

原 著

ヒト腎臓尿酸トランスポーター URAT1 と 水溶性ヨード系造影剤 iodipamide の相互作用

獨協医科大学 薬理学

岡本 和久 大内 基司 森田亜州華 花田 健治

阿部 篤朗 大谷 直由 林 啓太郎

Jutabha Promsuk 安西 尚彦

要 旨 降圧薬などいくつかの薬剤は本来の薬理作用とは別に尿酸降下作用を持つものがあり、水溶性ヨード系造影剤もその一つで iodipamide や diatrizoate での尿酸排泄亢進が報告されていた。長らく不明のままであった腎尿酸輸送機構の分子実体は 2002 年の腎尿管尿酸トランスポーター URAT1 (Urate Transporter 1) の分子同定によりその理解が飛躍的に進んだ。本研究では URAT1 と水溶性造影剤の iodipamide および diatrizoate の相互作用を検討することで、その尿酸排泄促進作用の分子機序の解明を目的とする。URAT1 の尿酸輸送活性の測定には URAT1 安定発現 HEK293 細胞 (HEK-URAT1) 細胞を用いた。Iodipamide は HEK-URAT1 細胞での RI 標識尿酸取込みを著明に阻害した (IC_{50} : $1.19 \pm 0.08 \mu\text{M}$) のに対し、diatrizoate は 1 mM までの範囲では 50% 以上の阻害作用を示さなかった。1 mM までの iodipamide は HEK-URAT1 細胞の生存率に影響を与えなかった。Iodipamide による URAT1 媒介尿酸輸送への阻害作用のキネティクス解析の結果、その阻害は競合阻害であり、阻害定数 K_i 値は $11.03 \mu\text{M}$ であった。以上より、iodipamide は尿酸トランスポーター URAT1 と相互作用をすることを初めて確認できた。このことから iodipamide は細胞外から URAT1 の尿酸結合部位に結合し、競合して阻害を行うことで、腎尿管の経上皮性尿酸再吸収を抑制し、ひいては血清尿酸値を低下させるものと考えられた。

Key Words : 腎臓, トランスポーター, 尿酸, 造影剤, 近位尿管

緒 言

体内で有機酸として存在する尿酸 (uric acid) は、主に肝臓のキサンチンオキシダーゼにより合成され、肝臓の尿酸酸化酵素 (ウリカーゼ) を欠失しているヒトを含む高等霊長類では、尿酸はプリン体の最終代謝産物となる。体内に蓄積した尿酸はその 3 分の 2 が腎臓より排泄され、血清尿酸値は産生と排出のバランスの上に成り立っている¹⁾。ヒトの腎尿管は強力な尿酸再吸収機構を備えているため、他の哺乳類に比し血中尿酸値は高値を示す。このためヒトでは腎臓における尿酸の排泄低下により高尿酸血症を来すと、痛風や尿路結石症などを容

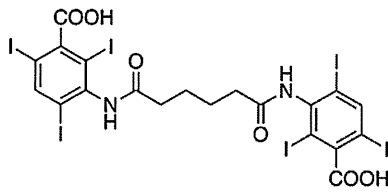
易に発症する一方、腎性低尿酸血症は、腎臓における尿酸排泄亢進が成因であると考えられる²⁾。降圧薬などいくつかの薬剤の中には本来の薬理作用とは別に尿酸を低下させるものがあることが以前より報告されていたが³⁾、腎尿酸輸送機構の分子実体は長らく不明のままであったため、その原因の解明は遅れていた。

著者らの研究グループは、2002 年に世界に先駆けてヒトの腎臓特異的尿酸トランスポーター URAT1 (urate transporter 1) の同定に成功し、URAT1 は特発性腎性低尿酸血症の原因となることに加え、benzbromaron, probenecid, losartan と言った尿酸値を変動させる薬物の作用点であることを明らかにした⁴⁾。URAT1 は腎皮質の近位尿管管腔側に局在し、尿酸の経上皮細胞性再吸収の中で入り口としての役割を担うメインの分子と考えられている。腎での尿酸排泄促進を来す薬物の多くはこの URAT1 による尿酸再吸収を阻害する事で、尿酸の尿中排泄を増加させ、血清尿酸値を低下させることが

