

博士論文

サンドイッチ培養肝細胞を  
用いた尿酸肝動態の解析

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科  
薬学専攻  
薬物動態学研究室

学 籍 番 号 1228052006  
氏 名 和田 翔  
主任指導教員 玉井 郁巳

## 目次

第一章	序論	5
第二章	サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた hypoxanthine- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N、 xanthine- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N、及び uric acid- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N の肝動態解析	16
第一節	サンドイッチ培養ヒト肝細胞における[3H]taurocholate の BEI 算出	16
第一項	試薬及び方法	
第二項	結果	
第二節	サンドイッチ培養ヒト肝細胞における hypoxanthine- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N、 xanthine- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N、及び uric acid- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N の経時的量変化	20
第一項	試薬及び方法	
第二項	結果	
第三節	サンドイッチ培養ヒト肝細胞における hypoxanthine- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N、 xanthine- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N、及び uric acid- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N の数理的モデル解析	26
第一項	試薬及び方法	
第二項	結果	
第四節	Store model により算出したパラメータに対する UA 量の感受性試験	37
第一項	試薬及び方法	
第二項	結果	
第五節	小括	
第三章	サンドイッチ培養ヒト肝細胞における、hypoxanthine- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N、 xanthine- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N、及び uric acid- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N の肝動態に対する XO 阻害剤及びトランスポーター阻害剤の影響	42
第一節	Allopurinol 存在下の HX、XA、及び UA の経時的量変化及び肝動態モデル解析	43

第一項	試薬及び方法	
第二項	結果	
第二節	尿酸トランスポーター阻害剤の影響	46
第一項	試薬及び方法	
第二項	結果	
第三節	小括	49
第四章	結論	51
第五章	引用文献	54
第六章	謝辞	63

## 略語一覽

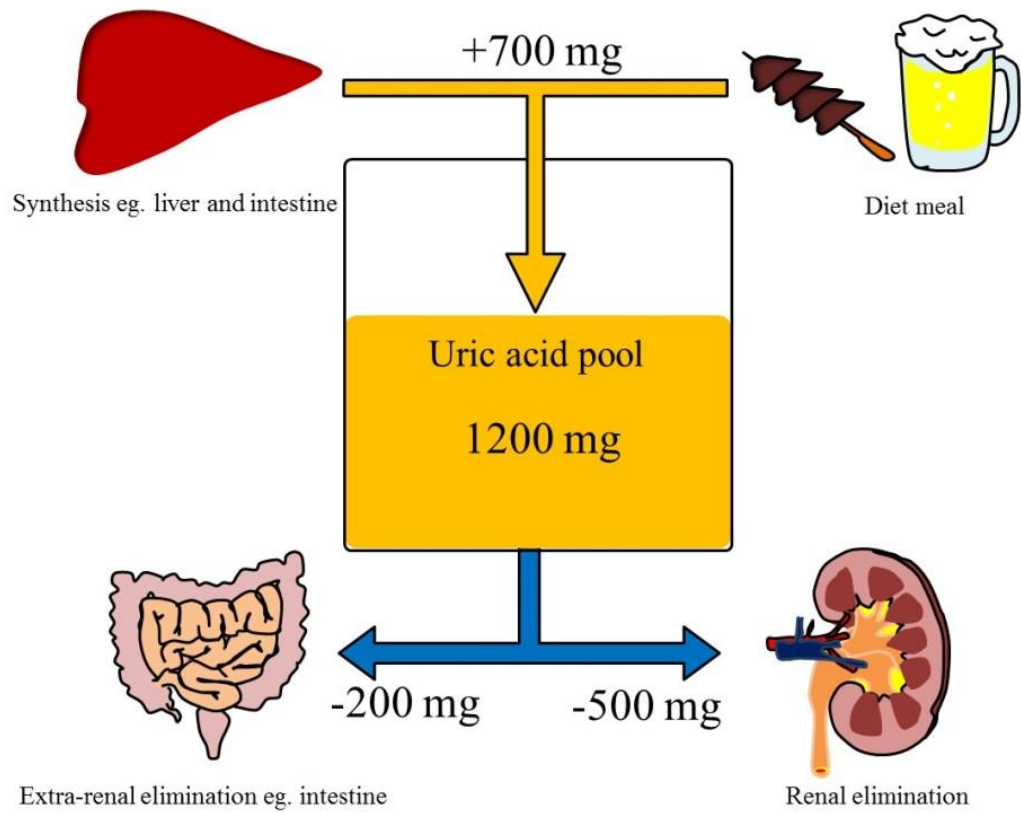
略後	内容
$^3\text{H}$	Tritium
ABC	ATP-binding cassette
ALO	Allopurinol
BCRP	Breast cancer resistance protein
BEI	Biliary excretion index
BEZ	Benzbromarone
BSEP	Bile salt export pump
CV%	Coefficient of variation rate
DP	Declustering potential
EGTA	Ethylene glycol tetra acetic acid
FUR	Furosemide
GULT9	Glucose transporter 9
HX	Hypoxanthine- $^{13}\text{C}_2$ , $^{15}\text{N}$
IC <sub>50</sub>	Half maximal (50%) inhibitory concentration
ITS	Insulin-transferrin-sodium selenite
k	First order rate constant
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten constant
LC-MS/MS	Liquid chromatography with tandem mass spectrometry
MPA	Mycophenolic acid
MPAG	MPA phenyl-glucuronide
MRP	Multidrug resistance-associated protein
NPT	Sodium-phosphate cotransporter
OATP	Organic anion transporting polypeptide
P-gp	P-glycoprotein
S.D.	Standard deviation
UA	Uraic acid- $^{13}\text{C}_2$ , $^{15}\text{N}$

UFLC	Ultra fast liquid chromatography
UGT	UDP glucuronosyltransferase
Vmax	Maximum rate
WEM	Williams' media E
XA	Xanthine-[ <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N]
XO	Xanthine oxidase

## 第一章 序論

尿酸は高尿酸血症や痛風の原因因子である。SUA の基準値は男性が 3.7-7.0 mg/dL、女性が 2.5-7.0 mg/dL であり、SUA が 7 mg/dL を超えると高尿酸血症と診断される (高尿酸血症・痛風の治療ガイドライン 2019)。尿酸濃度 7 mg/dL (417  $\mu$ M) は尿酸の水への飽和溶解度であり、本値を超えることで尿酸は結晶化し、関節や尿細管中において析出することで痛風や腎障害を引き起こす (Berger and Yü 1975, Koka *et al.*, 2000)。また、メタボリックシンドローム (Hikita *et al.*, 2007)、高血圧 (Perlstein *et al.*, 2006) や非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) (Xu *et al.*, 2010) などの疾患とも関連性が示唆されている。そのため、血清尿酸値の変動は痛風のみならず他の疾患を誘発する危険性がある。一方、尿酸は生理的作用として、抗酸化作用を保持している (Ames *et al.*, 1981, Becker *et al.*, 1993)。近年ではパーキンソン病 (de Lau *et al.*, 2005)、アルツハイマー病 (Kim *et al.*, 2006) や多発性硬化症 (Knapp *et al.*, 2004) の防御因子として報告されている。そのため、血清中尿酸値 (serum uric acid: SUA) の変動は様々な疾患と関連すると考えられ、SUA の恒常性を維持することで種々の病気の発症や悪化を防ぐ観点から重要である。

ヒトにおいて尿酸は、食事や筋肉に由来するプリン体の最終産物として生成される。その生成を担う酵素である xanthine oxidase (XO) は、肝臓及び消化管に発現及び活性が高く、両臓器が主たる尿酸の生成部位となる (Kooij *et al.*, 1992, Wright *et al.*, 1993)。通常、1日に約 700 mg の尿酸が産生され、腎臓から約 500 mg、消化管などの腎外経路から約 200 mg が排出される (Sorensen *et al.*, 1965)。産生と排泄のバランスがとれているため、尿酸の体内量・血中濃度は正常時には一定に保持されている (Figure 1-1)。

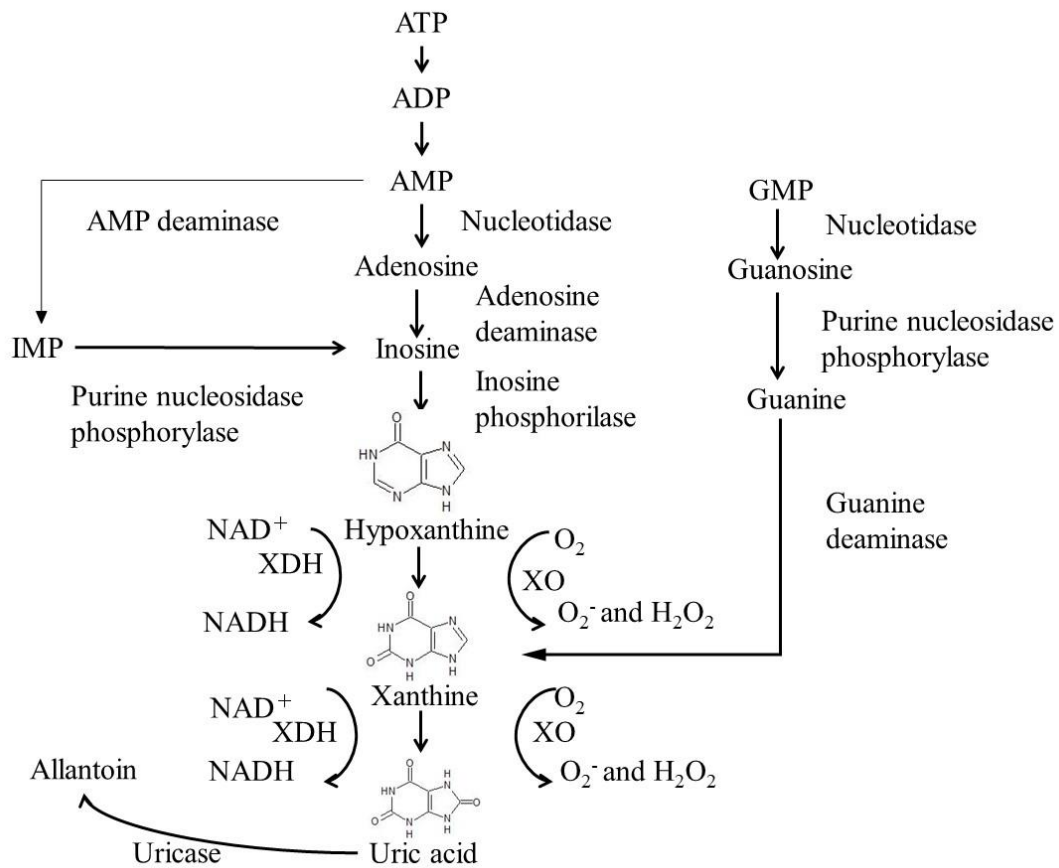


**Figure 1-1 Uric acid pool and turnover.**

Uric acid is produced from purine by XO mainly liver and intestine. Uric acid is excreted into urine (500mg : -70%) and feces (200mg : -30%).

尿酸の生成臓器である肝臓に血液中のプリン体が取り込まれると、プリンヌクレオチドである adenylic acid (AMP)、inosinic acid (IMP)、guanylic acid (GMP)は inosine、guanosine に分解される。続いて、purine nucleoside phosphoryrase (PNP) や guanine deaminase (GDA) によって hypoxanthine、xanthine へと代謝される。さらに、XO によって hypoxanthine、そして xanthine を経て尿酸が生成する (Figure 1-2) (Sahlin *et al.* 1999)。肝臓において生成された尿酸は、胆汁中又は、血液中に排出されると考えられる。胆管側膜には尿酸を基質とするトランスポーターBCRP が発現する。しかしながら、ヒトや齧歯類において、腎排泄クリアランスや消化管排泄クリアランスと比較して、胆汁中排泄クリアランスは極めて小さい (Kountouras *et al.*, 1996, Hosomi *et al.*, 2012, Ichida *et al.*, 2012)。また、Bcrp1 ノックアウトマウスにおける胆汁中排泄クリアランスは野生型と比較して有意な差が無いことが報告されている (Ichida *et al.*, 2012)。これらの報告から、尿酸は胆汁中というよりは主に血液中に排出されていると考えられる。



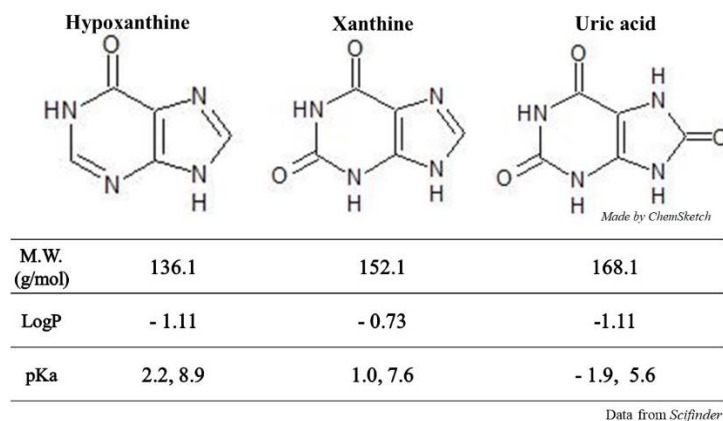


(Pacher *et al.*, 2006 を改変)

**Figure 1-2 Purine nucleotides metabolism.**

尿酸は、分子量 168.1 g/mol、オクタノール・水分配係数の自然対数 (logP) -1.11 と低分子かつ極性の高い内因性物質である (Figure 1-3)。また、その酸解離定数 (pKa)は、5.6 であり、生理的 pH7.4 付近においてほとんどがイオン型として存在しているため、尿酸の生体膜透過過程にはトランスポーターの介在が必須であると考えられる。特に、近年のゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study : GWAS) によって、高尿酸血症及び痛風の関連遺伝子として同定された 16 遺伝子のうち 8 つがトランスポーター関連遺伝子である (Table 1-1) (Reginato *et al.*, 2012)。これら遺伝子の発見によって、尿酸の

体内動態をトランスポーターが制御していることが考えられ、尿酸動態におけるトランスポーター研究の重要性が裏付けられている。



**Figure 1-3 Chemical data of hypoxanthine, xanthine and uric acid.**

**Table 1-1 Genetic variants implicated in the pathogenesis of hyperuricaemia or gout.**

ALDH16A1 (Aldehyde dehydrogenase 16 family member A1)	SLC16A9* (MCT9)
SLC2A12* (GLUT8, GLUT12)	SLC17A1* (NPT1)
RREB1 (Ras responsive element binding protein 1)	SLC17A3* (NPT4)
R3HDM2 (R3H domain containing 2)	ABCG2* (BCRP)
PDZK1 (PDZ domain containing 1)	SLC2A9 (GLUT9, URATv1)*
LRRC16A (Leucine rich repeat containing 16A)	SLC22A12* (URAT1)
GCKR (Glucokinase (hexokinase 4) regulator )	MTHFR (Methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H))
SLC22A11* (OAT4)	ADRB3 (Adrenoceptor beta 3)

