

トの体内における輸送体 ABCG2 の尿酸排泄機能は、両親由来の SNP の影響から「0%」「25%」「50%」「75%」「100%」に分類して推定可能である、と考えられた<sup>9)</sup>。

ABCG2 のヒトの体内における機能を検討するために、739 名の日本人の健康診断受検者のゲノムサンプルを用いて、血清尿酸値と ABCG2 の変異との関係について量的形質座位 (quantitative trait locus: QTL) 解析を実施したところ、機能低下型 SNP である Q141K を有する変異数が多いほど、血清尿酸値が有意に上昇することがわかった (図 7-4)。この QTL 解析の結果と、ABCG2 の局在に関する過去の報告により、図 7-2 で示されるような腎臓や腸管における尿酸排泄が、ABCG2 の生理学的な機能であることが示された。

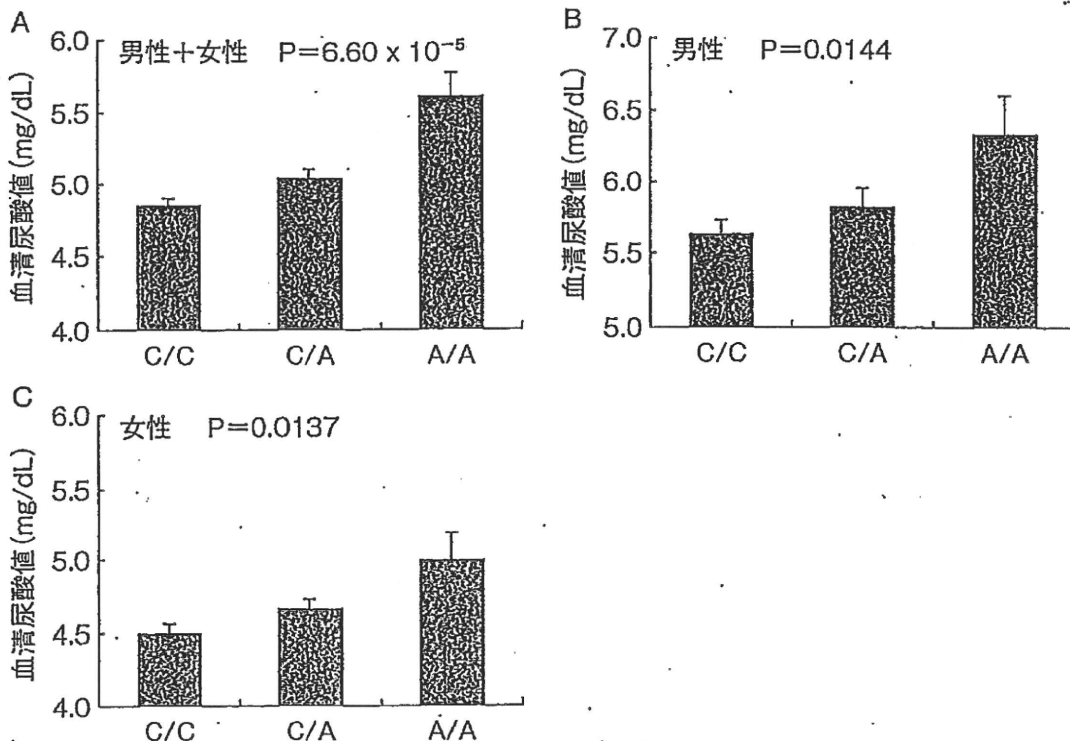


図 7-4 ABCG2 の機能低下型 SNP による血清尿酸値の上昇

日本人 739 名 (うち男性 245 名, 女性 494 名) の血清尿酸値を対象とした QTL 解析の結果, ABCG2 の機能低下型 SNP である Q141K のヘテロ変異およびホモ変異では, ワイルドタイプと比べて, 血清尿酸値が有意に上昇することがわかった ( $P<0.05$ )。C/C は野生型, C/A はヘテロ変異, A/A はホモ変異を示す。ABCG2 の局在に関する過去の報告と QTL 解析の結果により, ABCG2 が前述の図 7-2 で示されるように, 腎臓や腸管における尿酸排泄を司ることが示唆された。(文献 9 より引用, 改変)

ABCG2の尿酸排泄機能についての上記の分類に基づいて、尿酸値正常の対照群男性 865 名と痛風患者群男性 161 症例において、ABCG2の機能低下が及ぼす痛風のリスクについて評価したところ、少しでも ABCG2 に機能低下があるヒトでは約 3 倍以上、25%以下まで機能が低下している場合は約 26 倍の痛風発症リスクを認めることがわかった(図 7-5)<sup>9)</sup>。さらに、少しでも ABCG2 に機能低下があるヒトは痛風患者の 8 割を占め、25%以下まで機能が低下しているヒトの割合は、対照群の 0.9%に比して、患者群では約 10%であったことから、ABCG2 が痛風の主要な病因遺伝子であることがわかった(図 7-5)<sup>9)</sup>。生活習慣病を含む common disease において、リスクを高める遺伝子が同定される場合、現状では 1.5 倍以下のリスクであることが多く、このように 8 割もの症例において 3 倍以上のリスクを認めるような主要病因遺伝子の同定はこれまでにほとんどない研究成果といえる。この研究についての詳細は、別の総説<sup>45)</sup>も参照されたい。

## (2) ABCG2 以外の尿酸排泄トランスポーター

2008 年末に Dehghan らにより報告された GWAS では、GLUT9 以外に、ABCG2, SLC17A3 を含む遺伝子領域が尿酸値の変動にかかわることが報告された(表 7-2)<sup>32)</sup>。しかしながら、SLC17A3 のように、GWAS で同定された領域が、SLC17A3-SLC17A1-SLC17A4 と複数のトランスポーター遺伝子を含む領域にまたがっている場合には、連鎖不平衡という問題がある。すなわち、GWAS などにより同定された SNP が、複数の遺伝子のうち、どの遺伝子の影響を反映しているかという課題については遺伝学的解析のみでは解決が困難である。そのため、それを解決して生理学的な血清尿酸値の調節において真に重要な遺伝子を同定するためには、GWAS 後のさらなる詳細な解析が必要である。SLC17A3-SLC17A1-SLC17A4 のうち、NPT1/SLC17A1 については、その遺伝子の SNP と痛風の発症との関連について Urano ら<sup>46)</sup>が報告している。NPT1/SLC17A1<sup>47)</sup>、NPT4/SLC17A3<sup>48)</sup>ともにそれぞれ尿酸を輸送することが最近報告されており、SLC17A3-SLC17A1-SLC17A4 の遺伝子領

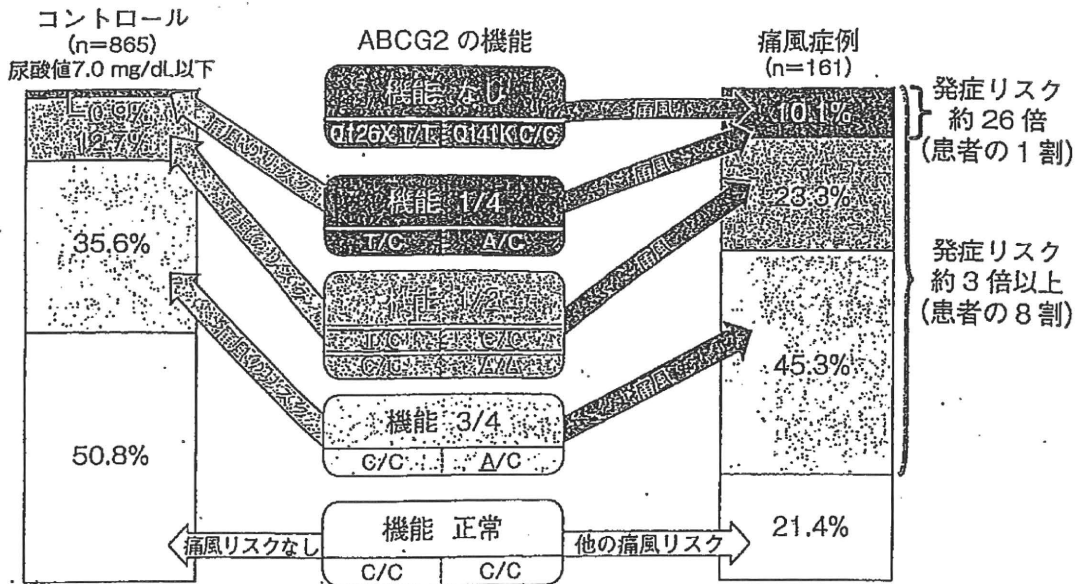


図 7-5 ABCG2 の輸送機能低下と痛風発症リスクの関係

機能消失型変異である Q126X および機能半減型変異である Q141K の組み合わせから輸送体 ABCG2 の機能を 5 段階に分類できる。輸送体 ABCG2 に何らかの機能異常を認めるのは、血清尿酸値 7.0 mg/dL 以下の男性 865 名 (コントロール群) のうち約半数であったのに対し、痛風男性 161 症例 (症例群) では 8 割に上り、3 倍以上の痛風発症リスクを認めた。また、機能低下が著しい (機能 25%以下) 例は、コントロール群では 0.9%であったのに対し、症例群では 10.1%を占め、極めて高い痛風発症リスクを認めた。下線はリスク変異を示す。(文献9より引用, 改変)

