

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 4 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460652

研究課題名(和文)腎不全進展時におけるトランスポートソームの分子機構学的解明と甲状腺ホルモンの関与

研究課題名(英文)Molecular mechanism of transportsome in chronic kidney disease and the involvement of thyroid hormone

研究代表者

末永 綾香 (Ayaka, Suenaga)

熊本大学・薬学部・講師

研究者番号：20040313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：二次性副甲状腺機能亢進症(SHPT)患者において、高尿酸血症の発症頻度が増加する。また、複数の観察研究で、血清PTH濃度と尿酸値あるいは高尿酸血症との関連性が指摘されてきた。これらの知見は、PTHと尿酸の密接な関係を示唆するものの、その機序については明らかにされていない。本研究では血清中PTHの上昇がABCG2の膜発現を抑制する結果、尿酸排泄の低下を惹起する現象を初めて明らかにした。また、PTH分泌抑制剤であるシナカルセトが、ABCG2の機能回復を介して尿酸の体内蓄積を間接的に抑制するという、本剤に関する新たなプレオトロピック効果を見出した。

研究成果の概要(英文)：Hyperuricemia occurs with increasing frequency among patients with hyperparathyroidism. However, the molecular mechanism by which serum parathyroid hormone (PTH) regulates serum urate levels remains unknown. Here we show that, in rats with secondary hyperparathyroidism (SHPT), serum urate levels are increased and urate excretion in the intestine and kidney is decreased, presumably due to the downregulation of the intestinal and renal membrane expression of a urate exporter ABCG2. These effects were prevented by the administration of the calcimimetic PTH suppressor, cinacalcet. In Caco-2 cells, the plasma membrane expression of ABCG2 was downregulated by PTH. Clinical studies showed that treatment with cinacalcet resulted in significant reductions in serum urate levels in SHPT patients. These results suggest that PTH downregulates ABCG2 expression, and thereby suppresses intestinal and renal urate excretion, and that the effects of PTH can be prevented by a cinacalcet treatment.

研究分野：医療薬学

キーワード：腎障害 二次性副甲状腺機能亢進症 副甲状腺ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

二次性副甲状腺機能亢進症(SHPT)とは、副甲状腺以外の疾患が引き金となり、副甲状腺ホルモン(PTH)が過剰に血中へ分泌される結果、繊維性骨炎や異所性石灰化を引き起こす続発性の疾患であり、維持透析患者のような高度の慢性腎臓病(CKD)が発症の原因となりやすい。ところで、一般住民並びに原発性副甲状腺機能亢進症患者を対象とした複数の横断的研究の結果から、血清 PTH 濃度と尿酸値あるいは高尿酸血症との関連性が示されてきた。また、両者の関連性は腎機能をはじめとする様々な因子と独立して存在することも見出されている。さらに、組換え型 PTH 製剤のテリパラチド(1-34)では、用量依存的に高尿酸血症の発症頻度が増加する。これらの知見は、PTH と尿酸の密接な関係を示唆するものの、その機序については全く明らかにされていない。尿酸は主に腸管と腎臓から体外排泄されるが、これらの経路では、ABCG2 が尿酸排泄トランスポーターとして機能している。事実、松尾や高田らは、本トランスポーターの機能不全バリエーションを有する場合、両臓器からの尿酸排泄が低下する結果、痛風リスクを増大させることを明らかにし、高尿酸血症の新たな概念を提唱している(*Sci Transl Med* (2009))。ABCG2 は腸管と尿細管細胞の頂端膜に発現しているが、SHPT を合併した維持透析患者では、腎機能が極度に低下しているため、尿酸排泄における腸管 ABCG2 の寄与が大きくなる。また、PTH は小腸、腎臓および肝臓等に局在する PTH 受容体との相互作用を介して生理活性を発揮しているため、高 PTH 状態では、腸管や腎臓における ABCG2 の機能を PTH が制御しているかもしれない。

## 2. 研究の目的

本研究では、PTH が ABCG2 の膜発現量を抑制する結果、腸管や尿中への尿酸排泄を低下させ高尿酸血症を惹起するという仮説のもと、1)未だ明らかにされていない SHPT 状態における PTH と高尿酸血症の関連性、2)PTH が ABCG2 の膜発現量に及ぼす影響、3)PTH 分泌抑制作用を有する SHPT 治療薬のシナカルセトによる尿酸排泄改善効果、について検証した。

