トランスポーターの生理機能

キーワード：ABCG2 高尿酸血症 酸化ストレス 細胞内局在

様式 C-19, F-19-1, Z-19, CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心血管疾患及び慢性腎臓病の危険因子であるメタボリックシンドロームは、内臓型肥満を基盤として高血圧、高血糖あるいは脂質代謝異常を併せ持つ。これらは慢性炎症を背景とした臓器連関によって病態の悪循環を引き起こされている。また、近年では、高尿酸血症も慢性炎症の一因として考えられている (Fig. 1)。

尿酸は正常人血中に 3-7 mg/dL 存在し、血清中ではラジカル消去能を発揮して、抗酸化に寄与している。一方で、細胞内へ移行すると NADPH oxidase を活性化して活性酸素種 (ROS) を産生させ、細胞障害を引き起こす。従って、高尿酸血症自体ではなく、それによって生じる細胞内尿酸濃度の上昇が細胞障害を引き起こし、慢性炎症の悪循環に繋がると考えられる。動脈硬化症及び慢性腎臓病に伴う心血管障害では、尿酸による血管内皮細胞の傷害を起点として、内皮の肥厚、平滑筋細胞の過増殖が引き起こされる (So and Thorens, *J. Clin. Invest.*, 2010)。しかし、尿酸が健常時でも血中に存在することを考慮すると、常に尿酸が細胞を傷害しているとは考えにくい。

尿酸は形質膜に発現するトランスポーターを介して細胞内外を移行するため、細胞内の尿酸濃度はトランスポーターによって恒常性が維持されていると考えられている。そこで、高尿酸血症時にはトランスポーター活性が変動することで細胞内の尿酸濃度調節が破綻して細胞障害が生じるのではないかと仮説を立てた。

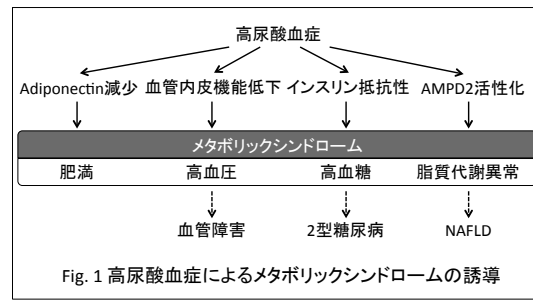


Fig. 1 高尿酸血症によるメタボリックシンドロームの誘導

2. 研究の目的

血清尿酸値の上昇によって血管障害が引き起こされるメカニズムを明らかにするため、尿酸が細胞内の尿酸濃度及びその調節機構に及ぼす影響を検討した。また、慢性腎臓病と高尿酸血症はしばしば併発することから、高尿酸血症によって変動する薬物動態を探索するため、腎臓における薬物トランスポーターの発現変動を評価した。

3. 研究の方法

血管の恒常性維持には内皮細胞機能が重要であることから、本研究ではヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用い、正常及び高尿酸血症濃度に相当する濃度として 5 及び 10 mg/dL の尿酸で処置した。細胞内への尿酸取り込み試験には ¹⁴C 標識尿酸を用いた。HUVEC における尿酸トランスポーターの発現は RT-PCR 及び Western blotting により評価した。形質膜に発現するトランスポーターは flow cytometry あるいは細胞表面ビオチン化法により発現量を評価した。尿酸によって惹起される酸化ストレスは細胞内 ROS プローブとして CM-H₂-DCFDA を用いて検出した。

高尿酸血症モデルは oxonic acid 及び adenine をラットに 10 日間経口投与して作成し、血清尿酸値は HPLC によって定量することでモデルの妥当性を確認した。摘出した腎臓における薬物トランスポーター発現量の変化は定量的 RT-PCR 及び Western blotting により評価した。変動したトランスポーターの基質化合物は静脈投与した後に規定時間に採血、あるいは尿を回収し、LC-MS/MS により定量した。