域においてどの遺伝子が生理学的な尿酸値の調節において重要であるのか、これらの知見をもとに今後解明されていくものと期待される。ABCG2 以外の尿酸排泄トランスポーター遺伝子は、これらの遺伝子を含む GWAS で見いだされているものの中から、解明されていくと考えられる。

## 5. 尿酸トランスポーター研究の現状

### (1) ゲノムワイド解析と尿酸トランスポーター

ヒトゲノム情報の解読後、GWASにより疾患に関連する遺伝子の探索が盛んに行われるようになった。GWASとは疾患関連遺伝子の同定を可能とする日本で開発された、有用な遺伝子解析法である。GWASはゲノムに多数存在

する遺伝子の個人差である遺伝子多型、特に一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) を50万～100万カ所選んで、注目する疾患の患者群と健常人群の間で比較すると、その出現頻度に違いがあるという原理に基づいている。この解析法が開発されて以来、尿酸値変動をはじめ、数多くの病態と遺伝子の関連が指摘されてきている。血清尿酸値にかかわるGWASについては、2007年以降、複数のグループにより実施され、尿酸値の変動に関与する遺伝子として *GLUT9/SLC2A9* が報告された (表7-2)<sup>28-31)</sup>。また、その後の Dehghan らにより報告されたGWASでは、前述のように *GLUT9* 以外に、*ABCG2*, *SLC17A3* を含む遺伝子領域が尿酸値の変動にかかわることが報告された (表7-2)<sup>32)</sup>。

さらに、これまでのGWASの成果をもとにして、2万8千人以上を対象としたメタ解析が Kolz らにより実施され、尿酸値の変動にかかわるさらに多くの遺伝子群が報告された<sup>33)</sup>。この報告では、これら3つの遺伝子領域のほかに、新たに、6つの遺伝子領域が見いだされた。トランスポーター遺伝子の領域としては、*URAT1/SLC22A12*, *OAT4/SLC22A11*, *MCT9/SLC16A9* が挙げられ、そのほかに、*PDZK1*, *GCKR*, *LRRC16A-SCGN* といった様々な遺伝子領域も報告された (表7-2)。上記のうち、*LRRC16A-SCGN* 以外は、その後の replication study においても血清尿酸値への影響の再現性が認められている<sup>49)</sup>。Kolz らの報告において、*URAT1* の SNP と尿酸値変動とのかわかりが、GWAS においても初めて報告された<sup>33)</sup>。*OAT4* については尿酸輸送活性があることがすでに示されており<sup>50,51)</sup>、高尿酸血症や低尿酸血症などの疾患との関連が解明されていくものと考えられている。*PDZ* ドメインタンパク質 *PDZK1* は、*URAT1* をはじめとするトランスポーターと結合してその機能を高めるため<sup>52)</sup>、尿酸トランスポートソーム (尿酸輸送分子複合体) における尿酸輸送調節機構の解明につながることを期待される。

これまでに述べた遺伝子については、尿酸輸送との関連が示唆されているが、以降に述べる遺伝子については、尿酸動態との関連が現在のところ不明である。*GCKR* (glucokinase regulatory protein) はグルコースセンサーとして

作用する解糖系酵素の調節因子であり、2型糖尿病を対象としたGWASにおいて *GCKR* 遺伝子の同じ SNP が中性脂肪値の変動に関連することが報告された<sup>53)</sup>。これは、中性脂肪を含むメタボリック症候群の指標と血清尿酸値との関連の解明のうえでも、興味深い知見である。その後、Kamataniらにより、日本人におけるGWASの結果も報告されており、血清尿酸値と関連することがこれまでに示されている *GLUT9*, *URAT1*, *ABCG2* のほかに、新たな関連遺伝子として low density lipoprotein receptor-related protein 2 (*LRP2*) が見いだされた (表7-2)<sup>34)</sup>。これらの遺伝子と尿酸関連疾患との関係についても、今後の研究の進歩が期待される。

## (2) トランスポーター機能を指標とした臨床遺伝学的解析

尿酸トランスポーター分子の同定に関する歴史は浅く、ヒトゲノム解読後のポストゲノムシーケンス研究を駆使することで、現在においても新たなトランスポーターが同定されてきている。尿酸以外の重要な基質を輸送する未知のトランスポーターへのアプローチとしても、今回紹介した尿酸トランスポーター研究で採用されたような分子機能を指標とした臨床遺伝学的解析の手法は参考になると考えられる。

ポストゲノムシーケンス研究の1つとして重要な位置を占めるGWASにより、極めて多くの疾患関連遺伝子やその候補遺伝子が同定されている。しかしながら、疾患に関連する遺伝子のめどがついても、分子機能が不明であったり、あるいは、真に病因となる変異の同定や評価が困難であることから、現状では、疾患の病態の解明にまで至っていない例が多い。そのため、GWASのさらに後の研究 (次世代のポストゲノムシーケンス研究) においては、上記のようなトランスポーター等の「分子機能を指標とした遺伝学的解析」の活用が、「残された重要な分子」の生理学的機能の同定や、生活習慣病を含む重要な疾患の病態解明に役立つと考えられる。

## 6. おわりに

尿酸トランスポーター研究の最近の進展によって、生理学的な尿酸の輸送機構について多くが明らかとなり、尿酸の再吸収や排泄の分子機構や、その機能不全による病態が明らかとなってきた。特に、尿酸排泄にかかわるトランスポーター ABCG2 には、機能低下を伴う個人差が高頻度で認められ、8割の症例において、痛風という生活習慣病のリスクを3倍以上に高めることが明らかとなった。

一般に、高尿酸血症は血清尿酸値 7.0 mg/dL を超えた場合と定義されている。高尿酸血症の治療ガイドラインによると、痛風のない無症候性高尿酸血症において、合併症（腎障害、尿路結石、高血圧、高脂血症、虚血性心疾患、耐糖能異常など）を認める場合には、血清尿酸値 8.0 mg/dL 以上になって初めて薬物治療を始めることになっており、それまでは食事療法を含む生活指導のみとなっている。上記の合併症を認めない場合には、血清尿酸値 9.0 mg/dL 以上になって初めて薬物治療を始めることとなる。これまでは一律に上記の基準による治療が実施されており、一部の症例については、薬物治療の開始前に痛風発作を生じることが認められていた。前述のように、尿酸トランスポーター ABCG2 の遺伝子型のタイピングにより、ハイリスクグループが簡易的に抽出できることから、リスクに応じた適切な早期予防、早期治療が可能となり、ハイリスクグループに対するテーラーメイド栄養指導を含む個人差医療にもつながることが期待できる。

日本においては、トランスポーター研究が非常に盛んであり、これらの分子の機能解析の技術が確立している。そのため、分子機能解析と臨床遺伝学的解析を効果的に組み合わせたトランスレーショナルリサーチを、トランスポーターの基礎研究者と、遺伝学、遺伝統計学、臨床医学の研究者らが効率的に共同して実施することにより、様々な疾患における病態の解明や未知の生理学的機能の解明が日本発で実現できる状況にあると考えられる。このような解析法

を1つの手段として、未知の尿酸トランスポーターを含めた残された重要な分子の生理学および病態生理学的役割が明らかになり、生活習慣病を含む種々の疾患の克服が実現されていくことが期待できる。

