

ヒト尿酸トランスポーター URAT1 による サリチル酸輸送

大津尚子 安西尚彦 福富俊之 木村 徹
櫻井裕之 遠藤 仁

Human renal urate transporter URAT1 mediates the transport of salicylate

Naoko OHTSU, Naohiko ANZAI, Toshiyuki FUKUTOMI, Toru KIMURA, Hiroyuki SAKURAI,
and Hitoshi ENDOU

Department of Pharmacology and Toxicology, Kyorin University School of Medicine, Tokyo, Japan

要 旨

解熱鎮痛薬のサリチル酸は、腎臓の尿酸排泄に対する paradoxical 効果を持つことが知られている。すなわち、低濃度(5~10 mg/dL)において腎臓での尿酸排泄を低下させ、高濃度(15 mg/dL 以上)ではそれを増加させるという特性である。2002 年にわれわれが分子同定を行った腎尿細管管腔側膜の尿酸トランスポーター URAT1 (urate transporter 1) による RI 標識尿酸輸送は、非標識サリチル酸(1 mM)により抑制されることから、本研究では URAT1 とサリチル酸の相互作用を検討することで、サリチル酸の持つ paradoxical 効果の分子機序の解明を目的とした。URAT1 の尿酸およびサリチル酸の輸送活性の測定には、URAT1 安定発現 HEK293 (HEK-URAT1) 細胞、および URAT1 cRNA を微量注入したアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた。非標識サリチル酸は HEK-URAT1 細胞での RI 標識尿酸取り込みを著明に阻害した (IC_{50} : 23.9 μ M)。RI 標識サリチル酸は時間依存性に HEK-URAT1 により取り込まれた。URAT1 による RI 標識サリチル酸輸送は、非標識尿酸、サリチル酸、および尿酸排泄促進薬ベンズブロマロンなどによる抑制を受けた。URAT1 発現卵母細胞における RI 標識サリチル酸は時間および濃度依存性輸送特性を示した (K_m : 25.3 μ M)。また、URAT1 発現卵母細胞では細胞内への非標識サリチル酸導入による有意な RI 標識尿酸取り込みの増加(トランス亢進効果)が認められた。

以上より、サリチル酸は URAT1 の輸送基質となることを初めて確認し、サリチル酸が URAT1 による尿酸取り込みを阻害する可能性と、交換基質として細胞内尿酸取り込みの促進作用を起こす可能性を示した。この URAT1 への作用の二面性より、サリチル酸の尿酸排泄に対する paradoxical 効果を説明できると思われる。

Salicylic acid derivatives are the most prescribed analgesic-antipyretic and anti-inflammatory agents. It is well known that salicylate has a paradoxical effect on renal urate excretion. At low doses (5~10 mg/dL serum), renal urate excretion is decreased, whereas at high doses (>15 mg/dL serum), renal urate excretion is increased. Since the molecular identification of the renal apical urate/anion exchanger URAT1, it has been suggested that this protein is responsible for the paradoxical effect because of *cis*-inhibition of salicylate (1 mM) on urate uptake by URAT1-expressing oocytes. The purpose of this study was to examine whether or not URAT1 is responsible for the paradoxical effect of salicylate. In URAT1-stably expressing HEK293 (HEK293-URAT1) cells, salicylate inhibited [14 C] urate uptake dose-dependently (IC_{50} , 23.9 μ M). URAT1 mediated the time-dependent uptake of [3 H] salicylate in these cells. [3 H] Salicylate uptake via URAT1 was inhibited by non-labelled urate and salicylate, and the uricosuric agent, benzbromarone. In the URAT1-expressing oocytes, we observed the time- and concentration-dependent transport of salicylate (K_m : 25.3 μ M). Moreover, non-labelled

salicylate injected into the URAT1-expressing oocytes stimulated [^{14}C]urate uptake.

These results suggest that the “paradoxical effect” of salicylate can be explained by two modes of salicylate interaction with URAT1: (1) acting as an exchange substrate to facilitate urate reabsorption, and (2) acting as an inhibitor for urate reabsorption.

