

博士論文

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

金沢大学大学院自然科学研究科

生命科学専攻

分子作用学講座

学 籍 番 号 1123032319

氏 名 地野 之浩

主任指導教員名 玉井 郁巳 教授

提 出 年 月 平成 26 年 3 月

目次

目次	1
本論文中に用いた略号の一覧	4
第1章 序論	6
1. 糖尿病およびその患者数の概要と新規血糖降下薬の必要性.....	6
2. Sodium/glucose cotransporter 2 阻害薬.....	11
3. 血糖降下薬による血清尿酸値低下作用の意義.....	14
第2章 Luseogliflozin の血清尿酸値低下作用および尿酸排泄作用	17
第1節 緒言.....	17
第2節 試験および解析方法	19
1. 臨床試験の概要.....	19
2. 被験者.....	19
3. 試験デザイン	20
4. 測定方法	20
5. データ解析.....	21
6. 統計解析	22
第3節 結果.....	23
1. 被験者の背景値 (baseline 値)	23
2. Luseogliflozin の SUA 値低下作用	25
3. Luseogliflozin の UE_{UA} 促進作用	26
4. Luseogliflozin 投与による CL_{UA} の変化.....	27
5. Luseogliflozin 投与による CL_{CRE} の変化	28
6. Luseogliflozin の尿量に対する作用	29
7. Luseogliflozin 投与後の SUA 値の低下と UE_{UA} の増加の関連性.....	30
8. Luseogliflozin 投与後の UE_{UA} 、 UE_{GL} および血漿中薬物濃度の比較	32
9. UE_{GL} と SUA 値および CL_{UA} の関係.....	35
第4節 考察.....	37

第3章 Luseogliflozin の尿酸輸送体への作用および SGLT2 の尿酸輸送への関与..	40
第1節 緒言.....	40
第2節 実験方法.....	43
1. 被検物質.....	43
2. 試薬.....	43
3. 試験系 1：輸送体遺伝子発現哺乳類培養細胞.....	43
4. 試験系 2：輸送体発現アフリカツメガエル oocyte.....	45
5. 遺伝子発現培養細胞を用いた ¹⁴ C]UA 取り込み阻害試験 (URAT1、OAT1、OAT3 および OAT4)	46
6. 遺伝子発現 oocyte を用いた ¹⁴ C]UA 取り込み阻害試験 (GLUT9 isoform 1、 OAT10 および SMCT1)	49
7. SGLT2 による ¹⁴ C]UA 取り込み試験.....	49
8. データ解析.....	50
第3節 結果.....	52
1. 尿酸の再吸収に関わる URAT1 および OAT4 に対する Luseogliflozin の作用.....	52
2. 尿酸の再吸収に関わる GLUT9 isoform 1 および OAT10 に対する Luseogliflozin の作用.....	53
3. URAT1 の活性化に関与する SMCT1 に対する Luseogliflozin の作用.....	54
4. 尿酸の分泌に関わる OAT1 および OAT3 に対する Luseogliflozin の作用.....	55
5. 尿酸の消化管分泌に関わる BCRP に対する Luseogliflozin の作用.....	56
6. SGLT2 による尿酸の輸送.....	57
第4節 考察.....	58
第4章 GLUT9 isoform 2 に対するグルコースの作用	60
第1節 緒言.....	60
第2節 実験方法.....	62
1. 試薬.....	62
2. 試験系：GLUT9 isoform 2 発現アフリカツメガエル oocyte	62
3. GLUT9 isoform 2 発現 oocyte による ¹⁴ C]UA 取り込み <i>trans</i> -促進試験.....	64
4. GLUT9 isoform 2 発現 oocyte による ¹⁴ C]UA 排出 <i>trans</i> -促進試験.....	64

5. GLUT9 isoform 2 発現 oocyte による ¹⁴ C]UA 取り込み <i>cis</i> -阻害試験	64
6. 統計解析	65
第3節 結果.....	66
1. GLUT9 isoform 2 発現 oocyte による ¹⁴ C]UA 取り込み試験条件の検討.....	66
2. GLUT9 isoform 2 を介した ¹⁴ C]UA 取り込みに対する D-グルコースの <i>trans</i> -促進作用.....	67
3. GLUT9 isoform 2 発現 oocyte による ¹⁴ C]UA 排出試験条件の検討.....	68
4. GLUT9 isoform 2 を介した ¹⁴ C]UA 排出に対する D-グルコースの <i>trans</i> -促進作用	70
5. GLUT9 isoform 2 を介した ¹⁴ C]UA 取り込みに対する D-グルコースの <i>cis</i> -阻害作用	72
第4節 考察.....	73
第5章 結論.....	78
引用文献	79
参考論文	94
謝辞	95

本論文中に用いた略号の一覧

ADA	The American Diabetes Association
ABCC	ATP-binding cassette sub-family C
ABCG	ATP-binding cassette sub-family G
AUC _{0-∞}	area under the plasma concentration-time curve extrapolated to infinity
α-GI	α-glucosidase inhibitor
α-MG	methyl-α-D-glucopyranoside
BCRP	breast cancer resistance protein (<i>ABCG2</i>)
Caco2	colon carcinoma 2
CHO-K1	Chinese hamster ovary-K1
CKD	chronic kidney disease
CL _{CRE}	renal clearance of creatinine
CL _{UA}	renal clearance of uric acid
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DPP4	dipeptidyl peptidase 4
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
EGF	epidermal growth factor
FBS	fetal bovine serum
FPG	fasting plasma glucose
GCP	Good Clinical Practice
GLP-1	glucagon-like peptide-1
GLUT9	facilitative glucose transporter 9 (<i>SLC2A9</i>)
GIP	glucose-dependent insulintropic polypeptide
GWAS	genome-wide association study
HbA1c	hemoglobin A1c
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEK293	human embryonic kidney 293
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIV	human immunodeficiency virus
IDF	International Diabetes Federation
IRB	institutional review board
JDS	Japan Diabetes Society
K _m	Michaelis constant
LB medium	Lysogeny Broth medium
MBS	modified Barth's solution
MDCKII	Madin-Darby canine kidney II
MRP4	multidrug resistance-associated protein 4 (<i>ABCC4</i>)
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Na ⁺ /K ⁺ -ATP phosphohydrolase
NGSP	National Glycohemoglobin Standardization Program
<p>注)2012年4月1日より、HbA1cは、特定健康診査・保健指導等を除く日常臨床および著作物においてNGSP値、HbA1c(NGSP)を用い、当面の間、日常臨床ではJDS値を併記する。換算式(NGSP値(%)=1.02×JDS値(%) + 0.25%)に基づくNGSP値は、我が国でこれまで用いられてきたJapan Diabetes Society (JDS)値で表記されたHbA1c(JDS)におよそ0.4%を加えた値となり、特に臨床的に主要な領域であるJDS値5.0~9.9%の間では、JDS値(%) + 0.4%と完全に一致する¹⁾。</p>	
NPT1	sodium phosphate transporter 1 (<i>SLC17A1</i>)

NPT4	sodium phosphate transporter 4 (<i>SLC17A3</i>)
OAT1	organic anion transporter 1 (<i>SLC22A6</i>)
OAT3	organic anion transporter 3 (<i>SLC22A8</i>)
OAT4	organic anion transporter 4 (<i>SLC22A11</i>)
OAT10	organic anion transporter 10 (<i>SLC22A13</i>)
OGTT	oral glucose tolerance test
OR2	oocyte Ringer's (solution) 2
QOL	quality of life
PCR	polymerase chain reaction
S1	segment 1
S2	segment 2
S2 cell	segment 2 cell
S3	segment 3
SD	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	standard error of mean
SGLT1	sodium/glucose cotransporter 1 (<i>SLC5A1</i>)
SGLT2	sodium/glucose cotransporter 2 (<i>SLC5A2</i>)
<i>SLC</i>	solute carrier (transporter)
SMCT1	sodium/monocarboxylate cotransporter 1 (<i>SLC5A8</i>)
SMCT2	sodium/monocarboxylate cotransporter 2 (<i>SLC5A12</i>)
SMIT1	sodium/inositol cotransporter 1 (<i>SLC5A3</i>)
SMIT2	sodium/inositol cotransporter 2 (<i>SLC5A11</i>)
SOC medium	super optimal broth with catabolite repression medium
SU	sulfonylurea
SUA	serum uric acid
Tris	tris(hydroxymethyl)-aminomethane
UA	uric acid
UE _{GL}	urinary excretion rate of glucose
UE _{UA}	urinary excretion rate of uric acid
URAT1	uric acid transporter 1 (<i>SLC22A12</i>)
WHO	World Health Organization

第1章 序論

1. 糖尿病およびその患者数の概要と新規血糖降下薬の必要性

糖尿病とは、インスリン作用の不足による慢性の高血糖状態を主徴とし、種々の特徴的な代謝異常を伴う疾患群である。高い血糖値の持続は、口渇、多飲、多尿、体重減少、易疲労感などの症状を呈するが、それ以外の自覚症状は少ない。しかしながら、高度のインスリン作用不足は、血糖値の著しい上昇、ケトアシドーシス、高度脱水などを引き起こし、昏睡に陥る場合もある。また、慢性的に続く高血糖や代謝異常は、網膜、腎臓、神経を代表とする細血管の異常から視力障害または失明、腎障害、末梢神経障害などの細小血管合併症、いわゆる“三大合併症”を引き起こし、心臓、脳および全身において動脈硬化症、すなわち大血管合併症を促進し、患者のQOLを著しく低下させる^{1,2,3)}。

糖尿病は、その成因から4つに分類される (Table 1-1)。1型糖尿病は、インスリンを分泌する膵臓ランゲルハンス島β細胞の破壊性病変によるインスリンの欠乏による。β細胞破壊の原因は、主にヒト白血球型抗原などの遺伝因子にウイルス感染などの誘因・環境因子が加わって起こる「自己免疫性」であり、自己免疫が証明できない症例は「特発性」と分類する。1型糖尿病はあらゆる年齢層で起こり得る。2型糖尿病は、インスリン分泌やインスリン抵抗性をきたす複数の遺伝的因子に、過食、運動不足、肥満、ストレスなどの環境因子および加齢が加わり発症する。2型糖尿病の病態は「インスリン分泌の低下を主体とするもの」と「インスリン抵抗性が主体でインスリンの不足を伴うもの」があるが、実際の病態は不均一であり、明確に区別できない。日本人では糖尿病患者の90%以上は生活習慣の悪化が原因で起こる生活習慣病としての2型糖尿病である。他に、遺伝子異常やその他の疾患に伴う糖尿病、妊娠による妊娠糖尿病がある^{1,2)}。

Table 1-1 糖尿病と糖代謝異常の成因分類^{1,2)}

I. 1型: 膵β細胞の破壊、通常は絶対的インスリン欠乏に至る
A. 自己免疫性
B. 特発性
II. 2型: インスリン分泌低下を主体とするものと、インスリン抵抗性が主体で、それにインスリンの相対的不足を伴うものなど
III. その他の特定の機序、疾患によるもの
A. 遺伝因子として遺伝子異常が同定されたもの
①β細胞機能に関わる遺伝子異常 ②インスリン作用の伝達機構に関わる遺伝子異常
B. 他の疾患、条件に伴うもの
①膵外分泌疾患 ②内分泌疾患 ③肝疾患 ④薬剤や化学物質によるもの ⑤感染症
⑥免疫機序によるまれな病態 ⑦その他の遺伝的症候群で糖尿病を伴うことの多いもの
IV. 妊娠糖尿病

糖尿病の診断基準を Table1-2 に示す。①空腹時血糖（FPG）値が 126 mg/dL 以上、②75g 経口ブドウ糖負荷試験（75 g OGTT）で 2 時間値が 200 mg/dL 以上、③随時血糖値が 200 mg/dL 以上、④HbA1c（NGSP）が 6.5%以上のいずれかが確認された場合は「糖尿病型」と判定し、さらに別の日に再検査を行い、再度「糖尿病型」が確認されれば糖尿病と診断する。ただし、HbA1c のみの反復検査による診断は不可とする。また、同一採血でも①～③のいずれかと④が確認されれば、初回検査だけでも糖尿病と診断する。一方、⑤早朝 FPG 値が 110 mg/dL 未満でなおかつ⑥75 g OGTT で 2 時間値が 140 mg/dL 未満の場合は「正常型」と判定する。なお、上記のいずれにも属さない場合は「境界型」と判定する^{1,2,3)}。

Table 1-2 糖代謝異常の判定区分と判定基準^{1, 2, 3)}

判定基準	判定区分
①早朝 FPG 値 126 mg/dL 以上	①～④のいずれかが確認された場合は「糖尿病型」と判定する。 ただし、①～③のいずれかと④が確認された場合には、糖尿病と診断してよい。
②75 g OGTT で 2 時間値 200 mg/dL 以上	
③随時血糖値 200 mg/dL 以上	
④HbA1c(NGSP)が 6.5%以上	
⑤早朝 FPG 値 110 mg/dL 未満	⑤および⑥の血糖値が確認された場合には、「正常型」と判定する。
⑥75 g OGTT で 2 時間値 140 mg/dL 未満	
上記の「糖尿病型」「正常型」いずれにも属さない場合は「境界型」と判定する。	

境界型とは、WHO 分類での「耐糖能異常」と「空腹時血糖異常」に相当し、糖尿病型に移行する率が高い高リスクグループと考えられている。その病態は、インスリン分泌障害が主たるものと、インスリン抵抗性の増大が主たるものがあり、後者にはメタボリックシンドローム（内臓脂肪症候群）を呈するものが多い¹⁾。メタボリックシンドロームは、腹腔内脂肪蓄積とインスリン抵抗性を基盤とした、2 型糖尿病や動脈硬化性疾患の危険因子が個人に集積した病態と考えられている²⁾。

国際糖尿病連合 (IDF) の報告によると、2013 年の世界の糖尿病有病者数は 3 億 8,200 万人（成人の 8.3%）、それ以外にインスリン抵抗性患者が 3 億 1,600 万人と推定された。糖尿病が原因で死亡した人は、2013 年は 510 万人に上り、6 秒に 1 人が糖尿病のために亡くなっている計算になる。2013 年の糖尿病による経済的な損失は、総支出の 11%に相当する 54 兆 8,000 億円（5,480 億ドル）に上ると推定された。また、1 型糖尿病の患者数は欧州（12 万 9,400 人）や北米（10 万 8,600 人）で多い⁴⁾。2 型糖尿病の有病者数は、世界のすべての国で増加している。糖尿病有病者の 80%は低・中所得の国に集中しており、豊かな先進国に多い疾患というイメージはまったくの誤解である。さらに、糖尿病有病者の推定数 3 億 8,200 万人のうちの 46%は診断（治療）を受けていな

い。このまま有効な対策を施さないと、糖尿病有病者は2030年までに5億9,200万人に増加すると予測されている⁴⁾。

2013年の日本国内の糖尿病患者数は、前述のIDFの報告において720万人で、昨年の710万人から微増した。国別に最も多いのは中国(9,840万人)で、次いでインド(6,507万人)、米国(2,440万人)が続き、8位にドイツ(755万人)、日本は10位に位置した⁴⁾。厚生労働省の平成24年国民健康・栄養調査報告によると、糖尿病が強く疑われる人(HbA1c[NGSP]:6.5%以上または糖尿病の治療を受けている人)が1997年には690万人であったものが2013年には950万人(成人の8.7%)に達した。さらに、糖尿病の可能性が否定できない人(HbA1c[NGSP]:6.0%~6.5%)を加えると2050万人(同13.1%)と推定された⁵⁾。

上記のとおり糖尿病患者およびその予備軍が増加している現状において、既存の薬剤による治療については十分に満足できるものではないと考えられている。実際に海外においても国内においても糖尿病患者の寿命は数年から10年以上短いと言われている^{6,7)}。米国において2型糖尿病患者の半数は、HbA1cが米国糖尿病学会(ADA)の治療目標であるHbA1c(NGSP)「7.0%未満」に達しないとの報告がある⁸⁾。国内においては、ヒューマンサイエンス振興財団・医療ニーズ調査(2011)によると、今後、新たな薬剤による治療が必要な疾患では、アルツハイマー、膵癌、肺癌に次いで糖尿病が上位に挙げられた⁹⁾。さらに、2011年、大阪府豊能2次医療圏の約350の調剤薬局に糖尿病薬の処方箋を持参した1,026人の患者を対象に糖尿病実態アンケートを実施した結果、HbA1c(NGSP)の平均値は7.2%で、患者の約半数は日本糖尿病学会が定める血糖コントロールの目標の「7.0%未満」を達成していないことが明らかになった¹⁰⁾。これら、既存薬による血糖降下によって大血管合併症の発生や死亡の抑制が実現されない原因としては、多くの大規模臨床試験では動脈硬化が進行した患者を対象としていた可能性があり、2型糖尿病ではβ細胞の数や機能の経年的低下が生じる^{11,12)}ことから、既存の治療薬では効果が期待できない可能性が示唆されている¹³⁾。また、インスリンやSU薬によって助長される肥満や高インスリン血症が大血管合併症をむしろ促進した可能性も示唆されている¹³⁾。したがって、今後の2型糖尿病に求められる薬物療法は、十分な血糖降下作用がありながら、低血糖・体重増加・高インスリン血症などの副作用がなく、膵β細胞に対する保護作用があるものが望まれる。

2013年の現在、日本国内において承認されている血糖降下薬の特徴をTable1-3に、作用機序をFigure 1-1に示した。現在のところ、先にも述べたβ細胞の経年的機能低下を克服し、糖尿病を完治させる方法はない¹⁴⁾。したがって、糖尿病治療の目標は細小血管合併症(網膜症、腎症、

神経障害等) および大血管合併症(心筋梗塞、脳梗塞、閉塞性動脈硬化症等)などの合併症の発症や進展を抑制し、糖尿病患者のQOLや寿命を健康者と同じレベルに維持することである¹⁴⁾。

Table 1-3 血糖降下薬の特徴^{2, 3)}

主作用	使用	分類	一般名	主な副作用	主な禁忌
インスリン抵抗性改善	第1選択薬	ビグアナイド薬	メトホルミン、プロホルミン	乳酸アシドーシス ^{a)} 、胃腸障害	乳酸アシドーシスの既往、低酸素血症、(*)
	-	チアゾリジン誘導体	ピオグリタゾン	浮腫、心不全、体重増加、骨折、膀胱がん、黄斑浮腫	心不全、膀胱がん、(*)
インスリン分泌促進	第1選択薬	スルホニル尿素(SU)薬	トルブタミド、アセトヘキサミド、クロロプロバミド、グリクロピラミド、グリベンクラミド、グリクラジド、グリメピリド	低血糖 ^{b)} 、体重増加、肝障害	(*)
	-	速効型インスリン分泌促進薬	ナテグリニド、ミナグリニド、レバグリニド		(*)
	第2選択薬	DPP4阻害薬	シタグリプチン、ビルダグリプチン、アログリプチン、リナグリプチン、テネリグリプチン、アナグリプチン、サキサグリプチン	低血糖の増強、胃腸障害、急性膵炎	(*)
	-	GLP-1誘導体	リラグルチド、エキセナチド、リキシセナチド		1型糖尿病、糖尿病昏睡・ケトアシドーシス、重症の感染症
食後過血糖改善	第2選択薬	α -グルコシダーゼ阻害薬	アカルボース、ボグリボース、ミグリトール	肝障害、胃腸障害(放屁、下痢、満腹、便秘)	(*)

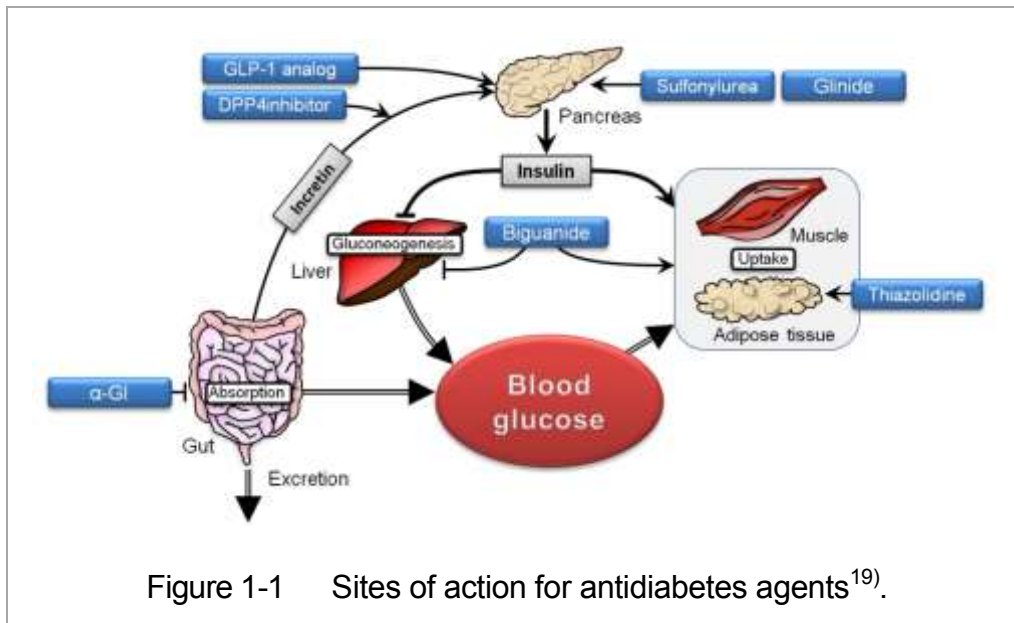
*全経口血糖降下薬共通：1型糖尿病、糖尿病昏睡・ケトアシドーシス、重症の肝障害・腎障害・感染症、妊娠(インスリン治療の絶対適応である)。

a) 適性条件下ではリスクは増加しない^{15, 16, 17)}。

b) 腎機能低下・高齢など低血糖を起こしやすい場合、速効型インスリン分泌促進薬の慎重投与を考慮。

糖尿病の薬物治療の第1選択薬は、ビグアナイド薬およびスルホニル尿素(SU)薬である³⁾。ビグアナイド薬は、主に肝臓での糖新生を抑制し、ほかに消化管からの糖吸収抑制、末梢組織でのインスリン感受性の改善などにより血糖を降下させ、体重増加もしにくい。重篤な副作用として乳酸アシドーシスがある。肝、腎、心、肺機能障害、循環障害、脱水、大量飲酒者、手術前後、高齢者、インスリン絶対適応の患者、栄養不良などの場合には使用できない^{2, 18)}。SU薬は、膵臓 β 細胞のSU受容体に結合してインスリン分泌を促進し、服用後短時間で血糖降下作用を発揮する。そのため症例によっては、投与量が少量でも低血糖を起こすことがある。 β 細胞を刺激してインスリン分泌を促進する機序であることから、投与中に臨床効果がなくなる場合があり、インスリン抵抗性による1次無効に対し「2次無効」と呼ばれ、代謝改善が不十分な場合は薬剤を切り替えるか他の経口薬との併用またはインスリン療法に変更する必要がある。また、SU薬は体重増加をきたしやすいので注意する必要がある²⁾。

第2選択薬は、 α -グルコシダーゼ阻害薬(α -GI)およびジペプチジルペプチダーゼ4(DPP4)阻害薬である³⁾。 α -GIは、小腸粘膜上皮細胞に存在する二糖類を単糖に加水分解する α -グルコシダーゼを阻害し、糖の吸収を遅らせることにより食後の高血糖を抑制する。単独投与では低血糖



を起こしにくい。食直前投与が必須である。副作用としては、腹部膨満感、放屁の増加、下痢などが認められる。 α -GIの1つアカルボースでは重篤な肝障害が報告されている²⁾。DPP4阻害薬は、小腸粘膜に局在する細胞から分泌され、グルコース濃度依存的にインスリン分泌を促進するインクレチン（GLP-1、GIP）を分解するDPP-4を阻害することにより血糖を降下させる。単独投与では低血糖の危険は少なく、膵臓の β 細胞への負担も少ない。シタグリプチン、アログリプチン、アナグリプチンは腎排泄型であるため腎機能障害患者で投与量の調節が必要となる²⁾。SU薬との併用で重篤な低血糖、ほかに胃腸障害が報告されており、膵癌、膵炎の懸念も完全に払拭されたとは言えない^{2,3,20)}。

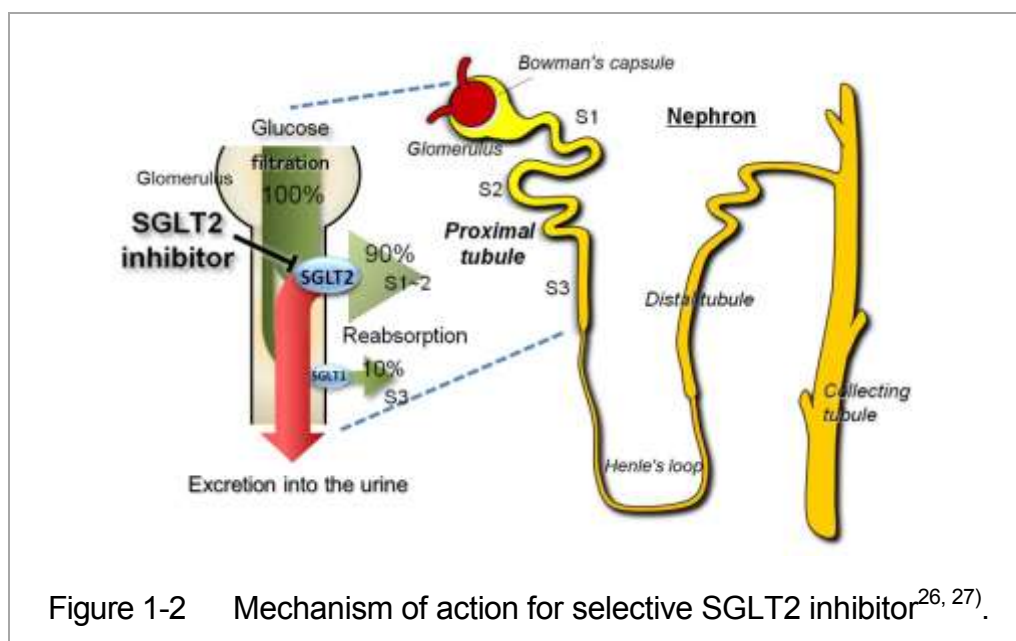
上記のほかに、チアゾリジン誘導体、速効型インスリン分泌促進薬およびグルカゴン様ペプチド1（GLP-1）誘導体がある²⁾。チアゾリジン誘導体は脂肪組織に作用し、インスリン抵抗性を改善する作用を持つ。インスリン抵抗性の関与がある状態では有効率が高い。単独投与では低血糖の危険は少ない。時に浮腫貧血などが認められ、体重が増加しやすい²⁾。国内では使用されていないが、同クラスのrosiglitazoneにおいて心血管リスク上昇が²¹⁾、ピオグリタゾンの疫学調査で膀胱がんのリスクが報告されている²²⁾。速効型インスリン分泌促進薬は、SU薬の一種であり作用機序も同一であるが、吸収および消失が速いことから、食後の高血糖を効率よく抑制するのが特徴である。食30分前投与では食事開始前に低血糖を起こす可能性があるため、必ず食直前に投与しなければならない。薬物のクリアランスが低下するため肝・腎障害者では特に注意が必要とされる。重篤な腎障害患者ではナテグリニドは禁忌、他は慎重投与が必要である²⁾。GLP-1誘

導体は、膵臓のβ細胞のGLP-1受容体を介して作用することによりグルコース濃度依存的にインスリン分泌を促進させる。体重増加はしにくく、β細胞への負担は少ない。注意すべき副作用は嘔吐、下痢・便秘、急性膵炎、SU薬との併用に際しての低血糖など、エキセナチド投与中に腎不全がまれに報告されている^{2,23)}。

以上のように、血糖降下薬には多くの種類があるが、現行の治療薬による目標達成率は50%に達せず、糖尿病患者の寿命も10年短い状況である。最近承認されたDPP4阻害薬ではそれまでに効果が出なかった患者層にも有効との評価結果が出つつあるが²⁴⁾、糖尿病との診断を受けた際には既にβ細胞の障害はかなり進んでいる症例も多い現状において、インスリン作用に依存する機序であるため体重増加に対しては有効でない。今後は、より早期の診断方法を開発しながら、できるだけ早期に安全に使える薬剤、インスリン分泌に頼らずβ細胞の保護が見込まれる薬剤が必要とされている²⁵⁾。

2. Sodium/glucose cotransporter 2 阻害薬

Sodium/glucose cotransporter 2 (SGLT2) 阻害薬は、SGLT2 を選択的に阻害することにより、グルコースの尿細管再吸収を抑制し、グルコースを体外に排泄して血糖を低下させるという作用機序を持つ新規クラスの血糖降下薬である (Figure 1-2)^{26,27)}。2013年現在、dapagliflozin が欧州²⁸⁾で、canagliflozin が米国²⁹⁾で承認されており、ほかに6種の開発化合物が後期臨床試験を実施中または終えている。



SGLT は、solute carrier 5 (SLC5) 遺伝子ファミリーに属している 14 回膜貫通型の輸送体であ

り、現在ヒトにおいて 11 種の isoform が報告されている³⁰⁾。そのうち SGLT2 とアミノ酸レベルで相同性が高いものは、SGLT1~5 ならびに sodium/inositol cotransporter (SMIT) 1 および 2 の 7 種である³⁰⁾ (Table 1-4)。これらは、生体内において Na⁺/K⁺-ATPase によって形成された Na⁺勾配を利用して単糖またはイノシトールを細胞内に取り込む働きを担っている³¹⁾。

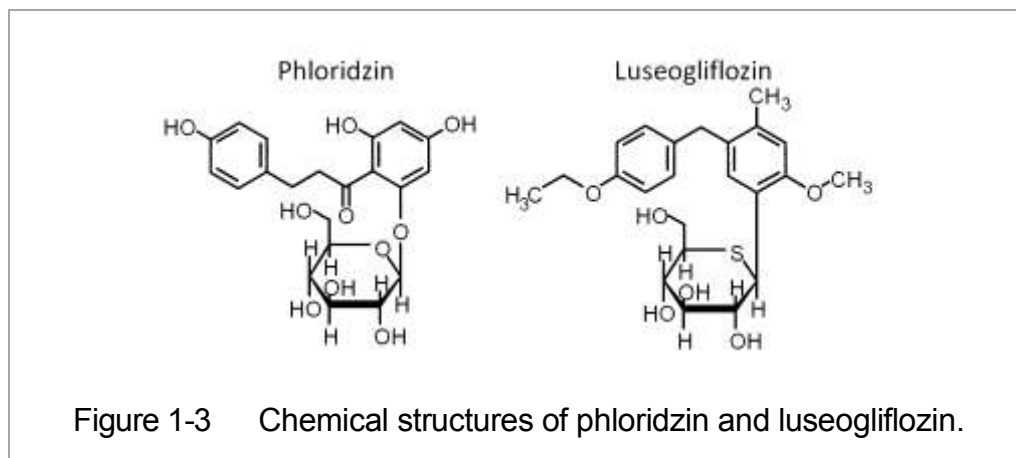
以下にそれぞれの特徴を簡単に説明する。SGLT1 は主に小腸上皮に発現し、グルコースおよびガラクトースの吸収に関わる。ほかに腎臓、気管および心臓などにも発現する^{32,33,34,35)}。SGLT2 は腎臓の近位尿細管の S1 部位を中心に強く発現し^{34,35)}、グルコースの再吸収に関わる^{36,37)}。SGLT3 は、小腸に多く発現するが、グルコース輸送能は持たずにグルコースセンサーとして機能していると考えられている^{34,38)}。SGLT4 は、主に小腸に発現し、グルコースおよびマンノースを輸送する^{33,34)}。SGLT5 は、腎臓に多く発現し、マンノースおよびフルクトースを輸送する^{34,39,40)}。SMIT1 および 2 は、主に脳に発現し、イノシトールを取り込むが、生体での機能の詳細は明らかになっていない^{34,41,42,43,44)}。

Table 1-4 Highly-homologous SLC5 family members with human SGLT2.