\*: Transporter

尿酸輸送に関わるトランスポーターとしてこれまでに Table 1-2 に示す分子が見出されており、それらの血清尿酸値調節における役割は主に腎臓と小腸で説明されている。一方、肝細胞にも発現する分子として、BCRP (ABCG2)、GLUT9 (SLC2A9)、 $\text{Na}^+$ -dependent phosphate transporter (NPT) 1 及び NPT4 (SLC17A1/3) がある (Anzai and Endou 2011)。また、側底膜に発現する MRP4 は種々の基質を肝細胞から血液側へ排出するため、尿酸排出にも寄与すると考えられる。以上のように尿酸輸送活性を有するトランスポーターが複数分子肝細胞に発現するが、それぞれの寄与に関する情報はない。したがって、遺伝子多型や病態などによりトランスポーターの発現や活性の変動がおり血清尿酸値変動の予測が容易ではなく、また尿酸値調節を狙った創薬標的が絞れないなど課題がある。

**Table 1-2 Km and expression of uric acid-transporters.**

<b>Transporter</b>	<b>Km (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Main expressing tissue</b>
URAT1 (SLC22A12)	371	Kidney
GLUT9 (SLC2A9)	365	Kidney, Liver
OAT1 (SLC22A6)	943	Kidney
OAT2 (SLC22A)	1168	Liver, Kidney
OAT3 (SLC22A8)	2900	Kidney, Brain
OAT4 (SLC22A11)	N.D.	Kidney, Placenta
NPT1 (SLC17A1)	1100	Kidney, Liver
NPT4 (SLC17A3)	N.D.	Kidney, Liver, Intestine
MRP4 (ABCC4)	1550	Kidney, Liver
BCRP (ABCG2)	8240	Kidney, Liver, Intestine

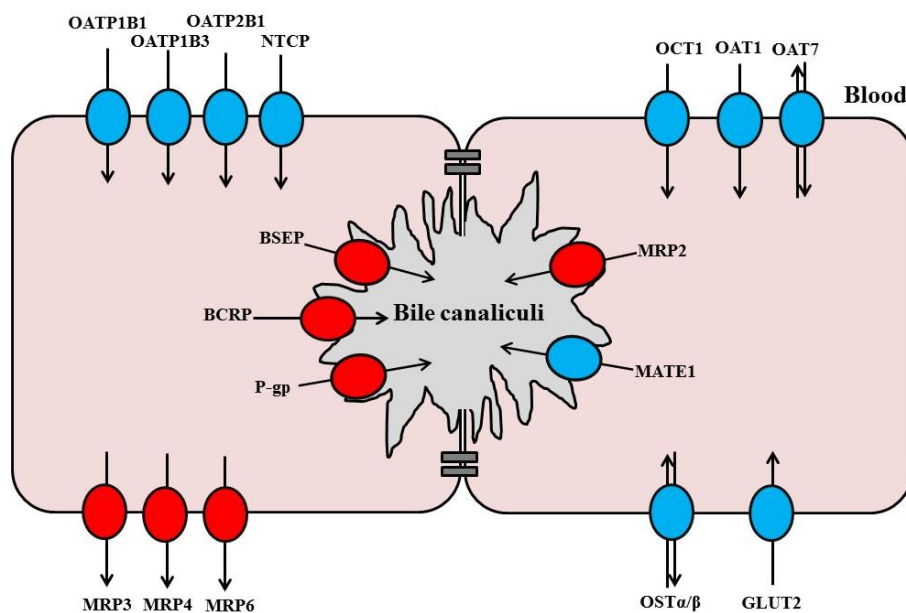
N.D.: not data

細胞膜を介した物質交換は、生体が生命活動を維持する上で必須である。トランスポーターは、物質の膜透過を制御するタンパク質であり、栄養素、医薬品や環境物質など

を体内や組織内に取り込みや排出に働いている。細胞膜は脂質二重層により形成されるため、特に水溶性の高い物質である糖、アミノ酸、ペプチド、水溶性ビタミン、胆汁酸、アミン、有機酸などの細胞膜透過にトランスポーターの存在意義は大きい (Tsuji 2002)。

体内最大の線組織である肝臓は、成人男性で 1000~1300 g、女性で 900~1100 g あり、糖、脂質、アミノ酸、リポタンパク、金属、ビリルビンなどの代謝、ビタミンの貯蔵と代謝、タンパクの生成と分泌、尿素の生成、胆汁酸の生成と排泄など、種々の生理的機能を有する。また、薬物の代謝や胆汁を介した解毒を担う組織としても重要である (Rollins and Klaassen 1979, Trauner and Boyer 2003)。そのため、生体内物質や医薬品の肝動態は、病気の発症・改善、医薬品の作用・副作用発現に繋がる (Strautnieks *et al.*, 1998, Paulusma *et al.*, 1997)。肝臓におけるトランスポーターの主な役割は、(i) 化合物の血液からの肝細胞への取り込み、(ii) 肝細胞から血液側への排出、(iii) 胆汁中への排出である。肝臓におけるトランスポーターを Figure 1-4 に示す。(i) 化合物の血液からの肝細胞内への取り込み過程に関与するトランスポーターは、肝臓の基底膜に局在する organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 及び OATP1B3 が広く知られている。これらのトランスポーターは、複数の臨床的な薬物間相互作用や副作用に関与しており、例えば高コレステロール血症の治療に用いられるスタチン系薬物の多くは OATP1B1 の基質となる (Kameyama *et al.*, 2005)。その結果、OATP1B1 上での薬物間相互作用や遺伝子多型による機能の低下は、肝細胞内へのスタチンの取り込みを低下させるため、薬物の血漿中濃度が増加し、スタチン誘発性ミオパチーのリスクが増大することが報告されている (Link *et al.*, 2008)。また、(ii) 化合物の肝細胞内から血液中への排出に寄与するトランスポーターとして multidrug resistance-associated protein (MRP) 3 及び MRP4 がある。さらに、(iii) 化合物の胆汁中への排出がある。胆管側膜に存在する主なトランスポーターは、bile salt export pump (BSEP)、permeability glycoprotein (P-gp)、breast cancer resistance protein (BCRP)、及び MRP2 がある。BSEP は、主に胆汁酸を細胞外に輸送す

るトランスポーターであり、胆汁酸を胆汁中へと排出している。BSEP は、進行性家族性肝内胆汁うっ滞 2 型 (PFIC 2) という致死性の遺伝疾患の原因遺伝子であり、BSEP の機能が欠落することにより胆汁酸が肝臓から排出されなくなり、肝臓内に胆汁酸が蓄積することで発症する (Strautnieks *et al.*, 1998)。また、MRP2 は劣性遺伝の Dubin-Johnson 症候群の原因遺伝子である。MRP2 の機能が欠損することでその内因性基質であるグルクロン酸抱合型ビリルビン (直接ビリルビン) の胆汁排泄が障害され、肝細胞内に蓄積すると伴に血中にも基底膜側に発現する MRP3 によって排出され、血中の直接ビリルビンも高値となる (Paulusma *et al.*, 1997)。これらのことから、肝臓におけるトランスポーターは、薬物や内因性物質の動態を左右するため、疾病とも密接に関与していることが考えられる。

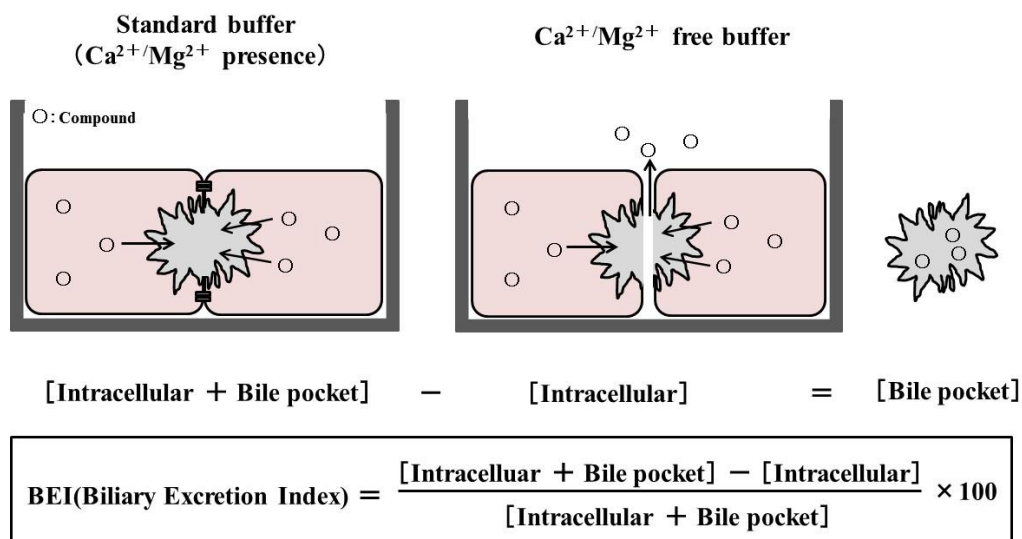


**Figure 1-4 Membrane transporters in human livers**

肝臓における化合物の動態を決定する因子は、主に肝取り込み、肝臓から血液への排出、胆汁中への排出及び細胞内での代謝である。これらの因子を評価する *in vitro* の実験系はいくつか報告されている。ヒト肝癌由来細胞 HepG2 細胞、HepaRG 細胞、肝細胞 *couplets*、及びサンドイッチ培養肝細胞などがある (Shoda *et al.*, 2004, Aninat *et al.*, 2005, Graf *et al.*, 1984, Liu *et al.*, 1999)。この中で、サンドイッチ培養肝細胞のみが、化合物の胆汁中への排出、細胞への取り込み、基底膜側からの排出 (*sinusoidal efflux*)、及び代謝を同時に評価可能である。

サンドイッチ培養法は、単層培養法と比べてより長期間細胞を培養できる点や、薬物代謝酵素活性を維持できる利点があり、酵素誘導試験や、肝細胞障害性試験等にも利用される (Papageorgiou *et al.*, 2013, Susukida *et al.*, 2015 Kern *et al.*, 1997)。さらに、サンドイッチ培養肝細胞では単層培養肝細胞とは異なり、肝細胞自体の形態がより生体内に近い状態に分化し、細胞間を密着させる *tight junction* が形成されることで、極性が回復して胆管腔が形成されるとともに、排出トランスポーターが局在化することが報告されている (Hoffmaster *et al.*, 2004)。胆管腔を形成するために必要な *tight junction* 機能を  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  存在の有無によって調節しながら薬物の取り込み試験を行い、胆管腔中への排出を評価できる (Liu *et al.*, 1999a, Liu *et al.*, 1999b)。 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  存在下では【細胞質+胆管腔】の薬物量が得られ、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  非存在下では胆管腔の *tight junction* の開口により【細胞質のみ】の薬物量が得られる。よって、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  存在下の取り込み量から  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  非存在下の取り込み量を差し引くことにより、胆管腔における薬物量を見積もることができる。このことから、胆管側トランスポーターによる排出能の指標として、以下 Figure 1-5 に示した式により算出した Biliary Excretion Index (BEI%) が提唱された (Liu *et al.*, 1999)。BEI は、化合物の胆汁中排泄の指標として用いられ、この値が大きいほど胆汁中へ排泄され易いと判断される (Brouwer *et al.*, 2013)。一方、BEI は胆汁中排泄クリアランスとの相関性は低いと報告されている (Fukuda *et al.*, 2008)。そのため、現在は胆汁

中排泄の有無を評価する定性的な指標と位置付けられている。



**Figure 1-5 Calculation of BEI in sandwich-cultured hepatocytes.**

私はこれまでに前記のようなサンドイッチ培養肝細胞を利用することで、mycophenolic acid (MPA)及びその代謝物である mycophenolic acid phenol glucuronide (MPAG)の胆汁中への排出、肝細胞への取り込み、血液側への排出を評価する研究に携わった (Matsunaga *et al.*, 2014)。サンドイッチ培養肝細胞を用いた胆汁中への排出に関する評価方法である蓄積量及び BEI の評価では、肝細胞内から血液中へ移行する過程を定量的に評価し、さらに予測することはできない。ゆえに、肝細胞内で生成した代謝物の血液中への移行を予測するために、肝細胞及び毛細胆管腔中の代謝物だけでなく、medium 中に移行する代謝物も評価する必要がある。また、medium 中、肝細胞中、及び毛細胆管腔中の化合物の推移は経時的に変化するため、BEI のような時点ごとの指標ではなく、速度論に基づいたモデルを樹立し、モデルを用いた解析が定量的評価ならびに予測に有用であると考えられる。したがって、経時的に変化する量に対する速度論的な方法として、数理的モデルを用いて、MPA 及び MPAG の *in vitro* 肝動態パラメー

タの推定を行った。また、得られたパラメータを変動させることで、medium 中、肝細胞中、及び毛細胆管腔中 MPAG の量的変動をシミュレーションし、MPAG の肝動態を決定する律速過程を検討した。以上の MPA の研究から、数理的モデルを用いて、サンドイッチ培養肝細胞を用いた輸送と代謝を同時に評価が可能であると伴に、定量的な予測が可能であることが示された。

上記の背景から、第二章では、サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いて肝臓における尿酸動態を解析することとした。尿酸やその前駆体は生体物質であるため、定量的解析にはそれら内因性の前駆体 hypoxanthine、xanthine 及び尿酸と区別して解析する必要がある。また、尿酸動態は生成過程も考慮しなければならない。そこで、hypoxanthine の  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識体を使用し、尿酸までの代謝と尿酸の膜輸送を同時評価することとした。即ち、添加した Hypoxanthine- $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  (HX) とその代謝物である、xanthine- $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  (XA) 及び uric acid- $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  (UA) の胆汁中排出を評価すると伴に、経時的な量変化を数理的モデルで解析した。さらに、第三章では xanthine oxidase (XO) 阻害剤及び尿酸トランスポーター阻害剤を用いてサンドイッチ培養肝細胞の XO 阻害作用の検討、及び各尿酸トランスポーターの寄与を探索した。最後に結論として、サンドイッチ培養肝細胞における尿酸肝動態の評価・予測及び、トランスポーターの寄与をまとめた。



## 第二章 サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた HX、XA 及び UA の肝動態の解析

肝臓の XO によって hypoxanthine、xanthine から尿酸が生成する。生成された尿酸は、胆汁中及び、血液中に排泄されることが考えられる。胆管側膜には尿酸を基質とする BCRP が発現するが、ヒトや齧歯類においては腎排泄クリアランスと比較して、胆汁中排泄クリアランスは極めて小さい(Kountouras *et al.*, 1996, Hosomi *et al.*, 2012, Ichida *et al.*, 2012)。したがって、肝臓で生成した尿酸は血液中への移行が主であると考えられるが、実験的に、胆汁中排泄及び血液中への排泄を区別して評価した報告はない。そこで、本章ではサンドイッチ培養肝細胞を用いて尿酸の肝動態の全容を把握するために代謝、膜透過を含むモデル解析を行うこととした。最初に試験系の確認としてタウロコール酸の BEI を測定し、次に尿酸動態の解析を行った。

### 第一節 サンドイッチ培養ヒト肝細胞による [<sup>3</sup>H]taurocholate の取り込み試験

サンドイッチ培養ヒト肝細胞 (Lot number GMX) が化合物を細胞内に取り込み、毛細胆管腔中に排出するか検討した。また、胆汁中への排出の評価は BEI を用いて行った。

