

〔別紙2〕

## 審査の結果の要旨

氏名 安藤 智広

本研究において申請者は、ヒトにおける重要な尿酸恒常性維持メカニズムである、尿中排泄メカニズムの検討を行っている。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。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。また、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。

これまでに、尿酸の尿中排泄メカニズムに関する主な知見として、①尿酸は糸球体ろ過量の 10%程度しか尿中に排泄されない腎再吸収優位な化合物である、②Probenecid (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、③PRB 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が消失することが知られている。これらの知見を説明しうる有力な仮説として、糸球体ろ過、分泌前再吸収、尿細管分泌、分泌後再吸収の 4 つの過程からなる 4-コンポーネントモデルが提唱されている。しかし、申請者は近年明らかになりつつあるトランスポーター研究の進展の成果から、この仮説に疑問を感じ、新たな尿酸尿中排泄モデルの構築を試みた。URAT1 は腎近位尿細管刷子縁膜側に発現する、尿酸-有機アニオン交換輸送トランスポーターであり、尿酸腎再吸収に関与していると考えられている。さらに、URAT1 の機能低下者において PRB、BZB、PZA の尿酸排泄への作用が消失するという報告がなされている。これらの報告より、以下のような矛盾点が明らかとなった。①4-コンポーネントモデルにおいて尿中分泌阻害の結果だと考えられていた PZA の尿酸排泄抑制作用が、どの様に腎再吸収トランスポーター URAT1 を介して生じるのか、②異なる再吸収部位を阻害すると考えられていた PRB と BZB がともに URAT1 を阻害するにも関わらず、なぜ異なる尿酸排泄促進作用を示すのか。そこで、申請者はこれらの 4-コンポーネントモデルと近年明らかとなった URAT1 機能の両方を説明可能な尿酸排泄モデルとして、次のような仮説を提案した。①PZA の尿酸排泄抑制作用は、活性代謝物 Pyrazinoate (PA) の腎内蓄積により生じる、URAT1 を介した尿酸腎再吸収促進作用である。②PZA 併用時に生じる PRB と BZB の尿酸排泄促進作用の違いは、PRB と BZB による PA 腎蓄積阻害の違いにより生じる。これら仮説を検証するため、申請者は以下のような検討を行った。

## 1. Pyrazinoic acid による Uric acid 排泄抑制効果の解明

URAT1 機能低下者における臨床試験から、PZA の尿酸排泄抑制作用は URAT1 機能に依存して生じる事が明らかとされている。しかし、PZA 自身は細胞内または細胞外に添加しても、URAT1 を介した尿酸輸送に対し影響を与えないことが *in vitro* 試験より報告されている。一方で、PZA の活性代謝物である PA を含む溶液を細胞内に注入することにより、URAT1 を介した尿酸輸送能を促進することが報告されている。これらの背景を基に、申請者は PA による URAT1 輸送能促進作用に対して、URAT1 だけでなく PA 取り込みトランスポーターもまた必要であると考え検討を行った。その結果、URAT1 と同じく腎近位尿細管刷子縁膜側に発現する乳酸トランスポーター SMCT1 および SMCT2 が PA を輸送することを明らかにし、かつ SMCT1/URAT1 または SMCT2/URAT1 二重発現細胞において、PA が尿酸取り込み促進作用を示すことを明らかとした。これに対し、SMCT1、SMCT2、URAT1 各単独発現細胞では PA による尿酸取り込み促進作用は観察されなかった。さらに、PRB、BZB による尿酸排泄促進作用より、URAT1 機能が確認されているマウスにおいて、近位尿細管 S1、S2、S3 各部位での SMCT1、SMCT2、URAT1 の mRNA 発現量を検討した。その結果、S2 および S3 部位において URAT1 および SMCT1 の mRNA が相対的に高い発現を示すことを明らかとした。そこで申請者は、近位尿細管 S2 および S3 部位に相当する近位直尿細管を用いてマウス単離尿細管微小灌流試験を行い、PA の細胞内へのプレロードが尿酸腎再吸収を促進することを確認している。これらの検討により、PZA の活性代謝物 PA による尿酸排泄抑制作用には、URAT1 ならびに PA の URAT1 発現細胞内への蓄積が必要であることを明らかにしている。