Protein	Gene	Main expressing tissue in human	Substrate (Km)	Amino acid homology to hSGLT2
SGLT1	SLC5A1	small intestine>trachea, skeletal muscle, heart, kidney, large intestine	glucose (1.8 mM) galactose (6.1 mM)	59%
SGLT2	SLC5A2	kidney	glucose (4.9 mM)	100%
SGLT3	SLC5A4	small intestine> skeletal muscle	glucose (20 mM)	56%
SGLT4	SLC5A9	small intestine>pancreas, skeletal muscle, kidney, liver	glucose (2.6 mM) mannose (0.15 mM)	54%
SGLT5	SLC5A10	kidney	mannose (0.45 mM) fructose (0.62 mM)	55%
SMIT1	SLC5A3	brain>kidney, thyroid gland, testis, fallopian tube	inositol	46%
SMIT2	SLC5A11	brain> spinal cord, small intestine	inositol (0.16 mM)	50%

SGLT2 阻害薬は、リンゴの樹皮などに存在し、非選択的な SGLT 阻害剤である phloridzin (Figure 1-3) を基本骨格として種々の誘導体が合成された。Phloridzin はグルコースに *O*-グリコシド結合でアグリコンが付いた構造であり、消化管の β -グルコシダーゼにより加水分解されやすいため経口投与時の bioavailability が低い。血糖降下薬として開発された初期の化合物群はいずれも *O*-グリコシド型であったため、bioavailability が改善できなかった¹⁹⁾。そこで、次の世代の化合物群は、グルコースとアグリコンが直結された *C*-グリコシド結合型となり、顕著な bioavailability の改善が図られた。さらに、腎臓で再吸収されるグルコースの 80~90%以上を担う SGLT2 を標的とし、SGLT2 への選択性の高い開発候補化合物が創製された。SGLT2 への選択性を上げることにより、

SGLT1 による再吸収経路を確保でき、血糖降下薬にとって重要である作用の超過による低血糖リスクを低下させることができると考えられている。また、SGLT2 への選択性を上げることにより Table 1-4 に示した近縁の SGLT isoform などのオフターゲットへの予期せぬ作用も回避することが可能となる¹⁹⁾。

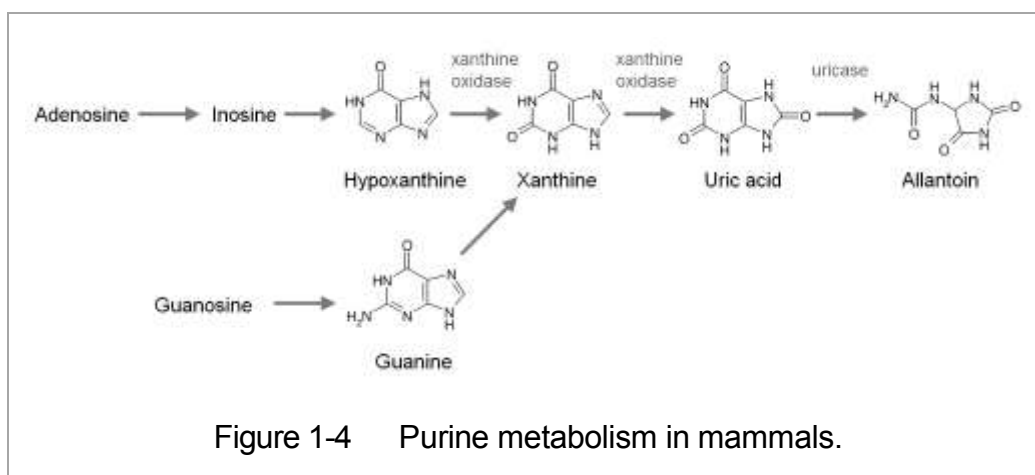


SGLT2 阻害薬の作用上での特徴は、インスリン作用に依存しないことである。インスリン作用を介さずに血糖を下げるため、過剰なインスリン作用に基づく低血糖および体重増加が出現する可能性が低く、膵β細胞へ負担をかけることなく血糖をコントロールすることが可能である^{19, 26, 27)}。また、初期の SGLT2 阻害薬である、T-1095 を糖尿病モデルである db/db マウスに経口投与したときに膵β細胞の保護作用を示すことが報告されている⁴⁵⁾。インスリンを含めた他のクラスの血糖降下薬の作用は、血糖を下げるためにグルコースを細胞内に溜め込むため、脂肪として蓄積されてしまう結果につながる。これらに対し、SGLT2 阻害薬は余分な糖を体外に排出するという機序により体脂肪を減少させ、それに伴うインスリン抵抗性を改善する作用が期待されている。したがって、SGLT2 阻害薬は2型糖尿病の重症度、インスリン分泌不全、インスリン抵抗性の重症度によらず幅広い患者層において有用性が示唆されている¹⁹⁾。当初に問題とされた SGLT2 を長期間阻害することによる健康への影響は、家族性腎性糖尿が SGLT2 の欠損に起因することか明らかになり、かつ一般生活に問題ないことが示されたことから、長期的にも問題ないと考えられている³⁸⁾。現在、多くの SGLT2 阻害薬が開発されており、後期臨床試験において有用性および安全性が確認されている^{46, 47, 48, 49)}。そして、これら SGLT2 阻害薬には、主薬効の他に血清尿酸(SUA)値を低下させる作用を持つことが、luseogliflozin^{50, 51)} (Figure 1-3) を含め、情報のある5つの薬物で認められた^{52, 53, 54, 55)}。

3. 血糖降下薬による血清尿酸値低下作用の意義

ヒトを含む類人猿のグループでは、尿酸（UA）をアラントインに分解するウリカーゼが不活性化している⁵⁶⁾。そのためプリン代謝系の最終産物はUAとなり（Figure 1-4）⁵⁷⁾、ヒトのSUA値は他の哺乳類と比較して約5～10倍も高い^{58,59)}。UAは還元力が強いことから、アスコルビン酸合成系を欠損した類人猿においてアスコルビン酸に代わり抗酸化的にラジカル除去に重要な役割を担っていると考えられている^{58,60,61)}。その一方で、糖尿病における血糖と同様に、SUA値が一定の値を超えると病的状態である高尿酸血症になる。高尿酸血症とは、**痛風関節炎、腎障害をはじめとする尿酸塩沈着症の病因であり、血清尿酸値が7.0 mg/dLを超えるもの**と定義されている⁶²⁾。

最近の日本における2つの大規模な調査の結果によると、高尿酸血症の頻度は、成人男性において21.5%および26.2%と高い割合であった^{63,64)}。年齢別では30歳代、40歳代が最も多く、30歳代の頻度は30%に達した⁶³⁾。痛風発作の有病率については、和歌山県の一部の地域で行われた住民調査の結果、全体で0.5%、男性で1.1%との報告がある⁶⁵⁾。これらの痛風患者はすべて30歳



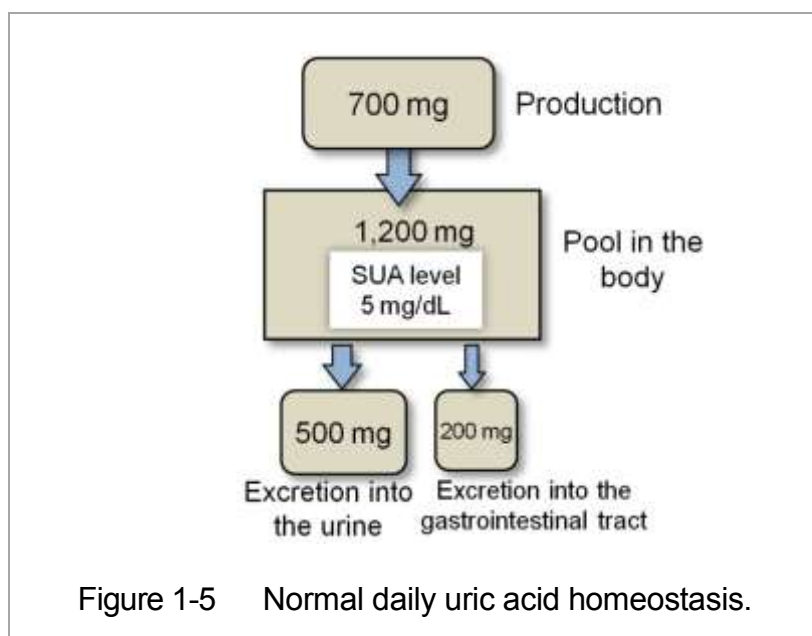
以上の男性で、このグループの有病率は1.7%であった。この地域の年齢構成は日本の平均値と類似しているため、ここで得られた有病率は日本人男性が生涯のうちに痛風を発症する割合に近いと考えられる。したがって、これは日本人男性の約60人に1人が痛風を発症することを示すことになる⁶²⁾。

高尿酸血症により高いSUA値が持続すると痛風発作の発症率が高くなる^{66,67,68,69)}。痛風に加えて、近年、一般集団病においてSUA値が高いほど腎機能が低下し慢性腎臓病（CKD）の発症や進展に関係することが示され^{70,71,72)}、2型糖尿病においてもSUA値とCKDに関係があること⁷³⁾、SUA値の上昇に伴ってメタボリックシンドロームの頻度が上昇することが示されている^{74,75)}。

さらに高血圧^{76,77,78)}および心血管系障害^{72,79,80,81)}に関しては、関連があるとする報告と関連がないとする報告が混在する。UA は一般的にはラジカルを除去する方向に働くが⁵⁸⁾、細胞内に取り込まれるとラジカル発生を促進する方向に働くとの報告がある⁸²⁾。これらの知見は、UA がCKD および心血管系疾患のリスクファクターとなることを説明することができる。

現在、新規の血糖降下薬のクラスとして SGLT2 阻害薬が開発されつつあり、それらに SUA 値を低下させる作用が認められた^{52,53,54,55)}。糖尿病においては、冒頭で述べたとおり高血糖や代謝異常から、細小血管および大血管の合併症を引き起こし進展させる。したがって、糖尿病患者において循環系への負の要素が取り除かれることは有用なことであると考えられる。

通常、健康成人の体内には約 1200 mg の UA プールが存在する⁵⁷⁾。UA は主に肝臓や筋肉で産生され、一日の産生量は約 700 mg になる。UA の産生にはキサンチンオキシダーゼが関わっている。一日に産生されるうちの約 70% (500 mg) は腎臓により尿中へ排泄され、残り (200 mg) は唾液、胃液および消化管分泌液として消化管へ排泄される (Figure 1-5)^{57,83)}。腎臓における UA の輸送には再吸収と分泌の両者が存在し、糸球体濾過を受けた UA は最終的に約 90% が再吸収され、尿中へ排泄されるのは 6~10% である^{84,85)}。UA はアニオンとしての極性物質であり細胞膜を透過できないため、細胞内外への輸送には UA 輸送体が関わっている^{86,87)} (第 3 章にて詳細に述べる)。



高尿酸血症の成因は、UA 産生過剰型と UA 排泄低下型および両者の混合型に大別される^{66,88)}。1982 年の国内における報告によると、産生過剰型が 12%、排泄低下型が 60%、混合型が 25%、

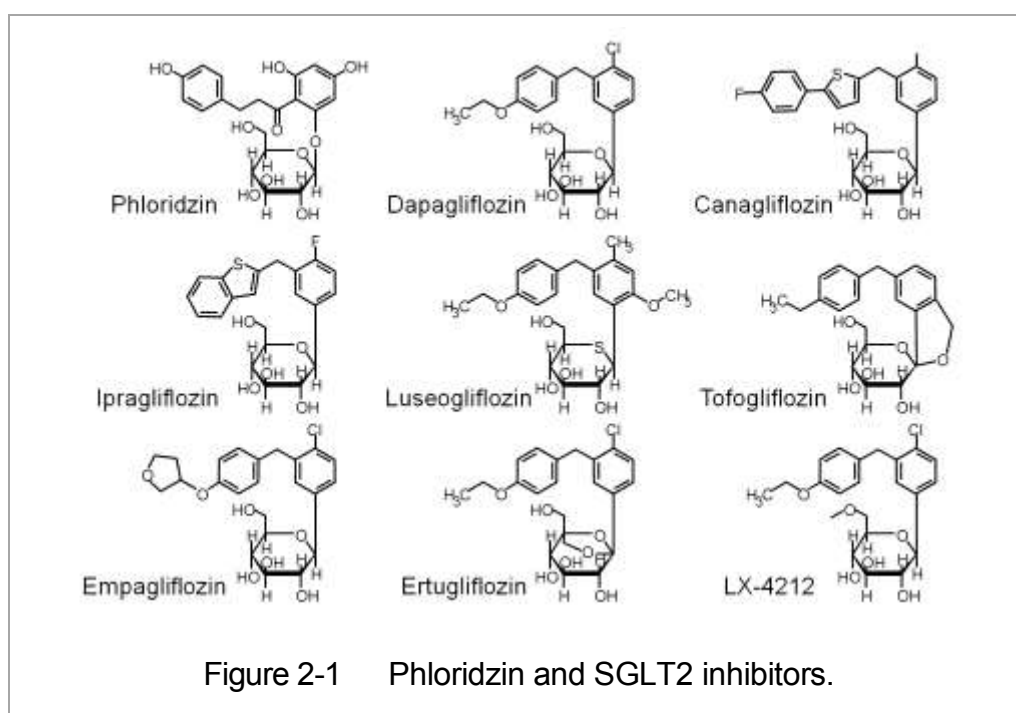
正常型が3%と推定されている⁸⁹⁾。SUAを低下させる高尿酸血症の治療薬には、これらUAの産生に働くキサンチンオキシダーゼを阻害するUA生成抑制薬とUAの腎臓における再吸収を抑制するUA排泄促進薬の2つがある⁶²⁾。

上記のことから、SGLT2阻害薬のSUA低下作用の機序についても、UA産生を抑制する可能性およびUA排出を促進する可能性の2つが考えられる。今回の検討では、*luseogliflozin*をモデル薬物として、SGLT2阻害薬のSUA値低下作用の機序を明らかにすること、ならびに本作用の有用性、安全性を見極めることを目的とした。第2章においては、健康成人および糖尿病患者に*luseogliflozin*を投与したときの臨床検査値を精査し、SUA値の低下作用の特徴を明らかにした。第3章においては、その作用機序の解明を目的として*in vitro*にて*luseogliflozin*のUA輸送体への作用およびSGLT2によるUA輸送への寄与を検討した。さらに、第4章において、SGLT2阻害の結果として尿中で濃度が上昇するグルコースについてGLUT9 isoform 2への作用を検討した。

第2章 Luseogliflozin の血清尿酸値低下作用および尿酸排泄作用

第1節 緒言

SGLT2 阻害薬には、主薬効の他に SUA 値を低下させる作用を持つことが、dapagliflozin⁵²⁾、canagliflozin⁵³⁾、ipragliflozin⁵⁴⁾および empagliflozin⁵⁵⁾において報告されている (Figure 2-1)。現在のところ、luseogliflozin を加えて、情報のあるすべての SGLT2 阻害薬において SUA 値の低下が観測されている。さらに、非選択的 SGLT 阻害剤として知られる phloridzin に関しては、UA の尿中排泄促進作用を持つことが 40 年以上前に報告されている^{90,91)}。以上より、SUA 値の低下作用は、SGLT2 阻害薬におけるクラス効果と予想される。なお、phloridzin の UA 排泄促進作用はその後具体的な機序は明らかにされていない。



UA と糖尿病に関しては密接な関わりがある。第 1 に、糖尿病の原疾患であるインスリン抵抗性と SUA 値が相関するという報告は数多く存在し^{92,93,94,95,96,97)}、SUA 値が糖尿病の独立した予測因子となることも報告されている⁹⁸⁾。健康成人の血中インスリン濃度を強制的に上昇させると、尿中の Na⁺排泄量とともに UA の排泄量も低下することが示され、インスリンは Na⁺とともに UA の腎における再吸収を亢進させる作用を持つと考えられている⁹⁵⁾。インスリン抵抗性による高インスリン状態は Na⁺/K⁺-ATPase を活性化し、細胞内外での Na⁺勾配を強化する。それにより、ナ

トリウム-モノカルボン酸共輸送体1および2 (SMCT1/2) による Na^+ 依存的なモノカルボン酸の再吸収が促進され、モノカルボン酸を交換基質として UA を取り込む uric acid transporter 1 (URAT1) の活性化につながる機序が想定される^{99,100)}。

第2に、糖尿病を発症して尿糖が出現すると SUA 値が低下することが報告されている^{92,93,97,101)}。40歳以上の男性約10,000人の SUA 値と耐糖能を検討した研究では、正常者に比べて耐糖能異常者では SUA 値は高値を示すものの、糖尿病患者では正常者よりも SUA 値が低値を示した⁹²⁾。このように、糖尿病の前段階まではインスリン抵抗性の進行に伴って SUA 値が上昇するが、尿糖出現後には SUA 値が低下に転じる現象 (逆U字現象) が見られる⁹⁷⁾。これは、尿糖の出現により UA の腎排泄が増えるため^{92,97,101)}、機序としてはグルコースによる UA 再吸収の阻害が考えられているが^{92,101)}、尿糖により SUA 値が低下する機序の詳細はいまだ明らかになっていない。

糖尿病患者における尿糖出現に伴う SUA 値の低下現象に関しては、SGLT 阻害剤による SUA 値低下作用と類似性も認められる。今回著者の所属機関において、luseogliflozin の薬物動態、薬力学および安全性を検討する目的で行った3つの臨床試験にて、安全性評価の一環として血漿および尿中の SUA 値データを得ていたことから、これらの測定値に関し、SUA 値の低下作用の特徴について解析を試みた。

第2節 試験および解析方法

1. 臨床試験の概要

健康成人および2型糖尿病患者における luseogliflozin の薬物動態、薬力学および安全性を検討するため、①健康成人における単回投与試験、②健康成人における7日間反復投与試験および③2型糖尿病患者における7日間反復投与試験を実施した。本研究においては、この3つの臨床試験における血漿および尿中の臨床検査値データ、luseogliflozin の血漿中濃度データおよび尿糖排泄データを用いた。

1-1. ヘルシンキ宣言およびGCP遵守の陳述

いずれの臨床試験も「ヘルシンキ宣言」¹⁰²⁾に基づく倫理的原則、「薬事法第14条3項および第80条の2」¹⁰³⁾に規定する基準、平成9年3月27日付厚生省令第28号「医薬品の臨床試験の実施の基準（GCP）に関する省令」¹⁰⁴⁾を遵守して実施された。

1-2. 治験委員会の承認および被験者の同意の確認

いずれの治験実施計画書も、臨床試験審査委員会（IRB）の承認を事前に得た。健康成人における単回投与試験および7日間反復投与試験は、医療法人相生会九州臨床薬理クリニック（福岡県福岡市）のIRBの承認を得た。2型糖尿病患者における7日間反復投与試験は、医療法人社団慶幸会ピーワンクリニック（東京都八王子市）のIRBの承認を得た。すべての被験者は、割り付け前に書面にて同意の確認を行った。

2. 被験者

2-1. 健康成人

単回投与試験では、57人の健康成人（日本人）が、反復投与試験では24人の健康成人（日本人）が試験に参加した（Table 2-1）。健康成人は、加齢による腎機能等への影響を少なくするため年齢20歳以上40歳未満とし、スクリーニング検査で健康と診断されたものとした。検査は臨床検査、心電図、身体検査、耐糖能検査を行った。主な除外基準は、既往歴、試験前4週間での3kg以上の体重変動、何らかの薬剤使用に該当するものとした。

2-2. 2型糖尿病患者

39人の2型糖尿病患者（日本人）が試験に参加した（Table 2-1）。2型糖尿病患者は、年齢

20歳以上75歳未満で、HbA1c (NGSP) が6.5~10.0%、空腹時血糖 (FPG) 値が126 mg/dL以上を記録したものとした。主な除外基準は、クレアチニン値が基準以上、腎疾患を有するもの、開始前4週間にインスリン、経口血糖降下薬、12週間以内にチアゾリジン誘導体にて治療を行ったもの、感染症陽性のものとした。

3. 試験デザイン

3-1. 健康成人での単回投与試験

57人の適格者を placebo、1、3、5、9、15 および 25 mg 群にランダムに割り付けた。治験薬 (placebo または luseogliflozin) は、10時間以上の絶食下で 200 mL の水で経口投与された。薬物動態評価のための採血は、投与前、投与後 0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、12、24、48、72 および 96 時間に行い、薬力学評価のための採血は、投与前、投与後 0.5、1、2、4、4.5、5、6、8、12、12.5、13、14、16、24、48 および 96 時間に行った。薬物動態評価および薬力学評価のための蓄尿は、投与前 24 時間、投与後 0-2、2-4、4-6、6-8、8-10、10-12、12-16、16-24、24-48、48-72、72-96 時間に行った。

3-2. 健康成人での7日間反復投与試験

24人の適格者を placebo、5 および 10 mg 群にランダムに割り付けた。治験薬 (placebo または luseogliflozin) は、1日一回、朝食直前に 200 mL の水で7日間にわたり経口投与された。薬物動態評価および薬力学評価のための採血は、Day 1 および Day 7 は、単回投与と同様の時間に行い、Day 2~6 は投与前のみ、Day 8~11 はそれぞれ朝1回採血を行った。薬物動態評価および薬力学評価のための蓄尿は、Day 1 と Day 7 は単回投与と同様の時間に行い、初回投与前日と Day 2~6 および Day 8~11 は 24 時間間隔で行った。

3-3. 2型糖尿病患者での7日間反復投与試験

39人の適格者を placebo、0.5、1、2.5 および 10 mg 群にランダムに割り付けた。治験薬 (placebo または luseogliflozin) の投与、採血および蓄尿は、健康成人での7日間反復投与試験と同様に行った。

4. 測定方法

4-1. グルコース (血糖および尿糖)

血液は採取後直ちに遠心分離 (4°C、3000 rpm、10 分) して血漿を得た。血漿および尿中

のグルコースは自動分析装置（TBA-120FR、東芝、Glucoroder NX、A&T または 7180、日立）を用い、glucose dehydrogenase 法で測定した。

4-2. 尿酸（血清および尿）

自動分析装置（TBA-120FR、東芝、Glucoroder NX、A&T または 7180、日立）を用い、uricase-peroxidase 法¹⁰⁵⁾で測定した。なお、高尿酸血症の診断目的では3日前より高プリン食および飲酒を制限し、当日に絶食を行うが⁸⁸⁾、今回は3日前からの高プリン食制限、飲酒制限は行わず、健康成人での単回試験のみで絶食を行った。

4-3. クレアチニン（血清および尿）

自動分析装置（TBA-120FR、東芝、Glucoroder NX、A&T または 7180、日立）を用い、creatinase-sarcosine oxidase-peroxidase 法¹⁰⁶⁾で測定した。

4-4. 血漿中 Luseogliflozin

血漿中の luseogliflozin 濃度は、重水素標識 luseogliflozin を内部標準物質として添加後、OASIS HLB（Waters）にて固相抽出したのち、高速液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトロメトリー（API4000、Applied Biosystems/MDS SCIEX、Foster City, CA, USA）で測定した。定量限界は 0.0500 ng/mL であった¹⁰⁷⁾。

5. データ解析

5-1. 尿酸の腎クリアランスおよびクレアチニンの腎クリアランス

UA の腎クリアランス (CL_{UA}) およびクレアチニンの腎クリアランス (CL_{CRE}) は、以下の式を用いて計算した。なお、薬物投与後 1 日 (Day 1) の場合は、SUA 値の低下が大きいことから baseline 値と Day 1 値の平均値を用いた。

$$CL \text{ (mL/min)} = \frac{\text{尿中濃度 (mg/dL)} \times \text{尿量 (1 mL/min)}}{\text{血清中濃度 (mg/dL)}}$$

5-2. 血漿中未変化体濃度の薬物動態パラメータ

健康成人での単回投与試験における被験者各人の血漿中未変化体濃度から、薬物動態解析ソフト WinNonlin (Ver. 5.2) を用い、モデル非依存的方法（ノンコンパートメント解析法）により AUC_{0-24h} を算出した。

5-3. 平均値、標準偏差および標準誤差の算出

試験ごとの全被験者の背景値における年齢、体重、HbA1c (NGSP)、空腹時血糖 (FPG)、尿中グルコース排泄速度 (UE_{GI})、SUA 値、尿中 UA 排泄速度 (UE_{UA})、CL_{UA} および尿量について、平均値および標準偏差 (SD) を算出した。

各試験の群ごとの SUA 値、UE_{UA}、CL_{UA}、CL_{CRE} および尿量について、治験薬投与前 (baseline 値) および投与後の各測定時期の値ならびに投与前後の差の平均値および標準誤差 (SEM) を算出した。

6. 統計解析

背景値においては、健康成人における単回投与試験の被験者と 7 日間反復投与試験の被験者の間および健康成人全体と 2 型糖尿病患者の間で Student's *t*-test により検定を行った。治験薬 (placebo または luseogliflozin) 投与後は、placebo 群に対する実薬投与各群の比較は Dunnett's test により、任意の 2 群間の比較は分散分析を行ったのち、Student's *t*-test または Aspin-Welch's *t*-test により検定を行った。相関関係は最小二乗法により回帰分析を行った。統計的有意差は $p < 0.05$ の場合に有意差ありと判定した。

第3節 結果

1. 被験者の背景値 (baseline 値)

今回解析した luseogliflozin における3つの臨床試験の被験者の背景値を Table 2-1 および Figure 2-2 に示す。

健康成人の単回投与試験と反復投与試験の被験者の背景値は、 CL_{UA} において有意差が認められたが、そのほかのパラメータでは有意差がなかった。2型糖尿病患者は、健康成人全体に対して有意に年齢が高く、体重が重く、糖尿病の病態である HbA1c (NGSP)、空腹時血糖 (FPG) 値、尿中グルコース排泄速度 (UE_{GL}) および尿量が高値を示した。UA に関するパラメータでは、SUA 値に有意差は認められなかったが、 UE_{UA} および CL_{UA} は糖尿病患者の方が有意に高値であった (Figure 2-2)。

健康成人 81 例の SUA 値は、78 例 (96.3%) が正常値 (7 mg/dL 以下)^{108, 109)}で、3 例 (3.7%) が正常範囲よりも高値であった。2型糖尿病患者 39 例の SUA 値は、34 例 (87.2%) が正常範囲内値で、5 例 (12.8%) が正常範囲よりも高値であった。

次に、背景値における SUA 値と UE_{UA} の関係、SUA 値と CL_{UA} の関係を Figure 2-3 に示す。SUA 値と UE_{UA} の関係に相関は認められなかったが、SUA 値と CL_{UA} の関係には有意な相関が認められた (Figure 2-3)。

Table 2-1 Demographic and baseline characteristics.

Clinical characteristics	Single dose study in healthy subjects	Multiple dose study in healthy subjects	Multiple dose study in diabetic subjects
Male (n)	57	24	33
Female (n)	0	0	6
Age (years)	26.5 ± 5.5	28.9 ± 5.9	57.5 ± 8.6
Body weight (kg)	61.8 ± 5.9	62.4 ± 6.8	71.3 ± 12.6
HbA1c(NGSP)(%)	5.1 ± 0.2	5.1 ± 0.2	8.4 ± 1.0
FPG (mg/dL)	91.1 ± 4.8	89.3 ± 5.7	159.9 ± 28.6
UE_{GL} (g/day)	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.2	27.3 ± 22.9
Urine volume (mL/day)	2374 ± 795	2630 ± 756	2997 ± 1037
SUA level (mg/dL)	5.7 ± 0.8	5.5 ± 0.9	5.4 ± 1.4
UE_{UA} (mg/day)	556 ± 90	589 ± 91	705 ± 115
CL_{UA} (mL/min)	6.88 ± 1.29	7.68 ± 2.20	9.62 ± 2.95

Data are the mean ± SD.

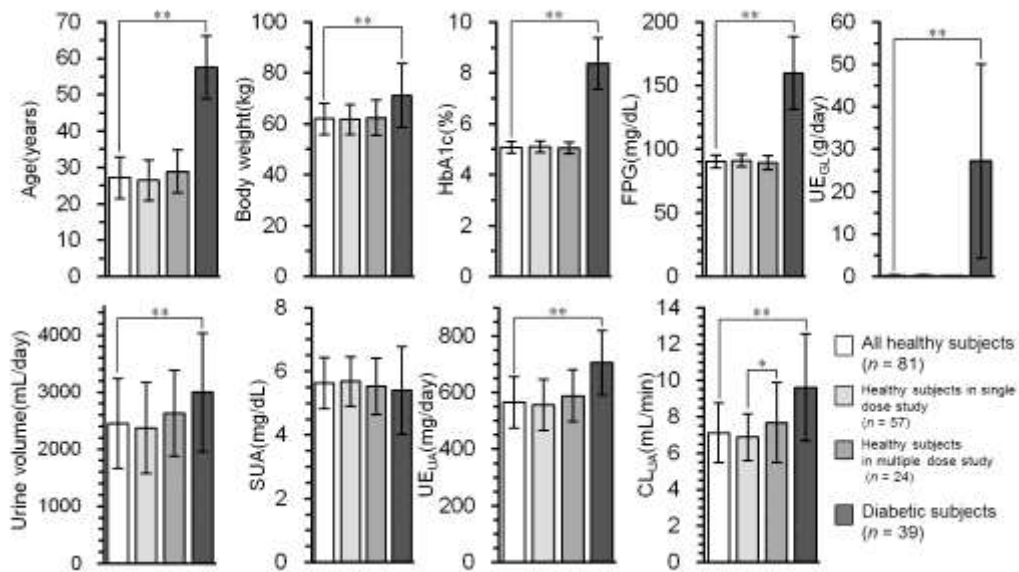


Figure 2-2 Demographic and baseline characteristics.

Data are the mean \pm SD.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student's t -test).

