

時のような尿のアルカリ化は、効果を期待できない。著しい尿路結石やオキシプリン排泄量増加が原因と思われる腎機能低下を認めるような症例には、食事療法として低プリン食を行う。

b. MoCo 欠損症

現時点で MoCo 欠損症の有効な治療法は確立

されていない。MoCo 合成の最初のステップの異常をもつ患者に対し、cyclic pyranopterin monophosphate の投与により症状が改善したとの報告がされ、今後の治療法の進展が期待される¹⁵⁾。

■ 文 献

- 1) Dent CE, Philpot GR: Xanthinuria, an inborn error (or deviation) of metabolism. *Lancet* **266**: 182-185, 1954.
- 2) Yamamoto T, et al: Metabolism of pyrazinamide and allopurinol in hereditary xanthine oxidase deficiency. *Clin Chim Acta* **180**: 169-175, 1989.
- 3) Reiter S, et al: Demonstration of a combined deficiency of xanthine oxidase and aldehyde oxidase in xanthinuric patients not forming oxipurinol. *Clin Chim Acta* **187**: 221-234, 1990.
- 4) Duran M, et al: Combined deficiency of xanthine oxidase and sulphite oxidase: a defect of molybdenum metabolism or transport? *J Inherit Metab Dis* **1**: 175-178, 1978.
- 5) Ichida K, et al: Identification of two mutations in human xanthine dehydrogenase gene responsible for classical type I xanthinuria. *J Clin Invest* **99**: 2391-2397, 1997.
- 6) Ichida K, et al: Cloning of the cDNA encoding human xanthine dehydrogenase (oxidase): structural analysis of the protein and chromosomal location of the gene. *Gene* **133**: 279-284, 1993.
- 7) Ichida K, et al: Mutation of human molybdenum cofactor sulfurase gene is responsible for classical xanthinuria type II. *Biochem Biophys Res Commun* **282**: 1194-1200, 2001.
- 8) Reiss J, et al: Mutations in a polycistronic nuclear gene associated with molybdenum cofactor deficiency. *Nat Genet* **20**: 51-53, 1998.
- 9) Reiss J, et al: Human molybdopterin synthase gene: genomic structure and mutations in molybdenum cofactor deficiency type B. *Am J Hum Genet* **64**: 706-711, 1999.
- 10) Reiss J, et al: A mutation in the gene for the neurotransmitter receptor-clustering protein gephyrin causes a novel form of molybdenum cofactor deficiency. *Am J Hum Genet* **68**: 208-213, 2001.
- 11) Hille R, et al: Molybdenum enzymes in higher organisms. *Coord Chem Rev* **255**: 1179-1205, 2011.
- 12) Mendel RR, Schwarz G: Molybdenum cofactor biosynthesis in plants and humans. *Coord Chem Rev* **255**: 1145-1158, 2011.
- 13) Johnson JL, et al: Inborn errors of molybdenum metabolism: combined deficiencies of sulfite oxidase and xanthine dehydrogenase in a patient lacking the molybdenum cofactor. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 3715-3719, 1980.
- 14) Ichida K, et al: Two siblings with classical xanthinuria type 1: significance of allopurinol loading test. *Intern Med* **37**: 77-82, 1998.
- 15) Veldman A, et al: Successful treatment of molybdenum cofactor deficiency type A with cPMP. *Pediatrics* **125**: e1249-1254, 2010.

IX 尿細管輸送異常症

腎性低尿酸血症 [特発性, 続発性]

Renal hypouricemia

Key words : 腎性低尿酸血症, 運動後急性腎不全, URAT1, GLUT9/URATv1

市田公美

1. 概念・定義

プリン体の最終代謝産物である尿酸は, 主に腎臓から体外に排泄される。血清尿酸値は, 尿酸への代謝量(産生量)と腎臓を中心とした排泄能のバランスにより規定されている。この中で血清尿酸値の決定に, より大きく関与しているのが尿酸排泄能である。

低尿酸血症の定義に明確な基準はなく, 報告者により血清尿酸値を1.5mg/dL以下から4mg/dL以下までとするなど, 幅がある。しかし, 最近では血清尿酸値2mg/dL以下を低尿酸血症としている報告が多い。低尿酸血症には, 尿酸産生低下型低尿酸血症と尿酸排泄亢進型低尿酸血症(腎性低尿酸血症)があり, 腎性低尿酸血症が日常遭遇する低尿酸血症のほとんどを占めている。

2. 疫学

腎性低尿酸血症と診断するためには, 尿中尿酸排泄量や尿酸排泄能の指標である尿酸クリアランス(C_{UA})または C_{UA}/C_{Cr} (FEUA)を測定する必要があるため, 疫学研究では腎性低尿酸血症としてではなく低尿酸血症としての報告が多い。しかし, 日本で日常遭遇する無症状の低尿酸血症は, ほとんどが腎性低尿酸血症である。低尿酸血症の頻度は, 男性0.14-0.22%, 女性で0.25-0.40%である。日本において特発性腎性低尿酸血症は, 他国に比較し著しく頻度が高い。

表1 尿酸排泄亢進型低尿酸血症の成因

特発性腎性低尿酸血症(遺伝性: 1型, 2型)
続発性尿酸排泄亢進型低尿酸血症(続発性腎性低尿酸血症)
遺伝性 Fanconi 症候群
続発性 Fanconi 症候群(薬物, Wilson 病, 多発性骨髄腫, 重金属毒性など)
SIADH
悪性腫瘍
糖尿病
肝硬変
薬物(benzbromarone, probenecid, sulfapyrazone など)
妊娠
難治性下痢

3. 病因

1日に約700mgの尿酸が体外に排泄され, その約70%が腎臓から, 残りは主に消化管から排泄される。血液中のタンパクと結合していない尿酸は, 糸球体で濾過された後, 近位尿細管を中心に再吸収と分泌が両方向性に行われ, 最終的には糸球体を通じた尿酸の6-10%が尿中に排泄される。尿酸が再吸収または分泌されるためには, 尿酸が細胞膜を越えて輸送される必要があり, これはトランスポーターを介して行われる。

尿酸排泄亢進型低尿酸血症の原因を表1に示す。特発性腎性低尿酸血症の原因としては, 近位尿細管の管腔側膜で尿酸の再吸収に働くトランスポーターurate transporter 1(URAT1)と血管側膜で尿酸の再吸収方向に働くトランスポー

ター glucose transporter 9 (GLUT9/URATv1) のそれぞれの欠損により、腎性低尿酸血症が発症することが明らかになっている。URAT1 をコードしている遺伝子 *SLC22A12* 変異によるものが腎性低尿酸血症1型 (OMIM 220150)、GLUT9/URATv1 をコードしている *SLC2A9* 変異によるものが腎性低尿酸血症2型 (OMIM 612076) と分類される¹⁻³⁾。