## 2. Probenecid、Benzbromarone 薬理作用機構の解明

URAT1 阻害剤である PRB および BZB は、尿酸排泄抑制作用を示す PZA 併用時に異なる尿酸排泄促進作用を示すことが知られている。PRB は PZA 併用時にも尿酸排泄促進作用を示すが、BZB は示さなくなることが、臨床試験より報告されている。そこで、この現象のメカニズムとして申請者は、PZA の活性代謝物である PA の腎蓄積に対する阻害作用の差により、PZA 併用時の尿酸排泄促進作用の差が生じると仮説を提唱している。先の検討において、PA による URAT1 を介した尿酸輸送促進作用には、URAT1 だけでなく PA の腎蓄積を生じさせる PA トランスポーターもまた必要であることが明らかにされている。すなわち、PRB は PA の腎蓄積を阻害することにより、PZA 併用時においても尿酸排泄促進作用を示すことができるが、BZB は PA 腎蓄積を阻害できないため、尿酸排泄促進作用が消失すると考えられる。初めに、申請者はマウスにおいてもヒトと同様に、PA 併用時において PRB の尿酸排泄促進作用が維持されること、および BZB の促進作用が消失することを確認している。さらに、マウス *in vivo* 試験において PRB が PA 腎蓄積および腎クリアランスを低下させるが、BZB は PA 腎蓄積に影響を与えないことを観察している。これらの結果より申請者は、PRB による PA の腎蓄積阻害は腎クリアランスの低下を伴うことから、刷子縁膜側 PA 取り込み機構の阻害ではなく、腎側底膜側取り込み機構の阻害だと報告している。先の検討において、腎刷子縁膜側に発現する SMCT1 および SMCT2 が PA を細胞内に取り込むことが確認されている。

SMCT1 および SMCT2 は乳酸腎再吸収に関与することがノックアウトマウスを用いた検討より報告されており、申請者もまた乳酸腎クリアランスの測定により PRB による SMCT1 または SMCT2 への作用を検討したが、乳酸腎クリアランスの上昇は観察されなかった。一方、本検討において観察された腎側底膜側の PA 取り込み機構に関して、マウス腎スライスを用いた検討を行っている。その結果、申請者は腎側底膜側における PA 取り込みが、乳酸トランスポーター MCT1 および MCT4 の阻害剤である  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamate および *p*-chloromercuri benzene sulphonic acid によって阻害されることを確認している。ただし申請者は同時に、MCT1 および MCT4 の mRNA が URAT1 の機能が確認された近位尿細管 S2 および S3 部位には検出されなかったことから、他のトランスポーターの寄与を想定している。以上より、本検討において PRB による PA 腎蓄積阻害作用および BZB は阻害作用を持たないことが確認された。このため、申請者は PZA 併用時における PRB および BZB の尿酸排泄促進作用の違いは、PA 腎蓄積に対する阻害作用の違いによると提唱している。

以上の解析より、申請者は①PZA による尿酸排泄抑制作用が、活性代謝物 PA の腎蓄積により生じる URAT1 機能促進であること、②PZA 併用時における PRB と BZB の尿酸排泄促進作用の違いが、PA 腎蓄積への阻害作用の違いで説明できることを明らかとした。さらに、これらの成果を基に申請者は、新規低尿酸血症原因遺伝子および新規高尿酸血症発症メカニズムを提唱している。低尿酸血症は大きく分けて、PRB、BZB、PZA の作用が消失するタイプと、PRB、BZB の作用は消失するが、PZA の作用は観察されるタイプに分けられる。前者は、低尿酸血症患者の多くを占め、原因遺伝子として URAT1 が同定されている。一方、後者に関しては未だ原因遺伝子が不明である。本検討において申請者は、PZA の作用は URAT1 の輸送能と、腎側底膜側 PA 取り込み機構により生じることを明らかとした。一方、SMCT1 および SMCT2 は腎刷子縁膜側において乳酸腎再吸収により URAT1 を駆動するトランスポーターであることが知られている。このため、SMCT1 および SMCT2 の機能低下者においては、URAT1 内因性駆動力低下により低尿酸血症が生じるが、PA 取り込み機構が正常であるため PZA の作用は観察されると考えられる。また、本検討で示したように PZA によって生じる高尿酸血症は、URAT1 を介した尿酸腎再吸収促進だと考えられる。このため、薬物の副作用として高尿酸血症が生じるメカニズムの一つとして、腎内に薬物が取り込まれた結果生じる URAT1 機能促進が予想される。

以上、申請者は尿酸尿中排泄メカニズムを解明することにより、新たな高尿酸血症および低尿酸血症発症メカニズム解明の糸口をつけた。申請者が解明した尿酸排泄メカニズムは尿酸恒常性異常により生じる種々の疾患解明に役立つと考え、本検討が博士（薬学）の学位を授与するに値するものと認めた。