Jpn J Nephrol 2010; 52: 499-504.

Key words: urate transporter, URAT1, salicylate, paradoxical effect

緒 言

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¹⁾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²⁾。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 μM)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ニカルボン酸(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さまざまな薬物およ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³⁾。上記の URAT1 の基質選択性はヒト腎臓由来の膜小胞を用いた過去の実験結果⁴⁾と一致するだけでなく、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³⁾。

解熱鎮痛薬であるサリチル酸系誘導体の代表であるサリチル酸は、抗結核薬ピラジナミド、尿酸排泄促進薬プロベネシド、そして抗炎症薬フェニルブタゾンなどと同様に、腎臓の尿酸排泄に対する paradoxical 効果を持つことが知られている⁵⁾。すなわち、低濃度(1~2 g/day 投与で 5~10 mg/dL; 約 500 μM)において腎臓での尿酸排泄を低下させ、高濃度(5~6 g/day 投与で 15 mg/dL 以上; 約 1 mM 以上)では腎臓での尿酸排泄を増加させるというものである。従来この効果は、低濃度時には尿細管の尿酸分泌機構を抑制することで再吸収優位に傾くため、また高濃度時には尿細管の尿酸再吸収機構を抑制するため、と考えられてきた⁵⁾。

すでにわれわれは、1 mM のサリチル酸が URAT1 によ

る尿酸輸送をサリチル酸非添加対照群に比し約 22 %抑制することから²⁾、URAT1 が他の尿酸排泄促進薬と同様にサリチル酸の標的となると推測していた。本研究では、URAT1 によるサリチル酸の輸送特性を検討することで、サリチル酸の腎臓尿酸排泄に対する paradoxical 効果の分子機序の解明を目指した。

実験材料と方法

1. 試 薬

[^{14}C]uric acid(1.85~2.22 GBq/mmol), [^{14}C]salicylic acid(1.85~2.22 GBq/mmol) は American Radiolabeled Chemicals Inc.(St. Louis, MO)より購入した。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 HEK293(HEK-URAT1)細胞は、既報の通り樹立されている⁶⁾。細胞は 37°C の 5%CO₂環境下で、10%FBS, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ geneticin を含む DMEM 培地を用いて培養し 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 15~25 代を使用した。

3. HEK-URAT1 細胞を用いた取り込み実験

継代後 2 日目に 37°C の Dulbecco's modified phosphate-buffered saline (DPBS) 溶液(137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM NaH₂PO₄, 1 mM KH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, pH 7.4)に移し、RI 標識尿酸およびサリチル酸の取り込み実験および抑制実験を行った。RI 標識尿酸(10 μM)ないしサリチル酸(5 μM)を含む低 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)を同細胞の培養上清に添加し、時間依存性実験では 60 分間、その他の実験では 2 分間インキュベートし、その細胞内取り込み量をシンチレーション

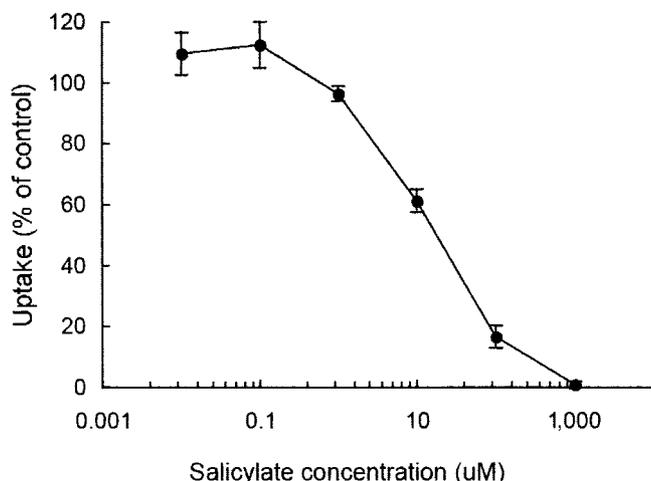


Fig. 1. Inhibitory effects of salicylate on hURAT1-mediated urate uptake

Concentration-dependent inhibition of [¹⁴C]urate uptake by salicylate. The 10 μM [¹⁴C]urate uptake was measured for 2 min in Cl⁻-free HBSS in the presence of various concentrations of salicylate (0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1,000 μM) and expressed as a percentage of control [¹⁴C]urate uptake in the absence of salicylate. (mean ± S. E. M. ; n=4)