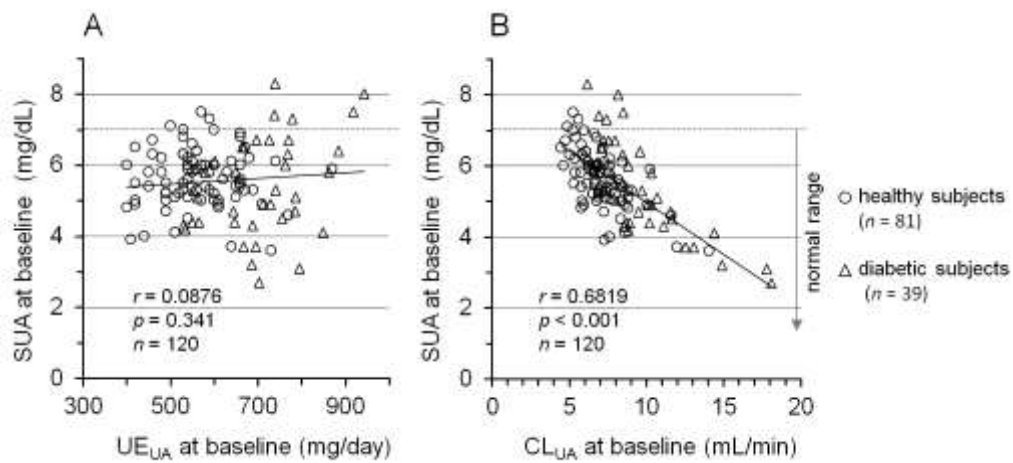


Figure 2-3 Relationship serum uric acid (SUA) level and urinary excretion rate of UA (UE_{ua}) (A) and urinary clearance of uric acid (CL_{ua}) (B) at the baseline.

2. Luseogliflozin の SUA 値低下作用

治験薬 (placebo または luseogliflozin) を投与後の SUA 値について、baseline 値からの変化量を Figure 2-4 に示す。

健康成人に luseogliflozin を投与後の SUA 値は、すべての投与群において低下し、3 mg 以上の群で placebo 群に比べて有意に低下した (Figure 2-4A, B)。1~25 mg を単回投与後 24 時間の SUA 値の変化量は、-0.50~-1.59 mg/dL (placebo 群 : +0.36 mg/dL) であった。5 mg または 10 mg を 7 日間反復投与したときの SUA 値の変化量は、Day 1 にそれぞれ-1.39 および-1.33 mg/dL (placebo 群 : -0.04 mg/dL) であったが、Day 3 では、ほぼ下げ止まり Day 7 まで同じレベルで推移した。

2 型糖尿病患者に luseogliflozin を反復投与したときの SUA 値は、Day 1 および Day 7 のいずれにおいても変化量に placebo 群との有意な差は認められなかった (Figure 2-4C)。

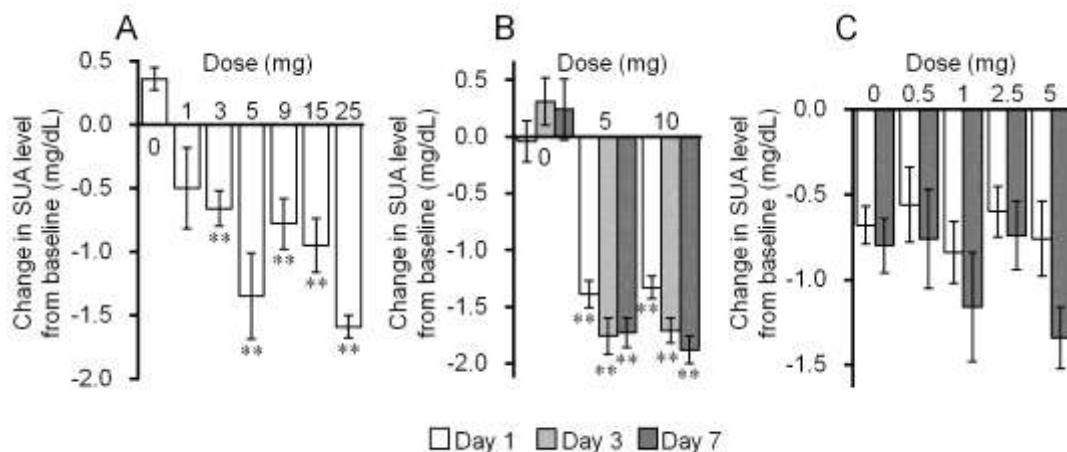


Figure 2-4 Effect of luseogliflozin on serum uric acid (SUA) level.

Changes in SUA level from the baseline after a single dose in healthy subjects (A, $n = 3\sim 14$), multiple dose in healthy subjects (B, $n = 8$), and multiple dose in diabetic subjects (C, $n = 7$ or 8). Data are shown as the mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ vs. placebo (0 mg) (Dunnett's test).

3. Luseogliflozin の UE_{UA} 促進作用

治験薬 (placebo または luseogliflozin) を投与後の尿中 UA 排泄速度 (UE_{UA}) について、baseline 値からの変化量を Figure 2-5 に示す。

健康成人に luseogliflozin を投与したとき、 UE_{UA} の顕著な増加が認められた (Figure 2-5A、B)。Luseogliflozin を投与後 24 時間までの UE_{UA} は、最少投与量の 1 mg 群においても baseline 値に比べて有意に増加し、1~25 mg 群の値は 189~268 mg/day (placebo 群: -59 mg/day) であった (Figure 2-5A)。 UE_{UA} の増加は、1 mg 群でプラトーに達していた。7 日間反復投与した場合は、Day 1 が最も排泄量が多く、5 mg 群および 10 mg 群の値は 279 および 243 mg/day であった (placebo 群: -85 mg/day)、Day 3、Day 7 は日数を経るに従い排泄速度が減少した (Figure 2-5B)。

糖尿病患者に luseogliflozin を反復投与したとき、Day 1 の UE_{UA} は増加し、0.5~5 mg 群の値は -13~75 mg/day (placebo 群: -38 mg/day) であり、1 mg 群および 5 mg 群で有意な差が認められた。Day 7 では健康成人と同様に排泄量の増加は認められなかった (Figure 2-5C)。

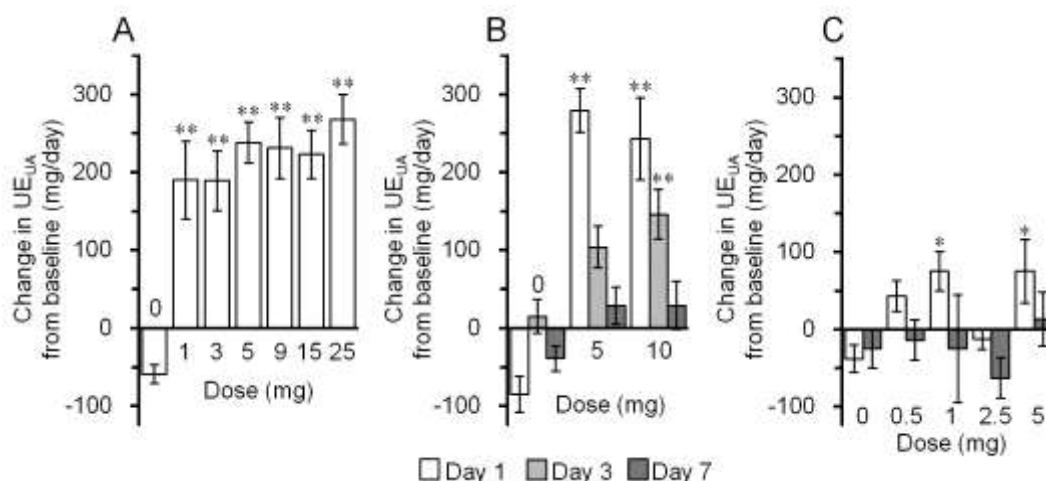


Figure 2-5 Effect of luseogliflozin on the urinary excretion rate of UA (UE_{UA}).

Changes in UE_{UA} from the baseline after a single dose in healthy subjects (A, $n = 3\sim 14$), multiple dose in healthy subjects (B, $n = 8$), and multiple dose in diabetic subjects (C, $n = 7$ or 8). Data are shown as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. placebo (0 mg) (Dunnett's test).

4. Luseogliflozin 投与による CL_{UA} の変化

治験薬 (placebo または luseogliflozin) を投与したときの SUA 値と UE_{UA} から UA クリアランス (CL_{UA}) を算出した。

健康成人に luseogliflozin を単回投与したときの 1~25 mg 群の CL_{UA} は placebo 群に比べて有意に上昇した (Figure 2-6A)。 UE_{UA} では 1~5 mg 群の間では差がみられなかったが、 CL_{UA} では投与量依存的に増加し、5 mg 付近でプラトーになった。健康成人に反復投与したときは、Day 1 で placebo 群に比べて有意な上昇がみられ、Day 7 においても Day 1 と同様に高値を示した (Figure 2-6B)。

糖尿病患者に luseogliflozin を反復投与したとき、Day 1 の 1 mg 群において CL_{UA} 上昇が認められ、Day 7 では placebo 群との差は認められなかった (Figure 2-6C)。

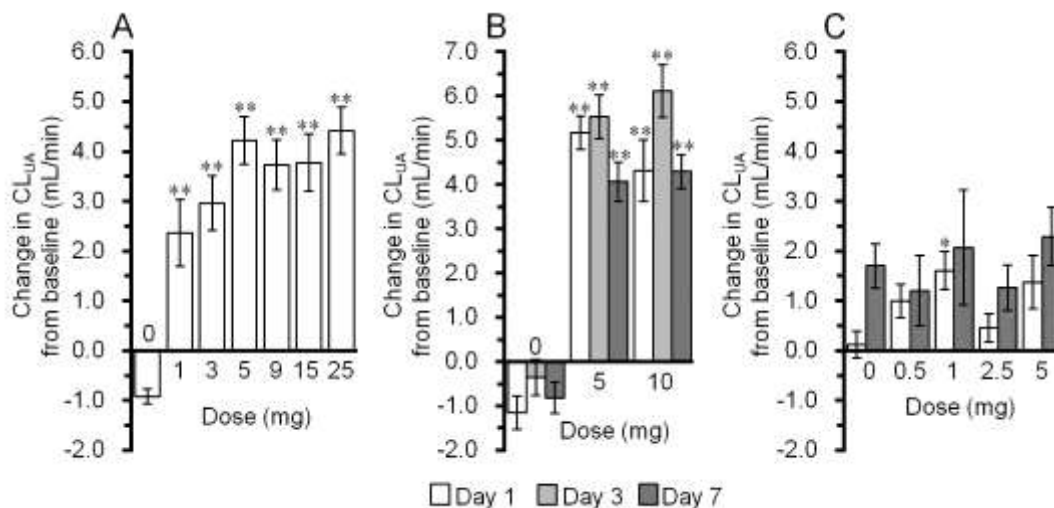


Figure 2-6 The renal clearance of uric acid (CL_{UA}) after administration of luseogliflozin.

Changes in CL_{UA} from the baseline after a single dose in healthy subjects (A, $n = 3\sim 14$), multiple dose in healthy subjects (B, $n = 8$), and multiple dose in diabetic subjects (C, $n = 7$ or 8). Data are shown as the mean \pm SEM.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. placebo (0 mg) (Dunnett's test).

5. Luseogliflozin 投与による CL_{CRE} の変化

Luseogliflozin の腎機能への影響を確認するために、治験薬 (placebo または luseogliflozin) を単回または反復投与したときのクレアチニンクリアランス (CL_{CRE}) を算出した。

健康成人に luseogliflozin を単回または反復投与したときの CL_{CRE} は、25 mg 単回投与群の baseline 値を除き、placebo 群との有意な差は認められなかった (Figure 2-7A、2-7B)。

糖尿病患者に luseogliflozin を反復投与したときの CL_{CRE} では、placebo 群との有意な差は認められなかった (Figure 2-7C)。

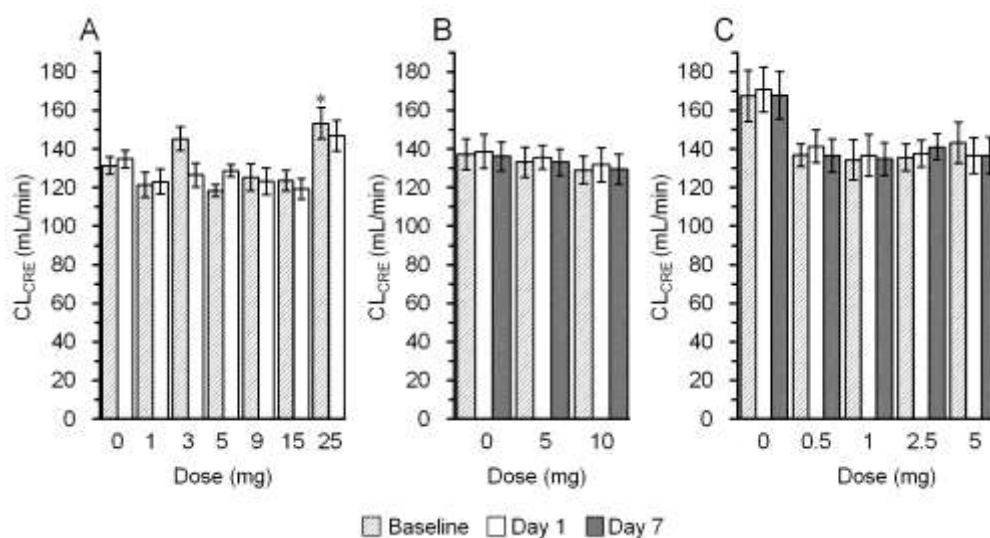


Figure 2-7 The renal clearance of uric acid (CL_{CRE}) after administration of luseogliflozin.

The CL_{CRE} after a single dose in the healthy subjects (A, $n = 3\sim 14$), multiple dose in the Healthy subjects (B, $n = 8$), and multiple dose in diabetic subjects (C, $n = 7$ or 8). Data are shown as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. placebo (0 mg) (Dunnett's test).

6. Luseogliflozin の尿量に対する作用

SGLT2 の阻害による尿糖の増加によりわずかながら尿量が増加することが明らかになっている^{110,111,112}。尿量の増加により UA の尿中排泄が促進される可能性があることから、治験薬 (placebo または luseogliflozin) を単回または反復投与したときの尿量に対する影響を検討した。

健康成人に luseogliflozin を投与したときの尿量は、baseline 値よりも増加したが、placebo 群においても増加していた (Figure 2-8A、2-8B)。いずれの投与群においても placebo 群と比較して有意な差は認められなかった。

糖尿病患者に luseogliflozin を反復投与後の尿量では、placebo 群に対して有意な差は認められなかった (Figure 2-8C)。

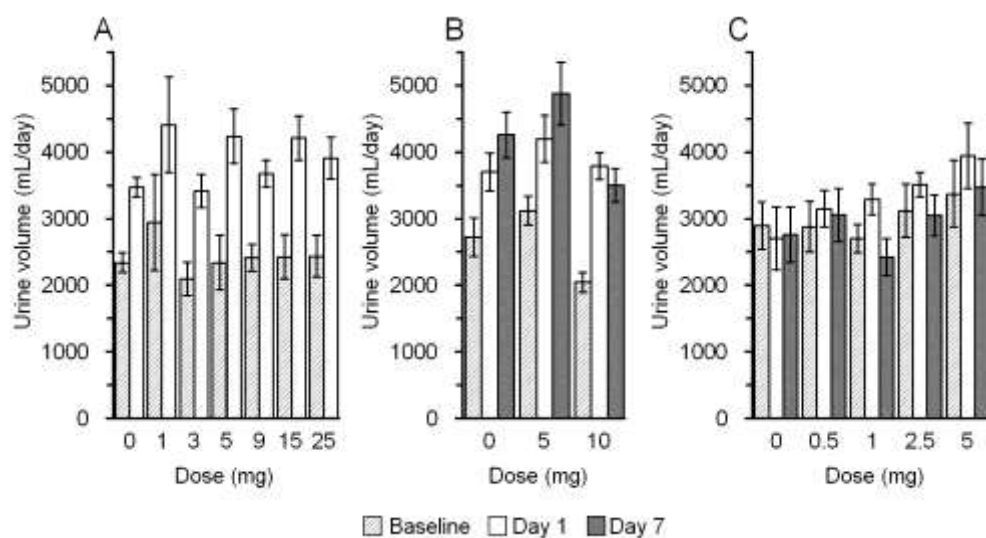


Figure 2-8 The urine volume after administration of luseogliflozin.

The urine volume after a single dose in healthy subjects (A, $n = 3\sim 14$), multiple dose in healthy subjects (B, $n = 8$), and multiple dose in diabetic subjects (C, $n = 7$ or 8). Data are shown as the mean \pm SEM. Not significant vs. placebo (0 mg) (Dunnett's test).

7. Luseogliflozin 投与後の SUA 値の低下と UE_{UA} の増加の関連性

Luseogliflozin による SUA 値低下作用が UE_{UA} に起因するかどうかを検証するため、健康成人に luseogliflozin を単回投与したときの SUA 値 (baseline 値からの低下) の推移と UE_{UA} (baseline 値からの増加) の推移を、1、5 および 25 mg 群のデータで比較した (Figure 2-9)。

健康成人に luseogliflozin を単回投与したときの SUA 値の低下 (Figure 2-9A) と UE_{UA} の増加 (Figure 2-9B) の推移には関連性が認められた。1 mg 群では SUA 値が Day 1 に低下したのち Day 2 に baseline 値に戻ったのと同様に、 UE_{UA} も Day 1 に有意に増加したのち baseline 値に戻った。25 mg 群では SUA 値の低下が Day 4 まで最大値を維持し、 UE_{UA} の有意な増加は Day 2 まで認められ、Day 3 においても高い傾向であった。そして、5 mg 群ではそれぞれが 1 mg 群と 25 mg 群の中間の値で推移した。

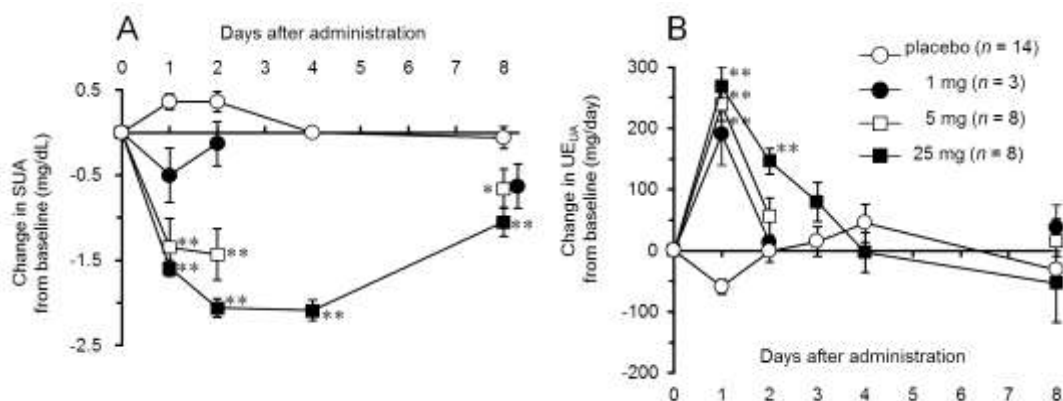


Figure 2-9 Comparison of the daily changes of serum uric acid (SUA) level and urinary excretion rate of UA (UE_{UA}) after a single administration of luseogliflozin in healthy subjects.

Daily changes in SUA level (A) and UE_{UA} (B) from the baseline at the 1, 5 and 25-mg dosing groups. Data are shown as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. placebo (Dunnett's test, Student's t -test or Aspin-Welch's t -test).

次に、健康成人に治験薬 (placebo または luseogliflozin 1~25 mg) を単回または反復投与したときの全 57 例において、Day 1 の SUA 値 (baseline 値からの変化量) と UE_{UA} (baseline 値からの変化量) をプロットした。その結果、SUA 値と UE_{UA} の変化量の間には有意な負の相関が認められた (Figure 2-10、 $r = -0.7672$ 、 $p < 0.001$)。

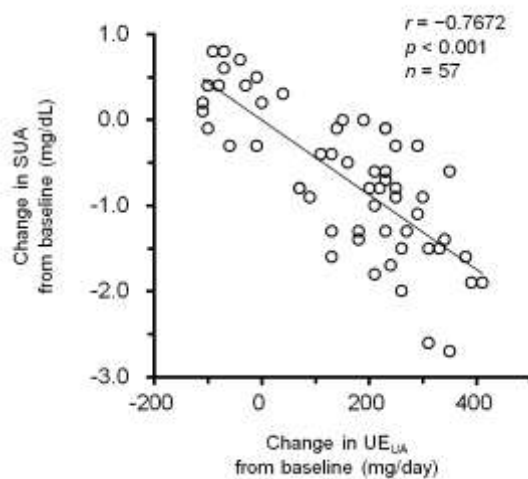


Figure 2-10 Negative correlation between the changes in the serum uric acid (SUA) level and urinary excretion rate of UA (UE_{UA}) on Day 1 from the baseline values in the single dose study in healthy subjects.

8. Luseogliflozin 投与後の UE_{UA} 、 UE_{GL} および血漿中薬物濃度の比較

Luseogliflozin 投与後の UE_{UA} の増加が luseogliflozin の血漿中濃度に依存するのかどうか検証するため、健康成人に luseogliflozin の 1、5 および 25 mg を単回投与後 24 時間までの経時的な UE_{UA} (mg/h)、luseogliflozin の血漿中濃度および UE_{GL} (g/h) を比較した。

治験薬 (placebo または luseogliflozin) を投与後の UE_{UA} の推移を Figure 2-11 に示す。Placebo 群の UE_{UA} は、投与後 0~10 時間は 25~28 mg/h であり、10~24 時間では 14~23 mg/h で推移した (Figure 2-11)。この結果は、運動および昼食による増加は大きくなく、それぞれ 1.04 倍および 1.1 倍という報告¹¹³⁾、SUA 値は明け方に高く夕方に低下するという報告¹¹⁴⁾と一致した。

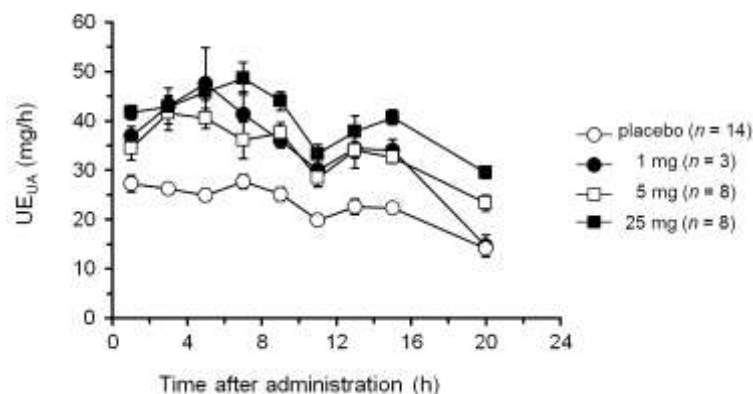


Figure 2-11 The time course profile of urinary excretion rate of UA (UE_{UA}) after a single administration of luseogliflozin in healthy subjects.

Data are shown as the mean \pm SEM.

Luseogliflozin 投与後の UE_{UA} および UE_{GL} (g/h) の推移は、placebo 群の値を減算した値にて Figure 2-12 に示す。健康成人に luseogliflozin を単回投与したときの UE_{UA} の増加分 (placebo 群減算値) は、投与後 3~8 時間の間および 15 時間付近で 2 つピークを認める推移を示した (Figure 2-12A)。このときの血漿中 luseogliflozin 濃度は、投与後 1 時間付近で最大濃度に達し、その後は低下する推移を示し、 UE_{UA} の推移とは異なった (Figure 2-12B)。一方、 UE_{GL} (placebo 群減算値) の推移は、投与後 5 時間付近と 13 時間付近に食後の血糖上昇に起因すると考えられるピークが認められ、 UE_{UA} と類似した推移を示した (Figure 2-12C)。

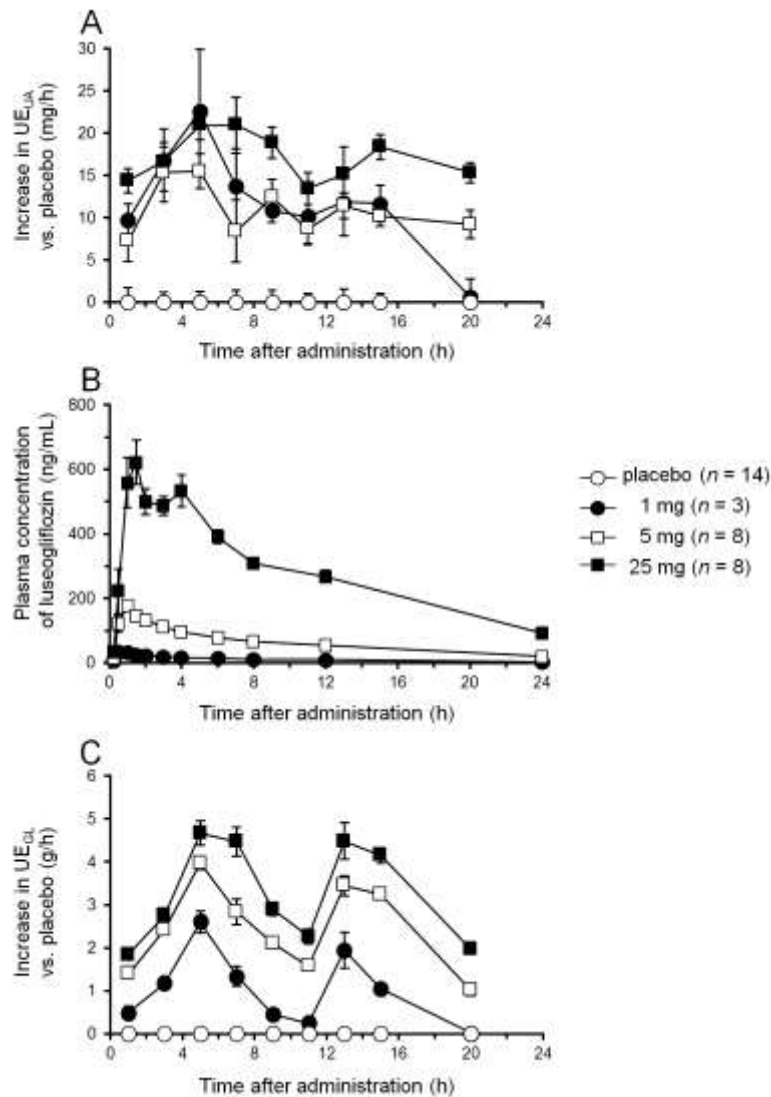


Figure 2-12 Comparison of the time course profile of (A) urinary excretion rate of UA (UE_{UA}), (B) the plasma concentration of luseogliflozin, and (C) urinary excretion rate of glucose (UE_{GL}) after a single administration of luseogliflozin in the healthy subjects.

Data are shown as the mean \pm SEM.

さらに、 UE_{UA} と UE_{GL} の関連性を検証するために、健康成人に治験薬 (placebo または luseogliflozin 1~25 mg) を投与したときの全 57 例において、Day 1 の UE_{UA} (baseline からの変化量) と UE_{GL} (baseline からの変化量)、および UE_{UA} と血漿中未変化体の AUC_{0-24h} の相関を検討した。その結果、 UE_{UA} と UE_{GL} には有意な相関が認められた (Figure 2-13A、相関係数 $r = 0.7875$ 、 p

<0.001)。それに対し、 UE_{UA} と AUC_{0-24h} の相関は有意ではあったが、それよりも低いものであった (Figure 2-13B、相関係数 $r=0.5707$ 、 $p<0.001$)。また、利尿作用によっても UE_{UA} が促進される可能性があることから、 UE_{UA} (baseline 群減算値) と尿量 (投与後 0~24 時間) について相関を調べた結果、有意な相関は認められなかった (Figure 2-13C、相関係数 $r=0.2161$ 、 $p=0.106$)。

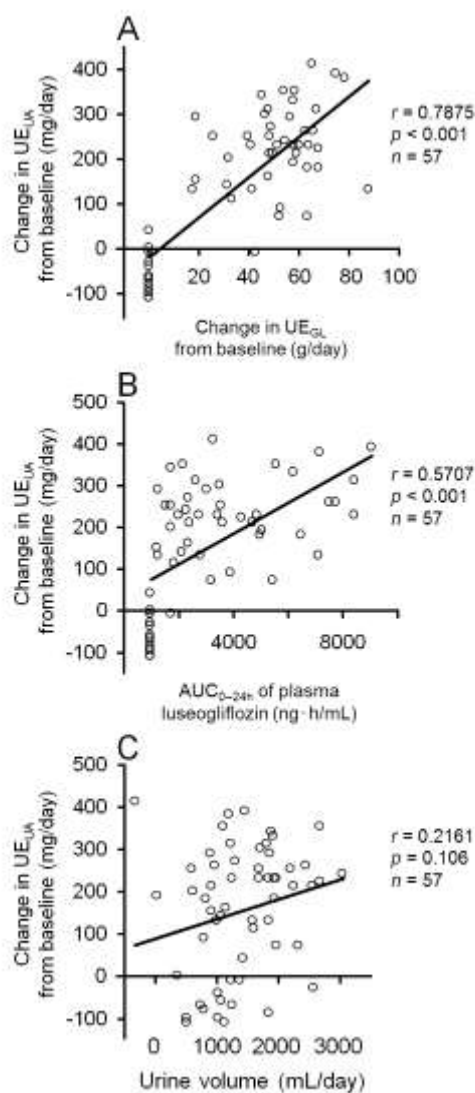


Figure 2-13 Relationship between the urinary excretion rate of UA (UE_{UA}) and urinary excretion rate of glucose (A, UE_{GL}), plasma AUC_{0-24h} of luseogliflozin (B) or urine volume (C) after a single administration of luseogliflozin in healthy subjects.

9. UE_{GL} と SUA 値および CL_{UA} の関係

9-1. Baseline 値における比較

健康成人 81 例および糖尿病患者 39 例の baseline 値における UE_{GL} を 0~5、5~20、20~50 および 50~100 g/day で層別化し、算出した各グループの SUA 値および CL_{UA} の平均値を Figure 2-14 に示す。

健康成人 81 例の UE_{GL} は、0.0~1.05 g/day の範囲内（平均値 \pm SEM : 0.16 ± 0.02 g/day）であり、すべての被験者が 0~5 g/day のグループに入った。健康成人の SUA 値は 5.64 ± 0.09 mg/dL（以下平均値 \pm SEM）、 CL_{UA} は 7.12 ± 0.18 mL/min であった（Figure 2-14A、2-14B）。

糖尿病患者の 39 例の UE_{GL} は、0.3~81.4 g/day の範囲内であった。糖尿病患者の SUA 値は、 UE_{GL} が 20 g/day を超えるグループで低値を示す傾向を示し、20~50 および 50~100 g/day のグループの値は、それぞれ 5.00 ± 0.28 mg/dL ($n = 15$) および 5.05 ± 0.69 mg/dL ($n = 6$) であったが、健康成人に対し有意差は認められなかった（Figure 2-14A）。 CL_{UA} は、0~5 g/day のグループでは健康成人と同等であったが、 UE_{GL} の増加に従って高くなる傾向を示し、5 g/day を超えるグループで健康成人に対し有意に高値を示し、50~100 g/day のグループでは 11.49 ± 1.40 mL/min ($n = 6$) であった（Figure 2-14B）。

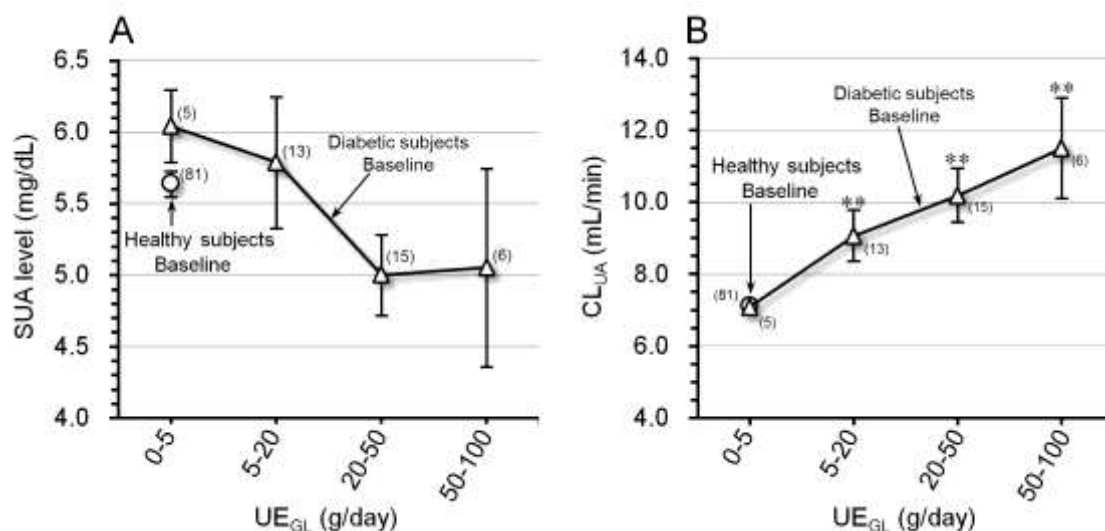


Figure 2-14 Relationship between urinary excretion rate of glucose (UE_{GL}) and serum uric acid (SUA) level or renal clearance of uric acid (CL_{UA}) at the baseline.

