

# A mechanism of serum uric acid-lowering effect induced by SGLT2 inhibitors

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/40290">http://hdl.handle.net/2297/40290</a>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



# 学位論文要旨

血糖降下薬 SGLT2 阻害薬の血清尿酸値低下作用に関する研究

A mechanism of serum uric acid-lowering effect induced by SGLT2 inhibitors

生命科学専攻

分子作用学講座

地野 之浩

## Abstract

SGLT2 inhibitors have been reported to lower the serum uric acid (SUA) level. To elucidate the mechanism first of all we analyzed SUA and the urinary excretion rate of UA ( $UE_{UA}$ ) after the oral administration of an SGLT2 inhibitor, luseogliflozin in human. After administration of luseogliflozin, SUA decreased and a negative correlation was observed between the SUA level and the  $UE_{UA}$ , suggesting that SUA decreased as a result of the increase in the  $UE_{UA}$ . The increase in  $UE_{UA}$  was correlated with an increase in urinary glucose excretion, but not with the plasma luseogliflozin concentration. Additionally, *in vitro* transport experiments showed that luseogliflozin had no direct effect on the transporters involved in renal handling of UA. To explain that the increase in  $UE_{UA}$  is likely due to glycosuria, we focused on GLUT9 isoform 2, which is expressed at the apical membrane of the kidney tubular cells and transports both UA and D-glucose. We observed that the efflux of [ $^{14}C$ ]UA in *Xenopus* oocytes expressing GLUT9 isoform 2 was *trans*-stimulated by 10 mM D-glucose, a high concentration of glucose that existed under SGLT2 inhibition. On the other hand, uptake of [ $^{14}C$ ]UA by oocytes was *cis*-inhibited by 100 mM D-glucose, a concentration assumed to exist in collecting ducts. In conclusion, it was demonstrated that the  $UE_{UA}$  could be potentially increased by luseogliflozin-induced glycosuria, with alterations of UA transport activity because of urinary glucose.

## 要 旨

ナトリウム-グルコース共輸送体 2 (sodium/glucose cotransporter 2, SGLT2) 阻害薬は、新規な血糖降下薬として現在開発中の薬物群である。SGLT2 阻害薬は、既存の血糖降下薬の作用機序とは異なり、腎臓の近位尿細管に発現する SGLT2 を阻害することにより余分なグルコースを体外に排出するというコンセプトに基づき開発された薬剤である。したがって、インスリン作用非依存性により、膵  $\beta$  細胞への負担が無く、糖毒性解除によるインスリン抵抗性の改善および  $\beta$  細胞保護作用も報告されている。近年 SGLT2 阻害薬の臨床試験が進行する中で、血糖降下作用に加え、有意な血清尿酸 (serum uric acid, SUA) 値の低下作用を有することが明らかになりつつある。現在までに、申請者が開発に関与した luseogliflozin のほかに、4 つの SGLT2 阻害薬においても同様の SUA 値の低下作用が観察されている。尿酸 (UA) は心血管系疾患および慢性腎臓病の増悪因子であるため、あらかじめ高血糖による心血管系および腎臓障害のリスクを有する糖尿病患者においては、SUA 値のより注意深い管理が必要とされる。このため、血糖降下作用と SUA 値低下作用を併せ持つことは、糖尿病治療薬として有用と考えられる。一方、UA は抗酸化物質として必須の生体成分であるため、必要以上の低下作用は問題にもなる。したがって、SUA 値低下機構を明らかにすることは、SGLT2 阻害薬の有用性および安全性確保の両面から必要である。

そこで、本研究において luseogliflozin をモデル薬物として SUA 値低下作用機構の解明を目的として研究を行った。まず、luseogliflozin の臨床試験における SUA 値および尿中への UA 排泄 (urinary excretion rate of uric acid,  $UE_{UA}$ ) の変動を解析するとともに、SUA 値の

調節に重要な働きをする UA 輸送体の遺伝子発現系を用いた *in vitro* 実験を行った。

健康成人に luseogliflozin の 1~25 mg を単回投与したとき、3 mg 以上の投与群で有意な SUA 値の低下が観測され (Figure 1A)、全ての投与量で  $UE_{UA}$  が有意に増加していた (Figure 1B)。また、健康成人に 1~25 mg を単回投与したとき、placebo 群を含めた全被験者 57 例の Day1 における SUA 値と  $UE_{UA}$  の変化量には有意な負の相関があった (Figure 1C)。SUA 値を低下させる機序としては、UA の体内における産生の抑制と排泄の促進が考えられるが、産生抑制