URAT1 は、生体内では乳酸などを交換基質として尿酸の再吸収に働き、*in vitro* の実験により尿酸排泄促進薬である benzbromarone や probenecid の作用点になっていることが明らかにされた¹⁾。最近、腎性低尿酸血症1型患者に対し、benzbromarone を投与しても有意な尿酸排泄促進効果を認めないことから、*in vivo* においても benzbromarone が URAT1 を介して効果を発現していることが確認された⁴⁾。腎性低尿酸血症1型では、FEUA で 0.45-0.87 と、正常値の 0.055-0.111 に比し高い値を示すことから、URAT1 は近位尿細管の管腔側膜における尿酸再吸収の中心的役割を担っていることが明らかにされた。

日本人の特発性腎性低尿酸血症の 80-90% は、腎性低尿酸血症1型である。日本人の特発性腎性低尿酸血症の特徴は、*SLC22A12* において W258Stop となる変異 G774A が、*SLC22A12* の遺伝子変異の 80% 近くを占めていることである⁵⁾。日本人における G774A のアレル頻度は 2.3-2.37% と高率であり^{6,7)}、日本人に腎性低尿酸血症が著しく多い原因となっている。大陸から日本に人が移動してくる際に、創始者効果により G774A の頻度が高くなったと考えられている⁸⁾。

GLUT9/URATv1 は、当初グルコーストランスポーターのファミリーである GLUT9 として同定され、その後、全ゲノム関連解析により、*SLC2A9* が血清尿酸値と関連を示す遺伝子として報告され、尿酸を輸送することが明らかになった^{2,9,10)}。現在、URATv1 との呼称が提唱されている。腎性低尿酸血症2型症例の報告はまだ少数であるため、腎性低尿酸血症1型との臨床上の正確な比較は難しい^{2,3,11,12)}。しかし、その少

数例を集計すると、GLUT9/URATv1 の完全欠損による腎性低尿酸血症2型の方が URAT1 完全欠損による腎性低尿酸血症1型よりも、FEUA が 1.9 程度と著しい高値を示す^{11,12)}。これは、管腔側膜には URAT1 以外の尿酸再吸収に働くトランスポーターが存在するのに対し、現時点では血管側膜では GLUT9/URATv1 以外のトランスポーターは想定されていないことに一致している(図1)。すなわち、URAT1 欠損では管腔側膜における尿酸再吸収は他のトランスポーターを介してある程度行われるが、GLUT9/URATv1 欠損では血管側膜における尿酸再吸収がほとんど行われなくなる。このため、GLUT9/URATv1 欠損においては、結果的に近位尿細管における尿酸分泌を観察していることになると考えられる。GLUT9/URATv1 の完全欠損症例の FEUA が高値を示すことは、糸球体で濾過された尿酸の 40-50% 程度が分泌されるとの今までの想定以上に尿酸分泌が行われていることを示している。

続発性腎性低尿酸血症は、近位尿細管の障害により尿酸再吸収が減少することにより起こる。したがって、Fanconi 症候群などに伴って続発性腎性低尿酸血症が認められることが多い。

4. 病 態

特発性腎性低尿酸血症において、血清尿酸値が低いことによる直接的な症状は報告されていない。合併症として、尿路結石と運動後急性腎不全の発症率が高い。尿路結石は、特発性腎性低尿酸血症患者の 7-10% 程度に認められる⁵⁾。その原因として、低尿酸血症により尿酸の腎外排泄が減少しているため、腎臓からの排泄の比率が増し、結果的に尿中尿酸排泄量が増加しているためと考えられている。

運動後急性腎不全の臨床症状は、運動後数時間後から著しい腰背部痛を伴う急性腎不全である¹³⁾。詳細な問診により、特発性腎性低尿酸血症患者の 10% 近くに運動後急性腎不全を疑わせる症状の既往を認める。運動後急性腎不全を誘発する運動の種類は、短時間でも激しい運動であることが多く、有酸素運動より無酸素運動

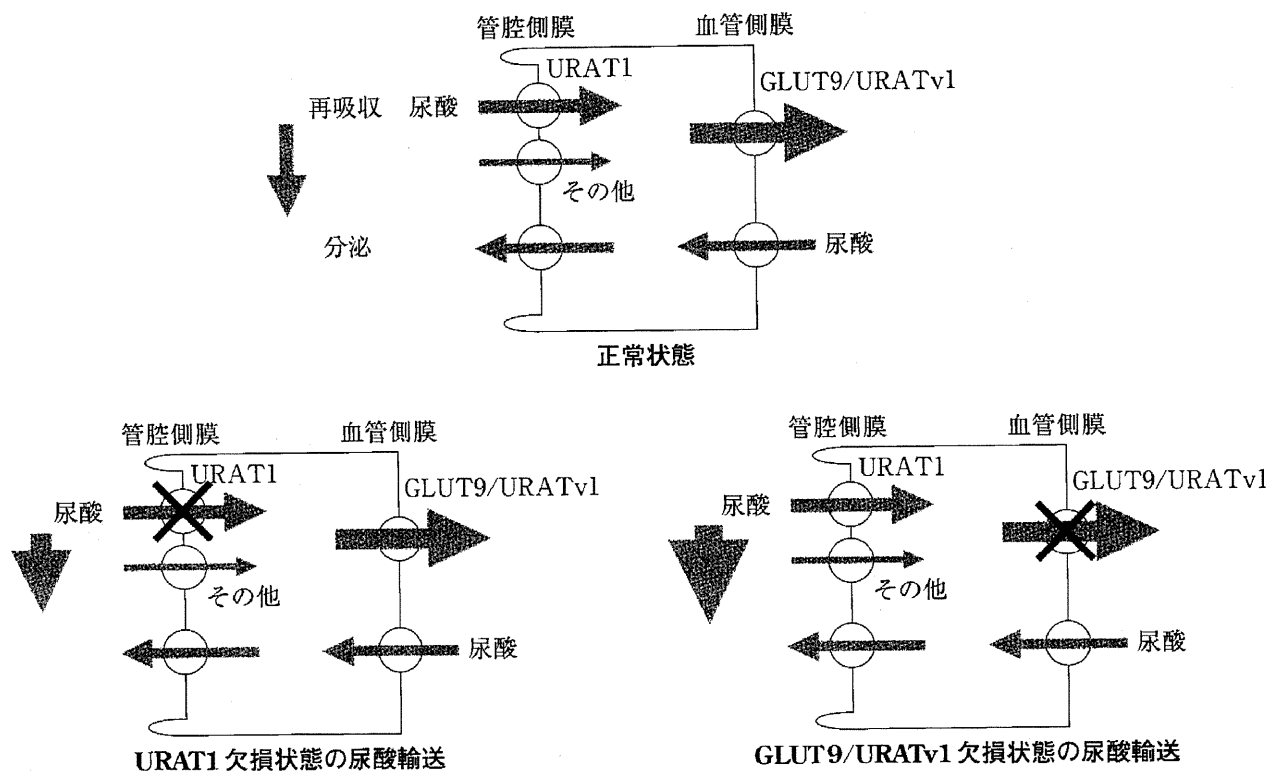


図1 URAT1とGLUT9/URATv1欠損による尿酸輸送の違い

簡略化のため、URAT1およびGLUT9/URATv1以外のトランスポーターは、1つのトランスポーターで表した。

で起こりやすいと推測されている。また、運動により必ず運動後急性腎不全を発症するのではなく、脱水やNSAIDs内服などの促進因子が運動に加わったときに発症すると考えられているが、まだ促進因子については十分に明らかになっていない¹⁴⁾。