平成 27 年 11 月 27 日受付, 平成 27 年 12 月 24 日受理
別刷請求先: 岡本和久

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880
獨協医科大学 薬理学

Iodipamide



Sodium diatrizoate

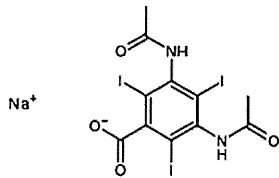


図1 本実験で用いた水溶性ヨード系造影剤の化学構造

推測されている。

以前より排泄性腎盂造影に用いられる diatrizoate (ウログラフィン[®]) や静脈性胆道造影に用いられる iodipamide (ピリグラフィン[®]) などの水溶性ヨード系造影剤は腎での尿酸排泄促進を来すことが報告されていた⁵⁾。そこで今回、初めて X 線造影剤を対象とし、その尿酸排泄作用の分子機序解明を目指して尿酸トランスポーター URAT1 への影響の解明を試みた。

方法

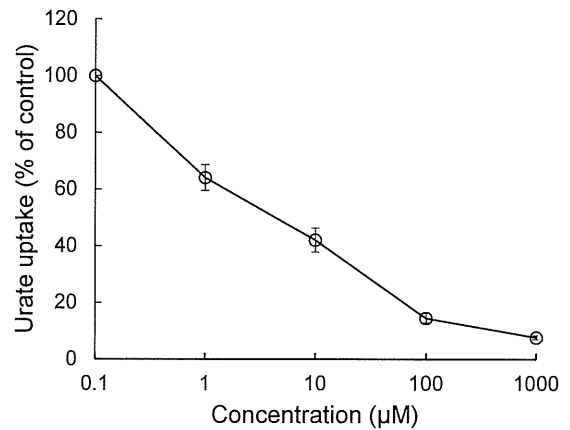
1. 試薬

[¹⁴C]Uric acid (1.85-2.22 GBq/mmol) は American Radiolabeled Chemicals, Inc. (St. Louis, MO) より購入した。X 線造影剤の iodipamide, sodium diatrizoate (図1) を含むその他の試薬はシグマアルドリッチジャパン (東京) より購入した。

2. 細胞培養

今回の検討に用いるヒト尿酸トランスポーター hURAT1 安定発現ヒト胎児由来腎臓細胞 HEK293 (HEK-URAT1) 細胞は、既報の通り樹立されている⁶⁾。HEK-URAT1 細胞は 37°C の 5% CO₂ 環境下で、10% FBS, 500 μg/ml geneticin を含む DMEM 培地を用いて培養を行った。細胞は 0.05% trypsin-EDTA 液 (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5.5 mM glucose, 4 mM NaHCO₃, 0.5 mM EDTA, 5 mM HEPES, pH 7.2) で継代を行い、継代後 15 から 25 代を使用した。

A)



B)

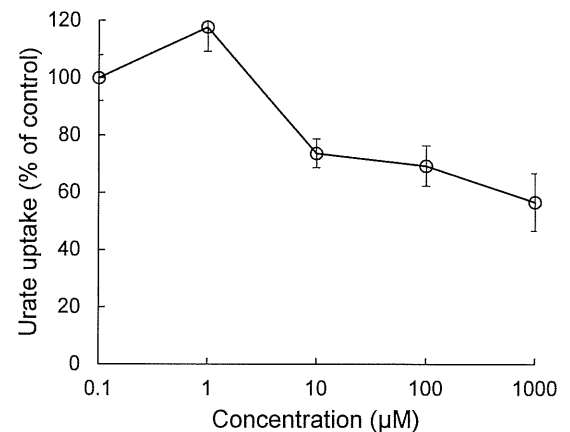


図2 URAT1 媒介尿酸輸送に対する造影剤の阻害効果 HEK-URAT1 細胞を RI 標識尿酸 (10 μM) を含む低 Cl⁻-free HBSS 溶液に iodipamide (A) ないし diatrizoate (B) (0.1, 1, 10, 100, 1000 μM) を添加した後、HEK-URAT1 細胞に 2 分間インキュベートを行った。(平均 ± S.D.; n=4)。

3. 尿酸輸送活性の測定

継代後 2 日目、測定開始 10 分前に 37°C の低 Cl⁻-Hank's Balanced Salt Solution (Cl⁻-free HBSS) 溶液 (125 mM Na-gluconate, 5.6 mM glucose, 4.8 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄ · 7H₂O, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.3 mM CaCl₂, 25 mM HEPES) に移し、RI 標識尿酸の輸送活性の測定を行った。RI 標識尿酸 (10 μM) を含む低 Cl⁻-free HBSS 溶液に造影剤 (iodipamide ないし diatrizoate 0.1, 1, 10, 100, 1000 μM) を添加した後、HEK-URAT1 細胞の培養上清に添加し、2 分間インキュベートを行い、その細胞内取込み量を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

