

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390044

研究課題名（和文）尿酸動態調節機構の解明に基づく血清尿酸値変動評価システムの樹立

研究課題名（英文）Clarification and evaluation of regulation mechanism of uric acid

研究代表者

玉井 郁巳 (TAMAI IKUMI)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：20155237

研究成果の概要（和文）：

尿酸調節に働く腎臓の新規トランスポーターならびに薬物との相互作用を明確にするとともに、解析モデルとしてラットの有用性をラット尿酸トランスポーターの詳細を解析することにより明らかにした。さらにヒトへの展開を目的とした PET プローブの合成ならびに腎外排泄経路として消化管の重要性を分子論・速度論的に明確にした。本成果は今後の尿酸変動機構の解析並びに高尿酸血症との治療薬の探索・評価に有用である。

研究成果の概要（英文）：

Transporter molecule that control renal handling of uric acid and effect of uricosuric- and anti-uricosuric drugs were analyzed using in vitro and in vivo model. OAT2 was newly found as the uric acid transporter in kidney. As the animal model, uric transporters expressed in rats were characterized and found to be useful as the model of uric acid disposition. In addition, as the extra-renal elimination pathways of uric acid, intestinal secretion was found to be very important and the BCRP transporter was found to be responsible for that process. Furthermore, for in vivo analysis in human, the method for the synthesis of PET probe of uric acid was succeeded. It was preliminarily applied in PET analysis in rats. All these studies related to the mechanism and evaluation method of uric acid disposition is useful for future development of drugs that can control serum uric acid level and physiological and pathological significance of uric acid.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2009 年度 | 4,700,000 | 1,410,000 | 6,110,000 |
| 2010 年度 | 4,700,000 | 1,410,000 | 6,110,000 |
| 2011 年度 | 4,700,000 | 1,410,000 | 6,110,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,100,000 | 4,230,000 | 18,330,000 |

研究分野：薬物動態学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：尿酸、トランスポーター、高尿酸血症、腎臓、消化管、尿酸値変動

1. 研究開始当初の背景

高尿酸血症は、痛風や狭心症、心筋梗塞な

どの慢性疾患のリスクファクターとなることが指摘されており、今後の重大な生活習慣病の悪性因

子として位置づけられるに至っている。一方、慢性疾患治療薬による血清尿酸値の変動が観察されており、上記のリスクを回避するためには、変動機構の解明とその回避の手法の提唱は医薬品の適正使用上重要である。尿酸は、腎臓での糸球体濾過・尿細管再吸収・分泌を含む複雑な調節を受け、多数の再吸収と分泌トランスポーターが腎での尿酸調節に関わる可能性が示されるに至っている。

研究代表者は、尿酸再吸収に働く URAT1 に着目し、アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) が URAT1 の阻害と活性化の相異なる作用を示し、それが ARB による血清尿酸値の上昇・下降両変動の原因となる可能性を示唆した。一方、URAT1 に対して強い阻害作用を有する場合でも血清尿酸値の低下がわずかしかならないなど、URAT1 に対する薬物の影響のみでは不十分である事実も得られ始めた。URAT1 以外の尿酸輸送に働く腎トランスポーター分子の候補はあるが、各分子の尿酸調節における役割は明確ではない。即ち、尿酸輸送活性を有するトランスポーター各々が尿細管での尿酸の再吸収に働くのか、分泌に働くのか、それらがどの程度尿酸調節に寄与しているのか、薬物等による尿酸値変動の原因となりうるのか、などが不明なのが現状である。さらに、尿酸排泄の 1/3 程度を担う可能性も指摘されている糞中排泄など、腎臓以外の臓器での尿酸調節機構も不明なままである。

以上、これまでの成果によって、尿酸値に対する薬物の作用機構として URAT1 を主としたプロトタイプモデルを提唱できたが、尿酸調節関連因子 (トランスポーターなど) が新たに見出されるなど、不明な点が圧倒的に多いのが現状である。そこで、尿酸調節機構を明確にすることにより、医薬品などにより生じる尿酸値変動機構を網羅し、医薬品の開発と適正使用ならびに心疾患リスク低減に対応できる評価系が必要になってきている。

