

## 学校検尿の限界



近畿大学医学部小児科学教室 竹村 司

### 抄 録

わが国では、世界各国に先がけて学校健診や乳幼児健診に尿検査が取り入れられ、その恩恵により様々な腎疾患の早期発見が可能となっている。小児期での早期の管理により、病状の進展予防が行えること、また早い時期での治療が実現されている。一般的に行われる尿検査のマスクリーニングには、尿試験紙法（dip stick 法と呼ばれる方法）が用いられている。試験紙法はアルブミンのような分子量の大きな蛋白の検出には優れているが、分子量の小さな  $\beta 2$ -microglobulin や Bence-Johns 蛋白などの低分子蛋白尿の検出には不向きな方法である。腎における低分子蛋白は、主として尿細管に存在し、その器質的、機能的障害により尿中へ放出される。尿細管障害を来す疾患として、小児期では先天性のものが占める割合が高く、特に、先天性尿路奇形症候群、逆流性腎症、ネフロン癆、デント病などが重要である。これらの疾患は、現行の試験紙法により見逃されてしまう危険性がある。いくつかの自治体では、乳幼児や学童健診に、腹部エコー検査を取り入れたり、低分子蛋白尿の測定が行われているが、全国的な浸透度はまだ低い。しかし、特に低年齢からの管理が必要な腎尿路奇形の早期発見のため、今後の検尿システムの改善が望まれる。

キーワード：低分子蛋白尿、マスキリング、腎尿路奇形、発生

### はじめに

わが国では、慢性維持透析を受けている患者数は毎年増加し、現在25万人を超えている。その中で小児の透析患者は、学校検尿施行開始10年目以降、新しく透析に導入されるのは年間60~70人とほぼ一定である。この数には日米間に大きな差があり、日米間の人口の違いを考慮しても、学校検尿の行われていない米国では日本の約4倍の頻度になる。小児の腎臓病の約半数は慢性に経過する腎臓病であり、最近の生活指導演や治療法の進歩によって、早くに見つけて早くから適切な生活管理と治療をすると、かなりの子ども達において、その悪化を阻止することができるうえに、その一部は全治させることもできることが判ってきた。そうといった理由で、その早期発見のための検尿が全国的に普及した。慢性糸球体腎炎は、血尿、蛋白尿とも陽性例から約60%、蛋白尿のみ陽性例から約1%、血尿単

独陽性例から、約2%の割合で発見されている。

### 試験紙法の長所と短所

一般的に行われる尿検査のマスキリングは、結果の即効性、コストパフォーマンスなどが考慮され、尿試験紙法（dip stick法）が用いられる。ズルフォサリチル酸法が併用されることもあるが、偽陽性率が比較的高い。試験紙法は、ネフローゼ症候群や慢性糸球体腎炎でみられるアルブミン尿のような分子量の大きな蛋白（70,000~100,000kDa）の検出には優れているが、分子量の小さな、 $\beta 2$ -microglobulin (MG) や多発性骨髄腫でみられるようなBence-Johns蛋白といった低分子蛋白尿の検出には不向きな方法と言える。腎における低分子蛋白は主として尿細管に存在し、その器質的、機能的障害により尿中へ放出される。尿細管障害を来す疾患には、先天性、後天性のいくつかの疾患があるが、小児期では、後天性の原因である薬剤性腎障害や一部の膠原病に続発する腎症を除き、先天性のものが占める割合が高い。

Tsukasa Takemura (近畿大学医学部小児科学教室)  
〒589-8511 大阪府大阪狭山市大野東377-2

## どのような疾患があるのか

低分子蛋白尿を主体とし、学校検尿にて異常が発見されない可能性のある疾患は、全身的症状が乏しく、腎のみに病変が限局する、先天性尿路奇形症候群、逆流性腎症、ネフロン癆、デント病などである。

### 1. 先天性尿路奇形症候群

低分子蛋白尿を主体とする小児期の重要な疾患には、先天性尿路奇形症候群 (Development of congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT) とよばれる病態がある。すなわち、腎異形成、腎低形成、膀胱尿管逆流症など、遺伝子学的異常を含むさまざまな理由から、発生段階で正常な腎泌尿器系の発育が阻害されたもの、またネフロン癆という尿細管に存在するネフロシスチンという蛋白が、遺伝子異常により正常に作られないもの、デント病のような、尿細管のCa輸送にかかわるチャネルの異常があるものなどがあげられる。一方で、同じく低分子蛋白尿を主体とするFanconi症候群という病気があるが、これは近位尿細管再吸収における複数の欠陥により、糖尿、リン酸尿、汎アミノ酸尿、重炭酸の喪失を引き起こす。小児期から、発育不全、成長遅滞が認められること、また、白内障などの眼病変、骨のクル病様変化、あるいは痙攣などの腎臓以外の徴候により、小児期の比較的早期に診断される。

### 2. 逆流性腎症

逆流性腎症とは、主にグレイドの高い膀胱尿管逆流症があり、尿路感染症と腎臓内への尿の逆流を繰り返すうちに、次第に尿細管や間質に障害が起こり、最終的には糸球体障害を来し、腎機能が廃絶してゆく疾患である。膀胱尿管逆流現象は、母胎内での腎尿路の発生段階において、尿管と膀胱の連結がスムーズに起こらず、逆流はすでに胎生期から生じていると思われ、それが高度な場合、出生時に腎臓が十分に発育しておらず、低形成腎や萎縮腎としてとらえられる。やっかいなことは、幼少期に膀胱尿管逆流症と診断され、腎臓の形態的な変化も少なく、適切な逆流防止術が行われていても、数年～十数年後に何の体調の変化もないまま腎機能が低下してゆくケースである。すなわち、障害を免れ、生き残った糸球体に過剰な血液の濾過や負荷が生じることにより、年月をかけて糸球体機能が徐々に低下し、硬化してゆくことが原因と考えられる。学童期には尿異常もなく、学校検尿でも異常が指摘されないことも多々ある。

### 3. Oligomeganephronia

一方、膀胱尿管逆流症が原因ではない腎の形成異常

もあり、これらにはさまざまな腎尿路系の発生にかかわる遺伝子の異常が報告されている。また、腎の形成単位であるネフロンの数が少ない、Oligomeganephroniaという病態もある。この病気の本質である糸球体数の少なさは、その発生に、ある特定の遺伝子群の異常が存在するもの以外に、最近では、未熟児や低出生体重児にも認められることから、出生時における腎の未熟さが原因と考えられるケースも報告されている。逆流性腎症や腎異形成と同様に、糸球体に過剰な血液の濾過による負荷が生じることにより、年月をかけて糸球体の硬化が進み、腎機能が徐々に低下してゆくことが原因と考えられている。腎臓には予備能力があるため、その機能がある一定のレベルにまで低下するまでは、むくみやだるさといった全身症状の出現やマススクリーニングによる尿異常の検出がなされない場合も多々ある。

### 4. ネフロン癆

ネフロン癆は、腎臓の髄質を中心とした嚢胞形成を認める疾患の代表である。組織学的には、進行性の硬化、硝子化糸球体を伴う尿細管間質性腎炎像を呈する。その病型には、3～5歳頃までに末期腎不全 (CRF) となる乳児ネフロン癆、幼少期から学童期までの比較的若年期に発症し、平均年齢13～14歳でCRFに移行する若年性ネフロン癆、平均年齢19歳頃にCRF至る思春期ネフロン癆がある。それぞれのタイプで責任遺伝子が解明されているが、中でも最も頻度が高いものが、若年性ネフロン癆である。この疾患は、遺伝形式は主として常染色体劣性遺伝を示すが、突然変異と思われる孤発例も存在する。

この疾患の最大の問題点は、病状がかなり進行してからでないと蛋白尿が検出されない点である。蛋白尿の主体は、 $\beta 2$ -MGなどの低分子蛋白尿であるため、学校検尿などのマススクリーニングで用いられる試験紙法では検出されにくく、見逃されることも多い。蛋白尿が検出された時には、すでに糸球体障害が進行しており、CRF状態ということも珍しくない。また、低分子蛋白尿の検出も全例で認められる訳ではなく、しかもある程度病期が進展した状態になってから初めて検出されるということもある。以上のことから、早期発見のための明らかな手がかりが少ないという難点がある。しかしこの疾患の概念を知っているかどうかで発見時期に差が生じる可能性もある。早期に発見されれば、適切な生活指導や腎機能の低下を遅らせる措置をとることができ、スムーズにその後の腎移植に向けた管理が可能となる。それは、本症は腎臓以外の症状から発見される例もあるということである。特に、

網膜色素変性症，眼球運動の失調，四肢の失調による粗雑な動き，すなわち，体操が苦手といったことから発見された例もある。その他には，肝繊維症，骨格や顔貌の異常（mid-facial dysplasia）なども早期発見のための観察点となる。

### 5. 日本型デント病

この疾患は，過去に特発性尿細管性蛋白尿症として報告され，その後東京大学小児科の五十嵐教授らにより，その原因の60～70%はクロライドチャンネル5遺伝子（CLCN5）の異常であることが明らかにされた。蛋白尿の主体は，およそ10,000以上ともなる尿の $\beta$ 2-MGで，3歳児健診での尿検査，学校検尿で蛋白尿を指摘されることがある一方で，その低分子蛋白尿の程度により，小児期には見逃され，成人になってから発見される例もある。すなわち，小児期には腎機能低下は示さず，無症状で経過することが大部分である。日本型デント病は予後が良好で，CRFに進展することはまずないと考えられていた時期があったが，最近になり，欧米でのデント病と同様に，日本型でも，50歳頃からCRFに至る症例があることが明らかにされている。その他，アミノ酸尿，糖尿，尿濃縮力低下などの近位尿細管機能障害を合併するものもあり，年齢とともに頻度は増加する。遺伝形式は，大部分がX連鎖型であるが，孤発例の報告もある。患者の多くは男児であるが，女児での報告も見られる。男性患者の母親（すなわち保因者）は，男児より程度の軽い低分子蛋白尿症を示すことが多いが，高齢になり糸球体機能低下や低P血症を呈するものも報告されている。

### 管理と治療

以上の疾患に共通して注意をしておかねばならない

徴候には，尿濃縮力の低下による多飲，多尿，また，夜尿や尿失禁などの2次性の遺尿，身長伸びが悪いといった成長発育障害などがある。若年性ネフロン癆では，これらの症状は，4～6歳頃より出現する。また，尿細管や集合管からのNaが喪失されるため，低Na血症，高K血症が認められるが，明らかななむくみや血尿，蛋白尿などの尿異常は，通常初期には認められず，血圧も正常である。腎機能障害が進行した段階で，初めて尿量の減少とともに，Naの貯留や高血圧，貧血を呈してくる。したがって，低身長や原因がよく分からない貧血などを呈する小児では，これらの病気を念頭においた検査や観察が必要となる。

これらの疾患に対し，現時点では特別有効な治療法はなく，電解質異常あるいは代謝性アシドーシスについて，食事療法，イオン吸着樹脂，重碳酸塩の投与が行われる。また，腎機能の低下が進行する場合には，CRFに準じた治療が行われる。また若年性ネフロン癆では，家族に対する遺伝相談，両親の保因者診断なども必要となる。

### さいごに

乳幼児，あるいは学童児に対して行われる尿スクリーニング検査は，早期発見といった多大な恩恵をもたらした。しかしシステム上，どうしても見逃されてしまう限界疾患もある。それを踏まえて，まだ全国規模での取り組みではないが，ある地方自治体では，乳幼児，学童健診に，腹部エコー検査を取り入れたり，低分子蛋白尿の測定が行われつつある。しかし，その手間やコストパフォーマンスの問題から，その浸透率は高くない。

# 1 ネフロン癆・髄質嚢胞腎

## A ネフロン癆

### 1 定義・概念

ネフロン癆(nephronophthisis: NPH)は、腎髄質に嚢胞形成を認める疾患の代表であり、組織学的には、進行性の硬化、硝子化糸球体を伴う尿細管間質性腎炎像を呈する。遺伝形式は主として常染色体劣性遺伝を示すが、孤発例もある<sup>1)</sup>。一方、髄質嚢胞腎(medullary cystic kidney disease: MCKD)は、発症年齢が10歳以降～50歳代と比較的高く、遺伝形式は常染色体優性遺伝をとる。本疾患の原因の一つ(MCKD2)はuromodulin(Tamm-Horsfall)蛋白遺伝子(UMOD)の異常である。しかし両疾患は、発症年齢と遺伝形式の相違を除いて、臨床学的にはともに末期腎不全(ESRD)へ進行し、また、病理組織学的にも極めて相同性を示すため、juvenile nephronophthisis-medullary cystic kidney complexともよばれる<sup>1)</sup>。その他のタイプである髄質海綿腎(medullary sponge kidney)は遺伝性に乏しく、ESRDに至ることが少ない比較的前後良好な疾患である。