Data are shown as mean \pm SEM. Numbers of cases are shown in parentheses.

*** $p < 0.01$ vs. healthy subjects (UE_{GL} : 0-5 g/day) (Dunnett's test).

9-2. Day 1 における比較

健康成人および糖尿病患者の実薬投与群の Day 1 の UE_{GL} により層別化したときの各グループの SUA 値および CL_{UA} の平均値を糖尿病患者の baseline 値とともに Figure 2-15 に示す。

健康成人に luseogliflozin (1~25 mg) 投与後の SUA 値は、 UE_{GL} の増加に従って低下し、 UE_{GL} が 20~50 および 50~100 g/day のグループでは、健康成人の baseline 値に対し有意に低値を示した (Figure 2-15A)。一方、 CL_{UA} は、 UE_{GL} の増加に従って上昇し、20~50 および 50~100 g/day のグループでは、健康成人の baseline 値に対し有意に高値を示した (Figure 2-15B)。

糖尿病患者に luseogliflozin (0.5~5 mg) 投与した場合には、SUA 値は 20~50 g/day のグループに比べて 50 g/day を超える 3 グループが低い傾向を示し、 CL_{UA} は高い傾向を示したが、いずれもそれ以上は頭打ちの傾向を示した (Figure 2-15A、2-15B)。

健康成人および糖尿病患者の実薬投与群 (Day 1) の SUA 値および CL_{UA} は、5~20、20~50 および 50~100 g/day の 3 グループにおいて、糖尿病患者の baseline 値と有意差は認められなかった (Figure 2-15A、2-15B)。

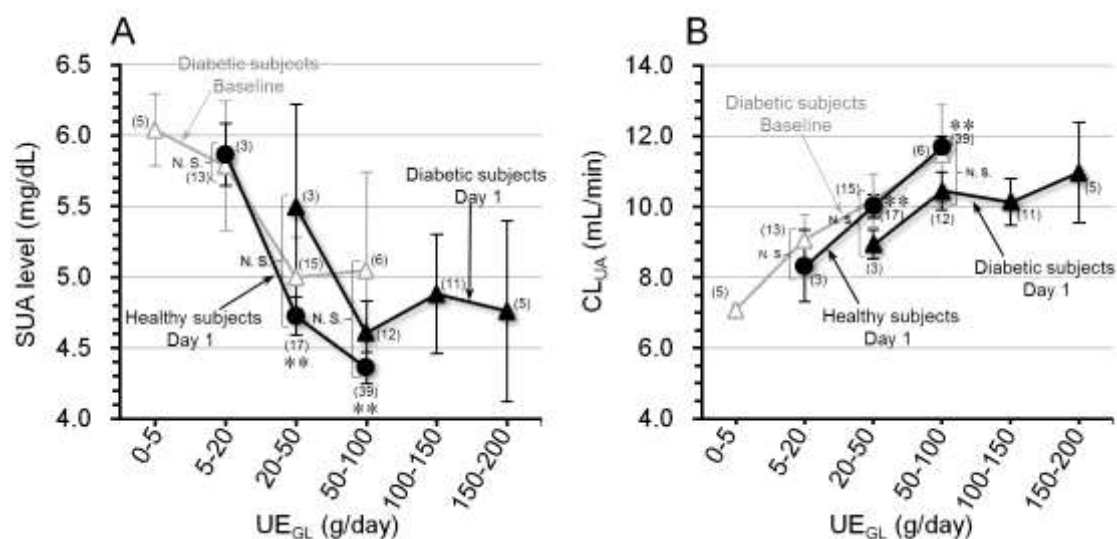


Figure 2-15 Relationship between urinary glucose excretion rate (UE_{GL}) and serum uric acid (SUA) level or renal clearance of UA (CL_{UA}) at Day 1.

Data are shown as the mean \pm SEM. The number of cases is shown in parentheses.

** $p < 0.01$ vs. the baseline of healthy subjects (UE_{GL} : 0-5 g/day), N.S.: not significant among each group of UE_{GL} (Student's t -test or Dunnett's test).

第4節 考察

SGLT2 阻害薬は、luseogliflozin を含む 5 つの薬剤において SUA 値の低下作用が報告されている^{52, 53, 54, 55})。本第 2 章においては、SUA 値低下作用の機序を明らかにするために、luseogliflozin の 3 つの臨床試験の検査値を解析した。

Luseogliflozin を投与したとき、健康成人および 2 型糖尿病患者によらず SUA 値の低下が認められると同時に、 UE_{UA} が有意に増加していた (Figure 2-4、5)。また、健康成人に 1~25 mg を単回投与したときの経日的な SUA 値の推移と UE_{UA} の推移は強く関連しており (Figure 2-9)、placebo 群を含めた全被験者 57 例の Day 1 における SUA 値と UE_{UA} には有意な相関が認められた (Figure 2-10)。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 投与により UE_{UA} が増加したことから、SUA 値低下には排泄促進が主であると考えられる。さらに、ヒト体内の UA は血漿および組織に分布し、健康成人の体内における総 UA プール量は 1200 mg 程度と報告されている⁵⁷)。健康成人に単回投与したときの UE_{UA} の増加は 189~279 mg/day であり、この量は UA 体内プールの 16~22% に相当する。このときの SUA 値低下は -0.5~-1.59 mg/mL で、baseline 値の 8~25% に相当するため、 UE_{UA} の増加量は SUA 値を低下させるために相応な量と考えられる。なお、反復投与後の排泄量の増加は、Day 1 が最も顕著でその後は減少したが (Figure 2-5B)、これは UA 体内プールが減少し SUA 値が低下したためと考えられる。一方、 CL_{UA} においては Day 7 まで高値を維持したことから (Figure 2-6B)、luseogliflozin 投与による UA 排泄促進作用としては Day 7 まで継続したことが推測される。以上の結果から、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る。なお、同じ被験者群の CL_{CRE} には、luseogliflozin 投与による影響は認められなかったことから (Figure 2-7)、腎機能を介した作用ではなく、UA 輸送に対して特異的な作用と考えられる。

次に、luseogliflozin を投与後の SUA 値の低下、 UE_{UA} の増加および CL_{UA} の増加には、いずれにおいても明確な投与量依存性が認められなかったため、 UE_{UA} の推移と薬物の血漿中濃度推移の関係を検証した。その結果、 UE_{UA} は投与後 3~8 時間と 15 時間付近で 2 つのピークが認められ、血漿中薬物濃度の推移からは説明できない推移を示した。一方、 UE_{GL} には食後に血糖値が上昇するための増加と考えられる 2 つのピークが認められ、 UE_{UA} と類似の推移を示した (Figure 2-12)。さらに、健康成人での単回投与試験における 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} の相関および UE_{UA} と血漿中未変化体濃度の AUC_{0-24h} の相関を

比較した結果、 UE_{UA} は AUC_{0-24h} よりも UE_{GL} において高い有意な相関が認められた (Figure 2-13)。なお、 UE_{UA} と尿量については、有意な相関は認められなかったことから、グルコースによる利尿効果の影響は限定的と考えられる (Figure 2-13C)。以上の臨床試験の結果から、 UE_{UA} の増加は尿中のグルコースの増加に起因する可能性が示唆された。

高尿酸血症と糖尿病は、両者ともインスリン抵抗性を主な成因とするという共通点により関係が深い。インスリン抵抗性による高インスリン状態は、近位尿細管のURAT1によるUA再吸収を促進することによりSUA値を上昇させると考えられている¹⁰⁰⁾。その一方で、さらに病態が進行して尿糖を示すようになった糖尿病患者のSUA値は正常者よりも低下することが数多く報告されている^{92,93,97,101)}。糖尿病患者で血糖値の正常化により尿糖が減少するとSUA値が上昇すること¹¹⁵⁾およびグルコース投与による UE_{GL} 出現の際にも UE_{UA} の亢進が起こることから^{91,116,117)}、糖尿病患者のSUA値の低下は尿糖に起因すると推察されるが、それを明確に示した報告はまだない。グルコースによる UE_{UA} 促進作用に関して、古くは1946年から報告がある。BonsnesとDanaは、健康成人にグルコースを持続投与し、 UE_{UA} が促進されることを報告し、グルコースが何らかの機序でUAと競合している可能性を指摘した¹¹⁶⁾。ChristensenとSteenstrupは、健康成人女性にグルコースを持続投与し、 UE_{UA} 促進作用およびわずかながら有意なSUA値の低下を報告した。さらに、血漿中グルコースと UE_{UA} が相関したことから、グルコースがUAの分泌を促進する可能性を示した¹¹⁷⁾。Skeithらは、ヒトにグルコースおよびマンニトールを持続静脈内投与したときの UE_{UA} を測定し、グルコースによる UE_{UA} の促進作用はマンニトールによるものよりも強いことから、グルコースの UE_{UA} 促進作用には、浸透圧以外の機序があること、グルコースとUAは類似の機序で吸収されること、その機序が同じではない場合は共通の駆動力か共通の基質要求性があるということを考察した。さらにSkeithらは、非選択的SGLT阻害剤として知られるphloridzinはグルコースよりも強い CL_{UA} 増加作用を持つことを報告し、phloridzinの作用は浸透圧でもUA輸送のどちらにも依存しないと結論している⁹¹⁾。また、Knightらは、微小還流法を用いてラット尿細管においてグルコースおよびphloridzinがUA再吸収阻害効果を有すること、両者の効果は相加的でないことから、同一の機序である可能性を報告している¹¹⁸⁾。以上のように、糖尿病患者のSUA値の低下現象およびグルコースとphloridzinのUA排泄の促進作用について多くの報告があるが、それらが関連した現象であるかどうか、さらにそれらを統一的に説明可能とする機序は不明なままである。

我々は、luseogliflozinを投与したときのSUA値、尿糖およびUA排泄のデータを、健康成人81例および2型糖尿病患者39例の両方の被験者群から得た。そこで、これらのデータを尿糖(UE_{GL})

により層別化し解析を行うことによって糖尿病患者における病態性の尿糖と luseogliflozin 投与による薬剤性の尿糖の SUA 値および UA 排泄に対する作用の比較ができると考えた。解析の結果、luseogliflozin を投与前(背景値)の糖尿病患者の UE_{GL} が少ないグループ(0~5 および 5~20 g/day)の SUA 値は健康成人と同等であったが、 UE_{GL} が 20 g/day を超えるグループの SUA 値は健康成人に対し低値を示す傾向を示した。また、 CL_{UA} は 5 g/day 以上のグループにおいて UE_{GL} の増加に従って増加しており、文献報告^{92,93,97,101)}に整合する結果が確認できた (Figure 2-14)。さらに、 UE_{GL} と SUA 値の関係および UE_{GL} と CL_{UA} の関係について、①健康成人に luseogliflozin を投与した場合および②糖尿病患者に luseogliflozin を投与した場合について、③糖尿病患者における baseline での関係と比較した。その結果、①~③において UE_{GL} が同じグループ間では SUA と CL_{UA} のいずれにおいても有意差が無いことが示された (Figure 2-15)。これらの結果より、luseogliflozin を投与したときの SUA 値の低下および UE_{UA} の増加が尿糖の増加で明瞭に説明できること、ならびに糖尿病患者において尿糖出現により SUA 値が低下する現象と SGLT2 阻害薬により SUA 値が低下する現象の機序が同一である可能性が示唆された。このことは、2 型糖尿病患者での luseogliflozin の SUA 低下作用および UA 排泄作用が健康成人に対して弱かったこと、ならびに糖尿病患者で尿糖が是正されると SUA 値が上昇することを説明することができる。

以上をまとめると、健康成人および糖尿病患者に luseogliflozin を投与したときの SUA 値の低下作用は UE_{UA} の増加に起因すること、および UE_{UA} の増加は luseogliflozin の直接作用ではなく、尿糖の増加に起因する可能性が高いことが示唆された。さらに、糖尿病患者において尿糖出現により SUA 値が低下する現象と SGLT2 阻害薬により SUA 値が低下する現象の機序が同一である可能性が示唆された。

第3章 Luseogliflozin の尿酸輸送体への作用および SGLT2 の尿酸輸送への関与

第1節 緒言

第2章において、luseogliflozin の SUA 値低下作用は UE_{UA} の増加に起因することが明らかになった。さらに UE_{UA} の増加は、尿糖の増加に起因する可能性が高いことが示唆された。しかしながら、薬物の直接作用、すなわち UA の輸送体に影響を及ぼす機序および SGLT2 が UA を輸送する可能性も排除できないと考えられる。そこで本第3章においては、UA の輸送体に対する luseogliflozin の作用および SGLT2 による UA 輸送を検討した。

ヒトの体内で産生される UA の約 70%は腎臓により尿中へ排出されるため、腎臓からの UA 排泄が SUA 調節において重要である⁵⁷⁾。血漿中における UA のタンパク結合率は4%と低いため、ほとんどの UA が糸球体で濾過されて原尿へ移行する。原尿中の UA は近位尿細管において再吸収されるが、近位尿細管では UA の分泌も同時に起こり、最終的に糸球体濾過された UA の約 90%が再吸収される^{84,85)}。

近年、これら UA の腎動態に寄与する輸送体が分子レベルで解明されている (Figure 3-1)。Enomoto らは、UA が体内では有機酸として存在することから、その輸送体は organic anion transporter (OAT) ファミリーに属すると予想し、2001年に公開されたヒトゲノム配列を検索した。その結果、OAT4 遺伝子配列に相同性のある遺伝子を見出し、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵母細胞 (oocyte) による機能解析を行い、ヒト組織発現の確認および低尿酸血症の患者に当該遺伝子の変異の発見により、腎尿細管において UA を輸送する URAT1 (*SLC22A12*) を同定した¹¹⁹⁾。URAT1 は、近位尿細管の管腔 (apical) 側の細胞膜に発現し、生体内では乳酸などを交換基質とし、UA の再吸収に働くことが明らかになった¹¹⁹⁾。その後、2002年に開発された全ゲノム関連解析 (genome-wide association study、GWAS) により facilitative glucose transporter 9 (GLUT9、URATv1、*SLC2A9*)^{120,121,122)} の関与が示唆され、*Xenopus oocyte* 発現系による機能解析および遺伝子変異と低尿酸血症の関連性の発見により UA 再吸収に重要な輸送体であること、2つの isoform が存在しそれぞれ管腔 (apical) 側と側底 (basolateral) 側細胞膜に発現し、膜電依存的に UA を細胞外に排出することが示された^{123,124)}。URAT1 および GLUT9 の遺伝子に機能を低減させる変異や欠損を認めると、SUA 値が 1 mg/dL 以下となる著しい低尿酸血症を呈することから、腎臓における UA 再吸収に主要な役割を果たすと考えられている。日本人における低尿酸血症患者の 80

～90%は URAT1 遺伝子の変異に起因し¹²⁵⁾ (G774A のアレル頻度は 2.3~2.37%^{126,127)}、GLUT9 遺伝子 (*SLC2A9*) の欠損による頻度は URAT1 に比べると著しく少ない^{128,129,130)}。さらに、URAT1 と GLUT9 (isoform 1) は、それぞれ apical 側と basolateral 側細胞膜に発現し、UA の再吸収に両者が協調的に働くことが Nakanishi らにより示されている¹³¹⁾。そのほか、GWAS により OAT4 (*SLC22A11*)¹³²⁾の関与が示唆され、遺伝子発現系における *in vitro* 試験において OAT4¹³³⁾および OAT10 (*SLC22A13*)¹³⁴⁾が UA を輸送することが報告され、UA の再吸収への関与が指摘されている。また、UA の輸送体ではないが、sodium/monocarboxylate cotransporter 1 (SMCT1、*SLC5A8*) は近位尿管の apical 側細胞膜に発現し、Na⁺依存的にモノカルボン酸を取り込む¹³⁵⁾。細胞内へ取り込まれたモノカルボン酸は URAT1 に対し交換基質として機能するため、結果的に URAT1 による UA 取り込みが活性化されることが Lu らにより明らかにされている⁹⁹⁾。

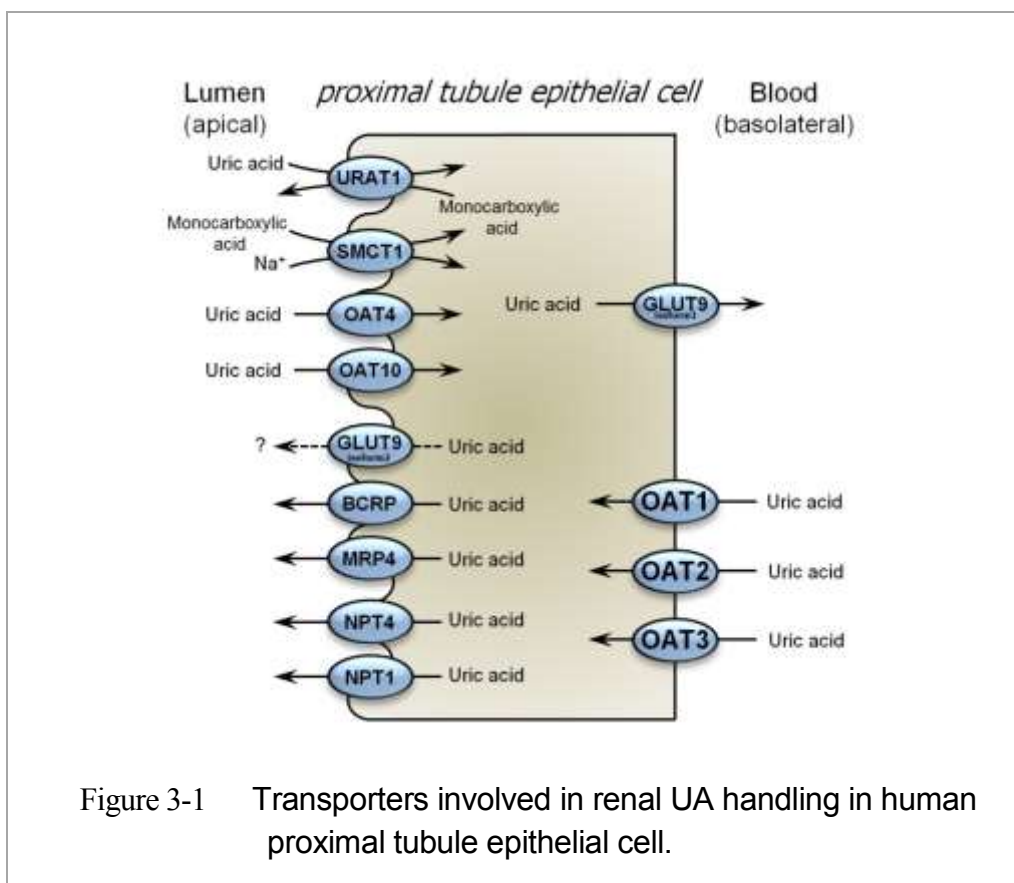


Figure 3-1 Transporters involved in renal UA handling in human proximal tubule epithelial cell.

一方、UA の分泌方向の輸送に関しては、basolateral 側に発現する OAT1¹³⁶⁾および OAT3¹³⁷⁾が、腎臓での発現量は高くないが OAT2¹³⁸⁾が哺乳類細胞発現系および *Xenopus* oocyte 発現系による *in vitro* 試験により UA を取り込むことが報告されている。Apical 側細胞膜において UA を排出する輸送体は、GWAS により sodium phosphate transporter 4 (NPT4、*SLC17A3*)^{132,139)}、NPT1 (*SLC17A1*)

¹³²⁾の関与が示唆され、NPT4 については *Xenopus oocyte* 発現系による *in vitro* 試験により UA を膜電位依存的に排出することが明らかにされている^{140,141)}。これらのほかに SUA 値に影響を与える輸送体として、同じく GWAS により breast cancer resistance protein (BCRP、*ABCG2*)^{132,139)}が報告されている。その後、BCRP は消化管において UA の排出に関わる重要な輸送体であることが明らかにされた^{83,142)}。

UA 排泄薬のベンズブロマロンおよびプロベネシドは、URAT1 を阻害することにより UE_{UA} を促進することが URAT1 の同定と同時に明らかになっている¹¹⁹⁾。また、SUA 値低下作用を有するアンギオテンシン II 受容体拮抗薬ロサルタンおよびサリチル酸の作用も URAT1 の阻害に起因することが明らかになっている^{119,143,144)}。以上のように、現在知られている UA 排泄促進作用を持つ薬物は、いずれも URAT1 に作用するものである。これらに対し、同様に UE_{UA} を促進することが示された SGLT2 阻害薬については、UA 輸送体に対する作用に関する報告はない。

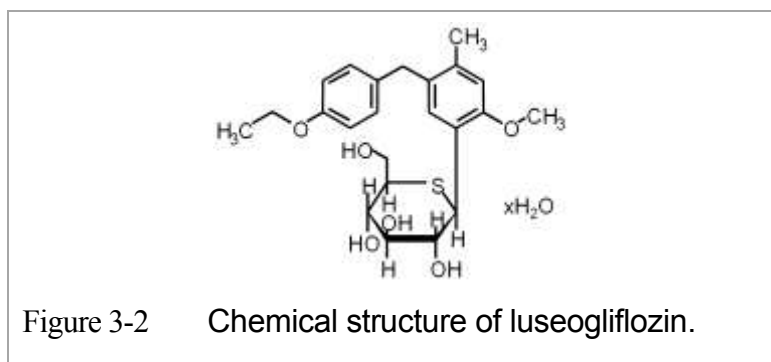
第2章において、luseogliflozin の SUA 値低下作用および CL_{UA} の増加作用は最低投与量の 1 mg から認められた。このことは、luseogliflozin の SUA 値に対する作用は、主薬効である SGLT2 阻害作用 ($IC_{50}:2.26 \text{ nM}^{50)$) に匹敵する強力な作用であることを意味する。その可能性に対し、GLUT9 のように、グルコースと UA の両者を輸送する例が存在すること^{123,124,145)}、また、SGLT2 に変異を認める家族性腎性尿糖において SUA 値が低下する報告がある¹⁴⁶⁾ことから、SGLT2 が UA を輸送する可能性も考えられる。

以上のことから、本第3章においては、腎臓で UA の再吸収に関わる URAT1、GLUT9 (isoform 1)、OAT4、OAT10 および SMCT1 ならびに UA の分泌に関わる OAT1 および OAT3 に対する luseogliflozin の作用を、それぞれの遺伝子を発現させた哺乳類細胞系または *Xenopus oocyte* 発現系を用いて検討した。さらに、消化管において UA の排出に関わる BCRP への影響および SGLT2 による UA の輸送についても哺乳類細胞発現系を用いて検討した。

第2節 実験方法

1. 被検物質

Luseogliflozin ((1*S*)-1,5-anhydro-1-[5-(4-ethoxybenzyl)-2-methoxy-4-methylphenyl]-1-thio-D-glucitol hydrate)⁵⁰⁾は、大正製薬株式会社(埼玉県、さいたま市)で合成した。今回の試験では3.18~3.96%の水を含む luseogliflozin 水和物を用いたが、luseogliflozin 濃度は水分を補正した無水物として表示した。



2. 試薬

[¹⁴C]Uric acid (1.96 TBq/mol) は American Radiolabeled Chemicals, Inc. (Saint Louis, Missouri, USA) または Moravек Biochemicals, Inc. (Brea, California, USA) から購入した。[³H]*p*-Aminohippuric acid、[³H]estrone 3-sulfate および[³H]Prazosin は、PerkinElmer Inc. (Waltham, Massachusetts, USA) から購入した。[³H]nicotinic acid は American Radiolabeled Chemicals から、Methyl- α -D-[U-¹⁴C]glucopyranoside ([¹⁴C] α -MG) は GE Healthcare UK Ltd. (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) から購入した。その他の試薬は、Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA)、Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (大阪府、大阪市)、Nacalai Tesque, Inc. (京都府、京都市)、Invitrogen Corporation (Carlsbad, California, USA)、Life technologies (Carlsbad, California, USA)、Applied Biosystems, LLC (Foster City, California, USA)、Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, USA) および Ambion Inc. (Austin, Texas, USA) から購入した。

3. 試験系 1：輸送体遺伝子発現哺乳類培養細胞

3-1. URAT1、OAT1 および OAT3 発現 HEK293 細胞

URAT1、OAT1 または OAT3 発現 HEK293 細胞 (ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞にヒト

URAT1、OAT1 または OAT3 の cDNA を含むベクターをトランスフェクションした細胞) および control HEK293 細胞 (HEK293 細胞にベクターのみをトランスフェクションした細胞) は、受託機関が保有するものを使用した。

遺伝子発現および control の HEK293 細胞は、10% fetal bovine serum (FBS)、100 units/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin、0.25 µg/ml amphotericin B および 2 mM L-glutamine を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM、Life technologies) で CO₂ インキュベーター (37°C、CO₂ : 5%) 中で培養した。輸送試験には、 2.5×10^5 cells/well の密度にてコラーゲン I でコートした 24 well プレートに播種し 2 日間培養した。

3-2. OAT4 発現 S2 細胞

OAT4 発現 S2 細胞 (Temperature-sensitive simian virus 40 large T 抗原遺伝子を持つトランスジェニックマウスの腎近位尿細管中間部由来細胞にヒト OAT4 の cDNA を含むベクターをトランスフェクションした細胞) および control S2 細胞 (ベクターのみをトランスフェクションした細胞) は受託機関が所有する細胞を使用した。

OAT4 発現および control の S2 細胞は、5% FBS、10 µg/L epidermal growth factor (EGF)、0.08 units/mL insulin および 10 mg/L transferrin を含む RITC80-7 medium (機能性ペプチド研究所、山形県、東根市) で CO₂ インキュベーター (33°C、CO₂ : 5%) 中で培養した。輸送試験には、 $2.5 \sim 2.6 \times 10^5$ cells/well の密度にてコラーゲン I でコートした 24 well プレートに播種し 2 日間培養した。

3-3. BCRP 発現 MDCKII 細胞

BCRP 発現 MDCKII 細胞 (イヌ腎臓由来細胞株にヒト BCRP の cDNA を含むベクターをトランスフェクションした細胞) および control の MDCKII 細胞 (ベクターのみをトランスフェクションした細胞) は Solvo Biotechnology (Budaörs, Hungary) から購入した。

BCRP 発現および control の MDCKII 細胞は、10% FBS、2 mM L-Glutamine、Non-essential amino acids solution、100 units/mL penicillin および 100 µg/mL streptomycin を含む DMEM で CO₂ インキュベーター (37°C、CO₂ : 5%) 中で培養した。輸送試験には、 2×10^5 cells/cm² の密度で 12-well transwell カルチャーインサート (Corning) に播種し、3 日目に培地交換し、4 日間培養した。

3-4. SGLT2 発現 CHO-K1 細胞

SGLT2 発現 CHO-K1 細胞 (チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 K1 株にヒト SGLT2 の cDNA を含むベクターをトランスフェクションした細胞) および control CHO-K1 細胞 (CHO-K1 細胞にベクターのみをトランスフェクションした細胞) は、大正製薬株式会社にて構築したものを使用した⁵¹⁾。

SGLT2 発現および control の CHO-K1 細胞は 10% FBS、100 units/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin および 250 µg/mL geneticin を含む F-10 nutrient mixture (Invitrogen) で CO₂ インキュベーター (37°C、CO₂:5%) 中で培養した。輸送試験には、 7.5×10^4 cells/well の密度で poly-lysine でコートした 24 well プレート (Becton Dickinson) に播種し 2 日間培養した。

4. 試験系 2：輸送体発現アフリカツメガエル oocyte

GLUT9 isoform 1、OAT10 および SMCT1 をアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵母細胞 (oocyte) に発現させたものを使用した。

4-1. 実験動物

アフリカツメガエルはカトーS カガク (千葉県、長生郡一宮町) より購入した。

4-2. 輸送体遺伝子発現 oocyte の調製

アフリカツメガエルを氷中に 30 分以上置き仮死状態にし、下腹部を切開し卵巣を摘出した。OR2 (oocyte Ringer's solution 2) 中、顕微鏡下で卵塊を適当な大きさに分割後、OR2 で 10 回洗浄した。その後、卵塊を 2 mg/mL collagenase 含有 OR2 に移し、20~25 分間、室温で振とうし、collagenase 処理を行った。処理後、collagenase 溶液を除き、OR2 で 10 回、modified Barth's solution (MBS) で 5 回洗浄した。処理後の卵塊は、MBS 中 18°C で維持し、2 日以内に使用した。

Collagenase 処理した卵塊を defolliculate solution を入れたシャーレに取り、実体顕微鏡下で滅菌した精密ピンセットを用いて濾胞膜を除去し、濾胞除去 oocyte を必要数調製した。濾胞除去 oocyte は、50 µg/mL gentamycin 含有 MBS 中、18°C で維持し、1 日以内に使用した。

濾胞除去 oocyte に 50 nL の cRNA 溶液 (GLUT9 isoform 1、OAT10 または SMCT1、0.5 µg/nL) または超純水をマイクロディスペンサー (Digital Microdispenser 10 µl #510、Drummond Scientific Company, Broomall, Pennsylvania, USA) を用いて注入した。注入後の oocyte は、50 µg/mL gentamycin 含有 MBS 中で 18°C、2~3 日間培養して遺伝子発現 oocyte および対照として用い

る水注入 oocyte を調製した。今回注入に用いた cRNA は、所属研究室にて調製したものを用いた^{99,131)}。

Oocyte Ringer's solution 2 (OR2、pH 7.4)

Chemical	Concentration
NaCl	82.5 mM
KCl	2.0 mM
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1.0 mM
HEPES	5.0 mM

The solution was adjusted to pH 7.4 with 1 N NaOH and sterilized by autoclaving.