#### 第一項 試薬及び方法

##### (1) 試薬

Cryopreserved Hepatocytes Recovery Medium (CHRM®)、Cryopreserved Hepatocytes Plating Medium (CHPM®)、Hepatocyte Maintenance Supplement Pack 及び HBSS は Life technologies (Maryland, USA)から購入した。Williams' E medium (WEM)は(Sigma-Aldrich Missouri, USA)から購入した。[<sup>3</sup>H]Taurocholate (4.6 Ci/mmol) は PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA)から購入した。その他の試薬はすべて市販試薬を用いた。

取り込み試験の medium の組成を以下に示す。

Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> medium (pH 7.4)の組成 (1 L)

NaCl	8.0 g
KCl	400 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydride)	48 mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60 mg
CaCl <sub>2</sub>	140 mg
NaHCO <sub>3</sub>	350 mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	200 mg
Glucose	1.0 g
HEPES	4.76 g

Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-free medium (pH 7.4)の組成 (1 L)

NaCl	8.0 g
KCl	400 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydride)	48 mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60 mg
NaHCO <sub>3</sub>	350 mg
EGTA	190 mg
Glucose	1.0 g
HEPES	4.76 g

(2) ヒト肝細胞

Cryopreserved human hepatocytes (BioreclamationIVT, Baltimore, MD) (Lot number: GMX)

は小野薬品工業株式会社（大阪）より頂いた。GMX の情報を以下に示す。

---

Lot number	Race	Sex	Age	Information
GMX	Hispanic	man	2-year	Case of death: anoxia, BMI: 19.3 kg/m <sup>2</sup>

---

(3) ヒト肝細胞のサンドイッチ培養

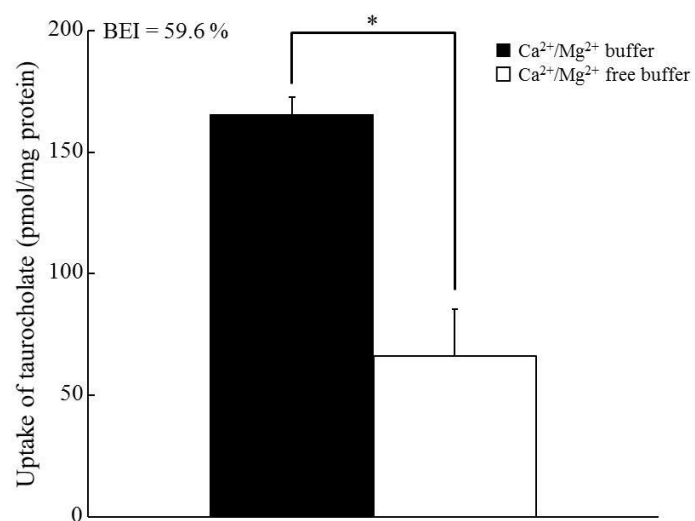
凍結肝細胞を 37°C で融解し、CHRM に懸濁後、遠心した (50 g、10 min、25°C)。アスピレータで上清を除去し、沈殿した細胞を  $7 \times 10^5$  になるように CHPM で懸濁した。細胞懸濁液を collagen I-coated 24 well plate (BioCoat, BD biosciences) に 500  $\mu$ L 播種した。37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 下で約 4 時間培養し、その後、350  $\mu$ g/mL geltrex を含む WME に培地を交換し、サンドイッチ培養を行った。以後は、約 24 時間ごとに WEM に培地交換した。

#### (4) 取り込み試験

24-well plate に播種したサンドイッチ培養ヒト肝細胞を Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>medium、または Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-free medium で 5 分間プレインキュベーションした。その後、[<sup>3</sup>H]taurocholate (1  $\mu$ M、0.2  $\mu$ Ci/mL) を添加し、それぞれの medium で 10 分間取り込みを行った。0.002 % triton-X (wako) で細胞を溶解させ、その細胞溶液 150  $\mu$ L を 1.2 mL のクリアズルにと混ぜ攪拌後、液体シンチレーションカウンター LS-6100 (Aloka, Tokyo, Japan) で放射能を測定した。また、各 well におけるタンパク量で値を補正した。タンパク量は BCA 法の kit (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) を用いて定量した。

## 第二項 結果

サンドイッチ培養ヒト肝細胞の胆管腔形成及びトランスポーターの機能を探索可能であるか、胆汁中に排出される胆汁酸である [<sup>3</sup>H]taurocholate を選択し、取り込み試験を行った (Figure 2-1)。Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> free medium に比べて、Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> medium において有意に高い取り込みが見られた。また、BEI は 59.6 % で、[<sup>3</sup>H]taurocholate の胆汁中排出が観察された。



**Figure 2-1 Accumulation in cells + bile canaliculi (■) and cells alone (□) of [<sup>3</sup>H]taurocholate in sandwich-cultured human hepatocytes.** Dosing concentration: 1 μM, Incubation time: 10 min, Data represent mean ± S.D. \*p < 0.01 (Student's t-test)

## 第二節 サンドイッチ培養ヒト肝細胞における HX、XA 及び UA 量の経時的変化

ヒト肝臓における代謝、細胞内への取り込み、血液側への排出及び胆汁中への排出を同時に評価可能なサンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いて、尿酸前駆体の hypoxanthine の安定同位体 HX を追跡し、XA 及び UA の肝動態を評価した。

### 第一項 試薬及び方法

#### (1) 試薬

尿酸は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した。Hypoxanthine 及び xanthine は、Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan) から購入した。また、Hypoxanthine-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>,<sup>15</sup>N (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), Uric acid-1,3-<sup>15</sup>N<sub>2</sub> (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 及び Geltrex (Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA.)) は小野薬品工業株式会社より提供して頂いた。

#### (2) HX、XA 及び UA の LC-MS/MS による定量

HX、XA、及び UA の LC-MS/MS による定量は既報の方法を参考に行った (Kim *et al.*, 2009)。細胞及び medium サンプルに 150 µL のアセトニトリルを加え、攪拌を 30 秒し、15000rpm、4°C、15 分間遠心した(HITACHI, VF15RX II, Angle Rotor T15A43)。その後、上清をエバポレーターで蒸発乾固し、50 µL の移動相で再構築し、LC-MS/MS で定量した。LC-MS/MS の条件を Table 2-1 及び、Table 2-2 に示す。

**Table 2-1 LC-MS/MS condition**

MS/MS system	MDS-Sciex API 3200TM triple quadrupole mass spectrometer (AB Sciex, Foster City, California)
HPLC system	LC-20AD ultra fast liquid chromatography system (Shimadzu Company, Kyoto, Japan)
Column	Luna 5u C18(2) 100A (150 × 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA)
Guard column	Security Guard Cartridge System (C18, 4 × 2.0 mm ID, Phenomenex, Torrance, CA)
Mobile phase	(A) 0.1 % acetic acid, 5 mM ammonium acetate, (B) Methanol
Gradient program	(B) 5 % (0 min) → 25 % (4.5 min) → 25 % (6 min) → 5 % (6.5 min) → 5 % (7 min)
Flow rate	0.6 mL/min (split 1 : 3)
Injection volume	20 µL
Column temperature	40 °C
Ion source	Turbo spray
Scan type	MRM
Polarity	Negative

**Table 2-2 LC-MS/MS condition**

Analyte	Monitor ion (m/z)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Hypoxanthine	135.0 → 92.1	-50	-20	-6
Hypoxanthine- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N	138.0 → 95.0	-50	-20	-6
Xanthine	151.0 → 108.0	-35	-22	-12
Xanthine- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N	154.0 → 111.0	-35	-22	-12
Urate	166.9 → 123.8	-35	-18	-14
Urate- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N	170.0 → 127.0	-35	-18	-14
Urate-1,3- <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	169.1 → 125.0	-35	-18	-14
Allantoin	157.0 → 114.0	-45	-18	-6
Allantoin- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N	160.0 → 117.0	-45	-18	-6

### (3) HX 取り込み試験

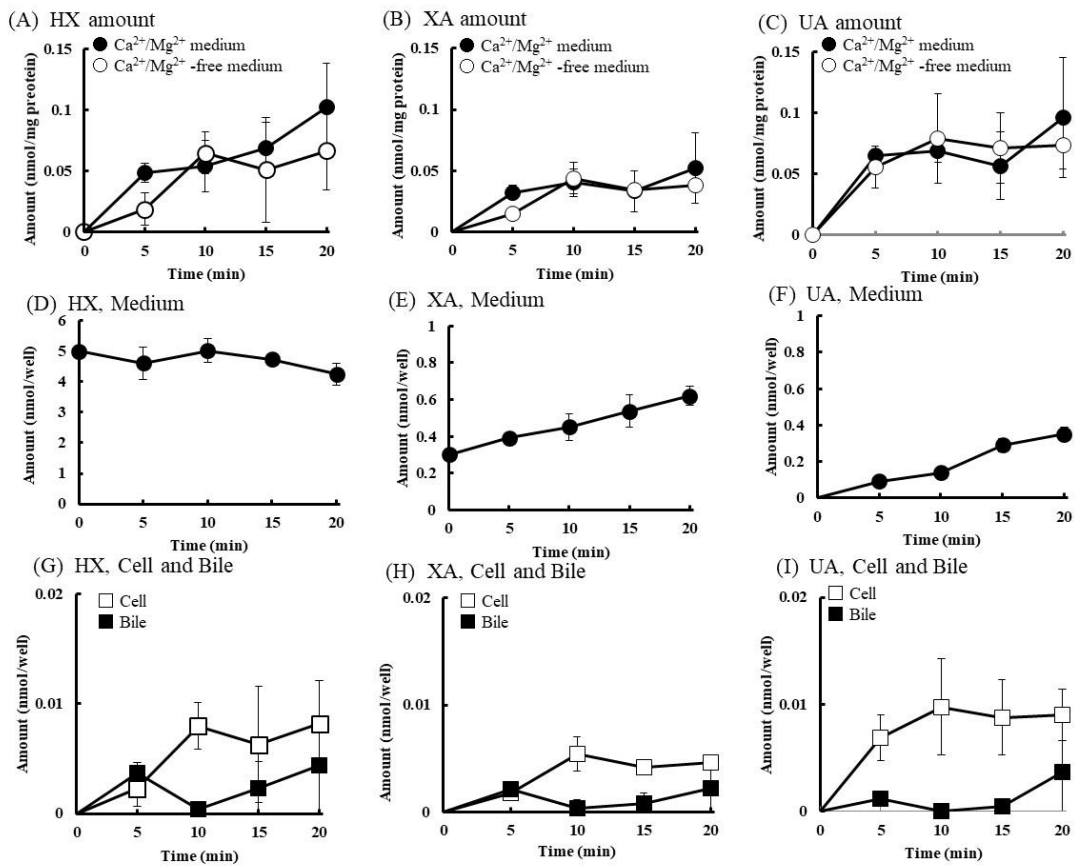
24-well plate に播種したサンドイッチ培養ヒト肝細胞を  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ medium 又は、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free medium で 5 分間プレインキュベーションした。その後、HX (10  $\mu\text{M}$ ) を含む 500  $\mu\text{L}$  の medium に交換した。所定時間ごとに、medium を 150  $\mu\text{L}$  回収した後、氷冷した medium で二回洗い、200  $\mu\text{L}$  の 0.002% triton-X (wako) で細胞を溶解させ、細胞溶解液を 150  $\mu\text{L}$  採取した。また、20  $\mu\text{L}$  をタンパク定量用に回収した。その後、上記に示した前処理を行い、LC-MS/MS で定量した。

## 第二項 結果

内因性の尿酸及びその前駆体と区別するために、HX (10  $\mu\text{M}$ ) をサンドイッチ培養ヒト肝細胞に処理し、その後の HX、XA 及び UA の動態を観察した (Figure 2-2)。添加後 HX は速やかに XA と UA に代謝された (Figure 2-2B, C)。 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 又は  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free medium において 5 分時点の HX を除いた時点で HX、XA 及び UA の蓄積量に変化は観察されなかった (Figure 2-2A, B, C)。このことから、HX、XA 及び UA の胆汁中排出はほとんどないと考えられた。

時間依存的に medium 中の HX 量は減少し、XA 及び UA 量は増加した (Figure 2-2, 2-3)。また、細胞内の HX、XA、及び UA 量も約 10 分まで増加し、その後、定常状態に達した。

HX 及び XA から生成された UA は 93.1~97.5% が medium 中に存在した (Figure 2-4)。このことから、生成された UA は細胞内から medium 中へ速やかに排出されると考えられた。また各物質量の総回収率は 96%~106%であった (Figure 2-3)。



**Figure 2-2 Mass versus time profiles of HX, XA and UA in sandwich-cultured human hepatocytes.** (A), (B), and (C) show amount of HX, XA, and UA respectively, after incubation of 10  $\mu$ M HX over 20 min in Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> or Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-free medium. (D), (E), and (F) show mass versus time profiles in the medium. (G), (H), and (I) show mass versus time profiles in the cells ( $\square$ ) and bile ( $\blacksquare$ ). Data represent the mean  $\pm$  S.D. of four independent experiments with one lot of human hepatocytes (GMX).



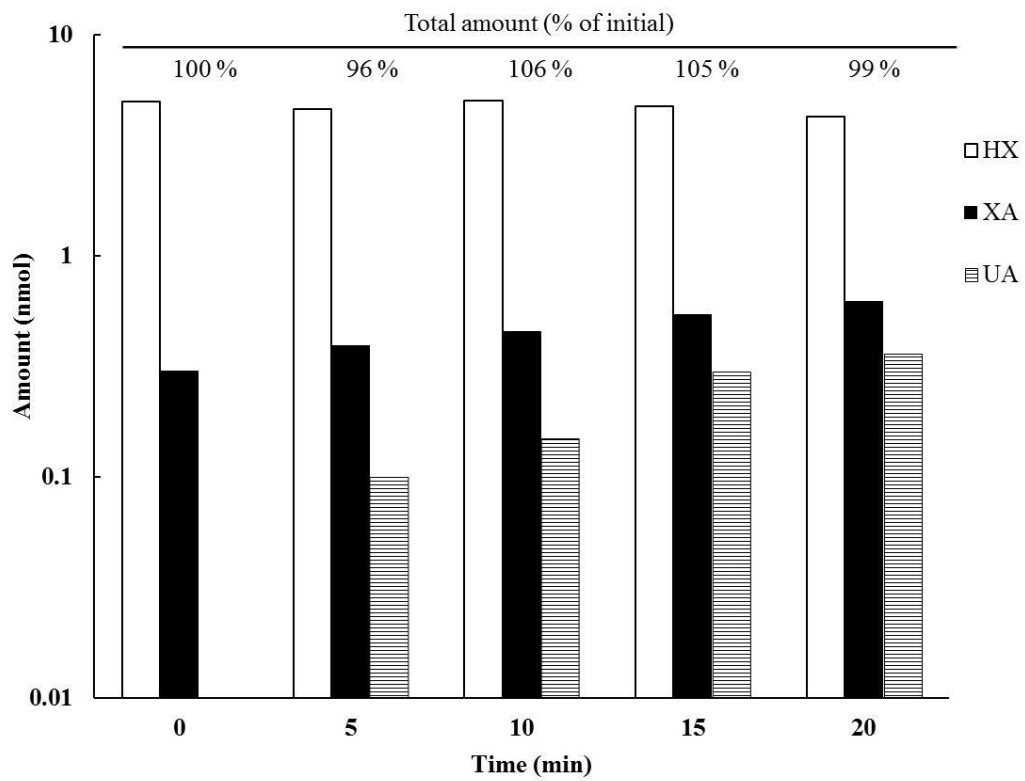


Figure 2-3 Total amount of HX, XA, and UA.

