

論文目録

健常集団における無症候性高尿酸血症と腎機能の関連性に対する
尿酸トランスポーターABCG2の修飾的効果

【提出年月日】2023年 1月 6日

【研究分野・指導教授】薬理学・市田公美 教授

【氏名】大橋 勇紀

目次

略語一覧	4
第1章 緒論	5
第2章 研究方法	8
2-1 研究デザイン・対象者	8
2-2 本研究実施における倫理的配慮	8
2-3 データの収集	8
2-4 Genomic DNA 抽出と SNP ジェノタイピング	9
2-5 Q126X と Q141K の組み合わせによる ABCG2 の機能推定	10
2-6 統計学的解析	11
2-6-1 主要評価項目の決定	11
2-6-2 腎機能低下に対する無症候性高尿酸血症・ABCG2 の修飾効果の評価	13
2-6-3 Propensity score を用いた共変量調整	13
2-6-4 統計学的検定方法, 効果推定モデリング解析のアルゴリズム	14
2-7 使用したソフトウェア・実験材料	16
第3章 結果	18
3-1 ベースラインにおける本研究集団の臨床的特性の評価	18
3-2 腎機能低下と無症候性高尿酸血症との関連解析	22
3-3 腎機能低下と ABCG2 機能との関連解析	24

第4章 考察	27
総括	31
謝辞	34
論文目録	35
引用文献	36

略語一覧

本論文中に使用した略語は以下の通りである.

ABCG2: ATP-binding cassette subfamily G member 2

α -SMA: α -smooth muscle actin

BCRP: breast cancer resistance protein

BMI: body mass index

CKD: chronic kidney disease

eGFR: estimated glomerular filtration rate

ESRD: end-stage renal disease

FE_{UA}: fractional excretion of uric acid

GBD: global burden of disease

GFR: glomerular filtration rate

GLUT9: glucose transporter 9

GWAS: genome-wide association study

KDIGO: Kidney Disease Improving Global Outcomes

LME: linear mixed-effect

MDRD: Modification of Diet in Renal Disorder

NHANES III: The Third National Health and Nutrition Examination Survey

PCR: polymerase chain reaction

QOL: quality of life

REML: restricted maximum likelihood

SGLT2: sodium glucose cotransporter member 2

URAT1: urate transporter 1

第1章 緒論

慢性腎臓病 (CKD: chronic kidney disease) は、慢性的に進行する腎障害・腎機能低下を従来の疾患分類とは別に、腎障害の存在と糸球体濾過量 (GFR: glomerular filtration rate) に基づいて、末期腎不全 (ESRD: end-stage renal disease) や心血管疾患などのリスク因子として包括的に捉えるために 2002 年に国際的に定義された包括的概念である¹。人口構成の老齢化に伴って、透析を必要とする ESRD 患者数が著明に増加し、医療経済に多大な圧迫をしていること²、また CKD は早期発見により進展予防・治療が可能であることから、このような包括的概念が誕生し、周知されるに至っている。1950~2017 年における 195 か国を対象にした Global Burden of Disease (GBD) study では、全世界の CKD 患者数は 6 億 9750 万人と報告しており²、本邦においても CKD stage G3 (eGFR: 59-45 mL/min/1.73m²) を含めた CKD 患者・予備軍は 2000 万人以上と推算されている³。加えて、本邦の慢性透析患者数は人口 100 万人当たり 2688 人と世界的に見ても多く⁴、近年では増減が横ばいになったものの明確な減少傾向は示していない。また CKD は進行度に応じた適切な治療と療養によって、その進行を阻止し、患者の生命予後や QOL の改善に貢献する。従って、引き続き CKD や ESRD へ対応することは国民の健康を守り、逼迫する医療経済負担を軽減するうえで喫緊の課題である。