Modified Barth's solution (MBS、pH 7.4)

Chemical	Concentration
NaCl	88.0 mM
KCl	1.0 mM
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0.33 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.41 mM
MgSO ₄ · 2H ₂ O	0.82 mM
NaHCO ₃	2.4 mM
HEPES	10.0 mM

The solution was adjusted to pH 7.4 with 1 N NaOH and sterilized by autoclaving.

Defolliculate solution (pH 7.4)

Chemical	Concentration
NaCl	110 mM
EDTA	1.0 mM
HEPES	10.0 mM

The solution was adjusted to pH 7.4 with 1 N NaOH and sterilized by autoclaving.

5. 遺伝子発現培養細胞を用いた¹⁴C]UA 取り込み阻害試験 (URAT1、OAT1、OAT3 および OAT4)

5-1. UA 再吸収に関わる輸送体の阻害試験

URAT1 または OAT4 発現細胞および control 細胞をそれぞれ 1 群につき 3 well ずつ割り振り、0.2%DMSO および所定濃度の luseogliflozin を含む uptake buffer を 300 μL 添加し、恒温槽を用いて 37°C で 15 分間プレインキュベーションした。取り込み試験は、uptake buffer を完全に除去し、37°C に加温した 50 μM の¹⁴C]uric acid (UA) および所定濃度の luseogliflozin を含

有した uptake buffer 300 μ L を添加することにより取り込みを開始した。URAT1 の場合 2 分間、OAT4 の場合 15 分間、37°C でインキュベーションして [14 C]UA の取り込み反応を行ったのち、氷冷した uptake buffer または PBS で 3 回洗うことにより取り込みを停止させた。取り込み停止後の細胞は 0.1 N NaOH 0.5 mL を加え細胞を溶解し、300 μ L をガラスバイアルに採取し、10 mL のシンチレーター (Hionic-Fluor、PerkinElmer) を加えて混和し、液体シンチレーションカウンター (2500TR、PerkinElmer) で放射能を測定した。また、残りの溶解液から 20 μ L を採取し、BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてタンパク濃度を測定した。 [14 C]UA の初期濃度は、添加前に測定した。薬物を添加するために用いた DMSO の最終濃度は 0.2% (v/v) にした。

Uptake buffer for HEK293 cells (Hanks' balanced salt solution containing 4.17 mM NaHCO₃ and 10 mM HEPES)

Chemical	Concentration
NaCl	1369 mM
KCl	53.7 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	4.92 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4.07 mM
CaCl ₂	12.6 mM
KH ₂ PO ₄	4.41 mM
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	3.36 mM
NaHCO ₃	4.17 mM
HEPES	10.0 mM
D-Glucose	55.6 mM

The solution was adjusted to pH 7.4 with 1 N NaOH.
Hanks' balanced salt solution (Life technologies)

Uptake buffer for S2 cells (Dulbecco's phosphate-buffered saline)

Chemical	Concentration
NaCl	1369 mM
KCl	26.8 mM
CaCl ₂	9.01 mM
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	80.6 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	4.92 mM
KH ₂ PO ₄	14.7 mM

Dulbecco's phosphate-buffered saline (Life technologies)

5-2. UA 分泌に関わる輸送体の阻害試験

OAT1 または OAT3 発現細胞および control 細胞をそれぞれ 1 群につき 6 well ずつ割り振り、

5-1 項と同様に阻害試験を行った。なお、uptake buffer は HEK293 cells 用 (5-1 項) を用いた。インキュベーション時間は、OAT1 の場合 0.5 分間、OAT3 の場合 2 分間とし、プローブ基質は、OAT1 の場合 $1 \mu\text{M}$ [^3H]p-aminohippuric acid、OAT3 の場合 $0.05 \mu\text{M}$ [^3H]estrone 3-sulfate を用いた。薬物を添加するために用いた DMSO の最終濃度は 0.2% (v/v) にした。

5-3. BCRP 発現培養細胞を用いた経細胞輸送阻害試験

BCRP 発現細胞および control 細胞を播種したカルチャーインサートをそれぞれ 1 群に付き 3 個ずつ割り振り、カルチャーインサートおよびプレート中の培地を transport buffer に置換し、恒温槽を用いて 37°C で 20 分間プレインキュベーションした。経細胞輸送の阻害試験は、transport buffer を完全に除去し、 37°C に加温した所定濃度の luseogliflozin と [^3H]prazosin を含む transport buffer (donor 溶液) または所定濃度の luseogliflozin のみを含む transport buffer (acceptor 溶液) を添加することにより輸送を開始させた。Apical 側から basolateral 側 (A to B) への膜透過試験では、apical 側に donor 溶液を $600 \mu\text{L}$ 、basolateral 側に acceptor 溶液を $1,500 \mu\text{L}$ 添加した。Basolateral 側から apical 側 (B to A) の膜透過試験では溶液を逆にして行った。輸送反応は 37°C でインキュベーションし、30 分後に acceptor 溶液 $100 \mu\text{L}$ をガラスバイアルに採取し、5 mL のシンチレーター (Insta-Gel Plus, PerkinElmer) を加えて混和し、液体シンチレーションカウンター (2910TR, PerkinElmer) で放射能を測定した。 [^3H]Prazosin の初期濃度は、開始直後に donor 溶液 $100 \mu\text{L}$ を採取して濃度を測定した。薬物を添加するために用いた DMSO の最終濃度は 0.2% (v/v) にした。

Transport buffer for MDCKII cells (HBSS containing 10 mM HEPES)

Chemical	Concentration
NaCl	1369 mM
KCl	53.7 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	4.92 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4.07 mM
CaCl ₂	12.6 mM
KH ₂ PO ₄	4.41 mM
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	3.36 mM
HEPES	10.0 mM
D-Glucose	55.6 mM

The solution was adjusted to pH 7.4 with 8 N NaOH.
HBSS (Invitrogen)

6. 遺伝子発現 oocyte を用いた¹⁴C]UA 取り込み阻害試験 (GLUT9 isoform 1, OAT10 および SMCT1)

遺伝子発現 oocyte または水注入 oocyte をそれぞれ 1 群につき 10 個ずつ 24 well プレートに振り分け、ND96 oocyte uptake buffer (ND96) を約 1.5mL 加え、恒温槽を用いて 25°C で 15 分間プレインキュベーションした。GLUT9 isoform 1 および OAT10 の場合は、20 μM の¹⁴C]UA および所定濃度の luseogliflozin を含有した ND96 の 500 μL に置換することにより取り込みを開始した。SMCT1 の場合は、¹⁴C]UA の代わりに 15 μM の³H]nicotinic acid をプローブ基質に用いた。25°C で 60 分間インキュベーションして放射性プローブ基質の取り込み反応を行ったのち、氷冷した ND96 で 3 回洗い取り込みを停止させた。取り込み停止後の oocyte を一つずつチューブにとり、50 μL の 5% sodium dodecyl sulfate (SDS) を添加して溶解させた。チューブに 1.5 mL のシンチレーター(クリアゾル、Nacalai Tesque)を加えて混和し、液体シンチレーションカウンター(LSC 5100、Aloka、東京都、三鷹市)で放射能を測定した。¹⁴C]UA の初期濃度は、添加直後に 20 μL を採取して放射能を測定した。薬物を添加するために用いた DMSO の最終濃度は 0.2% (v/v) にした。

ND96 oocyte uptake buffer (pH 7.4)

Chemical	Concentration
NaCl	96.0 mM
KCl	2.0 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.0 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.8 mM
HEPES	5.0 mM

The solution was adjusted to pH 7.4 with 1 M Tris.

7. SGLT2 による¹⁴C]UA 取り込み試験

SGLT2 発現細胞および control 細胞をそれぞれ 1 群につき 3 well ずつ割り振り、Na⁺ free-uptake buffer を 0.6 mL 添加し、恒温槽を用いて 37°C で 20 分間プレインキュベーションした。取り込み試験は、uptake buffer を完全に除去し、37°C に加温した 9 μM ¹⁴C]UA を含有した uptake buffer 250 μL を添加することにより取り込みを開始した。37°C で 5 分間インキュベーションして¹⁴C]UA の取り込み反応を行ったのち、氷冷した uptake buffer で 3 回洗うことにより取り込みを停止させた。取り込み停止後の細胞は 1 N NaOH を 200 μL 加えて細胞を溶解し、0.5 N HCl を 400 μL 加えて中和した。細胞溶解液の 500 μL をバイアルに採取し、5 mL のシンチレーター (Insta-Gel Plus、PerkinElmer) を加えて混和し、液体シンチレーションカウンター (2910TR、PerkinElmer) で放射

能を測定した。また、残りの溶解液から 20 μ L を採取し、BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてタンパク濃度を測定した。 $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ の初期濃度は、添加直後に 20 μ L を採取して放射能を測定した。なお、SGLT2 活性を確認するため典型基質である $[^{14}\text{C}]\alpha\text{-MG}$ (1 mM) の取り込みも測定した。

Uptake buffer for CHO-K1 cells (pH 7.4)

Chemical	Concentration	
	Normal	Na ⁺ free
NaCl	140 mM	-
Choline chloride	-	140 mM
KCl	2 mM	2 mM
CaCl ₂	1 mM	1 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1 mM	1 mM
HEPES	10 mM	10 mM
Tris	5 mM	5 mM

The solution was adjusted to pH 7.4 with 1 N HCl.

8. データ解析

8-1. Oocyte における放射性プローブ基質の取り込み量

Oocyte における放射性プローブ基質の取り込み速度 ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{oocyte}$) は、所定時間 (min) における oocyte 中の放射エネルギー (dpm/min/oocyte) を uptake buffer 中放射能の初期放射能濃度 (dpm/ μL) で除することにより算出した。輸送体を介した取り込み量は、遺伝子注入 oocyte の値から、水注入 oocyte の値を減じた。Luseogliflozin 添加時の阻害率は、輸送体を介した取り込み量を、阻害剤がないときの値を 100% として % of control で示した。

8-2. 培養細胞における放射性プローブ基質の取り込み量

培養細胞における放射性プローブ基質の取り込み量 ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$) は、所定時間 (min) における細胞中の放射エネルギー (dpm/min/well) を uptake buffer 中放射能の初期濃度 (dpm/ μL) およびタンパク量 (mg protein/well) で除することにより算出した。Luseogliflozin 添加時の阻害率は、8-1 項と同様に % of control で示した。

8-3. 細胞単層膜透過試験における放射性プローブ基質の透過係数および Efflux ratio

Net の透過係数 (P_{app} , 単位: cm/sec) は、放射性基質の donor 溶液の初期濃度と輸送量から次に示す式によって算出した。

$$P_{app} \text{ (cm/sec)} = \frac{1}{A \text{ (cm}^2\text{)} \times C_0 \text{ (pmol/mL)}} \times \frac{dQ \text{ (pmol)}}{dt \text{ (sec)}}$$

なお、 C_0 は0時間における donor 溶液の基質濃度 (pmol/mL)、 A はフィルターの面積 (cm²)、 dQ は acceptor 溶液へ輸送された基質量 (pmol)、 dt は輸送時間 (sec) とした。

Efflux ratio は、発現細胞単層膜および control 細胞単層膜それぞれの A to B および B to A の P_{app} (3例の平均値) から以下の式によって算出したのち、発現細胞の efflux ratio を control 細胞の efflux ratio で除して control 細胞による輸送を補正した。

$$\text{Efflux ratio} = \frac{\text{B to A の } P_{app}}{\text{A to B の } P_{app}}$$

Luseogliflozin 添加時の阻害率は、8-1 項と同様に % of control で示した。

8-4. 平均値、標準誤差の算出および統計解析

すべてのデータは mean ± SEM で表記し、統計的有意差は分散分析を行ったのち、Student's *t*-test または Aspin-Welch's *t*-test により検定を行い、 $p < 0.05$ の場合に有意差ありと判定した。

第3節 結果

1. 尿酸の再吸収に関わる URAT1 および OAT4 に対する Luseogliflozin の作用

URAT1 および OAT4 を介した $[^{14}\text{C}]$ UA 取り込みに対する luseogliflozin の阻害作用を、それぞれ URAT1 発現 HEK293 細胞および OAT4 発現 S2 細胞ならびにそれぞれの control 細胞を用いて検討した。Luseogliflozin を 1~1,000 nM の濃度で添加したときの $[^{14}\text{C}]$ UA の取り込みを control (luseogliflozin 濃度 : 0 nM) に対する%で示した (Figure 3-3)。

検討の結果、URAT1 および OAT4 を介した $[^{14}\text{C}]$ UA 取り込みに対し、luseogliflozin は阻害作用を示さなかった (Figure 3-3)。

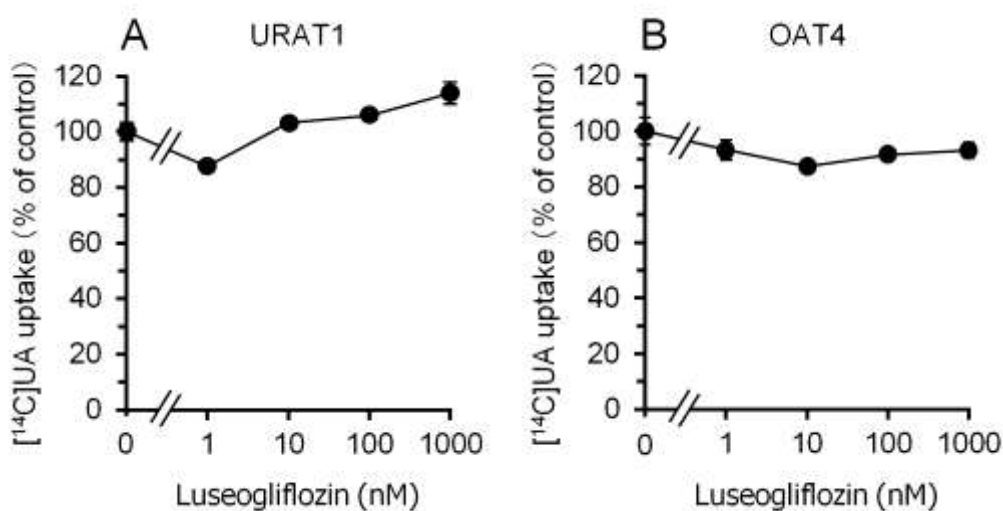


Figure 3-3 Effect of luseogliflozin on $[^{14}\text{C}]$ uric acid (UA) uptake mediated by URAT1 (A) or OAT4 (B).

Cells were incubated at 37°C for 2 min (URAT1) or 15 min (OAT4) in 50 μM $[^{14}\text{C}]$ UA with absence or presence of luseogliflozin added to the extracellular buffer. The values were expressed as percentages of uptake under control conditions (absence of luseogliflozin). Data are shown as the mean \pm SEM ($n = 3$).

2. 尿酸の再吸収に関わる GLUT9 isoform 1 および OAT10 に対する Luseogliflozin の作用

GLUT9 isoform 1 および OAT10 を介した ^{14}C]UA 取り込みに対する luseogliflozin の阻害作用を遺伝子および水注入 *Xenopus* oocyte を用いて検討した。Luseogliflozin を 2~200 nM の濃度で添加したときの ^{14}C]UA の取り込みを control (luseogliflozin 濃度:0 nM) に対する%で示した (Figure 3-4)。

検討の結果、GLUT9 isoform 1 および OAT10 を介した ^{14}C]UA 取り込みに対し、luseogliflozin は阻害作用を示さなかった (Figure 3-4)。

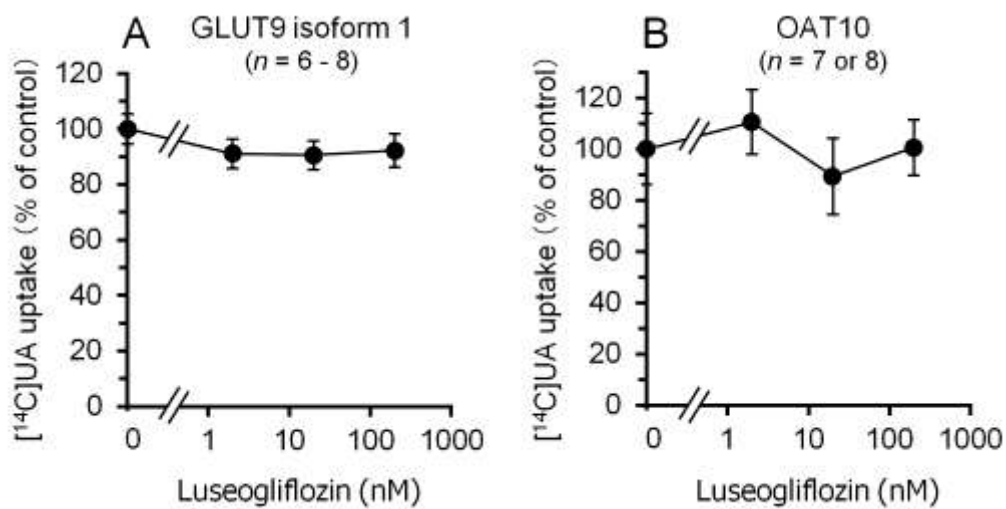


Figure 3-4 Effects of luseogliflozin on ^{14}C]uric acid (UA) uptake mediated by GLUT9 isoform 1 (A) or OAT10 (B).

Oocytes were incubated at 25°C for 60 min in 20 μM ^{14}C]UA with absence or presence of luseogliflozin added to the extracellular buffer. The values were expressed as percentages of uptake under control conditions (absence of luseogliflozin). Data are shown as the mean \pm SEM ($n = 6\sim 8$).

3. URAT1 の活性化に關与する SMCT1 に対する Luseogliflozin の作用

SMCT1 を介した nicotinic acid 取り込みに対する luseogliflozin の阻害作用を遺伝子注入 *Xenopus* oocyte および水注入 oocyte を用いて検討した。Luseogliflozin を 1~10,000 nM の濃度で添加したときの³H標識した nicotinic acid の取り込みを control (luseogliflozin 濃度 : 0 nM) に対する%で示した (Figure 3-5)。

検討の結果、SMCT1 を介した³H]nicotinic acid 取り込みに対し、luseogliflozin は阻害作用を示さなかった (Figure 3-5)。

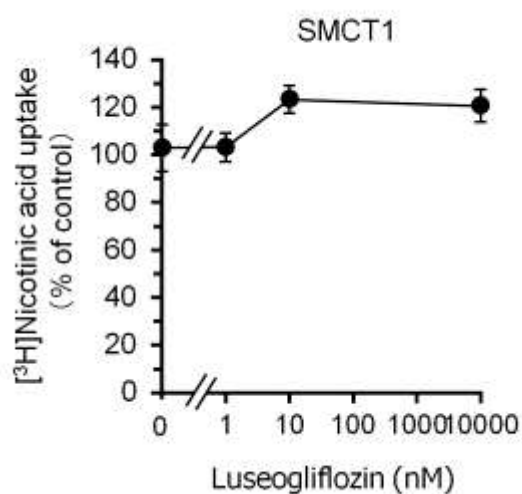


Figure 3-5 Effect of luseogliflozin on [³H]nicotinic acid uptake mediated by SMCT1.

Oocytes were incubated at 25°C for 60 min in 15 μM [³H]nicotinic acid with absence or presence of luseogliflozin added to the extracellular buffer. The values were expressed as percentages of uptake under control conditions (absence of luseogliflozin). Data are shown as the mean ± SEM ($n = 5$ or 6).

4. 尿酸の分泌に関わる OAT1 および OAT3 に対する Luseogliflozin の作用

OAT1 および OAT3 に対する luseogliflozin の作用を、遺伝子発現 HEK293 細胞および control 細胞を用いて検討した。Luseogliflozin を 1~100 μM の濃度で添加したときの ^3H]p-aminohippuric acid または ^3H]estrone 3-sulfate の取り込みを control (luseogliflozin 濃度 : 0 μM) に対する%で示した (Figure 3-6)。

検討の結果、OAT1 を介した ^3H]p-aminohippuric acid の取り込みに対し、luseogliflozin は影響を示さなかった (Figure 3-6A)。OAT3 を介した ^3H]estrone 3-sulfate の取り込みに対しては、luseogliflozin 濃度が 100 μM の時に 67.5%に低下させた (Figure 3-6B)。

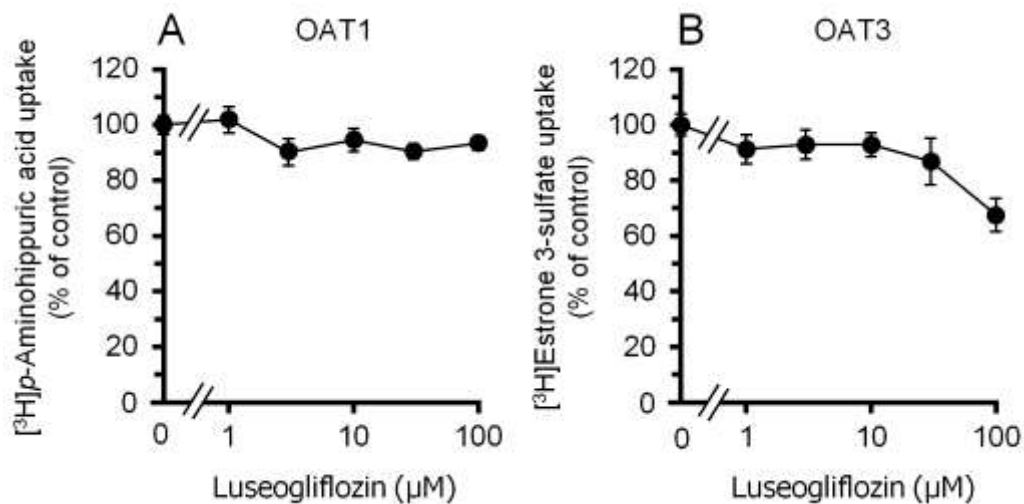


Figure 3-6 Effects of luseogliflozin on ^3H]p-aminohippuric acid uptake mediated by OAT1 (A) and ^3H]estrone 3-sulfate uptake mediated by OAT3 (B).

Cells were incubated at 37°C for 0.5 min (OAT1) or 2 min (OAT3) in 1 μM ^3H]p-aminohippuric acid (OAT1) or ^3H]estrone 3-sulfate (OAT3) with absence or presence of luseogliflozin added to the extracellular buffer. The values were expressed as percentages of uptake under control conditions (absence of luseogliflozin). Data are shown as the mean \pm SEM ($n = 6$).

5. 尿酸の消化管分泌に関わる BCRP に対する Luseogliflozin の作用

BCRP に対する luseogliflozin の作用を、BCRP 発現 MDCK2 細胞および control 細胞の単層膜を用いて検討した。Luseogliflozin を 1~100 μM の濃度で添加したときの [^3H]prazosin の輸送 (efflux ratio) を control (luseogliflozin 濃度 : 0 μM) に対する%で示した (Figure 3-7)。

検討の結果、BCRP を介した [^3H]prazosin の輸送に対し、luseogliflozin は影響を示さなかった (Figure 3-7)。

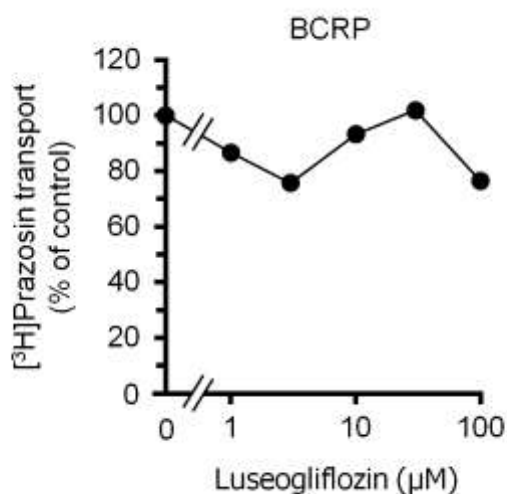


Figure 3-7 Effects of luseogliflozin on [^3H]prazosin transport mediated by BCRP

Cells were incubated at 37°C for 30 min in 5 μM [^3H]prazosin with absence or presence of luseogliflozin added to the donor and acceptor solutions. The values were expressed as percentages of transport under control conditions (absence of luseogliflozin) calculated from three samples.

6. SGLT2 による尿酸の輸送

SGLT2 を発現させた CHO-K1 細胞および control 細胞を用いて、UA の輸送を評価した。Control 細胞および SGLT2 発現細胞における $[^{14}\text{C}]\alpha\text{-MG}$ の取り込みならびに $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ の取り込みを Figure 3-8 に示す。

SGLT2 基質である $[^{14}\text{C}]\alpha\text{-MG}$ の取り込みは、SGLT2 発現細胞において control 細胞に比べて有意に高かった (Figure 3-8A)。Control 細胞および SGLT2 発現細胞における $[^{14}\text{C}]\alpha\text{-MG}$ の取り込みは、それぞれ $2.35 \pm 0.96 \mu\text{L}/5 \text{ min}/\text{mg protein}$ および $8.15 \pm 1.49 \mu\text{L}/5 \text{ min}/\text{mg protein}$ (mean \pm SEM) であった。一方、 $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ の取り込みはそれぞれ、 $2.12 \pm 0.75 \mu\text{L}/5 \text{ min}/\text{mg protein}$ および $1.73 \pm 0.44 \mu\text{L}/5 \text{ min}/\text{mg protein}$ (mean \pm SEM) であり両細胞ではほぼ同等であった (Figure 3-8B)。

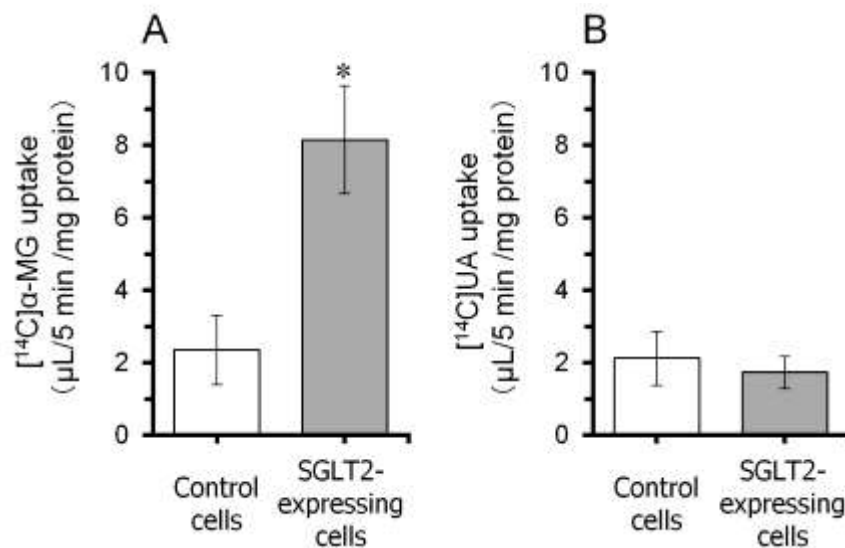


Figure 3-8 Uptake of $[^{14}\text{C}]\text{uric acid (UA)}$ by SGLT2-expressing cells.

Cells were incubated at 37°C for 5 min in 1 mM $[^{14}\text{C}]\alpha\text{-MG}$ or 9 μM $[^{14}\text{C}]\text{UA}$. Data are shown as the mean \pm SEM ($n = 3$). * $p < 0.05$ vs. control cells (Aspin-Welch's t -test).