## 文 献

- 1) Cannon P. J., Stason W. B., Demartini F. E. et al : Hyperuricemia in primary and renal hypertension. *N Engl J Med* 1966 ; 275 ; 457 - 464.
- 2) Forman J. P., Choi H., Curhan G. C. : Uric acid and insulin sensitivity and risk of incident hypertension. *Arch Intern Med* 2009 ; 169 ; 155 - 162.
- 3) Siu Y. P., Leung K. T., Tong M. K. et al : Use of allopurinol in slowing the progression of renal disease through its ability to lower serum uric acid level. *Am J Kidney Dis* 2006 ; 47 ; 51 - 59.
- 4) Talaat K. M., el-Sheikh A. R. : The effect of mild hyperuricemia on urinary transforming growth factor beta and the progression of chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 2007 ; 27 ; 435 - 440.
- 5) Tuttle K. R., Short R. A., Johnson R. J. : Sex differences in uric acid and risk factors for coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2001 ; 87 ; 1411 - 1414.
- 6) Lin Y. H., Hsu H. L., Huang Y. C. et al : Gouty arthritis in acute cerebrovascular disease. *Cerebrovasc Dis* 2009 ; 28 ; 391 - 396.
- 7) Chen J. H., Chuang S. Y., Chen H. J. et al : Serum uric acid level as an independent risk factor for all-cause, cardiovascular, and ischemic stroke mortality: a Chinese cohort study. *Arthritis Rheum* 2009 ; 61 ; 225 - 232.
- 8) Feig D. I., Kang D. H., Johnson R. J. : Uric acid and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2008 ; 359 ; 1811 - 1821.
- 9) Matsuo H., Takada T., Ichida K. et al : Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout : a function-based genetic analysis in a Japanese population. *Sci Transl Med* 2009 ; 1 ; 5ra11.
- 10) Wu X. W., Lee C. C., Muzny D. M. et al : Urate oxidase : primary structure and evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 ; 9412 - 9416.
- 11) Lee C. C., Wu X. W., Gibbs R. A. et al : Generation of cDNA probes directed by amino acid sequence: cloning of urate oxidase. *Science* 1988 ; 239 ; 1288 - 1291.
- 12) Sorensen L. B. : Role of the intestinal tract in the elimination of uric acid.

- Arthritis Rheum.1965 ; 8 ; 694-706.
- 13) 松尾洋孝：尿酸の再吸収機構と輸送体病—ゲノムワイド関連解析後の新展開, Annual Review 腎臓 2010 (御手洗哲也, 東原英二, 秋澤忠男, 五十嵐隆, 金井好克編), 中外医学社, 2010, p9-20.
  - 14) Hediger M. A. : Kidney function : gateway to a long life? Nature 2002 ; 417 ; 393-395.
  - 15) Cutler R. G. : Urate and ascorbate : their possible roles as antioxidants in determining longevity of mammalian species. Arch Gerontol Geriatr 1984 ; 3 ; 321-348.
  - 16) Enomoto A., Kimura H., Chairoungdua A. et al : Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. Nature 2002 ; 417 ; 447-452.
  - 17) Matsuo H., Chiba T., Nagamori S. et al : Mutations in glucose transporter 9 gene SLC2A9 cause renal hypouricemia. Am J Hum Genet 2008 ; 83 ; 744-751.
  - 18) Ishikawa I. : Acute renal failure with severe loin pain and patchy renal ischemia after anaerobic exercise in patients with or without renal hypouricemia. Nephron 2002 ; 91 ; 559-570.
  - 19) Ishikawa I., Nakagawa M., Hayama S. et al : Acute renal failure with severe loin pain and patchy renal ischaemia after anaerobic exercise (ALPE) (exercise-induced acute renal failure) in a father and child with URAT1 mutations beyond the W258X mutation. Nephrol Dial Transplant 2005 ; 20 ; 1015.
  - 20) Cusatis G., Gregorc V., Li J. et al : Pharmacogenetics of ABCG2 and adverse reactions to gefitinib. J Natl Cancer Inst 2006 ; 98 ; 1739-1742.
  - 21) Zhang W., Yu B. N., He Y. J. et al : Role of BCRP 421C>A polymorphism on rosuvastatin pharmacokinetics in healthy Chinese males. Clin Chim Acta 2006 ; 373 ; 99-103.
  - 22) Jonker J. W., Buitelaar M., Wagenaar E. et al : The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. Proc Natl Acad Sci USA 2002 ; 99 ; 15649-15654.
  - 23) Kikuchi Y., Koga H., Yasutomo Y. et al : Patients with renal hypouricemia with exercise-induced acute renal failure and chronic renal dysfunction. Clin Nephrol 2000 ; 53 ; 467-472.
  - 24) 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* 2004 ; 15 ; 164–173.
- 25) Iwai N., Mino Y., Hosoyamada M. et al : A high prevalence of renal hypouricemia caused by inactive SLC22A12 in Japanese. *Kidney Int* 2004 ; 66 ; 935–944.
- 26) Taniguchi A., Urano W., Yamanaka M. et al : A common mutation in an organic anion transporter gene, SLC22A12, is a suppressing factor for the development of gout. *Arthritis Rheum* 2005 ; 52 ; 2576–2577.
- 27) Wakida N., Tuyen D. G., Adachi M. et al : Mutations in human urate transporter 1 gene in prescretory reabsorption defect type of familial renal hypouricemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 ; 90 ; 2169–2174.
- 28) Li S., Sanna S., Maschio A. et al : The GLUT9 gene is associated with serum uric acid levels in Sardinia and Chianti cohorts. *PLoS Genet* 2007 ; 3 ; e194.
- 29) Döring A., Gieger C., Mehta D. et al : SLC2A9 influences uric acid concentrations with pronounced sex-specific effects. *Nat Genet* 2008 ; 40 ; 430–436.
- 30) Vitart V., Rudan I., Hayward C. et al : SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nat Genet* 2008 ; 40 ; 437–442.
- 31) McArdle P. F., Parsa A., Chang Y. P. et al : Association of a common nonsynonymous variant in GLUT9 with serum uric acid levels in old order amish. *Arthritis Rheum* 2008 ; 58 ; 2874–2881.
- 32) Dehghan A., Köttgen A., Yang Q. et al : Association of three genetic loci with uric acid concentration and risk of gout : a genome-wide association study. *Lancet* 2008 ; 372 ; 1953–1961.
- 33) Kolz M., Johnson T., Sanna S. et al : Meta-analysis of 28,141 individuals identifies common variants within five new loci that influence uric acid concentrations. *PLoS Genet* 2009 ; 5 ; e1000504.
- 34) Kamatani Y., Matsuda K., Okada Y. et al : Genome-wide association study of hematological and biochemical traits in a Japanese population. *Nat Genet* 2010 ; 42 ; 210–215.
- 35) Caulfield M. J., Munroe P. B., O'Neill D. et al : SLC2A9 is a high-capacity urate transporter in humans. *PLoS Med* 2008 ; 5 ; e197.
- 36) Anzai N., Ichida K., Jutabha P. et al : Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter URATv1 (SLC2A9) in humans. *J Biol Chem* 2008 ; 283 ; 26834–26838.
- 37) 金井好克 : 尿酸排泄異常の成因 尿酸トランスポーター. 高尿酸血症と痛風

- 2009 ; 17 ; 21 - 27.
- 38) Pascual J. M., Wang D., Lecumberri B. et al : GLUT1 deficiency and other glucose transporter diseases. *Eur J Endocrinol* 2004 ; 150 ; 627 - 633.
  - 39) Pascual J. M., Wang D., Yang R. et al : Structural signatures and membrane helix 4 in GLUT1 : inferences from human blood-brain glucose transport mutants. *J Biol Chem* 2008 ; 283 ; 16732 - 16742.
  - 40) Sato M., Mueckler M. : A conserved amino acid motif (R-X-G-R-R) in the Glut1 glucose transporter is an important determinant of membrane topology. *J Biol Chem* 1999 ; 274 ; 24721 - 24725.
  - 41) 松尾洋孝, 市田公美 : GLUT9 の異常症. *高尿酸血症と痛風* 2010 ; 18 ; 84 - 89.
  - 42) Dinour D., Gray N. K., Campbell S. et al : Homozygous SLC2A9 mutations cause severe renal hypouricemia. *J Am Soc Nephrol* 2010 ; 21 ; 64 - 72.
  - 43) Cheng L. S., Chiang S. L., Tu H. P. et al : Genomewide scan for gout in Taiwanese aborigines reveals linkage to chromosome 4q25. *Am J Hum Genet* 2004 ; 75 ; 498 - 503.
  - 44) Woodward O. M., Köttgen A., Coresh J. et al : Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 ; 10338 - 10342.
  - 45) 松尾洋孝, 高田龍平, 市田公美ほか : 痛風の主要な病因遺伝子 ABCG2 の同定. *実験医学* 2010 ; 28 ; 1285 - 1289.
  - 46) Urano W., Taniguchi A., Anzai N. et al : Sodium-dependent phosphate cotransporter type 1 sequence polymorphisms in male patients with gout. *Ann Rheum Dis* 2010 ; 69 ; 1232 - 1234.
  - 47) Iharada M., Miyaji T., Fujimoto T. et al : Type 1 sodium-dependent phosphate transporter (SLC17A1 Protein) is a Cl<sup>-</sup>-dependent urate exporter. *J Biol Chem* 2010 ; 285 ; 26107 - 26113.
  - 48) Jutabha P., Anzai N., Kitamura K. et al : Human sodium phosphate transporter 4 (hNPT4/SLC17A3) as a common renal secretory pathway for drugs and urate. *J Biol Chem* 2010 ; 285 ; 35123 - 35132.
  - 49) van der Harst P., Bakker S. J., de Boer R. A. et al : Replication of the five novel loci for uric acid concentrations and potential mediating mechanisms. *Hum Mol Genet* 2010 ; 19 ; 387 - 395.
  - 50) 木村弘章, 市田公美, 細山田真ほか : 近位尿細管管腔膜側に存在するヒト有機陰イオントランスポーター hOAT4 (human Organic Anion Transporter 4) における尿酸輸送の解析. *痛風と核酸代謝* 2001 ; 25 ; 113 - 120.

