

令和 6 年 5 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02641

研究課題名(和文) 血清尿酸値を感受する尿酸センサーの同定と生理作用

研究課題名(英文) Identifivatina and functional analysis of urate binding proteins

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：何故ヒトは高い血清尿酸値SUAを維持し、SUA変動と病態・生理機能は関連するするかを明確にするために、尿酸結合タンパク質の同定という全く新しい概念での検討を行った。その結果、複数の尿酸結合タンパク質が見つかり、その一つCD38について解析を進めた。結晶化尿酸は炎症細胞においてCD38の発現量を増大させること、さらに可溶性尿酸はCD38が有するNAD+分解酵素活性を阻害することが見出された。NAD+は、炎症・免疫・老化現象などに関わる生理的に極めて広範な役割を有しており、SUAを維持することは適度なCD38活性を調節する意義を持つことが見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトと高等霊長類でのみ特異的に高い血清尿酸値SUAの意義とSUA変動と相関する多様な病態との関連性を明確にするべく、尿酸結合タンパク質が尿酸センサーとして働いていると仮定し、複数の尿酸結合タンパク質を見出した。その一つCD38については、結晶化尿酸と可溶性尿酸がCD38のNAD+分解酵素活性を調各々正負に相異なる方向に調節することをin vitroならびにCD38欠損マウス等のin vivo試験により示した。本成果は初めて尿酸が直接作用する生体タンパク質を同定するとともに、見出したNAD+は炎症・免疫・寿命など基本的な生理機能に関連しており、今後の尿酸研究に全く新しい情報となる。

研究成果の概要(英文)：To clarify why humans maintain high serum uric acid (SUA) levels and why SUA fluctuations are associated with pathological and physiological functions, this study hypothesized the completely new concept that there are urate-binding proteins in humans and they mediate urate associated physiological function and pathology. As a result, several urate-binding proteins were found and CD38, which was found as one of urate binding proteins, was further analyzed. It was found that crystallized uric acid increases CD38 expression in inflammatory cells, and that soluble uric acid inhibits NAD+-degrading enzyme activity of CD38. The maintenance of SUA has significance in modulating the activity of CD38. This is the first study which identified the presence of urate binding proteins and should be useful for further understanding of the roles of urate and the mechanisms for urate associated diseases in future.

研究分野：薬物動態学

キーワード：尿酸 血清尿酸値 CD38 炎症 免疫反応 トランスポーター 尿酸結合タンパク質 痛風

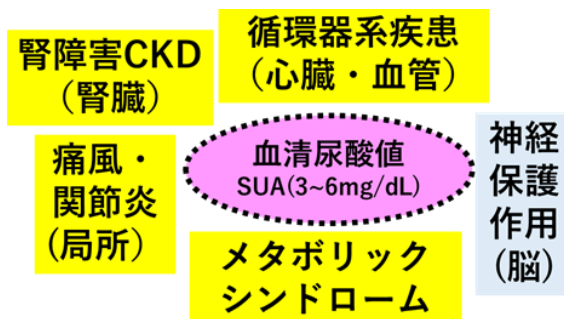
様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血清尿酸値(SUA, Serum Uric Acid)は、肝・消化管でのプリン体からの生合成および腎と消化管からの排泄を司る酵素とトランスポーター(輸送体)等により厳密に調節される。このバランスが維持できなくなり、SUAが7mg/dLを超えると高尿酸血症と診断され、2mg/dL以下では低尿酸血症と

図1 尿酸値変動と相関する疾患

診断される。日本においては成人男性の20%が高尿酸血症と推定され、痛風発作、腎疾患や種々代謝性疾患、非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD)などの発症リスクが増大する。痛風発作の発症は、高尿酸血症によって生成する尿酸結晶に起因し、NLRP3インフラマソームにより炎症反応が進行する



ことが分かっている。しかし、図1に示すような他の相関する疾患については、その因果関係は明確にはなっていない。一方、尿酸は他の動物に比べヒトを含む高等霊長類においてのみ高値を示し、なんらかの生理的な役割が推定される。尿酸自身は化学的に抗酸化作用を有しており、現時点では、生体内においても抗酸化作用が生理的役割と推定されている。しかし、抗酸化作用と多様な疾患との関連メカニズムは明確ではない。さらに、SUA変動と疾患の関係は、単なる相関であって原因ではない、あるいは疾患によりSUAも変動しているにすぎないという考え方もなされており、論争となっている。その結果、SUAが高いのみでは病態と診断しないのが欧米等の現状であり、高尿酸血症を病態と診断するのは日本などに限られている。即ち、多くの国では痛風発作時のみSUA低下治療がなされており、SUAを適正化する治療は行われていない。即ち、痛風発作を伴わない高尿酸血症治療の必要性の有無を判断するためには、病態とSUAの関係性を明確にすることが必要な状況にあった。

