

## 【10】

氏 名	つちやごう 土屋 豪
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第670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 (心臓・血管外科学)
学位論文題目	<b>Molecular mechanism of the urate-lowering effects of calcium channel blockers</b> <b>(Ca拮抗薬による尿酸降下作用の分子機序の解明)</b>
論文審査委員	(主査) 教授 石 光 俊 彦 (副査) 教授 麻 生 好 正 教授 田 口 功

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【背 景】

Angiotensin receptor blockerであるlosartanを初めとして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ることが知られている。カルシウム拮抗薬（Calcium channel blocker：CCB）も一部尿酸降下作用を有していると報告されているが、その尿酸降下作用の分子機序は明らかになっていない。血中尿酸値は肝臓でのキサンチンオキシダーゼ（Xanthine oxidase：XO）による産生と腎臓での尿酸輸送機構による排泄のバランスにより決まっている。この中で尿酸降下作用を持つ薬剤の標的となる腎臓の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年に腎臓での尿酸再吸収の重要な分子である尿酸トランスポーターURAT1（Urate Transporter 1）の同定がなされたことで、その理解が飛躍的に進んだ。

#### 【目 的】

本研究ではURAT1とCCBの相互作用、およびXOとCCBの相互作用を検討することで、これまで不明であったCCBによる尿酸降下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% CO<sub>2</sub>環境下で、10% FBS, 500μg/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<sup>-</sup>-Hank's Balanced Salt Solution (Cl<sup>-</sup>-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Cl<sup>-</sup>-free HBSS溶液にCCB (nifedipine, nilvadipine, nitrendipine, benidipine, nisoldipine, nicardipine, efonidipine, amlodipine, azelnidipine (dihydropyridine subgroup), and verapamil, diltiazem (non-dihydropyridine subgroup)) 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。濃度依存性阻害実験には薬剤を0.1, 1, 10, 100, 1000μM投与する事で測定を行った。キサンチンオキシダーゼ活性の測定にはXanthine Oxidase Fluorometric Assay Kit (Cayman Chemical Co.) を用いた。独立した多群間の検定はsingle-factor ANOVAを用い、post hoc testにはDunnnett法を用いて、危険率5%以下を有意差ありとした。

### 【結 果】

CCBの中でnifedipine, nilvadipine, nitrendipineは強力に (それぞれ47%, 32%, 43%)、benidipine, nisoldipine, nicardipine, efonidipineは中等度に (それぞれ60%, 59%, 58%, 64%) HEK-URAT1細胞でのRI標識尿酸取込みを阻害した。さらに強い阻害を示したnifedipine, nilvadipine, nitrendipineは濃度依存性の阻害作用を示した (IC<sub>50</sub>: それぞれ15.8, 0.018, 0.40μM)。XOに対する阻害効果はnifedipine, nisoldipineで観察されたが、その程度は軽度であった。

### 【考 察】

今回の検討で、CCBは強弱の差こそあれ、多くが腎尿酸再吸収の主要な経路である尿酸トランスポーターURAT1に作用し、XOには殆ど作用が認められなかったことは、CCBに見られる尿酸降下作用が腎臓における尿酸排泄への効果である事が示唆された。特に強い阻害を示したnifedipine, nilvadipine, nitrendipineのIC<sub>50</sub>はそれぞれ15.8, 0.018, 0.40μMであったが、健康成人に投与された際のCmaxと比較した場合、唯一nilvadipine (Cmax: 0.009 μM) が同等レベルにあるため、nilvadipineの尿酸降下作用はURAT1によるものであることが推測された。

構造活性相関の点では、強い阻害を示したnifedipine, nilvadipine, nitrendipineの化合物から見て、ジヒドロピリジン環のC4位に存在するニトロフェニル基がURAT1との結合に重要であると考えられ、基質結合部位の構造解明への情報を与えると共に、今後のURAT1を標的とした新規抗痛風薬開発に役立つものと期待される。

### 【結 論】

尿酸降下作用を示すことが報告されていたCCBはXOよりもむしろURAT1に作用を示すことが初めて確認された。強い阻害効果を示したCCBから得られた構造活性相関情報は、今後のURAT1標的分子創薬に重要な示唆を与える事が期待される。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