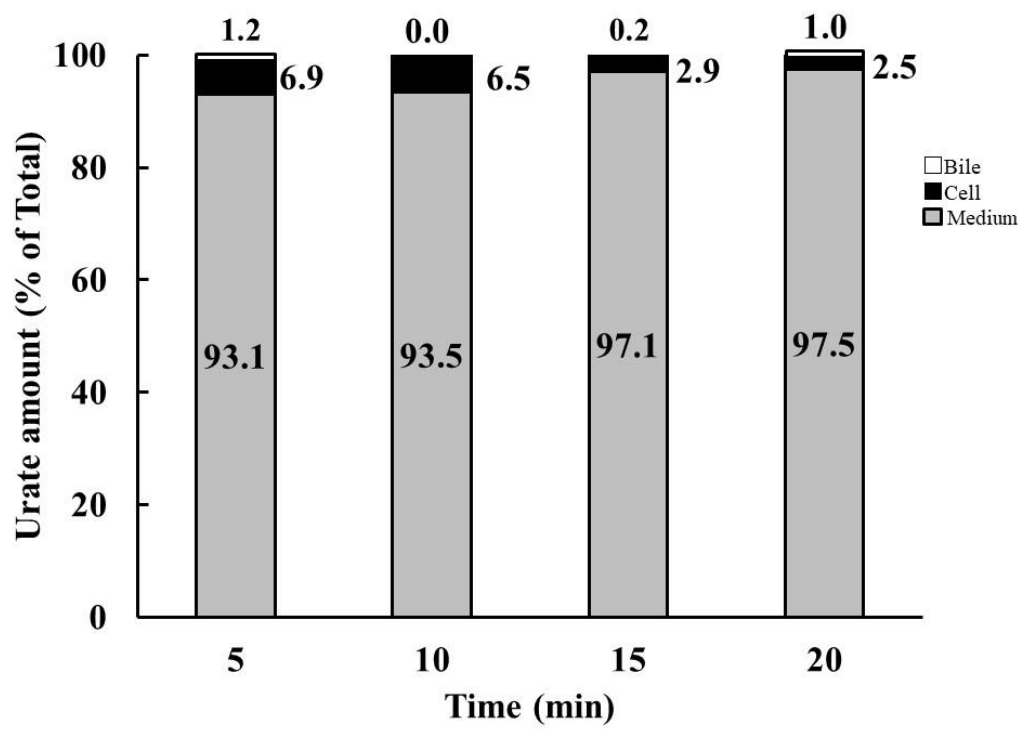


Figure 2-4 Amount of UA in cells, medium and bile.

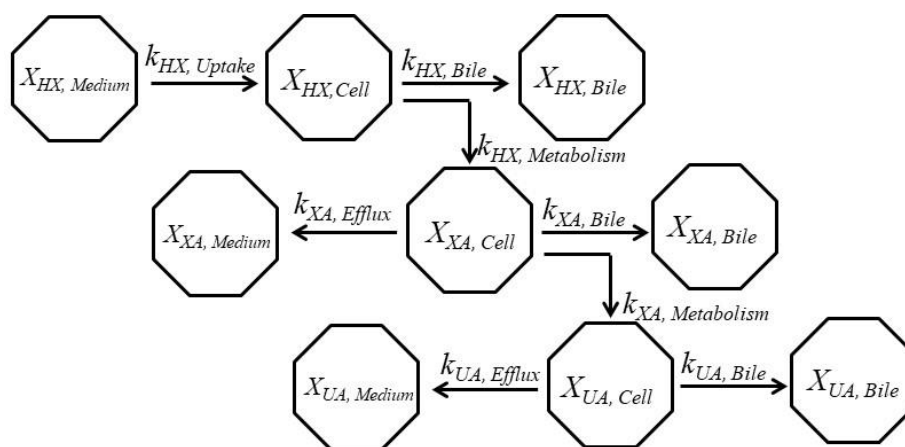
### 第三節 サンドイッチ培養ヒト肝細胞における HX、XA 及び UA 量の数理的モデルによる解析

第二章、第二節の結果から、HX をサンドイッチ培養ヒト肝細胞の培養 medium 中に加えた後に、XO によって速やかに XA、及び UA が生成した。また、HX、XA 及び、UA は胆管腔中への移行は無視できる程度と考えられた。さらに、medium 中の XA 及び UA が増加することから、細胞内から medium 中への排出することも示された。以上の結果を組み込んだ数理的モデルによって、HX、XA 及び UA の肝動態パラメータの算出を試みた。さらに、モデルにより算出したパラメータから尿酸量のシミュレーションを行った。

#### 第一項 数理的モデル (standard model) の構築

HX、XA 及び UA の medium 中、細胞中及び胆管腔中の経時的な量変化を数理的モデルで解析し一次速度定数を算出した。解析ソフトは Napp nonlinear regression analysis program (version 2.3.1 for Macintosh OS-X; The University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan) を使用した。Figure 2-5 に構築したコンパートメントモデルを示す。Standard model は HX が medium 中から細胞に取り込まれ、代謝を受け XA を経て UA が生成される。また、HX、XA 及び UA は細胞中から medium 中へ移行する過程及び胆管腔中への排出過程も含むものである。

### Standard model



**Figure 2-5 Standard model; Scheme depicting *in vitro* hepatic disposition of hypoxanthine-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>,<sup>15</sup>N, xanthine-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>,<sup>15</sup>N and uric acid-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>,<sup>15</sup>N in the medium, and hepatocytes in sandwich-cultured human hepatocytes. X denotes mass of HX, XA, and UA. Rate constants are designated as  $k_{\text{Uptake}}$  for uptake from medium into hepatocytes,  $k_{\text{Bile}}$  for efflux from cell into bile canaliculi, and  $k_{\text{Metabolism}}$  for metabolism from HX to XA, and from XA to UA.**

Standard model では以下の微分方程式を連立させ各一次の速度定数を算出した。

$$dX_{\text{HX, Medium}} / dt = - k_{\text{HX, Uptake}} \times X_{\text{HX, Medium}}$$

$$dX_{\text{HX, Cell}} / dt = k_{\text{HX, Uptake}} \times X_{\text{HX, Medium}} - (k_{\text{HX, Metabolism}} + k_{\text{HX, Bile}}) \times X_{\text{HX, Cell}}$$

$$dX_{\text{HX, Bile}} / dt = k_{\text{HX, Bile}} \times X_{\text{HX, Cell}}$$

$$dX_{\text{XA, Medium}} / dt = k_{\text{XA, Efflux}} \times X_{\text{XA, Cell}}$$

$$dX_{\text{XA, Cell}} / dt = k_{\text{HX, Metabolism}} \times X_{\text{HX, Cell}} - (k_{\text{XA, Metabolism}} + k_{\text{XA, Efflux}} + k_{\text{XA, Bile}}) \times X_{\text{XA, Cell}}$$

$$dX_{\text{XA, Bile}} / dt = k_{\text{XA, Bile}} \times X_{\text{XA, Cell}}$$

$$dX_{\text{UA, Medium}} / dt = k_{\text{UA, Efflux}} \times X_{\text{UA, Cell}}$$

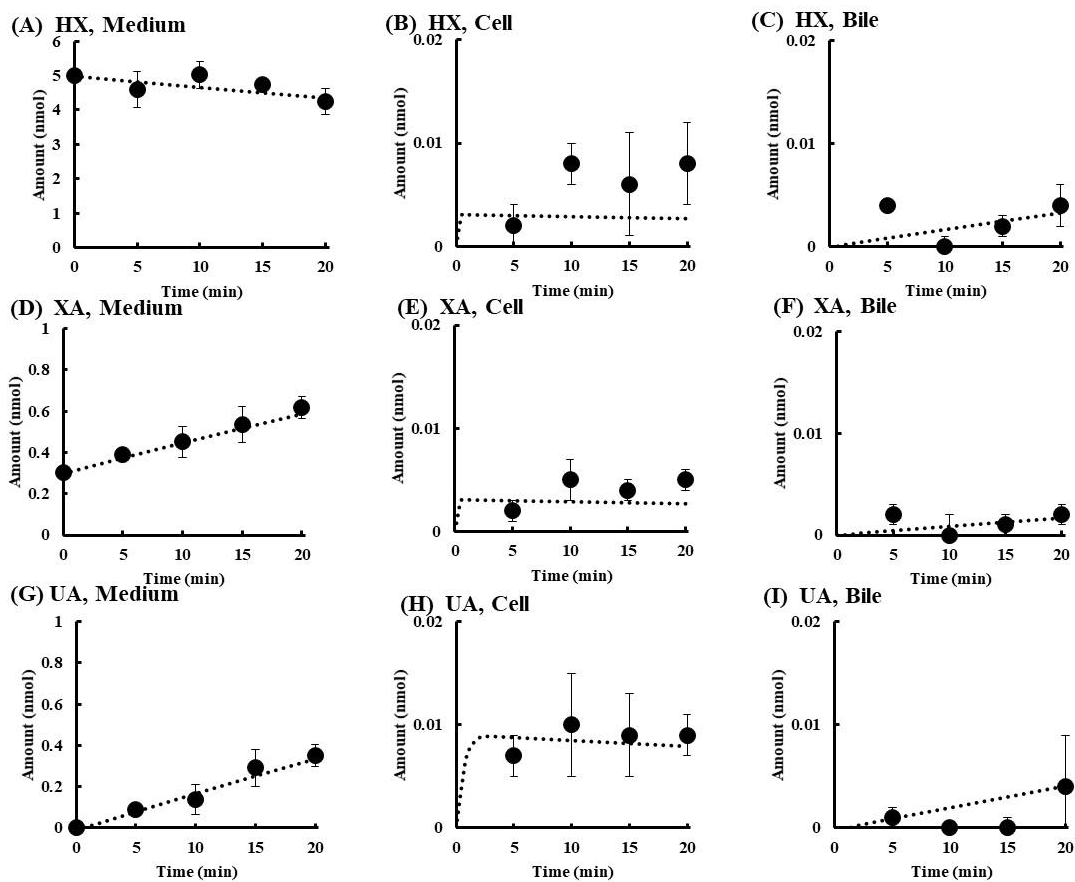
$$dX_{\text{UA, Cell}} / dt = k_{\text{XA, Metabolism}} \times X_{\text{XA, Cell}} - (k_{\text{UA, Efflux}} + k_{\text{UA, Bile}}) \times X_{\text{UA, Cell}}$$

$$dX_{\text{UA, Bile}} / dt = k_{\text{UA, Bile}} \times X_{\text{UA, Cell}}$$

本式において記載された一次速度定数の  $k_{\text{Uptake}}$ 、 $k_{\text{Bile}}$  及び  $k_{\text{Efflux}}$  はそれぞれ、medium 中から細胞中への取り込み、胆管腔中への排出、及び細胞中から medium 中への排出を示す。また、 $k_{\text{Metabolism}}$  は細胞内での代謝を示す。X は、HX、XA 及び UA の各コンパートメントにおける量を表す。

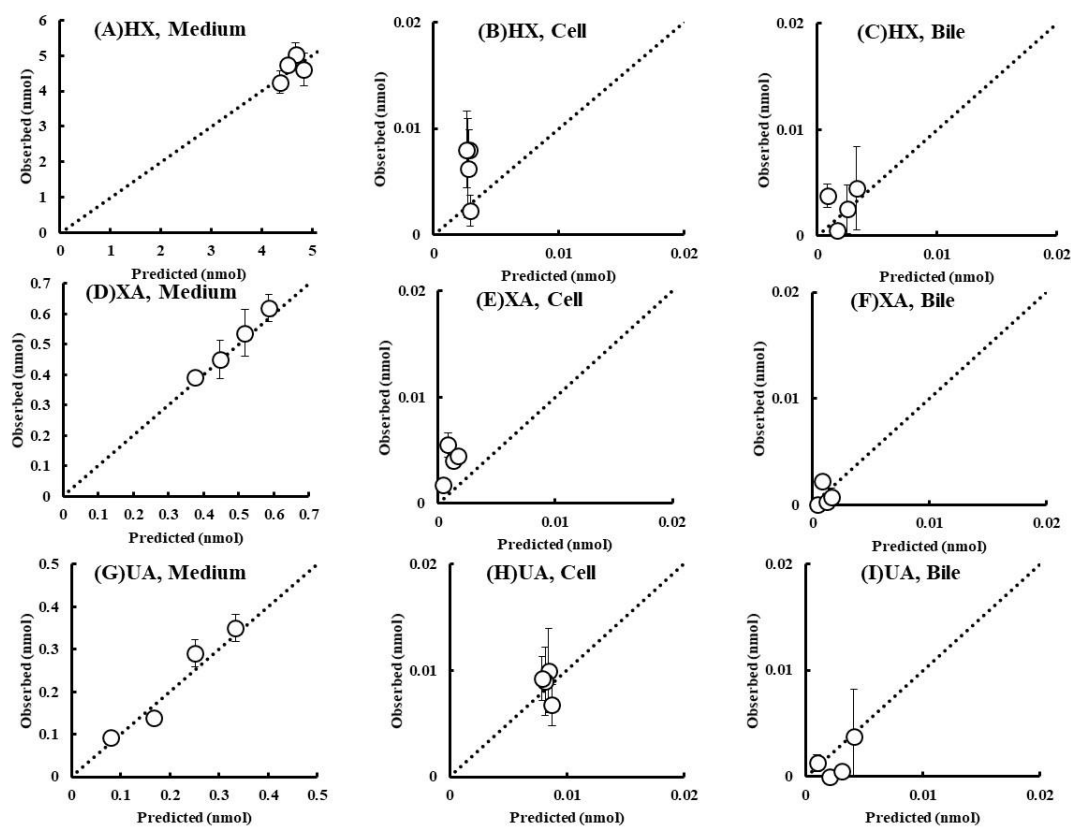
## 第二項 結果

HX、XA 及び UA の medium 中、胆管腔中及び細胞中の経時的な量の変化から、standard model に基づいてコンパートメント間の移行を示す一次速度定数を算出した。算出したパラメータの推定値から HX、XA 及び UA 量の時間推移を、予測した値と実測値を Figure 2-6 に示す。Standard model において予測した、medium 中の HX、XA 及び UA 量は実測値と概ね一致するものであった。一方、細胞内量は、実測値は 5 から 10 分にかけて増加するのに対し、モデルによる予測値は、HX 添加後速やかに増加し定常状態へと達していた。Standard model から算出した予測値と実測値の相関図を Figure 2-7 に示す。Standard model における実測値と予測値の medium 中化合物量の相関は良好であったが、細胞内化合物量は相関しない部分があった(Figure 2-6B, E, H, 2-7B, E, H)。



**Figure 2-6 Simulation of HX, XA, and UA mass versus time profiles by standard model.**

Observed and fitted mass versus time profiles for HX (A, B and C), XA (D, E and F), and UA (G, H and I). A, D, and G show amount in medium; B, E, and H show amount in cells. C, F and I show amount in bile. Each observed value represents the mean  $\pm$  S.D. Closed circles indicate observed values. Dotted lines indicate fitted values by standard model.