一方、研究代表者らは、SUAを維持することは生理的に重要であると考え、医薬品の副作用によるSUA変動機構に着目し、腎臓、消化管、肝臓、血管内皮における尿酸輸送体研究を進めてきた。また、高尿酸血症動物では、様々な輸送体の発現量低下による薬物動態変動も示した。さらに最近、尿酸に対する生体応答を調べるためにヒト初代培養肝細胞に尿酸を曝露し、網羅的プロテオミクス解析を行った。その結果の一つとして、図2の点線枠内に示す5種類のタンパク質に発現変動が見られた。Pathway解析によりこれらはPTENの安定化や活性化を制御するタンパク質群であることが示され、この変化は尿酸動態変動や疾患と関連するとも考えられた。即ち、高尿酸血症自体が生理機能に影響する可能性が示されるいくつかの結果を得ていた。

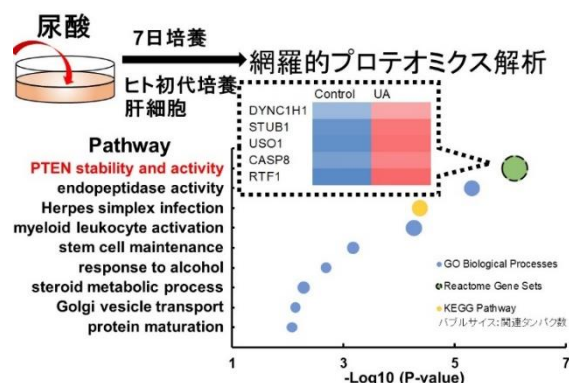


図2 尿酸曝露により変動したヒト肝細胞の代謝経路解析

2. 研究の目的

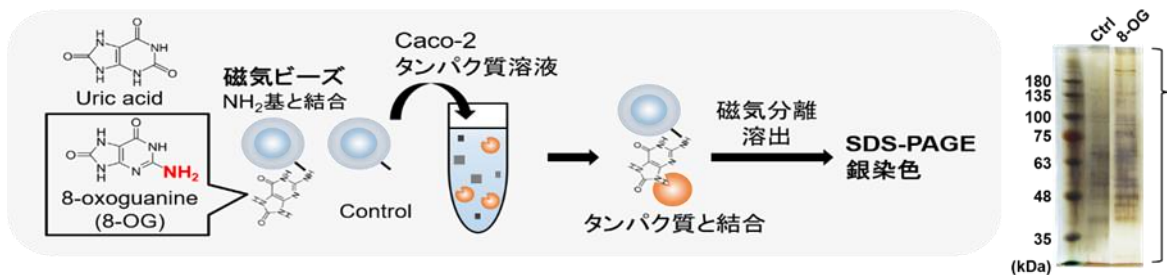
上記背景に基づき、何故ヒトは高い血清尿酸値SUAを維持し、SUA変動と病態・生理機能は関連するものかについて、尿酸の生体への生理作用あるいは病態との関連メカニズムを明確にすることを目的とした。その手法として本研究では、体内の尿酸を感知する尿酸センサーとなる生体成分が存在し、SUA変動に応じて尿酸濃度維持や尿酸作用と関連する機

能タンパク質活性を変動させているという仮説を立てた。即ち、生体には尿酸センサーとなるような尿酸結合タンパク質の同定という全く新しい概念での検討を行った。その結果、複数の尿酸結合タンパク質が存在すると仮定し、その探索をおこない、得られた候補尿酸センサーと生理作用・病態との関連性を解析することとした。その結果に応じて、尿酸の役割を推定することを目的とした。従来、尿酸作用を司るタンパク質の存在は知られておらず、全く新しい仮説とその検証研究を実施することを目的とした。

3. 研究の方法

尿酸センサーとなる候補尿酸結合タンパク質を細胞可溶化分画から単離する。細胞としては、Caco-2 細胞を用いる。尿酸暴露時に尿酸トランスポーターの一つ BCRP タンパク質の発現誘導が報告されており、尿酸をシグナルとして BCRP 発現量を誘導する尿酸反応性タンパク質の示唆があったためである。タンパク質単離には FG (NHS)-ビーズを用いた。尿酸自体は低反応性故にビーズ結合ができず、尿酸類似体として 8-oxoguanine (8-OG) のアミノ基を利用して分離用ビーズを作成した、細胞可溶化液と反応させ、図3に示すように磁気分離、SDS-PAGE による分離を行った。8-OG 非結合ビーズを非特異的とし、8-OG-ビーズ特異性が得られたタンパク質を溶出し、プロテオミクスによるタンパク質の単離を行った。候補対象となったタンパク質について、結果に示すような手法で解析を進めた。