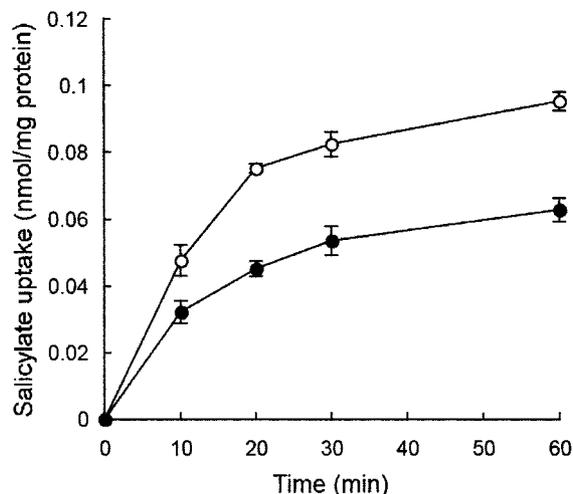


Fig. 2. Time-course of [¹⁴C]salicylate uptake in HEK-hURAT1 cell

hURAT1 and mock cells were incubated in Cl⁻-free HBSS solution containing 5 μM [¹⁴C]salicylate for 2 min at 37°C. Open circles (○) represent the uptake into hURAT1-expressed cells, respectively. Closed circles (●) represent the uptake into the mock cells. (mean ± S. E. M. ; n=4)

ンカウンターにて測定した。

4. アフリカツメガエル卵母細胞を用いた機能解析

ヒト URAT1 cRNA は常法に従い²⁾, URAT1 cDNA を含むプラスミドを HindIII で linearize した後, 精製したものを鋳型として T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写により得た。URAT1 cRNA (10 ng) をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し, ゲンタマイシン (50 μg/mL) を含む 18°C の Barth 溶液 (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.4 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 2.4 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES) を用いてインキュベートした。2~3 日の培養後, 室温の ND96 溶液 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.4) に移し, RI 標識化合物の取り込み実験⁷⁾ および排出実験⁸⁾ を行った。

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% 以下を有意差ありとした。

結 果

1. URAT1 安定発現細胞にみられる尿酸輸送に対するサリチル酸の抑制効果

はじめにサリチル酸が 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 細胞におけ

る RI 標識尿酸に対するサリチル酸の抑制実験を行った。Fig. 1 に示すように, サリチル酸は濃度依存性に URAT1 による尿酸輸送を抑制し, その IC₅₀ 値は 23.9 μM であった。

2. URAT1 安定発現細胞におけるサリチル酸輸送

続いて, URAT1 がサリチル酸と結合するだけでなく, 実際に輸送を行うかどうかを検討するため, mock 細胞 (コントロール) および HEK-URAT1 細胞による RI 標識サリチル酸取り込みの時間依存性を検討した。Fig. 2 に示すように, mock 細胞への取り込みもみられるものの, HEK-URAT1 細胞によるサリチル酸取り込みは, mock 細胞への取り込みよりも各時点で約 2 倍の時間依存性の増加を示した。

3. URAT1 安定発現細胞にみられるサリチル酸輸送に対する各種化合物の抑制実験

URAT1 によるサリチル酸輸送は, 他の URAT1 と相互作用する物質と同様に実際に相互作用するかどうかを明らかにするため, 各種非標識有機酸化合物を輸送阻害物質 (500 μM) として HEK-URAT1 細胞に投与した際に, RI 標識サリチル酸 (5 μM) が取り込まれる量を測定し, 阻害物質非添加時 (コントロール) との間で比較を行った。

Fig. 3 に示すように, URAT1 による RI 標識サリチル酸の取り込みは, 非標識尿酸と尿酸排泄促進薬ベンズブロマロンにより高度に, また, 非標識サリチル酸により中等度