横紋筋融解症と異なり、運動後急性腎不全における血清CPKや血清ミオグロビンの上昇は、認めないか認めたとしても軽度である。delayed CT、MRIや超音波などの画像検査において、造影剤残存、信号強度やエコー強度がまだらな楔形になることが診断の一助になる。腎組織所見は、尿細管壊死が多い。急性腎不全に伴い血清尿酸値は上昇し正常範囲になっていることが多いため、急性腎不全期には腎性低尿酸血症を見逃しやすい。

運動後急性腎不全の発症機序は、腎臓の血管攣縮の関与が推定されている。すなわち、運動により活性酸素が増加し、腎臓の弓状動脈・葉間動脈が攣縮を起し虚血状態になり、再灌流時に活性酸素による虚血再灌流障害をきたすと

考えられている。腎性低尿酸血症に運動後急性腎不全を合併しやすい理由は、活性酸素のスカベンジャーとして働く尿酸が少ないためであると推定されている。このほかの機序として、腎臓からの尿酸排泄が増加していることによる閉塞性腎障害説が提唱されているが、運動後急性腎不全発症時の腎生検において、尿酸による尿細管閉塞所見がほとんど認められないことから、否定的な意見が多い。以上のように、運動後急性腎不全の発症機序の仮説は出されているものの、現段階では発症機序はまだ明確になっていない。

5. 診断と鑑別診断

血清尿酸値2mg/dL以下の低尿酸血症に加え、 C_{UA} またはFEUAの上昇を認めれば診断できる。典型的な特発性腎性低尿酸血症では、血清尿酸値は1mg/dL以下と低く、尿中尿酸排泄量は700mg/day程度と増加を認める。鑑別診断としては、表1の疾患となるが、特発性腎性低尿酸血症は無症状でほかの検査では異常を認

めないため、診断に苦慮することは少ない。

6. 治療と予後

特に治療は必要としない。運動後急性腎不全の予後は良く、腎機能は1週間から1カ月程度

で回復するが、再発例が多い¹⁵⁾。運動後急性腎不全の予防のために、無酸素運動や脱水を避ける指導が行われている。また、allopurinolの内服が有効だとする論文もあるが、確認されていない。

文献

- 1) Enomoto A, et al: Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* **417**: 447-452, 2002.
- 2) Anzai N, et al: Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter URATv1 (SLC2A9) in humans. *J Biol Chem* **283**: 26834-26838, 2008.
- 3) Matsuo H, et al: Mutations in glucose transporter 9 gene SLC2A9 cause renal hypouricemia. *Am J Hum Genet* **83**: 744-751, 2008.
- 4) Hamada T, et al: Uricosuric action of losartan via the inhibition of urate transporter 1 (URAT 1) in hypertensive patients. *Am J Hypertens* **21**: 1157-1162, 2008.
- 5) Ichida K, 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* **15**: 164-173, 2004.
- 6) Iwai N, et al: A high prevalence of renal hypouricemia caused by inactive SLC22A12 in Japanese. *Kidney Int* **66**: 935-944, 2004.
- 7) Taniguchi A, et al: A common mutation in an organic anion transporter gene, SLC22A12, is a suppressing factor for the development of gout. *Arthritis Rheum* **52**: 2576-2577, 2005.
- 8) Ichida K, et al: Age and origin of the G774A mutation in SLC22A12 causing renal hypouricemia in Japanese. *Clin Genet* **74**: 243-251, 2008.
- 9) Li S, et al: The GLUT9 gene is associated with serum uric acid levels in Sardinia and Chianti cohorts. *PLoS Genet* **3**: e194, 2007.
- 10) Vitart V, et al: SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nat Genet* **40**: 437-442, 2008.
- 11) Dinour D, et al: Homozygous SLC2A9 mutations cause severe renal hypouricemia. *J Am Soc Nephrol* **21**: 64-72, 2010.
- 12) Stiburkova B, et al: Novel homozygous insertion in SLC2A9 gene caused renal hypouricemia. *Mol Genet Metab* **102**: 430-435, 2011.
- 13) Ishikawa I: Acute renal failure with severe loin pain and patchy renal ischemia after anaerobic exercise in patients with or without renal hypouricemia. *Nephron* **91**: 559-570, 2002.
- 14) 石川 勲: 運動後急性腎不全(ALPE), 金沢医科大学出版局, 2006.
- 15) Ohta T, et al: Exercise-induced acute renal failure associated with renal hypouricaemia: results of a questionnaire-based survey in Japan. *Nephrol Dial Transplant* **19**: 1447-1453, 2004.

講演会・学会発表

運動後急性腎不全の発症機序における 腎血管収縮の寄与の検討

Study of contribution of renal vasoconstriction
in pathogenesis of exercise-induced acute renal failure

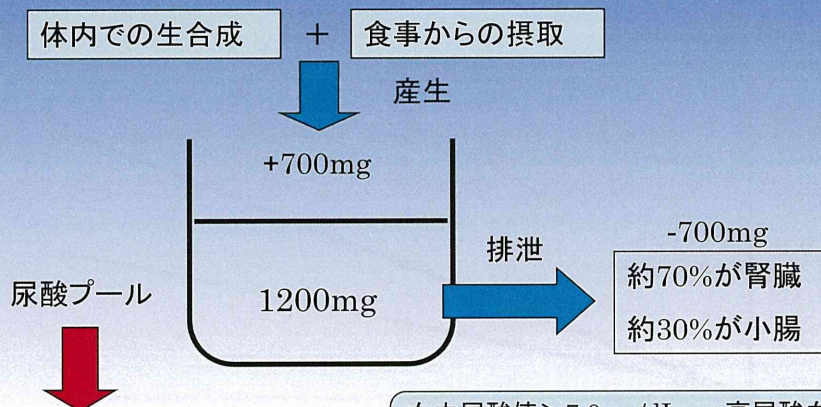
○飛田将希、中村真希子、長谷川弘、市田公美
東京薬科大学・病態生理学教室

○M.Tobita , M.Nakamura , H.Hasegawa , K.Ichida

Department of Pathophysiology, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