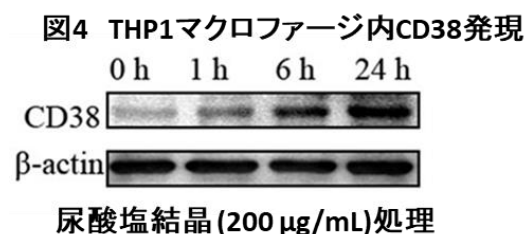
図3 尿酸結合タンパク質のスクリーニング



4. 研究成果

8-OG 結合ビーズを用いることで、複数の尿酸センサー候補タンパク質として7種類が得られた。SRI (Sorcin), CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase 1), NDFIP1 (NEDD4 family-interacting protein 1), CASP1 (Caspase activity and apoptosis inhibitor 1), NBL4 (Band 4.1-like protein 4A), MDM4 (Protein mdm4), FER (Tyrosine-protein kinase Fer)が候補となった。特異的結合を確認するために、候補タンパク質の遺伝子を単離・合成したタンパク質を用いたところ、CD38 と 8-OG の結合性が確認された。

尿酸塩結晶と可溶性尿酸の両面から検討した。研究代表者らが報告した高尿酸モデルラットでは数種のトランスポータータンパク質の発現量が変動したこと、さらに上記の方法で記載したように尿酸トランスポーターBCRP の発現量が尿酸作用により変動したことから、両型の尿酸により CD38 発現量への影響を調べた。また、CD38 は炎症・免疫反応上重要であることから、免疫細胞において検討した。ヒトマクロファージ THP-1 細胞ならびにマウス骨髄由来マクロファージ BMDM 細胞への各型の尿酸処理後の CD38 発現量を調べた。その結果、可溶性尿酸による発現量変化はなかった。一方、尿酸結晶によって CD38 発現量はいずれの細胞においても増大した。図4には THP1 マクロファージに尿酸塩結晶 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 処理後の CD38 タンパク質発現量を示す。尿酸塩結晶処理により時間依存的に CD38



タンパク質は発現が増大した。

CD38の主たる生理機能は、NAD⁺ (Nicotinamide adenine dinucleotide)の分解酵素であり、その結果、ADP-ribose ならびに cyclic-ADP ribose を生成する。NAD⁺を含め、いずれも免疫・炎症反応など生体にとって重要な生理反応に関与する(図5)。そこで、尿酸のCD38酵素活性への影響について調べた。

図5 CD38の生理的役割であるNAD⁺分解反応

ヒトリコンピナントCD38を用いて、NAD⁺分解活性をADP-ribose ならびに Cyclic-ADP-ribose の生成を測定した。その結果、図6のように、可溶性尿酸は両反応を生理的濃度で阻害

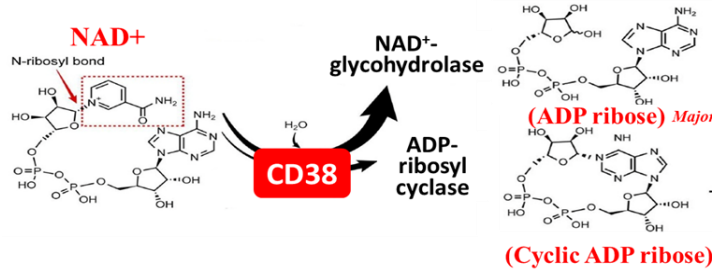
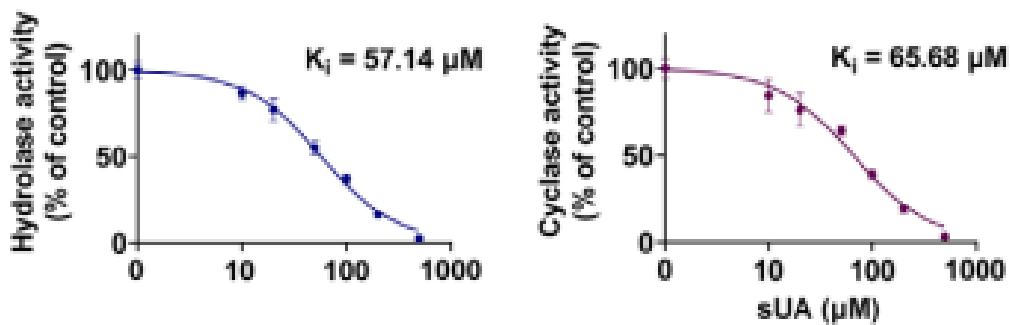