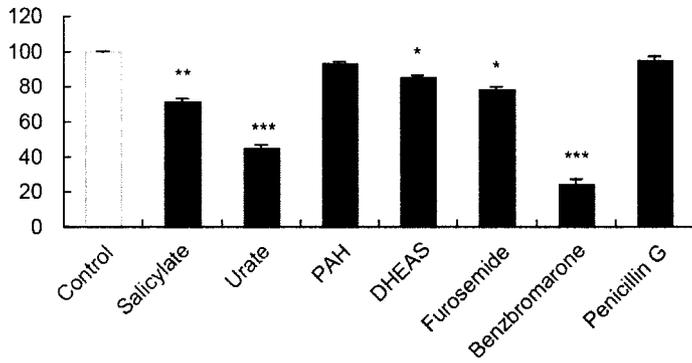


Fig. 3. Effects of various urate-related compounds on salicylate uptake by hURAT1

HEK-hURAT1 cells were incubated in a medium containing $5 \mu\text{M}$ [^{14}C] salicylate at 37°C for 2 min in the absence (open column) or presence (closed column) of several urate-related compounds ($500 \mu\text{M}$). Each value represents the mean \pm S. E. M. of four determinations.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus Control

に阻害を受けた。この結果から、HEK-URAT1 細胞におけるサリチル酸輸送は、尿酸輸送のときと同じ基質結合部位により行われることが示唆された。

4. URAT1 発現卵母細胞でのサリチル酸の取り込み輸送特性

さらに URAT1 が尿酸とサリチル酸との交換輸送を行うトランスポーターであるかどうかについて検討するため、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて検討した。URAT1 cRNA を注入した卵母細胞に非標識尿酸 (50 nL) を注入し、はじめに注入後 1 時間における RI 標識サリチル酸の取り込みを検討した。その結果、Fig. 4 に示す通り、アフリカツメガエル卵母細胞発現系においても HEK-URAT1 細胞にてみられたのと同様に、コントロールに比べて著明なサリチル酸の時間依存性の取り込みを観察できた。さらに Fig. 5 に示すように、濃度依存性の取り込みも観察され、その K_m 値は $25.3 \mu\text{M}$ であった。

5. URAT1 発現卵母細胞における尿酸取り込みへの細胞内サリチル酸のトランス亢進効果

続いて URAT1 cRNA 発現卵母細胞に、水(コントロール群)、非標識尿酸および非標識サリチル酸を直接 microinjection 法により卵母細胞中に注入後、それらの卵母細胞への RI 標識尿酸 ($20 \mu\text{M}$, pH 7.4) の取り込み量を測定、比較した。

Fig. 6 に示すように、RI 標識尿酸の取り込みは既報の通り乳酸注入群でコントロール群に比べて有意に増加するだけでなく、サリチル酸注入群において、さらに著明な増加を示すことが明らかになった。

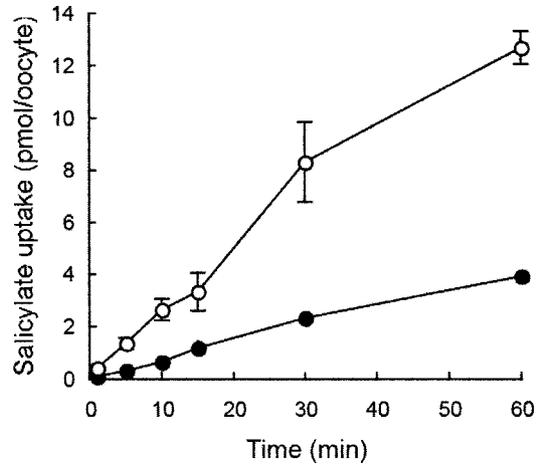


Fig. 4. Time-dependent uptake of [^{14}C] salicylate via hURAT1 in *Xenopus* oocytes

The uptake of $5 \mu\text{M}$ [^{14}C] salicylate was measured for 1 h in control oocytes (closed circles) and oocytes expressing hURAT1 (open circles). (mean \pm S. E. M.; $n = 8 \sim 10$)