## 3. 研究の方法

高 PTH 血症を示す SHPT モデルラットは CKD(5/6 腎臓摘出)ラットに、高リン食を与えることで作製した。SHPT モデルラットを 2

群に分け、対照群には 0.5% CMC 溶液を、もう一方には 0.5% CMC 溶液に溶解したシナカルセトを連日経口投与した。血清、腸管内液、尿中の尿酸値は SHPT モデルラットにオキソロン酸を 7 日間投与した後に測定した。PTH 濃度は intact PTH として測定した。細胞実験はヒト腸管モデルの Caco-2 細胞を用いた。観察研究は、シナカルセト投与が開始された SHPT 合併の維持透析患者を対象とした。なお、尿酸値に影響を及ぼす薬剤を服用している場合は対象から除外した。

## 4. 研究成果

### (1) SHPT モデルラットを用いた検討

健常ラットに比べて、SHPT モデルラットでは血清 PTH 濃度と尿酸値が有意に上昇していた。また、血清 PTH 濃度と尿酸値の間には有意な相関性が認められた。ここで、尿酸値の上昇は腸管及び尿中排泄の低下に起因していた。その際、腎臓と小腸における ABCG2 の膜発現量を測定したところ、両臓器における発現量は低下していた。興味深いことに、これらの現象は、PTH 分泌抑制作用を持つシナカルセトにより抑制された。以上のことから PTH は ABCG2 発現を抑制する可能性が示された。

### (2) Caco-2 細胞を用いた検討

ABCG2 の発現に及ぼす PTH の影響を検討した結果、活性型 PTH (1-34) は ABCG2 の mRNA レベルには変化を与えずに、ABCG2 の膜発現量を有意に減少させた。この作用は PTH 受容体に結合しない不活性型 PTH (13-34) では観察されなかった。また、プロテインホスファターゼ 2A の阻害を介して Akt のリン酸化を促進するオカダ酸を添加すると、PTH (1-34)による ABCG2 の膜発現低下が改善した。これらの結果から、PTH による ABCG2 の膜発現制御には、PTH 受容体を介した転写後調節機構が重要な役割を果たしていることが示唆された。

### (3) SHPT 患者を対象とした観察研究

シナカルセト治療を開始した SHPT 合併透析患者を対象として、血清 PTH 濃度と尿酸値の関連性を観察研究で検討した。シナカルセト投与 12 週目において、血清中 PTH 濃度と尿酸値を測定し、投与前のデータと比較したところ、いずれの値もシナカルセト投与後で有意に減少していた。また、血清 PTH 値と尿酸値の間には有意な正の相関性が認められた(Fig.1)。これらの結果は SHPT モデルラットで得られた結果と良く一致していた。

#### (4) おわりに

本研究では、血清中 PTH の上昇が ABCG2 の膜発現を抑制する結果、尿酸排泄の低下を惹起する現象を初めて明らかにした。特に、SHPT 患者のように腎機能が低下している場合には、尿酸の体外排泄が消化管に依存するため、PTH による小腸での ABCG2 の膜発現低下が血清尿酸値の上昇を引き起こしているものと推察された。加えて、PTH 分泌抑制

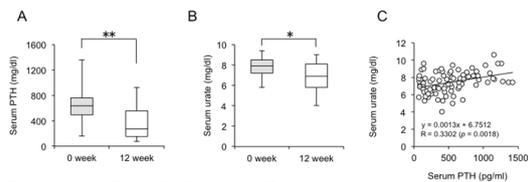


Fig. 1 シナカルセト投与患者における血清PTHと尿酸値の関係  
シナカルセト投与0週と12週の血清PTH(A)と尿酸(B)値および血清PTHと尿酸値との相関(C)