2. 研究の目的

研究代表者等によるこれまでの成果から、腎臓での尿酸動態に多彩なトランスポーター分子が関与し、尿酸値変動機構についてはこれらトランスポーターに対する薬物の影響を総合的に考慮する必要があると言える。そこで本研究では、(1) 腎臓と腎臓以外に分けて尿酸調節に働く因子を網羅的に見出す。その情報に基づいて、(2) 薬物が影響する因子を選別してその裏づけを行い、最終的に(3) 薬物などの尿酸値変動活

性の有無についての評価系の樹立を試みる。

腎臓における尿酸動態: 糸球体ろ過後の腎尿酸動態に関与するトランスポーターとして、URAT1, URATv1, OAT1, OAT3 などのトランスポーターを中心に、①いずれのトランスポーター分子が尿酸調節に影響が大きいかについて検討する。同時に、②各トランスポーターによる尿酸輸送に対する種々薬物の影響 (阻害と活性化の両面) を評価する。得られた仮説の実証と他の薬物等の評価をより簡便に行うために、③新規 *in vivo* と *in vitro* の評価系の構築を行う。

腎臓以外として肝臓・消化管における尿酸動態: 肝臓や消化管において尿酸動態を左右するトランスポーターの分子実体を明らかにする。いずれの場合も、具体的には以下の項目を実験的に示す。

- ・各組織に発現する尿酸トランスポーター分子の同定と局在。
- ・各組織における尿酸トランスポーターの発現レベル。
- ・*In vitro* 尿酸トランスポーター評価系の樹立。必要に応じて複数のトランスポーター分子発現系を作成。
- ・*In vivo* 評価系樹立を目的としたラットやマウス用いた尿酸輸送解析。
- ・上記樹立したモデルを用いた薬物の尿酸輸送への影響の解析 (阻害・活性化両面から調べる)
- ・トランスポーターのみならず関連酵素への薬物の影響の解析。

3. 研究の方法

1) トランスポーター活性に対する薬物の影響

・尿酸輸送活性を有するトランスポーター分子として、URAT1, OATs, NPT1, MRP4, BCRP, URATv1 を対象とし、その発現系 (アフリカツメガエルの卵母細胞、ヒト培養細胞、あるいは昆虫細胞由来膜小胞) を用いて、以下のような尿酸輸送特性を比較検討する。

・また、必要に応じて、腎臓組織試料 (腎切片、膜ベシクル、培養上皮細胞など) を用いて、トランスポーター分子を特定せずに、見かけの尿酸輸送活性も測定する。この場合、Apical 側と Basolateral 側を分離し、さらに分泌方向か再吸収方向かも区別できるような検討を行なう。具体的検討項目は以下である。

- ・親和性: Km 値と輸送効率 V_{max}/K_m 値
- ・駆動力・影響因子: 塩素イオン、pH、有機アニオン類、ナトリウムなど、

- ・方向性:influx か、efflux にも働くか。
- ・交換輸送かその他のタイプの輸送形態か。
- ・尿酸生成酵素キサンチンオキシダーゼ XO を用い、尿酸生成速度を測定する。
- ・様々な医薬品の影響を、トランスポーターを介した尿酸輸送活性ならびに酵素を介した尿酸生成速度に対する促進効果、阻害効果としてそれぞれ評価する。
- ・実際の体内薬物濃度を推定し(血漿中濃度、血漿タンパク結合率、組織—血漿中濃度比を基にする)、臨床投与量における各医薬品が上記結果を反映するか否かを評価する。

2) 小腸における尿酸トランスポーター:

小腸の尿酸トランスポーターの発現は不明である。尿中に排泄される尿酸は全排泄量の 70% 程度であり、残りは小腸を経て糞中に排泄される。胆汁を経たのか直接に小腸管腔中に分泌された後糞中に排泄されるかは現時点では区別がなされていない。そこで、ラットの小腸組織やヒト消化管由来 Caco-2 細胞を用いて尿酸輸送活性(吸収か分泌方向か)の有無を明らかにする。また Caco-2 細胞や特定されたトランスポーター発現細胞を用いて、尿酸輸送に対する薬物の影響を測定し、尿酸動態変動との関係性を評価する。