図6 可溶性尿酸によるCD38のNAD⁺分解酵素活性への影響

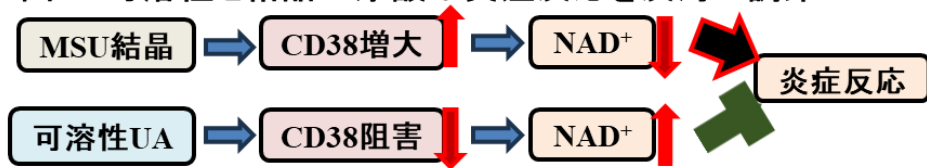


K_i 値は正常 SUA 範囲内にあり、正常時尿酸は少なくとも血中においては NAD⁺分解活性を抑制していると考えられる。マウス組織ホモジネートによる NAD⁺分解活性に対しても 100 μM 以下の K_i 値が得られ、組織細胞内の尿酸濃度に応じて CD38 酵素活性を抑制するものと考えられた。

さらに、CD38 遺伝子欠損マウスを用いた検討も行った。その結果、オキソソ酸ならびにイノシン投与による高尿酸血症モデルマウスにおいて、CD38 欠損マウスにおいては、血中 NAD⁺濃度変動は見られなかったが、正常マウスでは血中 NAD⁺濃度が上昇した。したがって、in vitro 手法で得られた NAD⁺に対する尿酸の作用は、生体中でも再現された。

以上、尿酸結合タンパク質として見出された CD38 は、尿酸塩結晶 (monosodium salt urate: MSU) と可溶性尿酸 (可溶性 UA) によって、その発現量の増大と酵素活性抑制という異なる影響をそれぞれ受け、その結果、NAD⁺濃度変動もそれに対応して生じ、また応じた炎症反応変動も受けるものと考えられた。即ち、尿酸塩結晶は NAD⁺低下により炎症反応が促進され、可溶性尿酸によっては NAD⁺が維持され炎症反応が抑制されると想定される(図7)。即ち、痛風発作は高尿酸血症の継続によって生成した尿酸塩結晶により NAD⁺濃度が低下し、炎症反応が促進されると説明される。

図7 可溶性と結晶の尿酸は炎症反応を反対に調節



痛風発作は NLRP3 インフラマソームで説明されているが、本反応には NAD⁺の低下が原因と考えられている。したがって、尿酸塩結晶の CD38 への作用は痛風発作反応を説明

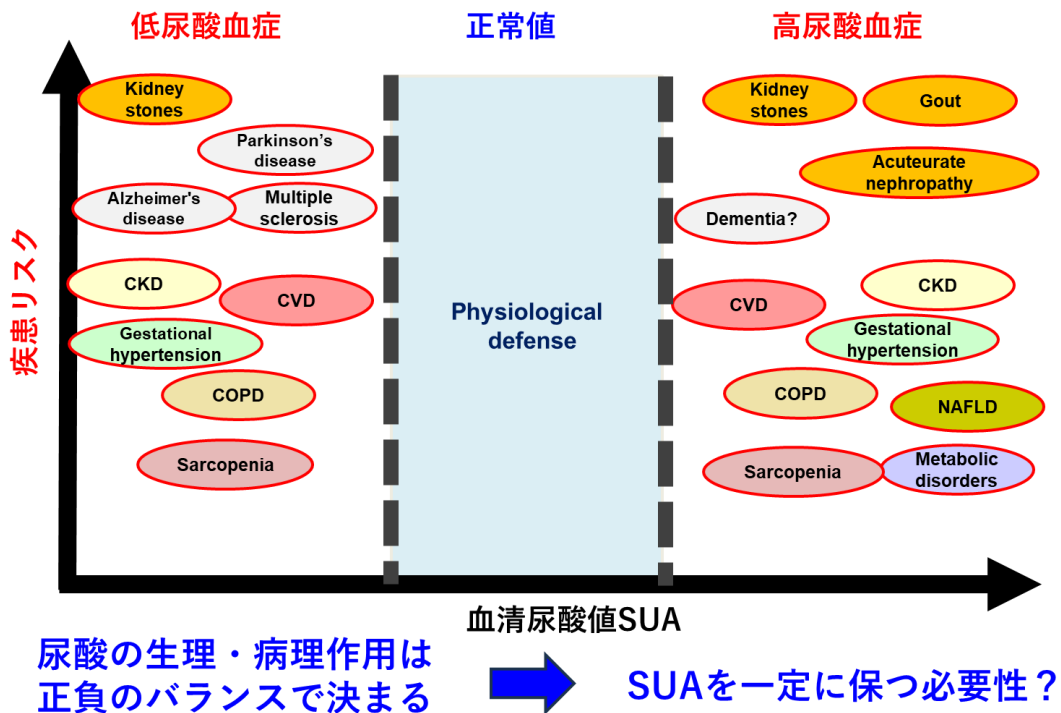
できる。したがって、SUA を正常値に維持することで、尿酸塩結晶の生成を妨げ、NAD⁺を維持し、痛風発作の発症を回避できると言える。