- 51) Hagos Y., Stein D., Ugele B. et al : Human renal organic anion transporter 4 operates as an asymmetric urate transporter. *J Am Soc Nephrol* 2007 ; 18 ; 430-439.
- 52) 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* 2004 ; 279 ; 45942-45950.
- 53) Saxena R., Voight B. F., Lyssenko V. et al : Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 2007 ; 316 ; 1331-1336.

## 2. トランスポーターの分子機能を指標とした臨床遺伝学的解析による痛風の主要病因遺伝子 *ABCG2* の同定

松尾 洋孝

ヒトゲノム情報解読後のゲノムワイド関連解析などにより、多くの疾患関連遺伝子が同定されている。しかし、それらの分子機能評価が困難であることなどから、病態の解明にまで至っていない例も多い。トランスポーター分子は *in vitro* での分子機能評価が可能なため、遺伝学的解析との併用により病態の解明のみならず未知の分子機能の同定にもつながる可能性が高い。痛風の主要病因遺伝子の同定などで採用された「分子機能を指標とした臨床遺伝学的解析」は、「残されたトランスポーターへのアプローチ」の1つとして極めて有用である。

### はじめに

ヒトゲノム情報が解読されて以降、最近ではゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study: GWAS) をはじめとしたゲノムワイド解析により、極めて多くの疾患関連遺伝子やその候補遺伝子が同定されている。しかしながら、疾患に関連する遺伝子の目処があっても、分子機能が不明であったり、あるいは真に病因となる変異の同定や評価が困難であることから、疾患の病態の解明にまで至っていない例が多いのが現状である。一方でトランスポーター分子は、分子機能や変異体の評価が *in vitro* で実施可能であるのみならず、疾患の約2割において創薬のターゲットとなると考えられており、多くの疾患の病態に関与している。そのため、GWAS後の成果をもとにした疾患の病態解明をめざすうえで、「分子機能を指標とした臨床

遺伝学的解析」の実施においてトランスポーターは極めて有望なターゲットであり、ゲノムワイド解析後の病態解明のための解析対象として優先的に取り組む価値の高いモデル分子となりうる。また、このような解析から、逆にトランスポーターなどの分子の未知の機能同定につながり、これまでわかっていなかった生理学的機能の解明に至る可能性も高く、実際にそのような報告例も多くなっている。日本においては、トランスポーター研究が非常に盛んであり、様々なトランスポーター分子の機能解析の技術が確立している。そのため、トランスポーターの機能解析と臨床遺伝学的解析を効果的に組み合わせたトランスレーショナルリサーチを、トランスポーターの基礎研究者と遺伝学・遺伝統計学・臨床医学の研究者らが効率的に共同して実施することにより、様々な疾患における病態の解明や未知の生理学的機能の解明が日本

### key words

ゲノムワイド関連解析 (GWAS), リシークエンス, 臨床遺伝学的解析, function-based genetic analysis, 生活習慣病, ありふれた疾患 (common disease), 痛風, 高尿酸血症, 腎性低尿酸血症, 尿酸トランスポーター (尿酸輸送体), *ABCG2/BCRP*, *GLUT9/SLC2A9*, トランスレーショナルリサーチ

発で実現できる状況にあると考えられる。本稿では、ゲノムワイド解析後に実施された「トランスポーター分子機能を指標とした臨床遺伝学的解析 (function-based genetic analysis)」の例として、尿酸再吸収トランスポーターの同定や痛風の主要病因遺伝子の同定などの例を挙げて解説し、このような手法が「残されたトランスポーターへのアプローチ」としても極めて重要であることを紹介したい。

## I. 臨床遺伝学的解析

### 1. ゲノムワイド関連解析 (GWAS)

GWASとは、ゲノムに多数存在する遺伝子の個人差である遺伝子多型、特に一塩基多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) を 50万~100万カ所選び、その出現頻度の違いを患者群と健常人群で比較して、差のある SNP は疾患関連遺伝子の近傍にあるという原理に基づくものであり、日本で開発された有用な遺伝子解析法である。この解析法が開発されて以来、尿酸値変動をはじめ数多くの病態と遺伝子の関連が指摘されてきている。しかしながら前述のように、疾患の病態の解明のためには、さらに分子機能の解明と、病因となる変異の同定や評価が必要である。GWASを含むゲノムワイド解析の成果を発展させるべき解析手段として、分子機能解析とさらに詳細な遺伝子解析 (リシーケンスなど) が必要とされているため、function-based genetic analysis の実施により、これまでの解析で得られなかった研究の進展が期待できる。

### 2. Function-based genetic analysis の対象としての尿酸トランスポーター

トランスポーターを含めて *in vitro* で機能が評価可能な分子はすべて function-based genetic analysis の対象となりうる。その中で、尿酸トランスポーターは血清尿酸値を対象とする GWAS においてトランスポーター遺伝子が同定される頻度が高いことや、また以下に述べるように尿酸代謝がマウスなどの齧歯類とヒトで大きく異なっていることから、その生理学的機能の同定や病態への関与の解明においては、ヒトを対象とした遺伝学 (human genetics) 的アプローチの併用が特に不可欠である。

ヒトを含む霊長類の一部では尿酸分解酵素である Urikase が欠損しているため<sup>2)</sup>、ヒトの血清尿酸値はマウスなどの他の哺乳類と比較しても高値を示すことが知られている。また、その欠損のためヒトにおいて尿酸はプリン代謝の最終代謝産物となり、主に腎臓から尿中に排泄され、一部は腸管から大便中に排泄される。そのため、GWAS などのゲノムワイド解析により指摘されるような、尿酸を輸送する可能性のあるトランスポーター分子は function-based genetic analysis の格好の解析対象である。これまでに痛風の主要病因遺伝子である ABCG2/BCRP (腎や腸管における高容量性尿酸排泄トランスポーターをコードすることも判明)<sup>3)</sup> のほか、腎性低尿酸血症 2 型の原因遺伝子である GLUT9/SLC2A9 (腎における尿酸再吸収トランスポーターをコードすることも判明) の同定<sup>4)</sup> も成功し報告されている。ヒトの遺伝学的解析においては、遺伝子改変マウスの解析とは異なり個人差が大きいため、それぞれの解析に適切な規模のサンプル集団と数を設定する必要があるが、遺伝統計学的な評価を並行して実施することで解決でき、非常に重要な情報を得ることが期待できる。そのため、function-based genetic analysis の適応は、「残されたトランスポーターへのアプローチ」の 1 つとして極めて重要であり、これまでの既存の解析技術で不明のままであった、真の生理学的機能の同定や疾患の病態解明に資することのできる強力な解析手法であると考えられる。

## II. 尿酸再吸収トランスポーター URAT1 と GLUT9 の同定

### 1. 尿酸再吸収トランスポーター URAT1 の同定から GWAS 以前まで

トランスポーターの分子機能解析と臨床遺伝学的解析の併用により、腎性低尿酸血症の原因遺伝子として urate transporter 1 (URAT1/SLC22A12) が同定され、尿酸の再吸収トランスポーターであることと、高尿酸血症の治療標的分子であることが 2002 年に報告された<sup>5)</sup>。腎性低尿酸血症は日本人に多く、そのほとんどが URAT1 の遺伝子変異、特に W258X 変異に起因することが報告されてい