尚、iodipamide による URAT1 媒介尿酸輸送への阻害作用のキネティクス解析の際には、iodipamide 50 μM の有無による比較を行った。尿酸が 10, 20, 40, 60,

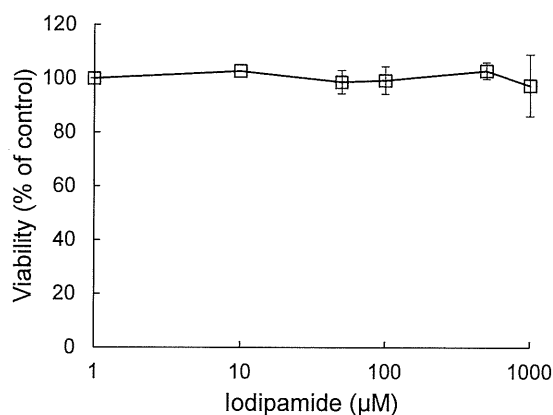


図3 Iodipamide の HEK-URAT1 細胞の生存率への影響

HEK-URAT1 細胞の培養上清に iodipamide (1, 10, 50, 100, 500, 1000 μM) を付加し, 24 時間培養を行い, その細胞生存性を検討した. (平均 ± S.E.M.; n=4).

100 μM (うち 10 μM は RI 標識尿酸で, その他は非標識体) の時の尿酸輸送活性をプロットした. 阻害定数 K_i 値は以下の計算式により算出した⁷⁾.

$$K_i = \text{iodipamide 濃度} / [(\text{iodipamide 存在下の尿酸輸送の } K_m / \text{iodipamide 非存在下の尿酸輸送の } K_m) - 1]$$

4. 細胞生存率の測定

細胞生存率は既報⁸⁾に従い MTT (3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 試験を行うことで測定した.

5. 統計学的処理

群間差の検定は対応のない t-test を用い, 危険率 5% 未満を有意差ありとした.

結 果

1. URAT1 安定発現細胞に見られる尿酸輸送に対する X 線造影剤の抑制効果

始めに X 線造影剤 iodipamide および diatrizoate が URAT1 による尿酸輸送にどの程度影響を与えるかを調べるため, HEK-URAT1 細胞を用いて RI 標識尿酸に対する同剤の取込み抑制実験を行った. 図 2 に示すように, iodipamide は濃度依存性に URAT1 による尿酸輸送を抑制し, その IC_{50} 値は $1.19 \pm 0.08 \mu\text{M}$ であったのに対し, diatrizoate は 1 mM までの範囲では 50% を越える阻害作用は示さなかった.

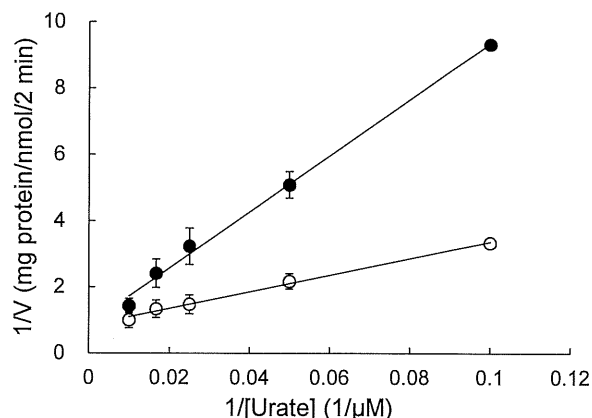


図4 Iodipamide による URAT1 媒介尿酸輸送の阻害キネティクス

Iodipamide 50 μM の有無により URAT1 媒介尿酸輸送キネティクスの比較を行った. 尿酸が 10, 20, 40, 60, 100 μM の時の尿酸輸送活性をプロットした. ○: Iodipamide 無, ●: Iodipamide (50 μM) 有 (平均 ± S.E.M.; n=4).

2. URAT1 安定発現細胞に対する iodipamide の細胞毒性の検討

今回の実験で用いた iodipamide が細胞障害を来している可能性を除外するため, HEK-URAT1 細胞の培養上清に濃度の異なる iodipamide (1, 10, 50, 100, 500, 1000 μM) を付加し, 24 時間培養を行い, その細胞生存性を検討した. 図 3 に示すように, 阻害実験に用いた 1000 μM までの iodipamide では有意な細胞障害はなかった.