腎機能の経時的な低下は、加齢に伴う残存ネフロン数の喪失の結果として引き起こされている。CKD は多くの影響因子が複雑に絡み合う多因子複合疾患であり、加齢に伴う腎機能低下は、喫煙^{5,6}、アルコールの過量摂取⁵、肥満⁶などの環境要因や、高血圧^{7,8,9,10}、糖尿病^{10,11}、高脂血症¹²、高尿酸血症¹³⁻¹⁷などの疾患の合併によって加速することが報告されている。高尿酸血症による典型的な腎障害として、痛風腎が知られている¹⁸⁻²¹。痛風腎は腎臓の尿細管管腔内や間質に尿酸塩が析出し腎実質が障害されることで発症するが、この尿酸塩の析出は無症候期から進行している^{22,23}。また尿酸塩の析出に加えて、尿酸そのものの作用や血清尿酸値 (SUA) の上昇によるレニン-アンジオテンシン系の亢進を介した作用により、血管内皮細胞の炎症と組織の繊維化を介して腎臓内の血管障害を引き起こす²⁴⁻²⁸。これまで数多くの SUA と腎機能の関連性を調査した疫学的観察研究が実施され、その多くは SUA の上昇はその後の腎予後不良を予測することを示唆している^{13,14,17,29-31}。しかしながら、近年の臨床介入研究では、尿酸降下治療が CKD の進行を抑制しないことを報告しており^{32,33}、メタアナリシスにおいても SUA の上昇によるリスクは現状、痛風と尿路結石にのみに限定されている³⁴。

CKD を始めとする日常的慢性疾患の多くは遺伝的要因が関与しており、複数の遺伝因子が集合的に影響する。2000 年にヒトゲノムのドラフト配列が解読されたことを皮切りに、International HapMap Project³⁵、1000 Genome Project³⁶などによるゲノムバリエーションの整備や、ゲノム解析技術、デバイスの性能、大規模データを処理する情報技術の著しい躍進により、腎疾患と遺伝因子の関連性は徐々に明らかとなりつつある。特に、疾患に関与する遺伝子をゲノム上から網羅的に調べることのできる genome-wide association study (GWAS) の登場は、CKD を始めとした多因子複合疾患における一塩基多型 (SNPs: single nucleotide

polymorphisms) などの遺伝要因についての研究を急激に拡大し、腎機能に関わる多数の遺伝因子の特定を可能にした^{37,38,39}。GWASは“common disease common variant 仮説”⁴⁰に基づいており、これによって多くの疾患関連遺伝子を同定してきた。しかしながら、発見された候補遺伝子全体でも遺伝性のごく一部のみしか説明できておらず、腎機能に関連する遺伝子座は現在 308 の遺伝子座が同定されているものの、eGFR における遺伝性全体の 19.6%しか説明できていないのが現状である⁴¹。これは rare variants の存在や、非常に多数のマーカーSNPs による多重性の問題として考えられており、依然として潜在的な遺伝因子が数多く存在する。

上述の GWAS では腎機能の遺伝因子だけでなく、SUA と関連する遺伝因子も数多く発見され、その中でも尿酸の膜輸送体（トランスポーター）の重要性が見出されている。このことは、有機酸である尿酸の体内制御にはトランスポーターが必須であり、個人差が大きい SUA の遺伝的背景には、尿酸トランスポーターの変異や多型が重要な位置を占めていることを示唆している。本研究では、この尿酸トランスポーターの 1 つであり、機能低下が高尿酸血症・痛風発症のリスクとなることが知られる ATP-binding cassette subfamily G member 2/ breast cancer resistance protein (ABCG2/BCRP) に着目した⁴²⁻⁴⁵。ABCG2 はヒト乳がん細胞から発見された一次性能動輸送を行うトランスポーターであり、腎臓、小腸、肝臓など広範な組織な分布^{46,47}、広い基質認識性を有する^{48,49}。日本人における ABCG2 の非同義 SNPs のアレル頻度は高く、特に終止コドンが生じ機能欠損となる rs72552713 (c.376C>T, p.Q126X) は 2.8%、タンパク質レベルが約半分に低下する rs2231142 (c.421C>A, p.Q141K) は 31.9%と報告されている⁵⁰。特にリスクアレル頻度の高い p.Q141K については臨床的にも多様な観点から研究されており、薬物動態ではスルファサラジンの消化管吸収の上昇⁵¹、ロスバスタチンなど HMG-CoA 還元酵素阻害薬の経口投与時の薬物血中濃度－時間曲線化面積や最高血中濃度の上昇する⁵²。これらは、ABCG2 が様々な物質の細胞内から細胞外への輸送を担うこと、ABCG2 が小腸上皮細胞の管腔側膜に高発現しており efflux pump として働いていることに起因する。ABCG2 の機能低下によって基質薬物の小腸管腔内への排泄活性が減弱することで、薬物の経腸吸収が上昇することによって説明される。これらの薬剤に加え、ニューキノロン系抗菌薬であるシプロフロキサシン⁵³、抗がん剤であるカンプトテシンの誘導体であるジフロモテカンを基質とした臨床試験も報告されている⁵⁴。このように、ABCG2 は薬剤制御因子として臨床的に広く研究されており、ABCG2 の輸送活性や遺伝的要因は薬物動態を考慮するうえで重要視されてきた。