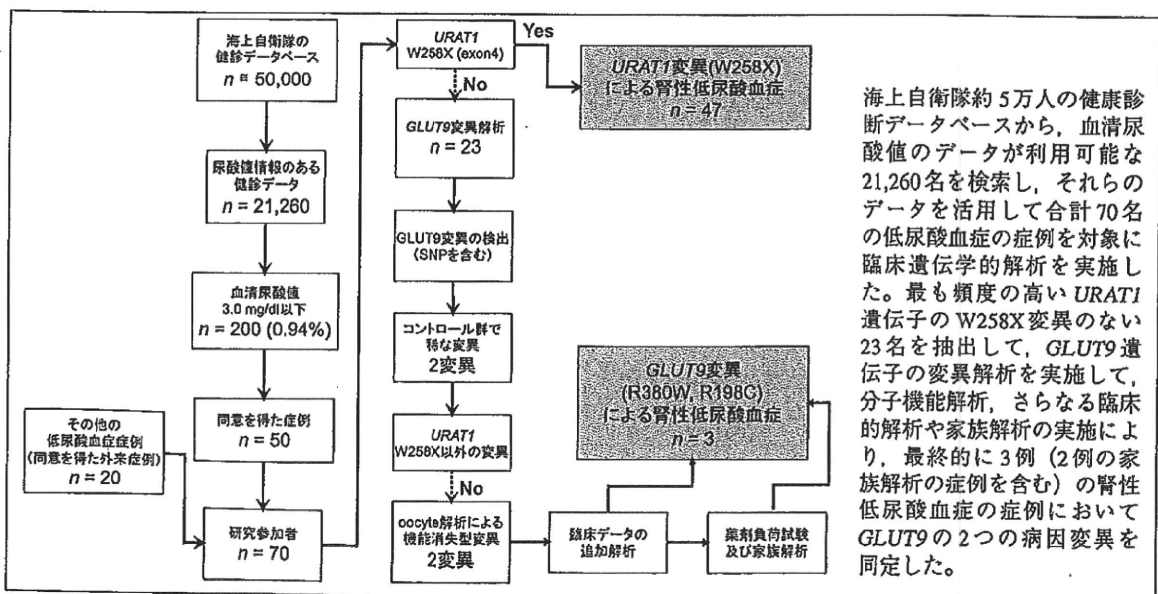
る。この URAT1 の発見以降、分子機能解析と遺伝学的解析とによるヒトの尿酸トランスポーターの同定は長らくなされておらず、URAT1 以外の尿酸トランスポーターは不明のままであった。近年、OAT4, OAT10, MRP4 など尿酸を輸送する分子はいくつか報告されていたが<sup>9)</sup>、ヒトの疾患における意義は明らかにされておらず、人体における尿酸動態への寄与は不明であった。しかも、URAT1 は近位尿細管における管腔側の尿酸トランスポーターであることから、血管側の尿酸再吸収トランスポーターは未同定のままであった。また URAT1 遺伝子に変異を認めない腎性低尿酸血症が存在することから<sup>10)</sup>、URAT1 以外にも重要な尿酸トランスポーターが存在することが確実視されていた。

## 2. 尿酸再吸収トランスポーター GLUT9 の同定

2007年以降には、複数の GWAS<sup>9)・10)</sup>により、血清尿酸値の変動に関わる分子として、glucose transporter 9 (GLUT9/SLC2A9) が同定された。そのため、GLUT9 は腎性低尿酸血症の第2の病因遺伝子の候補である可能性が考えられた。前述のように腎性低尿酸血症は日本人に多く、そのほとんどが URAT1 の遺伝子変異に起因することが報告されている。したがって、GLUT9 遺伝子を対象とした効果的な腎性低尿酸血症の臨床遺伝学的解析

を実施するためには、十分な症例数を確保する必要があった。われわれは過去10年間にわたる85万セットの健康診断データが利用可能である海上自衛隊の健康診断データベースのうち、2006年の健康診断データで血清尿酸値が判別できる21,260名のデータを活用することによりこの問題を解決し、GLUT9 遺伝子を対象とした低尿酸血症の臨床遺伝学的解析を実施した。図①に解析のフローチャートを示し、詳細は別の総説<sup>11)</sup>にも記載したが、トランスポーターの分子機能解析と臨床遺伝学的解析を併用した解析を適応することにより、最終的に腎性低尿酸血症の原因遺伝子として GLUT9 が同定された。また、この解析により、GLUT9 が腎臓の近位尿細管の血管側などに局在する尿酸の再吸収トランスポーター (図②) であることと、高尿酸血症の有望な治療標的分子であることもあわせて報告した<sup>9)</sup>。腎性低尿酸血症の新規病因遺伝子 GLUT9 の同定により、既知病因遺伝子である URAT1 変異によるものが「腎性低尿酸血症1型」(RHUC1, renal hypouricemia type 1, MIM 220150)、GLUT9 変異によるものが「腎性低尿酸血症2型」(RHUC2, renal hypouricemia type 2, MIM 612076) と分類されるようになった<sup>11)</sup>。これまでのわれわれの解析により、URAT1 および GLUT9

図① GLUT9 遺伝子を対象とした function-based genetic analysis のフローチャート (文献4より改変)



海上自衛隊約5万人の健康診断データベースから、血清尿酸値のデータが利用可能な21,260名を検索し、それらのデータを活用して合計70名の低尿酸血症の症例を対象に臨床遺伝学的解析を実施した。最も頻度の高いURAT1遺伝子のW258X変異のない23名を抽出して、GLUT9遺伝子の変異解析を実施して、分子機能解析、さらなる臨床的解析や家族解析の実施により、最終的に3例(2例の家族解析の症例を含む)の腎性低尿酸血症の症例においてGLUT9の2つの病因変異を同定した。

の両遺伝子に変異を認めない腎性低尿酸血症例が存在することも確認されており、今後、未知の病因遺伝子異常による「腎性低尿酸血症3型」(RHUC3, renal hypouricemia type 3)が見出される可能性がある<sup>111)</sup>。

GLUT9の解析の例を総括すると、大規模健康診

断データベースを活用した臨床遺伝学的解析を、GLUT9のトランスポーター機能解析を併用して実施することにより、腎性低尿酸血症という疾患の病因の解明と生理学的機能の同定に至ることが可能となった。以上は、比較的稀な遺伝子変異による単一遺伝子病としての腎性低尿酸血症の病態

解明につながった例であるが、上記の解析手法をさらに発展させることにより、多因子病である「common disease (ありふれた疾患)」の1つである痛風の病態解明につながった解析例を以下に述べる。

### Ⅲ. 痛風の主要病因遺伝子 ABCG2 の同定

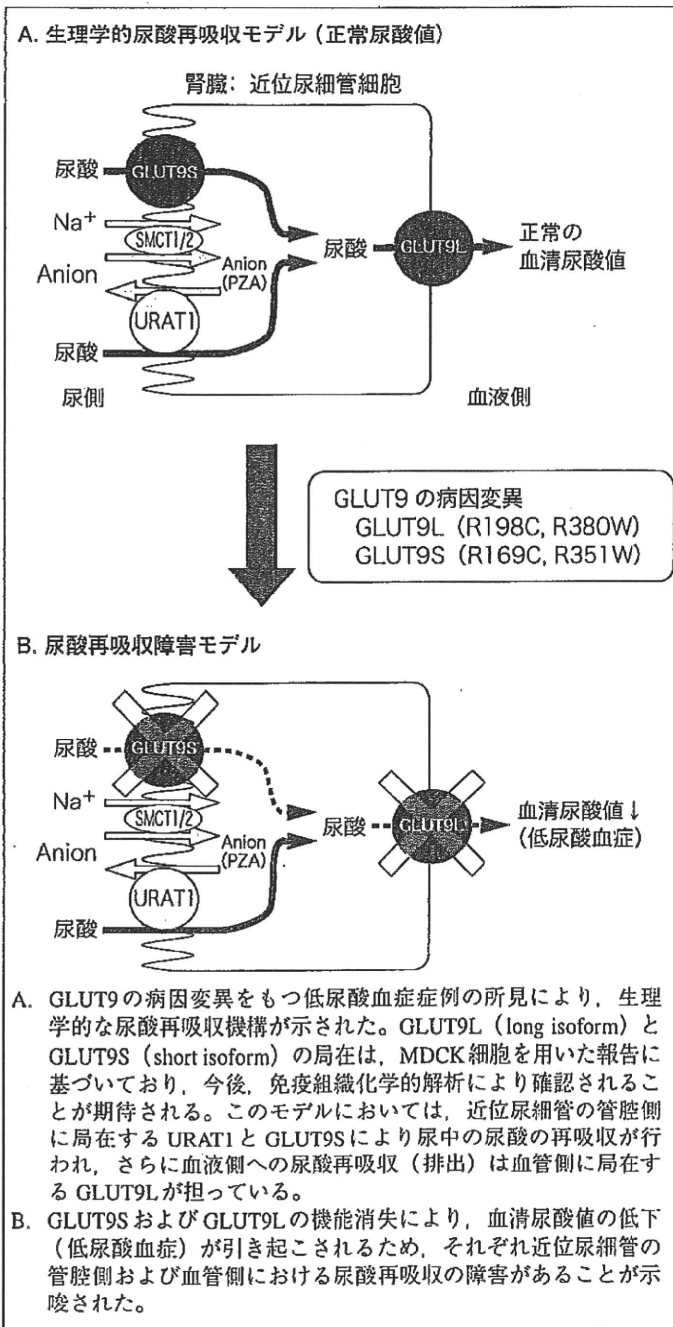
#### 1. なぜ ABCG2 を対象とした function-based genetic analysis を実施したか?