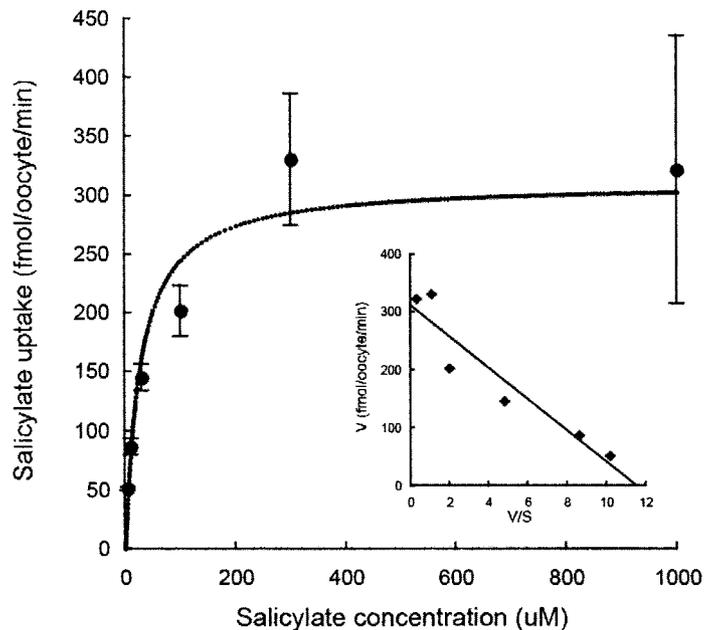


Fig. 5. Concentration-dependent uptake of [^{14}C] salicylate via hURAT1 in *Xenopus* oocytes

The uptake of $5 \mu\text{M}$ [^{14}C] salicylate by control or hURAT1-expressing oocytes was measured for 1 h at variable concentrations ($5, 10, 30, 100, 300, 1,000 \mu\text{M}$) (mean \pm S. E. M.; $n = 8 \sim 10$).

Inset, Eadie-Hofstee plot. V, velocity; V/S, velocity per concentration of salicylate

以上のことから、サリチル酸は URAT1 の輸送基質であり、さらには交換基質として尿酸取り込みを促進することを示唆した。

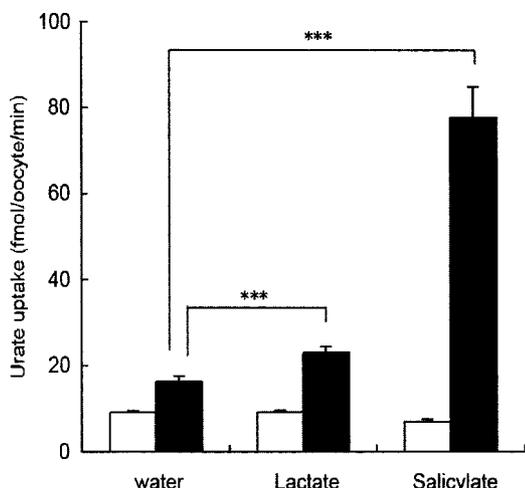


Fig. 6. hURAT1-mediated urate uptake in *Xenopus* oocytes

Trans-stimulatory effects of lactate and salicylate on urate uptake via hURAT1 were examined. Control (open columns) and hURAT1-expressing (closed columns) oocytes were injected with water, cold lactate (10 mM), or salicylate (10 mM). After washing, oocytes were incubated with 20 μM [¹⁴C] urate. The amount of [¹⁴C] urate accumulated for 1 h was determined. (mean ± S. E. M; n = 8~10)

