

## 論文の内容の要旨

論文題目 URAT1 を介した uric acid 再吸収に基づく uric acid 尿中排泄機構の解明

氏 名 安藤 智広

### 【背景・目的】

尿酸はヒトにおけるプリン化合物の最終代謝物であり、主に肝代謝による生成と腎臓からの尿中排泄によって恒常性が維持されている。霊長類以外の哺乳類では Uricase により尿酸は Allantoin へと代謝排泄されるが、ヒトでは Uricase が遺伝的に機能欠損しており、代謝経路が存在しない。このため、主要排泄経路である尿中排泄の異常は尿酸恒常性破綻によって生じる各種疾患の主な原因となる。特に、日本人において高尿酸血症患者の約 8 割、低尿酸血症患者の約 9 割に尿中排泄異常が観察され、尿酸恒常性維持における尿中排泄経路の重要性が伺える。高尿酸血症では痛風、虚血性心疾患等の、低尿酸血症では尿路結石、運動誘起性腎不全等のリスク上昇が知られている。このため、尿酸尿中排泄機構の解明は尿酸恒常性維持の解明につながり、臨床的観点においても重要である。

尿酸尿中排泄量は、糸球体ろ過量の 10%程度しか観察されないため、尿中に排泄された大部分の尿酸は管腔側から血液中へと再び吸収を受ける。Probenecid(PRB)および benzbromaron(BZB)は尿酸尿中排泄量を増加させる尿酸排泄促進薬であり、抗結核薬 pyrazinamide(PZA)はその副作用として尿酸尿中排泄量を低下させることが知られている。PRB および BZB の尿中排泄促進機構として腎再吸収阻害が、PZA の尿中排泄阻害機構として尿中への分泌阻害が考えられてきた。さらに、PRB は PZA との併用時にも尿酸排泄を促進するが、BZB の尿酸排泄促進効果は消失することが知られている。これらの臨床的知見は、尿酸再吸収過程に 2 つの異なる輸送機構を仮定することで説明されてきた。

尿酸腎再吸収に働くトランスポーターとして URAT1/SLC22A12 が同定された。URAT1 は近位尿細管管腔膜側に発現する尿酸再吸収トランスポーターであり、低尿酸血症患者において高頻度で機能欠損につながる変異が観察されている。さらに、URAT1 機能欠損者では、PRB と BZB および PZA の薬理

作用が消失することが報告されている。つまり、PRB、BZB および PZA から得られたこれまでの臨床的知見は、すべて URAT1 による尿酸輸送の表現型であることが示唆され、2つの異なる再吸収機構を仮定した従来の仮説に反する。そこで、本研究では URAT1 の尿酸輸送特性に着目し、PRB、BZB、PZA の各薬物の単独・併用時の薬理効果を説明するために尿酸尿中排泄機構を明らかにすることを目的とした。①URAT1 はアニオン-尿酸交換輸送体であり、細胞内に濃縮された乳酸や PZA の酸性代謝物である pyrazinoate(PA)により、細胞外からの尿酸取り込み促進が報告されている。このアニオン-尿酸交換輸送体としての性質に着目し、PZA による尿酸排泄阻害機構が尿酸尿中分泌阻害ではなく、尿酸腎再吸収促進であると考えた。②PZA 併用時に PRB は尿酸排泄促進作用を有している、一方 BZB の尿酸排泄促進作用は消失する現象は、PA 細胞内取り込みに対する阻害能の違いに由来するものと考えた。つまり、PRB は URAT1 機能促進効果の原動力となる PA 取り込みを阻害することにより、PA の尿酸排泄阻害効果を打ち消すことができるが、BZB は URAT1 のみを阻害するため、PA 存在下(PA による URAT1 尿酸再吸収促進時)では尿酸尿中排泄クリアランスを上昇させない。この2つの仮説を実証するため、以下の実験を行った。

#### 【方法・結果】

マウス *in vivo* 試験において PA、PRB、BZB の尿酸腎クリアランスへの影響を検討したところ、PA による尿酸排泄抑制作用および、BZB、PRB による尿酸排泄促進作用が観察された。さらに、近位尿細管において URAT1 が S2 および S3 部位に高い mRNA 発現量を示したことから、S2 および S3 部位に相当する近位直尿細管を用いて単離尿細管試験を行った。その結果、近位直尿細管において BZB、PRB による尿酸再吸収率の有意な低下および、PA プレロードによる尿酸再吸収率の上昇が観察された。