の場合は排泄量も低下する。したがって、luseogliflozin 投与による SUA 値低下作用は、 $UE_{UA}$  促進に起因すると考えられた。

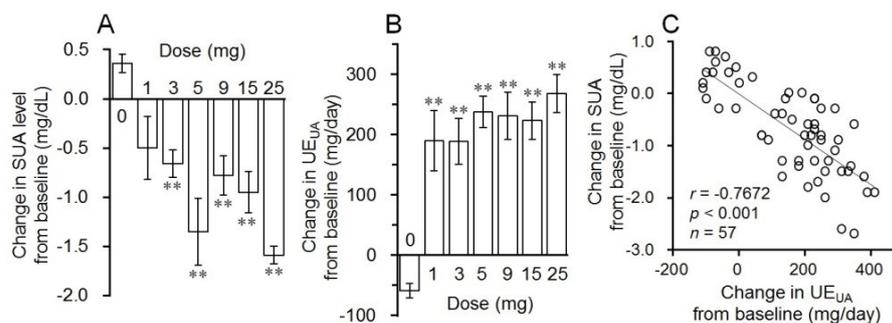


Figure 1. Effect of luseogliflozin on serum uric acid (A, SUA) and urinary excretion rate of uric acid (B,  $UE_{UA}$ ) in healthy subjects ( $n = 3\sim 14$ ), and the negative correlation between SUA and  $UE_{UA}$ . Data are the mean  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$  vs. placebo (0 mg) (Dunnett's test).

次に、健康成人に luseogliflozin を単回投与したときの  $UE_{UA}$  の推移と薬物の血漿中濃度推移を比較した結果、 $UE_{UA}$  の推移には投与後 3~8 時間と 15 時間付近で 2 つのピークを示す特徴があったが、血漿中薬物濃度の推移にはそのような傾向はなかった。一方、尿中グルコース排泄速度 (urinary excretion rate of glucose,  $UE_{GL}$ ) には食事の影響と考えられる 2 つのピークが観測されるなど、 $UE_{UA}$  と類似の推移を示した。そこで、placebo 群を含めた全被験者 57 例について、薬

物投与後 24 時間までの  $UE_{UA}$  と  $UE_{GL}$  (いずれも baseline 値を引いた値) の相関および  $UE_{UA}$  と血漿中未変化体薬物濃度の  $AUC_{0-24h}$  の相関を比較した結果、 $UE_{UA}$  は  $AUC_{0-24h}$  よりも  $UE_{GL}$  において高い相関を有していた (Figure 2)。

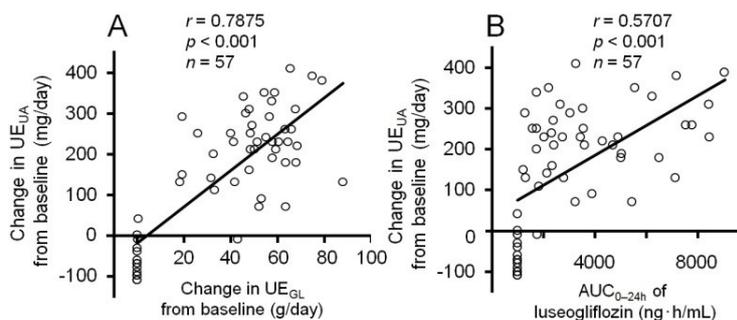


Figure 2. Relationship between the urinary excretion rate of UA ( $UE_{UA}$ ) and urinary excretion rate of glucose (A,  $UE_{GL}$ ) or  $AUC_{0-24h}$  of luseogliflozin (B) after a single administration of luseogliflozin in healthy subjects.