【背景】 尿酸排泄について

尿酸はヒトや高等霊長類におけるプリン体の最終代謝産物として知られ、約70%が腎臓、残りの30%が小腸から排泄される。



均衡が崩れた場合、様々な疾患の原因となる。

- ・血中尿酸値 > 7.0mg/dL……高尿酸血症
- ・血中尿酸値 ≤ 1.0~2.0mg/dL……低尿酸血症

低尿酸血症そのものに臨床症状はないが、近年、運動後急性腎不全の発症に関係していることが明らかになってきた。

運動後急性腎不全(ALPE*)とは…

*ALPE: acute renal failure with severe loin pain after anaerobic exercise

短時間の激しい無酸素運動後に発症する
腎機能障害

- ・CTスキャンで造影剤残存が見られる → 血管狭窄？
- ・ALPE患者の51%が腎性低尿酸血症

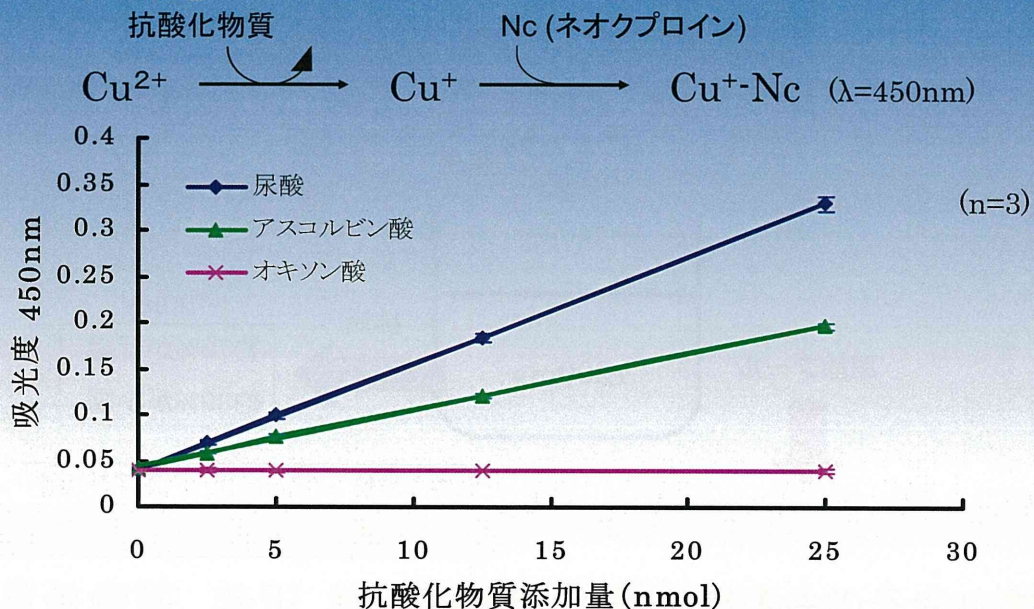


【発症機序仮説】

活性酸素障害説: 血中尿酸値が低いために、運動により大量に生成された活性酸素を除去できない。

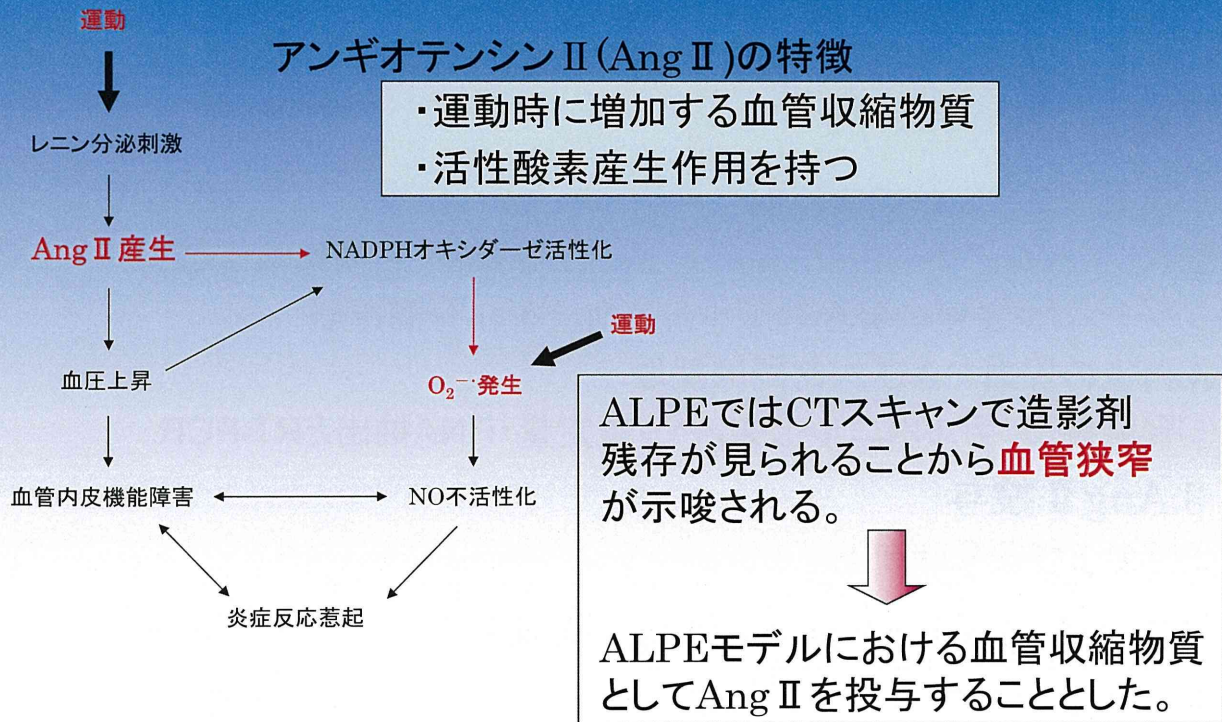
尿酸の抗酸化能について

【CUPRAC法】



尿酸は強い抗酸化能を持つ。

運動による血管収縮の機序



【本研究の目的】

ALPEの発症機序における活性酸素障害説
および腎血管収縮の寄与について検証する。

- ・腎虚血再灌流手術による活性酸素障害説の検討
- ・Ang II 投与による腎血管収縮の寄与の検討

【実験方法】

1. 血中尿酸値調節ラットの作成

オキソン酸(OA) 3%含有飼料にて8日間飼育した。

2. 腎虚血再灌流(I/R*)手術 *I/R:ischemia reperfusion

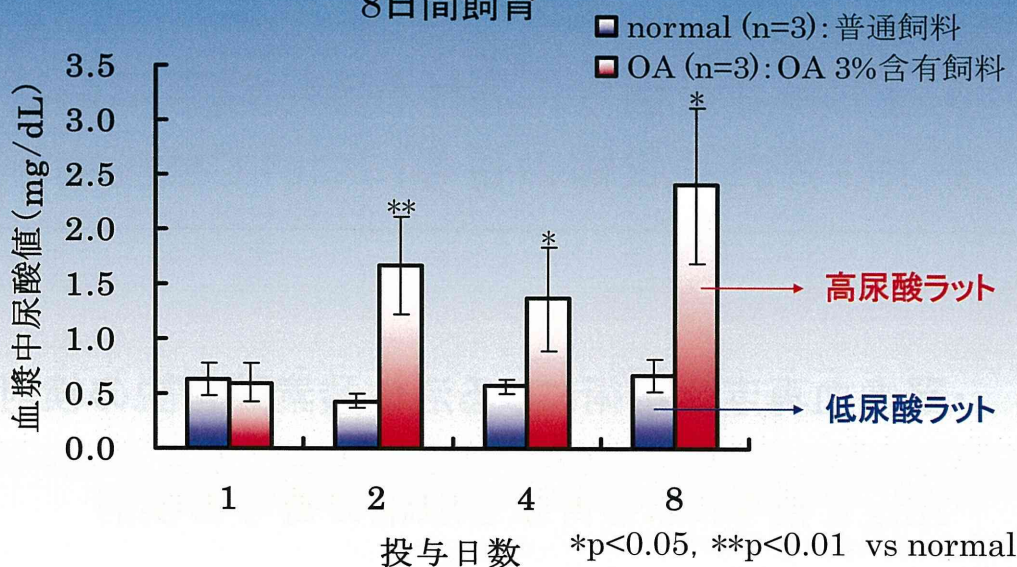
- ①採血および24時間尿採取
- ②ペントバルビタール(50 mg/kg, i.p.)にて麻酔、左側腹部を切開
- ③クランプで左腎の腎動静脈を留め血流を45分間遮断
- ④術後の採血および24時間尿採取
- ⑤腎臓摘出、カルボニル化タンパク質定量・RNA抽出とRT-PCR

3. Ang II 投与

- ①②および④⑤は同上
- ③腎動脈からAng II (1mg/kg weight)を投与
- ⑥腎組織よりパラフィン切片作成、Hematoxyline-Eosin染色