一方、ABCG2 の生理基質・生理機能として、腎臓の近位尿細管・小腸上皮において体外に排泄する方向に尿酸を輸送する^{43,55}。ABCG2 の K_m 値は 8.24 ± 1.44 mM であり、SUA (男性: 3.8 ~ 7.5 mg/dL, 228 ~ 450 μ M) と比較してもはるかに高いことが報告されている⁴³。すなわち、生理的濃度条件では飽和しない高容量性・低親和性の膜輸送を行うことが明らかとなっている。遺伝的背景においても、ABCG2 の common variants が SUA に影響を与え、p.Q141K の保有数に比例する明らかな SUA の上昇が報告されている⁴³。加えて、ハプロタイプ頻度解析により、p.Q126X と p.Q141K は同一染色体上に存在しないこと、また両変異箇所は近傍に位置し連関しないことから、p.Q126X と p.Q141K の組み合わせのパターンによっ

て推定される ABCG2 の機能低下に伴い痛風発症リスクのオッズ比が上昇することが示されている⁴³。p.Q126X と p.Q141K を除く ABCG2 の機能低下型 rare variants の頻度が非常に低いことを踏まえて、この両変異の組み合わせによる機能推定は ABCG2 の機能をおおよそ反映し、日本人集団における ABCG2 関連の様々な解析に有用であることが示されている^{42, 56, 57}。

ほとんどの哺乳類は肝臓の酵素反応で尿酸を産生・分解し SUA を調節しているが、ヒトの場合、進化の過程で尿酸分解酵素であるウリカーゼ (尿酸オキシダーゼ) を失っている⁵⁸。すなわち、ヒトにおけるプリン代謝の最終生成物は尿酸であり、生理的条件下では大部分がアニオンとして存在している尿酸の細胞間の移動、体外排泄にはトランスポーターによる膜輸送が必須である。尿酸排泄の主経路である腎臓では数多くのトランスポーターが協同的に働いており、特に尿酸排泄機構への貢献度の大きいトランスポーターとして、尿酸再吸収トランスポーターである SLC22A12 (URAT1: urate transporter 1)⁵⁹、SLC2A9 (GLUT9: glucose transporter 9)^{60, 61}、そして尿酸排泄トランスポーターである ABCG2 である。特に、ABCG2 は腎臓のみならず小腸にも高発現していること、ABCG2 の既知の基質物質との類似性から、前述した基質薬物と同様に尿酸の糞便中への排泄にも関与している可能性が考えられた。ABCG2 機能低下による高尿酸血症のメカニズムを解明するために実施された高尿酸血症患者の集団解析では、ABCG2 と尿中尿酸排泄量との関連性が調査された。ところが結果として、大方の予想に反し推定 ABCG2 機能低下に伴い、尿中尿酸排泄量が増加することが確認された⁶²。その後に行われた *Abcg2*-knockout mice を用いた *in vivo* 研究から、尿中への尿酸排泄はヒトと同様に亢進すること、また腸管への尿酸排泄量の著減を認めた⁶²。以上の結果から、ABCG2 機能低下による高尿酸血症の発症メカニズムは、腸管を中心とした腎外での尿酸排泄の低下を主体とし、これまで軽視されてきた腎外からの尿酸排泄が SUA の恒常性にとって重要な役割を果たしていることを示す発見であった。このことから ABCG2 機能低下による腎外尿酸排泄量の低下を補う尿中尿酸排泄量の増加は、尿酸産生増加型と合わせて“腎負荷型高尿酸血症”が新規に病型分類された⁶²。尿酸は高濃度、酸性尿の存在下で結晶化する。この ABCG2 機能低下による腎外経路への腸内への尿酸排泄の低下は、代償的に増加した尿中尿酸によって尿路における尿酸の結晶析出のリスクを増加する可能性がある。尿酸塩の沈着は直接的な組織障害やインフラマソームの活性化を誘導し炎症を惹起するため⁶³、CKD の危険因子と考えられている⁶⁴。また尿酸排泄に加えて、ABCG2 は生体内防御因子として 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP) に代表されるがん原生物質⁶⁵、さらに近年では代表的な尿毒症物質である Indoxyl sulfate を体外に排泄していることが報告されている⁶⁶。