### 2 病型分類

NPHの頻度は、小児の血液透析例の約4～5%を

占める。病型分類には、3～5歳頃までにESRDとなる乳児ネフロン癆(NPH2)、幼少期～学童期までの比較的若年期に発症し、平均年齢13～14歳でESRDに移行する若年性ネフロン癆(NPH1)、平均年齢19歳頃にESRDに至る思春期ネフロン癆(NPH3)がある(表1)。なかでも最も頻度が高いものが若年性ネフロン癆である。

現在では、遺伝学的に上記の3型に加えて、若年性ネフロン癆のsecond formとして、NPH4～6が新たに加えられている。遺伝形式は主として常染色体劣性遺伝を示すが、孤発例もある。NPHP4は、1p36上に存在し、nephrocystin-4(nephroretinin)分子をコードする。nephrocystin-4は、nephrocystin-1と協調して、尿細管上皮細胞におけるシグナル伝達を連係する。nephrocystin-5は、一部の網膜色素変性症を呈するネフロン癆の患者(Senior-Loken症候群)から同定された新しい蛋白であり、その責任遺伝子はIQCB1(NPHP5)である。nephrocystin-5は、腎尿細管細胞のprimary ciliaと網膜の光受容体のconnecting cilia上に存在する。この機能異常が、眼障害の原因である。

しかし最近では、乳児ネフロン癆においても、思春期ネフロン癆の責任遺伝子であるNPHP3のcompound heterogeneityが発見されるなど、発症にかかわる遺伝子の複雑化が報告されている<sup>2)</sup>。

表1 ネフロン癆の分類と責任遺伝子

	若年性ネフロン癆 (NPH1)	乳児ネフロン癆 (NPH2)	思春期ネフロン癆 (NPH3)
遺伝子	NPHP1, 4, 5, 6, 8	NPHP2	NPHP3
遺伝子産物	nephrocystin-1	inversin (INVS)	nephrocystin-3
遺伝子座	2q12-13 (NPHP1)	9q22-31	3q21-22
ESRDへの進行	平均13～14歳	3～5歳頃まで	平均19歳頃
腎外症状	網膜色素変性症 Joubert症候群 骨異常など	内臓逆転位 心奇形 高血圧など	肝線維症などの 報告あり

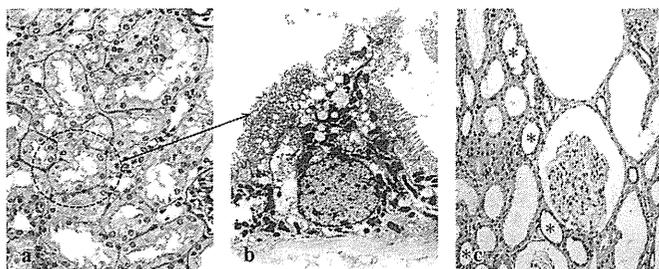


図1 nephrocystin-1の局在  
nephrocystin-1は、尿細管上皮細胞の primary cilia に存在する(→)。免疫染色により、その発現が認められる(\*)  
(口絵カラー7, p. v 参照)

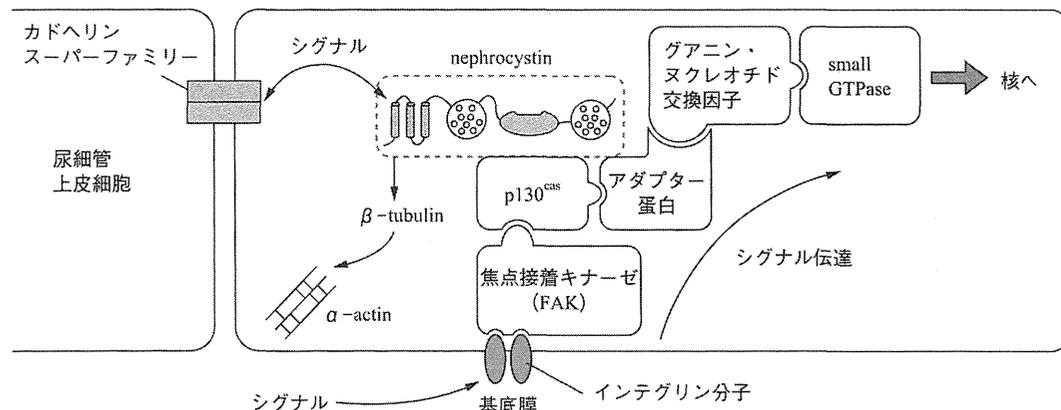


図2 nephrocystinの機能

### 3 病因・病態

*NPHP1* は若年性ネフロン癆の責任遺伝子であり、約 11 kb の長さで、染色体 2q12-13 上に存在し、nephrocystin-1 分子をコードする<sup>3)</sup>。nephrocystin-1 は、677 個のアミノ酸からなる蛋白で、3 個の coiled domain, 2 個の highly acidic negatively charged glutamic acid-rich domain と Src-homology 3 domain から構成されている。分子量は 83 kD である。nephrocystin-1 は、腎では尿細管上皮細胞の primary cilia の transition zone に存在する(図 1)。

尿細管上皮細胞はインテグリン分子を架橋として基底膜と連結しており、細胞外から細胞内へ伝達されるシグナルは、これを介して核内に伝達される(図 2)。nephrocystin は、結合蛋白として、細胞対細胞、細胞対細胞外マトリックスのシグナル伝達に重要な役割を有し、また N-cadherin, catenin,  $\beta$ -catenin と協調して細胞接着にも関与する<sup>4)</sup>。また、 $\beta$ -tubulin とともに、actin cytoskeleton 構造に影響を与え、細胞骨格の維持や細胞極性の変化にも寄与している。細胞内シグナル伝達の役割については、nephrocystin は Crk-associated substrate (CAS) と複合体を形成し、さらに Pyk2 のリン酸化を促進させ、Pyk2 依存性経路を介して細胞内情報を核内まで伝達する。また最近

の研究では、primary cilia 上で、 $\alpha$ -tubulin とその機能維持に寄与するとともに、細胞内小器官におけるシグナル伝達、すなわち cilia-sensory にかかわる役割も明らかにされている。したがって、nephrocystin 分子に異常を生じると、細胞と細胞外マトリックスとのシグナル伝達、細胞間接着、細胞骨格、細胞極性や cilia の機能、細胞内情報の核内への移行に障害が生じ、腎尿細管上皮の構造的・機能的障害を引き起こすことが推察される。

*NPHP1* mRNA の各組織での発現を検討した成績では、*NPHP1* mRNA は非常に広範囲な組織での発現が観察されるが、腎以外では、脳下垂体、脊椎、精巣、リンパ節や甲状腺などでの発現量が高い。脳・神経系での *NPHP1* mRNA の発現量は高く、その部位と一致した腎外合併症として小脳失調症がある一方で、肝線維症のように、mRNA 発現レベルが必ずしも高くない臓器にも症状が出現することがあるため、腎外徴候の発現における nephrocystin の役割については、いまだ解明されていない部分が多い。

乳児ネフロン癆の責任遺伝子(*NPHP2*)は、9q22-31 上に存在する。*NPHP2* は *INVS* 遺伝子、すなわち inversin とよばれる分子をコードする遺伝子を含み、*INVS* の異常は、ネフロン癆に類似した嚢胞形成を伴う腫大した腎とともに、内臓逆転位、臍臓にお

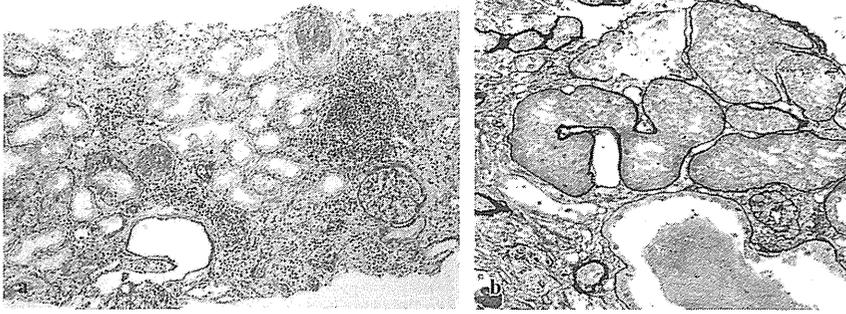


図3 若年性ネフロン病の腎病理所見

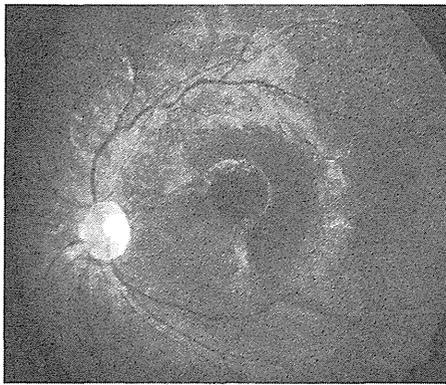


図4 腎外徴候である網膜色素変性症

る ilelet cell の異形成、心血管の欠損や形態異常、肝・胆管系障害など、様々な異常をきたし、乳児期に ESRD に至る<sup>5)</sup>。

思春期ネフロン病(NPH3)の責任遺伝子(NPHP3)は、3q21-22上に位置する<sup>6)</sup>。この遺伝子がコードする蛋白の機能についてはまだ十分には解明されていないが、diacylglycerol kinase-zeta や receptor-like tyrosin kinase などの尿細管上皮細胞上におけるシグナル伝達に参与する分子をコードすることが推察されており、その異常は、ほかのタイプと同様に尿細管の機能的・構造的崩壊をきたす。

#### 4 臨床組織学的所見

ネフロン病の尿細管基底膜における病理学的特徴は、特に皮髓境界部に主として遠位尿細管を起源とする直径数 mm から十数 mm 程度の小嚢胞が多数認められ、進行すると尿細管の萎縮、尿細管基底膜の肥厚や萎縮などがみられる(図3a)。さらに末期に至ると、腎間質や糸球体周囲の線維化、硬化糸球体が出現し、腎萎縮の状態に至る。また、本症では

尿細管基底膜の不均一化もみられる(図3b)。

本症の初期症状としては、多飲、多尿、尿最大濃縮能の低下、また二次性の遺尿や成長発育障害などがある。これらの症状は、4~6歳頃より出現する。主要な病態は、尿細管や集合管からのNaの喪失である。そのため、低ナトリウム血症、高カリウム血症が認められるが、著明な浮腫や血尿、蛋白尿などの腎症状は通常初期には認められず、血圧も正常である。腎機能障害が進行した段階で、はじめて尿量の減少とともに、Naの貯留や高血圧、貧血を呈する。したがって、低身長などの身体発育障害で受診する小児については、本症も念頭においた検査やフォローが必要である。また、原因不明の貧血の場合にも、本症を念頭におき精査する。また、本症には腎外症状を有する例もある。特に網膜色素変性症(図4)(Senior-Loken症候群)、眼球運動の失調(Cogan症候群)、小脳失調症、肝線維症、骨格や顔貌の異常なども発見のためのポイントとなる。

#### 5 診断と検査法

欧米では、本症が疑われる場合には、まず遺伝子診断が実施されるケースが多い。Salomonらによる診断のアルゴリズムを示す(図5)<sup>7)</sup>。まず、ESRDに至った年齢により、NPHP1もしくはNPHP2の診断から開始する。さらに、NPHP1に異常が認められない場合には、腎外徴候である網膜色素変性症や小脳失調症などの所見をもとに診断が進められる。しかしわが国では、ネフロン病に対する遺伝子診断は欧米のように浸透しておらず、統計学的データの大部分は臨床組織学的診断によりなされたものであると思われ、ネフロン病の疑いの域を出ない症例が大部分を占めているのが現状である。

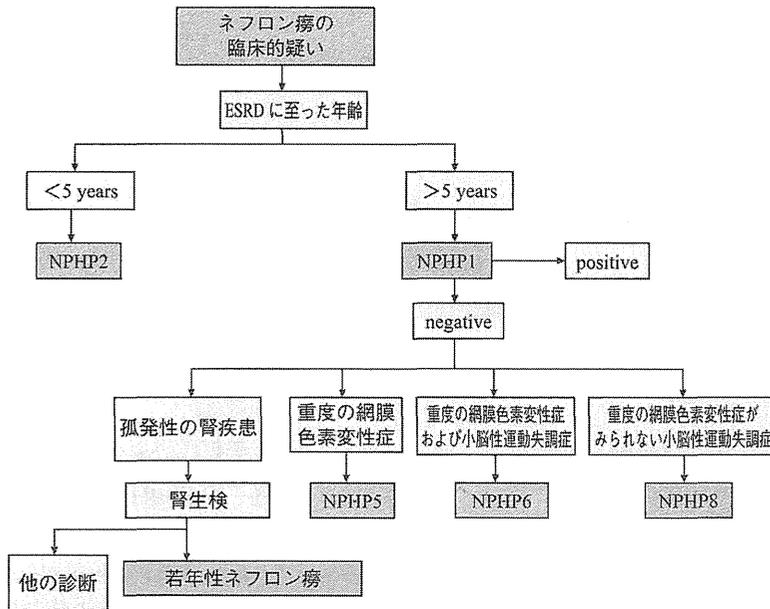


図5 ネフロン癆遺伝子診断のアルゴリズム  
(Salomon R, et al. : *Pediatr Nephrol* 24 : 2333-2344, 2009 より)