***: p < 0.001

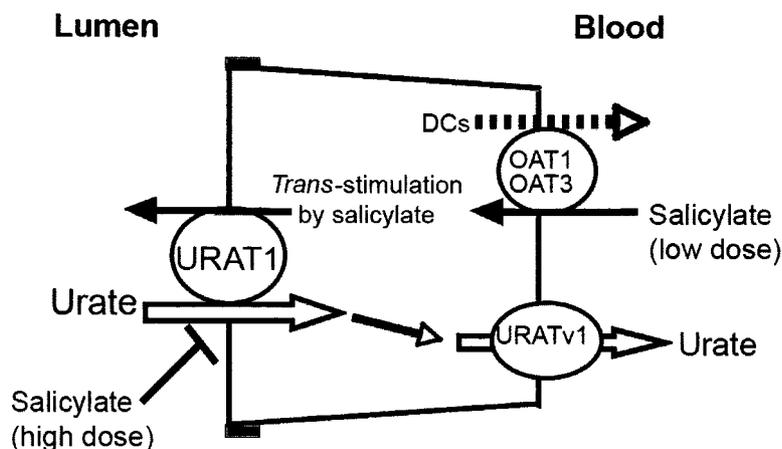


Fig. 7. Proposed model of paradoxical effects of salicylate via hURAT1
OAT : organic anion transporter, URATv1 : voltage-driven urate transporter 1, DCs : dicarboxylates

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⁾。このため少なくとも、ピラジナミド(およびその代謝物である PZA)による paradoxical 効果は、腎臓の尿酸分泌経路に対する抑制効果ではなく、URAT1 による尿酸再吸収経路への影響であると考えられるに至った。

そこでわれわれは、残るプロベネシド、フェニルブタゾン、サリチル酸のなかで RI 標識化合物が入手可能なサリチル酸に絞り、その腎臓の尿酸排泄に対する paradoxical 効果がピラジナミド同様に、URAT1 が作用標的となるかどうかについて解明を目指した。

URAT1 に対するサリチル酸の尿酸輸送抑制効果は濃度依存性で、IC₅₀値が 23.9 μM であった (Fig. 1)。また、URAT1 のサリチル酸輸送キネティクスから Km 値は 25.3 μM であった (Fig. 5)。サリチル酸 3 g/day 経口投与の際に血中濃度は 2.0 mM を超えるとされ¹¹⁾、サリチル酸の蛋白結合率が約 90 % であること¹²⁾を考慮すると、遊離体濃度が約 200 μM と考えられ、これはサリチル酸の尿酸輸送抑制の IC₅₀値および URAT1 のサリチル酸輸送の Km 値より大きい。したがって、サリチル酸は臨床での常用量で URAT1 への作用により尿酸輸送に影響する可能性が高いと考えられる。

さらに、サリチル酸は URAT1 の輸送基質であることも今回の実験から明らかとなった。HEK-URAT1 細胞における RI 標識サリチル酸の取り込みは時間依存性に増加し、mock 細胞の約 2 倍以上であり (Fig. 2)、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた実験によっても同様の結果が得られた (Fig. 4 および Fig. 5)。また、HEK-URAT1 細胞における

考 察

今回われわれは本研究において、サリチル酸による腎臓尿酸排泄に対する paradoxical 効果の分子機序の解明を目的として、URAT1 によるサリチル酸輸送の特性を検討した。

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⁹⁾。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。そのなかでピラジナミド、プロベネシド、フェニルブタゾン、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⁵⁾。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 年のわれわれの研究グループによる腎近位尿管腔側の尿酸トランスポーター URAT1 の分子同定²⁾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

種々の尿酸関連化合物のサリチル酸輸送抑制実験の結果が、既報の URAT1 の尿酸輸送に対する抑制実験と類似の結果を示したことも、サリチル酸が URAT1 の基質である可能性を支持する (Fig. 3)。したがって、サリチル酸による尿酸再吸収低下はこの URAT1 への尿酸再吸収に対する阻害作用 (排泄促進) というで説明可能となった (Fig. 7)。

一方、サリチル酸が URAT1 を介する尿酸再吸収促進に働くとすれば、サリチル酸が尿酸との交換基質となるというのが最も考えやすい。そこで本研究では、microinjection 法により外部から薬物などの注入を手技的に行いやすい URAT1 卵母細胞発現系で尿酸とサリチル酸の交換輸送の可能性を検討した。細胞内に注入されたサリチル酸は RI 標識尿酸の取り込みを著明に促進した (Fig. 6) ため、URAT1 は直接尿酸とサリチル酸の交換輸送を担い、サリチル酸による尿酸再吸収促進は、血管側の有機酸トランスポーター OAT1 ないし OAT3 で細胞内に取り込まれたサリチル酸¹³⁾の URAT1 へのトランス亢進作用 (排泄低下) というで説明可能となった (Fig. 7)。