**Figure 2-7 Correlation diagram of observed versus predicted valued based on standard model.** The dashed line represents a correlation coefficient of 1. (A), (D), and (G) represent the correlation diagrams in medium of amount of HX, XA, and UA respectively. (B), (E), and (H) represent the correlation diagrams in cells of amount of HX, XA, and UA respectively. (C), (F), and (I) represent the correlation diagrams in bile of amount of HX, XA, and UA respectively.

**Table 2-3 Parameter estimates from standard model.**

Compound	Parameter	Estimated	CV%
Hypoxanthine- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N	k <sub>Uptake</sub> (min <sup>-1</sup> )	0.0068	27
	k <sub>Metabolism</sub> (min <sup>-1</sup> )	11	35
	k <sub>Bile</sub> (min <sup>-1</sup> )	0.058	36
Xanthine- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N	k <sub>Efflux</sub> (min <sup>-1</sup> )	5.1	58
	k <sub>Metabolism</sub> (min <sup>-1</sup> )	6.1	29
	k <sub>Bile</sub> (min <sup>-1</sup> )	0.029	34
Urate- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N	k <sub>Efflux</sub> (min <sup>-1</sup> )	2.0	27
	k <sub>Bile</sub> (min <sup>-1</sup> )	0.025	34

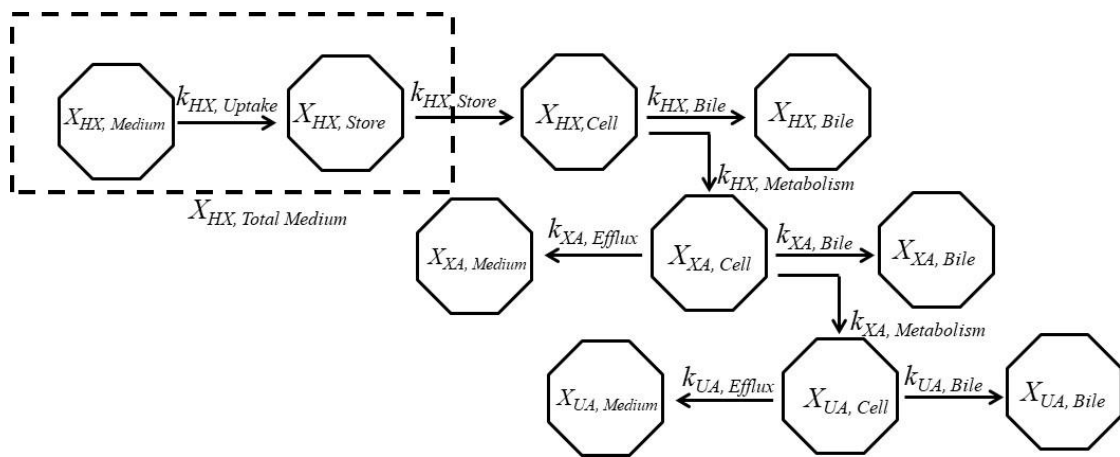
$$\text{CV\%} = [\text{S.D.}] / [\text{Rate constant}] \times 100$$



### 第三項 数理的モデル(store model)の構築

Standard model による解析の結果、細胞中の HX、XA 及び UA 量の相関性が低かったため、HX の取り込み過程にもう一つコンパートメント( $X_{HX, Store}$ )を加えた store model を構築した。Figure 2-8 にモデルを示す。

Store model



**Figure 2-8 Store model; Scheme depicting in vitro hepatic disposition of HX, XA and UA in medium, hepatocytes, and bile canalicular lumen in hSCH.**

X denotes mass of HX, XA, and UA. The rate constants are designated as  $k_{Uptake}$  for uptake from medium into cells,  $k_{Efflux}$  for efflux from cells to medium,  $k_{Bile}$  for efflux from cells to bile canalicular lumen and  $k_{Metabolism}$  for metabolism from HX to XA, and from XA to UA.

Store model では、以下の微分方程式によって一次速度定数を算出した。

$$dX_{HX, Medium} / dt = - k_{HX, Uptake} \times X_{HX, Medium}$$

$$dX_{HX, Store} / dt = k_{HX, Uptake} \times X_{HX, Medium} - k_{HX, Store Uptake} \times X_{HX, Store}$$

$$dX_{HX, Cell} / dt = k_{HX, Store Uptake} \times X_{HX, Medium} - (k_{HX, Metabolism} + k_{HX, Bile}) \times X_{HX, Cell}$$

$$dX_{HX, Bile} / dt = k_{HX, Bile} \times X_{HX, Cell}$$

$$dX_{XA, Medium} / dt = k_{XA, Efflux} \times X_{XA, Cell}$$

$$dX_{XA, Cell} / dt = k_{XA, Metabolism} \times X_{HX, Cell} - (k_{XA, Metabolism} + k_{XA, Efflux} + k_{XA, Bile}) \times X_{XA, Cell}$$

$$dX_{XA, Bile} / dt = k_{XA, Bile} \times X_{XA, Cell}$$

$$dX_{UA, Medium} / dt = k_{UA, Efflux} \times X_{UA, Cell}$$

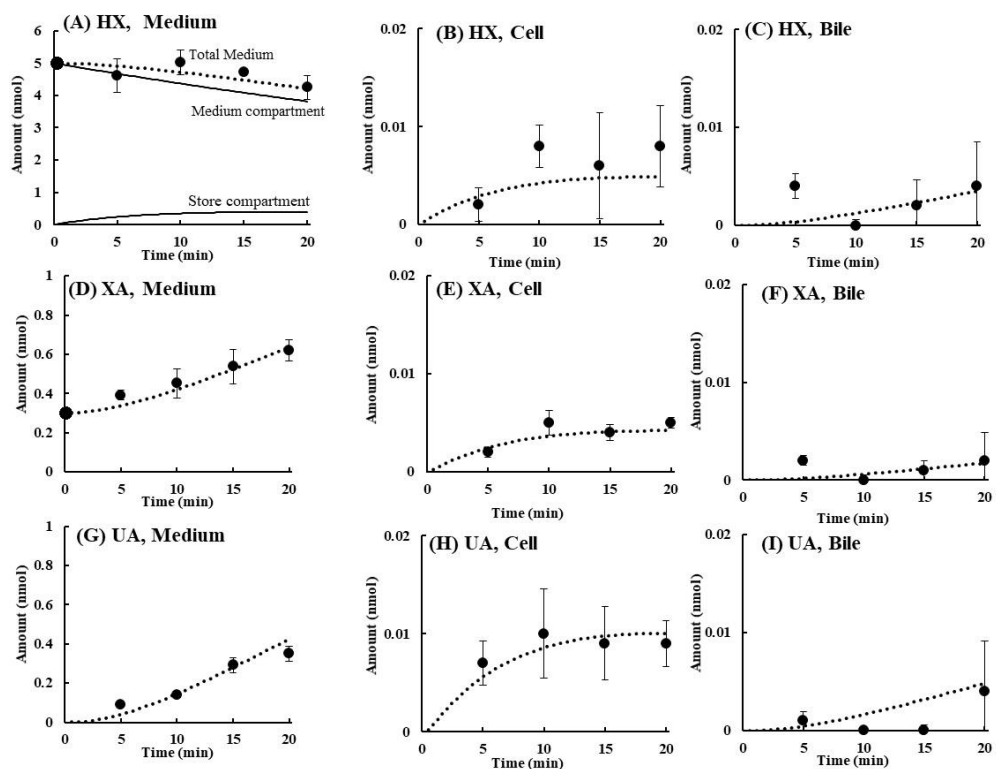
$$dX_{UA, Cell} / dt = k_{UA, Metabolism} \times X_{XA, Cell} - (k_{UA, Efflux} + k_{UA, Bile}) \times X_{UA, Cell}$$

$$dX_{UA, Bile} / dt = k_{UA, Bile} \times X_{UA, Cell}$$

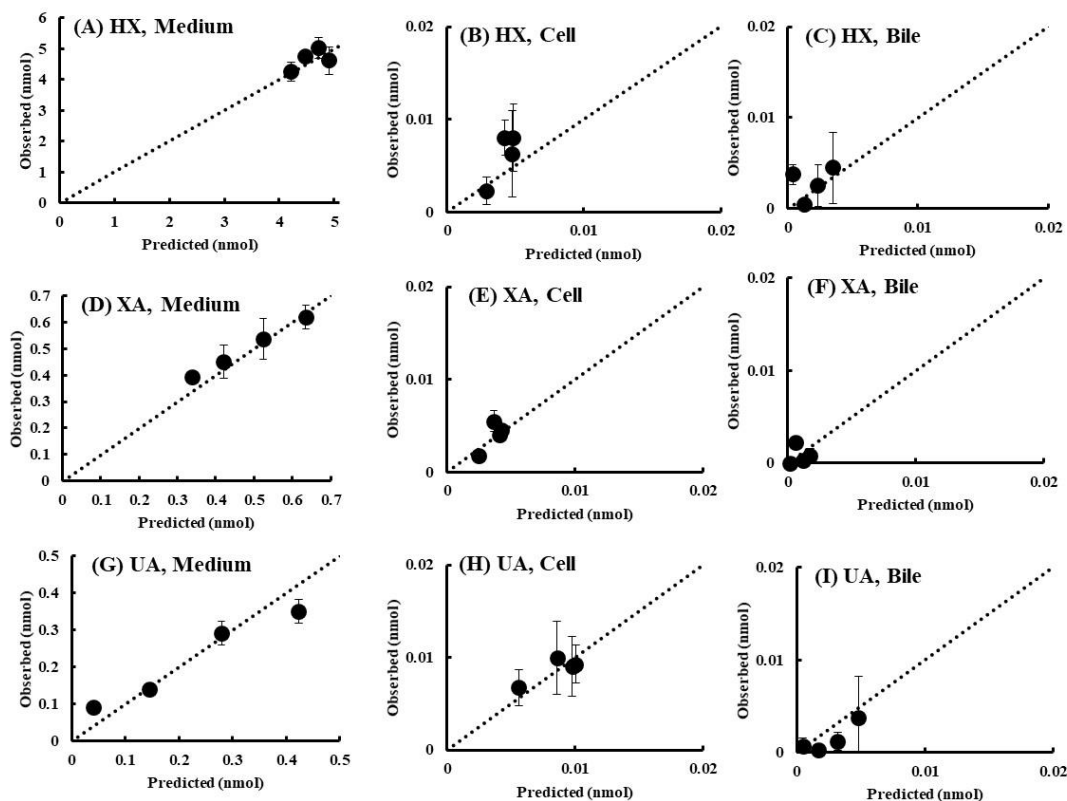
一次速度定数の  $k_{HX, Uptake}$  及び  $k_{HX, Store Uptake}$  は HX の取り込み過程を示す。

#### 第四項 Store model による解析結果

HX の取り込み過程を二段階にしたモデルである store model による fitting で算出した medium 中、細胞中及び胆管腔中の HX、XA 及び UA の量的推移は、実測値と概ね一致した (Figure 2-9)。Store model から算出した予測値と実測値の相関図を Figure 2-10 に示す。Store model から算出した各過程の一次速度定数を Table 2-4 に示す。Store model において算出された速度定数の CV% のほとんどが 50% 以下となり、細胞内外の HX、X、および UA 量を良好に説明できるものとなった。



**Figure 2-9 HX, XA and UA mass versus time profiles after incubation with HX (10  $\mu$ M) in human SCH over 20 min.** Observed and fitted mass versus time profiles for HX (A and D), XA (B and E), and UA (C and F). A, B, and C: medium; D, E, and F: cells; G: medium and a store compartment; H: store compartment. Each observed value represents the mean  $\pm$  S.D. Closed circles indicate observed values. Dotted lines indicate fitted values.



**Figure 2-10 Correlation diagram of observed versus predicted valued based on store model.**

The dashed line represents a correlation coefficient of 1. (A), (D), and (G) represent the correlation diagrams in medium of amount of HX, XA, and UA respectively. (B), (E), and (H) represent the correlation diagrams in cells of amount of HX, XA, and UA respectively. (C), (F), and (I) represent the correlation diagrams in bile of amount of HX, XA, and UA respectively.

**Table 2-4 Parameter estimates from store model.**

Compound	Parameter	Estimated	CV%
Hypoxanthine- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N	$k_{HX, \text{Uptake}}$ (min <sup>-1</sup> )	0.013	43
	$k_{HX, \text{Store Uptake}}$ (min <sup>-1</sup> )	0.11	57
	$k_{HX, \text{Metabolism}}$ (min <sup>-1</sup> )	11	32
	$k_{HX, \text{Bile}}$ (min <sup>-1</sup> )	0.048	34
Xanthine- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N	$k_{XA, \text{Efflux}}$ (min <sup>-1</sup> )	5.3	54
	$k_{XA, \text{Metabolism}}$ (min <sup>-1</sup> )	7.0	27
	$k_{XA, \text{Bile}}$ (min <sup>-1</sup> )	0.028	33
Uric acid- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N	$k_{UA, \text{Efflux}}$ (min <sup>-1</sup> )	2.9	28
	$k_{UA, \text{Bile}}$ (min <sup>-1</sup> )	0.033	36

$$\text{CV\%} = [\text{S.D.}] / [\text{Rate constant}] \times 100$$

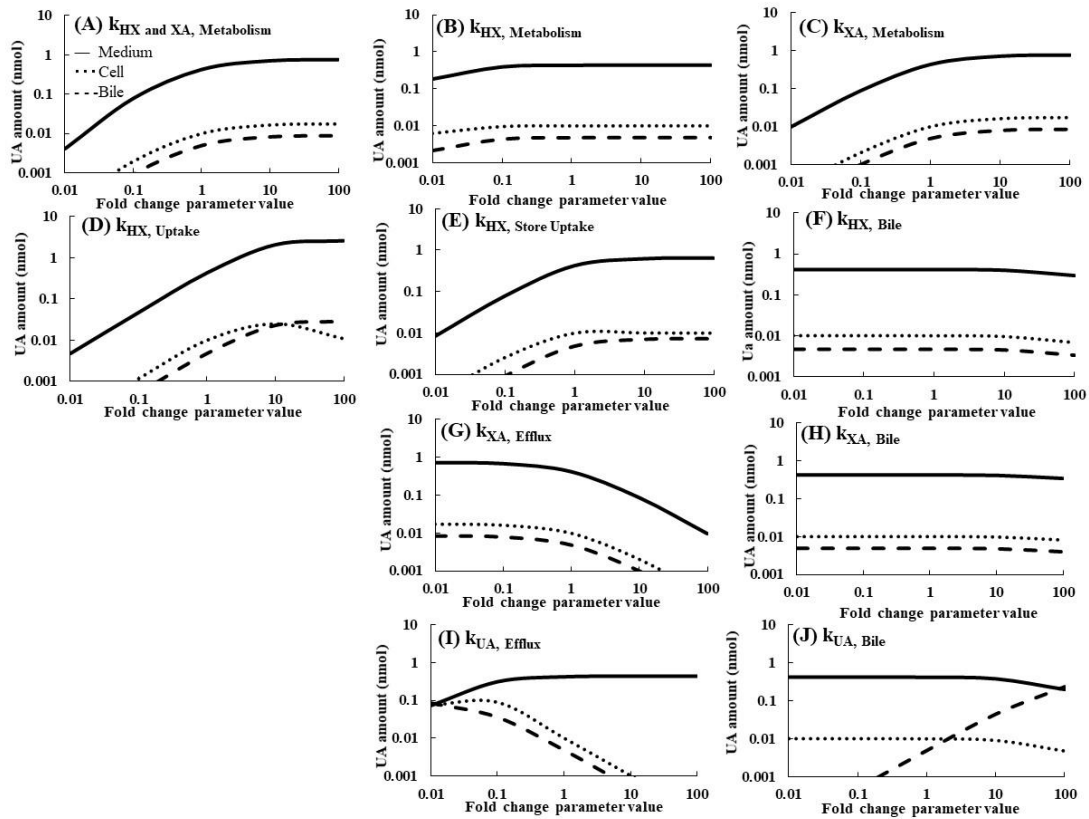
## 第四節 Store model により算出したパラメータに対する UA 量の感受性試験