剤であるシナカルセトが、ABCG2 の機能回復を介して尿酸の体内蓄積を間接的に抑制するという、本剤に関する新たなプレオトロピック効果を見出した。

#### 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 7 件)

1. Miyamura S, Imafuku T, Anraku M, Taguchi K, Yamasaki K, Tominaga Y, Maeda H, Ishima Y, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T. Comparison of posttranslational modification and the functional impairment of human serum albumin in commercial preparations. *J Pharm Sci*. 査読有, 105, 1043-1049 (2016) doi: 10.1016/j.xphs.2015.12.015
2. Yamamoto S, Kazama JJ, Omori K, Matsuo K, Takahashi Y, Kawamura K, Matsuto T, Watanabe H, Maruyama T, Narita I. Continuous reduction of protein-bound uremic toxins with improved oxidative stress by oral charcoal adsorbent in patients undergoing maintenance hemodialysis. *Sci Rep*. 査読有, 5, 14381 (2015) doi: 10.1038/srep14381
3. Watanabe H, Miyamoto Y, Enoki Y, Ishima Y, Kadowaki D, Kotani S, Nakajima M, Tanaka M, Matsushita K, Mori Y, Kakuta T, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T. p-Cresyl sulfate, a uremic toxin, causes vascular endothelial and smooth muscle cell damages by inducing oxidative stress. *Pharmacol Res Perspect*. 査読有, 3, e00092 (2015) doi: 10.1002/prp2.92

4. Nagumo K, Tanaka M, Chuang VT, Setoyama H, Watanabe H, Yamada N, Kubota K, Tanaka M, Matsushita K, Yoshida A, Jinnouchi H, Anraku M, Kadowaki D, Ishima Y, Sasaki Y, Otagiri M, Maruyama T. Cys34-cysteinyllated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. *PLoS One*. 査読有, 9, e85216 (2014) doi: 10.1371/journal.pone.0085216
5. Anraku M, Tanaka M, Hiraga A, Nagumo K, Imafuku T, Maezaki Y, Iohara D, Uekama K, Watanabe H, Hirayama F, Maruyama T, Otagiri M. Effects of chitosan on oxidative stress and related factors in hemodialysis patients. *Carbohydr Polym*. 査読有, 112, 152-157 (2014) doi: 10.1016/j.carbpol.2014.05.078
6. Tanaka H, Iwasaki Y, Yamato H, Mori Y, Komaba H, Watanabe H, Maruyama T, Fukagawa M. p-Cresyl sulfate induces osteoblast dysfunction through activating JNK and p38 MAPK pathways. *Bone*. 査読有, 56, 347-354 (2013) doi: 10.1016/j.bone.2013.07.002
7. Watanabe H, Miyamoto M, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, Noguchi T, Kadowaki D, Ishima Y, Kotani S, Nakajima M, Kataoka K, Kim-Mitsuyama S, Tanaka M, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress through the activation of NADPH oxidase. *Kidney Int*. 査読有, 83, 446-454 (2013) doi: 10.1038/ki.2012.448

[学会発表] (計 23 件)

1. 渡邊 博志、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹 慢性腎臓病における腎-多臓器連関に関わる尿毒素の関与とその分子機構 日本薬学会 第136年会 2016/3/26-29 (神奈川：パシフィコ横浜)
2. 杉本 龍星、渡邊 博志、榎木 裕紀、異島 優、田中 元子、松下 和孝、駒場大峰、深川 雅史、小田切 優樹、丸山 徹 副甲状腺ホルモンによるABCG2 の発現抑制は二次性副甲状腺機能亢進症における尿酸値の上昇に関与する 第6回腎不全研究会 2015/12/12 (東京：全社協・灘尾ホール)
3. Ryusei Sugimoto, Hiroshi Watanabe, Yuki Enoki, Yu Ishima, Motoko Tanaka,