以上の既知の報告から、ABCG2 は無症候性高尿酸血症と腎予後との関連性における効果修飾因子である仮説が示された。この仮説を検討するため、無症候性高尿酸血症を含む一般集団を募集し、ヒト対象の非介入研究を行った。本研究はまず、無症候性高尿酸血症の腎予後を ABCG2 の遺伝的観点から評価すること、次に ABCG2 そのものが腎機能へ与える影響度を評価することを目的として、治療介入の影響が少ない健常集団 (eGFR > 60 mL/min/1.73 m²) を対象に後ろ向きコホート研究を行った。

第2章 研究方法

2-1 研究デザイン・対象者

本研究は東京に勤務する組織職員の健康診断データを利用した後ろ向きコホート研究である。2007年から2017年間に健康診断を受けた3,250人のうち、痛風のない2,600人が本研究に参加することに同意した。同意を得た参加者は組織職員である特性上18-65歳の日本人で構成されている。本研究はABCG2または無症候性高尿酸血症と長期的な腎機能の推移との関連性を調査するため、また脱水などに起因する一時的な腎機能低下の影響を最小限とし後述する本研究のアウトカム評価の頑強性を担保するため(2-6 統計学的解析の項を参照)、血清クレアチニンの測定点が10回以上となる参加者、すなわち、9-10年間の追跡期間を確保した参加者を対象とした。観察期間が9年未満(本研究では扱わない参加同意取得者)と9-10年間の観察期間を確保した観察対象者の選定における選択バイアスを評価するため、それぞれの集団特性を比較した。なお、本研究の除外基準として、SUAと腎機能の因果推論の交絡となりうる腸炎患者、肝炎患者、腎症患者、CKD stage G3以降の患者を研究開始時に標本から除外した。したがって、本研究の想定する母集団は正常な腎機能($eGFR \geq 60$ mL/min/1.73 m²)を有する一般集団である。

2-2 本研究実施における倫理的配慮

本研究はヘルシンキ宣言に準拠した研究倫理指針に則り、研究への参加者の保護に十分に留意して実施された。調査への協力は患者の自由意思であり、例え同意を得なくても何ら不利益を受けることはないこと、参加後もいつでも撤回でき、その場合にも不利益を受けないことを保証すること、得られた情報は本研究の調査目的以外に使用しないことを伝え、書面にてインフォームド・コンセントを得ている。本研究は東京薬科大学の施設審査委員会(IRB)/倫理委員会(承認番号17-19)および東京慈恵会医科大学(承認番号29-143(8759))により承認されており、東京国税局の代理人審査は、東京慈恵会医科大学の施設審査委員会(IRB)/倫理委員会が行った。

本研究では、採血以外の医療行為は含まれず参加者に掛かる侵襲負担は軽微であり、安全性は確保されていることから参加・不参加による不利益は生じない。またプライバシーや人権の保護を最大限配慮するため、「個人情報の取得・利用並びに第三者提供に関する細則」を遵守し試料(データ含む)を連結番号に匿名化したのち、個人を識別できないような形で解析を行った。情報の公開に際しても、個人が特定されないような統計要約量としている。

2-3 データの収集

本研究のデータセットは年度ごとに実施される健康診断のデータを基に作成しているため、臨床データの収集は1年単位で行った。8-12時間の絶食後に採血・採尿を行い、血算・生化

学検査・尿定性検査によって得られた臨床的特徴量を使用した。腎機能の指標である eGFR を算出する際、以下の式を用いた。

$$eGFR \text{ (mL/minute/1.73 m}^2 \text{ body surfase area)} \\ = 194 \times \text{serum creatinine level}^{-1.094} \times \text{age}^{-0.287} \text{ (if female, } \times 0.739 \text{)}$$