次に、PA による尿酸取り込み促進の分子メカニズムについて検討を行った。過去の報告より、細胞内に PA の外向き濃度勾配を形成させた場合、URAT1 を介した尿酸取り込みの促進が生じることが知られている。このため、腎臓における PA 外向き濃度勾配を形成する、PA 取り込みトランスポーターに着目した。遺伝子発現細胞を用いた PA 取り込み試験より、hSMCT1 および hSMCT2 発現細胞において有意な PA 取り込みクリアランスの上昇が観察された。一方、hURAT1 発現細胞では PA 取り込みクリアランスの上昇が観察されず、URAT1 単独では PA による尿酸取り込み促進作用が生じないと予想される。そこで、hSMCT1/hURAT1 または hSMCT2/hURAT1 二重発現細胞を作成し、PA による URAT1 を介した尿酸再吸収促進作用を検討した。その結果、hSMCT1/hURAT1 および hSMCT2/hURAT1 二重発現細胞において、プレロードした PA 濃度依存的な尿酸取り込みクリアランスの上昇が観察された。一方、hURAT1、hSMCT1 および hSMCT2 単独発現細胞においては PA プレロードによる尿酸取り込みクリアランスの上昇は観察されず、PA 取り込みトランスポーターにより形成される PA 外向き濃度勾配が、URAT1 の輸送活性促進には必要であることが示唆された。

次に、PRB と BZB の尿酸排泄促進メカニズムの差異について検討を行った。尿細管管腔側および側底膜側の PA 取り込み機構に対する BZB および PRB の阻害能を検討したところ、BZB は何れの PA 取り込み機構に対し阻害作用を示さなかった。一方、PRB は mSmct1 およびマウス腎スライスにおける PA 取り込みを有意に阻害した。mSmct1 に対する PRB の IC50 値は 199 $\mu$ M であり、マウス腎スライスに対しては 17.5 $\mu$ M である。マウスにおける PRB 薬理作用発現時の非結合型血漿中濃度 215 $\mu$ M との比較により、*in vivo* 条件においても PRB による PA 取り込み阻害作用が予想される。そこで、*in vivo* 試験において PA の尿中排泄に対する BZB および PRB の影響を検討したところ、PRB 投与群においてのみ

PA 腎クリアランスおよび腎臓-血漿中濃度比の低下が観察された。これらの結果より、PRB は PA の腎側底膜側取り込みを阻害することが明らかとなった。さらに、マウス腎スライスを用いて腎側底膜側 PA 取り込み機構に対する検討を行った。その結果、BZB によって阻害されないが、PRB によって阻害を受ける、マウス腎スライスにおける PA 取り込み機構は、OAT1 および OAT3 それぞれの阻害剤である *p*-aminohippurate および estrone-3-sulfate によって阻害されないことが明らかとなった。一方、MCT ファミリーの阻害剤である  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamate および *p*-chloromercuri benzene sulphonic acid によって PA 取り込みは有意に阻害されることが明らかとなった。以上より、マウス腎スライスにおける PA 取り込み機構には、MCT ファミリーに属するトランスポーターの寄与が大きいと予想される。

#### 【考察・議論】

本研究の結果、PZA による尿酸尿中排泄量の低下は、従来の仮説とは異なりその代謝物である PA の URAT1 機能促進による再吸収促進の結果であることが明らかとなった。さらに、PA はアニオン化合物であるため、その細胞内取り込みにはトランスポーターを介した効率的な輸送が必要である。尿酸排泄促進薬である PRB と BZB が PZA 存在下で異なる薬理作用を示す機構として、PRB が PA の腎取り込みトランスポーターを阻害し、PA による再吸収促進効果を減弱させるのに対して、BZB は URAT1 選択的であり PA の腎臓内動態に影響を与えないためであることが示唆された。当初、PA 腎内取り込み機構として、内因性駆動力として働く乳酸の腎再吸収トランスポーター SMCT1/2 を考えていたが、マウス *in vivo* 試験の結果、側底膜側の取り込み機構が PA の腎臓内濃度を決定する重要な要因であった。この PA 基底膜側取り込みには、乳酸輸送トランスポーター MCT ファミリーが関与していることが示唆された。以上より、古典的モデルでは説明困難であった尿酸尿中排泄機構を、URAT1 および URAT1 の輸送駆動力を形成するトランスポーターにより、合理的に説明することができた。尿酸尿中排泄機構の実体解明により、尿酸排泄異常に起因する種々の臨床症状への理解に役立つものと考えている。