以上の結果から、 $UE_{UA}$  の増加は  $UE_{GL}$  の増加に起因する可能性が高いことが示唆された。

ヒトの体内で産生された UA の約 70%は腎臓により尿中へ排出されるため、SUA 値を維持するために UA の腎臓動態が重要である。腎近位尿細管において、UA は再吸収と分泌を受けるが、最終的に糸球体濾過を受けた UA の約 90%が再吸収され、約 10%が尿中へ排泄される。そこで、UA の再吸収に関与する URAT1 および GLUT9 isoform 1、さらに可能性が示唆されている OAT4 および OAT10 を介した UA 輸送に対する luseogliflozin の作用を

検討した。その結果、いずれに対しても luseogliflozin は、臨床的な血漿中非結合形濃度以上の濃度において阻害作用を示さなかった (Figure 3)。他に、UA の輸送に関与する SMCT1、OAT1、OAT3 および BCRP に対しても luseogliflozin は影響を与えなかった。以上の臨床データおよび UA 輸送体を用いた *in vitro* 試験結果から、 $UE_{UA}$  は luseogliflozin の直接作用ではなく、SGLT2 阻害により尿中のグルコース濃度が上昇することによる可能性が高いことが強く示唆された。

そこで、グルコースと UA の両者を輸送する GLUT9 の isoform 2 に着目した。GLUT9 はグルコース輸送体ファミリーに属し、主に肝臓および腎臓に発現している。GLUT9 については、その主な生理機能はグルコース調節よりもむしろ UA の輸送であり、膜電位依存的に UA を輸送することが明らかになっている。GLUT9 には翻訳領域が異なる 2 種の isoform (splicing variant) が存在する。GLUT9 isoform 2 は isoform 1 と N 末端の数十アミノ酸残基以外は同一配列であり、UA やグルコースの輸送特性も類似するとされているが、それぞれの発現部位が明確に異なることが報告されている。GLUT9 isoform 1 が近位尿細管上皮細胞の basolateral 側に発現し、apical 側の URAT1 と協調的に UA の再吸収に主要な役割を担っている。さらに、isoform 1 では生理的な濃度である 5 mM の D-グルコースにより UA 輸送を *trans*-促進することが示されている。一方、isoform 2 は apical 側に発現するが、生理的役割はまったく明らかになっておらず、5 mM のまでの D-グルコースにおいて UA 輸送の *trans*-促進効果も示されていない。これらの知見に基づき、尿糖が GLUT9 isoform2 による UA 排出を *trans*-促進することにより、尿糖の増加に伴い  $UE_{UA}$  が増加するとの仮説を立てた。健康なヒトの血漿中のグルコース濃度は 5~5.5 mM (100~190 mg/dL) であり、食後にお

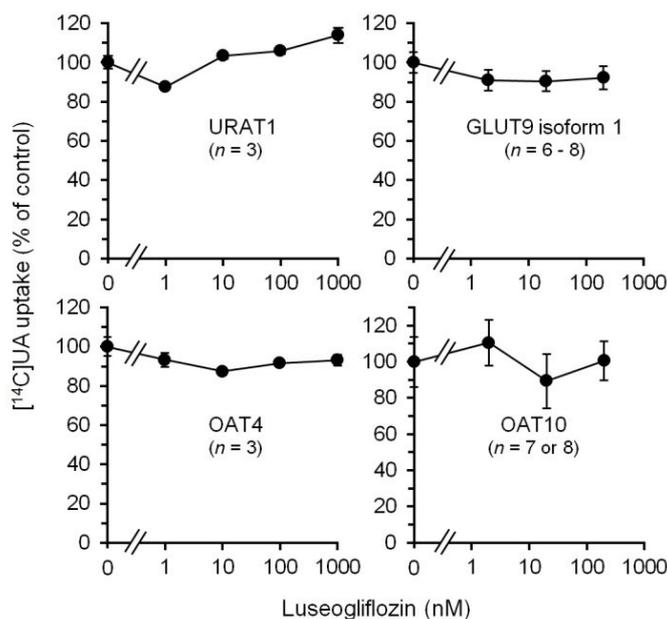


Figure 3. Effects of luseogliflozin on [<sup>14</sup>C]uric acid (UA) uptake mediated by UA transporters involved in UA reabsorption in the kidney. Data are the mean ± SEM.