## 6 治療法

現時点では特別有効な治療法はなく、低ナトリウム血症や高カリウム血症あるいは代謝性アシドーシスに対する食事療法、イオン吸着樹脂、重炭酸塩の投与を行う。腎機能の低下が進行する場合には、ESRDに準じた治療が行われる。また、本症の出生前診断は現在のところ不可能であるため、家族に対する遺伝相談も重要である。本症の最大の問題点は、初期には蛋白尿が陰性で、かなり病態が進展してからでないと蛋白尿が検出されない点である。蛋白尿の主体は、 $\beta_2$ -ミクログロブリン(MG)や $\alpha_1$ -ミクログロブリン(MG)などの低分子蛋白尿であるため、アルブミンを中心に検出する通常の試験紙法では検出されにくい。このような理由から、学校検尿をはじめとするマスキング検査でも見逃される例が多い。すなわち、蛋白尿を検出したときには、すでにESRD状態ということも珍しくない。また、 $\beta_2$ -MGなどの低分子蛋白尿の検出も全例ではなく、しかもある程度病期が進展した状態になってからはじめて検出されるということもある。すなわち、早期発見のための明らかな手がかりが少ないのが現状である。しかし、この疾患の概念を知っているか否かで発見時期に差が生じる可能性がある。

## B 髓質嚢胞腎

MCKDは、皮質髓質移行部の嚢胞形成を示し、尿細管の萎縮、尿細管基底膜の肥厚や萎縮、腎間質や糸球体周囲の線維化などの出現がみられる点では、ネフロン癆と差はない。*UMOD*の異常が原因であるMCKD2では、平均30歳頃にESRDに至る。一方、MCKD1の発症にかかわる責任遺伝子はまだ同定されていないが、染色体1q21上にあることが推察されている。MCKD1では、60歳前後にEDRDに移行する。ESRDへの移行がゆるやかな経過を示すため、痛風以外の臨床症状をみることは少ないが、ネフロン癆と同様に、多飲、多尿、尿最大濃縮能の低下を示すこともある。

### 文献

- 1) Hildebrandt F, et al. : *J Am Soc Nephrol* 11 : 1753-1761, 2000
- 2) Tory K, et al. : *Kidney Int* 75 : 839-847, 2009
- 3) Otto EA, et al. : *J Am Soc Nephrol* 11 : 270-282, 2000
- 4) Donaldson JC, et al. : *J Biol Chem* 277 : 29028-29035, 2002
- 5) Otto EA, et al. : *Nature Genetics* 34 : 413-420, 2003
- 6) Omran H, et al. : *Am J Hum Genet* 66 : 118-127, 2000
- 7) Salomon R, et al. : *Pediatr Nephrol* 24 : 2333-2344, 2009

(竹村 司)

## ARTICLE

Received 2 Nov 2011 | Accepted 20 Feb 2012 | Published 3 Apr 2012

DOI: 10.1038/ncomms1756

# Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia

Kimiyoshi Ichida<sup>1,2,\*</sup>, Hiroataka Matsuo<sup>3,\*</sup>, Tappei Takada<sup>4,\*</sup>, Akiyoshi Nakayama<sup>3,5</sup>, Keizo Murakami<sup>4</sup>, Toru Shimizu<sup>6</sup>, Yoshihide Yamanashi<sup>4</sup>, Hiroshi Kasuga<sup>4</sup>, Hiroshi Nakashima<sup>7</sup>, Takahiro Nakamura<sup>8,9</sup>, Yuzo Takada<sup>10</sup>, Yusuke Kawamura<sup>3</sup>, Hiroki Inoue<sup>3</sup>, Chisa Okada<sup>3</sup>, Yoshitaka Utsumi<sup>3</sup>, Yuki Ikebuchi<sup>4</sup>, Kousei Ito<sup>4</sup>, Makiko Nakamura<sup>1</sup>, Yoshihiko Shinohara<sup>1</sup>, Makoto Hosoyamada<sup>11</sup>, Yutaka Sakurai<sup>7</sup>, Nariyoshi Shinomiya<sup>3</sup>, Tatsuo Hosoya<sup>2</sup> & Hiroshi Suzuki<sup>4</sup>

ABCG2, also known as BCRP, is a high-capacity urate exporter, the dysfunction of which raises gout/hyperuricemia risk. Generally, hyperuricemia has been classified into urate 'overproduction type' and/or 'underexcretion type' based solely on renal urate excretion, without considering an extra-renal pathway. Here we show that decreased extra-renal urate excretion caused by ABCG2 dysfunction is a common mechanism of hyperuricemia. Clinical parameters, including urinary urate excretion, are examined in 644 male outpatients with hyperuricemia. Paradoxically, ABCG2 export dysfunction significantly increases urinary urate excretion and risk ratio of urate overproduction. *Abcg2*-knockout mice show increased serum uric acid levels and renal urate excretion, and decreased intestinal urate excretion. Together with high ABCG2 expression in extra-renal tissues, our data suggest that the 'overproduction type' in the current concept of hyperuricemia be renamed 'renal overload type', which consists of two subtypes—'extra-renal urate underexcretion' and genuine 'urate overproduction'—providing a new concept valuable for the treatment of hyperuricemia and gout.

<sup>1</sup> Department of Pathophysiology, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan. <sup>2</sup> Division of Kidney and Hypertension, Department of Internal Medicine, Jikei University School of Medicine, 3-19-18 Shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8471, Japan. <sup>3</sup> Department of Integrative Physiology and Bio-Nano Medicine, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359-8513, Japan. <sup>4</sup> Department of Pharmacy, The University of Tokyo Hospital, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan. <sup>5</sup> Third Division, Aeromedical Laboratory, Japan Air Self-Defense Force, 2-3 Inariyama, Sayama, Saitama 350-1324, Japan. <sup>6</sup> Midorigaoka Hospital, 3-13-1 Makami-cho, Takatsuki, Osaka 569-1121, Japan. <sup>7</sup> Department of Preventive Medicine and Public Health, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359-8513, Japan. <sup>8</sup> Laboratory for Mathematics, Premedical Course, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359-8513, Japan. <sup>9</sup> Laboratory for Statistical Analysis, Center for Genomic Medicine, Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan. <sup>10</sup> Laboratory for Biofunctions, The Central Research Institute, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359-8513, Japan. <sup>11</sup> Department of Human Physiology and Pathology, Teikyo University School of Pharmaceutical Sciences, 2-11-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173-8605, Japan. \*These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to K. Ichida (ichida@toyaku.ac.jp).

Hyperuricemia induces gout and kidney stones and accelerates the progression of renal and cardiovascular diseases<sup>1,2</sup>. Unlike other mammals, hominoids, including humans, show high serum uric acid levels (SUAs), because uric acid (urate) is the end product in the purine metabolism owing to the lack of the urate-degrading enzyme uricase<sup>3</sup>. It is commonly accepted that two-thirds of the urate is excreted from the kidney into urine via the 'renal excretion' pathway, and the remaining third via the 'extra-renal excretion' pathway, such as gut excretion<sup>4,5</sup>. Hyperuricemia has been clinically classified into the urate 'overproduction' type, the 'underexcretion' type, and the 'combined' type. This classification is, however, based solely on the amount of renal urate excretion and urate clearance<sup>6–9</sup>, and extra-renal excretion, for example, via the gut excretion pathway, is not considered.

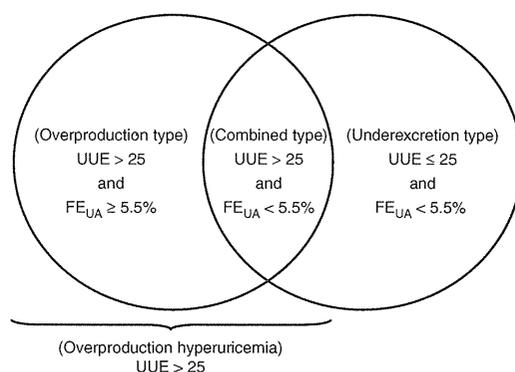
The kidney has been recognized as a main regulator of SUA and renal urate excretion is determined by the balance of the reabsorption and secretion of urate. Renal urate reabsorption is mainly mediated by two urate transporters; urate transporter 1 (URAT1, also known as SLC22A12)<sup>10</sup> and glucose transporter 9 (GLUT9, also known as SLC2A9 (refs 11–15)). Recent genome-wide association studies of SUA identified the involvement of several transporter genes including ATP-binding cassette transporter, sub-family G, member 2 (*ABCG2*, also known as *BCRP*)<sup>16–18</sup>. The *ABCG2* gene locates in a gout-susceptibility locus on chromosome 4q, which was previously demonstrated by a genome-wide linkage study of gout<sup>19</sup>. Woodward *et al.* and our group independently found that *ABCG2* transports urate and shows the reduced urate transport by a half-functional variant, Q141K (rs2231142)<sup>20,21</sup>. In addition, *ABCG2* has been identified as a high-capacity urate exporter that would mediate renal and/or extra-renal urate excretion<sup>21</sup>. We also showed that common dysfunctional genotype combinations of *ABCG2* gene (Q126X (rs72552713) and Q141K) are a major cause of gout<sup>21</sup>.

In this study, we investigated the relationship between *ABCG2* dysfunction and urate excretion in hyperuricemia patients and mouse model. We found that decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia, which has not been considered in the current pathophysiological concept of hyperuricemia.

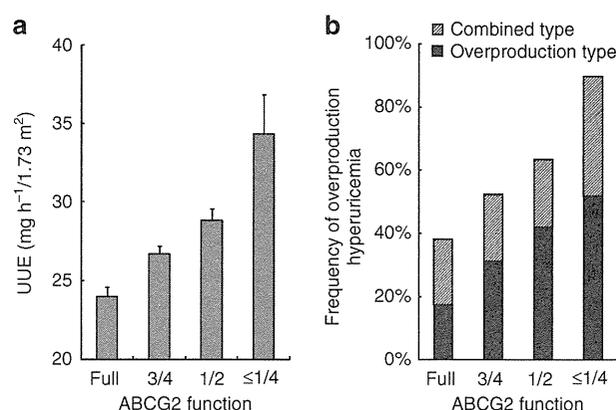
## Results

**Renal urate excretion in hyperuricemia patients.** We investigated the relationship between *ABCG2* dysfunction and renal urate excretion in hyperuricemia patients in this study. The characteristics and genotypes of the participants are summarized in Supplementary Tables S1 and S2, respectively. The patients' types of hyperuricemia were determined according to the classification of hyperuricemia (Fig. 1), which is based on the patient's urinary urate excretion (UUE) and fractional excretion of urate clearance (urate clearance/creatinine clearance ratio,  $FE_{UA}$ ). The risk allele frequency of Q126X (risk allele, X) and Q141K (risk allele, K), among 644 male outpatients with hyperuricemia including 575 gout cases, was 4.1 and 45.9%, respectively. Those who had Q126X and Q141K variants were 8.1 and 71.9%, respectively, of all patients (Supplementary Table S2). Subsequent haplotype frequency analysis revealed that the minor alleles of Q126X and Q141K were in different haplotypes (Supplementary Table S3), which indicated that these variants were independent risks, as reported previously<sup>21</sup>. Therefore, we could estimate urate export function of *ABCG2* by the combination of two common variants, non-functional Q126X and half-functional Q141K (Supplementary Fig. S1). Patients were then divided into four groups by genetically estimated *ABCG2* function<sup>21</sup>; that is, full function, 3/4 function (mild dysfunction), 1/2 function (moderate dysfunction) and  $\leq 1/4$  function (severe dysfunction) (Supplementary Table S4). Altogether, 75.6% of all patients had *ABCG2* dysfunction.

Figure 2a shows the association between *ABCG2* function and UUE. Contrary to the general understanding that *ABCG2*



**Figure 1 | Current classification of hyperuricemia.** Classification of hyperuricemia is based on UUE and fractional excretion of urate ( $FE_{UA}$ ). In this study, patients were classified as overproduction hyperuricemia, when their UUE was over  $25.0 \text{ mg h}^{-1}/1.73 \text{ m}^2$  ( $600 \text{ mg per day}/1.73 \text{ m}^2$ ). Those who had  $FE_{UA}$  under 5.5% were classified as underexcretion hyperuricemia. Combined type was classified when their UUE and  $FE_{UA}$  met the criteria of both overproduction and underexcretion hyperuricemia. Patients who met the single criterion of overproduction hyperuricemia, excluding combined type, were defined as overproduction type. In addition to the types shown in this figure, there is a 'normal type' whose UUE is  $\leq 25 \text{ mg h}^{-1}/1.73 \text{ m}^2$  and  $FE_{UA}$  is  $\geq 5.5\%$ . UUE unit,  $\text{mg h}^{-1}/1.73 \text{ m}^2$ .