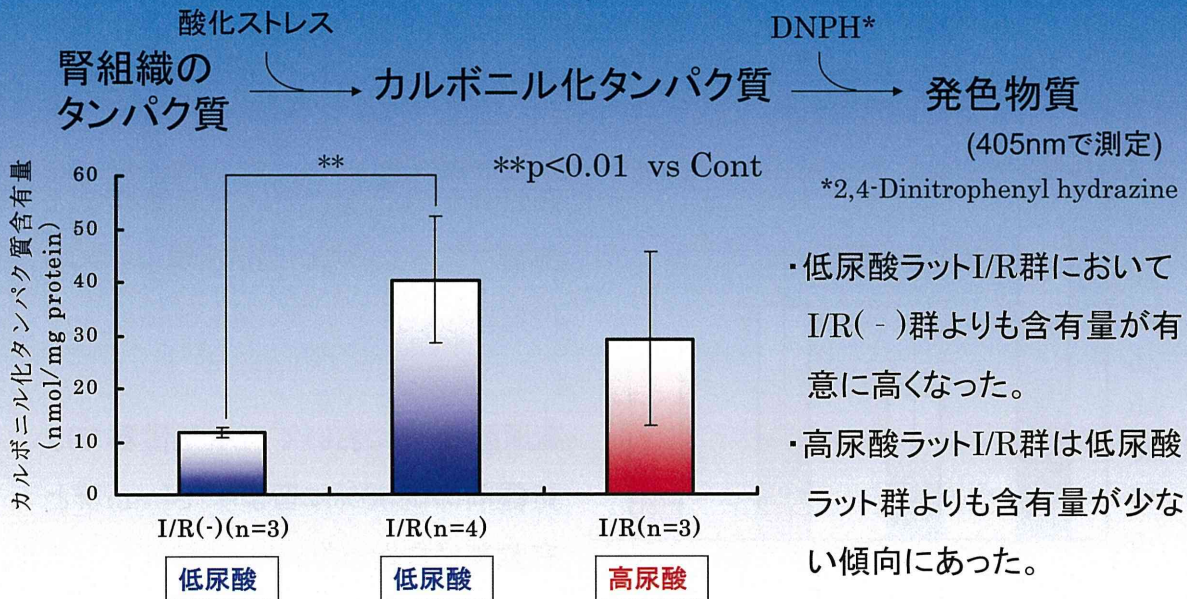
【結果】 1. 血中尿酸値調節ラットの作成

ウリカーゼ阻害薬であるオキソン酸(OA) 3%含有飼料を用いて8日間飼育



⇒ OA飼料投与により、ラットの血中尿酸値を調節した。

2-1 I/R後腎での尿酸の抗酸化能評価



⇒ 血中尿酸値が高いと、I/R処置により発生する酸化ストレスが抑えられる傾向にあることがわかった。

2-2 血中尿酸値とI/R後腎障害の関係①

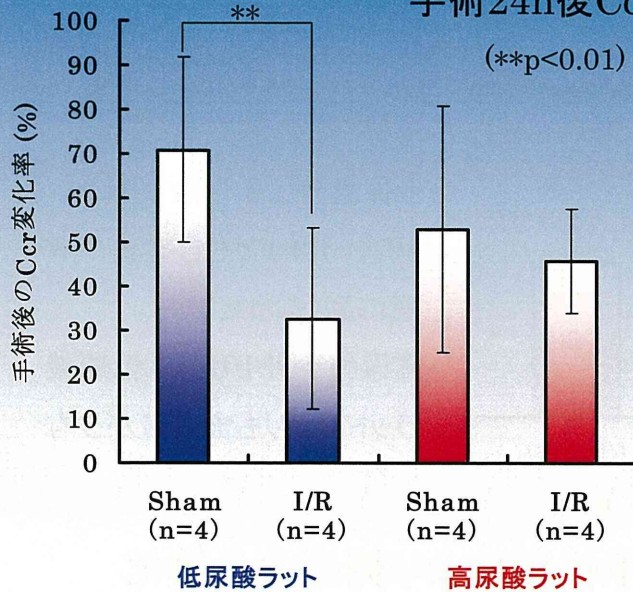
腎障害マーカー KIM-1, 虚血マーカー HIF-1αの発現量



⇒ I/R処置により腎障害が発生することが示唆されたが、血中尿酸値の差による腎障害の程度を評価することはできなかった。

2-3 血中尿酸値とI/R後腎障害の関係②

手術前クレアチンクリアランス(Ccr)に対する
手術24h後Ccrの割合



・低尿酸ラットにおいて、I/R処置群では処置を行っていないSham群より有意に低下した。

・高尿酸ラットにおいて、I/R処置群では処置前の約50%に留まり、Sham群と有意差はなかった。

⇒ 血中尿酸値の上昇により、Ccr低下が軽減された。

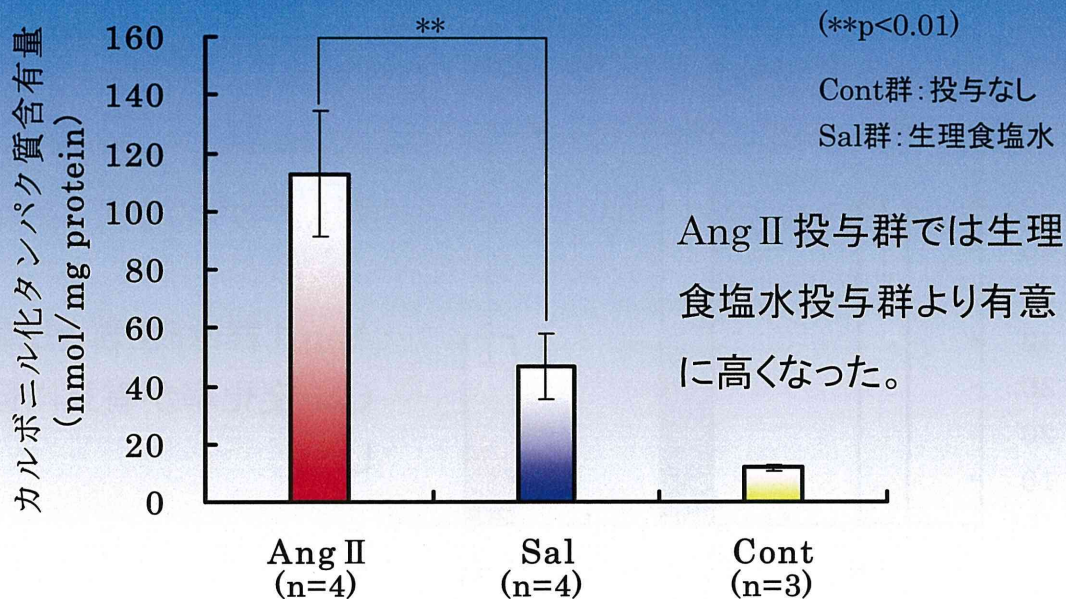
まとめ①

- ・ OA 3%含有飼料の飼育によって血中尿酸値が通常より高いラットを作成した。
- ・ I/R手術により酸化ストレスが負荷され、腎障害が発現することが確認された。