3)ヒトの腎尿酸動態モデル、ならびに体内尿酸動態モデルの構築

体内尿酸動態に及ぼす薬物の影響を考察するための腎臓の尿酸動態変動予測モデルを構築し、さらにその有用性を以下のように評価する。腎臓のみで不十分の場合には肝臓や小腸の尿酸調節因子の評価系についても樹立を行なう。

- ・1)および 2)の結果を基に、腎臓の尿酸動態変動を予測することが可能となる *in vitro* モデルを作成する。具体的には、腎尿細管上皮細胞で働く重要な尿酸トランスポーター分子を、単層を形成する培養細胞(LLCPK1 や MCD 細胞に)に発現させ、再吸収・分泌両方向輸送活性を評価する。
- ・ラット、マウスなどの実験動物を用いた *in vivo* 評価システムを構築する。適宜、ウリカーゼ阻害剤を用い、尿酸動態をヒトに類似させる工夫を試みる。
- ・上記で構築したモデルを用いて実際の体内尿酸動態の評価を試みる。すなわち、腎レベルでの尿酸動態から体内尿酸動態および血清尿酸値変動そのものを評価することが可能か否かを評価する。
- ・尿酸動態における薬物応答性を比較・検討し、

種差を明らかにする。さらにその原因因子を明確にし、種差を克服できるモデル作成を試みる。

- ・腎臓のみでは不十分と判断された場合は、適宜、同様の手法で肝臓や小腸の尿酸動態規定因子を組み込んだ評価系の作成を行なう。
- ・最終的には、ノックアウト、ノックインすることにより、ヒト化動物モデルを構築する。このモデルを用いて尿酸動態における薬物応答性を評価し、モデルの有用性を評価する。

4. 研究成果

腎臓に発現するトランスポーターの中で尿酸輸送活性を有している可能性のある分子の探索を新たに行った。候補として OAT2 分子に着目した。OAT2 は尿酸取り込み活性を有していることを確認できた。その特徴は、塩素イオン感受性など既知尿酸トランスポーターOAT1 や OAT2 と共通であったが、他のアニオン性化合物との交換輸送活性は見られなかった。OAT2 は尿細管上皮細胞側底側膜に発現していることから、尿酸の分泌に働く新たな輸送体であることを見いだすことができた。

尿酸動態特性解析のための動物モデルとラットの有用性について検討を行った。尿酸再吸収に必須な URAT1 分子についてラットオルソログの同定と機能解析を行った。その結果、ラットにも Urat1 は発現していること、その尿酸輸送特性はヒト URAT1 と類似点の多いことを見いだされた。しかし、Urat1 阻害薬についてはヒト URAT1 に対する親和性と乖離しているものがあり、必ずしも同様な URAT1 阻害あるいは活性化作用を同条件では示さない可能性も示された。

腎尿酸動態評価系の *in vitro* モデルの構築を試みた。尿細管には複数の尿酸トランスポーターが存在することから、単一のトランスポーター分子発現系にこだわらずに、第一段階として尿細管上皮細胞培養系の樹立を行った。ラット腎臓より単離した細胞の初代培養系はグルコースやカルニチンなど栄養物輸送活性をよく維持し、しかも管腔側から側底膜側への極性輸送を示すことがわかった。しかし、尿酸トランスポーターUrat1 の発現は極めて低く、通常の培養ではUrat1 はダウンレギュレーションを受けることがわかった。本実験系の尿酸動態解析系としての応用のためには、Urat1 等尿酸トランスポー