第4節 考察

UA の尿中排泄促進剤で高尿酸血症治療に用いられるベンズブロマロンおよびプロベネシドは腎臓において UA の再吸収に主要な働きをする URAT1 を阻害することにより作用を発現する¹¹⁹⁾。ほかに、SUA 値低下作用を有するアンギオテンシン II 受容体拮抗薬ロサルタンおよびサリチル酸についても URAT1 を阻害することが明らかになっている^{119,143)}。すなわち、現在において UA を排泄する作用を持つ薬剤の機序はいずれも URAT1 の阻害が関与する。第2章において、luseogliflozin による UE_{UA} の増加は、SGLT2 阻害に起因する尿中グルコースの増加による可能性が高いことが示唆されたが、luseogliflozin が UA の再吸収に関わる輸送体を阻害する可能性もある。これらのことからまず、腎臓において UA の再吸収に関わる輸送体に対する luseogliflozin の阻害作用を検討した。

検討の結果、UA の再吸収に関与する URAT1、GLUT9 isoform 1 ならびに可能性のある OAT4 および OAT10 を介した¹⁴C]UA 取り込みに対し、luseogliflozin は最高 200~1000 nM の濃度においていずれも阻害作用を示さなかった (Figure 3-3, 3-4)。また、SMCT1 は URAT1 の UA 取り込みの交換基質となるモノカルボン酸を Na^+ 依存的に細胞内に取り込み、URAT1 を活性化することが示されている⁹⁹⁾。そこで、SMCT1 を介した nicotinic acid 取り込みに対する luseogliflozin の阻害作用を検討したが、阻害作用は示さなかった (Figure 3-5)。Luseogliflozin の臨床最高投与量 5 mg をヒトに反復投与したときの定常状態における最高濃度 (C_{max}) 0.7 μ M および血漿タンパク結合率 96%⁵⁰⁾ から非結合形濃度は最高で 28 nM と推定され、臨床において luseogliflozin は腎における UA の再吸収に直接影響しないことが示唆された。なお、試験はすべて細胞外液に¹⁴C]UA および luseogliflozin を添加して行われたが、URAT1 による UA 取り込みに対して、細胞内薬物がその機能を阻害すること (*trans*-阻害作用) を Sato らが報告している⁶⁵⁾。Luseogliflozin の Caco-2 細胞系による膜透過係数は $14.4 \text{ cm}^2/\text{s} \times 10^6$ であり細胞膜透過性が良いことが示されており⁵⁰⁾、*Xenopus oocyte* 発現系では取り込み反応時間を 60 分としたことから、細胞内濃度も十分に上昇すると考えられる。一方、哺乳類細胞に発現させた URAT1 および OAT4 の阻害試験においては取り込み時間が 2 分間および 15 分間と短く、細胞内への薬物移行が不十分となる可能性があることから、15 分間のプレインキュベーション中においても luseogliflozin を曝露させた。これらことにより、luseogliflozin は、いずれの試験においても内部まで十分な濃度となっており、*trans*-阻害作用についても起こる可能性はきわめて低いと考えられる。以上の結果から、luseogliflozin が UA を再吸収する輸送体を阻害して UA 排泄を促進する可能性は排除できると考えられる。

腎臓における UA 再吸収に関わる輸送体に加えて、UA の分泌に関わる輸送体である OAT1 および OAT3 への luseogliflozin の作用についても検討したが、最高 100 μM の濃度において影響は認められなかった (Figure 3-6)。さらに、消化管で UA 分泌に働く BCRP に対しても luseogliflozin の影響は最高 100 μM の濃度において認められなかった (Figure 3-7)。これらの結果から、luseogliflozin は、腎臓における UA の分泌および消化管における UA の分泌に影響を与えないと考えられる。

健康成人における luseogliflozin の UE_{UA} 促進作用は UE_{GL} と高い相関が示され (Figure 2-13A)、さらに、SGLT2 に変異を認める家族性腎性尿糖において SUA 値が低下する報告があることから¹⁴⁶⁾、SGLT2 が UA を再吸収していれば、すべてが説明可能と考えた。しかしながら、SGLT2 による UA の取り込みを測定した結果、UA の取り込みは認められなかった (Figure 3-8)。したがって、luseogliflozin が SGLT2 による UA 再吸収を阻害する機序の可能性はないと考えられる。

以上の結果をまとめると、第 2 章において臨床データから UE_{UA} は薬物濃度よりも UE_{GL} と相関することが示され、本章において luseogliflozin は UA 輸送に関わる輸送体を阻害または促進しなかったこと、ならびに SGLT2 が UA を取り込まなかったことから、 UE_{UA} は luseogliflozin の直接作用ではなく、SGLT2 阻害による尿糖に起因する可能性が強く示唆された。

第4章 GLUT9 isoform 2 に対するグルコースの作用

第1節 緒言

第2章および第3章の結果から、luseogliflozin による UE_{UA} の促進は、尿糖による作用の可能性が強く示唆された。グルコースの UE_{UA} の促進作用についても、phloridzin と同様に古くからの報告が複数あるが、その機序は明らかになっていない^{90, 116, 117, 147)}。

これまでの検討の結果を踏まえ、尿管上皮細胞の apical 膜に発現し、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¹⁴⁵⁾。近年の機能的および遺伝学的研究により、GLUT9 は生体内において電位依存的に UA を細胞内から細胞外の排出方向に輸送することが明らかになった^{120, 123, 124)}。GLUT9 には N 末端側アミノ酸残基数が異なる 2 種のスプライシングバリエーションがあり¹⁴⁵⁾、isoform 1 が近位尿管上皮細胞の basolateral 側に発現し、isoform 2 が apical 側に発現している。Apical 膜に発現する URAT1 が管腔から UA を細胞内に取り込み、basolateral 膜に発現する isoform 1 が血管側へ UA を排出する経路が、UA の主要な再吸収経路と考えられている^{131, 145)}。さらに、isoform 1 については、グルコースによる UA 排出および UA によるグルコース排出が促進され、グルコースと UA を交換輸送することが示されている^{124, 148)}。一方、isoform 2 については生理的な役割に関する報告はひとつもない¹⁴⁵⁾。また、5 mM のまでのグルコースにおいて UA との交換輸送も示されていない^{123, 148)}。しかしながら、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¹⁴⁵⁾、UA やグルコースの輸送特性も類似していることから^{123, 124)}、グルコースと UA を交換輸送する能力は持っているのではないかと考えた。

健康成人の血漿中のグルコース濃度は 5~5.5 mM (100~190 mg/dL) であり、食後においては 10 mM 程度まで上昇する¹⁹⁾。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る。ここに SGLT2 の阻害が起こった場合には、さらに高濃度のグルコースにて近位尿管が曝露を受ける可能性が考えられる。

以上のことから、GLUT9 isoform 2 は、試験条件を見直すことによりグルコースと UA の交換輸送を示す可能性があると考えた。本第4章においては、GLUT9 isoform 2 を発現させた *Xenopus* oocyte を用いて、D-グルコースと UA の交換輸送を検出可能とする試験条件を検討し、D-グルコースによる UA 輸送の促進作用を検討した。

さらにごく最近、Kimura らは GLUT9 の isoform 2 タンパクがヒト集合管の apical 側に強く発

現することを示し、UA の再吸収に関与する可能性を報告した¹⁴⁹⁾。健康成人に luseogliflozin 3 mg 以上を投与したときの尿中グルコース濃度は 100 mM 以上となったことから、集合管における GLUT9 の isoform 2 による UA の再吸収を高濃度のグルコースが阻害する可能性が考えられる。そこで、交換輸送の検討と同様に GLUT9 isoform 2 を発現させた *Xenopus oocyte* を用いて、UA の取り込みに対する 100 mM の D-グルコースの阻害作用についても検討を行った。

第2節 実験方法

1. 試薬

[¹⁴C]Uric acid (1.96 TBq/mol) は Moravek Biochemicals, Inc. から購入した。その他の試薬は、Sigma-Aldrich、Wako Pure Chemical Industries、Nacalai Tesque、Invitrogen、Life technologies、Applied Biosystems および Becton, Dickinson から購入した。

2. 試験系：GLUT9 isoform 2 発現アフリカツメガエル oocyte

GLUT9 isoform 2 を *Xenopus* oocyte に発現させたものを使用した。

2-1. プラスミド DNA の調製

GLUT9 isoform 2 の coding region を含む pCMV6-XL5 ベクター 10 ng (20 μL) を大腸菌 (DH5α、タカラ、滋賀) 液 25 μL に添加後、42°C で 1 分間熱処理し、形質転換させた。氷上で 2 分間冷却後、SOC 培地 300 μL に移し、37°C で 30 分間振とう培養した。大腸菌液を、100 mg/mL の ampicillin 溶液を塗布した LB 寒天培地プレートに播種し、37°C で 12 時間培養した。形成された大腸菌コロニーを 4 つ採取し、それぞれ 100 μg/mL の ampicillin 含有 LB 培地 12 mL で、37°C で 5 時間振とう培養した。4 つのうちの 2 つの菌液からそれぞれ 0.50 μL を採取し、PCR にて増幅後 (35 サイクル)、2% agarose gel-tris-acetate-EDTA buffer による電気泳動により、135 bp の DNA バンドを確認した (Figure 4-1)。

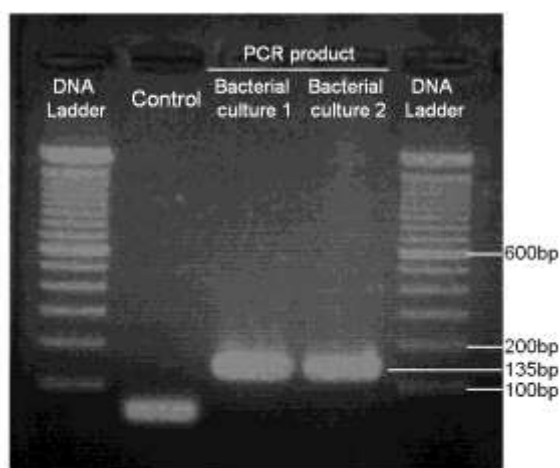


Figure 4-1 PCR products of plasmid DNA for GLUT9 isoform 2.

GLUT9 isoform 2 の DNA が確認されたうちの 1 つから、10 μL を採取し、200 mL の ampicillin 含有 LB 培地に播種し、37°C で 13 時間振とう培養し、遠心 (6000 rpm、5 分間、4°C) して大

腸菌ペレットを得た。このペレットから、QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit (Qiagen) を用いてプラスミド DNA を抽出・精製した。すなわち、ペレットを RNaseA を含有する溶解 buffer に完全に再懸濁し、細胞をアルカリ溶解させた。溶解液を中和した後、filter cartridge に添加し、室温で 10 分間静置した。その後、filter cartridge にてろ過しながら column cartridge に添加した。DNA を column に吸着させ、洗浄 buffer で洗浄したのち、溶出 buffer で DNA を溶出させた。溶出液についてイソプロパノール沈殿およびエタノール沈殿にて DNA を洗浄したのち、超純水 (Invitrogen) に溶解しプラスミド DNA (97 μg) を得た。プラスミド DNA を制限酵素 XbaI により切断して直鎖にした。反応液の一部を取り、1% agarose gel-tris-acetate-EDTA buffer による電気泳動により 6500 bp のバンドを確認した (Figure 4-2)。確認後、反応液からクロロホルム抽出およびイソプロパノール沈殿にて DNA を洗浄したのち、超純水に溶解し cDNA (45 μg) を得た。

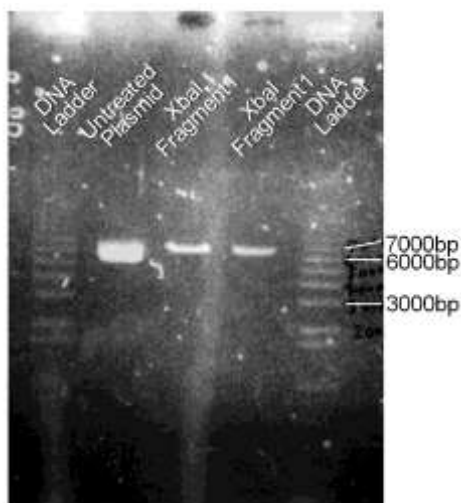


Figure 4-2 Single stranded DNA of GLUT9 isoform 2.

2-2. cRNA の調製

T7 RNA polymerase による copied RNA (cRNA) 合成は、mMESSAGE mMACHINE Kit (Life Technology) を用いて、37°C で 2 時間行った後、鋳型 DNA を除くために DNase I 処理を 37°C で 15 分間行い、フェノール・クロロホルム抽出後、エタノールおよび酢酸アンモニウムで cRNA を沈殿させた。合成した cRNA を遠心により回収し、70%エタノールで洗浄後、超純水で溶解し cRNA (91 μg) を得た。

2-3. GLUT9 isoform 2 発現 oocyte の調製

第3章2節4-2項と同様の方法にて collagenase 処理、濾胞除去、cRNA または水注入を行い、遺伝子発現 oocyte および水注入 oocyte を調製した。前述した方法と異なる条件を用いた場合は適宜各項に記載した。

3. GLUT9 isoform 2 発現 oocyte による $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ 取り込み *trans*-促進試験

cRNA (25 ng/oocyte) または水を注入後2日間培養した oocyte をそれぞれ1群につき18個ずつ24 well プレートに振り分けた。Na⁺/K⁺置換 ND96 で15分間、25°C でプレインキュベーション後、50 nL の D-グルコース溶液 (100 mM) を注入し、10 μM の $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ を含む Na⁺/K⁺置換 ND96 に置換することにより取り込み反応を開始させた。25°C で15分間インキュベーション後、第3章2節6項と同様に $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ の取り込みを測定し、浸透圧対照として設定した L-グルコース溶液 (100 mM) を注入した場合と比較した。条件検討において上記と異なる方法を用いた場合は各試験結果の項に示した。

Na⁺/K⁺-replaced ND96 oocyte uptake buffer (pH 7.4)

Chemical	Concentration
KCl	98.0 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.0 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.8 mM
HEPES	5.0 mM

The solution was adjusted to pH 7.4 with 1 M Tris.

4. GLUT9 isoform 2 発現 oocyte による $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ 排出 *trans*-促進試験

cRNA (0.25 ng/oocyte) または水を注入後1日間培養した oocyte をそれぞれ1群につき8~10個ずつ振り分けた。1個ずつ ND96 で15分間、25°C でプレインキュベーション後、1 mM の $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ を注入し、その後5および10 mM の D-グルコースを含む ND96 (100 μL) に置換することにより排出反応を開始させた。25°C で5分間インキュベーション後に所定量の ND96 を採取し、第3章2節6項と同様に ND96 および卵母細胞の放射能を液体シンチレーションカウンター (LSC 5100、Aloka) を用いて測定した。 $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ の残存率または排出率 (% radioactivity) は、ND96 中の放射エネルギー (dpm) および oocyte 中の放射エネルギー (dpm) を求め、合計値で除することにより算出した。条件検討において上記と異なる方法を用いた場合は各結果の項に示した。

5. GLUT9 isoform 2 発現 oocyte による $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ 取り込み *cis*-阻害試験

cRNA (25 ng/oocyte) または水を注入後2日間培養した oocyte をそれぞれ1群につき10~12

個ずつ 24 well プレートに振り分けた。ND96 で 15 分間、25°C でプレインキュベーション後、10 mM の [¹⁴C]UA および 10 または 100 mM の D-グルコースを含む ND96 に置換することにより取り込み反応を開始させた。25°C で 15 分間インキュベーション後、第 3 章 2 節 6 項と同様に [¹⁴C]UA の取り込みを測定し、control (ND96) ならびに浸透圧対照として設定した D-マンニトール (100 mM) および L-グルコース (100 mM) と比較した。

6. 統計解析

すべてのデータは mean ± SEM で表記した。統計的有意差は、2 群間の比較は分散分析を行ったのち、Student's *t*-test または Aspin-Welch's *t*-test により、3 群の場合は Dunnett's test にて検定を行い、 $p < 0.05$ の場合に有意差有り と判定した。

第3節 結果

1. GLUT9 isoform 2 発現 oocyte による $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ 取り込み試験条件の検討

GLUT9 isoform 2 による UA と D-グルコースの交換輸送を検討するにあたり、はじめに、より安定的な結果が得られやすい取り込み試験にて D-グルコースの *trans*-促進作用を検討することとした。緒言にも述べた通り、GLUT9 isoform 2 の UA 取り込みに対して D-グルコースは *trans*-促進作用を示さないとする報告があることから、下記のように生理条件を考慮した新規の試験条件を検討した。

GLUT9 は、isoform 1 および isoform 2 共に負の膜電位を駆動力としてアニオンである UA を排出する活性を示す¹²³⁾。そのため、通常の実験液 (ND96) での取り込みは膜電位の抵抗を受け、絶対活性が低く促進効果が検出しにくいと考えられる。そこで、ND96 の Na^+ を K^+ に置換 (Na^+/K^+ 置換 ND96) することにより、GLUT9 isoform 2 発現 oocyte の膜電位差を低下させ、取り込み方向の活性を高める条件を検討した。

GLUT9 isoform 2 発現 *Xenopus* oocyte および水注入 oocyte を用い、実験液に Na^+/K^+ 置換 ND96 を用いて $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ の取り込みを検討した。その結果、GLUT9 isoform 2 を介した $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ の取り込みは、通常の ND96 に比べて 5.7 倍に増加した (Figure 4-3)。

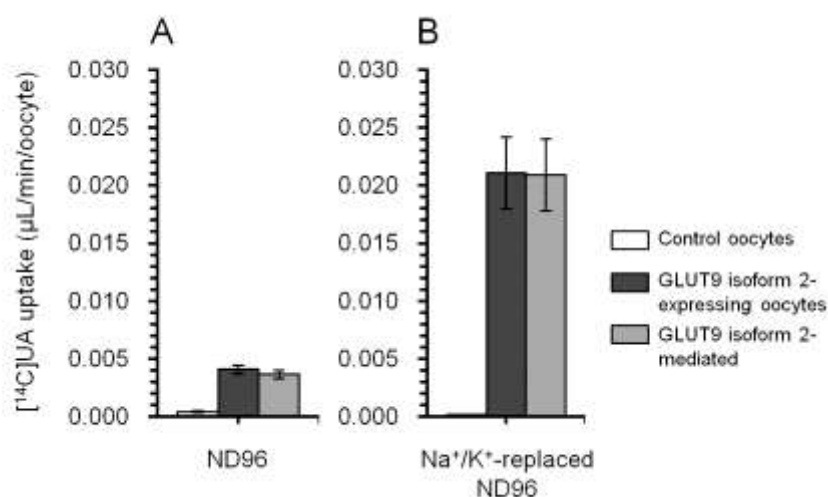


Figure 4-3 The effects of the replacing Na^+ with K^+ in ND96 on GLUT9 isoform 2-mediated $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ uptake in the gene expressing *Xenopus* oocytes.

Oocytes were incubated at 25°C for 20 min (A) or 60 min (B) in 10 μM $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ added to the extracellular buffer. Data are shown as mean \pm SEM ($n = 9$ or 10).

2. GLUT9 isoform 2 を介した¹⁴C]UA 取り込みに対する D-グルコースの *trans*-促進作用

GLUT9 isoform 2 を介した UA の取り込みに対する D-グルコースの *trans*-促進作用について、反応液に Na⁺/K⁺置換 ND96 を用い、GLUT9 isoform 2 発現 *Xenopus* oocyte および水注入 oocyte を用いて検討した。D-グルコースは、¹⁴C]UA の取り込み反応の開始直前に 100 mM の濃度の溶液を各 oocyte に 50 nL 注入した。なお、oocyte 内容積を考慮した場合、oocyte 内では 16 倍希釈されるため¹⁵⁰、濃度は 6.25 mM 程度であると推定される。

検討の結果、100 mM の D-グルコースを注入したときの GLUT9 isoform 2 を介した¹⁴C]UA の取り込みは、浸透圧対照として用いた 100 mM の L-グルコースを注入した場合に比べて有意に増加し、その増加は L-グルコースの 32%であった (Figure 4-4)。

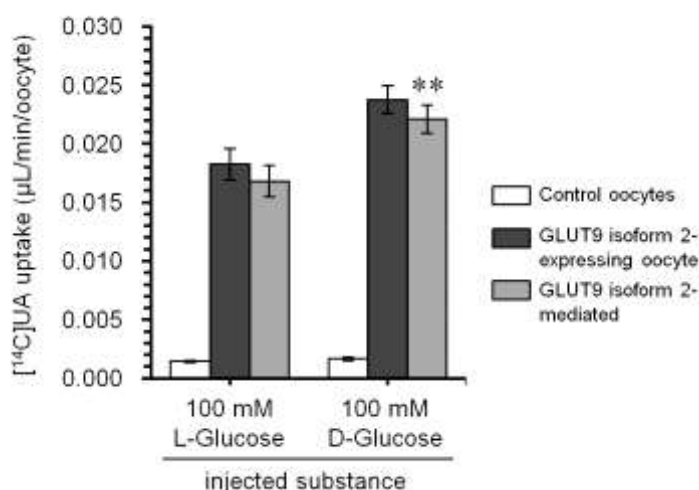


Figure 4-4 *Trans*-stimulatory effect of D-glucose on GLUT9 isoform 2-mediated [¹⁴C]UA uptake in the gene expressing *Xenopus* oocytes.

Oocytes were incubated at 25°C for 15 min in 10 μM [¹⁴C]UA added to the extracellular buffer after the injection of 100 mM D-glucose or L-glucose. Data are shown as mean ± SEM ($n = 14\sim 17$). ** $p < 0.001$ vs. L-glucose (Aspin-Welch's t -test).

3. GLUT9 isoform 2 発現 oocyte による $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ 排出試験条件の検討

GLUT9 isoform 2 発現 oocyte を用いた $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ 排出輸送の試験条件は、当初 *Xenopus* oocyte への cRNA 注入量を 25 ng、注入後の oocyte の培養期間を 2 日間、排出の反応時間を 5 分間、oocyte に注入する $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ 濃度を 0.4 mM としていた。その結果、10 mM 以上の D-グルコースにおいて再現性のある促進効果は認められなかった。促進効果が認められなかった理由として、 $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ の排出速度が速く oocyte 内の $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ が不足することが想定された。そこで反応時間中十分な $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ が維持できるよう、GLUT9 isoform 2 を介した UA 排出活性を低下させる条件を検討した。

まず、GLUT9 isoform 2 の発現量を低下させることを意図し、cRNA 注入量を 25 ng から 2.5 ng まで低下させ、その場合の $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ の oocyte 内の残存量および反応液中への排出量を測定し、残存率を測定した。その結果、cRNA 注入量 25 ng のときの細胞内 $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ の残存量は注入量の 56~64%であり、2.5 ng まで減少させた場合でも 66%であり、十分な排出量の低下は認められなかった (Figure 4-5A)。次に、cRNA の注入量を 0.1 ng まで減少させ、さらに oocyte の培期間を 2 日から 1 日に短縮、 $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ 濃度を 1 mM とした条件にて $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ の残存量を測定した。その結果、cRNA 注入量 2.5 ng のときの $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ の残存量は注入量の 87%となり、さらに 0.25 ng まで低下させたときの排出量は 95%となった (Figure 4-5B)。また、cRNA 注入量を 2.5 ng としたときの経時的な残存量の変化を検討した結果、15 分までの間、直線的な残存量の低下 (排出) が認められ、5 分後では 97%、15 分後では 91%まで低下する結果が得られた (Figure 4-5C)。なお、水を注入した oocyte における $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ の残存率は、GLUT9 isoform 2 発現 oocyte に比べて高い値であることを確認した (Figure 4-5A~C)。

以上の結果より、cRNA を 0.25 ng 注入後 1 日培養した oocyte (GLUT9 isoform 2 低発現 oocyte) を用い、1 mM の $[^{14}\text{C}]\text{UA}$ を注入後、5 分間の排出を測定する条件で試験を行うこととした。

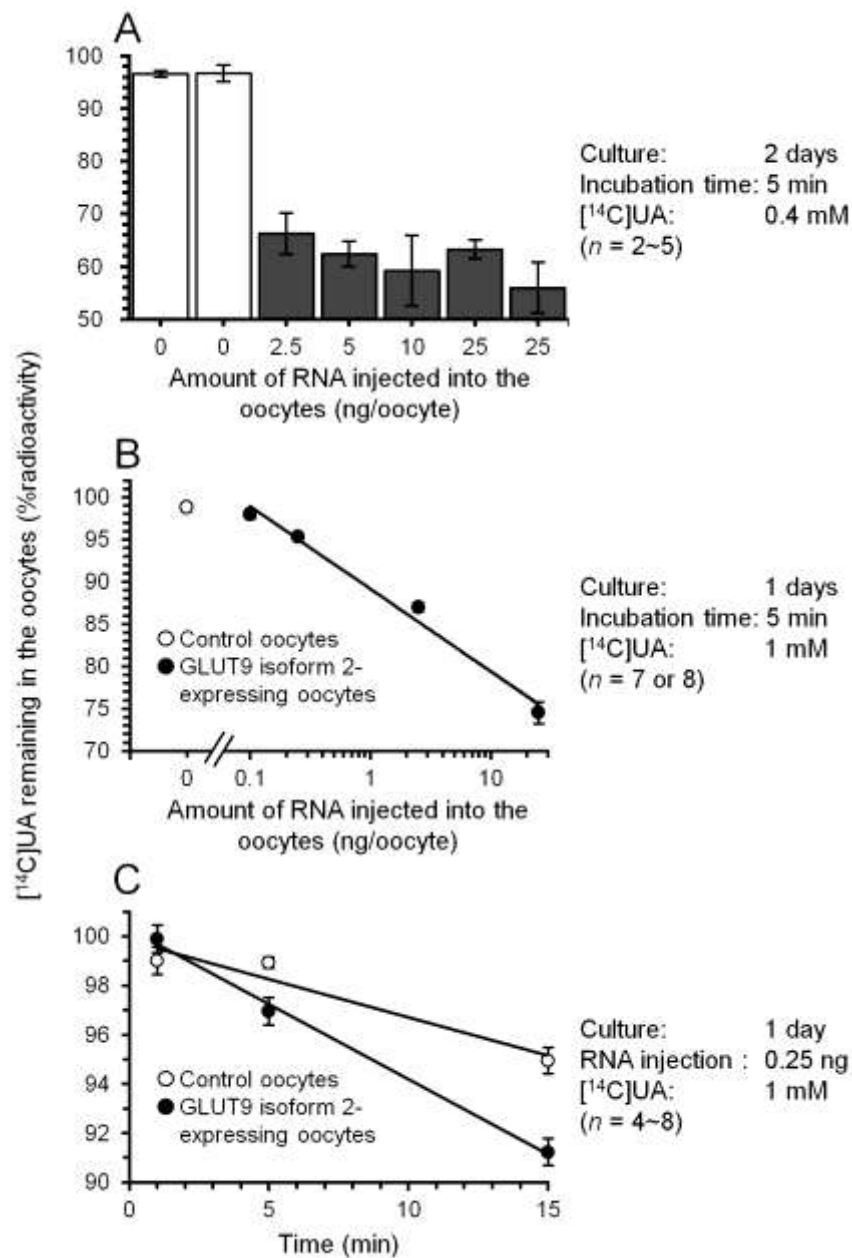


Figure 4-5 The effects of injection amount of cRNA, culturing time, substrate concentration, and reaction time on GLUT9 isoform 2-mediated [¹⁴C]uric acid (UA) efflux by gene expressing *Xenopus* oocytes.

Oocytes were incubated at 25°C for 5 (A and B) or 15 min (C) after the injection of 0.4 (A) or 1 mM (B and C) [¹⁴C]UA. Data are shown as mean ± SEM.

4. GLUT9 isoform 2 を介した $[^{14}\text{C}]$ UA 排出に対する D-グルコースの *trans*-促進作用

GLUT9 isoform 2 を介した UA の排出に対する D-グルコースの *trans*-促進作用について、GLUT9 isoform 2 低発現 oocyte および水注入 oocyte を用いて検討した。個々の oocyte に $[^{14}\text{C}]$ UA を注入し、直後に 5 mM および 10 mM の D-グルコースを含む反応液に交換し、10 mM の L-グルコースと比較した (Figure 4-6)。

検討の結果、GLUT9 isoform 2 を介した $[^{14}\text{C}]$ UA の排出は、浸透圧対照として用いた 10 mM の L-グルコースに比べて 5 mM の D-グルコースにより 2.1 倍、10 mM の D-グルコースにより 3.1 倍に増加した。10 mM の D-グルコースの場合は有意差が認められた (Figure 4-6)。

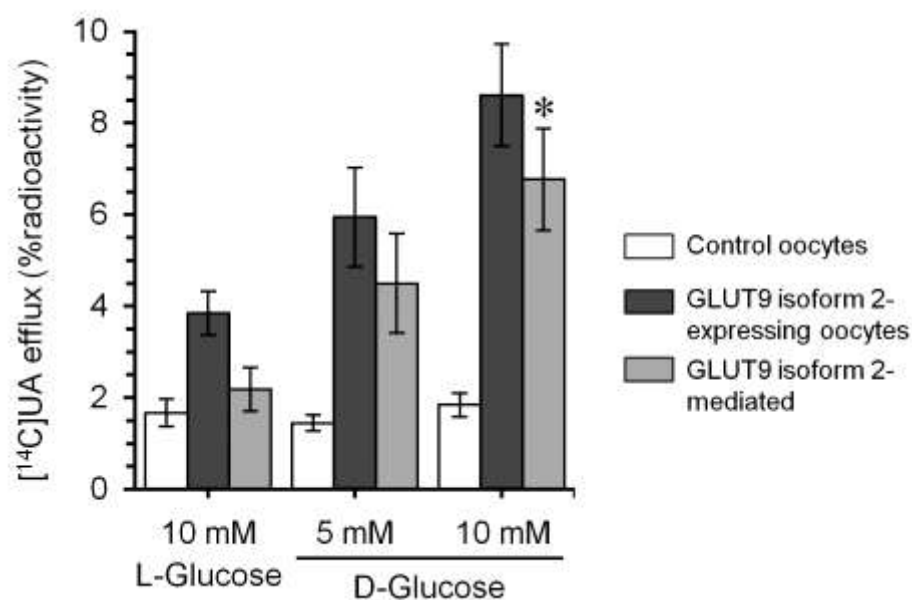


Figure 4-6 *Trans*-stimulatory effect of D-glucose on GLUT9 isoform 2-mediated $[^{14}\text{C}]$ uric acid (UA) efflux in the gene expressing *Xenopus* oocytes.

Oocytes were incubated at 25°C for 5 min after the injection of 1 mM $[^{14}\text{C}]$ UA with D-glucose or L-glucose added to the extracellular buffer. Data are shown as mean \pm SEM ($n = 5\sim 10$). * $p < 0.05$ vs. L-glucose (Dunnet's test).

さらに、GLUT9 isoform 2 低発現 oocyte における D-グルコースによる $[^{14}\text{C}]$ UA 排出の *trans*-促進効果が GLUT9 isoform 2 によるものかどうかを確認するために、GLUT9 (isoform 1 および 2) に対し阻害作用を有するベンズブロマロンの効果を検討した (Figure 4-7)。なお、ベンズブロマロンは、GLUT9 isoform 1 に対して 50 μM で 55%、100 μM で約 80%、isoform 2 に対して 50 μM で 68%を阻害すると報告されていることから、100 μM となるように ND96 (反応液) に添加した。

検討の結果、10 mM の D-グルコース添加時の GLUT9 isoform 2 を介した $[^{14}\text{C}]$ UA の排出は、100 μM のベンズブロマロンにより非添加時の 54%にまで有意な低下が認められた (Figure 4-7)。

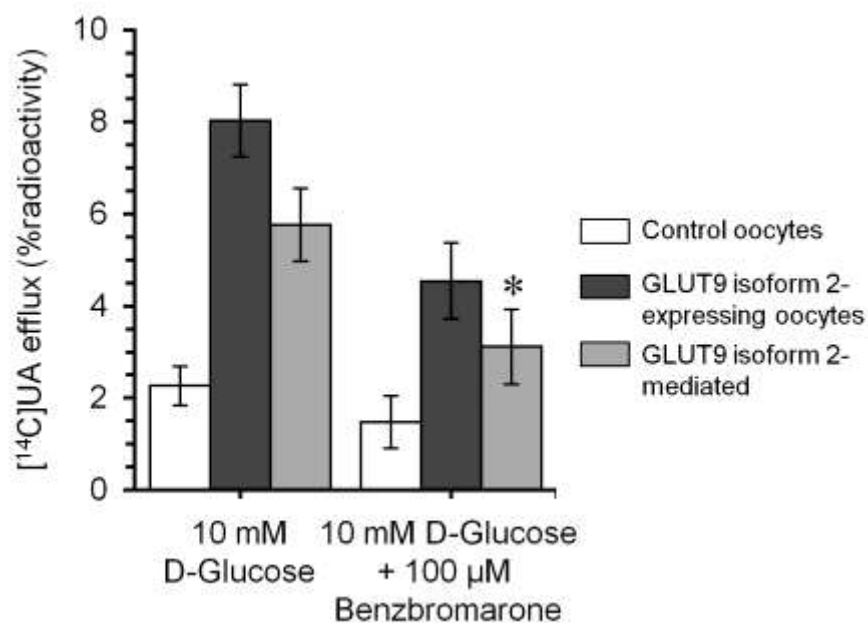


Figure 4-7 Inhibitory effect of benzbromarone on D-glucose-stimulated $[^{14}\text{C}]$ uric acid (UA) efflux via GLUT9 isoform 2-expressing *Xenopus* oocytes.