結 語

サリチル酸は URAT1 の輸送基質となることが初めて確認され、さらにサリチル酸は URAT1 による尿酸との交換基質となることも示されたことから、サリチル酸の腎尿酸排泄に対する paradoxical 効果の責任分子は URAT1 であることが示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、実験遂行に協力をいただいた杏林大学医学部薬理学教室実験助手小藤理絵氏および土岐昭依氏に深謝致します。

本論文の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金および財団法人痛風研究会研究助成金の補助を受けて行われました。

文 献

1. Anzai N, Kanai Y, Endou H. Organic anion transporter family: current knowledge. *J Pharmacol Sci* 2006; 100: 411-426.
2. Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha SH, Hosoyamada M, Takeda M, Sekine T, Igarashi T, Matsuo H, Kikuchi Y, Oda T, Ichica K, Hosoya T, Shimokata K, Niwa T, Kanai Y, Endou H. Molecular identification of a renal urate-anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 2002; 417: 447-452.
3. Enomoto A, Endou H. Roles of organic anion transporters (OATs) and a urate transporter (URAT1) in the pathophysiology of human disease. *Clin Exp Nephrol* 2005; 9: 195-205.
4. Roch-Ramel F, Guisan B. Renal transport of urate in humans. *News Physiol Sci* 1999; 14: 80-84.
5. Sica DA, Schoolwerth AC. Renal handling of organic anions and cations: Excretion of uric acid. In: Brenner BM (ed) *The Kidney* 6th ed. Philadelphia: Saunders, 2000; 680-700.
6. Anzai N, Miyazaki H, Noshiro R, Khamdang S, Chairoungdua A, Shin HJ, Enomoto A, Sakamoto S, Hirata T, Tomita K, Kanai Y, Endou H. The multivalent PDZ domain-containing protein PDZK1 regulates transport activity of renal urate-anion exchanger URAT1 via its C terminus. *J Biol Chem* 2004; 279: 45942-45950.
7. Islam R, Anzai N, Ahmed N, Ellapan B, Jin CJ, Srivastava S, Miura D, Fukutomi T, Kanai Y, Endou H. Mouse organic anion transporter 2 (mOat2) mediates the transport of short chain fatty acid propionate. *J Pharmacol Sci* 2008; 106: 525-528.
8. Anzai N, Ichida K, Jutabha P, Kimura T, Babu E, Jin CJ, Srivastava S, Kitamura K, Hisatome I, Endou H, Sakurai H. Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter uratel (slc2a9) in humans. *J Biol Chem* 2008; 283: 26834-26838.
9. Anzai N, Endou H. Drug discovery for hyperuricemia. *Expert Opin Drug Discov* 2007; 2: 1251-1261.
10. Ichida K, Hosoyamada M, Hisatome I, Enomoto A, Hikita M, Endou H, Hosoya T. Clinical and molecular analysis of patients with renal hypouricemia in Japan-influence of URAT1 gene on urinary urate excretion. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 164-173.
11. Vietri M, De Santi C, Pietrabissa A, Mosca F, Pacifici GM. Inhibition of human liver phenol sulfotransferase by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Eur J Clin Pharmacol* 2000; 56: 81-87.
12. Benet LZ, Oie S, Schwartz JB. Design an optimization of dosage regimens; pharmacokinetic data. In: Hardman JG, Limbird LE (eds) *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutic*, 9th ed, New York: McGraw-Hill, 1996: 1707-1792.
13. Khamdang S, Takeda M, Noshiro R, Narikawa S, Enomoto A, Anzai N, Piyachaturawat P, Endou H. Interactions of human organic anion transporters and human organic cation transporters with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303: 534-539.