### 第一項 方法

Table 2-4 で得られた各一次速度定数の変化に対する、medium 中、細胞中及び胆管腔中の UA 量の感受性をシミュレーションした。モデルにより算出した一次速度定数を 0.01 倍から 100 倍まで変動させ、UA 量の変化を評価した。

### 第二項 結果

HX の medium 中から細胞中への取り込み速度定数である  $k_{HX, Uptake}$  を 10 倍した場合、medium 中、細胞中及び胆管腔中の UA 量はそれぞれ 481%、249%及び 481%に増加した (Figure 2-11D)。一方、 $k_{HX, Uptake}$  を 10 分の 1 に低下させた場合、medium 中、細胞内及び胆管腔中の UA 量は 11~12%に減少した。また、XA の代謝速度である  $k_{XA, Metabolism}$  を 10 倍にした場合、medium 中、細胞中及び胆管腔中の UA 量は、164-165%に増加した (Figure 2-11C)。一方、 $k_{XA, Metabolism}$  を 10 分の 1 倍に低下させた場合、いずれも 20%に減少した。XA の細胞から medium 中への排出速度定数である  $k_{XA, Efflux}$  を 10 倍にした場合、medium 中、細胞中及び胆管腔中の UA 量は 21%まで減少した (Figure 2-11G)。一方、 $k_{XA, Efflux}$  を 10 分の 1 に低下させた場合、medium 中及び細胞中の UA 量は 163%に増加した。UA の細胞から medium への排出速度である  $k_{UA, Efflux}$  を 10 倍にした場合、medium 中、細胞中及び胆管腔中の UA 量はそれぞれ 103%、10%及び 10%に変化した (Figure 2-11I)。一方、 $k_{UA, Efflux}$  を 10 分の 1 に低下させた場合にはそれぞれ 74%、886%及び 741%に変化した。以上の結果から、in vivo では血中の尿酸量に相当する、medium 中の UA 量を増加するのに感受性が高い速度定数の順は、 $k_{HX, Uptake} > k_{XA, Metabolism} \doteq k_{XA, Efflux} > k_{HX, Store Uptake} > k_{UA, Efflux}$  であった (Figure 2-11, Table 2-5)。Medium 中の UA 量を減少するのに感受性が高いパラメータの順は  $k_{HX, Uptake} > k_{HX, Store Uptake} \doteq k_{XA, Metabolism} \doteq k_{XA, Efflux} > k_{UA, Efflux}$  であった。



**Figure 2-11 Sensitivity analysis of parameter estimates determined from the store model.**

Parameters were altered 100-fold in either direction of estimated value in Table 3-3-2. Solid line, dotted line and dashed line represent the amount of UA in medium, cells, and bile canaliculi, respectively. (A), (B), (C), (D), (E), (F), (G), (H), (I) and (J) represent effect of fold change of  $k_{HX}$  and XA, Metabolism,  $k_{HX}$ , Metabolism,  $k_{XA}$ , Metabolism,  $k_{HX}$ , Uptake,  $k_{HX}$ , Store Uptake,  $k_{HX}$ , Bile,  $k_{XA}$ , Efflux,  $k_{XA}$ , Bile,  $k_{UA}$ , Efflux, and  $k_{UA}$ , Bile respectively.

**Table 2-5 Sensitivity analysis of parameter estimates determined from the store model.**

Fold change of parameters	$k_{HX, \text{Uptake}}$			$k_{HX, \text{Store Uptake}}$			$k_{HX, \text{Bile}}$			$k_{HX \text{ and } XA, \text{Metabolism}}$			$k_{HX, \text{Metabolism}}$		
	Medium	Cell	Bile	Medium	Cell	Bile	Medium	Cell	Bile	Medium	Cell	Bile	Medium	Cell	Bile
0.01	1	1	1	2	3	2	100	100	100	1	1	1	43	60	43
0.1	11	12	11	19	26	19	100	100	100	18	20	18	91	96	91
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
10	481	249	481	147	101	147	96	96	96	166	164	166	101	100	101
100	602	109	602	152	100	152	69	69	69	178	176	178	101	100	101
Fold change of parameters	$k_{XA, \text{Metabolism}}$			$k_{XA, \text{Efflux}}$			$k_{XA, \text{Bile}}$			$k_{UA, \text{Efflux}}$			$k_{UA, \text{Bile}}$		
	Medium	Cell	Bile	Medium	Cell	Bile	Medium	Cell	Bile	Medium	Cell	Bile	Medium	Cell	Bile
0.01	2	2	2	174	174	174	100	100	100	17	738	1750	101	101	1
0.1	20	20	20	163	163	163	100	100	100	74	886	741	101	101	10
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
10	165	164	165	21	21	21	98	98	98	103	10	10	91	91	910
100	176	175	176	2	2	2	82	82	82	103	1	1	48	47	4788

**% of rate constant estimated by store model**



## 第五節 小括

本章ではまず、サンドイッチ培養ヒト肝細胞 (Lot number: GMX) において胆管腔の形成及びトランスポーター (NTCP や BSEP) による化合物の輸送を観察可能か検討した。 $[^3\text{H}]$ Taurocholate の BEI は 59.6% と、既報の 52.4-70.8% と同程度であった (Abe *et al.*, 2009)。したがって、本研究で用いた肝細胞による肝取り込み及び胆管腔排出の評価は可能であることが示された。

サンドイッチ培養ヒト肝細胞における HX、XA 及び UA の medium 中及び細胞中の経時的な量変化を standard model で解析した結果、HX、XA 及び UA の細胞内量の時間推移を適切に説明できなかった。全体の変化から、この原因が HX の medium 中から細胞中への移行過程にあると考え、standard model 中の HX の medium 中から細胞中への移行過程に新たにコンパートメントを追加した store model を構築した。Store model より算出した細胞中 HX、XA 及び UA 量は概ね実測値と一致した (Figure 2-10)。加えたコンパートメントである  $X_{\text{HX,Store}}$  の実体は不明であるが、HX は脂溶性が高いことから medium 中から細胞内移行する段階でいったん細胞膜に分配され、その後細胞内に移行することが考えられた。改善された Store model より算出した  $k_{\text{UA, Efflux}}$  は  $k_{\text{UA, Bile}}$  と比較すると 88 倍であり、medium 中に多く排出された。したがって、ヒト肝臓において尿酸は胆管腔中よりも血液側に排出されていることが示された。さらに、尿酸はヒトや齧歯類において、胆汁中クリアランスは腎臓や小腸におけるクリアランスよりも極めて小さいこととも一致した (Hosomi *et al.*, 2012, Kountouras *et al.*, 1996)。

Store model より算出した一次速度定数 (Table 2-4) の変化に対する medium 中、細胞中ならび胆管腔中の UA 量の感受性をシミュレーションした (Figure 2-11, Table 2-5)。興味深いことに UA の細胞中から medium 中への移行速度定数である  $k_{\text{UA, Efflux}}$  を 10 倍にした場合、medium 中の UA 量はほとんど変化しなかった。また、逆に 10 分の 1 まで低下させても medium 中の尿酸量は 8 割程度までしか減少しなかった。つまり、肝細胞から

血液側に移行するトランスポーターの活性を調節してもそれほど SUA には影響しないことが考えられた。これは、medium 中への移行効率が非常に高いため、多少の変動では medium 中尿酸量への影響が出ず、他の輸送あるいは代謝過程が medium 中尿酸量を定める律速過程になっていることが考えられた。一方で、 $k_{HX, Uptake}$ 、 $k_{XA, Metabolism}$  及び  $k_{XA, Efflux}$  を変化させた時の medium 中の UA 量は感受性が高かったことより、尿酸生成阻害薬である febuxostat、topiroxostat ならびに ALO が臨床で高尿酸血症及び痛風治療で有用であることが、本数理的モデル解析によって示すことができた。また、hypoxanthine の肝細胞への取り込みや、xanthine の肝細胞からの排出過程の変動により SUA が変化することが考えられ、これらの過程が高尿酸血症や痛風の病態や治療に影響することが考えられた。

### 第三章 サンドイッチ培養ヒト肝細胞における HX、XA 及び UA の肝動態に対する XO 阻害剤及びトランスポーター阻害剤の影響

Xanthine oxidase (XO)は、プリン塩基の分解経路において、hypoxanthine から xanthine、xanthine から尿酸に至る二段階を触媒する金属フラビン酵素である。酸化酵素（オキシダーゼ）と呼ばれてきたが、本来生体内では脱水素酵素として存在する。キサンチン脱水素酵素 xanthine dehydrogenase では基質の酸化に伴い、電子はもう一方の基質である NAD に渡され NADH を生成する。酸化酵素では NAD より酸素分子との反応性が高く過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) およびスーパーオキシド  $O_2^-$ を生成する。酵素は細胞質に存在し、様々な臓器に広く分布するが、肝臓や小腸粘膜、乳汁中に活性が高い。分子量約 30 万で二量体からなる。一量体当たり 1 個のモリブドプテリン、2 個の非ヘム鉄、1 個の FAD をもち分子内電子伝達系を形成している (Pacher *et al.*, 2006)。アロプリノール及びその酸化物であるオキシプリノールは本酵素の強い阻害剤で高尿酸血症や痛風の治療薬として使われている(ザイロリック®インタビューフォーム)。

尿酸は肝臓や消化管で生成されるが、それらの組織における尿酸及びその前駆体の動態に関与するトランスポーターは未解明な点が多い。安西らは肝臓にある NPT1、NPT4 及び GLUT9 が尿酸の肝臓からの排出を担うと予測しているが、実験的には示されていない(Anzai and Endou 2009)。そこで本研究では、XO ならびに肝細胞に発現する尿酸トランスポーター各分子の尿酸動態への影響と寄与を樹立したモデルを用いて検討することとした。

## 第一節 Allopurinol 存在下の HX、XA、及び UA の経時的量変化及び肝動態モデル解析

XO 阻害剤の ALO 存在下における、HX、XA 及び UA の経時的な量変化に対する一次速度定数を算出し ALO 非存在下と比較することで、サンドイッチ培養ヒト肝細胞における XO 活性の評価、及び第二章で構築したモデルの妥当性の評価を行う。

### 第一項 試薬及び方法

(1) Allopurinol は Sigma-Aldrich (Missouri, USA) から購入した。ヒト肝細胞のサンドイッチ培養法は第二章、第一節と同様に行った。

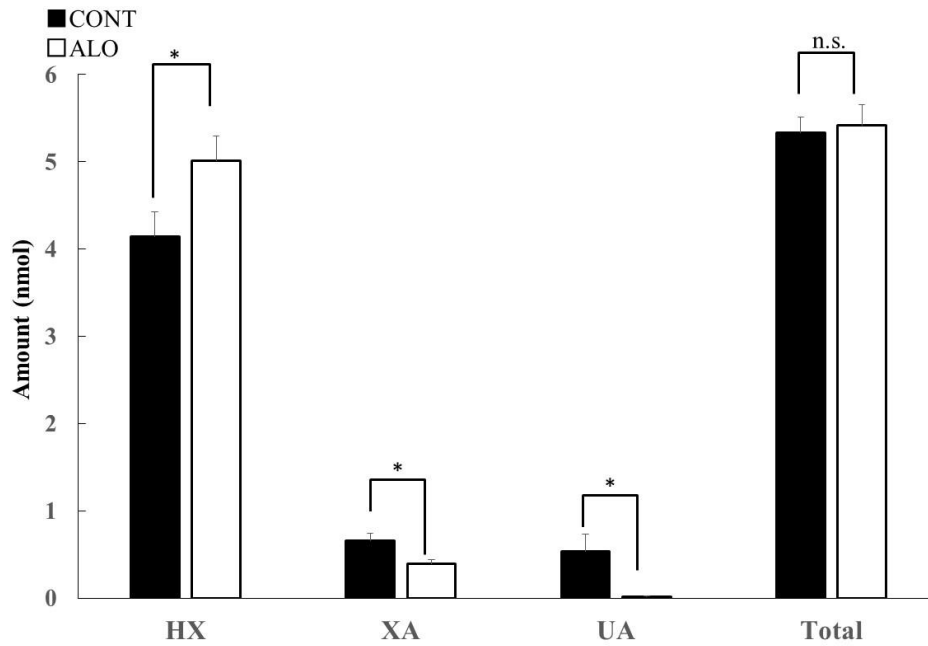
(2) サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた取り込み試験

24-well plate に播種したサンドイッチ培養ヒト肝細胞を  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  medium または、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free medium で 5 分間プレインキュベーションした。その後、 $10 \mu\text{M}$  hypoxanthine- $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{15}\text{N}$  のみ、又は  $10 \mu\text{M}$  allopurinol (ALO) を含む  $500 \mu\text{L}$  の medium に交換した。ALO の濃度  $10 \mu\text{M}$  は血漿 ALO 濃度を反映している。所定時間ごとに、medium を  $150 \mu\text{L}$  回収した。また反応終了後、氷冷した medium で二回洗い、 $0.002\%$  triton-X (wako) を  $200 \mu\text{L}$  加えて細胞を溶解させ、その細胞溶解液を  $150 \mu\text{L}$  採取した。その後 LC-MS/MS で定量した。前処理及び定量方法は第二章、第二節と同様に行った。

### 第二項 結果

サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いて、ALO ( $10 \mu\text{M}$ ) の XA 及び UA の生成への影響を検討した。ALO 存在下において、XA 及び UA の産生がそれぞれ  $60\%$  及び  $3\%$  にまで低下した (Figure 3-1)。一方、HX は  $121\%$  に増量した。また総回収量は変化しなかった。Store model を用いて ALO の UA 生成への影響を速度定数の観点から評価した。ALO を添加した際には、HX 及び XA の代謝速度定数 ( $k_{\text{HX, Metabolism}}$ 、 $k_{\text{XA, Metabolism}}$ ) が、

2~5%にまで低下した。さらに、HX の細胞への取り込み速度定数 ( $k_{HX, Uptake}$ ) 及び UA の移行速度定数 ( $k_{UA, Efflux}$ ) もそれぞれ、4%及び8%までに低下した。



**Figure 3-1 Total amount of HX, XA, and UA in the presence or absent of ALO at 20 min.**

Data represent mean + S.D.  $n = 4$ . The asterisks indicate a significant difference from the control by Student's t-test or Aspin-Welch's t-test;  $*p < 0.05$ . n.s: not significant. Solid bars: in the absent of ALO. Open bars: in the present of ALO.