4. 研究成果

正常濃度として 5 mg/dL 及び高尿酸血症濃度に相当する 15 mg/dL の尿酸で 12 時間前培養した HUVEC において、¹⁴C 標識尿酸の細胞内蓄積量は、5 mg/dL では未処理群と比較して増加しなかったが、15 mg/dL では約 1.5 倍上昇した。また尿酸前処置は ¹⁴C 標識尿酸の初期取り込みには影響しなかったことから、高濃度の尿酸処置によって細胞内尿酸の排出が減少することが示唆された。

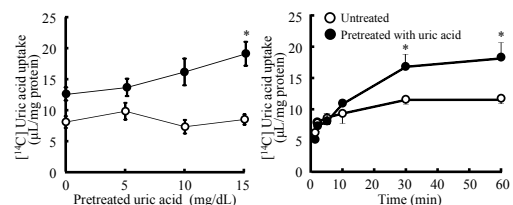


Fig. 2 尿酸前処置による¹⁴C標識尿酸の細胞内蓄積増大

尿酸を基質とする報告のあるトランスポーターの発現を HUVEC においてスクリーニングした結果、SLC トランスポーターでは SLC2A9 及び OAT10, ABC トランスポーターでは ABCC4 及び ABCG2 の発現が見られた。siRNA によりこれら ABC トランスポーターの発現を抑制したところ、細胞内尿酸蓄積及び細胞内酸化ストレスの増大が見られたことから、ABCC4 及び ABCG2 は HUVEC において尿酸排出に寄与していることが示された。

尿酸処置による ABCC4 及び ABCG2 の発現量への影響を検討するために、形質膜及び細胞全体での発現量を比較した。細胞全体での発現量は 5 及び 15 mg/dL の尿酸処置下で両トランスポーター共に mRNA 及びタンパク質の発現レベルに有意な変化が見られなかった。形質膜発現において、5 mg/dL では両トランスポーターとも細胞膜及び全体での発現変化は見られな

かった。15 mg/dL では ABCG2 の細胞膜発現は変化が見られなかったが、ABCG2 は有意な減少が見られた (Fig. 2)。実際、ABCG2 基質 pheophorbide a の細胞蓄積は尿酸処置濃度依存的に減少した。したがって、高濃度の尿酸濃度で処置した際に尿酸蓄積が亢進する原因に、ABCG2 の発現減少ではなく細胞膜発現の減少、すなわち局在の変化が寄与している可能性が示された。

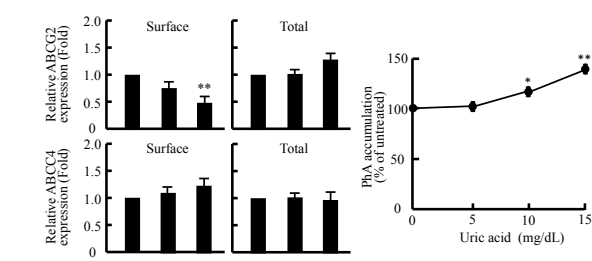


Fig. 3 尿酸処置によるABCG2の形質膜発現低下及び基質の細胞内蓄積亢進

PI3K/Akt 経路の阻害は ABCG2 の転写や翻訳に影響することなく、局在を変化させることで ABCG2 の内在下を引き起こすことが報告されている (Imai *et al*, *Oncol. Rep.*, 2012)。そこで、尿酸処置下の Akt のリン酸化レベルを検討したところ、尿酸 5 mg/dL では変化しなかったのに対し、15 mg/dL でリン酸化 Akt が減少した (Fig. 3)。抗酸化剤 N-acetylcystein 存在下では尿酸による Akt のリン酸化阻害が抑制されたことから、尿酸によって惹起される細胞内の ROS が寄与していることが示唆された。実際、尿酸処置によって減少した ABCG2 の細胞表面発現は N-acetylcystein 存在下で有意に回復した。