この推算式は従来の MDRD 式を基礎として、日本腎臓学会が日本人向けの新たな eGFR 推算式として 2009 年に提唱したものである⁶⁷。加えて eGFR から腎機能を Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) ガイドラインに従い、腎機能正常 (G1: eGFR \geq 90 mL/min/1.73m²), 腎機能軽度低下 (G2: eGFR 60~89 mL/min/1.73m²) に分類した (Figure 1)⁶⁸。高尿酸血症の診断基準として、ベースラインでの SUA が 7.0 mg/dL を超えた対象者を無症候性高尿酸血症群として扱った⁶⁹。また観察終了時 (本研究は後ろ向き追跡の為、リクルート時) に自己申告制のアンケートを実施し、尿酸降下薬の服用の有無を集計した。

Prognosis of CKD by GFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012				Persistent albuminuria categories Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/ 1.73 m ²) Description and range	G1	Normal or high	\geq 90			
	G2	Mildly decreased	60-89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45-59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30-44			
	G4	Severely decreased	15-29			
	G5	Kidney failure	<15			

Figure 1. Prognosis of chronic kidney diseases by eGFR and albuminuria categories: KDIGO 2012. Green: low risk (if no other markers of kidney disease, no CKD); Yellow: moderately increased risk; Orange: high risk; Red, very high risk. Figure 1 has been excerpted from reference 68.

2-4 Genomic DNA 抽出と SNP ジェノタイピング

全血サンプル 5 mL に 0.2% Polyoxyethylene (10) Octylphenyl Ether (Triton X-100) リン酸緩衝生理食塩水 10mL, を加え遠心分離を行い (3500 rpm, 25°C, 15 min), 有核細胞 (白血球) を回収した。回収した白血球に Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% SDS) 400 μ L, Proteinase K recombinant Solution 12 μ L を添加し, 55°C, 8 hour 以上インキュベートし細胞を溶解した。TE saturated Phenol 500 μ L で genomic DNA を抽出後, 2-Propanol, 70% Ethanol で抽出した genomic DNA を精製後, Tris/EDTA (TE) buffer 200 μ L に溶解した。

抽出した genomic DNA 40 ng に対し THUNDERBIRD Probe PCR Mix kit を用いた Real-time

PCR (polymerase chain reaction) を行い, TaqMan Assay による SNP Genotyping を実施した. Positive control として Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer を用いた Dye Terminator Sequencing を行い, 事前に SNPs が同定された DNA サンプルを使用した. Genomic DNA 抽出, SNP Genotyping はすべてコード化されたサンプルを用いて盲検下で行われた. TaqMan Assay, Dye Terminator Sequencing に使用した Primer, TaqMan probe の塩基配列は **Table 1** に示した.

Table 1. Primers and TaqMan Probes Sequences.

Gene / SNP		5'-3' sequence
<i>ABCG2</i> / rs72552713 (<i>Q126X</i>)	Sequencing primer	GCAAGGAAAGATCCAAGTGG
	Forward primer	GCAAGGAAAGATCCAAGTGG
	Reverse primer	ATCAGCCAAAGCACTTACCC
	TaqMan probe (wild type)	HEX - TACTTGTACCACG - BlackFQ
	TaqMan probe (mutation)	FAM - TTACTTATACCACG - BlackFQ
<i>ABCG2</i> / rs2231142 (<i>Q141K</i>)	Sequencing primer	AGGATGATGTTGTGATGGGC
	Forward primer	AGGATGATGTTGTGATGGGC
	Reverse primer	ATTACCTTGGAGTCTGCCAC
	TaqMan probe (wild type)	FAM - AACTTACAGTTCTCA - BlackFQ
	TaqMan probe (mutation)	HEX - ACTTAAAGTTCTCAGC - BlackFQ

Table footnote: Primer and probe sequences used for TaqMan assays of 2 common single nucleotide polymorphisms of *ABCG2* (rs72552713 and rs2231142) were shown. The five-prime and three-prime ends are labeled with fluorescent dyes (HAM or FAM) and have the quencher (BlackFQ) attached, respectively. Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphisms; *ABCG2*, ATP-binding cassette subfamily G member 2.