**Table 3-1 Parameter estimates in the presence or absent of xanthine oxidase inhibitor, allopurinol (ALO).**

Compound	Parameter		CONT	ALO
Hypoxanthine- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N	k <sub>HX</sub> , Uptake	min <sup>-1</sup>	0.012	0.00051*
	k <sub>HX</sub> , Store Uptake	min <sup>-1</sup>	0.21	4.4
	k <sub>HX</sub> , Metabolism	min <sup>-1</sup>	9.2	0.47*
	k <sub>HX</sub> , Bile	min <sup>-1</sup>	0.012	n.d.
Xanthine- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N	k <sub>XA</sub> , Efflux	min <sup>-1</sup>	5.8	0.99
	k <sub>XA</sub> , Metabolism	min <sup>-1</sup>	8.1	0.16*
	k <sub>XA</sub> , Bile	min <sup>-1</sup>	n.d.	0.0038
Uric acid- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N	k <sub>UA</sub> , Efflux	min <sup>-1</sup>	2.1	0.17*
	k <sub>UA</sub> , Bile	min <sup>-1</sup>	0.0011	n.d.

Data represent the mean (S.D.). n=3-4. The asterisks indicate a significant difference from the control by Student's t-test or Aspin-Welch's t-test; \*p < 0.05. n.d.: not detected

## 第二節 トランスポーター阻害剤の影響

肝臓における尿酸輸送活性を有する各トランスポーターの寄与を store model を用いた速度論的解析により評価することとした。肝臓においては、尿酸輸送活性を有するトランスポーターとして、GLUT9、OAT2、NPT1/4、BCRP 及び MRP4 の発現が確認されている。この中で、細胞内から血液中への移行に働き、かつ基底膜に発現が確認されている GLUT9、NPTs、MRP4 に特に着目し、阻害剤を選択した。

### 第一項 試薬及び方法

#### (1) 試薬

Benzbromarone (BEZ)、bromsulphalein (BSP)、allopurinol (ALO) は Sigma-Aldorich (St. Louis, MO, U.S.A.)から購入した。Furosemide (FUR), para-aminohippuric acid(PAH)は Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Oosaka, Japan)から購入した。MK571 は Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI)から購入した。

#### (2) サンドイッチ培養ヒト肝細胞の培養方法

第二章、第一節と同様に行った。

#### (3) サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた取り込み試験

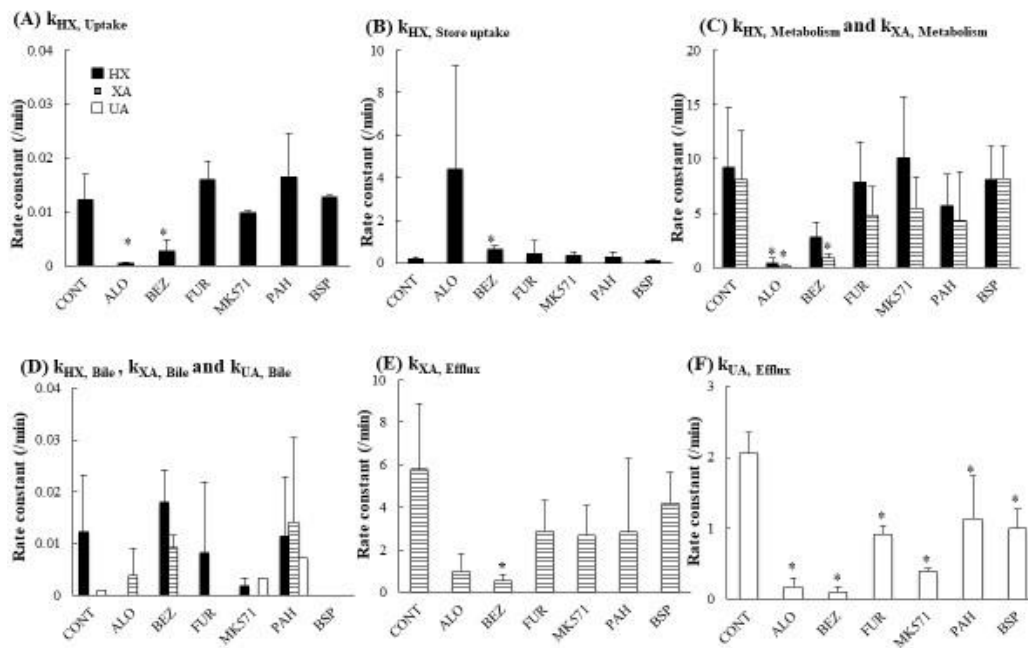
第三章、第一節と同様に行った。

### 第二項 結果

各尿酸トランスポーターの阻害として BEZ (GLUT9)、MK571 (MRP4)、FUR (NPT4 及び MRP4)、PAH (NPT1)、及び BSP (OATPs)を、HX と同時にそれぞれサンドイッチ培養ヒト肝細胞に処理し、HX、XA、及び UA 量の経時的变化を観察した。また、そ

これらの経時的な量変化をモデルにより解析した。

Store model による解析により、コントロールと比較して 200  $\mu\text{M}$  BEZ を処理した場合、 $k_{\text{UA, Efflux}}$  が 5%までに低下し、最も低下の程度が高かった。また、 $k_{\text{XA, Metabolism}}$  が 11%に減少した。 25  $\mu\text{M}$  の MK571 を処理した場合、 $k_{\text{UA, Efflux}}$  が 19%までに低下した。1000  $\mu\text{M}$  の FUR を処理した場合、 $k_{\text{UA, Efflux}}$  が 44%までに低下した。1000  $\mu\text{M}$  の PAH を処理した場合、 $k_{\text{UA, Efflux}}$  が 55%までに低下した。50  $\mu\text{M}$  の BSP を処理した場合、 $k_{\text{UA, Efflux}}$  が 49%までに低下した(Figure 3-2)。



**Figure 3-2 Effect of inhibitors of transporters and enzyme on estimated rate constants for uotake, efflux and metabolism of HX, XA, and UA in hSCH.**

Effects of ALO (10  $\mu\text{M}$ , XO inhibitor), BEZ (200  $\mu\text{M}$ , GLUT9 inhibitor), FUR (1000  $\mu\text{M}$ , MRP4 and NPT4 inhibitor), MK571 (25  $\mu\text{M}$ , MRP4 inhibitor), PAH (1000  $\mu\text{M}$ , NPT1 inhibitor) and BSP (50  $\mu\text{M}$ , OATPs inhibitor) on the rate constant of HX-uptake



(A), HX-store uptake (B), HX and XA-metabolism (C), HX, XA and UA-bile (D), XA-efflux (E) and UA-efflux (F) were examined and estimated each rate constant is shown.

Solid bars indicate the rate constant of HX. Horizontal striped bars indicate rate constant of XA. Open bars indicate rate constant of UA. Data are mean±S.D.; n=3-5; \*p<0.05

#### 第四節 小括

サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いて HX、XA 及び UA の経時的な量変化に対する XO 阻害剤である ALO (10  $\mu\text{M}$ )の影響を検討した(Table 3-1)。モデル解析により、ALO 存在下で XO の代謝過程の速度定数は有意に減少したことから、サンドイッチ培養ヒト肝細胞は XO 活性を保持し、hypoxanthine から尿酸までの代謝を評価可能であることが裏付けられた。ALO の XO に対する 50 % 阻害作用を示す  $\text{IC}_{50}$  は 0.2-50  $\mu\text{M}$  である(Tamta *et al.*, 2006, Hsieh *et al.*, 2007, Pacher *et al.*, 2006)。また、ラット初代肝細胞の *in vitro* 試験においては、同じ 10  $\mu\text{M}$  において、尿酸の生成量を約 90 %阻害している (Petrie *et al.*, 2013)。ALO の  $\text{IC}_{50}$  は報告によって異なっており、*in vitro* の系の中でより生体に近い形態をとるサンドイッチ培養肝細胞は、XO の活性を評価する上で有益であると考えられた。

ALO 処理時の  $k_{\text{HX, Uptake}}$  はコントロールと比較して有意に減少していたことから、ALO は HX 及び XA の代謝過程だけでなく、HX の細胞への取り込み過程にも影響することが考えられた。また、ALO 処理によって HX の medium 中量もコントロールと比較して増加していた。これは、ヒトに ALO (300 mg)を投与した際に、hypoxanthine の血漿中濃度が増加する現象と一致していた (Kaya *et al.*, 2006)。さらに、ALO 処理によって XA の medium 中量はコントロールと比較して減少していた。

200  $\mu\text{M}$  BEZ を処理した場合、コントロールと比較して  $k_{\text{HX, Uptake}}$ 、 $k_{\text{XA, Metabolism}}$  及び  $k_{\text{UA, Efflux}}$  が、有意に減少した。BEZ は、ラット肝臓ホモジナイズの XO 活性を阻害することが報告されている (Rodilla F., *et al.*, 1988)。また、BEZ は、GLUT9 及び MRP4 を阻害することが報告されている。GLUT9 に対する  $\text{IC}_{50}$  は 23  $\mu\text{M}$  で、MRP4 に対する  $\text{IC}_{50}$  は 150  $\mu\text{M}$  である (Anzai *et al.*, 2008, Reid *et al.*, 2003)。よって、今回の試験で用いた BEZ 濃度 200  $\mu\text{M}$  は、GLUT9 をほぼ完全に阻害する濃度であり、MRP4 は 57 %阻

害することが  $IC_{50}$  から予測される。ゆえに、尿酸の肝細胞内から血液中への排出に GLUT9 及び MRP4 が関与していることが考えられた。

25  $\mu$ M MK571 を処理した場合、medium 中の UA 量に変化は見られなかったが、細胞内の量は有意に増加した。また、モデル解析の結果、 $k_{UA, Efflux}$  が 19% に低下した (Figure 3-2)。よって、 $k_{UA, Efflux}$  が一定程度低下しても肝細胞から血液側に移行する尿酸量への影響を大きくないと考えられた。この結果は、Sensitivity analysis の結果とも一致する。さらに、 $k_{UA, Efflux}$  が減少したことから MRP4 も尿酸の肝細胞中から血液中への排出に関与していることが考えられた。

1000  $\mu$ M FUR を処理した場合、 $k_{UA, Efflux}$  が 44% に減少した。FUR は NPT4 及び MRP4 を阻害することが報告されており、細胞内 UA 量が増加した原因に、これらトランスポーターの阻害作用が考えられた。NPT4 及び MRP4 に対する  $IC_{50}$  はそれぞれ、73.5  $\mu$ M 及び 10  $\mu$ M であり、1000  $\mu$ M の FUR ではほぼ完全阻害されると考えられる (Jutabha P., *et al.*, 2010, Hasegawa *et al.*, 2007)。一方、この条件では GLUT9 は阻害されないことが報告されている (Anzai N., *et al.*, 2008)。

1000  $\mu$ M PAH を処理した場合、 $k_{UA, Efflux}$  が 55% に減少した。PAH は 1000  $\mu$ M で、NPT1 をほぼ完全阻害する (Iharada *et al.*, 2010)。一方で GLUT9 は阻害しないことが報告されている (Anzai N., *et al.*, 2008)。

50  $\mu$ M BSP は OATPs を完全阻害する濃度であり、 $k_{UA, Efflux}$  を 49% に減少した。このことから OATPs も尿酸の肝細胞から血中への移行に関連している可能性が示唆された。

以上の結果より、血中への移行に関与するトランスポーターとしては GLUT9 ならびに MRP4 の寄与が大きく、NPTs や OATPs も一部関与することが示唆された。なお、今回各トランスポーターに対する阻害の評価に用いた濃度参考を決定するにあたり用いた  $IC_{50}$  は発現系による取り込みに対する値であるため、本試験の UA の細胞内

からの排出とは異なる点や、阻害剤の他のトランスポーターへの影響が不明である。遺伝子のノックダウンなどによる特定のトランスポーターの活性抑制をより精度高く行うことにより、寄与の大きなトランスポーターの同定が今後の課題として挙げられる。

#### 第四章 結論

尿酸は高尿酸血症及び痛風の原因因子であるとともに腎障害及び血管障害のリスク因子である。また、尿酸は抗酸化作用を保持し、パーキンソン病、アルツハイマー病や多発性硬化症の防御因子として報告されている。したがって、SUA の変動は様々な疾患と関連すると考えられ、SUA の恒常性を維持することは種々の病気の発症や悪化を防ぐ観点から重要である。尿酸の排泄臓器である腎臓や消化管における尿酸動態は明らかになってきているが、代謝臓器である肝臓では明らかになってない。そのため、肝臓における尿酸動態を明らかにし、高尿酸血症や痛風治療のターゲットの探索を試みた。

第二章では、内因性の hypoxanthine、xanthine ならびに尿酸と区別し評価するために、安定同位体である HX を用いてサンドイッチ培養ヒト肝細胞における HX、XA 及び UA の medium 中、細胞中及び胆管腔中の経時的な量変化を数理学的モデルにより解析した。Store model による解析結果より、UA の肝細胞中から medium 中への排出速度定数( $k_{UA, Eflux}$ )は胆管腔中への排出速度定数( $k_{UA, Bile}$ )の 88 倍であり、UA は medium 中に多く排出された。本結果はヒト及び齧歯類における尿酸の胆汁中排泄が少ないこととも一致している。したがって、ヒト肝臓において尿酸は胆管腔中よりも血液中に排出されることを初めて明らかにした。

また、store model によるシミュレーションにより、UA の細胞中から medium 中への移行速度定数( $k_{UA, Eflux}$ )の変動に対して medium 中 UA 量の感受性は低かった。一方、HX

の取り込み速度定数( $k_{HX, Uptake}$ )、XA の代謝過速度定数( $k_{XA, Metabolism}$ )及び XA の細胞中から medium 中への移行速度定数( $k_{XA, Efflux}$ )の変動に対して medium 中 UA 量の感受性は高かった。よって、尿酸の肝細胞から血液中への移行を低下させることで穏やかに SUA を減少させることが可能であると予測できた。また、xanthine の代謝過程や、肝細胞から血液中への排出過程を調節することで SUA を変動させることが可能であると予測できた。すでに XO 阻害薬である febuxostat、topiroxostat ならびに allopurinol が高尿酸血症及び痛風治療で用いられていることから、肝臓における XO 阻害過程以外の hypoxanthine を肝細胞へ取り込む過程及び xanthine の肝細胞から血液中への排出過程も高尿酸血症及び痛風治療の新たなターゲットとして挙げられた (Figure 4-1)。

第三章では、第二章で構築した store model を用いて、サンドイッチ培養ヒト肝細胞における HX、XA 及び UA の経時的な量変化に対する XO 阻害剤及び尿酸トランスポーター阻害剤の影響を検討した。allopurinol 存在下で XO の代謝過程の速度定数は有意に低下したことから、サンドイッチ培養ヒト肝細胞は XO 活性を保持し、hypoxanthine から尿酸までの代謝を評価可能であることが示された。また、尿酸トランスポーターの阻害剤を用いた試験から、ヒト肝臓 sinusoidal 側で尿酸の排出を担っているトランスポーターの寄与は、GLUT9 > MRP4 > NPTs, OATPs であることが明らかになった。