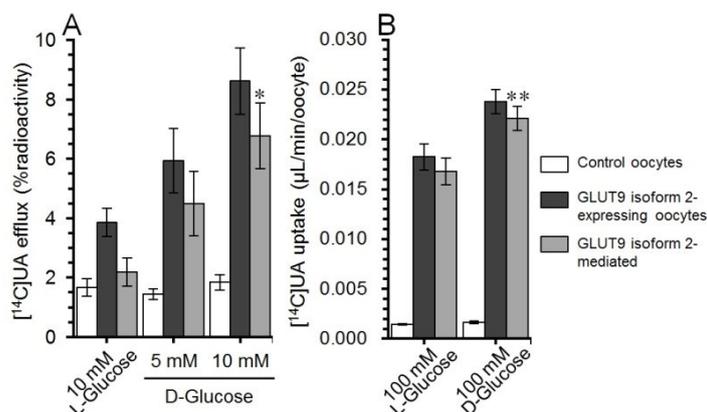


Figure 4. *Trans*-stimulatory effect of D-glucose on GLUT9 isoform 2-mediate [<sup>14</sup>C]UA efflux (A, n = 5-10) and [<sup>14</sup>C]UA uptake (B, n = 14-17) in the gene expressing *Xenopus* oocytes. Data are mean ± SEM. \*p < 0.05, \*\*p < 0.001 vs. L-glucose (A: Dunnett's test; B: Aspin-Welch's t-test).

いては 10 mM 程度まで上昇する。血漿中のほとんどのグルコースは糸球体ろ過を受けるため、血漿中と糸球体ろ過直後の原尿中ではほぼ同じ濃度となり、SGLT2 阻害時の原尿中グルコース濃度も同等以上になると考えられる。以上より、GLUT9 の isoform2 を発現させた *Xenopus oocyte* を用いて、D-グルコースによる UA 輸送の *trans*-促進の検討を行った。その結果、10 mM の D-グルコースにより有意に UA の排出輸送が促進されることが見いだされた (Figure 4A)。さらに、D-グルコースによる *trans*-促進効果は GLUT9 isoform 2 発現 *oocyte* に 100 mM の D-グルコースを注入したときの UA の取り込みでも確認された (Figure 4B)。

GLUT9 の isoform 2 に関し、ヒト集合管に強く発現することがごく最近に報告された。過去の報告では、GLUT9 の isoform 1 および isoform 2 を介した [<sup>14</sup>C]UA 取り込みも 1 mM の D-グルコースによって阻害が示されていない。しかしながら、集合管では近位尿細管よりもさらに尿の濃縮が進むため、SGLT2 阻害薬により、近位尿細管以上にグルコースの濃度が上昇する。そこで、GLUT9 isoform 2 発現 *oocyte* を用いて [<sup>14</sup>C]UA の取り込みに対する D-グルコースの *cis*-阻害作用を検討した。その結果、100 mM の D-グルコースに [<sup>14</sup>C]UA の取り込みの *cis*-阻害作用があることが明らかになった (Figure 5)。

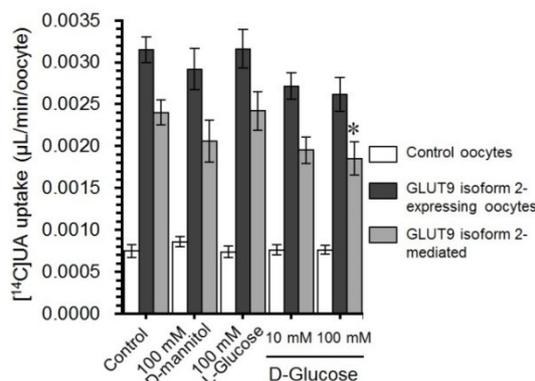


Figure 5. *Cis*-inhibitory effect of D-glucose on GLUT9 isoform 2-mediate [<sup>14</sup>C]UA uptake in the gene expressing *Xenopus oocytes*. Data are mean ± SEM (n = 8-12). \*p < 0.05 vs. control (Aspin-Welch's t-test).