ターの発現を誘導するなどの工夫を必要とする。

尿酸動態の in vivo 評価系として PET (ポジトロンエミッショントモグラフィ) への展開を試みた。上述したように尿酸動態は種差が大きく、全身動態を評価するためには動物モデルは限界がある。したがって、動物モデルや in vitro 試験系で得られた尿酸動態を評価するためにはヒト in vivo での解析が必要である。さらに、尿酸の生理作用などの影響を調べるためには単純に血中や尿中のみならず、組織内での動態の情報が必要になる。このような全身動態のヒトでの解析手法は限られており、その中でも PET イメージングによる解析は極めて有用である。そこで、まずは PET 解析用尿酸プローブ (11C) ラベル化尿酸の合成とその in vivo 解析の有用性評価として動物試験による PET 解析を行った。その結果純度の高い尿酸の PET プローブの合成手法の樹立に成功した。さらに、ラットにおける解析を、ウリカーゼ阻害薬オキソニン酸処理ラットを用いて行った。その結果、尿酸の腎における蓄積を同定できるとともに、痛風発作の生じる手足や脳などの組織への尿酸の蓄積性を確認できた。本プローブは今後のヒト試験への応用が望まれる。

尿酸の腎外排泄機構について、ラット・マウス等の動物試験による解析を行った。その結果、尿酸の腎外排泄としては、肝臓を経た胆汁中排泄は極めて少ないことが示された。一方、糞中には大量に排泄されるため、血液中から消化管上皮細胞を経た消化管腔中への直接的排泄であることが確認された。さらに遺伝子欠損マウスならびに in vitro トランスポーター発現系やヒト小腸由来 Caco2 細胞等を用いた解析により、小腸上皮細胞管腔側膜に発現する BCRP が極めて重要な役割を果たしていることを見いだすことができた。

以上、尿酸の腎動態ならびに腎外排泄について全体像を把握するための多くの知見を得ることができた。さらに、医薬品等の影響を検討する上において簡便な評価系として in vitro 発現系ならびに初代培養尿管上皮細胞の有用性ならびに限界について新たな知見を得ることができた。また、in vivo 評価系としてラットの有用性を確認するとともに、ヒトでの尿酸動態評価手法として PET を用いた検討を進める準備も終了した。

以上の知見は、今後のヒトにおける尿酸動

態調節機構とそれに対する医薬品との影響を評価するための有用である。

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 9 件)

1. Hosomi A., Nakanishi T., Fujita T., Tamai I., Extra-renal elimination of uric acid via intestinal efflux transporter BCRP/ABCG2. PLoS One, 査読有, 7(2)2012, e30456
DOI:10.1371/journal
2. Yashio K., Katayama Y., Takashima T., Ishiguro N., Doi H, Suzuki M., Wada Y., Tamai I., Watanabe Y., Synthesis of [¹¹C]uric acid, using [¹¹C]phosgene, as a possible biomarker in PET imaging for diagnosis of gout. Bioorg Med Chem Lett., 査読有 22(1)2012, 115-9
DOI:10.1016/bmcl
3. Nakanishi T., Fukushi A., Sato M., Yoshifuji M., Gose T., Shirasaka Y., Ohe K., Kobayashi M., Kawai K., Tamai I., Functional characterization of apical transporters expressed in rat proximal tubular cells (PTCs) in primary culture. Mol Pharm., 査読有, 8(6)2011, 2142-50
DOI: 10.1021/mp200096r
4. Nakanishi T, Haruta T, Shirasaka Y., Tamai I. Organic cation transporter-mediated renal secretion of ipratropium and tiotropium in rats and humans. Drug Metab Dispos., 査読有, 39(1)2011, 117-22
DOI: 10.1124/DMD
5. Sato M., Wakayama T., Mamada H., Shirasaka Y., Nakanishi T., Tamai I. Identification and functional characterization of uric acid transporter Urat1 (Slc22a12) in rats. Biochim Biophys Acta., 査読有, 1808(6): 2011, 1441-1447 (2011).
DOI:10.1016/j.bbame
6. Sato M., Mamada H., Anzai N., Shirasaka Y., Nakanishi T., Tamai I. Renal secretion of uric acid by organic anion transporter 2 (OAT2/SLC22A7). Biol. Pharm. Bull., 査読有, 33(3)2010, 498-503
DOI:10.1248/bpb.33.498
7. Fujita M., Nakanishi T., Shibue Y., Kobayashi D., Moseley RH., Shirasaka Y., Tamai I. Hepatic Uptake of