- Kazutaka Matsushita, Masafumi Fukagawa, Masaki Otagiri, Toru Maruyama Suppression of ABCG2 expression by parathyroid hormone enhances urate accumulation in secondary hyperparathyroidism Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2015 (Bangkok) 2015/11/25-27 (Thailand, Rama Gardens Hotel)
4. 杉本 龍星、渡邊 博志、榎木 裕紀、異島 優、田中 元子、松下 和孝、駒場 大峰、深川 雅史、小田切 優樹、丸山 徹 副甲状腺ホルモンは ABCG2 の発現抑制を介して血清尿酸値を上昇させる 第37回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2015/11/19-20 (熊本: 熊本大学薬学部)
  5. 杉本 龍星、渡邊 博志、榎木 裕紀、異島 優、田中 元子、松下 和孝、深川 雅史、小田切 優樹、丸山 徹 シナカルセトは副甲状腺ホルモンが介在する ABCG2発現抑制を解除することで尿酸排泄を促進する 第30回日本薬物動態学会 2015/11/12-14 (東京: タワーホール船堀)
  6. 榎木 裕紀、渡邊 博志、荒毛 里歩、富永 結菜、杉本 龍星、異島 優、田中 元子、松下 和孝、深川 雅史、小田切 優樹、丸山 徹 尿毒素インドキシル硫酸はCKD病態の骨格筋萎縮を加速させる 第30回日本薬物動態学会 2015/11/12-14 (東京: タワーホール船堀)
  7. Yuki Enoki, Hiroshi Watanabe, Masafumi Fukagawa, Toru Maruyama Indoxyl sulfate, a uremic toxin, accelerates skeletal muscle atrophy in CKD condition 第48回米国腎臓学会議 2015/11/3-8 (USA: San Diego Convention Center)
  8. 渡邊 博志、田中 元子、深川 雅史、小田切 優樹、丸山 徹 慢性腎臓病における定量的酸化ストレス評価法の確立とそれを基盤とした治療戦略 第32回 和漢医薬学会学術大会 2015/8/21-22 (富山: 富山国際会議場)
  9. 榎木 裕紀、渡邊 博志、荒毛 里歩、杉本 龍星、異島 優、田中 元子、松下 和孝、深川 雅史、小田切 優樹、丸山 徹 CKD病態の骨格筋萎縮における尿毒素の関与とその分子機構 第58回 日本腎臓学会学術総会 2015/6/5-7 (愛知: 名古屋国際会議場)
  10. 渡邊 博志、南雲 恒平、田中 遼大、小玉 あずさ、異島 優、山田 尚之、瀬戸山 博子、田中 基彦、佐々木 裕、田中 元子、深川 雅史、小田切 優樹、丸山 徹 酸化ストレス関連疾患とトランスレーショナルリサーチ 第8回 次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2014/11/15-16 (熊本)
  11. Hiroshi Watanabe, Yohei Miyamoto, Yuki Enoki, Yu Ishima, Masafumi Fukagawa, Masaki Otagiri and Toru Maruyama MOLECULAR PHARMACOKINETIC MECHANISMS OF OXIDATIVE STRESS-INDUCED TISSUE DAMAGE IN CHRONIC KIDNEY DISEASE FOR MEDICAL DEVELOPMENT AND THERAPEUTIC APPLICATION 19th North American ISSX Meeting and 29th JSSX Meeting 2014/10/19-23 San Francisco, California, USA
  12. 渡邊 博志、宮本 洋平、異島 優、深川 雅史、小田切 優樹、丸山 徹 尿毒症物質パラクレジル硫酸による NADPH oxidase活性化を介した尿細管及び血管障害作用 第26回 腎とフリーラジカル研究会 2014/9/20 (愛知: 産業労働センター ウィンクあいち)
  13. 今福 匡史、南雲 恒平、杉森 剛志、阿部 貴弥、申 曾洙、渡邊 博志、山田 尚之、田中 元子、松下 和孝、小田切 優樹、丸山 徹 透析患者における新規酸化ストレスマーカーとしてのシステイン付加Cys34アルブミンの有用性評価 第57回 日本腎臓学会学術総会 2014/7/4-6 (神奈川: パシフィコ横浜)
  14. 渡邊 博志、宮本 洋平、榎木 裕紀、異島 優、深川 雅史、小田切 優樹、丸山 徹 尿毒症物質 p-クレジル硫酸の酸化ストレス誘導を介した血管障害作用 第57回 日本腎臓学会学術総会 2014/7/4-6 (神奈川: パシフィコ横浜)
  15. 宮村重幸、南雲恒平、杉森剛志、渡邊博志、山田尚之、小田切優樹、丸山徹 ESI-TOFMSを用いた透析患者由来ヒト血清アルブミンの翻訳後修飾解析 日本薬学会第134年会2014/3/27-30 (熊本)
  16. Hiroshi Watanabe, Yoshiaki Sakaguchi, Ryusei Sugimoto, Yu Ishima, Ken-ichi Kaneko, Hiroshi Iwata, Masaki Otagiri and Toru Maruyama Human organic anion transporters function as a high-capacity