- ・ 高尿酸ラットにおいてはI/R手術後の酸化ストレスおよびCcrに回復傾向が見られた。

⇒ I/R手術による活性酸素の発生で運動後の状態を再現することができ、尿酸によって腎障害が軽減されることが示唆された。

しかし、**血管狭窄**については本モデルでは検証することができなかった。

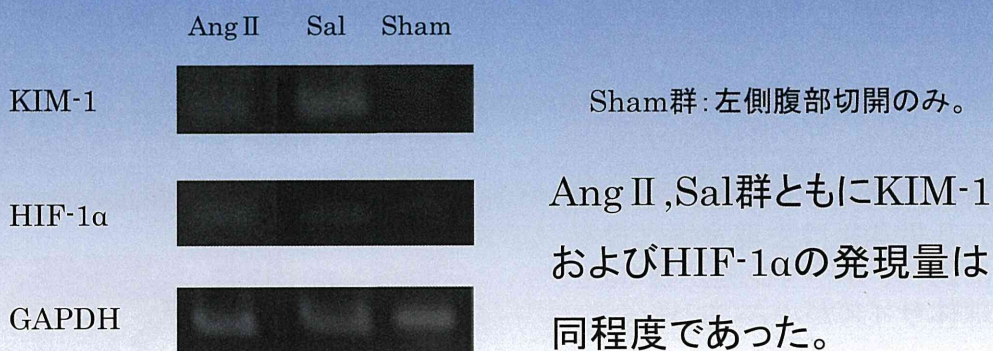
3-1 Ang II の活性酸素産生作用の検討



⇒ Ang II 投与により酸化ストレスが発生したといえる。

3-2 Ang II 投与による腎機能評価②

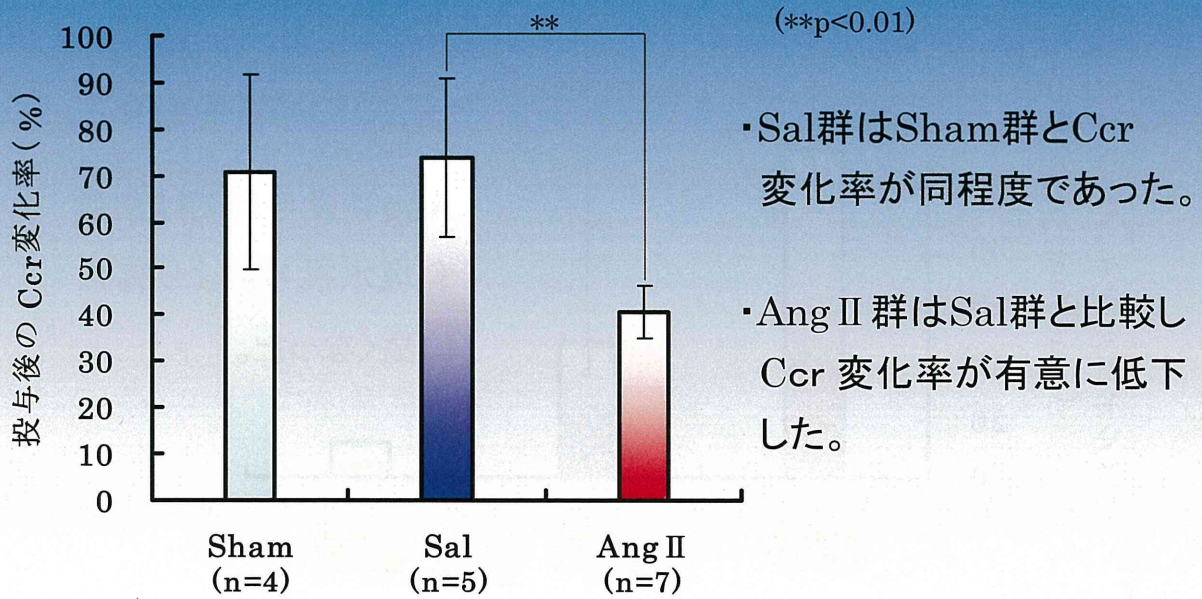
腎障害マーカー KIM-1, 虚血マーカー HIF-1αの発現量



⇒ Ang II 投与により腎障害が発生することが示唆されたが、投与物質の違いによる腎障害の程度を評価することはできなかった。

3-3 Ang II 投与による腎機能評価①

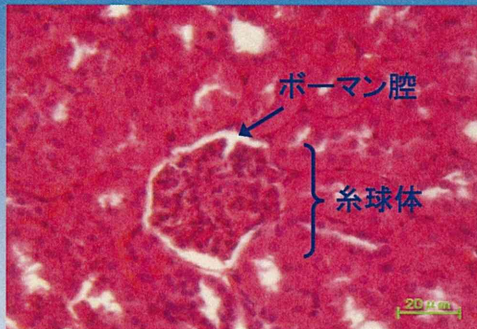
投与前Ccrに対する投与24h後Ccrの割合



⇒ Ang II 投与により、腎障害が発生したといえる。

3-4 Ang II 投与による腎機能評価②

Ang II 投与群

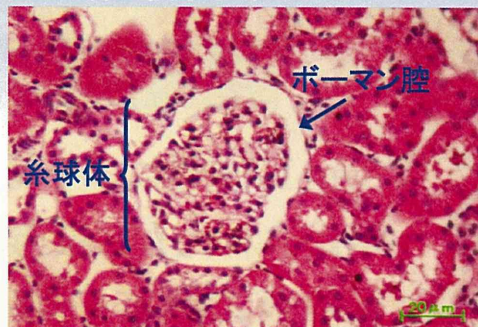


Ang II 投与後は生理食塩水投与後に比べ、ボーマン腔が狭くなり、糸球体サイズが小さくなった。

生理食塩水投与群



Cont群 (投与なし)