2004年に台湾の研究グループにより報告されたゲノムワイド連鎖解析により、ヒトの4番染色体長腕に未知の痛風遺伝子が存在する候補領域があることが報告されていた<sup>112)</sup>。そのため、われわれはこの領域に存在するトランスポーターに着目し、個人差が大きく、かつAIDS治療薬3'-azido-2'-deoxythymidine (AZT)などの尿酸と構造が類似した物質を輸送するトランスポーター遺伝子である ABCG2 が最も有望な候補であると考えた。最近のゲノムワイド関連解析 (GWAS)<sup>113)</sup>においても、血清尿酸値の変動に関連する遺伝子として ABCG2 が同定されており、尿酸関連疾患の病因遺伝子の候補として極めて重要な遺伝子であることが確認されている。ABCG2の尿酸輸送や痛風の病態への関与を実証するために実施した解析のフローチャートを図②に示す。

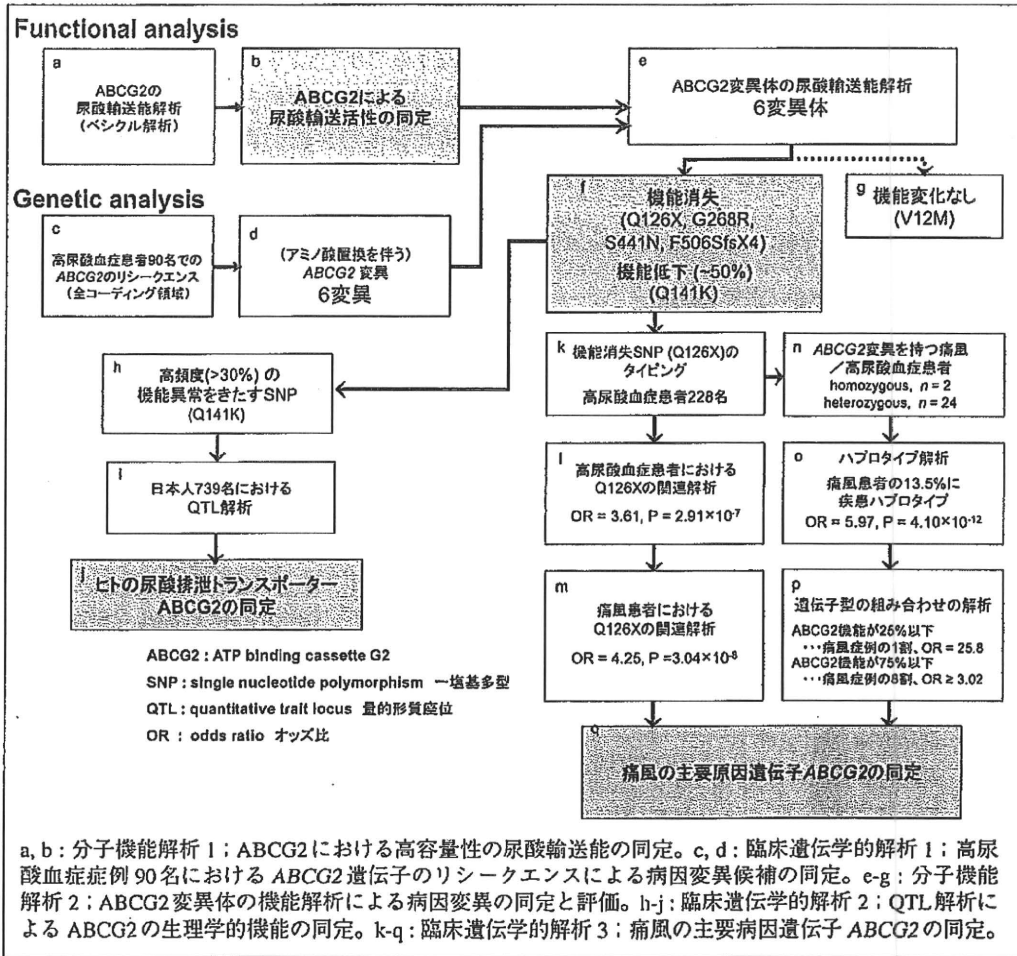
#### 2. 分子機能解析 1: ABCG2 における高容量性の尿酸輸送能

ABCG2の分子機能解析は、ABCG2

図② GLUT9を介したヒト腎臓における尿酸再吸収機構 (文献4より改変)



図④ ABCG2 遺伝子を対象とした function-based genetic analysis のフローチャート (文献3より改変)



を HEK293 細胞に発現させたのち、細胞膜小胞 (ベシクル) を調製して RI で標識した基質の輸送を評価することにより実施した。前述のように、尿酸と構造が類似した物質である AZT を ABCG2 が輸送することがわかっているため、まずは既知の輸送基質である硫酸エストロンの輸送に対する AZT と尿酸の阻害効果を解析した。その結果、ABCG2 による硫酸エストロンの輸送は、AZT より濃度依存性に阻害されるが、尿酸によっても同様な阻害が観察されることがわかった (図④ A)。ABCG2 において尿酸の輸送能を解析すると、生理的に到達しうる尿酸濃度においては輸送飽和の生じない、高容量性の尿酸輸送能が観察され (図④ B)、ABCG2 が高容量性尿酸排泄トランスポーターであることがわかった。

3. 臨床遺伝学的解析 1: 高尿酸血症症例 90 名における ABCG2 遺伝子のリシークエンス

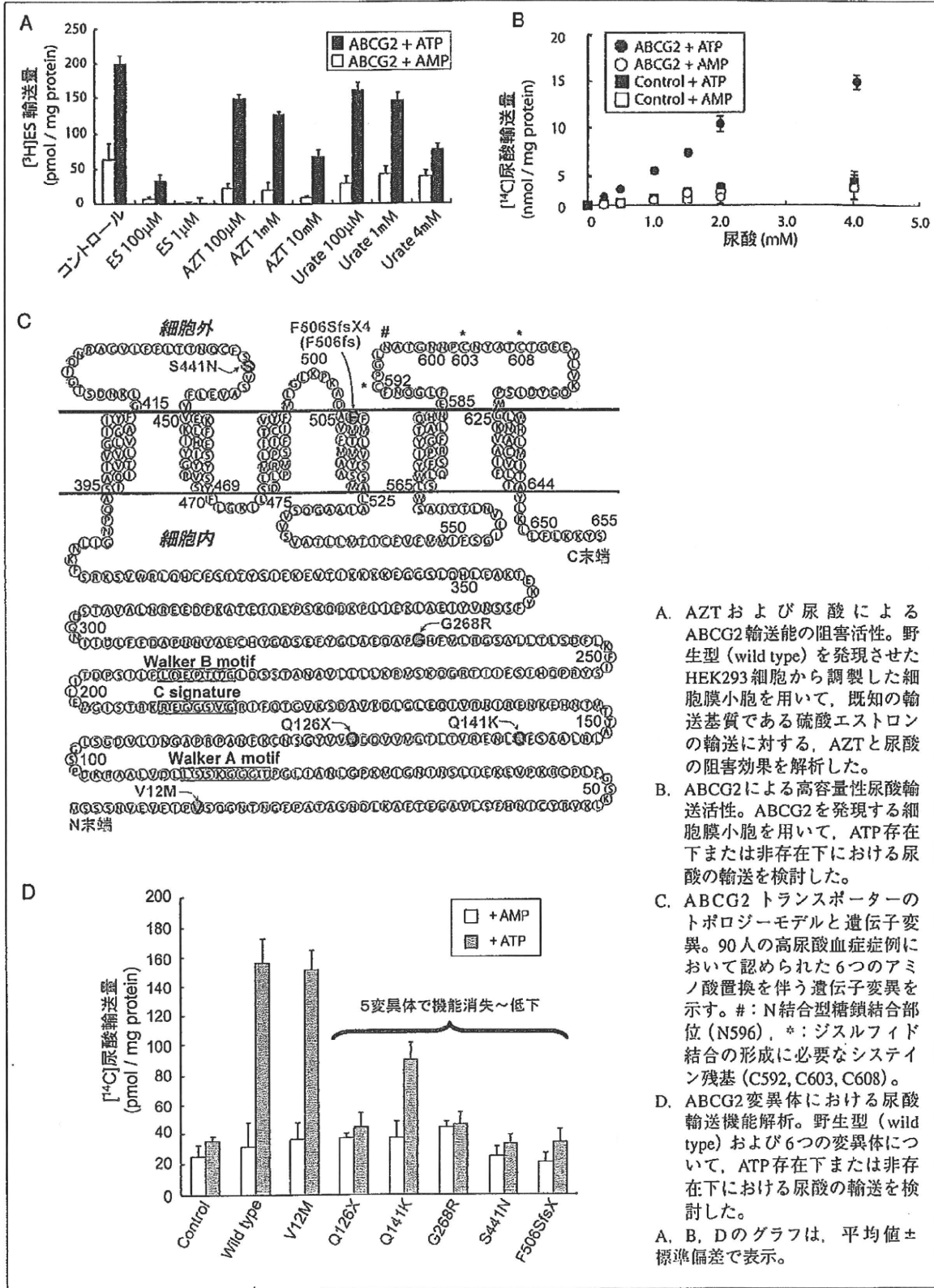
ABCG2 の臨床遺伝学的解析として、まず病態に関わる ABCG2 遺伝子変異を見出すために、高尿酸血症症例 90 名を対象にして ABCG2 遺伝子の全コーディング領域を対象としたリシークエンスにより変異解析を実施した。これにより、ABCG2 遺伝子の病因変異の候補として図④ C に示すようなアミノ酸置換を伴う 6 つの変異 (V12M, Q126X, Q141K, G268R, S441N, F506SfsX4) が見出された。