3. Iodipamide による阻害作用のキネティクス解析

URAT1 による尿酸輸送が, どのようにして iodipamide により阻害されるのか, その阻害様式を明らかにするため, iodipamide 存在下および非存在下でのキネティクス解析を行った. 解析結果を Lineweaver-Burk プロットにより表示した (図 4).

Iodipamide 非存在下での y 切片 ($=1/V_{max}$) は 0.85, 存在下では 0.88 とほぼ同じであり, x 軸上の交点 ($= -1/K_m$) が非存在下で 0.034, 存在下で 0.010 と大きく変化したことから, iodipamide と URAT1 の相互作用は競合阻害であることが明らかになった. その阻害定数 K_i は $11.03 \mu\text{M}$ であった.

考 察

今回我々は本研究において, 尿酸再吸収阻害作用が示唆されている水溶性造影剤 iodipamide および diatrizoate による尿酸排泄促進作用の分子機序の解明を目的として, URAT1 による腎臓尿酸輸送と水溶性造影剤の

相互作用を検討した。

腎臓尿酸トランスポーター URAT1 (urate transporter 1) は、有機陰イオントランスポーター OAT (Organic Anion Transporter) ファミリー⁹⁾に属する12回膜貫通型の分子で、腎皮質の近位尿細管管腔側に局在する⁴⁾。URAT1は時間依存性に増加する尿酸の取り込みを示し、その取り込み様式は飽和を示す担体輸送の特徴を有すること(ミカエリス定数 K_m : 約 $370 \mu M$)がアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた実験により確認されている。URAT1は乳酸、ニコチン酸、および抗結核薬ピラジナミドの代謝産物であるピラジナルボン酸(PZA)、などの有機アニオンと尿酸との交換を行う尿酸/アニオン交換輸送体であり、血中尿酸値を変動させる様々な薬物及び内因性アニオンと相互作用をすることも確認されたことから、URAT1は尿酸値を変動させる薬物の作用点であり、新たな尿酸排泄促進薬の創薬ターゲットであると考えられている²⁾。URAT1をコードする遺伝子 *SLC22A12* の変異が、家族性腎性低尿酸血症(OMIM220150)を引き起こすことから、URAT1が腎臓において尿酸再吸収を担う中心的な輸送体であると考えられている¹⁰⁾。

腎臓の尿酸輸送は種々の薬物によって制御されることが知られている^{1,3)}。例えば薬物誘発性の高尿酸血症は、腎臓での尿酸再吸収の亢進ないし尿酸排出の抑制により生じると考えられ、また逆に低尿酸血症は尿酸再吸収の抑制および尿酸排出の亢進により生じると考えられてきた。その中でピラジナミド、プロベネシド、そしてサリチル酸は、腎臓の尿酸排泄に対する paradoxical な効果を持つことが報告されていた¹¹⁾。すなわち低濃度のこれらの薬物は、腎臓での尿酸排泄を低下させ、高濃度では腎臓での尿酸排泄を増加させる。

2002年の我々の研究グループによる腎近位尿細管管腔側の尿酸トランスポーター URAT1 の分子同定⁴⁾を契機とした家族性腎性低尿酸血症患者解析の結果、URAT1 遺伝子欠損患者ではピラジナミドの尿酸排泄抑制効果が消失することが示され、ヒトでは URAT1 が唯一の PZA の作用標的であることが明らかになった¹⁰⁾。続いて我々はサリチル酸の持つ尿酸排泄に対する paradoxical 効果も、ピラジナミド同様に URAT1 が作用標的であることを解明している¹²⁾。

水溶性ヨード系造影剤は目的の器官と周囲組織の間に X 線吸収の差がない時にコントラストを作り出す目的で現在臨床上頻繁に用いられている^{13,14)}。尿路・血管造影および CT 用造影剤として1953年に導入された diatrizoate (ウログラフィン[®]) は分子内にヨードを3つ持つトリヨード化合物でイオン性モノマー型造影剤である。