**Figure 2 | Increase of UUE and the frequency of overproduction hyperuricemia by *ABCG2* dysfunction.** (a) UUE according to each *ABCG2* function ( $n = 644$ ). Patients with hyperuricemia were divided into four groups by their estimated *ABCG2* functions, that is, full function, 3/4 function, 1/2 function and  $\leq 1/4$  function. UUE showed an inverse association with *ABCG2* functions ( $P = 3.60 \times 10^{-10}$  by simple linear regression analysis). All bars show mean  $\pm$  s.e.m. (b) Frequency of 'overproduction' hyperuricemia according to each *ABCG2* function. 'Overproduction' hyperuricemia consists of overproduction type and combined type.

dysfunction leads to decreased renal urate excretion, UUE is significantly increased by *ABCG2* dysfunction ( $P = 3.60 \times 10^{-10}$ ). Whereas the mean UUE level of patients with full *ABCG2* function was  $24.0 \text{ mg h}^{-1}/1.73 \text{ m}^2$ , that of patients with severe dysfunction ( $\leq 1/4$  function) was  $34.3 \text{ mg h}^{-1}/1.73 \text{ m}^2$ , showing an increase of 42.9%. The frequency of 'overproduction' hyperuricemia ( $\text{UUE} > 25 \text{ mg h}^{-1}/1.73 \text{ m}^2$ ), which consists of overproduction type and combined type (Fig. 1), is also increased by *ABCG2* dysfunction; the ratio of 'overproduction' hyperuricemia was 38.2% in patients with full function, and reached 89.7% in those with severe dysfunction (Fig. 2b). Severe *ABCG2* dysfunction especially raised

**Table 1 | Relationship between overproduction hyperuricemia and ABCG2 dysfunction.**

Estimated transport activity	Genotype		N		Frequency of OP hyperuricemia	RR	95% CI	P	Adjusted RR†	Adjusted 95% CI†	Adjusted P†
	Q126X (rs72552713)	Q141K (rs2231142)	OP hyperuricemia*	Non-OP hyperuricemia*							
≤1/4 Function	X/X	Q/Q	26	3	0.897	2.35	1.86–2.97	3.32×10 <sup>-7</sup>	2.30	1.31–3.90	2.65×10 <sup>-3</sup>
1/2 Function	Q/X	Q/Q	96	55	0.636	1.66	1.32–2.10	8.58×10 <sup>-6</sup>	1.79	1.25–2.59	1.55×10 <sup>-3</sup>
3/4 Function	Q/Q	K/K	160	147	0.521	1.36	1.09–1.71	4.55×10 <sup>-3</sup>	1.42	1.03–2.00	0.035
Full function	Q/Q	Q/Q	60	97	0.382	1.00					

Abbreviations: CI, confidence interval; OP, overproduction; RR, risk ratio.  
\*Patients were classified as OP hyperuricemia (OP type and combined type) when their UUE was over 25.0 mg h<sup>-1</sup>/1.73 m<sup>2</sup> (600 mg per day/1.73 m<sup>2</sup>). UUE was normalized for a body surface area of 1.73 m<sup>2</sup>. Other patients were classified as non-OP hyperuricemia.  
†Using Poisson regression analysis, RR, 95% CI, and P value are adjusted with covariates of body mass index, alcohol intake, and single nucleotide polymorphisms of urate-related genes (rs06338 in URAT1, rs11722228 in GLUT9 and rs12129861 in PDZK1).

the risk of ‘overproduction’ hyperuricemia, conferring a risk ratio (RR) of 2.35 (95% CI 1.86–2.97;  $P=3.32\times 10^{-7}$ ) (Table 1). In addition, moderate and mild dysfunction also significantly increased the risk of ‘overproduction’ hyperuricemia, conferring an RR of 1.66 (95% CI 1.32–2.10;  $P=8.58\times 10^{-6}$ ) and 1.36 (95% CI 1.09–1.71;  $P=4.55\times 10^{-3}$ ), respectively. Risk of overproduction hyperuricemia was still significant after adjustment (Table 1). These results clearly demonstrate that ABCG2 dysfunction increases UUE, thereby leading to increased frequency of ‘overproduction’ hyperuricemia. This seems paradoxical in light of the current concept of hyperuricemia, but it would be understandable if extra-renal excretion via ABCG2 has a physiologically significant role in urate regulation.

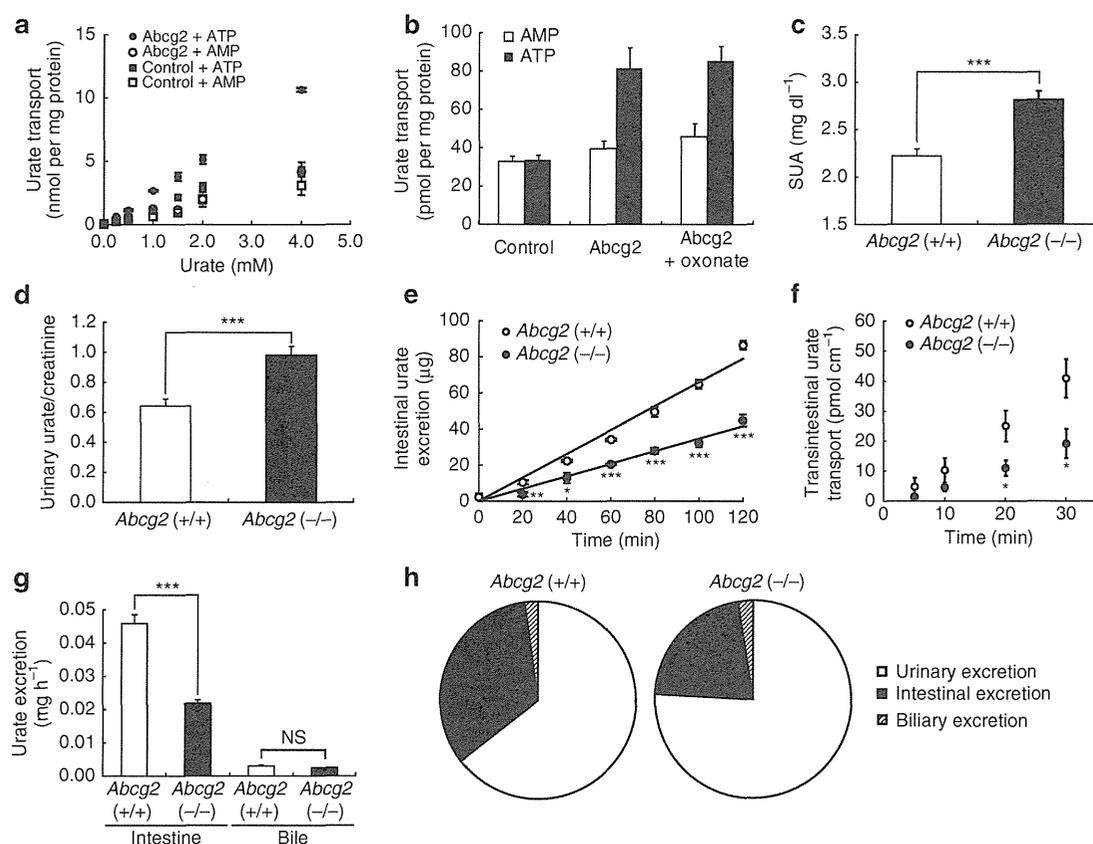
**Abcg2 dysfunction and urate excretion in mice.** Next, we investigated how ABCG2 dysfunction affected the urate excretion pathways and re-evaluated the current concept of hyperuricemia based on ABCG2 dysfunction. The evaluation of gut urate excretion in humans is intrinsically difficult because urate excreted into the intestinal lumen is rapidly metabolized by bacterial flora. To solve this problem, we introduced an animal model in which urate excretion through the gut is easily achievable by invasive sampling. Also, *Abcg2*-knockout mice were treated with oxonate, a uricase inhibitor, so that the urate metabolism of this model mimicked that of humans that lacks the urate degrading enzyme, uricase<sup>22</sup>. First, mouse *Abcg2* is revealed to mediate urate transport (Fig. 3a) using the membrane vesicle system prepared from HEK293 cells that express mouse *Abcg2*. The export process by mouse *Abcg2* was ATP-dependent and not saturable under the physiological concentration of urate (Fig. 3a), indicating high-capacity urate transport activity by *Abcg2*. Another functional analysis demonstrated that oxonate has no hazardous effect on the *Abcg2*-mediated urate transport (Fig. 3b). We then tried to characterize the excretion of urate into urine, bile and intestinal lumen using the *in vivo* mouse model. As shown in Fig. 3c, SUA of *Abcg2*-knockout mice was significantly higher than that of control mice ( $P=8.8\times 10^{-6}$ ), which is consistent with the increase of SUA in humans with ABCG2 dysfunction<sup>21</sup>. Under this condition, the urinary urate/creatinine ratio was significantly increased in *Abcg2*-knockout mice ( $P=4.1\times 10^{-4}$ ) (Fig. 3d), which also corroborates the observation in humans (Fig. 2a). On the other hand, the urate excretion from the intestine was significantly lower in *Abcg2*-knockout mice (Fig. 3e), which is supported by the

similar results of the transintestinal urate transport experiment (Fig. 3f; Supplementary Fig. S2). Calculated velocity of the intestinal urate excretion in *Abcg2*-knockout mice was less than a half of that in control mice ( $P=3.6\times 10^{-4}$ ) (Fig. 3g), whereas biliary urate excretion showed no significant difference regardless of *Abcg2* genotype (Fig. 3g). From these results, we estimated the relative contribution of each pathway to the total urate excretion; in wild-type mice, the UUE pathway contributes approximately two-thirds, and the intestinal excretion pathway contributes one-third of the total urate excretion, whereas the urate excretion into bile is 2.2% of the total urate excretion (Fig. 3h). The ratio of each urate excretion pathway is consistent with the previous literature about the estimation of urate excretion pathways in humans<sup>4,5</sup>. As a result of decreased intestinal excretion, the urate excretion in *Abcg2*-knockout mice was much more dependent on the urinary excretion pathway (Fig. 3h). Furthermore, the small contribution of biliary urate excretion in mice (Fig. 3h) is also consistent with a report of human urate excretion, which shows that biliary urate excretion consists of less than 5 percent of the total urate excretion<sup>23</sup>. Taken together, ABCG2 is suggested to have an important role in extra-renal urate excretion, especially in intestinal urate excretion. Accordingly, increased SUA in patients with ABCG2 dysfunction can be explained by the decreased excretion of urate from the intestine.

## Discussion

We found that the decrease in urate exporter ABCG2 function in hyperuricemic patients is associated with the increase of UUE and frequency of overproduction hyperuricemia, which consists of the overproduction type and the combined type. Also, any ABCG2 dysfunction caused by common dysfunctional variants significantly raised the risk of overproduction hyperuricemia. *Abcg2*-knockout mice treated with oxonate showed increased renal urate excretion as well as SUA and decreased intestinal urate excretion, compared with those of wild-type mice. These findings indicate that the decrease in extra-renal urate excretion via dysfunctional ABCG2 is a common mechanism of hyperuricemia, which has been currently mistaken for urate ‘overproduction’ due to increased UUE.