Ang II 投与により原尿が出にくい状態であり、糸球体毛細血管の収縮が起こったと示唆される。

まとめ②

- Ang II 投与により、腎血管収縮が惹起する腎障害モデルを構築することができた。
- Ang II 投与による腎障害は酸化ストレスの上昇を伴うことが確認された。

➡ Ang II 投与による活性酸素の発生モデルを構築でき、**血管収縮**を伴う腎障害が発生することが示唆された。

【総括】

- ① I/R処置による虚血モデルで運動後の酸化ストレスを再現することで、高尿酸状態では酸化ストレスによる腎障害が軽減される傾向にあることを示した。
- ② 運動後の亢進が報告されているAng IIの投与を行うことで、Ang IIの惹起する腎血管収縮により酸化ストレスが上昇し、腎障害となることを示した。



よって、ALPEの発症機序として活性酸素障害説が有力であることが示唆され、**腎血管の収縮**が関与していると考えられる。

Fluoresceinを用いた 尿酸トランスポーター機能評価法の開発

○中村真希子¹, 荒川伸介¹, 松尾広大¹, 細山田真²,
安西尚彦³, 市田公美¹

¹東京薬科大学 薬学部 病態生理学教室

²帝京大学 薬学部 生理化学研究室

³獨協医科大学 医学部 薬理学講座

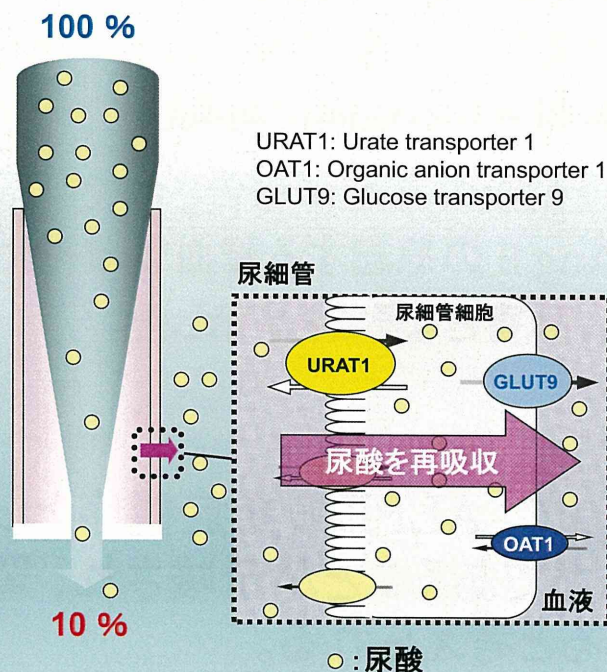
腎臓における尿酸排泄機構



近位尿細管に発現する尿酸トランスポーターは血中尿酸値を規定する。

血中尿酸値異常による疾病の治療標的として有用である。

しかし、未だ尿酸輸送に関わる全因子の特定とその相互関係の把握は進んでいない



現行のトランスポーター機能評価法の問題点

【現行の尿酸トランスポーター機能評価法】

[¹⁴C]標識した尿酸を取り込ませた細胞破碎液中の放射線量定量

利点	欠点
<ul style="list-style-type: none">・高感度・定量性に優れる	<ul style="list-style-type: none">・RI設備が必要・多検体処理に適さない・細胞の破碎が必要で経時評価ができない



尿酸トランスポーターの詳細な機能評価には

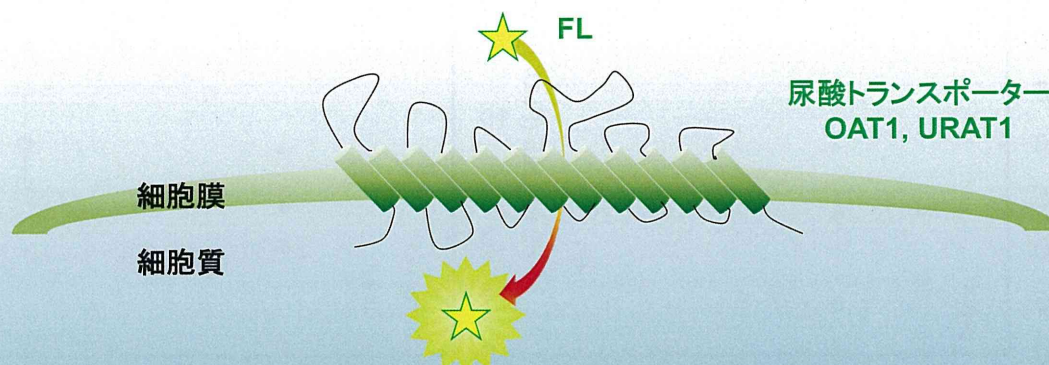
- ・簡便であり多検体処理が可能
- ・生細胞による動態観察が可能

という条件を満たす手法の開発が望まれる

目的

蛍光物質fluorescein (FL) の取り込みを指標とした

尿酸トランスポーター機能評価法の開発



- ・尿酸トランスポーターOAT1はFLを取り込むことが知られる
⇒取り込まれたFL蛍光を指標として尿酸トランスポーター能を評価可能
- ・多検体処理が容易で、96-384 wellフォーマットでの測定が可能となる
⇒新規トランスポーターやトランスポーター阻害剤のスクリーニングに有用