2-5 Q126X と Q141K の組み合わせによる ABCG2 の機能推定

ABCG2 の common variants である rs72552713 (c.376C > T, p.Q126X, risk allele: T) と rs2231142 (c.421C > A, p.Q141K, risk allele: A) の組み合わせによって *ABCG2* の機能を推定した. p.Q126X は *ABCG2* 機能を欠失し, p.Q141K は *ABCG2* 機能を 50%程度まで低下させる. p.Q126X と p.Q141K の Minor allele frequency (MAF) はそれぞれ 2.8%, 31.9%と日本人集団において高頻度で認められる⁵⁰. この2つの SNPs は同一染色体上に存在せず, また近傍であるため互いに linkage がないため, 両 SNPs のそれぞれが *ABCG2* 機能低下の独立した因子である. また, 他の高頻度で認められる SNPs の rs2231137 (c.34G>A, p.V12M, risk allele: A) は機能低下を起こさず, その他の変異頻度は MAF > 1.0%と極めて低いことから, 日本人集団における *ABCG2* 機能の遺伝的要因としての p.Q126X と p.Q141K の2つの変異によって大まかな機能推定が可能である^{42, 56, 57}. この2つの SNPs の組み合わせにより, *ABCG2* 機能を 100%, 75%, 50%, 25%, 0%の5つの段階的なカテゴリーに区分が可能である. 本研究で

は ABCG2 の重度機能低下の例数を十分に確保するため、ABCG2 機能 50%、25%の対象者を ABCG2 機能 50%以下として統合しカテゴライズした (Figure 2).

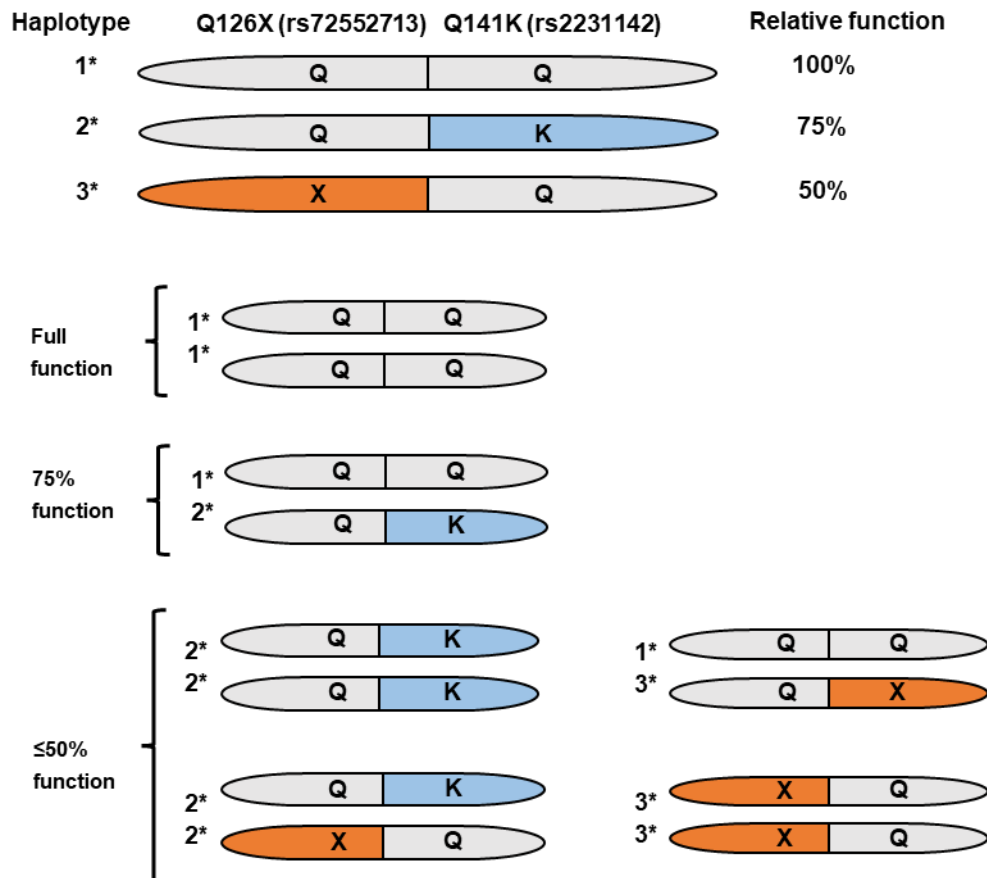


Figure 2. Estimation of ABCG2 function using genotype combination of two common single nucleotide polymorphisms. The ABCG2 function was evaluated based on combining rs72552713 (c.376C > T, p.Q126X, risk allele: T) and rs2231142 (c.421C > A, p.Q141K, risk allele: A). All participants were classified into ABCG2 100%, 75%, 50% functional groups by the genotype combination.