Three main transporters have been confirmed to regulate SUA in humans; a secretion transporter ABCG2 and two urate reabsorption transporters, URAT1 (ref. 10) and GLUT9 (refs 14,15). In addition, urate transporters including ABCG2 and URAT1 are regulated



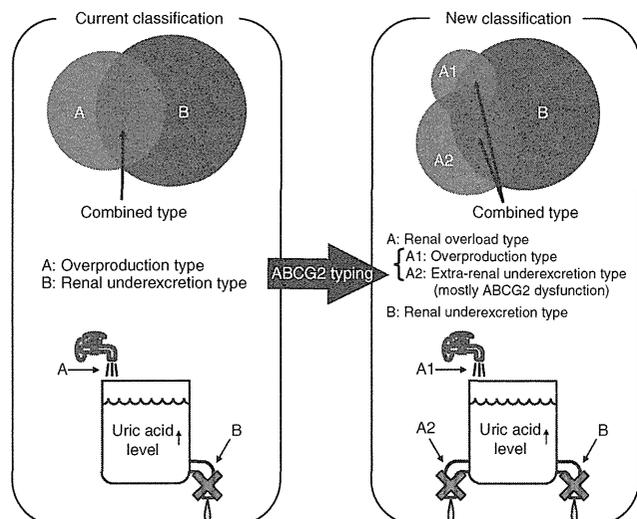
**Figure 3 | Urate excretion via Abcg2 in a mouse model.** (a) Concentration-dependent urate transport via Abcg2 ( $n=3$ ). (b) Effect of oxonate on Abcg2-mediated urate transport ( $n=3$ ). (c–e, g, h) *In vivo* study using Abcg2-knockout and wild-type mice. (c) Serum uric acid (SUA) levels ( $n=19-20$ ).  $***P=8.8\times 10^{-6}$ . (d) Urinary excretion of urate ( $n=10-11$ ).  $***P=4.1\times 10^{-4}$  (e) Time course of intestinal urate excretion ( $n=4$ ).  $***P<0.001$ ;  $**P=0.0066$ ;  $*P=0.021$ . (f) Transintestinal urate transport ( $n=3-4$ ).  $*P=0.037$  and  $0.034$  for 20 min and 30 min, respectively. (g) Urate excretion in intestine and bile ( $n=3-4$ ).  $***P=3.6\times 10^{-4}$ . All bars show means  $\pm$  s.e.m.  $P$  values were obtained by Student's  $t$ -test. NS, not significant. (h) Relative contribution of urinary, intestinal and biliary urate excretion pathways.

by an adaptor protein, the PDZ domain containing-protein, PDZK1 (refs 24,25). Among these urate-related genes, dysfunctional variants of ABCG2 are demonstrated as a major cause of gout and hyperuricemia<sup>20,21</sup>. ABCG2 is expressed on the apical membrane of several tissues including kidney<sup>26</sup>, liver and intestine<sup>27</sup>. As ABCG2 is supposed to mediate renal urate excretion<sup>20</sup>, the dysfunction of this molecule is expected to decrease UUE. The results in this study, however, show an opposite conclusion that the dysfunction of ABCG2 results in an increase of UUE. This contradiction can be explained by two facts: kidney is not the only organ in which ABCG2 is expressed<sup>27,28</sup>, and one-third of urate excretion in humans depends on the extra-renal pathway such as gut excretion<sup>4,5,8</sup>. Also, together with little intestinal expression of URAT1 (ref. 10), our data from an animal model indicate that the decreased expression of Urat1 in the kidney could partially account for the increased urate in urine in Abcg2-knockout mice (Fig. 3d, Supplementary Fig. S3). Therefore, it is reasonable that common dysfunction of ABCG2 can cause a decrease of urate excretion via the extra-renal pathway rather than the renal pathway.

The current classification of hyperuricemia is based on the understanding of its mechanism by which hyperuricemia results from either overproduction of urate due to a metabolism disorder, underexcretion by abnormal renal urate transport activity, or the combination of the two. So far 'renal urate underexcretion' has been widely considered to be a main cause of hyperuricemia, and 'urate overproduction' is recognized as another common cause. A part

of hyperuricemia is definitely attributable to lifestyle factors such as consumption of an excessive amount of alcohol as well as high-calorie diet intake. However, even taking such factors into account, most causes of 'overproduction' hyperuricemia still cannot be explained. Many attempts have been made to elucidate the pathogenesis of 'overproduction' hyperuricemia. Nevertheless, no study has succeeded in identifying the exact mechanism of urate overproduction except some urate metabolism disorders<sup>29</sup> including Lesch-Nyhan syndrome (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase deficiency), accelerated purine nucleotide degradation and accelerated ATP breakdown. Our findings indicate that a major cause of 'overproduction' hyperuricemia is not true overproduction of urate but rather 'extra-renal urate underexcretion' by common ABCG2 dysfunction. We also suggest that re-classification of hyperuricemia is necessary because 'overproduction' hyperuricemia in the current classification is only defined by the result of UUE value and does not represent a correct pathophysiological condition. Therefore, our data lend support to the idea that 'overproduction type' in the current classification of hyperuricemia should be renamed 'renal overload type', which includes subtypes of 'extra-renal underexcretion' and genuine 'overproduction' (Fig. 4).

In this study, we suggest a common mechanism of hyperuricemia by decreased extra-renal excretion due to ABCG2 dysfunction. Therefore, ABCG2 could be a promising target for urate-lowering medications without adverse effects such as urolithiasis. Our findings and proposal would serve to correct the long-misunderstood



**Figure 4 | Pathophysiological model and proposed new classification of hyperuricemia.** Hyperuricemia is currently classified into urate ‘overproduction type’ (A), ‘renal underexcretion type’ (B), and combined type. Taking extra-renal urate excretion into account, we propose a testable model by which ‘overproduction type’ be renamed ‘renal overload type’ (A), consisting of two subtypes, genuine ‘overproduction’ (A1) and ‘extra-renal underexcretion’ (A2).

pathophysiology of hyperuricemia. This new concept will help pinpoint the causes of hyperuricemia more accurately and provide a more effective therapeutic strategy for hyperuricemia and gout, leading to a good model of personalized medicine for common diseases.

## Methods

**Study participants.** This study was approved by the institutional ethical committees, and all procedures involved in this study were performed in accordance with the Declaration of Helsinki. Hyperuricemia patients were diagnosed when their SUAs were higher than  $7.0 \text{ mg dl}^{-1}$ , and gout cases were also clinically diagnosed as primary gout according to the criteria established by the American College of Rheumatology<sup>30</sup>. All hyperuricemic subjects and primary gouty patients were eligible, when written consent was obtained at the gout clinics of either Jikei University Hospital (Tokyo, Japan) or Midorigaoka Hospital (Osaka, Japan). The following patients were excluded; patients without information on clinical parameters shown in Supplementary Table S1, or those with inherited metabolism disorders including Lesch–Nyhan syndrome. Finally, 644 male outpatients, including 575 gout cases, were registered as valid participants.

**Clinical parameters for urate handling.** Clinical parameters including SUA, amount of UUE and fractional excretion of urate clearance (urate clearance/creatinine clearance ratio,  $FE_{UA}$ ) were measured for each patient after diet education, concerning low-purine and calorie-controlled diet, as well as less fructose and alcohol intake<sup>31,32</sup>. Clinical parameters before taking medications for hyperuricemia were used in this study. Both UUE and  $FE_{UA}$  were calculated after a few-hour urine collection. UUE was normalized for a body surface area of  $1.73 \text{ m}^2$ . In this study, patients were classified as overproduction hyperuricemia when their UUE was over  $25.0 \text{ mg h}^{-1}/1.73 \text{ m}^2$  ( $600 \text{ mg day}^{-1}/1.73 \text{ m}^2$ )<sup>7,8,33</sup>. Those who had  $FE_{UA}$  under 5.5% were classified as underexcretion hyperuricemia<sup>34</sup> on the basis of the normal  $FE_{UA}$  range (5.5–11.1%)<sup>35</sup>. Combined type was classified when their UUE and  $FE_{UA}$  met the criteria of both overproduction and underexcretion hyperuricemia (Fig. 1). Patients who met the single criterion of overproduction hyperuricemia, excluding combined type, were defined as overproduction type.

**Genetic analysis.** Genomic DNA was extracted from whole peripheral blood cells<sup>36</sup>. Genotyping was performed by high-resolution melting analysis with a LightCycler 480 (Roche Diagnostics)<sup>21</sup>, or by an allelic discrimination assay (Custom Taqman MGB, Applied Biosystems) with a 7700 detector (Applied Biosystems)<sup>37</sup>. To confirm their genotypes, more than 100 samples were subjected to direct sequencing with primers shown in Supplementary Table S5. DNA sequencing analysis was performed with a 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)<sup>21</sup>. The export function of ABCG2 was then estimated from the

combinations of ABCG2 variants, rs72552713 (Q126X) and rs2231142 (Q141K), and divided into four functional groups<sup>21</sup>; that is, full function, 3/4 function (mild dysfunction), 1/2 function (moderate dysfunction) and  $\leq 1/4$  function (severe dysfunction).

**Experimental assessment for urate excretion pathways.** Mouse *Abcg2* complementary DNA (GenBank accession number NM\_011920) was inserted into the *Not I* site of pcDNA3.1(+) vector plasmid (Invitrogen), with a myc-tag sequence attached at the 5′-end. The wild-type human ABCG2 cDNA (GenBank accession number NM\_004827) or mutated (Q126X and Q141K) ABCG2 cDNA was inserted into the *Nhe I* and *Apa I* sites of pcDNA3.1(+) vector plasmid, with a myc-tag sequence attached at the 5′-end<sup>21</sup>. To prepare membrane vesicles, HEK293 cells were transiently transfected with the expression vector for *Abcg2*/ABCG2 or empty vector (control) by FuGENE6 (Roche Diagnostics), according to the manufacturer’s instructions. Forty-eight hours later, cells were collected and the membrane vesicles were isolated by a standard method with repeated centrifugation and homogenization<sup>38</sup>. After the expression of *Abcg2* protein was confirmed by western blot analysis, the uptake studies of [<sup>14</sup>C]urate (28  $\mu\text{M}$ , American Radiolabeled Chemicals) were performed by a standard protocol for transport assays with membrane vesicles<sup>39</sup>. All other chemicals used in this study were commercially available and of reagent-grade.

Male *Abcg2*-knockout mice (FVB.129P2-*Abcg2*, Taconic) and control FVB mice of 27–33 g were fed 2.0% (w/w) potassium oxonate for more than 1 week, as reported earlier<sup>40</sup>. Concentrations of urate and creatinine in collected serum and urine samples were determined by QuantiChrom Uric Acid Assay Kit (Bioassay systems) and Creatinine Assay Kit (Cayman Chemical Company). To analyze the intestinal urate excretion, mice fasted overnight were anaesthetized by intraperitoneal injection of urethane and cannulated with polyethylene tubing (Hibiki Size 8) (Kunii Co.) at the upper duodenum and the middle jejunum to make an intestinal loop at the upper half of the intestine. After the intestinal contents were removed by the slow infusion of saline and air, the efflux buffer (saline containing 0.3 mM potassium oxonate) was introduced into the intestinal loop, and both ends of the loop were closed with syringes. After the indicated periods, the efflux buffer in the loop was collected by syringes and urate concentrations were quantified. Intestinal urate excretion was calculated from the following equation:

$$\begin{aligned} [\text{Intestinal urate excretion}] = & [\text{Urate concentration in the intestinal loop}] \\ & \times [\text{Volume of efflux buffer in the intestinal loop}] \\ & \times [\text{Length of the whole small intestine}] \\ & / [\text{Length of the intestinal loop}] \end{aligned}$$

To investigate the biliary urate excretion, mice were anaesthetized by intraperitoneal injection of urethane, the cystic duct was ligated and a common bile duct fistula was created using a Teflon catheter (UT-03) (Unique Medical). Urate in the hepatic bile specimens collected for 3 h was examined. Relative contribution of urinary, intestinal and biliary excretion pathways was estimated by the comparison of the calculated velocity of each pathway, for which the amount of daily urine is assumed to be 2 millilitres. Protocols were performed according to accepted criteria for humane care of experimental animals and approved by the review board of our institution for animal studies.

**Western blot analysis.** For western blot analysis, 5  $\mu\text{g}$  of membrane vesicles diluted with 2 $\times$ SDS loading buffer was separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis plate with a 3.75% stacking gel. Proteins were transferred electrophoretically onto an Immobilon membrane (Millipore) using a blotter (Bio-Rad Laboratories) at 15 V for 1 h. The membrane was blocked with Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBS-T) and 3% bovine serum albumin (BSA) for 1 h at room temperature. After washing with TBS-T, the membrane was incubated for 1 h at room temperature in TBS-T containing 0.1% BSA and anti-ABCG2/BCRP antibody (BXP-53, Abcam) (1:500, 0.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) for the detection of ABCG2, or anti- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$  antibody (Santa Cruz Biotechnology) (1:200, 1.0  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) as a loading control of membrane proteins. For detection, the membrane was allowed to bind to a horseradish peroxidase-labelled secondary antibody (GE Healthcare) diluted 5,000-fold in TBS-T containing 0.1% BSA for 1 h at room temperature. The enzyme activity was assessed using an ECL Prime Western Blotting Detection System (GE Healthcare) with a luminescent image analyzer (Bio-Rad).

**Transintestinal urate transport experiment.** To demonstrate the intestinal transport of urate, the upper third of mice intestine specimens was collected and enteral contents were carefully removed. Next, both ends of the specimens were connected with syringes and the luminal sides were filled with 5 ml of Ringer Buffer (93.4 mM NaCl, 6.2 mM KCl, 2.0 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.5 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.4, 37 °C). Then, the specimens were incubated with [<sup>14</sup>C]urate (0.4  $\mu\text{M}$ )-containing Ringer Buffer (pH 7.4, 37 °C), pre-bubbled with mixed gas (95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$ ) for 30 min. After incubation with indicated periods, 200  $\mu\text{l}$  of luminal buffer was sampled followed by the addition of the same aliquot of the buffer. Syringes

were slowly pumped every 2.5 min to thoroughly mix the luminal buffer (Supplementary Fig. S2).