{gamma}-Butyrobetaine, a Precursor of Carnitine Biosynthesis, in Rats. Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol., 査読有, 297 2009 G681-G686
DOI: 10.1152/ajpgi

8. Nakakariya M., Shima Y., Shirasaka Y., Mitsuoka K., Nakanishi T., Tamai I. Organic Anion Transporter OAT1 Is Involved in Renal Handling of Citrulline. Am. J. Physiol. Renal Physiol., 査読有, 297 2009 F71-F79
DOI: 10.1152/ajprenal
9. Sato M., Anzai N., Tamai I., Angiotensin II Receptor Blockers Induce Alteration of Serum Uric Acid Level via Renal Uric Acid Transporters, A Review of the Authors' Current Research, Gout and Nucleic Acid Research, 査読有, 33, 2009 149-161
DOI: なし

[学会発表] (計 28 件)

1. Ikumi Tamai, Intestinal Transporters for oral Delivery and Detoxification, International Symposium on PPF Molecular Pharmacokinetics Luncheon Seminar, 2012 年 1 月 17 日, 一ツ橋ホール(東京都)
2. Ikumi Tamai, 薬物間相互作用間相互作用の予測: 薬物吸収過程における薬物間相互作用 取り込みトランスポーター, CBI 学会研究会, 2011 年 12 月 5 日, 東京大学薬学系総合研究棟講堂(東京都)
3. Ikumi Tamai, Drug Absorption and Interaction on Intestinal Influx/Uptake Transporters, 26th JSSX Annual Meeting, 2011 年 11 月 18 日, 広島国際会議場(広島県)
4. Ikumi Tamai, Intestinal OATP Transporters as Target for Drug Absorption and Interaction, AAPS Annual Meeting, Round Table Discussion, 2011 年 10 月 25 日, Water E. Washington Convention Center (USA)
5. Ikumi Tamai, 消化管における取り込みトランスポーターと排出トランスポーターの協働, 創剤フォーラム 第 17 回シンポジウム, 2011 年 9 月 30 日, アルカディア市ヶ谷(東京都)
6. Ikumi Tamai, 腎・肝トランスポーターの生理機能を反映させた薬物影響評価系の構築, 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2011 年 7 月 13 日, パシフィコ横浜、(神奈川県)
7. Ikumi Tamai, Role of Absorptive Transporter: Impact on Oral BA and DDI, International Symposium on BA/BE of Oral Drug Products, 2011 年 6 月 29 日, 神戸コンベンションセンター(兵庫県)
8. Ikumi Tamai, 消化管に発現する薬物トランスポーターと薬効・毒性, 第 18 回 HAB 研究機構学術年会シンポジウム, 2011 年 5 月 20 日, 昭和大学上条講堂(東京都)
9. Ikumi Tamai, 高分子と生体膜の相互作用を利用した新たな治療戦略, 日本膜学会第 33 年会シンポジウム, 2011 年 5 月 13 日, 産業技術総合研究所(東京都)
10. Ikumi Tamai, Mechanism and Interaction of Absorptive Drug Transporters, 4th Asia Pacific Regional Meeting of ISSX, 2011 年 4 月 23 日(台湾)
11. 玉井郁巳, シンポジウム「痛風・高尿酸血症: 最近の進歩」医薬品による血中尿酸値制御, 日本薬学会第 131 年会(招待講演), 2011 年 3 月 30 日, ツインメッセ静岡(静岡県)
12. Atsushi Hosomi, Extra-Renal Excretion of Uric Acid in Rats, 14th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man, 2011 年 2 月 21 日, 京王プラザホテル(東京都)
13. 細見篤史, ラットにおける尿酸の腎外排泄機構, 第 44 回日本痛風・核酸代謝学会総会, 2011 年 2 月 17 日, 京王プラザホテル(東京都)
14. 玉井郁巳, 医薬品・食品の吸収動態と相互作用, フードサイエンス棟竣工記念シンポジウム(招待講演), 2010 年 12 月 11 日, 東京大学(東京都)
15. 玉井郁巳, サポートからリードへ: トランスポーターと創薬・医薬品開発, 第 31 回臨床薬理学会年会(招待講演), 2010 年 12 月 3 日, 国立京都国際会館(京都府)
16. Ikumi Tamai, Renal and Intestinal Transport and Interactions, Globalization of Pharmaceuticals Education Network (GPEN) Meeting (招待講演), 2010 年 11 月 11 日, University of North Carolina(米国)
17. Mayuko Yoshifuji, Uric Acid Transporter-Mediated Uricosuric Effect of RDEA594, A Metabolite of Antiviral Agent RDEA806, Globalization of Pharmaceuticals Education Network (GPEN) Meeting, 2010 年 11 月 11 日, University of North Carolina, (米国)

