

【5】

氏 名	岡 本 和 久 <small>おか もと かず ひさ</small>
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第665号
学位授与の日付	平成28年3月9日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (薬理学)
学位論文題目	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
論文審査委員	(主査) 教授 杉 本 博 之 (副査) 教授 瀬 尾 芳 輝 教授 堀 雄 一

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

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、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（ビリグラフィン®）などでは腎臓の尿酸排泄亢進が報告されていた。尿酸降下作用を持つ薬剤が標的となる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が、2002年の腎尿細管尿酸トランスポーターURAT1（urate transporter 1）の分子同定により、その後その分子実体の理解が飛躍的に進んだ。

【目 的】

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、これまで不明であったそれら薬剤による尿酸排泄促進作用の分子機序の解明を目的とする。

【対象と方法】

URAT1の尿酸輸送活性の測定にはURAT1安定発現ヒト胎児由来腎臓細胞HEK293細胞（HEK-URAT1細胞）を用いた。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 液で継代を行い、継代後15から25代を使用した。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分間インキュベーションを行い、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。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い、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。阻害定数Ki値は以下の計算式により算出した。

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

細胞生存率はMTT試験を行うことで測定した。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】

IodipamideはHEK-URAT1細胞でのRI標識尿酸取込みを著明に阻害した（IC₅₀: 1.19 ± 0.08 μM）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Ki値は11.03 μMであった。

【考 察】

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URATv1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、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。

【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。

論文審査の結果の要旨

【論文概要】

薬剤の中に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、diatrizoate（ウログラフィン[®]）やiodipamide（ビリグラフィン[®]）など水溶性ヨード系造影剤も腎臓の尿酸排泄亢進が報告されていた。2002年に分子同定された腎尿細管尿酸トランスポーターURAT1（Urate Transporter 1）は腎尿酸輸送機構で最も重要な分子である。本研究ではURAT1と水溶性造影剤のiodipamideおよびdiatrizoateの相互作用の検討により、その尿酸排泄促進作用の分子機序解明を目的として行われた。

URAT1の輸送活性はURAT1安定発現ヒト胎児由来腎臓細胞HEK293細胞（HEK-URAT1細胞）を用い、2分間インキュベート後のRI標識尿酸の細胞内取込み量を、細胞生存率は3-（4,5-dimethylthiazol-2-yl）-2,5-diphenyltetrazolium bromide（MTT）試験を行うことで測定した。

IodipamideはURAT1の尿酸取込みを著明に阻害したが、細胞生存率に影響はなく、細胞毒性によるものではなかった。キネティクス解析の結果、その阻害は競合阻害（阻害定数 K_i 値：11.03 μ M）であった。Diatrizoateは阻害作用を示さなかった。

本研究により、iodipamideが持つ尿酸降下作用は管腔側のURAT1との相互作用により尿酸再吸収を阻害することで尿中尿酸排泄が増え、血清尿酸値低下に至るものと考えられた。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、既に樹立されているURAT1安定発現ヒト胎児由来腎臓細胞HEK293細胞（HEK-URAT1細胞）を用いた尿酸輸送活性測定法を用いており、薬物の阻害効果判定もこれまでのスタンダードなプロトコールに則って行われていること、さらに阻害効果が薬物の細胞毒性によるものではないことを否定しており、本研究方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

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（ビリグラフィン[®]）など水溶性ヨード系造影剤は以前から本来の薬理作用とは別に尿酸降下作用を持つことが報告されていたが、その分子機序は長らく不明のままであった。本研究は水溶性ヨード系造影剤iodipamideのこれまで不明であった尿酸排泄促進作用が腎尿細管管腔側の取込みトランスポーターURAT1の阻害による可能性を世界で初めて示唆している他、iodipamideはURAT1の尿酸結合部位を競合的に阻害することも同時に明らかにしている。この点において本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、既にヒトへの投与が行われ、臨床的に尿酸降下作用が認められている水溶性ヨード系造影剤を選択し、これまでに確立された薬物阻害作用検討のプロトコールを遵守して得られた結果から、尿酸排泄促進作用とURAT1の関連性を位置付けている。そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、また、薬理学、生理学など関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文では、これまでに報告されている尿酸（プリン骨格）を輸送するトランスポーターであるURAT1がピリミジン骨格を持つオロト酸もその輸送基質とする例に加えて、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すことを解明した。このURAT1の基質認識に関する構造活性情報は今後同分子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ことにつながるだけでなく、他のトランスポーターに対する阻害薬作製を始めとした創薬研究の進歩にも大いに役立つ大変意義深い研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、薬理学や生化学・分子生物学の理論を学び実践した上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は医学領域の学会誌への掲載が承認されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判定した。

（主論文公表誌）

Dokkyo Journal of Medical Sciences

43 : 73-78, 2016