**Quantitative real-time PCR.** To determine messenger RNA levels of genes involved in urate transport, mice kidney specimens were homogenized in RNA iso plus (Takara) and extracted RNA was reverse-transcribed with ReverTra Ace (Toyobo). Quantitative real-time PCR was performed using 2× SYBR GREEN (Stratagene) and Chromo4 (BIO-RAD) at 95 °C 10 min followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s, 50 °C for 30 s, and 72 °C for 40 s. We used primers for *Abcg2* (sense and antisense primers were 5'-aagcatagggatggagctga-3' and 5'-ctgtgcttgagtc caaacca-3', respectively), *Urat1* (sense and antisense primers were 5'-atcatctcatgtgctg-3' and 5'-aagtcacaatcccgatgag-3', respectively), *Glut9* (sense and antisense primers were 5'-cggcctggctcacaactcgccg-3' and 5'-ggcgaagacgaggaagcagct-3', respectively), *Pdzk1* (sense and antisense primers were 5'-atataatgcctcaggcgtg-3' and 5'-atggctggcgttctctacat-3', respectively) and  $\beta$ -*actin* (sense and antisense primers were 5'-ccggaagaaaactgacagc-3' and 5'-gtgtgggtgaagctgtgacc-3', respectively).

**Statistical analysis.** Haplotype estimation was performed with the EM algorithm<sup>41</sup>. To investigate the association of ABCG2 functions and UUE, simple linear regression analysis was performed with UUE as a dependent variable and estimated function of ABCG2 as an independent variable. To evaluate the relationship between ABCG2 function and overproduction hyperuricemia, the risk ratio (RR) and its 95% CI were calculated by dividing the proportion of overproduction hyperuricemia in each function category by that in full function category. Poisson regression analysis was performed to obtain adjusted RR of ABCG2 dysfunction for overproduction hyperuricemia with possible confounding factors, such as body mass index, alcohol intake, single nucleotide polymorphisms of urate-related genes, rs11722228 (*GLUT9/SLC2A9*)<sup>18</sup>, rs506338 (*URAT1/SLC22A12*)<sup>18</sup>, and rs12129861 (*PDZK1*)<sup>17</sup>. For all calculations in the statistical analysis, software R (version 2.8.1) (<http://www.r-project.org/>) and SPSS (version 16.0J for Windows) (SPSS) were used.

## References

- Feig, D. I., Kang, D. H. & Johnson, R. J. Uric acid and cardiovascular risk. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1811–1821 (2008).
- Edwards, N. L. The role of hyperuricemia in vascular disorders. *Curr. Opin. Rheumatol.* **21**, 132–137 (2009).
- Yeldandi, A. V. *et al.* Human urate oxidase gene: cloning and partial sequence analysis reveal a stop codon within the fifth exon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 641–646 (1990).
- Sorensen, L. B. Role of the intestinal tract in the elimination of uric acid. *Arthritis Rheum.* **8**, 694–706 (1965).
- Sica, D. A. & Schoolwerth, A. in *Brenner and Rector's The Kidney* (ed. B.M. Brenner) 645–649 (Saunders, 2004).
- Boss, G. R. & Seegmiller, J. E. Hyperuricemia and gout. Classification, complications and management. *N. Engl. J. Med.* **300**, 1459–1468 (1979).
- Becker, M. A. in *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease* (eds Charles R. Scriver, Barton Childs, Kenneth W. Kinzler, & Bert Vogelstein) 2513–2535 (McGraw-Hill, 2001).
- Wortmann, R. L. in *Harrison's Principles of Internal Medicine* (eds Anthony S. Fauci *et al.*) 2444–2449 (McGraw-Hill, 2008).
- Ichida, K., Hosoyamada, M., Hosoya, T. & Endou, H. in *Genetic Diseases of the Kidney* (ed. Richard P. Lifton) 653–662 (Academic Press, 2009).
- Enomoto, A. *et al.* Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* **417**, 447–452 (2002).
- Li, S. *et al.* The GLUT9 gene is associated with serum uric acid levels in Sardinia and Chianti cohorts. *PLoS Genet.* **3**, e194 (2007).
- Döring, A. *et al.* SLC2A9 influences uric acid concentrations with pronounced sex-specific effects. *Nat. Genet.* **40**, 430–436 (2008).
- 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).
- 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).
- Matsuo, H. *et al.* Mutations in glucose transporter 9 gene SLC2A9 cause renal hypouricemia. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 744–751 (2008).
- Dehghan, A. *et al.* Association of three genetic loci with uric acid concentration and risk of gout: a genome-wide association study. *Lancet* **372**, 1953–1961 (2008).
- Kolz, M. *et al.* Meta-analysis of 28,141 individuals identifies common variants within five new loci that influence uric acid concentrations. *PLoS Genet.* **5**, e1000504 (2009).
- Kamatani, Y. *et al.* Genome-wide association study of hematological and biochemical traits in a Japanese population. *Nat. Genet.* **42**, 210–215 (2010).
- Cheng, L. S. *et al.* Genomewide scan for gout in Taiwanese aborigines reveals linkage to chromosome 4q25. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 498–503 (2004).
- Woodward, O. M. *et al.* Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 10338–10342 (2009).
- Matsuo, H. *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.* **1**, 5ra11 (2009).
- Fridovich, I. The competitive inhibition of uricase by oxonate and by related derivatives of s-triazines. *J. Biol. Chem.* **240**, 2491–2494 (1965).
- Sorensen, L. B. & Levinson, D. J. Origin and extrarenal elimination of uric acid in man. *Nephron* **14**, 7–20 (1975).
- Shimizu, T. *et al.* PDZK1 regulates breast cancer resistance protein in small intestine. *Drug Metab. Dispos.* **39**, 2148–2154 (2011).
- Anzai, N. *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.* **279**, 45942–45950 (2004).
- Huls, M. *et al.* The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane. *Kidney Int.* **73**, 220–225 (2008).
- Maliepaard, M. *et al.* Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* **61**, 3458–3464 (2001).
- Doyle, L. A. & Ross, D. D. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* **22**, 7340–7358 (2003).
- Zaka, R. & Williams, C. J. New developments in the epidemiology and genetics of gout. *Curr. Rheumatol. Rep.* **8**, 215–223 (2006).
- Wallace, S. L. *et al.* Preliminary criteria for the classification of the acute arthritis of primary gout. *Arthritis Rheum.* **20**, 895–900 (1977).
- Puig, J. G. & Mateos, F. A. Clinical and biochemical aspects of uric acid overproduction. *Pharm. World Sci.* **16**, 40–54 (1994).
- Perez-Ruiz, F., Calabozo, M., Erauskin, G. G., Ruibal, A. & Herrero-Beites, A. M. Renal underexcretion of uric acid is present in patients with apparent high urinary uric acid output. *Arthritis Rheum.* **47**, 610–613 (2002).
- Wortmann, R. L. Gout and hyperuricemia. *Curr. Opin. Rheumatol.* **14**, 281–286 (2002).
- Urano, W. *et al.* Sodium-dependent phosphate cotransporter type 1 sequence polymorphisms in male patients with gout. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 1232–1234 (2010).
- The guideline revising committee of Japanese Society of Gout and Nucleic Acid Metabolism in *Guideline for the Management of Hyperuricemia and Gout* (ed. The guideline revising committee of Japanese Society of Gout and Nucleic Acid Metabolism) 60–72 (Medical Review, 2010).
- 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).
- Daimon, M. *et al.* Large-scale search of SNPs for type 2 DM susceptibility genes in a Japanese population. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**, 751–758 (2003).
- Hayashi, H., Takada, T., Suzuki, H., Akita, H. & Sugiyama, Y. Two common PFIC2 mutations are associated with the impaired membrane trafficking of BSEP/ABCB11. *Hepatology* **41**, 916–924 (2005).
- Takada, T., Weiss, H. M., Kretz, O., Gross, G. & Sugiyama, Y. Hepatic transport of PKI166, an epidermal growth factor receptor kinase inhibitor of the pyrrolopyrimidine class, and its main metabolite, ACU154. *Drug Metab. Dispos.* **32**, 1272–1278 (2004).
- Hall, I. H., Scoville, J. P., Reynolds, D. J., Simlot, R. & Duncan, P. Substituted cyclic imides as potential anti-gout agents. *Life Sci.* **46**, 1923–1927 (1990).
- Kitamura, Y. *et al.* Determination of probability distribution of diplotype configuration (diplotype distribution) for each subject from genotypic data using the EM algorithm. *Ann. Hum. Genet.* **66**, 183–193 (2002).

## Acknowledgements

We express our gratitude to all the patients involved in this study. We thank T. Tamatsukuri, N. Katsuta and S. Terashige for genetic analysis; H. Fujiwara for patient analysis; and M. Yamashiro, K. Takahashi, T. Itoh, Y. Kobayashi and J. Fukuda for helpful discussion. This study was supported by grants from the Japan Society for the Promotion of Science, Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan including Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas HD-physiology (22136015), the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, the Ministry of Defense of Japan, the Kawano Masanori Memorial Foundation for Promotion of Pediatrics, Takeda Science Foundation, and the Gout Research Foundation of Japan.

## Author contributions

K. Ichida, H.M., T.T., M.H., N.S., T.H. and H.S. designed the experiment. K. Ichida, H.M., A.N., Y.T., Y.K., C.O., Y.U., M.N., Y. Shinohara and N.S. carried out genetic analysis. K. Ichida, H.M., A.N., T.S., H.I. and T.H. collected samples of patients and performed patient analysis. T.T., K.M., Y.Y., H.K., Y.I., K. Ito and H.S. performed experimental analysis. H.N., T.N. and Y.S. performed statistical analysis. K. Ichida, H.M., T.T., A.N. and N.S. wrote the paper. K. Ichida, H.M. and T.T. contributed equally to this work.

**Additional information**

**Supplementary Information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

**Competing financial interests:** K. Ichida, H.M., T.T., T.N., N.S., and H.S. have a patent pending based on the work reported in this paper (WO 2010/150525 A1, title: Urate transporter, as well as method and kit for evaluating urate transport-related disease factor and inflammation-related disease factor, and test sample and drug). Other authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

**How to cite this article:** Ichida, K. *et al.* Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia. *Nat. Commun.* 3:764 doi: 10.1038/ncomms1756 (2012).

**License:** This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-Share Alike 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>

特集 新たな創薬ターゲットとしてのトランスポーター：  
明らかになるその構造と新機能

# 尿酸動態の支配要因としての尿酸トランスポーター

Urate Transporters as a Regulatory Factor for Urate Handling

松尾洋孝, 市田公美, 高田龍平, 中山昌喜, 四ノ宮成祥

Hiroataka Matsuo, Kimiyoshi Ichida, Tappei Takada, Akiyoshi Nakayama, Nariyoshi Shinomiya

生理学的に重要なヒトの尿酸トランスポーターとしては、腎臓における尿酸再吸収を司るURAT1とGLUT9のほか、腎臓や腸管における尿酸排泄を司るABCG2が知られている。尿酸再吸収トランスポーター遺伝子URAT1とGLUT9は、それぞれ腎性低尿酸血症1型と2型の原因遺伝子であり、かつ痛風・高尿酸血症の有望な治療標的分子である。一方、尿酸排泄トランスポーター遺伝子ABCG2は痛風・高尿酸血症の主要病因遺伝子である。最近になって、ABCG2の機能不全による腸管を含む腎外尿酸排泄低下が高尿酸血症の主要な機序の1つであることがわかり、これまでの定説を覆す新たな高尿酸血症の病型概念が提唱されている。



尿酸トランスポーター, 痛風・高尿酸血症, 腎性低尿酸血症

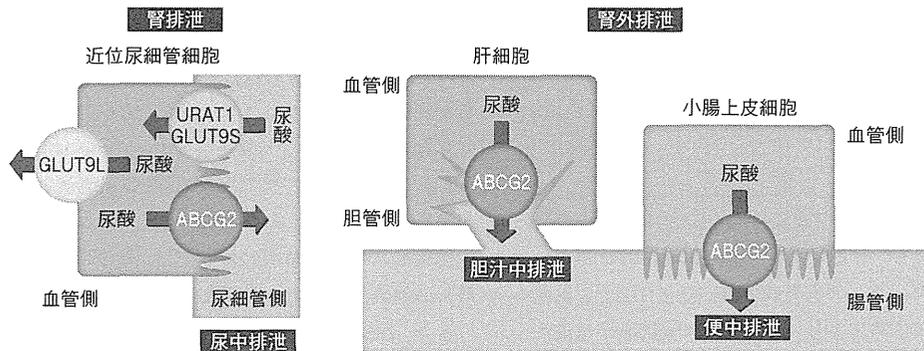
## はじめに

尿酸トランスポーターは、細胞膜に存在して血清尿酸値を調節する分子であり、腎臓の尿細管において尿酸の再吸収に働く分子と、腎臓や腸管などにおける尿酸の排泄に働く分子がある。これらの尿酸トランスポーターは、尿酸動態の重要な支配要因の1つとして血清尿酸値の調節に関わっており、その機能不全は血清尿酸値の異常を引き起こすことがわかっている。本稿では尿酸トランスポーターの視点からみた血清尿酸値の生理学的な調節機構と、その機能不全による病