4. 分子機能解析 2: ABCG2 変異体の機能解析による病因変異の抽出

ABCG2 の分子機能解析として、次にリシークエンスで検出された 6 つの病因変異候補を対象にして、ABCG2 の変異体における尿酸輸送を、前述の



図4 ABCG2 を介した高容量性尿酸輸送と遺伝子変異に基づく尿酸輸送機能不全 (文献3より改変)



第4章 残されたトランスポーターへのアプローチ

- A. AZT および尿酸による ABCG2 輸送能の阻害活性。野生型 (wild type) を発現させた HEK293 細胞から調製した細胞膜小胞を用いて、既知の輸送基質である硫酸エストロンの輸送に対する、AZT と尿酸の阻害効果を解析した。
  - B. ABCG2 による高容量性尿酸輸送活性。ABCG2 を発現する細胞膜小胞を用いて、ATP 存在下または非存在下における尿酸の輸送を検討した。
  - C. ABCG2 トランスポーターのトポロジーモジュールと遺伝子変異。90 人の高尿酸血症症例において認められた 6 つのアミノ酸置換を伴う遺伝子変異を示す。#: N 結合型糖鎖結合部位 (N596), \*: ジスルフィド結合の形成に必要なシステイン残基 (C592, C603, C608)。
  - D. ABCG2 変異体における尿酸輸送機能解析。野生型 (wild type) および 6 つの変異体について、ATP 存在下または非存在下における尿酸の輸送を検討した。
- A, B, D のグラフは、平均値  $\pm$  標準偏差で表示。

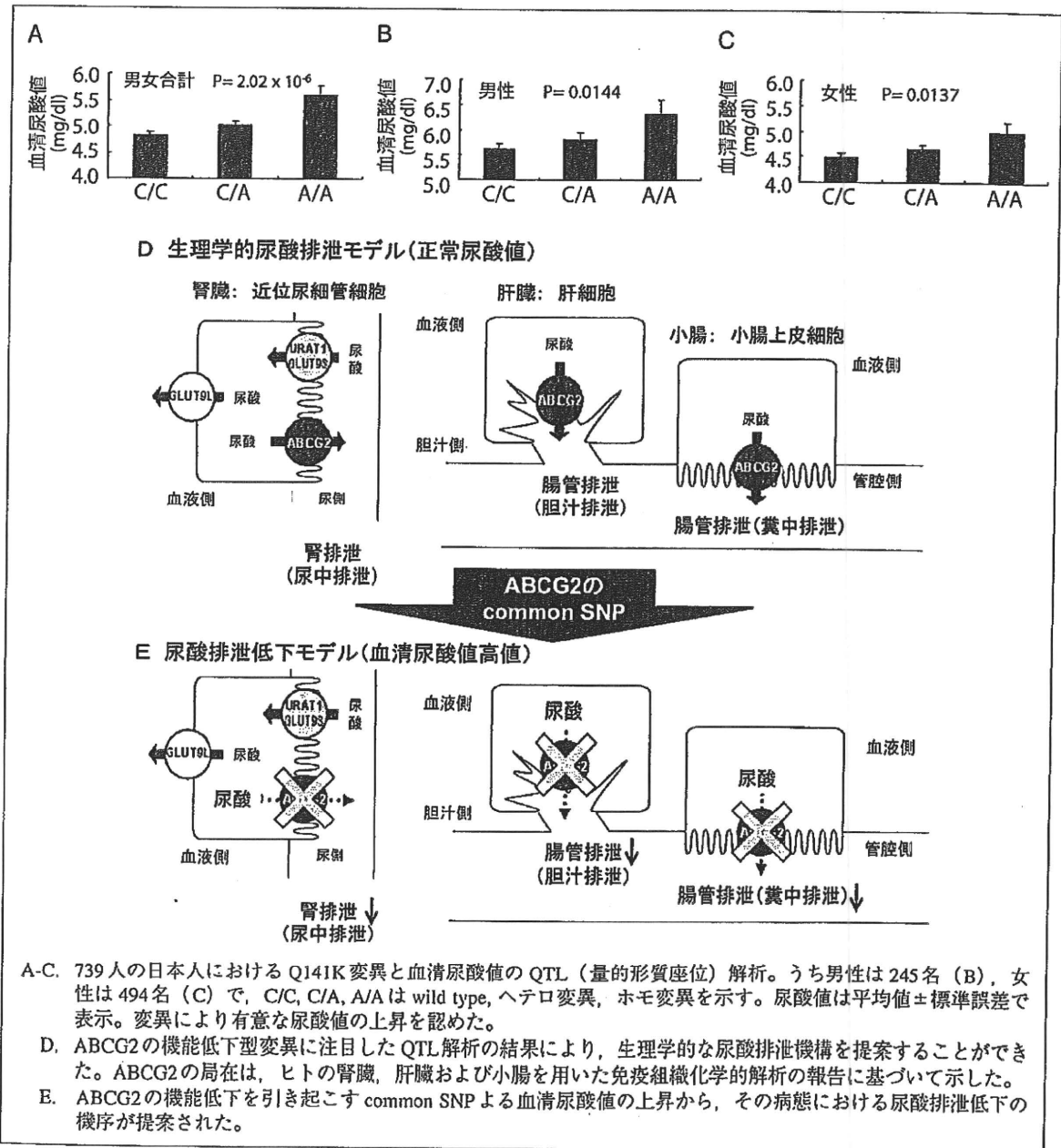
細胞膜小胞を用いた輸送実験系で解析した。その結果、V12M以外の5変異では機能の低下が認められた。すなわち、Q141Kでは機能が半分に減少することが観察され、残りのQ126Xを含む4変異では機能が完全に消失することが観察された(図4D)。これらの5変異のうち、Q126XとQ141Kはそれぞれ日本人の5.5%および53.6%と高い頻度で認められることが報告されており、以降の解析はこの

2つの変異 (common SNP) に注目して実施した。

5. 臨床遺伝学的解析2：QTL解析によるABCG2の生理学的機能の同定

ABCG2の生体における機能を検討するための臨床遺伝学的解析として、739名の日本人の健康診断受診者のサンプルを用いて、血清尿酸値とABCG2の変異による関係について量的形質座位 (quantitative trait locus: QTL) 解析を実施した。その結果、

図5 QTL解析に基づくABCG2を介したヒト腎臓および腸管からの尿酸排泄機構 (文献3より改変)