トランスポーターのFL取り込み定量

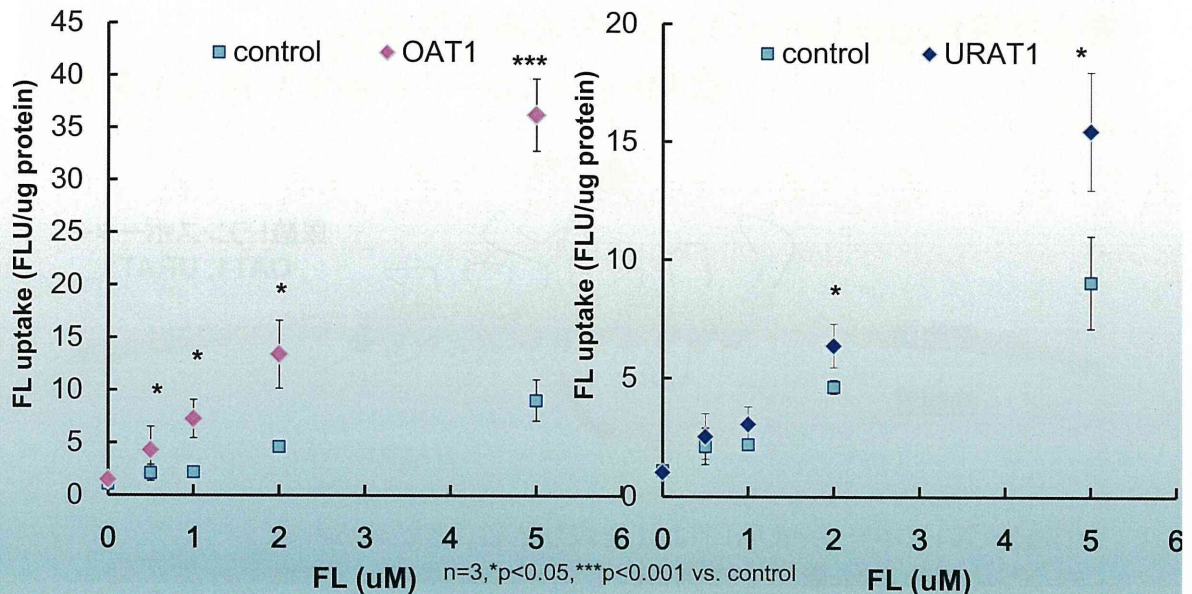
Control: pcDNAベクターのみ遺伝子導入したCOS-7細胞

実験方法

1. サル腎上皮由来COS-7細胞にトランスポーター遺伝子を導入
2. 48時間培養後、氷冷したFL溶液を細胞に添加、室温5分インキュベート
3. 氷冷HBSS緩衝液にて2回洗浄
4. 0.5 N NaOHにて細胞破碎
5. 蛍光プレートリーダーにて蛍光値定量(ex. 485 nm em. 520 nm)
6. Bradford法にて定量した破碎液のタンパク質濃度で蛍光値を除し単位タンパク量あたりのFL蛍光値を求めた

トランスポーターのFL取り込み定量

Control: pcDNAベクターのみ遺伝子導入したCOS-7細胞



OAT1によるFL取り込みを蛍光定量することができた。同様にURAT1もFLを認識することが示された。

尿酸に対する基質親和性評価

実験方法

1. COS-7細胞にトランスポーター遺伝子を導入
2. 48時間培養後、氷冷したFL 5 uM溶液(尿酸含有)を細胞に添加、室温5分インキュベート
3. 氷冷HBSS緩衝液にて2回洗浄
4. 0.5 N NaOHにて細胞破碎
5. プレートリーダーにて蛍光定量(ex. 485 nm em. 520 nm)
6. Bradford法にて単位タンパク質量あたりの蛍光値(FLU/ug protein)を算出

尿酸添加によるFL取り込みへの影響

Control: pcDNA3.1ベクターのみ導入した細胞
n=3,*p<0.05,**p<0.001 vs. 0 uM

Uric acid (uM)	FL uptake (% , control=100)	
	OAT1	URAT1
0	307 ± 26.1	142 ± 11.8
1	206 ± 44.6*	107 ± 11.9
10	187 ± 23.5*	109 ± 21.6
100	213 ± 12.3*	89 ± 7.4*
500	155 ± 24.0***	64 ± 10.7*

尿酸トランスポーターの各種輸送におけるKm値

	OAT1	URAT1
FL輸送	15.7 uM	852.4 uM
¹⁴ C尿酸輸送(文献値*)	943 ± 84 uM	371 ± 28 uM

*痛風と核酸代謝、巻28、号1、頁1-5、2004

トランスポーターのFL取り込み観察

実験方法

1. サル腎上皮由来COS-7細胞にトランスポーター遺伝子を導入
2. 48時間培養後、氷冷したFL 0.5 uM溶液を細胞に添加、室温5分インキュベート
3. 氷冷HBSS緩衝液にて2回洗浄
4. 蛍光顕微鏡観察(ex. 485 nm em. 520 nm)

Control: pcDNAベクターのみ遺伝子導入したCOS-7細胞



尿酸に対する基質親和性評価

尿酸

FL 0.5 μ M溶液に尿酸を添加し、FL取り込みへの影響を検討。

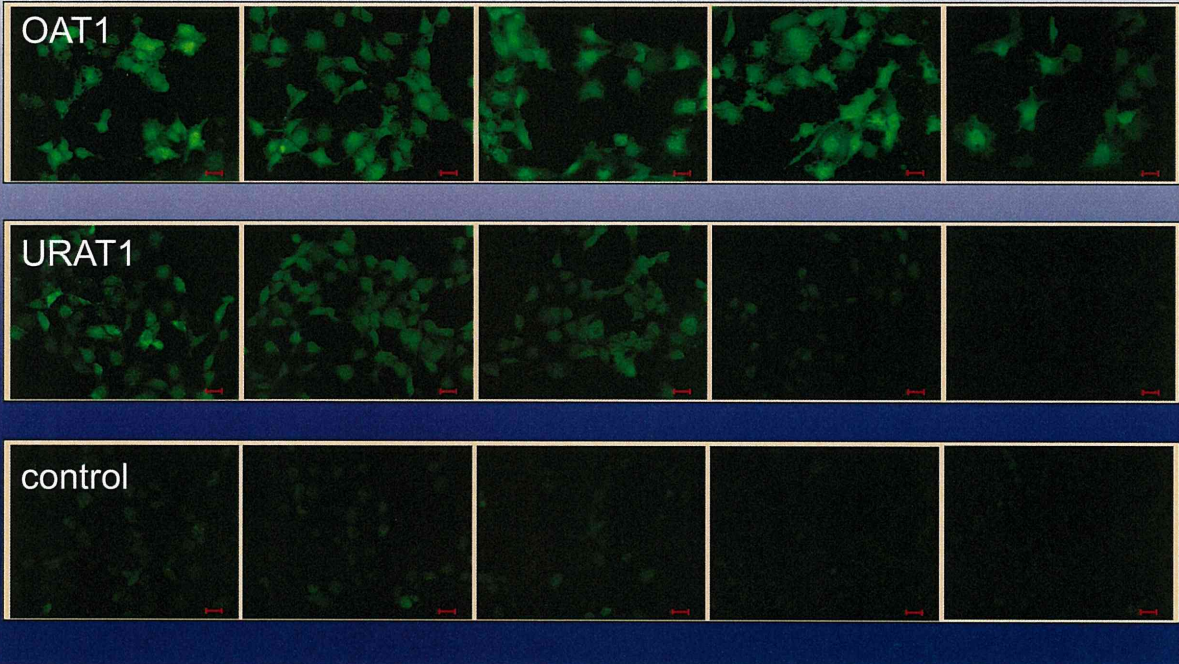
0 μ M

1 μ M

10 μ M

100 μ M

500 μ M



総括

- 尿酸トランスポーターOAT1, URAT1共にFLを取り込むことが示された。
- FL蛍光値定量によりOAT1, URAT1の取り込み能を評価することができた。
- FL蛍光観察によりOAT1, URAT1の取り込み能を評価することができた。

→ 蛍光値を指標とした、多検体処理可能な尿酸トランスポーター評価法を開発できた。