以上から尿酸の肝動態を評価すツールとしてサンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた数理的モデル解析が有用であると示された。

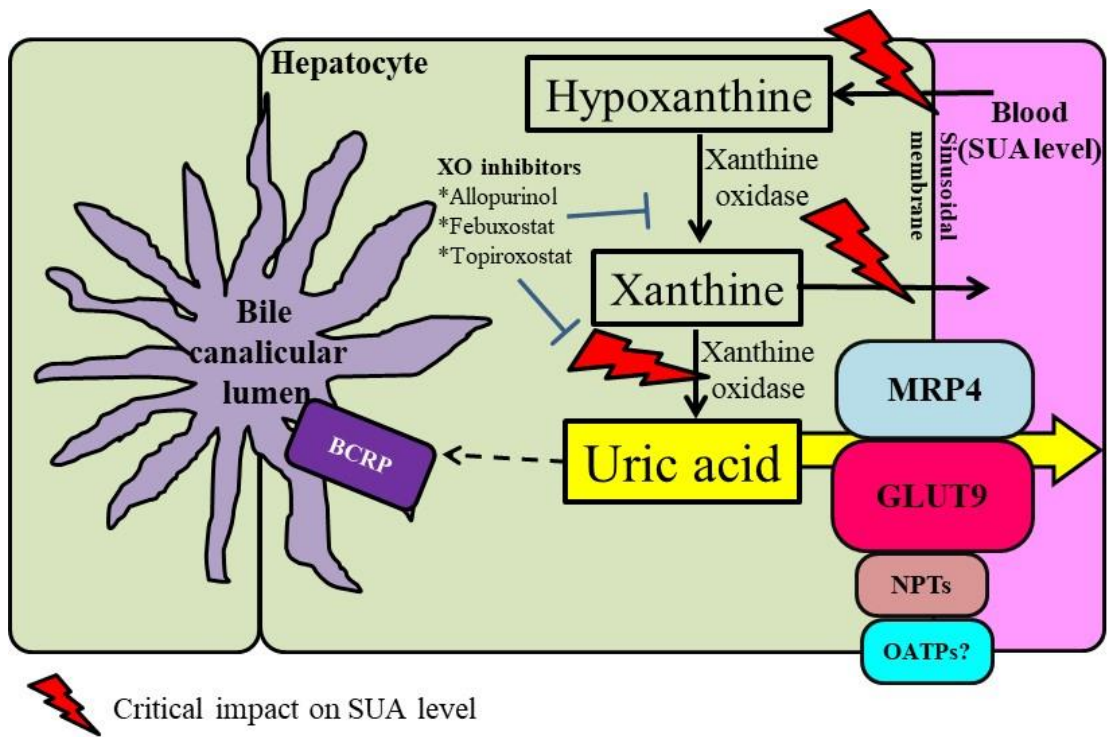


Figure 4-1 Hepatic handling of uric acid

## 第五章 参考文献

Abe K, Bridges AS, Brouwer KL. Use of sandwich-cultured human hepatocytes to predict biliary clearance of angiotensin II receptor blockers and HMG-CoA reductase inhibitors. *Drug Metab Dispos.* 2009; 37: 447-452.

Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, 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.* 1981; 78: 6858-6862.

Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouët S, Morel F, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos.* 2006; 34: 75-83.

Anzai N, Endou H. Uric acid transporters: an evolving field. *Semin Nephrol.* 2011; 31: 400-409.

Anzai N, Ichida K, Jutabha P, Kimura T, Babu E, Jin CJ, Srivastava S, Kitamura K, Hisatome I, Endou H, Sakurai H. Plasma uric acid level is directly regulated by a voltage-driven uric acid efflux transporter URATv1 (SLC2A9) in humans. 2008; 283: 32152.

Anzai N, Ichida K, Jutabha P, Kimura T, Babu E, Jin CJ, Srivastava S, Kitamura K, Hisatome I, Endou H, Sakurai H. Plasma uric acid level is directly regulated by a voltage-driven uric acid efflux transporter URATv1 (SLC2A9) in humans. *J Biol Chem.* 2008; 283: 26834-26838.

Becker BF. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med.* 1993; 14: 615-631.

Berger L, Yü TF. Renal function in gout. IV. An analysis of 524 gouty subjects including long-term follow-up studies. *Am J Med.* 1975; 59: 605-613.

Brouwer KL, Keppler D, Hoffmaster KA, Bow DA, Cheng Y, Lai Y, Palm JE, Stieger B, Evers R; International Transporter Consortium. In vitro methods to support transporter evaluation in drug discovery and development. *Clin Pharmacol Ther.* 2013; 94:95-112.

de Lau LM, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM. Serum uric acid levels and the risk of Parkinson disease. *Ann Neurol.* 2005; 58: 797-800.

Fukuda H, Ohashi R, Tsuda-Tsukimoto M, Tamai I. Effect of plasma protein binding on in vitro-in vivo correlation of biliary excretion of drugs evaluated by sandwich-cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2008; 36: 1275-1282.

Graf J, Gautam A, Boyer JL. Isolated rat hepatocyte couplets: a primary secretory unit for electrophysiologic studies of bile secretory function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984; 81: 6516-6520.

Hasegawa M, Kusuhara H, Adachi M, Schuetz JD, Takeuchi K, Sugiyama Y. Multidrug resistance-associated protein 4 is involved in the urinary excretion of hydrochlorothiazide and furosemide. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18: 37-45.



Hikita M, Ohno I, Mori Y, Ichida K, Yokose T, Hosoya T. Relationship between hyperuricemia and body fat distribution. *Intern Med.* 2007; 46: 1353-1358.

Hoffmaster KA, Turncliff RZ, LeCluyse EL, Kim RB, Meier PJ, Brouwer KL. P-glycoprotein expression, localization, and function in sandwich-cultured primary rat and human hepatocytes: relevance to the hepatobiliary disposition of a model opioid peptide. *Pharm Res.* 2004; 21: 1294-1302.

Hosomi A, Nakanishi T, Fujita T, Tamai I. Extra-renal elimination of uric acid via intestinal efflux transporter BCRP/ABCG2. *PLoS One.* 2012; 7: e30456.

Hsieh JF, Wu SH, Yang YL, Choong KF, Chen ST. The screening and characterization of 6-aminopurine-based xanthine oxidase inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2007; 15: 3450-3456.

Ichida K, Matsuo H, Takada T, Nakayama A, Murakami K, Shimizu T, Yamanashi Y, Kasuga H, Nakashima H, Nakamura T, Takada Y, Kawamura Y, Inoue H, Okada C, Utsumi Y, Ikebuchi Y, Ito K, Nakamura M, Shinohara Y, Hosoyamada M, Sakurai Y, Shinomiya N, Hosoya T, Suzuki H. Decreased extra-renal uric acid excretion is a common cause of hyperuricemia. *Nat Commun.* 2012; 3: 764

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 MF, Endou H, Sakurai H. Human sodium phosphate transporter 4

(hNPT4/SLC17A3) as a common renal secretory pathway for drugs and uric acid. *J Biol Chem.* 2010; 285: 35123-35132.

Kameyama Y, Yamashita K, Kobayashi K, Hosokawa M, Chiba K. Functional characterization of SLCO1B1 (OATP-C) variants, SLCO1B1\*5, SLCO1B1\*15 and SLCO1B1\*15+C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells. *Pharmacogenet Genomics.* 2005; 15: 513-522.

Kaya M, Moriwaki Y, Ka T, Inokuchi T, Yamamoto A, Takahashi S, Tsutsumi Z, Tsuzita J, Oku Y, Yamamoto T. Plasma concentrations and urinary excretion of purine bases (uric acid, hypoxanthine, and xanthine) and oxypurinol after rigorous exercise. *Metabolism.* 2006; 55: 103-107.

Kern A, Bader A, Pichlmayr R, Sewing KF. Drug metabolism in hepatocyte sandwich cultures of rats and humans. *Biochem Pharmacol.* 1997; 54: 761-772.

Kim KM, Henderson GN, Ouyang X, Frye RF, Sautin YY, Feig DI, Johnson RJ. A sensitive and specific liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of intracellular and extracellular uric acid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009; 877: 2032-2038.

Kim TS, Pae CU, Yoon SJ, Jang WY, Lee NJ, Kim JJ, Lee SJ, Lee C, Paik IH, Lee CU. Decreased plasma antioxidants in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2006; 21: 344-348.

Knapp CM, Constantinescu CS, Tan JH, McLean R, Cherryman GR, Gottlob I. Serum uric acid levels in optic neuritis. *Mult Scler.* 2004; 10: 278-280.

Koka RM, Huang E, Lieske JC. Adhesion of uric acid crystals to the surface of renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000; 278: 989-998.

Kooij A, Schijns M, Frederiks WM, Van Noorden CJ, James J. Distribution of xanthine oxidoreductase activity in human tissues--a histochemical and biochemical study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1992; 63: 17-23.

Kountouras J, Magoula I, Tsapas G, Liatsis I. The effect of mannitol and secretin on the biliary transport of uric acid in humans. *Hepatology.* 1996; 23: 229-233.

Link E, Parish S, Armitage J, Bowman L, Heath S, Matsuda F, Gut I, Lathrop M, Collins R. SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy—a genomewide study. *N. Engl. J. Med.* 2008; 359: 789–799.

Liu X, Chism JP, LeCluyse EL, Brouwer KR, Brouwer KL. Correlation of biliary excretion in sandwich-cultured rat hepatocytes and in vivo in rats. *Drug Metab Dispos.* 1999; 27: 637-644 (a).

Liu X, LeCluyse EL, Brouwer KR, Gan LS, Lemasters JJ, Stieger B, Meier PJ, Brouwer KL. Biliary excretion in primary rat hepatocytes cultured in a collagen-sandwich configuration. *Am J Physiol.* 1999; 277: 12-21 (b).

Matsunaga N, Wada S, Nakanishi T, Ikenaga M, Ogawa M, Tamai I. Mathematical modeling of the in vitro hepatic disposition of mycophenolic acid and its glucuronide in sandwich-cultured human hepatocytes. *Mol Pharm.* 2014; 11: 568-579.

Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev.* 2006; 58: 87-114.

Papageorgiou I, Grepper S, Unadkat JD. Induction of hepatic CYP3A enzymes by pregnancy-related hormones: studies in human hepatocytes and hepatic cell lines. *Drug Metab Dispos.* 2013; 41: 281-290.

Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, ter Borg F, Scheper RJ, Tytgat GN, Borst P, Baas F, Oude Elferink RP. A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology.* 1997; 25: 1539-1542.

Perlstein TS<sup>1</sup>, Gumieniak O, Williams GH, Sparrow D, Vokonas PS, Gaziano M, Weiss ST, Litonjua AA. Uric acid and the development of hypertension: the normative aging study. *Hypertension.* 2006; 48: 1031-1036.

Petrie JL, Patman GL, Sinha I, Alexander TD, Reeves HL, Agius L. The rate of production of uric acid by hepatocytes is a sensitive index of compromised cell ATP homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol. Metab.* 2013; 305: 1255-1265.

Reginato AM, Mount DB, Yang I, Choi HK. The genetics of hyperuricaemia and gout. *Nat Rev Rheumatol.* 2012; 8: 610-621.

Reid G, Wielinga P, Zelcer N, De Haas M, Van Deemter L, Wijnholds J, Balzarini J, Borst P. Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. *Mol Pharmacol.* 2003; 63: 1094-1103.

Rodilla F, Sanchez-Beltran MJ., Izquierdo R, Gomez-Ruiz MD., Cabo J. Inhibition of purine catabolism by benzbromarone in isolated rat liver cells. Comparison with allopurinol and probenecid. *Biochem. Pharmacol.* 1988; 37: 3561-3563.

Rollins DE, Klaassen CD. Biliary excretion of drugs in man. *Clin Pharmacokinet.* 1979; 4: 368-379.

Sahlin K, Tonkonogi M, Söderlund K. Plasma hypoxanthine and ammonia in humans during prolonged exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1999; 80: 417-422.

Shipkova M, Strassburg CP, Braun F, Streit F, Gröne HJ, Armstrong VW, Tukey RH, Oellerich M, Wieland E. Glucuronide and glucoside conjugation of mycophenolic acid by human liver, kidney and intestinal microsomes. *Br J Pharmacol.* 2001; 132: 1027-1034.

Shoda J, Inada Y, Tsuji A, Kusama H, Ueda T, Ikegami T, Suzuki H, Sugiyama Y, Cohen DE, Tanaka N. Bezafibrate stimulates canalicular localization of NBD-labeled PC in HepG2 cells by PPARalpha-mediated redistribution of ABCB4. *J Lipid Res.* 2004; 45: 1813-1825.

Sorensen LB. Role of the intestinal tract in the elimination of uric acid. *Arthritis Rheum.* 1965; 8: 694-706.

Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V, Tanner MS, Kagalwalla AF, Németh A, Pawlowska J, Baker A, Mieli-Vergani G, Freimer NB, Gardiner RM, Thompson RJ. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet.* 1998; 20: 233-238.

Susukida T, Sekine S, Nozaki M, Tokizono M, Ito K. Prediction of the Clinical Risk of Drug-Induced Cholestatic Liver Injury Using an In Vitro Sandwich Cultured Hepatocyte Assay. *Drug Metab Dispos.* 2015; 43: 1760-1768.

Tamta H, Kalra S, Mukhopadhyay AK. Biochemical characterization of some pyrazolopyrimidine-based inhibitors of xanthine oxidase. *Biochemistry (Mosc).* 2006; 71: 49-54.

Trauner M., Boyer J. L. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev.* 2003; 83: 633-671.

Tsuji A. Biopharmaceutical Studies on Molecular Mechanisms of Membrane Transport. *YAKUGAKU ZASSHI* 2002; 122: 1037-1058.

Wright RM, Vaitaitis GM, Wilson CM, Repine TB, Terada LS, Repine JE. cDNA cloning, characterization, and tissue-specific expression of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90: 10690-10694.

Xu C, Yu C, Xu L, Miao M, Li Y. High serum uric acid increases the risk for nonalcoholic Fatty liver disease: a prospective observational study. PLoS One. 2010; 5: e11578.

グラクソ・スミスクライン ザイロリック®錠 50, 100 医薬品インタビューフォーム  
2015

高尿酸血症・痛風の治療ガイドライン 第二版 2012年追補 ダイジェスト版

中外製薬株式会社 セルセプト®カプセル 医薬品インタビューフォーム 2013

## 第六章 謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご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 博士に深く感謝いたします。

実験の遂行に際してご助言を頂きました金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 准教授 中西 猛夫 博士に深く感謝いたします。

実験に際し有益なご助言をいただいた金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 助教 小森 久和博士に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり有益なご助言及び数多くのご協力をいただいた小野薬品工業株式会社 松永 憲和 博士に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり有益なご助言をいただいた金沢大学 薬物動態学研究室 關根 和真 修士、藤田 大地 博士、山田 和幸 修士、荒井 俊樹 学士、西澤 慧 修士、に深く感謝いたします。

金沢大学という新境地で巡り合え、共に研究生活での苦楽を共にし、互いに切磋琢磨することができた島田 紘明 博士をはじめ、薬物動態額研究室の諸氏に深く感謝いたします。

最後に、本研究の遂行にあたり、終始支えていただいた家族に深く感謝致します。