- transporter for p-cresyl sulfate 8th International Society on Uremia Research and Toxicity 2014/3/13-15 (Okinawa convention hall)
17. 榎木裕紀、渡邊博志、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹 尿毒素の酸化ストレス誘導を介したマウス骨格筋細胞障害作用 第30回日本薬学会九州支部大会 2013/12/7-8 (長崎国際大学)
  18. 杉本 龍星、渡邊 博志、坂口 義明、宮本 洋平、異島 優、金子 健一、岩田 宏、小田切 優樹、丸山 徹 ヒト有機アニオントランスポーターは尿毒症物質p-クレジル硫酸の高容量性トランスポーターとして機能する 第30回日本薬学会九州支部大会 2013/12/7-8 (長崎国際大学)
  19. Hiroshi Watanabe, Yoshiaki Sakaguchi, Ryusei Sugimoto, Yu Ishima, Ken-ichi Kaneko, Hiroshi Iwata, Masaki Otagiri, Toru Maruyama TRANSPORT OF P-CRESYL SULFATE, A UREMIC TOXIN, VIA HUMAN ORGANIC ANION TRANSPORTER 日本薬物動態学会 第28回年会 2013/10/9-11 (東京：タワーホール船堀)
  20. 渡邊博志、宮本洋平、田中寿絵、異島 優、田中元子、松下和孝、深川雅史、小田切 優樹、丸山 徹 尿毒症物質p-クレジル硫酸の酸化ストレス誘導を介した尿細管障害作用 第58回日本透析医学会学術集会総会 2013/6/21-23 (福岡国際会議場など)
  21. 南雲恒平、杉森剛志、阿部貴弥、申 曾洙、渡邊博志、山田尚之、田中元子、松下和孝、小田切優樹、丸山 徹 ESI-TOF MSを用いた透析患者由来ヒト血清アルブミンの翻訳後修飾解析 第58回日本透析医学会学術集会総会 2013/6/21-23 (福岡国際会議場など)
  22. 丸山 徹 尿毒症物質による酸化ストレスを介した臓器障害と治療戦略 第58回日本透析医学会学術集会総会 2013/6/21-23 (福岡国際会議場など)
  23. 坂口義明、渡邊博志、宮本洋平、異島 優、金子健一、岩田 宏、小田切 優樹、丸山 徹 尿毒症物質p-クレジル硫酸の腎排泄過程におけるhOATsの関与 日本薬剤学会第28年会 2013/5/23-5/25 (愛知、ウインクあいち)
- [図書] (計6件)
1. Hiroshi Watanabe, Toru Maruyama, Albumin as a biomarker. Human serum albumin: Pharmaceutical and medical applications, edited by Masaki Otagiri et al. Springer (2016)
  2. 渡邊博志、丸山徹 タンパク結合率の臨床的な意義を教えてください。月刊薬事 3月号 じほう vol.58 No.4, 41-45 (2016)
  3. 田中元子、伊藤和子、奥田智子、今福匡史、渡邊博志、丸山徹、小泉賢洋、角田隆俊、深川雅史 CKD-MBDにおけるリン吸着薬の進歩と治療選択～リンと鉄の関連を含めて～最新透析医療 先端技術との融合 医薬ジャーナル社 699-701 (2016)
  4. Toru Maruyama, Hiroshi Watanabe, Victor TG Chuang. Recombinant albumin, Human Serum Albumin, edited by Masaki Otagiri et al. 2013
  5. Hiroshi Watanabe, Daisuke Kadowaki, Toru Maruyama. Binding of uremic toxin, Human Serum Albumin, edited by Masaki Otagiri et al. 2013
  6. 渡邊博志、丸山徹 尿毒症毒素 透析患者の検査値の読み方 改訂第3版 211-213, 2013、臨床医学出版社
- [その他]  
ホームページ等  
<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/Yakuzai/>
6. 研究組織
    - (1)研究代表者  
末永 綾香 (SUENAGA, Ayaka)  
熊本大学・薬学部・特任講師  
研究者番号：20040313
    - (2)研究分担者  
丸山 徹 (MARUYAMA, Toru)  
熊本大学・薬学部・教授  
研究者番号：90423657
    - 小田切 優樹 (OTAGIRI, Masaki)  
崇城大学・薬学部・教授  
研究者番号：80120145