### 【論文概要】

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ることが知ら

れている。カルシウム拮抗薬（calcium channel blocker：CCB）の中にも一部尿酸降下作用を有していると報告されているが、その尿酸降下作用の分子機序は明らかになっていない。血中尿酸値は肝臓でのキサンチンオキシダーゼ（xanthine oxidase：XO）による産生と腎臓での尿酸輸送機構による排泄のバランスにより決まっている。この中で尿酸降下作用を持つ薬剤の標的となる腎臓の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年に腎臓での尿酸再吸収の重要な分子である尿酸トランスポーターURAT1（Urate Transporter 1）の同定がなされたことで、その理解が飛躍的に進んだ。本研究ではURAT1とCCBの相互作用、およびXOとCCBの相互作用を検討することで、これまで不明であったCCBによる尿酸降下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% CO<sub>2</sub>環境下で、10% FBS, 500μg/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Cl<sup>-</sup>-free-Hank's Balanced Salt Solution（Cl<sup>-</sup>-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Cl<sup>-</sup>-free HBSS溶液にCCB（nifedipine, nilvadipine, nitrendipine, benidipine, nisoldipine, nicardipine, efonidipine, amlodipine, azelnidipine（ジヒドロピリジン系）、および verapamil, diltiazem（非ジヒドロピリジン系））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。濃度依存性阻害実験には薬剤を0.1, 1, 10, 100, 1000μM投与する事で測定を行った。キサンチンオキシダーゼ活性の測定にはXanthine Oxidase Fluorometric Assay Kit（Cayman Chemical Co.）を用いた。独立した多群間の検定はsingle-factor ANOVAを用い、post hoc testにはDunnnett法を用いて、危険率5%以下を有意差ありとした。CCBの中でnifedipine, nilvadipine, nitrendipineは強力に、benidipine, nisoldipine, nicardipine, efonidipineは中等度にHEK-URAT1細胞でのRI標識尿酸取込みを阻害した。より強い阻害を示したnifedipine, nilvadipine, nitrendipineは濃度依存性の阻害作用を示した。XOに対する阻害効果はnifedipine, nisoldipineで観察されたが、その程度は軽度であった。

今回の検討でCCBの多くが腎尿酸再吸収の主要な経路である尿酸トランスポーターURAT1に作用し、XOには殆ど作用が認められなかったことは、CCBに見られる尿酸降下作用が腎臓における尿酸排泄への効果である事が示唆された。特に強い阻害を示したnifedipine, nilvadipine, nitrendipineのIC<sub>50</sub>はそれぞれ15.8, 0.018, 0.40μMであったが、健康成人に投与された際のC<sub>max</sub>と比較した場合、唯一nilvadipine（C<sub>max</sub>：0.009 μM）が同等レベルにあるため、nilvadipineの尿酸降下作用はURAT1によるものであることが推測された。

構造活性相関の点では、強い阻害を示したnifedipine, nilvadipine, nitrendipineの化合物から見て、ジヒドロピリジン環のC4位に存在するニトロフェニル基がURAT1との結合に重要であると考えられ、基質結合部位の構造解明への情報を与えると共に、今後のURAT1を標的とした新規抗痛風薬開発に役立つものと期待される。

### 【研究方法の妥当性】

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、RI標識尿酸、CCBを培養上清に添加し、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ており、またキサンチンオキシダーゼ活性の測定には確立された測定キットを用いている。これらは標準的な実験方法であり、適切な対照群の設定と客観的な統計解析を行っており、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】

CCBの一部は尿酸降下作用を有していると報告されているが、その尿酸降下作用の分子機序は明らかになっていなかった。今回の研究ではCCBはXOよりもむしろURAT1に作用していることを初めて示し、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、多種のCCBを用い適切な対照群の設定の下、確立された実験手法と統計解析を用いて、CCBのURAT1尿酸再吸収阻害の関係を示唆している。これらの結論は、論理的に矛盾するものではなく、薬理的な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】

強い阻害効果を示した3つのCCBから得られた構造活性相関情報は、今後のURAT1標的分子創薬に重要な示唆を与えることが期待される。

### 【申請者の研究能力】

申請者は、薬理学、生理学を基にCCBの作用機序や尿酸代謝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。その研究成果は今後のURAT1分子創薬に重要な示唆を与えており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

### 【学位授与の可否】

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 : 23-29, 2016