世界中で最も広く使用された造影剤であったが、我が国では非イオン性造影剤の有用性が確立されたため、2001年2月にイオン性高浸透圧造影剤の血管内投与に係わる効能効果は削除された。ほぼ全てが糸球体で濾過され腎臓から排泄されるという最初の静脈胆道造影剤である iodipamide (ビリグラフィン[®]) もトリヨード化合物であるが、側鎖をもたないイオン性ダイマー型造影剤であり、血管内投与されても大部分は化学変化(代謝)を受けずに肝臓の陰イオン輸送機構を利用して90%が胆汁中に排泄され、残りの10%は尿中に排泄されるという。最近では CT 技術の発展により、CT-cholangiography にも使用されている。

造影剤投与に伴う副作用として腎機能障害があり、急性腎障害 (acute kidney injury: AKI) の一種と考えられており、別名造影剤腎症 (contrast induced nephropathy: CIN) とも呼ばれている¹³⁾。原因は不明であるが血管攣縮による腎臓の血流変化や尿細管障害が示唆されている。Diatrizoate および iodipamide などの水溶性ヨード系造影剤による低尿酸血症の報告は⁵⁾、増加した尿中尿酸が結晶化することで閉塞性の腎障害を起こし AKI 発症に繋がる可能性も示唆されていた。

今回の検討で、その約1割が尿中に排泄される iodipamide が URAT1 との著明な相互作用を示す事、そして URAT1 の尿酸結合部位と競合阻害を起こすことから、iodipamide が持つ尿酸降下作用は管腔側にある尿酸取り組み口の URAT1 と相互作用し、尿酸再吸収を阻害することで尿中尿酸排泄が増え、従って血清尿酸値が下がることで説明可能であると思われる。これに対し、その多くが尿中に排泄される diatrizoate では著明な URAT1 との相互作用を認めなかったが、同剤も尿酸再吸収を阻害して低尿酸血症を来すと考えられている事から、その分子標的は管腔側の URAT1 ではなく、尿酸の細胞からの出口となる URATv1¹⁵⁾ である可能性が考えられた。

URAT1 相互作用を示す化合物の分子構造に関しては、モノマー型である diatrizoate よりもダイマー型である iodipamide の方がより強い相互作用を示したことが興味深い。我々は既にピリミジン骨格を持つオロト酸が URAT1 の基質となる事を報告しており¹⁶⁾、モノマーよりもダイマーの方がより親和性が高くなるという構造活性情報は今後 URAT1 を標的とした新規尿酸排泄促進薬開発に重要な情報を与えると期待される。

最近我々は降圧薬などとして臨床で広く用いられている Ca^{2+} 拮抗薬のいくつかが URAT1 との相互作用を示し、それらが持つ尿酸降下作用の一部が腎臓の尿酸再吸収阻害である可能性を報告した¹⁷⁾。それらの中には肝

臓で尿酸合成を担うキサンチンオキシダーゼ活性を阻害するものもあり，尿酸産生抑制による尿酸降下作用も否定出来ない。基底側の URAT1 との相互作用に加え，水溶性ヨード造影剤の尿酸降下作用を考える上で，キサンチンオキシダーゼ阻害も視野に入れ，今後の課題として検討を続けて行きたい。

結 論

尿酸降下作用を示すことが報告されていた水溶性ヨード型造影剤 iodipamide は URAT1 と相互作用を示すことが初めて確認され，さらに iodipamide は URAT1 の尿酸結合部位を競合的に阻害することも示されたことから，iodipamide による尿酸排泄促進はこの URAT1 への尿酸再吸収に対する阻害作用である可能性が示された。

謝 辞 本論文の一部は，日本学術振興会科学研究費補助金 24590328 (林)，23590647 (Jutabha)，26461258 (安西)，財団法人痛風研究会研究助成金，獨協医科大学 関湊賞研究助成 (安西，Jutabha)，研究助成金 (個人研究) (大内，大谷)，および研究奨励賞 (岡本，花田) の補助を受けて行われました。