2-6 統計学的解析

2-6-1 主要評価項目の決定

本研究は腎機能の経時的な推移と無症候性高尿酸血症、ABCG2 との関連性を評価するために計画された腎領域の疫学研究である。通常、疫学研究では因果関係を推論するため重要なクリニカルエンドポイントを予測する予後因子を検討するために実施される。腎臓疫学における真のクリニカルエンドポイントは腎死であり、腎代替療法や腎移植への導入が用いられてきた。しかしながら、この真のエンドポイントの発生頻度のそもそもの低さや、一般的に長い時間経過の末に起こるイベントゆえに大規模なサンプルサイズや長期のフォローアップ

が必要であり臨床試験を実施するハードルは高い⁷⁰。そのため、腎領域での臨床研究は他領域と比較して著しく少ないのが現状である⁷¹。

このような問題点から、真のクリニカルエンドポイントを代替し短期間で観測可能な「サロゲートエンドポイント」が模索されてきた。National Institutes of Health のメンバーを中心とした Biomarkers Definitions Working Group により、サロゲートエンドポイントは「A biomarker that is intended to substitute for a clinical endpoint. A surrogate endpoint is expected to predict clinical benefit (or harm or lack of benefit or harm) based on epidemiologic, therapeutic, pathophysiologic, or other scientific evidence.」と定義されている⁷²。すなわち、サロゲートエンドポイントは (i) 臨床的結果の関連に生物学的合理性が認められること、(ii) 臨床的結果の予後を予測する上で有益であると疫学研究によって示されていること、(iii) 臨床試験のサロゲートエンドポイントに対する効果が臨床的效果に対応していること、の条件を満たす科学的根拠に基づいたバイオマーカーである必要がある。腎領域の臨床研究においては、KDIGO が **Table 2** に示したサロゲートエンドポイントを提案している⁷³。本研究の対象集団は正常な腎機能 (CKD stage G1 or G2; eGFR ≥ 60 mL/min/1.73 m²) を有する一般集団であることから比較的線形に腎機能の低下を呈すると予測されたため、本研究のサロゲートエンドポイントを 1 年ごとに反復測定された eGFR から最小二乗法に基づき算出した eGFR slope とした。eGFR slope の算出において、脱水などによる見かけ上の eGFR の変動や腎機能の一過性の急性変化の影響を最小限にするため、本研究では eGFR の反復測定点が 10 時点以上 (追跡期間 9-10 年) の研究参加者に限定した。また、副次的なサロゲートエンドポイントとして、追跡開始時と観察終了時から算出した eGFR 低下率 (%) を用いた。追跡期間が 9 年未満の参加者を選択的に除外したことにより selection bias が発生する可能性も否定できない。したがって、本研究で用いた一般集団 (追跡期間 9-10 年) と追跡期間を理由に除外した除外集団 (追跡期間 >9 年) の集団特性を比較し、selection bias が影響していないことを確認した。

Table 2. Suggested outcomes in measuring kidney disease status in randomized trial.

CKD stage	Slow progression of CKD	Rapid progression of CKD ^a
Early stage: CKD G1-G3a (eGFR ≥ 45 mL/min/1.73 m ²)	Slope of mGFR or eGFR, or Surrogate outcomes ^b , or Combinations of outcomes	30-40% decline in eGFR using repeat measurements to rule out transient acute effects
Late stage: CKD G3b-G5 (eGFR < 45 mL/min/1.73 m ²)	End-stage kidney disease or 30-40% decline in eGFR ^c	End-stage kidney disease or doubling of serum creatinine level.

Table footnote: (a) For example, in patients with macroalbuminuria. (b) Surrogates may include measures of activity of disease (e.g., in lupus nephritis) or kidney structure (e.g., in adult polycystic kidney disease). (c) The added value of eGFRs outside the routine study visit schedule has not yet been demonstrated and they may be unnecessary. Abbreviation: CKD, chronic kidney disease; eGFR, estimated glomerular filtration rate; mGFR, measured glomerular filtration rate. **Table 2** has been excerpted from reference 73.