このように、高尿酸血症により血管傷害が引き起こされる背景として、高濃度の尿酸が細胞内で酸化ストレスを誘起し、Akt のリン酸化を阻害することにより排出輸送体 ABCG2 の細胞膜発現量が低下し、細胞内の尿酸蓄積を増大させていることが示された (Fig. 4)

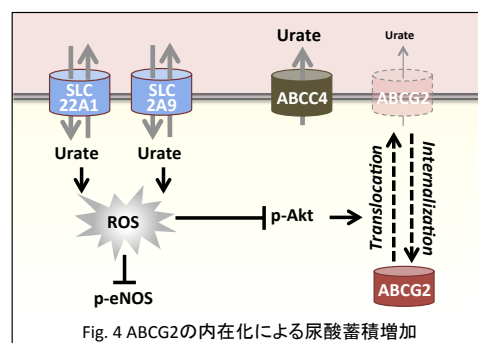


Fig. 4 ABCG2の内在化による尿酸蓄積増加

血管障害の他にも血清尿酸値の上昇によってトランスポーターの発現が変動し、薬物動態に影響を及ぼす事例を探索するために、高尿酸血症モデルラットを作成した。摘出した腎臓において、Mate1, Oat1, Oct2, Urat1, Pept1 の mRNA 発現が減少していた。薬物の腎排泄に重要な Mate1, Oat1 及び Oct2 の基質化合物の体内動態を評価したところ、Mate1 基質の cephalexin 及び creatine で腎クリアランス低下及び腎組織蓄積増大、Oct2 基質の metformin で腎組織蓄積増加がみられた。このように、高尿酸血症は Mate1 及び Oct2 の発現変化を介して、基質化合物の体内動態を変化させることが示唆された。

ABCG2 の異常は、尿酸、IS、ポルフィリンなど基質の蓄積増大を引き起こし、痛風、血管障害、光過敏症などを引き起こす。また、ABCG2 は抗がん剤などの薬物の排出にも寄与し、薬剤耐性の大きな要因となっている。したがって、ABCG2 の局在を制御することができれば、基質の蓄積量を調節することができる。一般的に分子の発現は、転写・転写後・翻訳・翻訳後で調節を受ける。転写から翻訳過程での調節は数分から数日をかけて起きる長期的制御であり、翻訳後修飾は数分から数時間で起きる短期的制御である。そのため、薬物を用いて輸送体の機能を調節するには、速やかに制御できる翻訳後修飾が有用なターゲットである。今後は ABCG2 におけるどのような翻訳後修飾が局在を変化させるかを明らかにし、その修飾を調節する薬物を見出すことが、高尿酸血症に併発する疾患の増悪を抑制するために必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kei Nishizawa, Noriaki Yoda, Fumi Morokado, Hisakazu Komori, Takeo Nakanishi, Ikumi Tamai. Changes of drug pharmacokinetics mediated by downregulation of kidney organic cation transporters Mate1 and Oct2 in a rat model of hyperuricemia. *PLoS One*. 査読有, 2019, 5; 14(4): e0214862.
doi: 10.1371/journal.pone.0214862
- ② Hisakazu Komori, Kazuyuki Yamada, Ikumi Tamai. Hyperuricemia enhances intracellular urate accumulation via down-regulation of cell-surface BCRP/ABCG2 expression in vascular endothelial cells. *Biochimica Biophysica et Acta – Biomembrane*. 査読有, 2018, 1860(5): 973-980.
doi: 10.1016/j.bbmem.2018.01.006.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

金沢大学 医薬保健研究域薬学系 薬物動態学研究室ホームページ
<http://dmpkatku.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8 桁）：

(2)研究協力者

氏名：玉井 郁巳
ローマ字氏名：(Tamai Ikumi)

氏名：中西 猛夫
ローマ字氏名：(Nakanishi Takeo)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。