本論文内容に関する著者らの利益相反：なし

文 献

- 1) Sica DA and Schoolwerth AC : Renal handling of organic anions and cations : Excretion of uric acid. in "The Kidney 6th Edition". ed by Brenner BM. Saunders, Philadelphia, pp680-700, 2000.
- 2) Anzai N and Endou H : Drug discovery for hyperuricemia. *Expert Opin Drug Discov* **2** : 1251-1261, 2007.
- 3) 久留一郎 : 尿酸が下がる薬剤. *Heart View* **17** : 187-192, 2013.
- 4) Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, et al : Molecular identification of a renal urate-anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* **417** : 447-452, 2002.
- 5) Postlethwaite AE and Kelley WN : Uricosuric effect of radiocontrast agents. A study in man of four commonly used preparations. *Ann Intern Med* **74** : 845-852, 1971.
- 6) Anzai N, Miyazaki H, Noshiro R, et al : The multivalent PDZ domain-containing protein PDZK1 regulates transport activity of renal urate-anion exchanger URAT1 via its C terminus. *J Biol Chem* **279** : 45942-45950, 2004.
- 7) Apiwattanakul N, Sekine T, Chairoungdua A, et al : Transport properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by organic anion transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Pharmacol* **55** : 847-854, 1999.
- 8) Jung KY, Takeda M, Shimoda M, et al : Involvement of rat organic anion transporter 3 (rOAT3) in cephaloridine-induced nephrotoxicity : in comparison with rOAT1. *Life Sci* **70** : 1861-1874, 2002.
- 9) Anzai N, Kanai Y, Endou H : Organic anion transporter family : current knowledge. *J Pharmacol Sci* **100** : 411-426, 2006.
- 10) Ichida K, Hosoyamada M, Hisatome I, et al : Clinical and molecular analysis of patients with renal hypouricemia in Japan-influence of URAT1 gene on urinary urate excretion. *J Am Soc Nephrol* **15** : 164-173, 2004.
- 11) Roch-Ramel F and Guisan B : Renal Transport of Urate in Humans. *News Physiol Sci* **14** : 80-84, 1999.
- 12) 大津尚子, 安西尚彦, 福富俊之, 他 : ヒト尿酸トランスポーター URAT1 によるサリチル酸輸送. *日腎会誌* **52** : 499-504, 2010.
- 13) 桑鶴良平, 山城雄貴 : 造影剤の種類. *Nephrology Frontier* **12** : 260-264, 2013.
- 14) 山口昂一 : 臨床画像 Special : 10-15, 1991.
- 15) Anzai N, Ichida K, Jutabha P, et al : Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter urate1 (slc2a9) in humans. *J Biol Chem* **283** : 26834-26838, 2008.
- 16) Miura D, Anzai N, Jutabha P, et al : Human urate transporter 1 (hURAT1) mediates the transport of orotate. *J Physiol Sci* **61** : 253-257, 2011.
- 17) Tsuchiya G, Hori T, Onizawa N, et al : Molecular mechanism of the urate-lowering effects of calcium channel blockers. *Dokkyo J Med Sci* **43** : 23-29, 2016.

Interaction of Human Renal Urate Transporter URAT1 and X-Ray Contrast Agent Iodipamide

Kazuhisa Okamoto, Motoshi Ouchi, Asuka Morita, Kenji Hanada, Tokuro Abe,
Naoyuki Otani, Keitaro Hayashi, Promsuk Jutabha, Naohiko Anzai

Department of Pharmacology and Toxicology, Dokkyo Medical University School of Medicine

Drug-induced hypouricemia has been found in several drugs such as probenecid, benzbromarone and angiotensin II receptor blocker (ARB) losartan. X-ray contrast agents such as iodipamide and diatrizoate, used for the intravenous cholangiography and excretory urography, were reported to have uricosuric effect beside their original action. After the molecular identification of renal apical urate transporter URAT1 as an entrance of urate into the epithelial cells of proximal tubules, this protein is thought to be major determinant for renal reabsorption of urate that affect the blood urate levels in human. The purpose of this study is to examine whether iodipamide and diatrizoate act on URAT1. In URAT1-stably expressing HEK293 (HEK-URAT1) cells, iodipamide inhibited [¹⁴C] urate uptake dose-dependently (IC_{50} , $1.19 \pm 0.08 \mu M$),

while diatrizoate did not. Up to the concentration of 1 mM, iodipamide incubation for 24 hr did not affect the viability of HEK293-URAT1 cells. Lineweaver-Burk plot of the kinetic analysis by URAT1-mediated urate uptake with or without iodipamide indicated that its interaction occurs in a competitive manner (K_i : $11.03 \mu M$). These results suggest that uricosuric effect of iodipamide can be explained by the interaction of iodipamide with urate-binding site of URAT1, and the inhibition of urate reabsorption from extracellular side by iodipamide causes uricosuria leading to induce hypouricemia.

key words : kidney, transporter, uric acid, contrast media agent, proximal tubules