Oocytes were incubated at 25°C for 5 min after the injection of 1 mM $[^{14}\text{C}]$ UA with presence of D-glucose and/or benzbromarone added to the extracellular buffer. Data are shown as mean \pm SEM ($n = 7\sim 10$). * $p < 0.05$ vs. 10 mM D-glucose (Aspin-Welch's *t*-test)

5. GLUT9 isoform 2 を介した¹⁴C]UA 取り込みに対する D-グルコースの cis-阻害作用

ごく最近、GLUT9 の isoform 2 タンパクがヒト集合管の apical 側に強く発現することおよび UA の再吸収に関与する可能性が報告された¹⁴⁹⁾。そこで、SGLT2 阻害薬により尿糖の濃度が上昇した場合に、集合管における GLUT9 の isoform 2 による UA の再吸収を阻害する可能性が考えられる。そこで、GLUT9 isoform 2 を発現させた *Xenopus* oocyte および水注入 oocyte を用いて、UA の取り込みに対する 100 mM の D-グルコースの cis-阻害作用について検討を行った。この検討においては、生理的条件下での UA の取り込みが想定されるため反応液に ND96 を用い、通常の発現量の oocyte により検討を行った。

検討の結果、GLUT9 isoform 2 を介した¹⁴C]UA 取り込みについて、浸透圧対照として用いた 100 mM の D-マンニトールおよび D-グルコースならびに 10 mM の D-グルコースは control (ND96) と有意差が付かなかったが、100 mM の D-グルコースは control に対して約 23%の有意に低下させる作用が認められた (Figure 4-8)。

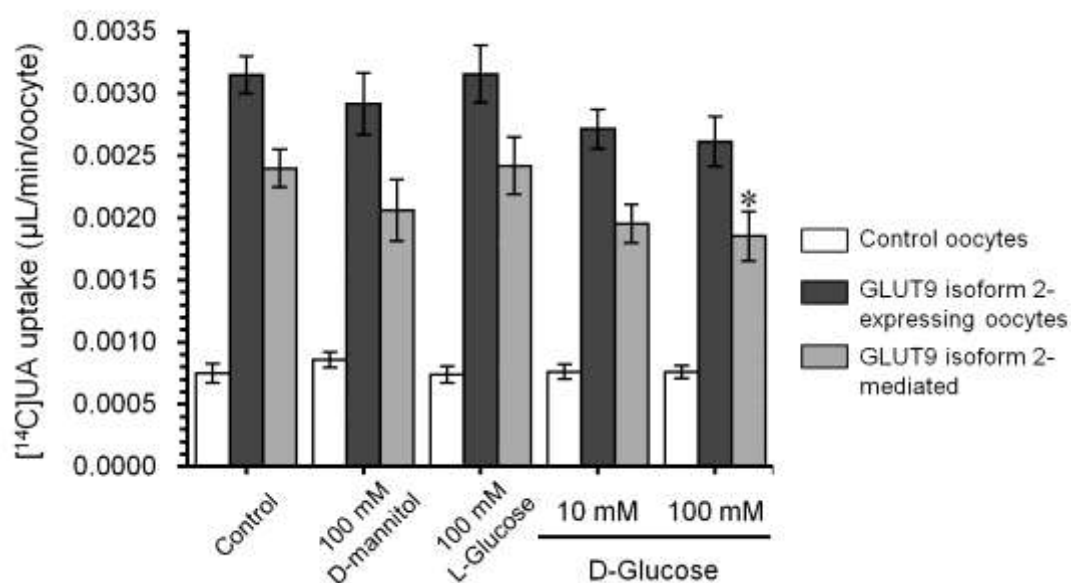


Figure 4-8 Cis-inhibitory effect of D-glucose on GLUT9 isoform 2-mediate ¹⁴C]UA uptake in the gene expressing *Xenopus* oocytes.

Oocytes were incubated at 25°C for 15 min in 10 μM ¹⁴C]UA added to the extracellular buffer. Data are shown as mean ± SEM (n = 8~12). *p < 0.05 vs. control (Aspin-Welch's t-test), Significant difference was not observed as a result of multiple comparison (Dunnnett's test) was used.

第4節 考察

本第4章においては、腎尿細管の apical 側の細胞膜に発現する GLUT9 の isoform 2 を介して、近位尿細管においてはグルコースと UA の交換輸送、集合管においてはグルコースが UA の再吸収を阻害することにより UE_{UA} を増加させるとの仮説を立て、GLUT9 isoform 2 を発現させた *Xenopus oocyte* による $[^{14}C]UA$ 輸送に対する D-グルコースの作用を検討した。検討の要点は、GLUT9 の isoform 2 による D-グルコースによる $[^{14}C]UA$ との交換輸送、および UA 取り込みの阻害作用に関して否定的な報告^{123, 148)}のみである状況において、生理条件および SGLT2 阻害薬の作用発現状況等を考慮した試験条件の変更により交換輸送および阻害作用を示す結果が得られるかどうかの点にある。

GLUT9 isoform 2 による $[^{14}C]UA$ と D-グルコースの交換輸送は、はじめに、より安定的な結果が得られやすい取り込み試験にて検討した。GLUT ファミリーは促進拡散型の輸送体で、濃度勾配に従って糖類の輸送を行う。GLUT9 による UA の輸送に関しても排出と取り込みの両方向の活性を持つこと^{123, 124)}、さらに、GLUT9 isoform 1 では UA 取り込みに対する D-グルコースの *trans*-促進作用が示されている¹⁴⁸⁾。しかしながら、GLUT9 isoform 2 では D-グルコースによる *trans*-促進作用は起こらないことが報告されている^{123, 148)}。GLUT9 は、isoform 1 および isoform 2 共に負の膜電位を駆動力としてアニオンである UA を細胞外に排出することが明らかになっており¹²³⁾、生理的条件下での UA の取り込みは膜電位による抵抗を受けると考えられる。そこで、反応液の Na^+ を K^+ に置換することによって膜電位を低下させた条件であれば、GLUT9 を介した取り込み輸送特性を検出しやすいのではないかと考えた。輸送試験に用いる反応液 (ND96) 中の Na^+ を K^+ に置換して試験を行った結果、GLUT9 isoform 2 を介した $[^{14}C]UA$ の取り込みは、通常の ND96 に比べて 5.7 倍に増加した (Figure 4-3)。この条件にて検討を行った結果、100 mM の D-グルコース注入により、GLUT9 isoform 2 を介した $[^{14}C]UA$ の取り込みが促進されること (*trans*-促進作用) が明らかになった (Figure 4-4)。この結果は、生理的条件とは異なる条件での結果であるが、GLUT9 isoform 2 の本質的な輸送能を示したものと考えられる。

次に、生理的条件下と同一方向の排出試験にて GLUT9 isoform 2 による UA と D-グルコースの交換輸送を検討した。SGLT2 阻害薬を投与したときの近位尿細管におけるグルコース濃度として 10 mM を設定した。過去の報告での検討では、D-グルコース濃度を 3 および 5 mM としていたことから、10 mM まで上げた条件であれば *trans*-促進作用が示されることが期待された。しかしながら、通常の GLUT9 isoform 2 の発現量 (cRNA の注入量 : 25 ng/oocyte) では 10 mM の D-グル

コースの UA 排出 *trans*-促進作用に再現性は認められず、過去の報告^{123, 148)}の通りの結果となった。この試験条件においては、*trans*-促進作用が確認されない原因として GLUT9 isoform 2 の¹⁴C]UA 輸送活性が高すぎる可能性が推察された。すなわち、コントロール条件下において GLUT9 による排出活性が高すぎるために oocyte 内の¹⁴C]UA が不足することによって排出活性の促進が検出できない可能性が想定された。そこで、cRNA の注入量を 25 ng/oocyte から 0.25 ng/oocyte まで減少させ、注入後の培養日数を 2 日から 1 日に短縮することによって GLUT9 isoform 2 低発現 oocyte を作成した。さらに、注入する¹⁴C]UA の濃度を 0.4 mM (標識体の定量可能な最低濃度) から 1 mM (煩雑な pH 調整をせずに溶解可能な最高濃度) へ変更した結果、¹⁴C]UA の排出量は当初注入量の約 40%であったものから約 5%に低下した (Figure 4-5A~C)。本条件にて D-グルコースによる¹⁴C]UA 排出への作用を検討したところ、10 mM の D-グルコースにより¹⁴C]UA 排出が促進されることが確認された (Figure 4-6)。さらに、¹⁴C]UA 排出の促進効果が GLUT9 isoform 2 に起因するかどうか確認するために、GLUT9 isoform 2 の UA 取り込みを阻害する濃度¹²³⁾のベンズブロマロンの効果を検討した結果、100 mM のベンズブロマロンは、10 mM D-グルコース添加によって増加した排出量を有意に低下させた (Figure 4-7)。これらの結果から、D-グルコースによる GLUT9 isoform 2 を介した¹⁴C]UA の排出輸送の *trans*-促進作用がはじめて明らかにされた。序論にも述べた通り、健康なヒト血漿中のグルコース濃度は 5~5.5 mM であり、食後においては 10 mM 程度まで上昇し¹⁹⁾、血漿中のほとんどのグルコースは糸球体ろ過を受け原尿中においても、ほぼ同じ濃度となると考えられる。この状況下で SGLT2 阻害薬により SGLT2 が阻害された場合、近位尿細管におけるグルコース濃度はさらに高くなる可能性が考えられる。したがって、ヒト *in vivo* においても GLUT9 isoform 2 によりグルコースと UA の交換輸送が生じるものと考えられる。なお、近位尿細管の起始部 (S1~S2) に発現する SGLT2 を選択的に阻害した場合、その遠位側 (S3) に発現する SGLT1 がグルコースを高度に再吸収し、上皮細胞内のグルコース濃度が高まることによって GLUT9 isoform 1 による UA の血管側への排出が阻害される可能性も想定される。しかしながら、その場合の UA およびグルコースの細胞内濃度に関しては何も情報がないことから、検討は行わなかった。以上のことから、SGLT2 阻害薬による UE_{UA} 促進作用について、近位尿細管における GLUT9 isoform 2 による UA とグルコースの交換輸送が関与する可能性が示唆された。

GLUT9 の isoform 2 に関し、ヒト集合管に強く発現することおよび UA の再吸収に関与する可能性がごく最近に報告された¹⁴⁹⁾。過去の報告では、GLUT9 の isoform 1¹²⁴⁾および isoform 2¹²³⁾のいずれを介した¹⁴C]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。実際、健康成人に luseogliflozin 3 mg 以上を投与したときの尿中グルコース濃度は 100 mM 以上であった。そこで、通常の発現量の GLUT9 isoform 2 発現 oocyte を用いて、 $[^{14}\text{C}]$ UA の取り込みに対する D-グルコースの *cis*-阻害作用について検討した。その結果、100 mM の D-グルコースに $[^{14}\text{C}]$ UA の取り込みに対して *cis*-阻害作用があることがはじめて明らかになった (Figure 4-8)。以上の結果から、SGLT2 阻害薬による UE_{UA} 促進作用について、前述の近位尿細管における機序に加え、集合管におけるグルコースによる GLUT9 isoform 2 を介した UA 再吸収の *cis*-阻害が関与する可能性が示唆された。

以上の結果から、SGLT2 阻害薬の SUA 値低下の機序は、尿中のグルコースによる GLUT9 isoform 2 を介した UA との相互作用である可能性が示唆された (Figure 4-9)。なお、ヒトにおけ

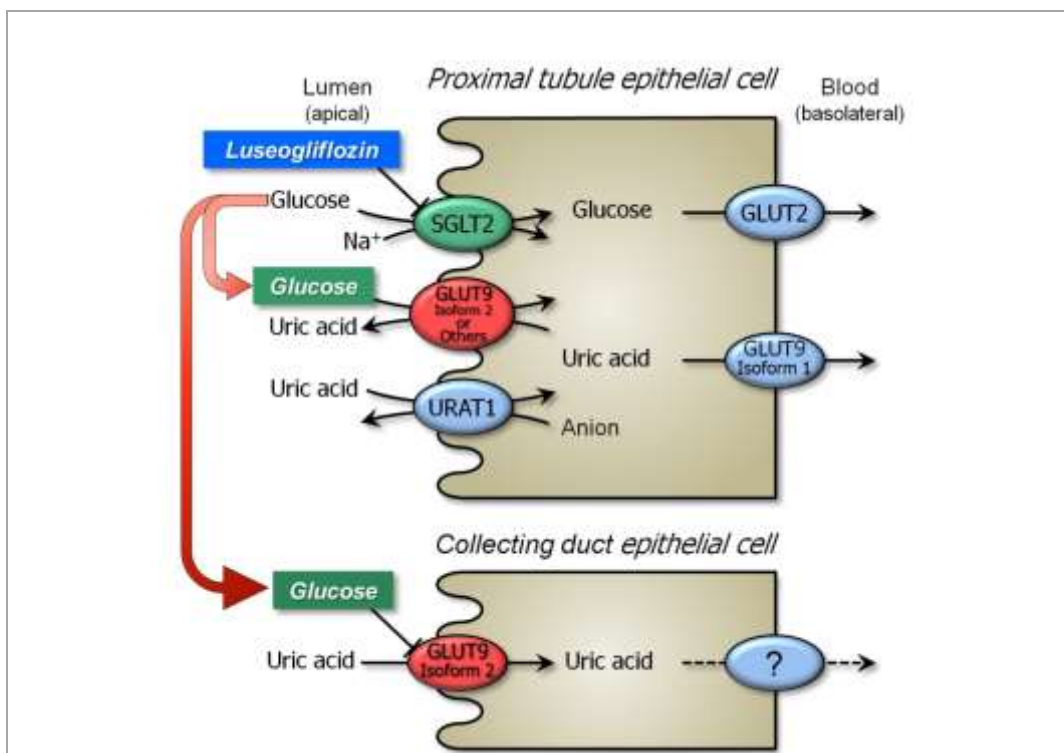


Figure 4-9 Proposed model for uricosuric effect of SGLT2 inhibitor by glycosuria-induced uric acid/glucose interaction mediated by GLUT9 isoform 2.

The luminal glucose possibly stimulates the UA efflux mediated by GLUT9 isoform 2 or any other functionally similar transporters at the proximal tube, and possibly inhibits the UA uptake mediated by GLUT9 isoform 2 at the collecting duct after an administration of SGLT2 inhibitor.

る GLUT9 isoform 2 の関与を確認するには、当該遺伝子欠損者による臨床試験が必要と考えられる。また、近位尿細管 apical 膜における GLUT9 isoform 2 の分布については、isoform 非選択的な抗 GLUT9 抗体による免疫組織化学的結果はあるものの¹³⁾その主要な発現部位は集合管であると報告がなされた¹⁴⁾。これらの評価にもさらなる検討が必要と考えられ、機能的に類似する輸送体が今後確認される可能性もあると考えられる。

SGLT2 阻害薬の SUA 値低下の機序について、GLUT9 isoform 2 を介したグルコースの作用以外にもいくつかの可能性が考えられる。まず、SGLT2 阻害薬の作用の結果、尿細管上皮細胞内のグルコース濃度が低下することにより、エネルギー上の不足が生じて UA 再吸収が低下する可能性が考えられる。しかし、糖尿病患者における SUA 値低下の機序と共通であった場合、糖尿病患者では細胞内のグルコース濃度は低下せずに尿糖が生じるため、その可能性は低いと考えられる。次に、マンニトールにおいても若干の CL_{UA} 上昇が報告されていることから⁹⁰⁾、グルコースによる浸透圧利尿の寄与も考えられるが、尿量と UE_{GL} との相関が低かったことからその可能性は高くない。また、URAT1、OAT4、OAT10 および SMCT1 などの UA を再吸収する輸送体に対するグルコースの阻害作用も考えられる。しかし、今回検討は行わなかったが、これらの輸送体は基本的にアニオンを基質とすることから、その可能性は低いと考えられる。ほかに、糖尿病患者において腎臓の器質的障害により UE_{UA} が促進される可能性も考えられるが、luseogliflozin による UE_{UA} 促進作用は、健康成人に投与後 2 時間で認められること、 UE_{GL} の消失後速やかに baseline 値に戻ったことからその可能性は低いと考えられる。

今回の検討において、SGLT2 阻害薬による SUA 値低下の機序の 1 つとして、GLUT9 isoform 2 を介したグルコースによる UA と交換輸送の可能性が示めされた。この機序によると、UA の排泄によりグルコースの再吸収が促進される可能性が考えられる。Luseogliflozin による UE_{UA} の増加は 1 日あたり最大で約 300 mg であった (Figure 2-5)。これは 1 日あたりの尿糖約 60 g に対して 1/200 の量であるため、GLUT9 isoform 2 による UA とグルコースの輸送される分子比は不明であるが、GLUT9 isoform 2 による交換輸送が尿糖排泄作用を減弱させる可能性は低いと考えられる。また、luseogliflozin による CL_{UA} の増加は尿糖排泄 100 g/day 付近でプラトーに達する傾向が認められたことから (Figure 2-15)、過剰に作用して低尿酸状態を来たす可能性は低いと考えられる。一方、このような SUA 値低下作用は、糖尿病患者において心血管系への障害リスク低減の可能性と血糖降下薬により UE_{GL} が是正されたときに SUA 値が上昇するリスク低減の面から有用な作用と考えられる。さらに、高尿酸血症への使用を想定すると、1 日あたり約 300 mg の UA の排泄促進作用は、300 mg までの UA 産生亢進または排泄の低下を是正できると考えられる。さらに、

SGLT2 阻害薬には、動物モデルにおいて糖毒性の解除を通じてインスリン抵抗性の改善作用も示されていることから^{45,151}、日本における高尿酸血症患者の6割を占める排泄低下型^{89,152})に対し根本的な治療効果を示す可能性も考えられる。これらの結果から、luseogliflozinによるUAへの作用は、主薬効へ影響を及ぼさず、インスリン抵抗性改善の作用とUA排泄促進により高尿酸血症に対し有効である可能性が示唆された。

*In vitro*においてGLUT9のisoform 1およびisoform 2は、いずれも電位依存的にUAを排出することから、生体内においてもUAの排出を行うと考えられている¹²³)。抗GLUT9抗体を持ちいたヒト腎臓の免疫組織染色においては近位尿細管のbasolateral膜のisoform 1方がapical膜のisoform 2よりも強く染色されることが示された¹³¹)。また、basolateral側では他にUA排出に働く輸送体が見付かっていないこと、GLUT9遺伝子のホモ変異を認める症例ではSUA値が1.0 mg/dL以下となり、尿中UA排泄率が糸球体ろ過量の150%以上であることが報告され、GLUT9 isoform 1による血管側へのUA排出への寄与が大きいことが示された^{129,130})。近位尿細管のapical膜では、MRP4、NPT4などがUAの分泌に関与し^{141,153})、上皮細胞内のUAの滞留を回避するなどの役割が考えられている¹⁵⁴)。しかしながら、GLUT9 isoform 2に関しては報告が無くその生理的作用は全く不明であった。今回の研究により、初めてGLUT9 isoform 2の生理的作用の一端が示された。すなわち、尿糖が増加した場合、近位尿細管においてはグルコースとの交換輸送によりUA排出促進に関与し、集合管においてはUA再吸収に関与する可能性である。さらに、これらは糖尿病患者において尿糖が出現したときにも同様に作用する可能性が示された。生理的意義としては、運動によりUA産生が高まった場合にUAとの交換輸送によりエネルギーとして必要なグルコースの再吸収をわずかながらでも上昇させる可能性、腎臓においてグルコースを再吸収するSGLT1および2の欠損時にグルコース再吸収に寄与する可能性などが考えられる。

以上をまとめると、試験条件を最適化することにより、過去の報告では認められていなかったD-グルコースによるGLUT9 isoform 2を介したUAとの交換輸送およびUA取り込みの阻害作用を明らかにすることができ、SGLT2阻害によるSUA値低下の機序となる可能性が示された。また、このようなSUA値低下作用は、糖尿病患者における心血管系への障害リスク低減ならびに高尿酸血症患者に対してはインスリン抵抗性改善の作用とUA排泄促進の作用により有効である可能性が示された。さらに、これらの作用はGLUT9 isoform 2に関する初めての生理作用に関する報告となる。

第5章 結論

今回の検討では、luseogliflozin をモデル薬物として、SGLT2 阻害薬の SUA 値低下作用の機序解明を試みた。

第2章においては、健康成人および糖尿病患者に luseogliflozin を投与したときの臨床検査値を精査し、SUA 値の低下作用は UE_{UA} の増加に起因すること、ならびに UE_{UA} の増加は luseogliflozin の直接作用ではなく、尿糖に起因する可能性が高いことを明らかにした。

第3章においては、*in vitro* にて luseogliflozin は腎臓および消化管において UA 輸送に関与する輸送体へ作用しないこと、および SGLT2 による UA 輸送への寄与がないことを明らかにした。

さらに第4章においては、グルコースが GLUT9 isoform 2 を介して UA と交換輸送すること、さらに高濃度のグルコースは UA 取り込みを阻害することを初めて明らかにした。

これらの結果から、SGLT2 阻害薬による SUA 値の低下作用は、SGLT2 阻害の結果として尿中で濃度が上昇するグルコースが腎臓尿細管上皮細胞の apical 膜に発現する GLUT9 isoform 2 を介して、近位尿細管においては UA と交換輸送すること、集合管においては UA の再吸収を阻害することに起因すると考えられる。さらに、この機序は糖尿病患者において尿糖が出現したときに SUA 値が低下する現象をも説明可能と考えられる。

以上

引用文献

1. 清野裕, 南條輝志男, 田嶋尚子, 門脇孝, 柏木厚典, 荒木栄一, 伊藤千賀子, 稲垣暢也, 岩本安彦, 春日雅人, 花房俊昭, 羽田勝計, 植木浩二郎: 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告(国際標準化対応版). *糖尿病*, **55**: 485-504 (2012).
2. 日本糖尿病学会: 糖尿病治療ガイド 2012 - 2013. 文光堂, 東京, 2012.
3. 野田光彦: 糖尿病標準診療マニュアル第8版. 2013.
4. International Diabetes Federation: IDF Diabetes Atlas Sixth edition, 2013.
5. 厚生労働省健康局がん対策・健康増進課: 平成24年国民健康・栄養調査報告. 厚生労働省, 2013.
6. Hotta, N., Nakamura, J., Iwamoto, Y., Ohno, Y., Kasuga, M., Kikkawa, R., and Toyota, T.: Causes of death in Japanese diabetics: A questionnaire survey of 18,385 diabetics over a 10-year period. *Journal of Diabetes Investigation*, **1**: 66-76 (2010).
7. Seshasai, S. R., Kaptoge, S., Thompson, A., Di Angelantonio, E., Gao, P., Sarwar, N., Whincup, P. H., Mukamal, K. J., Gillum, R. F., Holme, I., Njolstad, I., Fletcher, A., Nilsson, P., Lewington, S., Collins, R., Gudnason, V., Thompson, S. G., Sattar, N., Selvin, E., Hu, F. B., and Danesh, J.: Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. *N Engl J Med*, **364**: 829-841 (2011).
8. Hoerger, T. J., Segel, J. E., Gregg, E. W., and Saaddine, J. B.: Is glycemic control improving in U.S. adults? *Diabetes Care*, **31**: 81-86 (2008).
9. 開発振興委員会国内基盤技術調査ワーキンググループ: 国内基盤技術調査報告書- 2020年の医療ニーズの展望II-. 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団, 2011.
10. 岸本一郎, 芦田康宏, 大森洋子, 西洋壽, 萩原泰子, 藤本年朗, 槇野久士, 大畑洋子, 岩根光子, 飯沼恵子, 前田和恵, 佐藤滋(豊能医療圏糖尿病地域連携クリティカルパス検討会議): 大阪府豊能医療圏における糖尿病実態と連携手帳所持率調査. *糖尿病*, **56**: 543-550 (2013).
11. U.K. Prospective Diabetes Study Group.: U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. *Diabetes*, **44**: 1249-1258 (1995).
12. Butler, A. E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R. A., and Butler, P. C.: Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, **52**: 102-110 (2003).
13. Dluhy, R. G. and McMahon, G. T.: Intensive glycemic control in the ACCORD and ADVANCE

- trials. *N Engl J Med*, **358**: 2630-2633 (2008).
14. 植木浩二郎: 大規模臨床試験の結果から見た糖尿病治療のエビデンスと課題. *Human Sci*, **24**: 20-23 (2013).
 15. Salpeter, S. R., Greyber, E., Pasternak, G. A., and Salpeter, E. E.: Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*, **163**: 2594-2602 (2003).
 16. Bodmer, M., Meier, C., Krahenbuhl, S., Jick, S. S., and Meier, C. R.: Metformin, sulfonylureas, or other antidiabetes drugs and the risk of lactic acidosis or hypoglycemia: a nested case-control analysis. *Diabetes Care*, **31**: 2086-2091 (2008).
 17. Salpeter, S. R., Greyber, E., Pasternak, G. A., and Salpeter, E. E. Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus, *Cochrane Database Syst Rev*2010, p. CD002967.
 18. Lipska, K. J., Bailey, C. J., and Inzucchi, S. E.: Use of metformin in the setting of mild-to-moderate renal insufficiency. *Diabetes Care*, **34**: 1431-1437 (2011).
 19. Bailey, C. J.: Renal glucose reabsorption inhibitors to treat diabetes. *Trends Pharmacol Sci*, **32**: 63-71 (2011).
 20. Butler, A. E., Campbell-Thompson, M., Gurlo, T., Dawson, D. W., Atkinson, M., and Butler, P. C.: Marked expansion of exocrine and endocrine pancreas with incretin therapy in humans with increased exocrine pancreas dysplasia and the potential for glucagon-producing neuroendocrine tumors. *Diabetes*, **62**: 2595-2604 (2013).
 21. Woodcock, J., Sharfstein, J. M., and Hamburg, M.: Regulatory action on rosiglitazone by the U.S. Food and Drug Administration. *N Engl J Med*, **363**: 1489-1491 (2010).
 22. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé: Suspension de l'utilisation des médicaments contenant de la pioglitazone (Actos®, Competact®), 2011.
 23. Johansen, O. E. and Whitfield, R.: Exenatide may aggravate moderate diabetic renal impairment: a case report. *Br J Clin Pharmacol*, **66**: 568-569 (2008).
 24. Okazaki, Y., Ueki, K., and Kadowaki, T.: Japan Diabetes Outcome Intervention Trial 3 (Japan Diabetes Optimal Integrated Treatment Study for 3 major risk factors of cardiovascular diseases: J-DOIT3). *Nihon Rinsho*, **68**: 861-864 (2010).
 25. 春日雅人, 加来浩平, 稲垣暢也, 門脇孝: 糖尿病の克服 現状と将来. *Human Science*, **24**: 4-12

- (2013).
26. Chao, E. C. and Henry, R. R.: SGLT2 inhibition—a novel strategy for diabetes treatment. *Nat Rev Drug Discov*, **9**: 551-559 (2010).
 27. Nair, S. and Wilding, J. P.: Sodium glucose cotransporter 2 inhibitors as a new treatment for diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, **95**: 34-42 (2010).
 28. Dapagliflozin 5mg and 10mg film-coated tablets (Forxiga), EMA 2013.
 29. Highlights of Prescribing Information Invokana (canagliflozin) tablets, for oral use, FDA 2013.
 30. Wright, E. M. and Turk, E.: The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch*, **447**: 510-518 (2004).
 31. Wright, E. M.: Renal Na⁺-glucose cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol*, **280**: F10-18 (2001).
 32. Hediger, M. A. and Rhoads, D. B.: Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. *Physiol Rev*, **74**: 993-1026 (1994).
 33. Tazawa, S., Yamato, T., Fujikura, H., Hiratochi, M., Itoh, F., Tomae, M., Takemura, Y., Maruyama, H., Sugiyama, T., Wakamatsu, A., Isogai, T., and Isaji, M.: SLC5A9/SGLT4, a new Na⁺-dependent glucose transporter, is an essential transporter for mannose, 1,5-anhydro-D-glucitol, and fructose. *Life Sci*, **76**: 1039-1050 (2005).
 34. Chen, J., Williams, S., Ho, S., Loraine, H., Hagan, D., Whaley, J. M., and Feder, J. N.: Quantitative PCR tissue expression profiling of the human SGLT2 gene and related family members. *Diabetes Ther*, **1**: 57-92 (2010).
 35. Hummel, C. S., Lu, C., Loo, D. D., Hirayama, B. A., Voss, A. A., and Wright, E. M.: Glucose transport by human renal Na⁺/D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2. *Am J Physiol Cell Physiol*, **300**: C14-21 (2011).
 36. Kanai, Y., Lee, W. S., You, G., Brown, D., and Hediger, M. A.: The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *J Clin Invest*, **93**: 397-404 (1994).
 37. You, G., Lee, W. S., Barros, E. J., Kanai, Y., Huo, T. L., Khawaja, S., Wells, R. G., Nigam, S. K., and Hediger, M. A.: Molecular characteristics of Na⁺-coupled glucose transporters in adult and embryonic rat kidney. *J Biol Chem*, **270**: 29365-29371 (1995).