態について解説する。また、これまでのトランスポーター研究の成果から、生活習慣病の1つである高尿酸血症の病態の解明が進展している現状についても概説する。

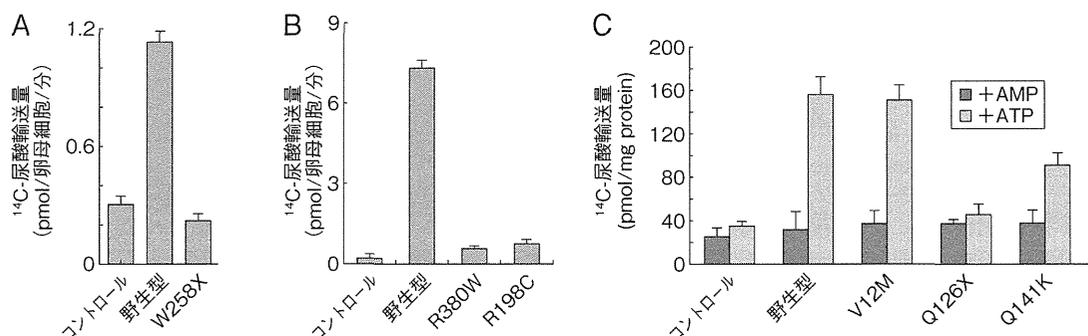
## I ヒトにおける尿酸輸送機構

ヒトを含む霊長類の一部では、尿酸分解酵素であるウリカーゼが欠損している。そのため、ヒトの尿酸値はマウスなど他の哺乳類と比較して高値を示す<sup>1)</sup>。また、ウリカーゼ欠損のため、尿酸はヒトにおけるプリン代謝の最終代謝産物と



■図1 尿酸の輸送機構

腎臓の近位尿細管細胞膜には、尿酸再吸収トランスポーターであるURAT1とGLUT9 (GLUT9Lはlong isoform, GLUT9Sはshort isoform)が発現し、尿酸の再吸収を司る。尿酸排泄トランスポーターABCG2は、腎臓近位尿細管細胞、肝細胞、小腸上皮細胞などの管腔側に発現し、尿酸の排泄を司る。Matsuo H, et al: Sci Transl Med (2009) 1: 5ra11より改変。



■図2 尿酸トランスポーターによる尿酸輸送

アフリカツメガエルの卵母細胞 (A, B) または膜小胞 (C) を用いてトランスポーターによる尿酸輸送能を見た。野生型の URAT1 (A), GLUT9 (B), ABCG2(C) による尿酸輸送は、それぞれのトランスポーター遺伝子の病因変異により著明に低下している。詳細は本文参照。Enomoto A, et al: Nature (2002) 417: 447-452, Matsuo H, et al: Am J Hum Genet (2008) 83: 744-751, Matsuo H, et al: Sci Transl Med (2009) 1: 5ra11 より改変。

なり、腎臓で排泄・分泌を受けるとともに、小腸などから排泄される。

ヒトにおける尿酸トランスポーターを介した尿酸輸送機構では、3つの主要な尿酸トランスポーターの役割が明らかになっている (図1)。尿酸再吸収トランスポーターである URAT1/SLC22A12 と GLUT9/SLC2A9 が、腎臓の近位尿細管における尿酸の再吸収を担っている。腎臓の糸球体で濾過された原尿中の尿酸は、近位尿細管の管腔側に局在する URAT1 を介して再吸収に向けて輸送される<sup>2)</sup>。GLUT9 のうち特に GLUT9L (long isoform) は近位尿細管の血管側に局在しており、URAT1 と協働して尿酸の再吸収を司る<sup>3)</sup>。これに対して尿酸の排泄は、3つ目の尿酸トランスポーターである ABCG2/BCRP が担っている<sup>4), 5)</sup>。ABCG2 は、腎臓の近位尿細管や小腸上皮細胞の管腔側に局在し、排泄に向けた尿酸輸送を司る<sup>4), 5)</sup>。

## II 腎性低尿酸血症

腎性低尿酸血症は、URAT1 または GLUT9 の遺伝子変異により引き起こされる。すなわち、近位尿細管におけるこれらの尿酸トランスポーターの再吸収機能が低下すると、原尿からの尿酸の再吸収は阻害され、尿中への尿酸排泄が増加することにより、血中の尿酸値は低下する。URAT1 遺伝子変異により引き起こされる腎性低尿酸血症は“腎性低尿酸血症1型”、GLUT9 遺伝子変異により引き起こされる腎性低尿酸血症は“腎性低尿酸血症2型”と呼ばれる<sup>6)</sup>。腎性低尿酸血症

を引き起こす遺伝子変異にはいくつかのパターンが知られているが、日本人の腎性低尿酸血症患者に最も高頻度に認められるのは URAT1 遺伝子の機能消失変異である“W258X”変異<sup>2)</sup> (258番目のアミノ酸であるトリプトファン (W) に対応するコドンが終止コドン (X) となる変異) である (図2)。GLUT9 遺伝子が関わる腎性低尿酸血症患者では、機能消失変異である“R198C”変異 (198番目のアルギニン (R) に対応するコドンがシステイン (C) となる変異) および“R380W”変異 (380番目のアルギニン (R) に対応するコドンがトリプトファン (W) となる変異) が最初に報告された (図2)<sup>3)</sup>。“R198C”変異および“R380W”変異は共に GLUT9 の膜貫通領域近傍の塩基性アミノ酸が中性アミノ酸に置換される変異で、これにより膜貫通部位の構造が変化し尿酸輸送機能が消失するものと考えられている<sup>6)</sup>。

尿酸トランスポーター遺伝子は URAT1 を含めて、ヒトゲノム情報解読後に行われた詳細な遺伝学的解析と分子機能解析が同定の鍵となった<sup>7), 8)</sup>。また GLUT9 については、2007年以降のゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study; GWAS)<sup>9)~12)</sup> において血清尿酸値と関連があることが指摘された。このように、尿酸トランスポーターの生理学的機能と病態の解明においては、遺伝学的解析と分子機能解析の効果的な併用が不可欠であった。

また、URAT1 と GLUT9 のいずれにも変異を認めない低尿酸血症例が確認されていることから、“腎性低尿酸血症3型”<sup>13)</sup> の存在が示唆されている。その病態には未知の尿酸トランスポーターが関与している可能性がある。

■表1 血清尿酸値のゲノムワイド関連解析 (GWAS) による候補遺伝子の探索

発表年	著者	対象人数	対象人種	候補遺伝子	文献
2007	Li <i>et al</i>	4,371人 [1,301人]	イタリア人Sardinia [イタリア人Chianti]	GLUT9/SLC2A9, PJA2	9
2008	Döring <i>et al</i>	1,644人 [4,162人] [4,066人] [1,719人]	ドイツ人Augsberg [ドイツ人Augsberg] [ドイツ人Pomerania] [オーストリア人Salzburg]	GLUT9/SLC2A9	10
2008	Vitart <i>et al</i>	986人 [708人]	クロアチア人 [イギリス人Orkney島]	GLUT9/SLC2A9	11
2008	McArdle <i>et al</i>	868人	ドイツ系アメリカ人	GLUT9/SLC2A9	12
2008	Dehghan <i>et al</i>	7,699人 4,148人 11,024人 3,843人	ヨーロッパ系白人 オランダ人Rotterdam アメリカ人白人 アメリカ人黒人	GLUT9/SLC2A9, ABCG2 SLC17A4-SLC17A1-SLC17A3 gene cluster	15
2009	Kolz <i>et al</i>	28,141人	ヨーロッパ人(メタ解析)	GLUT9/SLC2A9, ABCG2 SLC17A4-SLC17A1-SLC17A3 gene cluster URAT1/SLC22A12, OAT4/SLC22A11 MCT9/SLC16A9, PDZK1, GCKR LRRC16A-SCGN gene cluster	16
2010	Kamatani <i>et al</i>	14,700人	日本人	URAT1/SLC22A12, GLUT9/SLC2A9 ABCG2, LRP2	17
2010	Yang <i>et al</i>	22,054人	欧米白人(メタ解析)	GLUT9/SLC2A9, ABCG2 OAT4/SLC22A11 SLC17A4-SLC17A1-SLC17A3-SLC17A2 gene cluster GCKR, INHBC, RREB1, PDZK1	18

[ ] は replication study の対象を示す。松尾洋孝ら: Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌2012 (2012): 145-154 より改変。

### III 痛風・高尿酸血症

#### 1. 痛風・高尿酸血症の主要な病因遺伝子

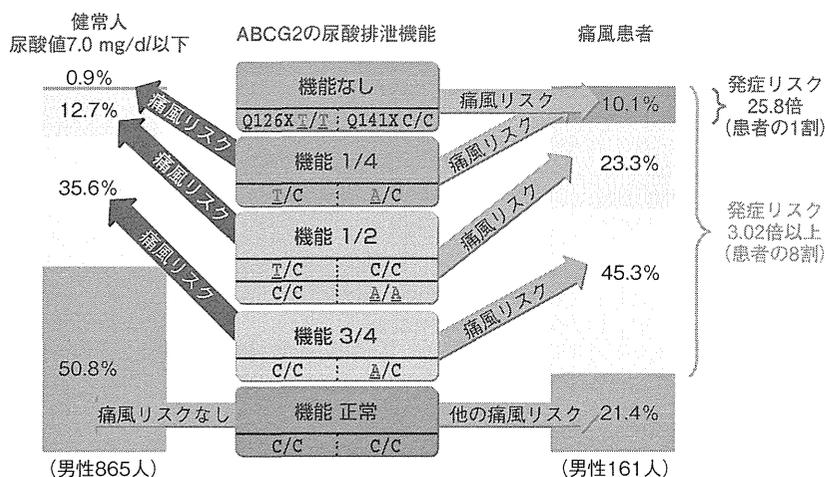
生活習慣病の1つである痛風や高尿酸血症の要因は、肥満や高プリン食の摂食過多といった環境要因に加え、遺伝的な要因が考えられていた。近年の遺伝子解析技術の進歩により、ゲノムワイド連鎖解析 (genome-wide linkage analysis)<sup>14)</sup> や GWAS<sup>15)~18)</sup> が導入され、ヒトゲノム全体において痛風や血清尿酸値の変動に関わる遺伝子多型の解析が可能になってきた。特に、GWASなどの網羅的な遺伝子解析により、尿酸トランスポーター遺伝子を含む複数の遺伝子が同定されている(表1)。それらの遺伝子のうち、ABCG2というトランスポーター遺伝子は尿酸排泄トランスポーターをコードし、痛風の主要な原因遺伝子であることが報告された<sup>5)</sup>。特に、この遺伝子 ABCG2 において、“Q126X” 変異 (126番目のアミノ酸であるグルタミン (Q) に対応するコドンが終止コドン (X) となる変異) および “Q141K” 変異 (141番目のアミノ酸であるグルタミン (Q) に対応するコドンがリジン (K) となる変異) の2種類の SNP (single nucleotide polymorphism: 一塩基多型) の組み合わせにより ABCG2 の機能低下を来た

すことが痛風の発症に関与していることがわかった(図2)。健常人男性(血清尿酸値が7.0 mg/dl以下)と男性痛風症例との比較解析において、痛風症例の約8割に何らかの ABCG2 機能低下を認め、ABCG2の機能異常が痛風発症リスクを3倍以上、上昇させることがわかった。また、重度の ABCG2 機能低下 (ABCG2機能が正常の1/4以下) を認める男性の場合は、痛風発症リスクが25.8倍にも上がることがわかった。これらの所見は、ABCG2が痛風の主要な原因遺伝子であることを示唆する(図3)。

痛風と関連する遺伝子は ABCG2 以外にも複数同定されているが、ABCG2ほどの高いリスクを呈し高頻度に遺伝子多型が認められるものはこれまでに報告されていない<sup>8)</sup>。

#### 2. 高尿酸血症の新しい病型概念

尿酸排泄トランスポーター ABCG2 の尿酸排泄能に着目した筆者らの研究は、これまでの内科教科書に記載されている高尿酸血症の病型分類とは異なる新しい病型概念の提唱につながった<sup>19)</sup>。644人の高尿酸血症患者の尿検体を用いて尿酸排泄を調べたところ、ABCG2の変異により尿酸排泄機能が低下すると腎臓からの尿酸排泄量は予想に反して増加することがわかった。このような ABCG2 尿酸排泄機能の低下



