

## 【14】

氏 名	ほり たか ゆき 堀 貴 行
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第713号
学位授与の日付	平成30年3月6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>The creation of urate under-excretion animal models and the uricosuric effects of dihydropyridine calcium channel blockers in vivo</b> <b>(尿酸排泄低下動物モデルの作製とin vivoにおけるジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬の尿酸排泄促進作用)</b>
論文審査委員	(主査) 教授 石 光 俊 彦 (副査) 教授 安 隆 則 教授 小 橋 元

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【背 景】

ヒトの尿酸値は主に肝臓における尿酸産生と、腎臓における尿酸排泄によって規定される。2002年にURAT1 (*SLC22A12*) と呼ばれる尿酸トランスポーターが発見された。このトランスポーターは腎臓の近位尿細管管腔側に存在し、尿酸の排泄に関与していることが明らかになり、以後様々な尿酸排泄に関与するトランスポーターの存在が報告されている。尿酸の排泄低下型の高尿酸血症の治療薬はこのURAT1を抑制することで尿酸排泄を促進し、尿酸値低下をもたらす。また同時に高尿酸血症は高血圧の合併や心血管疾患との関連が報告されている。高血圧治療薬のlosartanやカルシウム拮抗薬は尿酸降下作用をもつことが報告されているものの、その作用機序は不明であった。我々はin vitroにおいて、ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬がURAT1を抑制し、尿酸排泄促進作用をもつ可能性を報告したが、尿酸代謝の違いによりin vivoにおいてこの作用の再現を確認するのに適切な動物モデルは存在しない。結核治療薬であるpyrazinamideの副作用として、高尿酸血症は以前からよく知られており、その発生機序はURAT1を介した尿酸の再吸収の促進であることが報告されている。

#### 【目 的】

Pyrazinamide投与により尿酸排泄低下型動物モデルを作製し、その動物モデルを用いてジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬がin vivoにおいて尿酸排泄促進作用をもつことの確認を行った。

## 【対象と方法】

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て、指針にしたがって行った。体重40g前後の11週マウスを用い、全ての薬剤はdimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、isoflurane吸入による全身麻酔下に経口投与した。2.5ml/kgの量で水もしくはDMSOのみを投与したマウス群と、pyrazinamideを400mg/kgの量で経口投与したマウス群で投与から6時間半後に下大静脈からの採血ならびに膀胱穿刺による採尿を行い、血中ならびに尿中の尿酸値とクレアチニン値を測定し、計算にて尿酸排泄率、クレアチニクレアランス値を求めた。また尿中N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG)、尿中NAG-クレアチニン値比を求め、pyrazinamideの尿細管への影響を調べた。

次にpyrazinamideを400mg/kgの量で同様にマウスに投与し、30分後にbenzbromarone (3.0mg/kg, 10mg/kg)、losartan (3.2mg/kg)、ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬：nilvadipine (1.0mg/kg, 3.2mg/kg)、nitrendipine (3.2mg/kg)、nifedipine (3.2mg/kg)、azelnidipine (10mg/kg) の投与を行い、同様に採血ならびに採尿を行い尿酸排泄率を求めた。

各薬剤を投与したマウス群間でANOVA解析を行い、ANOVAで有意差を認めた場合にpyrazinamide投与群と各薬剤投与群での2群間比較のStudentの検定を行った。p<0.05の場合を有意とした。

## 【結 果】

Pyrazinamide投与群の平均尿酸排泄率は水投与群もしくはDMSO投与群の平均尿酸排泄率に比較して、有意に低下を認めた。また血中尿酸値、クレアチニクレアランス値、尿中NAGと尿中NAG-クレアチニン値比に有意差は認めなかった。

次にpyrazinamide投与群とbenzbromarone投与群 (3.0mg/kg, 10mg/kg)、losartan投与群の平均尿酸排泄率とクレアチニクレアランス値を比較すると10mg/kg benzbromarone投与群とlosartan群で有意に尿酸排泄率が高くなるものの、クレアチニクレアランス値は有意差を認めなかった。

続いてpyrazinamide投与群とnilvadipine投与群 (1.0mg/kg, 3.2mg/kg) で同様に比較すると、1.0mg/kgと3.2mg/kg両方のnilvadipine群で有意に尿酸排泄率は高くなり、クレアランスクレアランスは有意差を認めなかった。

最後にpyrazinamide投与群とnitrendipine投与群、nifedipine投与群、azelnidipine投与群とで同様の比較を行うと、nitrendipine投与群、nifedipine投与群、azelnidipine投与群で有意に尿酸排泄率は上昇し、クレアチニクレアランス値は有意差を認めなかった。