NAD⁺は、炎症・免疫・老化現象などに関わる生理的に極めて広範な役割を有しており、SUA を維持することは適度な CD38 活性を調節する意義を持つことが見出された。ヒトと高等霊長類でのみ特異的に高い血清尿酸値 SUA の意義と SUA 変動と相関する多様な病態との関連性を明確にすべく、尿酸結合タンパク質が尿酸センサーとして働いていると仮定し、複数の尿酸結合タンパク質を見出した。その一つ CD38 については、結晶化尿酸と可溶性尿酸が CD38 の NAD⁺分解酵素活性を調各々正負に相異なる方向に調節することを *in vitro* ならびに CD38 欠損マウス等の *in vivo* 試験により示した。本成果は初めて尿酸が直接作用する生体タンパク質を同定するとともに、見出した NAD⁺は炎症・免疫・寿命など基本的な生理機能に関連しており、今後の尿酸研究に全く新しい情報となる。

本研究では検討できなかったが、図 1 に示すような SUA 変動と相関する多様な疾患についても何らかの尿酸結合タンパク質の作用で説明できる可能性がある。即ち、高尿酸血症あるいは低尿酸血症時には多様な疾患リスクが増大するが、このような SUA と疾患・生理作用については、CD38 のように正常濃度で生理反応バランスを維持するために、病態発症を抑制しているというものである。この考えを図 8 に示した。

本研究では、CD38 以外にも尿酸センサーとして働いている可能性のある尿酸結合タンパク質を見出している。尿酸作用の全容を理解するためのアプローチとして本研究で提唱した尿酸センサーとなる尿酸結合タンパク質を介した尿酸作用という仮説のさらなる検証が待たれる。

血清尿酸値SUAと疾患間のU字型相関



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wen S, Arakawa S, Tamai I.	4. 巻 581
2. 論文標題 CD38 activation by monosodium urate crystals contributes to inflammatory response in macrophages.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 6-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.10.010.	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 玉井郁巳	4. 巻 57
2. 論文標題 尿酸再吸収トランスポーターURAT1 & GLUT9	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ファルマシア 57:897-901, 2021.	6. 最初と最後の頁 897-901
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤田一輝、朱秋楠、荒川大、玉井郁巳
2. 発表標題 Trans-inhibitory effect of dotinurad, a uricosuric agent on uric acid reabsorptive transporter URAT1
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Qiunan ZHU, Hiroshi ARAKAWA, Aimi TANIGUCHI, Yurika NAGAO, Yoshiyuki SHIRASAKA, Ikumi TAMAI
2. 発表標題 Specific binding of uric acid to NDFIP1 associates with hyperuricemia-induced liver fat accumulation
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shijie Wen, Hiroshi Arakawa, Kazuki Himi, Yoshiyuki Shirasaka, Ikumi Tamai
2. 発表標題 CD38 mediates the distinct roles of soluble uric acid and MSU crystals in gouty inflammation
3. 学会等名 第56回日本痛風・尿酸核酸学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Wen S, Arakawa S, Tamai I.
2. 発表標題 CD38 activation contributes to gouty inflammation in vitro
3. 学会等名 日本痛風・尿酸核酸学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ikumi Tamai
2. 発表標題 Transporter-mediated Regulation and Drug Interaction of Serum Uric Acid
3. 学会等名 Forbidden City International Pharmacist Conference 2021 China (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021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	荒川 大 (Arakawa Hiroshi) (40709028)	金沢大学・薬学系・准教授 (13301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	若山 友彦 (Wakayama Tomohiko) (70305100)	熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・教授 (17401)	

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