■図3 ABCG2の機能低下と痛風リスク

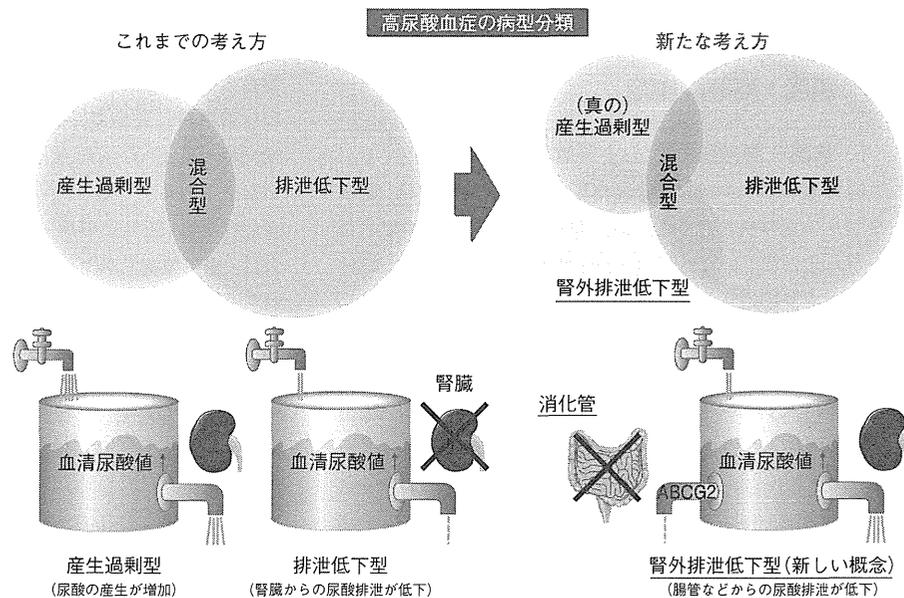
尿酸排泄トランスポーターであるABCG2の尿酸排泄機能の個人差および痛風発症の関係を示す。痛風患者の約8割でABCG2の機能異常が見られ、ABCG2遺伝子の変異が痛風発症のリスクを上げることから、ABCG2が痛風の主要病因遺伝子であることがわかる。Matsuo H, et al: Sci Transl Med (2009) 1: 5ra11より改変。

症例は、高尿酸血症患者全体の約8割(76%)に認められた。さらに、このようなABCG2の機能低下があると、従来の病型分類における“産生過剰型”高尿酸血症に最大で約2.3倍なりやすいこともわかった。次に、*Abcg2*ノックアウトマウス(尿酸排泄トランスポーターの機能を欠失させた遺伝子改変動物)を用いて尿酸排泄を見たところ、ABCG2の機能低下を伴うヒトの高尿酸血症例と同様、血清尿酸値は上昇し、腎臓からの尿酸排泄も増加した。一方、腸管から糞中への尿酸排泄は有意に減少していた。つまり、ABCG2/*Abcg2*遺伝子に異常が起こり尿酸排泄機能が低下すると、腸管から糞中への尿酸排泄量は減少し、血清尿酸値が上昇する。そのため腎臓には過剰な尿酸負荷がかかる。したがって、腎臓では尿管における尿酸排泄トラン

スポーター(ABCG2/*Abcg2*)の機能が低下しているにもかかわらず、尿酸は糸球体を通して原尿中へオーバーフローを起こし、結果として尿中の尿酸排泄量が増加するという新たな発症メカニズムが明らかになった(図4)。

従来の高尿酸血症の病型分類は、尿中への尿酸排泄量および排泄率を基準としているため、尿中に尿酸が多く排泄されることは、体内で尿酸が多く作られる“産生過剰型”または産生過剰と排泄低下の混じった“混合型”を意味していた。しかし、筆者らの研究結果<sup>19)</sup>は、尿酸排泄トランスポーターの純粋な機能低下により腸管など腎臓以外からの尿酸排泄が低下しても、従来の概念では“産

生過剰型”または“混合型”に分類されてしまうことを示している。これは、今まで無視されがちであった腸管からの尿酸



■図4 高尿酸血症の新しい病型概念

ABCG2の変異による腸管からの尿酸排泄機能低下は血清尿酸値の上昇をもたらす。結果として腎臓からの尿酸排泄の増加につながる。この際、尿酸の産生過剰はない(腎外排泄低下型)。これは従来の病型の考え方では説明のできない現象である。ABCG2の尿酸排泄能に着目した筆者らの研究は、“(従来の)産生過剰型”を“腎負荷型”とし、“(真の)産生過剰型”と“腎外排泄低下型”を含むものとする新しい高尿酸血症の概念の提唱につながった。Ichida K, et al: Nat Commun (2012) 3: 764より改変。

排泄の重要性を示すものである。また、尿酸の産生過剰でない病態を“産生過剰型”と分類してしまうことにも問題がある。筆者らの調査では、多数の高尿酸血症例で腎外排泄低下のメカニズムが発症に関与しており、高尿酸血症の原因として新たに“腎外排泄低下型”という概念を筆者らは提唱した。また、“腎外排泄低下型”と“(真の)産生過剰型”を併せたもの(従来の分類における“産生過剰型”に相当)を“腎負荷型”と呼称することも提唱している<sup>19)</sup>(図4)。

## おわりに

尿酸トランスポーターを介した生理学的な尿酸輸送機構の全容が明らかになりつつあり、その機能の破綻による疾患、すなわち腎性低尿酸血症や痛風・高尿酸血症の分子病態についても明らかになってきている。特に、*ABCG2*に関する詳細な解析の結果、高尿酸血症発症の新しいメカニズムが明らかにされた。このような解析は、新たな視点からの高尿酸血症の予防法や治療薬開発への道を開くものである。今後、*ABCG2*遺伝子解析による個人差に応じた医療が進展し、ゲノムテーラーメイド医療の先駆的なモデルとなることが大いに期待される。

### PROFILE 松尾洋孝

- 防衛医科大学校 分子生体制御学講座
- E-mail: hmatsuo@ndmc.ac.jp
- 趣味: 研究, 食べ歩き, 旅行

1995年防衛医科大学校卒業。1997年防衛医科大学校病院研修医修了。1999年杏林大学医学部薬理学教室研究生。2002年防衛医科大学校生理学第一講座助手。2007年防衛医科大学校分子生体制御学講座助教。2010年防衛医科大学校分子生体制御学講座講師。現在に至る。

### PROFILE 市田公美

- 東京薬科大学 病態生理学教室
- E-mail: ichida@toyaku.ac.jp
- 趣味: スキー

1982年東京慈恵会医科大学卒業。東京慈恵会医科大学附属病院研修医。1998年東京慈恵会医科大学腎臓・高血圧内科講師。2007年東京薬科大学病態生理学教室教授。

### PROFILE 高田龍平

- 東京大学医学部附属病院 薬剤部
- E-mail: tappai-ky@umin.ac.jp
- 趣味: 若い娘と遊ぶ(自分の娘)

1999年東京大学薬学部卒業。2004年東京大学大学院薬学系研究科博士後期課程修了。同年より東京大学医学部附属病院薬剤部助手(2007年より助教)。

### PROFILE 中山昌喜

- 防衛医科大学校 分子生体制御学講座
- E-mail: aknak@ndmc.ac.jp
- 趣味: 読書, ゲーム

2006年防衛医科大学校卒業。2008年防衛医科大学校病院研修医修了。航空自衛隊基地勤務を経て、2010年より防衛医科大学校分子生体制御学講座専門研修医。

### PROFILE 四ノ宮成祥

- 防衛医科大学校 分子生体制御学講座
- E-mail: shinomi@ndmc.ac.jp
- 趣味: 釣り, 絵画鑑賞

1983年防衛医科大学校卒業。1991年防衛医科大学校医学研究科博士課程修了。1993年防衛医科大学校生物学講座助教。1997年防衛医科大学校微生物学講座助教。2000年英国リバプールLiverpool School of Tropical Medicine, Diploma Tropical Medicine & Hygiene Course修了。2002~2004年米国ミシガン州Van Andel Research Institute 招聘研究員。2007年防衛医科大学校分子生体制御学講座教授。

## 文献

- 1) Wu XW, et al: Proc Natl Acad Sci USA (1989) 86: 9412-9416
- 2) Enomoto A, et al: Nature (2002) 417: 447-452
- 3) Matsuo H, et al: Am J Hum Genet (2008) 83: 744-751
- 4) Woodward OM, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2009) 106: 10338-10342
- 5) Matsuo H, et al: Sci Transl Med (2009) 1: 5ra11
- 6) Kawamura Y, et al: Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids (2011) 30: 1105-1111
- 7) 松尾洋孝: 遺伝子医学MOOK (2010) 19: 116-125
- 8) 松尾洋孝: 痛風と核酸代謝 (2010) 34: 159-169
- 9) Li S, et al: PLoS Genet (2007) 3: e194
- 10) Döring A, et al: Nat Genet (2008) 40: 430-436
- 11) Vitart V, et al: Nat Genet (2008) 40: 437-442
- 12) McArdle PF, et al: Arthritis Rheum (2008) 58: 2874-2881
- 13) 松尾洋孝ら: Annual Review糖尿病・代謝・内分泌2012 (2012): 145-154
- 14) Cheng LS, et al: Am J Hum Genet (2004) 75: 498-503
- 15) Dehghan A, et al: Lancet (2008) 372: 1953-1961
- 16) Kolz M, et al: PLoS Genet (2009) 5: e1000504
- 17) Kamatani Y, et al: Nat Genet (2010) 42: 210-215
- 18) Yang Q, et al: Circ Cardiovasc Genet (2010) 3: 523-530
- 19) Ichida K, et al: Nat Commun (2012) 3: 764

## XV 膜輸送系の異常

## 遺伝性腎性低尿酸血症

Hereditary renal hypouricemia

Key words : 腎性低尿酸血症1型, 腎性低尿酸血症2型, 尿酸トランスポーター, GLUT9/SLC2A9, URAT1/SLC22A12

千葉俊周<sup>1</sup>  
松尾洋孝<sup>1</sup>  
中山昌喜<sup>1</sup>  
市田公美<sup>2</sup>  
四ノ宮成祥<sup>1</sup>

## 1. 遺伝性腎性低尿酸血症の定義

## 1) 概 念

遺伝性腎性低尿酸血症とは、腎臓からの尿酸排泄亢進により低尿酸血症を認める遺伝性疾患である。低尿酸血症の基準値は報告により血清尿酸値が4.0mg/dL以下とするものから1.5mg/dL以下とするものまで幅がある<sup>1)</sup>が、一般的には2.0mg/dL以下を低尿酸血症として扱うことが多い。しかし基準値を低く設定しすぎると、URAT1やGLUT9のヘテロ変異による軽度の低尿酸血症(血清尿酸値2.0-3.0mg/dL)を見逃す可能性があり、注意が必要である。

## 2) 低尿酸血症の分類

尿酸は、主に肝臓で産生され、腎臓を中心に排泄される。したがって、低尿酸血症はその機序により産生低下型と再吸収低下型に分類される。このうち、産生低下に起因するものは極めてまれで、ほとんどが腎臓からの再吸収低下による‘腎性低尿酸血症’である。Fanconi症候群やWilson病のほか、薬物使用に続発して尿細管障害を起し低尿酸血症となるものを‘続発性腎性低尿酸血症’、遺伝性に尿細管での尿酸再吸収能が低下しているものを‘遺伝性腎性低尿酸血症’と呼ぶ。後者は判明している原因遺伝子の違いにより腎性低尿酸血症1型(renal hypouricemia type 1: RHUC1, URAT1が原因遺伝子)と腎性低尿酸血症2型(renal hypouricemia type 2: RHUC2, GLUT9が原因遺伝子)に分類される<sup>2)</sup>。

## 2. 疫 学

我が国における低尿酸血症(血清尿酸値2.0mg/dL以下)の頻度は約0.15-0.4%と推測されている<sup>3)</sup>。自衛隊員約2万人の健康診断データベースから低尿酸血症症例を抽出した著者らの研究では、尿酸値2.0mg/dL以下で39人(0.18%)、尿酸値3.0mg/dL以下で200人(0.94%)の症例を認めた<sup>4)</sup>。

## 3. 病 因

## 1) 尿酸代謝

尿酸は、プリン体の最終代謝産物である。肝臓を中心に1日あたり約700mg産生された後、2/3が腎臓から、残り1/3がその他(消化管など)から排泄される。尿酸は腎臓の糸球体で濾過された後、近位尿細管で再吸収を受ける。尿中に排泄される尿酸の量は、主にこの近位尿細管での再吸収効率により規定される。尿酸を原尿側から血液側へ細胞膜を通過させて再吸収する輸送体は尿酸トランスポーターと呼ばれ、この尿酸トランスポーターが遺伝子変異によって再吸収能が低下すると、尿酸排泄が亢進する。その結果、血中の尿酸値が低下し腎性低尿酸血症となる(図1)。

## 2) 腎性低尿酸血症の原因遺伝子

ヒトの腎臓における生理学的な尿酸の再吸収は、主にurate transporter 1(URAT1/SLC22A12)およびglucose transporter 9(GLUT9/SLC2A9)の2つの尿酸トランスポーターがその役割を

XV

膜輸送系の異常

<sup>1</sup>Toshinori Chiba, Hiroataka Matsuo, Akiyoshi Nakayama, Nariyoshi Shinomiya: Department of Integrative Physiology and Bio-Nano Medicine, National Defense Medical College 防衛医科大学校 分子生体制御学講座 <sup>2</sup>Kimiyoshi Ichida: Department of Integrative Pathophysiology, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences 東京薬科大学 病態生理学教室