以上の結果から、SGLT2 阻害剤による SUA 低下作用は  $UE_{UA}$  の増加に起因すること、 $UE_{UA}$  の増加は薬剤による直接作用ではなく、SGLT2 阻害により増加したグルコースが、腎臓近位尿細管では GLUT9 isoform 2 (または他の輸送体) を介して UA 排出を促進すること、また、集合管では GLUT9 isoform 2 を介した UA 取り込みを阻害することに起因すると考えられる (Figure 6)。さらに今回の結果は、これまで生理的機能がまったく不明であった GLUT9 isoform 2 に対して、初めての知見を与えるものである。また、luseogliflozin による  $UE_{UA}$  の増加量は、投与量 1~5 mg の範囲内で頭打ちになっており、最大で約 300 mg であった。このことから本作用が有害となる可能性は低いと考えられる。

以上、本研究は SGLT2 阻害薬に共通してみられる SUA 値低下作用機構を明らかにすることに初めて成功したものであり、本糖尿病治療薬について有用な知見となるものである。

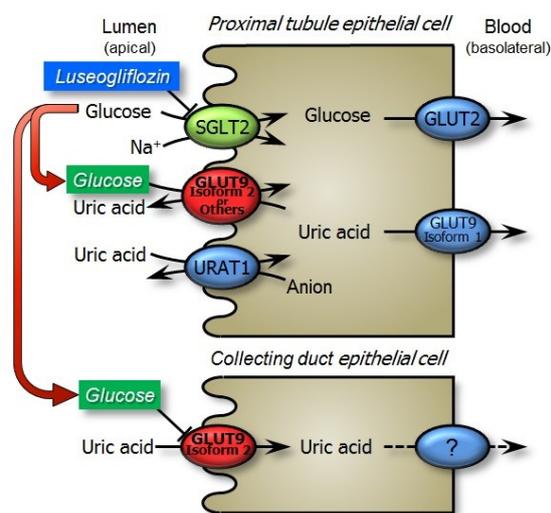


Figure 6. Proposed model for uricosuric effect of SGLT2 inhibitor by glycosuria-induced uric acid/glucose interaction mediated by GLUT9 isoform 2.

## 学位論文審査報告書（甲）

## 1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

.....血糖降下薬 SGLT2 阻害薬の血清尿酸値低下作用に関する研究.....

2. 論文提出者 (1) 所 属 生命科学 専攻 分子作用学 講座

(2) 氏 名 ちの ゆきひろ 地野 之浩

3. 審査結果 (1) 判 定 (いずれかに○印) ○合 格 ・ 不合格

(2) 授与学位 博 士 (薬学)

## 4. 学位論文審査委員

## 5. 審査結果の要旨（600～650 字）

グルコースの尿細管再吸収を担うトランスポーターSGLT2 阻害薬が、グルコースの尿中排泄促進に基づく新しいタイプの血糖降下薬として注目されている。本研究に用いられた luseogliflozin をはじめ複数の SGLT2 阻害薬が開発されているが、共通した副作用として血清尿酸値 (SUA) の低下が認められる。本研究では SGLT2 阻害薬が有する SUA 低下機構について、臨床試験ならびに腎尿酸トランスポーターを対象とした *in vitro* 試験により検討したものである。Luseogliflozin の臨床試験において、SUA の低下と尿酸の尿中排泄量ならびに尿中排泄クリアランスの増加がみられた。また、SUA の低下と尿酸の尿中排泄速度 (UE<sub>UA</sub>) の間には負の相関がみられ、SUA の低下は UE<sub>UA</sub> の増大に起因すると考えられた。さらに、UE<sub>UA</sub> の変化は luseogliflozin の血中濃度とは相関せず、主作用である尿糖排泄と相関したことから、本副作用はグルコース濃度変化が原因と考えられた。一方、luseogliflozin は尿酸の腎動態に関与するトランスポーター (URAT1, GLUT9 isoform1, OATs, SMCT, BCRP) には影響しなかった。しかし、尿酸およびグルコース両者を基質とし、尿細管上皮細胞管腔側細胞膜に発現する GLUT9 isoform2 については、luseogliflozin の尿糖排泄促進作用により上昇する尿中グルコース濃度において、尿酸輸送活性が尿酸-グルコース交換輸送機構によって増大した。したがって、SGLT2 阻害薬による SUA 低下作用は増大した尿中グルコースによる GLUT9 isoform2 を介した尿酸の排泄促進に起因することがわかった。本成果は、新しい血糖降下薬に付随する副作用機構を明らかにしたと同時に、従来から知られている糖尿病時の SUA 変動を説明する新しいメカニズムを提唱するものであり、薬学 (博士) に値すると判定された。