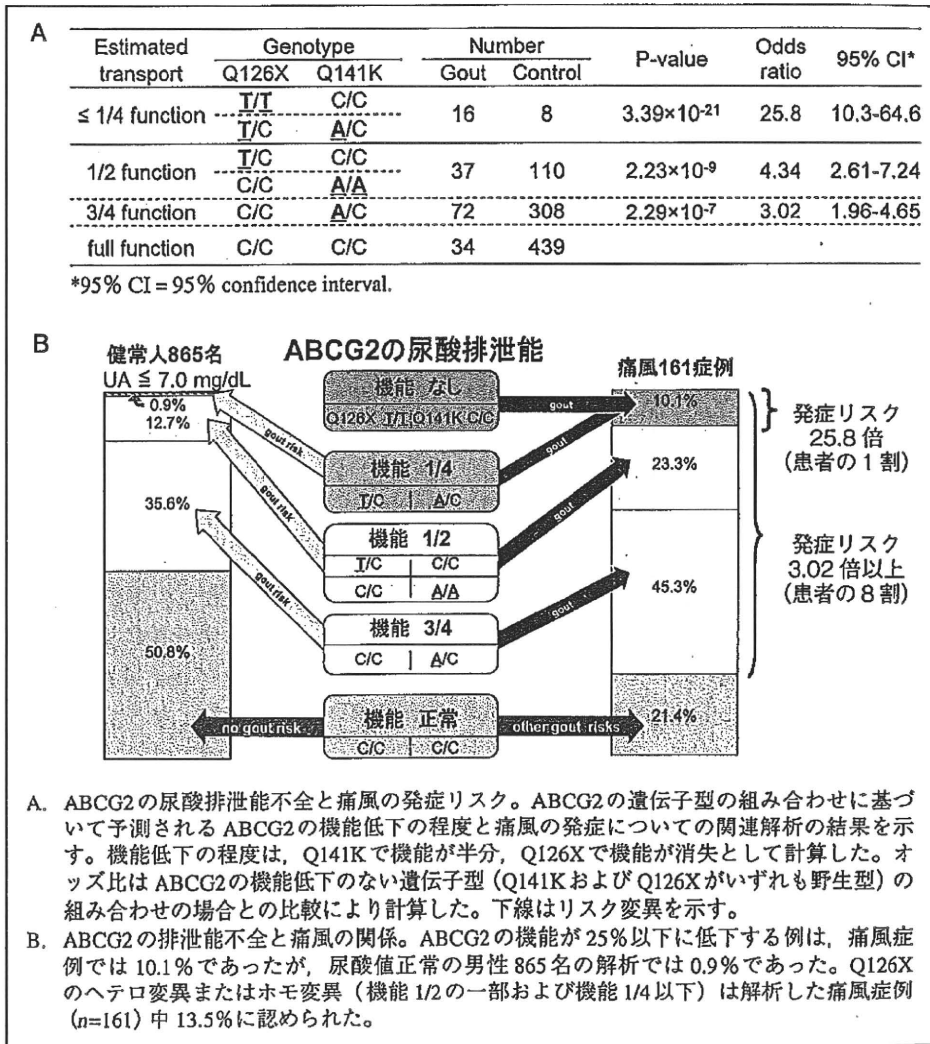
機能半減変異である Q141K 変異を有する数が多いほど血清尿酸値が上昇することがわかった (図 5 A-C)。これらの所見と, ABCG2 トランスポーターの腎臓<sup>16)</sup>, 肝臓および小腸<sup>17)</sup> における発現パターンから, 図 5 D, E に示す ABCG2 によるヒト腎臓および肝臓, 腸管からの尿酸排泄機構について, 生理学的なモデルと病態生理学的な ABCG2 機能不全モデルを提案することができた<sup>3)</sup>。すなわち, 生理学的なモデルにおいては, 腎臓の近位尿細管, 肝細胞および小腸上皮細胞の管腔側に局在する ABCG2 は, それぞれ尿中および大便中への尿酸排泄を担っている。肝細胞からの胆汁中への尿酸排泄は, 小腸上皮細胞からの小腸の管腔内へ

の尿酸排泄とともに, 大便中への尿酸排泄 (腸管排泄) に関与していると考えられる。ABCG2 機能不全モデルにおいては, 近位尿細管, 肝細胞および小腸上皮細胞の管腔側における尿酸排泄の障害があり, この機能不全により血清尿酸値が高まることが示唆された。ヒトにおいて尿酸は, 2/3 が腎臓から尿中へ, 残りの 1/3 は主に小腸などから大便中へ排泄されることが教科書的にも記載されていたが, ABCG2 がそれらの尿酸排泄を担う分子の実体であることが示唆された。

6. 臨床遺伝学的解析 3: 痛風の主要病因遺伝子の同定

前述の分子機能解析と遺伝学的解析を併用した

図 6 痛風の主要病因遺伝子としての ABCG2 の同定 (文献 3 より改変)



第4章 発症リスクを高めるトランスポーターへのアプローチ

解析結果を踏まえて、痛風や高尿酸血症の発症における ABCG2 の役割を検討するための更なる臨床遺伝学的解析としては、以下のハプロタイプ頻度解析と症例-対象研究 (case-control study) を含めた解析を実施した。今回の解析の特徴の1つは、単に遺伝子変異ごとのオッズ比 (発症リスク) の評価のみではなく、症例など個々の対象者における ABCG2 の機能低下レベルに注目したオッズ比の評価をあわせて実施したことである。対象としては、日本人男性の痛風症例 161 例を含む 228 名の高尿酸血症症例と、血清尿酸値が正常な日本人男性 865 名を対象として、ABCG2 の主な遺伝子多型について解析した。その結果、Q126X という ABCG2 の遺伝子多型は、高尿酸血症と痛風の両方の発症リスクを増加させることがわかり、高尿酸血症の発症と比べて、痛風の発症により強く関わることが明らかとなった。また、ハプロタイプ頻度解析により、ABCG2 遺伝子の Q126X と Q141K という2つの変異は、1つの染色体上では同時に存在しないことが明らかとなり、独立したリスクであることがわかった。したがって、これらの2つの変異を調べるだけでヒトの ABCG2 トランスポーターの機能低下の程度をほぼ予測できることがわかり、簡便な検査によりリスクの予測が可能であることが見出された。そのような解析の結果、痛風の症例の約1割には ABCG2 トランスポーターの機能が1/4以下になる遺伝子変異パターンが認められ、痛風の発症リスクを26倍高めることが明らかとなった (図6A)。また、日本人の痛風症例の約8割に ABCG2 トランスポーターの機能低下がみられることがわかり、3倍以上のリスクを認めることがわかった (図6B)。

生活習慣病などの common disease を対象としたこれまでの GWAS などにおいては、通常、リスクの増加が2倍以下の疾患関連遺伝子の報告がほとんどであった。したがって、生活習慣病の遺伝子解析において、今回の知見は疾患の病態解明にせまる日本発の大きな成果となったと考えられる。機能解析の一部については、Woodward らがツメガエル卵母細胞を用いた系で解析し報告した<sup>10)</sup>。し

かしながら、ABC トランスポーターの詳細な機能解析は卵母細胞の系では困難であり、本研究のようにベシクルを用いた解析系により初めて ABCG2 の高容量性の尿酸排泄能を同定することができた。これにより、ABCG2 がヒトの生理学的な尿酸排泄 (腎排泄および腎外排泄) に関わることを提唱することができた<sup>9)</sup>。また本研究では、より包括的な研究において function-based genetic analysis を適応し、かつ2つの遺伝子多型の組み合わせに注目した評価を実施することにより、ABCG2 遺伝子が痛風の主要病因遺伝子であることを初めて見出すことができた<sup>10)</sup>。これらの知見は、生理学的な尿酸輸送の分子機構や、痛風や高尿酸血症の病態解明を飛躍的に進めるものであり、新たな視点からの予防法や治療薬の開発につながることで大いに期待される。

## おわりに

ポストゲノムシーケンス研究の1つとして重要な位置を占める GWAS の結果を踏まえた、さらに後の研究 (次世代のポストゲノムシーケンス研究) においては、残された重要な分子の生理学的機能の同定や、common disease を含む重要な疾患の病態解明が期待される。本稿で紹介した「トランスポーター分子機能を指標とした臨床遺伝学的解析 (function-based genetic analysis)」は、次世代ポストゲノムシーケンス研究において重要な研究成果が十分に期待できる解析手法である。このような研究は、基礎研究者と遺伝学・遺伝統計学・臨床医学の研究者との綿密な連携によるトランスレーショナルリサーチにより実現可能であり、トランスポーター分子は *in vitro* での分子機能評価が可能であることなどから格好の解析対象であることを例に挙げて解説した。トランスポーター研究は日本において非常に進んでいる分野の1つであるため、トランスポーターを対象とした function-based genetic analysis による研究は、今後も日本においてますます発展し、未知の分子機能と病態の解明に迫るような、世界をリードした研究成果が期待できる。