## 【考 察】

尿酸排泄率は腎機能障害でも低下する。今回pyrazinamideを投与することで、尿酸排泄率は有意に低下を認めたが、その際に腎機能を反映するクレアチニクレアランス値、尿細管障害の度合いを反映する尿中NAG値などは有意に変化を認めなかった。Pyrazinamide投与による尿酸排泄率の低下は腎機能障害や尿細管障害が関与していない可能性が高い。またURAT1に作用し、尿酸排泄を促進させることがよく知られているbenzbromaroneやlosartanがpyrazinamide投与マウスの尿酸排泄率を上昇させることから、pyrazinamide投与マウスは尿酸排泄低下動物モデルとして有用である可能性

が高い。しかしながら本研究では血中尿酸値は有意に変化しなかったものの、pyrazinamideの投与量は400mg/kgのみであり、投与量を増やすことで血中尿酸値に変動を来す可能性は否定できない。

我々は過去の自験例からジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬として、nilvadipine、nitrendipine、nifedipine、azelnidipineの4剤を選択した。Nilvadipineはin vitro実験において最も強くURAT1を抑制していたことから、in vivo実験でも最初に投与し、1.0mg/kgと3.2mg/kgの2つの投与量で実験を行い、より尿酸排泄率の上昇を認めた3.2mg/kgを他のカルシウム拮抗薬の投与量として採用した。我々のin vitro実験ではazelnidipineはURAT1を抑制しない結果であったが、臨床的には尿酸降下作用をもつと報告されていることから、より高濃度（10mg/kg）の投与を行い、尿酸排泄率の有意な上昇を認めた。本研究ではジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬がURAT1に作用して尿酸排泄を促進している可能性が示唆されたが、尿酸排泄には様々な尿酸トランスポーターが関与し、尿酸の排泄と再吸収が行われている。ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬が他の尿酸トランスポーターに作用しているか更なる研究が必要と考えられる。

#### 【結 論】

Pyrazinamide投与によりURAT1を介していると考えられる尿酸排泄低下型動物モデルを作製し、ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬の尿酸排泄促進効果をin vivoにおいて確認できた。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

#### 【論文概要】

降圧薬の一種であるジヒドロピリジン系Calcium Channel Blockers (CCBs) は尿酸低下作用をもつことが臨床的に報告されているが、その作用機序は明らかではない。申請者たちはin vitroにおいてCCBがURAT1に抑制的に作用し、尿酸排泄を促進させている可能性を以前報告しているが、本研究では、その作用をin vivoに置いて確認するために新たに尿酸排泄低下型の動物実験モデルを作成し、ジヒドロピリジン系CCBの尿酸排泄促進作用を確認することを目的としている。結果、1) 生後10週の雄のICRマウスに対して、URAT1に作用して尿酸再吸収を促進させると考えられているピラジナミドを投与することで尿酸排泄低下型の動物実験モデルを作成していた。2) その動物実験モデルに、URAT1に作用して尿酸排泄促進作用をもつベンズブロマロン、ロサルタンを投与し、尿酸排泄が促進されることを確認していた。3) ジヒドロピリジン系CCBであるニルバジピン、ニフェジピン、ニトレンジピン、アゼルニジピンを動物実験モデルに投与し、尿酸排泄促進効果を確認していた。それぞれ腎機能障害による尿酸排泄低下ではないことを確認するためにクレアチニンクリアランスを計算し、比較検討していた。

#### 【研究方法の妥当性】

申請論文では、尿酸排泄低下型動物実験モデルを作成し、尿酸排泄促進効果の有無を確認したい薬物を投与し、採取したサンプルより尿酸排泄率を求め、適切な対象群の設定と客観的な統計解析を行っている。また同時にクレアチニンクリアランスやNAGなどの腎機能や尿管障害の有無などの検討も行っており、本研究は妥当なものである。

### 【研究結果の新奇性・独創性】

既存の尿酸排泄低下型動物実験モデルはなく、薬剤の経口投与で新たな動物実験モデルを作成し、ジヒドロピリジン系CCBが尿酸排泄促進効果作用をもつことを明らかにした。このことより臨床的に報告されていたジヒドロピリジン系CCBの尿酸値低下作用の機序の一つを明らかにしており、この点において本研究は新奇性・独創性に優れていると評価できる。

### 【結論の妥当性】

申請論文では、新たな動物実験モデルを作成し、得られたデータに適切な統計解析を行い、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、薬理学や循環器学、腎臓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、新たな尿酸排泄低下型動物実験モデルを作成し、今回尿酸排泄促進作用を明らかにしたジヒドロピリジン系CCB以外の薬剤の尿酸排泄促進効果の有無に関しても簡易に確認することができる実験方法を提案しており、尿酸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、薬理学や循環器学、腎臓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。その研究成果は当該領域の国際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)

Journal of Pharmacological Science

136, 2018