38. Wright, E. M., Loo, D. D., and Hirayama, B. A.: Biology of human sodium glucose transporters. *Physiol Rev*, **91**: 733-794 (2011).
39. Grempler, R., Augustin, R., Froehner, S., Hildebrandt, T., Simon, E., Mark, M., and Eickelmann, P.: Functional characterisation of human SGLT-5 as a novel kidney-specific sodium-dependent sugar transporter. *FEBS Lett*, **586**: 248-253 (2012).
40. Fukuzawa, T., Fukazawa, M., Ueda, O., Shimada, H., Kito, A., Kakefuda, M., Kawase, Y., Wada, N. A., Goto, C., Fukushima, N., Jishage, K., Honda, K., King, G. L., and Kawabe, Y.: SGLT5 reabsorbs fructose in the kidney but its deficiency paradoxically exacerbates hepatic steatosis induced by fructose. *PLoS One*, **8**: e56681 (2013).
41. Kwon, H. M., Yamauchi, A., Uchida, S., Preston, A. S., Garcia-Perez, A., Burg, M. B., and Handler, J. S.: Cloning of the cDNA for a Na⁺/myo-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein. *J Biol Chem*, **267**: 6297-6301 (1992).
42. Hitomi, K. and Tsukagoshi, N.: cDNA sequence for rkST1, a novel member of the sodium ion-dependent glucose cotransporter family. *Biochim Biophys Acta*, **1190**: 469-472 (1994).
43. Coady, M. J., Wallendorff, B., Gagnon, D. G., and Lapointe, J. Y.: Identification of a novel Na⁺/myo-inositol cotransporter. *J Biol Chem*, **277**: 35219-35224 (2002).
44. Lin, X., Ma, L., Fitzgerald, R. L., and Ostlund, R. E., Jr.: Human sodium/inositol cotransporter 2 (SMIT2) transports inositols but not glucose in L6 cells. *Arch Biochem Biophys*, **481**: 197-201 (2009).
45. Arakawa, K., Ishihara, T., Oku, A., Nawano, M., Ueta, K., Kitamura, K., Matsumoto, M., and Saito, A.: Improved diabetic syndrome in C57BL/KsJ-db/db mice by oral administration of the Na⁺-glucose cotransporter inhibitor T-1095. *Br J Pharmacol*, **132**: 578-586 (2001).
46. Ferrannini, E., Ramos, S. J., Salsali, A., Tang, W., and List, J. F.: Dapagliflozin monotherapy in type 2 diabetic patients with inadequate glycemic control by diet and exercise: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Diabetes Care*, **33**: 2217-2224 (2010).
47. Bode, B., Stenlof, K., Sullivan, D., Fung, A., and Usiskin, K.: Efficacy and safety of canagliflozin treatment in older subjects with type 2 diabetes mellitus: a randomized trial. *Hosp Pract (1995)*, **41**: 72-84 (2013).
48. Fonseca, V. A., Ferrannini, E., Wilding, J. P., Wilpshaar, W., Dhanjal, P., Ball, G., and Klasen,

- S.: Active- and placebo-controlled dose-finding study to assess the efficacy, safety, and tolerability of multiple doses of ipragliflozin in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*, **27**: 268-273 (2013).
49. Haring, H. U., Merker, L., Seewaldt-Becker, E., Weimer, M., Meinicke, T., Woerle, H. J., and Broedl, U. C.: Empagliflozin as add-on to metformin plus sulfonylurea in patients with type 2 diabetes: a 24-week, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Care*: (2013).
 50. Kakinuma, H., Oi, T., Hashimoto-Tsuchiya, Y., Arai, M., Kawakita, Y., Fukasawa, Y., Iida, I., Hagima, N., Takeuchi, H., Chino, Y., Asami, J., Okumura-Kitajima, L., Io, F., Yamamoto, D., Miyata, N., Takahashi, T., Uchida, S., and Yamamoto, K.: (1*S*)-1,5-anhydro-1-[5-(4-ethoxybenzyl)-2-methoxy-4-methylphenyl]-1-thio-D-glucitol (TS-071) is a potent, selective sodium-dependent glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor for type 2 diabetes treatment. *J Med Chem*, **53**: 3247-3261 (2010).
 51. Yamamoto, K., Uchida, S., Kitano, K., Fukuhara, N., Okumura-Kitajima, L., Gunji, E., Kozakai, A., Tomoike, H., Kojima, N., Asami, J., Toyoda, H., Arai, M., Takahashi, T., and Takahashi, K.: TS-071 is a novel, potent and selective renal sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor with anti-hyperglycaemic activity. *Br J Pharmacol*, **164**: 181-191 (2011).
 52. Bailey, C. J., Gross, J. L., Pieters, A., Bastien, A., and List, J. F.: Effect of dapagliflozin in patients with type 2 diabetes who have inadequate glycaemic control with metformin: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, **375**: 2223-2233 (2010).
 53. Cefalu, W. T., Leiter, L. A., Yoon, K. H., Arias, P., Niskanen, L., Xie, J., Balis, D. A., Canovatchel, W., and Meininger, G.: Efficacy and safety of canagliflozin versus glimepiride in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin (CANTATA-SU): 52 week results from a randomised, double-blind, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*, **382**: 941-950 (2013).
 54. Wilding, J. P., Ferrannini, E., Fonseca, V. A., Wilpshaar, W., Dhanjal, P., and Houzer, A.: Efficacy and safety of ipragliflozin in patients with type 2 diabetes inadequately controlled on metformin: a dose-finding study. *Diabetes Obes Metab*, **15**: 403-409 (2013).
 55. Ferrannini, E., Seman, L., Seewaldt-Becker, E., Hantel, S., Pinnetti, S., and Woerle, H. J.: A Phase IIb, randomized, placebo-controlled study of the SGLT2 inhibitor empagliflozin in

- patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*, **15**: 721-728 (2013).
56. Friedman, T. B., Polanco, G. E., Appold, C. J., and Mayle, J. E.: On the loss of uricolytic activity during primate evolution. *Comp Biochem Physiol B*, **81**: 653-659 (1985).
 57. Benedict, J. D., Forsham, P. H., and Stetten, D., Jr.: The metabolism of uric acid in the normal and gouty human studied with the aid of isotopic uric acid. *J Biol Chem*, **181**: 183-193 (1949).
 58. Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E., and Hochstein, P.: Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**: 6858-6862 (1981).
 59. Johnson, R. J. and Rideout, B. A.: Uric acid and diet—insights into the epidemic of cardiovascular disease. *N Engl J Med*, **350**: 1071-1073 (2004).
 60. Proctor, P.: Similar functions of uric acid and ascorbate in man? *Nature*, **228**: 868 (1970).
 61. Glantzounis, G. K., Tsimoyiannis, E. C., Kappas, A. M., and Galaris, D. A.: Uric acid and oxidative stress. *Curr Pharm Des*, **11**: 4145-4151 (2005).
 62. 日本痛風・核酸代謝学会ガイドライン改定委員会: 高尿酸血症・痛風の治療ガイドライン. メディカルレビュー社, 大阪, 2010.
 63. 富田眞佐子, 水野正一: 高尿酸血症は増加しているか? 性差を中心に. *Gout and Nucleic Acid Metabolism*, **30**: 1-5 (2006).
 64. Fujimori, S., Itoh, H., Kato, K., Watanabe, H., Matsuura, H., Ogata, N., and Yamanouchi, T.: The frequencies of hyperuricemia and gout may not increase in Japan. *Gout and Nucleic Acid Metabolism*, **30**: 13-20 (2006).
 65. Sato, M., Yoshifuji, M., Yeh, L. T., Shirasaka, Y., Nakanishi, T., and Tamai, I.: Uric acid transporter-mediated uricosuric effect of RDEA594, a metabolite of antiviral agent RDEA806. *The 24th JSSX Meeting, Kyoto*, (2009).
 66. Seegmiller, J. E., Grayzel, A. I., Laster, L., and Liddle, L.: Uric acid production in gout. *J Clin Invest*, **40**: 1304-1314 (1961).
 67. Champion, E. W., Glynn, R. J., and DeLabry, L. O.: Asymptomatic hyperuricemia. risks and consequences in the normative aging study. *Am J Med*, **82**: 421-426 (1987).
 68. Lin, K. C., Lin, H. Y., and Chou, P.: The interaction between uric acid level and other risk factors on the development of gout among asymptomatic hyperuricemic men in a prospective

- study. *J Rheumatol*, **27**: 1501-1505 (2000).
69. Shoji, A., Yamanaka, H., and Kamatani, N.: A retrospective study of the relationship between serum urate level and recurrent attacks of gouty arthritis: evidence for reduction of recurrent gouty arthritis with antihyperuricemic therapy. *Arthritis Rheum*, **51**: 321-325 (2004).
 70. Iseki, K., Oshiro, S., Tozawa, M., Iseki, C., Ikemiya, Y., and Takishita, S.: Significance of hyperuricemia on the early detection of renal failure in a cohort of screened subjects. *Hypertens Res*, **24**: 691-697 (2001).
 71. Chonchol, M., Shlipak, M. G., Katz, R., Sarnak, M. J., Newman, A. B., Siscovick, D. S., Kestenbaum, B., Carney, J. K., and Fried, L. F.: Relationship of uric acid with progression of kidney disease. *Am J Kidney Dis*, **50**: 239-247 (2007).
 72. Tomita, M., Mizuno, S., Yamanaka, H., Hosoda, Y., Sakuma, K., Matuoka, Y., Odaka, M., Yamaguchi, M., Yosida, H., Morisawa, H., and Murayama, T.: Does hyperuricemia affect mortality? A prospective cohort study of Japanese male workers. *J Epidemiol*, **10**: 403-409 (2000).
 73. Zoppini, G., Targher, G., Chonchol, M., Ortalda, V., Abaterusso, C., Pichiri, I., Negri, C., and Bonora, E.: Serum uric acid levels and incident chronic kidney disease in patients with type 2 diabetes and preserved kidney function. *Diabetes Care*, **35**: 99-104 (2012).
 74. Ishizaka, N., Ishizaka, Y., Toda, E., Nagai, R., and Yamakado, M.: Association between serum uric acid, metabolic syndrome, and carotid atherosclerosis in Japanese individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**: 1038-1044 (2005).
 75. Choi, H. K. and Ford, E. S.: Prevalence of the metabolic syndrome in individuals with hyperuricemia. *Am J Med*, **120**: 442-447 (2007).
 76. Shankar, A., Klein, R., Klein, B. E., and Nieto, F. J.: The association between serum uric acid level and long-term incidence of hypertension: Population-based cohort study. *J Hum Hypertens*, **20**: 937-945 (2006).
 77. Krishnan, E., Kwoh, C. K., Schumacher, H. R., and Kuller, L.: Hyperuricemia and incidence of hypertension among men without metabolic syndrome. *Hypertension*, **49**: 298-303 (2007).
 78. Ward, H. J.: Uric acid as an independent risk factor in the treatment of hypertension. *Lancet*, **352**: 670-671 (1998).
 79. Freedman, D. S., Williamson, D. F., Gunter, E. W., and Byers, T.: Relation of serum uric acid

- to mortality and ischemic heart disease. The NHANES I Epidemiologic Follow-up Study. *Am J Epidemiol*, **141**: 637-644 (1995).
80. Alderman, M. H., Cohen, H., Madhavan, S., and Kivlighn, S.: Serum uric acid and cardiovascular events in successfully treated hypertensive patients. *Hypertension*, **34**: 144-150 (1999).
 81. Hakoda, M., Masunari, N., Yamada, M., Fujiwara, S., Suzuki, G., Kodama, K., and Kasagi, F.: Serum uric acid concentration as a risk factor for cardiovascular mortality: a longterm cohort study of atomic bomb survivors. *J Rheumatol*, **32**: 906-912 (2005).
 82. Santos, C. X., Anjos, E. I., and Augusto, O.: Uric acid oxidation by peroxynitrite: multiple reactions, free radical formation, and amplification of lipid oxidation. *Arch Biochem Biophys*, **372**: 285-294 (1999).
 83. Hosomi, A., Nakanishi, T., Fujita, T., and Tamai, I.: Extra-renal elimination of uric acid via intestinal efflux transporter BCRP/ABCG2. *PLoS One*, **7**: e30456 (2012).
 84. Levinson, D. J. and Sorensen, L. B.: Renal handling of uric acid in normal and gouty subject: evidence for a 4-component system. *Ann Rheum Dis*, **39**: 173-179 (1980).
 85. Sorensen, L. B. and Levinson, D. J.: Isolated defect in postsecretory reabsorption of uric acid. *Ann Rheum Dis*, **39**: 180-183 (1980).
 86. Hediger, M. A., Johnson, R. J., Miyazaki, H., and Endou, H.: Molecular physiology of urate transport. *Physiology (Bethesda)*, **20**: 125-133 (2005).
 87. Anzai, N., Jutabha, P., Amonpatumrat-Takahashi, S., and Sakurai, H.: Recent advances in renal urate transport: characterization of candidate transporters indicated by genome-wide association studies. *Clin Exp Nephrol*, **16**: 89-95 (2012).
 88. 中村徹, 内田三千彦, 内野治人, 樋口富彦: 痛風の高尿酸血症の尿酸クリアランス法による検討. *尿酸*, **1**: 45-61 (1977).
 89. 中村徹, 加川大三郎, 樋口富彦: Inosine 負荷による痛風高尿酸血症の検討. *尿酸*, **5**: 17-27 (1982).
 90. Skeith, M. D., Healey, L. A., and Cutler, R. E.: Urate excretion during mannitol and glucose diuresis. *J Lab Clin Med*, **70**: 213-220 (1967).
 91. Skeith, M. D., Healey, L. A., and Cutler, R. E.: Effect of phloridzin on uric acid excretion in man. *Am J Physiol*, **219**: 1080-1082 (1970).
 92. Herman, J. B., Medalie, J. H., and Goldbourt, U.: Diabetes, prediabetes and uricaemia.

- Diabetologia*, **12**: 47-52 (1976).
93. Herman, J. B. and Goldbourt, U.: Uric acid and diabetes: observations in a population study. *Lancet*, **2**: 240-243 (1982).
 94. Facchini, F., Chen, Y. D., Hollenbeck, C. B., and Reaven, G. M.: Relationship between resistance to insulin-mediated glucose uptake, urinary uric acid clearance, and plasma uric acid concentration. *JAMA*, **266**: 3008-3011 (1991).
 95. Quinones Galvan, A., Natali, A., Baldi, S., Frascerra, S., Sanna, G., Ciociaro, D., and Ferrannini, E.: Effect of insulin on uric acid excretion in humans. *Am J Physiol*, **268**: E1-5 (1995).
 96. Ter Maaten, J. C., Voorburg, A., Heine, R. J., Ter Wee, P. M., Donker, A. J., and Gans, R. O.: Renal handling of urate and sodium during acute physiological hyperinsulinaemia in healthy subjects. *Clin Sci (Lond)*, **92**: 51-58 (1997).
 97. Choi, H. K. and Ford, E. S.: Haemoglobin A1c, fasting glucose, serum C-peptide and insulin resistance in relation to serum uric acid levels—the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Rheumatology (Oxford)*, **47**: 713-717 (2008).
 98. Perry, I. J., Wannamethee, S. G., Walker, M. K., Thomson, A. G., Whincup, P. H., and Shaper, A. G.: Prospective study of risk factors for development of non-insulin dependent diabetes in middle aged British men. *BMJ*, **310**: 560-564 (1995).
 99. Lu, Y., Nakanishi, T., and Tamai, I.: Functional cooperation of SMCTs and URAT1 for renal reabsorption transport of urate. *Drug Metab Pharmacokinet*, **28**: 153-158 (2013).
 100. Nakagawa, T., Hu, H., Zharikov, S., Tuttle, K. R., Short, R. A., Glushakova, O., Ouyang, X., Feig, D. I., Block, E. R., Herrera-Acosta, J., Patel, J. M., and Johnson, R. J.: A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol*, **290**: F625-631 (2006).
 101. Gotfredsen, A., McNair, P., Christiansen, C., and Transbol, I.: Renal hypouricaemia in insulin treated diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*, **120**: 355-361 (1982).
 102. The World Medical Association: Declaration of Helsinki, Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *Br Med J*, **18**: 177 (1964).
 103. 薬事法. 1960.
 104. 医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令. 1997.

105. 岩田一郎, 他. *臨床検査*, **20**: 941 (1976).
106. 佐々木禎一. *検査と技術*, **15**: 259 (1987).
107. 堀内伸子: Validaiton of an analytical method for the determination of luseogliflozin in human plasma by high- performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. 大正製薬株式会社試験報告書, 2008.
108. Loeb, J. N.: The influence of temperature on the solubility of monosodium urate. *Arthritis Rheum*, **15**: 189-192 (1972).
109. Mikkelsen, W. M., Dodge, H. J., and Valkenburg, H.: The distribution of serum uric acid values in a population unselected as to gout or hyperuricemia: Tecumesh, Michigan 1959-1960. *Am J Med*, **39**: 242-251 (1965).
110. List, J. F., Woo, V., Morales, E., Tang, W., and Fiedorek, F. T.: Sodium-glucose cotransport inhibition with dapagliflozin in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **32**: 650-657 (2009).
111. Sha, S., Devineni, D., Ghosh, A., Polidori, D., Chien, S., Wexler, D., Shalayda, K., Demarest, K., and Rothenberg, P.: Canagliflozin, a novel inhibitor of sodium glucose co-transporter 2, dose dependently reduces calculated renal threshold for glucose excretion and increases urinary glucose excretion in healthy subjects. *Diabetes Obes Metab*, **13**: 669-672 (2011).
112. Tahara, A., Kurosaki, E., Yokono, M., Yamajuku, D., Kihara, R., Hayashizaki, Y., Takasu, T., Imamura, M., Qun, L., Tomiyama, H., Kobayashi, Y., Noda, A., Sasamata, M., and Shibasaki, M.: Pharmacological profile of ipragliflozin (ASP1941), a novel selective SGLT2 inhibitor, in vitro and in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **385**: 423-436 (2012).
113. Statland, B. E., Winkel, P., and Bokelund, H.: Factors contributing to intra-individual variation of serum constituents. 2. Effects of exercise and diet on variation of serum constituents in healthy subjects. *Clin Chem*, **19**: 1380-1383 (1973).
114. Kanabrocki, E. L., Third, J. L., Ryan, M. D., Nemchausky, B. A., Shirazi, P., Scheving, L. E., McCormick, J. B., Hermida, R. C., Bremner, W. F., Hoppensteadt, D. A., Fareed, J., and Olwin, J. H.: Circadian relationship of serum uric acid and nitric oxide. *JAMA*, **283**: 2240-2241 (2000).
115. Gonzalez-Sicilia, L., Garcia-Estan, J., Martinez-Blazquez, A., Fernandez-Pardo, J., Quiles, J. L., and Hernandez, J.: Renal metabolism of uric acid in type I insulin-dependent diabetic patients: relation to metabolic compensation. *Horm Metab Res*, **29**: 520-523 (1997).

116. Bonsnes, R. W. and Dana, E. S.: On the increased uric acid clearance following the intravenous infusion of hypertonic glucose solutions. *J Clin Invest*, **25**: 386-388 (1946).
117. Christensen, P. J. and Steenstrup, O. R.: Uric acid excretion with increasing plasma glucose concentration (pregnant and non-pregnant cases). *Scand J Clin Lab Invest*, **10**: 182-185 (1958).
118. Knight, T. F., Senekjian, H. O., Sansom, S., and Weinman, E. J.: Effects of intraluminal D-glucose and probenecid on urate absorption in the rat proximal tubule. *Am J Physiol*, **236**: F526-529 (1979).
119. Enomoto, A., Kimura, H., Chairoungdua, A., Shigeta, Y., Jutabha, P., Cha, S. H., Hosoyamada, M., Takeda, M., Sekine, T., Igarashi, T., Matsuo, H., Kikuchi, Y., Oda, T., Ichida, K., Hosoya, T., Shimokata, K., Niwa, T., Kanai, Y., and Endou, H.: Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature*, **417**: 447-452 (2002).
120. Li, S., Sanna, S., Maschio, A., Busonero, F., Usala, G., Mulas, A., Lai, S., Dei, M., Orru, M., Albai, G., Bandinelli, S., Schlessinger, D., Lakatta, E., Scuteri, A., Najjar, S. S., Guralnik, J., Naitza, S., Crisponi, L., Cao, A., Abecasis, G., Ferrucci, L., Uda, M., Chen, W. M., and Nagaraja, R.: The GLUT9 gene is associated with serum uric acid levels in Sardinia and Chianti cohorts. *PLoS Genet*, **3**: e194 (2007).
121. Vitart, V., Rudan, I., Hayward, C., Gray, N. K., Floyd, J., Palmer, C. N., Knott, S. A., Kolcic, I., Polasek, O., Graessler, J., Wilson, J. F., Marinaki, A., Riches, P. L., Shu, X., Janicijevic, B., Smolej-Narancic, N., Gorgoni, B., Morgan, J., Campbell, S., Biloglav, Z., Barac-Lauc, L., Pericic, M., Klaric, I. M., Zgaga, L., Skaric-Juric, T., Wild, S. H., Richardson, W. A., Hohenstein, P., Kimber, C. H., Tenesa, A., Donnelly, L. A., Fairbanks, L. D., Aringer, M., McKeigue, P. M., Ralston, S. H., Morris, A. D., Rudan, P., Hastie, N. D., Campbell, H., and Wright, A. F.: SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nat Genet*, **40**: 437-442 (2008).
122. Doring, A., Gieger, C., Mehta, D., Gohlke, H., Prokisch, H., Coassin, S., Fischer, G., Henke, K., Klopp, N., Kronenberg, F., Paulweber, B., Pfeufer, A., Rosskopf, D., Volzke, H., Illig, T., Meitinger, T., Wichmann, H. E., and Meisinger, C.: SLC2A9 influences uric acid concentrations with pronounced sex-specific effects. *Nat Genet*, **40**: 430-436 (2008).
123. Anzai, N., Ichida, K., Jutabha, P., Kimura, T., Babu, E., Jin, C. J., Srivastava, S., Kitamura,

- K., Hisatome, I., Endou, H., and Sakurai, H.: Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter URATv1 (SLC2A9) in humans. *J Biol Chem*, **283**: 26834-26838 (2008).
124. Caulfield, M. J., Munroe, P. B., O'Neill, D., Witkowska, K., Charchar, F. J., Doblado, M., Evans, S., Eyheramendy, S., Onipinla, A., Howard, P., Shaw-Hawkins, S., Dobson, R. J., Wallace, C., Newhouse, S. J., Brown, M., Connell, J. M., Dominiczak, A., Farrall, M., Lathrop, G. M., Samani, N. J., Kumari, M., Marmot, M., Brunner, E., Chambers, J., Elliott, P., Kooner, J., Laan, M., Org, E., Veldre, G., Viigimaa, M., Cappuccio, F. P., Ji, C., Iacone, R., Strazzullo, P., Moley, K. H., and Cheeseman, C.: SLC2A9 is a high-capacity urate transporter in humans. *PLoS Med*, **5**: e197 (2008).
125. Ichida, K.: Clinical and molecular analysis of patients with renal hypouricemia in Japan-influence of URAT1 gene on urinary urate excretion. *Journal of the American Society of Nephrology*, **15**: 164-173 (2004).
126. Iwai, N., Mino, Y., Hosoyamada, M., Tago, N., Kokubo, Y., and Endou, H.: A high prevalence of renal hypouricemia caused by inactive SLC22A12 in Japanese. *Kidney Int*, **66**: 935-944 (2004).
127. Taniguchi, A., Urano, W., Yamanaka, M., Yamanaka, H., Hosoyamada, M., Endou, H., and Kamatani, N.: 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).
128. Matsuo, H., Chiba, T., Nagamori, S., Nakayama, A., Domoto, H., Phetdee, K., Wiriyasermkul, P., Kikuchi, Y., Oda, T., Nishiyama, J., Nakamura, T., Morimoto, Y., Kamakura, K., Sakurai, Y., Nonoyama, S., Kanai, Y., and Shinomiya, N.: Mutations in glucose transporter 9 gene SLC2A9 cause renal hypouricemia. *Am J Hum Genet*, **83**: 744-751 (2008).
129. Dinour, D., Gray, N. K., Campbell, S., Shu, X., Sawyer, L., Richardson, W., Rechavi, G., Amariglio, N., Ganon, L., Sela, B. A., Bahat, H., Goldman, M., Weissgarten, J., Millar, M. R., Wright, A. F., and Holtzman, E. J.: Homozygous SLC2A9 mutations cause severe renal hypouricemia. *J Am Soc Nephrol*, **21**: 64-72 (2010).
130. Stiburkova, B., Ichida, K., and Sebesta, I.: Novel homozygous insertion in SLC2A9 gene caused renal hypouricemia. *Mol Genet Metab*, **102**: 430-435 (2011).
131. Nakanishi, T., Ohya, K., Shimada, S., Anzai, N., and Tamai, I.: Functional cooperation of

- URAT1 (SLC22A12) and URATv1 (SLC2A9) in renal reabsorption of urate. *Nephrol Dial Transplant*, **28**: 603-611 (2013).
132. Kolz, M., Johnson, T., Sanna, S., Teumer, A., Vitart, V., Perola, M., Mangino, M., Albrecht, E., Wallace, C., Farrall, M., Johansson, A., Nyholt, D. R., Aulchenko, Y., Beckmann, J. S., Bergmann, S., Bochud, M., Brown, M., Campbell, H., Connell, J., Dominiczak, A., Homuth, G., Lamina, C., McCarthy, M. I., Meitinger, T., Mooser, V., Munroe, P., Nauck, M., Peden, J., Prokisch, H., Salo, P., Salomaa, V., Samani, N. J., Schlessinger, D., Uda, M., Volker, U., Waeber, G., Waterworth, D., Wang-Sattler, R., Wright, A. F., Adamski, J., Whitfield, J. B., Gyllenstein, U., Wilson, J. F., Rudan, I., Pramstaller, P., Watkins, H., Doering, A., Wichmann, H. E., Spector, T. D., Peltonen, L., Volzke, H., Nagaraja, R., Vollenweider, P., Caulfield, M., Illig, T., and Gieger, C.: Meta-analysis of 28,141 individuals identifies common variants within five new loci that influence uric acid concentrations. *PLoS Genet*, **5**: e1000504 (2009).
133. Hagos, Y., Stein, D., Ugele, B., Burckhardt, G., and Bahn, A.: Human renal organic anion transporter 4 operates as an asymmetric urate transporter. *J Am Soc Nephrol*, **18**: 430-439 (2007).
134. Bahn, A., Hagos, Y., Reuter, S., Balen, D., Brzica, H., Krick, W., Burckhardt, B. C., Sabolic, I., and Burckhardt, G.: Identification of a new urate and high affinity nicotinate transporter, hOAT10 (SLC22A13). *J Biol Chem*, **283**: 16332-16341 (2008).
135. Miyauchi, S., Gopal, E., Fei, Y. J., and Ganapathy, V.: Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na⁺-coupled transporter for short-chain fatty acids. *J Biol Chem*, **279**: 13293-13296 (2004).
136. Ichida, K., Hosoyamada, M., Kimura, H., Takeda, M., Utsunomiya, Y., Hosoya, T., and Endou, H.: Urate transport via human PAH transporter hOAT1 and its gene structure. *Kidney Int*, **63**: 143-155 (2003).
137. Bakhiya, A., Bahn, A., Burckhardt, G., and Wolff, N.: Human organic anion transporter 3 (hOAT3) can operate as an exchanger and mediate secretory urate flux. *Cell Physiol Biochem*, **13**: 249-256 (2003).
138. Sato, M., Mamada, H., Anzai, N., Shirasaka, Y., Nakanishi, T., and Tamai, I.: Renal secretion of uric acid by organic anion transporter 2 (OAT2/SLC22A7) in human. *Biol Pharm Bull*, **33**: 498-503 (2010).

139. Dehghan, A., Kottgen, A., Yang, Q., Hwang, S. J., Kao, W. L., Rivadeneira, F., Boerwinkle, E., Levy, D., Hofman, A., Astor, B. C., Benjamin, E. J., van Duijn, C. M., Witteman, J. C., Coresh, J., and Fox, C. S.: Association of three genetic loci with uric acid concentration and risk of gout: a genome-wide association study. *Lancet*, **372**: 1953-1961 (2008).
140. Jutabha, P., Anzai, N., Kitamura, K., Taniguchi, A., Kaneko, S., Yan, K., Yamada, H., Shimada, H., Kimura, T., Katada, T., Fukutomi, T., Tomita, K., Urano, W., Yamanaka, H., Seki, G., Fujita, T., Moriyama, Y., Yamada, A., Uchida, S., Wempe, M. F., Endou, H., and Sakurai, H.: Human sodium phosphate transporter 4 (hNPT4/SLC17A3) as a common renal secretory pathway for drugs and urate. *J Biol Chem*, **285**: 35123-35132 (2010).
141. Jutabha, P., Anzai, N., Wempe, M. F., Wakui, S., Endou, H., and Sakurai, H.: Apical voltage-driven urate efflux transporter NPT4 in renal proximal tubule. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **30**: 1302-1311 (2011).
142. Matsuo, H., Takada, T., Ichida, K., Nakamura, T., Nakayama, A., Ikebuchi, Y., Ito, K., Kusanagi, Y., Chiba, T., Tadokoro, S., Takada, Y., Oikawa, Y., Inoue, H., Suzuki, K., Okada, R., Nishiyama, J., Domoto, H., Watanabe, S., Fujita, M., Morimoto, Y., Naito, M., Nishio, K., Hishida, A., Wakai, K., Asai, Y., Niwa, K., Kamakura, K., Nonoyama, S., Sakurai, Y., Hosoya, T., Kanai, Y., Suzuki, H., Hamajima, N., and Shinomiya, N.: 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).
143. Iwanaga, T., Kobayashi, D., Hirayama, M., Maeda, T., and Tamai, I.: Involvement of uric acid transporter in increased renal clearance of the xanthine oxidase inhibitor oxypurinol induced by a uricosuric agent, benzbromarone. *Drug Metab Dispos*, **33**: 1791-1795 (2005).
144. Hamada, T., Ichida, K., Hosoyamada, M., Mizuta, E., Yanagihara, K., Sonoyama, K., Sugihara, S., Igawa, O., Hosoya, T., Ohtahara, A., Shigamasa, C., Yamamoto, Y., Ninomiya, H., and Hisatome, I.: Uricosuric action of losartan via the inhibition of urate transporter 1 (URAT 1) in hypertensive patients. *Am J Hypertens*, **21**: 1157-1162 (2008).
145. Augustin, R., Carayannopoulos, M. O., Dowd, L. O., Phay, J. E., Moley, J. F., and Moley, K. H.: Identification and characterization of human glucose transporter-like protein-9 (GLUT9): alternative splicing alters trafficking. *J Biol Chem*, **279**: 16229-16236 (2004).
146. Yu, L., Lv, J. C., Zhou, X. J., Zhu, L., Hou, P., and Zhang, H.: Abnormal expression and

- dysfunction of novel SGLT2 mutations identified in familial renal glucosuria patients. *Hum Genet*, **129**: 335-344 (2011).
147. Moriwaki, Y., Yamamoto, T., Takahashi, S., Suda, M., and Higashino, K.: Effect of glucose infusion on the renal transport of purine bases and oxypurinol. *Nephron*, **69**: 424-427 (1995).
148. Witkowska, K., Smith, K. M., Yao, S. Y., Ng, A. M., O'Neill, D., Karpinski, E., Young, J. D., and Cheeseman, C. I.: Human SLC2A9a and SLC2A9b isoforms mediate electrogenic transport of urate with different characteristics in the presence of hexoses. *Am J Physiol Renal Physiol*, **303**: F527-539 (2012).
149. Kimura, T., Takahashi, M., Yan, K., and Sakurai, H.: Expression of SLC2A9 isoforms in the kidney and their localization in polarized epithelial cells. *PLoS One*, **9**: e84996 (2014).
150. Iwanaga, T., Sato, M., Maeda, T., Ogihara, T., and Tamai, I.: Concentration-dependent mode of interaction of angiotensin II receptor blockers with uric acid transporter. *J Pharmacol Exp Ther*, **320**: 211-217 (2007).
151. Nawano, M., Oku, A., Ueta, K., Umabayashi, I., Ishirahara, T., Arakawa, K., Saito, A., Anai, M., Kikuchi, M., and Asano, T.: Hyperglycemia contributes insulin resistance in hepatic and adipose tissue but not skeletal muscle of ZDF rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **278**: E535-543 (2000).
152. Tsutani, H., Kiriba, C., Imamura, S., Yoshio, N., Nakamura, T., and Ueda, T.: Latent overproductive hyperuricemia increases in patients during the intermittent phase of gouty arthritis under long-term antihyperuricemic treatment. *Mod Rheumatol*, **10**: 207-210 (2000).
153. Wright, A. F., Rudan, I., Hastie, N. D., and Campbell, H.: A 'complexity' of urate transporters. *Kidney Int*, **78**: 446-452 (2010).
154. Anzai, N., Jutabha, P., Kimura, T., Endou, H., and Sakurai, H.: Transport properties of a novel human organic anion efflux transporter hNPT4 (SLC17A3). *Gout and Nucleic Acid Metabolism*, **35**: 31-37 (2011).

参考論文

Yukihiro Chino, Yoshishige Samukawa, Soichi Sakai, Yasuhiro Nakai, Jun-ichi Yamaguchi, Takeo Nakanishi, Ikumi Tamai: SGLT2 inhibitor lowers serum uric acid through alteration of uric acid transport activity in renal tubule by increased glycosuria. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, **35**: 391-404 (2014).

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導、ご鞭撻を賜りました金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 教授 玉井郁巳先生に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、終始有益な御指導を賜りました金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 准教授 中西猛夫先生、多大な御協力を頂いた金沢大学 医薬保健研究域 薬学系助教 白坂善之先生、小森久和先生ならびに薬物動態学研究室の皆様に深く感謝申し上げます。

さらに、本研究の機会を与えてくださいました大正製薬株式会社 専務取締役 藤田憲一氏、医薬研究本部 本部長 奥山茂博士、安全性・動態研究所 所長 佐藤靖博士、薬物動態研究室 室長 山口順一博士、医薬開発本部 副本部長 中井康博博士、医薬開発部 副部長 寒川能成氏、シニアスペシャリスト 浦野英俊氏、有益な御助言を頂きました創薬第2研究室 グループマネージャー 高橋禎介博士、データ解析に御協力を頂きました臨床統計部 武藤賢氏、薬物動態研究室 間野陽子氏に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究の実施に御協力頂きました薬物動態研究室 グループマネージャー 遠藤裕美博士、堀内伸子氏を始めとする関係諸氏に厚く御礼申し上げます。