18. Atsushi Hosomi, MECHANISM OF EXTRA-RENAL EXCRETION OF URIC ACID IN NORMAL RATS, 第 25 回日本薬物動態学会年会, 2010 年 10 月 8 日, 大宮ソニックシティ(埼玉県)
19. Tsunemitsu Haruta, TRACHEAL ABSORPTION OF AN ANTICHOLINERGIC BRONCHODILATOR IPRATROPIUM VIA ORGANIC CATION TRANSPORTERS, 第 25 回日本薬物動態学会年会, 2010 年 10 月 8 日, 大宮ソニックシティ(埼玉県)
20. 玉井郁巳、トランスポーターと医薬品の作用・副作用, 応用トキシコロジー : リカレント講座(招待講演), 2010 年 9 月 30 日, 金沢大学サテライト・プラザ金沢市(石川県)
21. 佐藤 正延, ラットを用いた薬物による尿酸動態変動の評価, 第 43 回痛風尿酸代謝学会年会, 2010 年 2 月 26 日, 大阪国際交流センター(大阪府)
22. Tamai I, Transporters Involved in Uricosuric and Antiuricosuric Effects of Anti-hypertensives, 米国腎臓学会年会, 2009 年 10 月 30 日, サンジェゴコンベンションセンター(米国)
23. 玉井郁巳, がんの診断と治療へのトランスポーター活性の利用, 日本医療薬学会年会, 2009 年 10 月 24 日, 長崎医師会館(長崎県)
24. 玉井郁巳, 尿酸代謝に及ぼす ARB の影響, 高血圧診療 UpDate 研究会, 2009 年 10 月 15 日, ホテル金沢(石川県)
25. 玉井郁巳, 医薬品の吸収にトランスポーターはどこまで関わるか, 創薬薬理フォーラム 第 17 回シンポジウム, 2009 年 9 月 10 日, 長井記念館(東京都)
26. 玉井郁巳, ここまでわかってきた消化管吸収における薬物吸収分子機構 薬物の吸収性を調節する消化管トランスポーター, 第 28 臨床薬理阿蘇九重カンファレンス, 2009 年 7 月 18 日, ハウステンボス(長崎県)
27. 玉井郁巳, TDM とトランスポーター研究, 日本 TDM 学会学術年会, 2009 年 6 月 13 日, 新潟コンベンションセンター(新潟県)
28. Tamai I, Role of Intestinal and Hepatic OATPs in Drug Absorption and Disposition, 3rd Asian-Pacific ISSX Meeting, 2009 年 5 月 10 日, インペリアルクイーンズパークホテル(タイ)

[図書] (計 3 件)

1. 玉井郁巳ら共著, 羊土社, 薬物トラン

スポーター活用ライブラリー, 2009 年, 246 頁

2. 玉井郁巳ら共著, 医学書院, 臨床薬物動態学, 2009 年, 415 頁
3. 玉井郁巳ら共著, 東京化学同人, 薬と疾病 I B. 薬の効くプロセス (2) 薬剤, 2009 年, 192 頁

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/lab/doutai.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉井 郁巳 (TAMAI IKUMI)
金沢大学・薬学系・教授
研究者番号 : 20155237

(2) 研究分担者

白坂 善之 (SHIRASAKA YOSHIYUKI)
金沢大学・薬学系・助教
研究者番号 : 60453833

(3) 連携研究者

該当なし