2-6-2 腎機能低下に対する無症候性高尿酸血症・ABCG2の修飾効果の評価

本研究は ABCG2, 無症候性高尿酸血症, 腎機能の 3 つの因子の関連性を総合的に評価することを目的に行われた追跡研究である. この 3 因子のうち, ABCG2 は尿酸排泄トランスポーターとして複数の疫学研究から SUA や痛風との関連性が認められており^{42-44, 56, 57}, 研究計画段階において多重共線性の問題から ABCG2 と SUA を同一のモデルに組み込むことが困難であることが予想された. また, CKD の病期によって腎機能の低下速度が異なり linear な変化を呈さない可能性も考えられた. そこで, 推定 ABCG2 機能カテゴリー・CKD stage ごとにサブグループを作成し, それぞれのサブグループで無症候性高尿酸血症集団, 正常 SUA 集団の eGFR slope を比較した.

また, 腎機能低下に対する ABCG2 の修飾効果の評価することを目的として, ベースラインの CKD stage と痛風・高尿酸血症の治療目標値である SUA (6.0 mg/dL) を cut-off point として再度サブグループを作成した. 作成したサブグループにおいて, 観察開始から終了までの eGFR 変化率 (%) を算出し, 比較した. また eGFR 変化率に対し ABCG2 が修飾効果を与えたと考えられるサブグループについては, アウトカムを eGFR slope に変更し再度比較する感度分析を実施し, 結果についての頑強性を判断した.

2-6-3 Propensity score を用いた共変量調整

本研究は無作為割付ではなく, CKD stage や SUA, ABCG2 の推定機能で事後的にサブグループ割付を行った. 従って, 評価項目である eGFR slope や eGFR 変化量に影響を与える共変量や交絡要因の情報を用いた共変量調整を行う必要があった. 本研究でリクルートした参加者は男女を含む 18-65 歳で構成された組織職員であり, 男女比は均等ではなく年齢の分散も大きい. また, サブグループの区分基準を CKD stage と SUA に設定することにより, 年齢や性別がサブグループごとに偏ることが想定された. 腎機能低下に対する無症候性高尿酸血症の修飾効果の検討においては, これらの背景因子に加え, 腎機能と高尿酸血症の関連性について交絡となりうる肥満の体格指標である BMI, またベースラインでの eGFR を調整因子とした.

ABCG2 は尿酸排泄トランスポーターであり, 既知の報告からも ABCG2 遺伝子と SUA の関連性は明確である⁴²⁻⁴⁴. この強い関連性により, SUA によってサブグループを作成する分割法のみでは, 分割後にも ABCG2 による SUA への影響が残存する可能性があった. 従って, 腎機能低下に対する ABCG2 の修飾効果の検討においては, 上述の共変量に加えてベースラインでの SUA も調整因子とした.

共変量調整は propensity score paired matching を用いて, ベースラインで類似した共変量を有する参加者同士をマッチングした. Propensity score とは, 複数の交絡要因を複合的に評価した確率変数である. 曝露群と対象群のそれぞれからこの変数が最も近似する被験者を抽出することで交絡による影響を最小限となるよう調整することが可能である. この propensity

score は交絡と考えられる因子を独立変数、割付したい群間を従属変数とした多重ロジスティック回帰モデルから算出した。またマッチングのアルゴリズムとして、曝露群・対象群の propensity score の差分の合計が最小となるようにペアを作る optimal paired matching (one-to-one or fixed ratio matching) 法を用いて実施した。Optimal paired matching ではキャリパー幅としてロジット変換した propensity score の標準偏差に 0.20 を乗じた値を設定した⁷⁴。Propensity score paired matching 前後の共変量のバランスについては、それぞれ標準化差スコアを比較し、評価した。

2-6-4 統計学的検定方法、効果推定モデリング解析のアルゴリズム

本研究で用いた統計学的検定、モデリング解析については **Table 3** に要約した。p.Q126X と p.Q141K の2つの変異によって推定された ABCG2 の機能は、ABCG2 機能 100%、ABCG2 機能 75%、ABCG2 機能≤50%と3つのカテゴリーに区分されている。この段階的に区分された ABCG2 機能と連続変数との関連性は two-tailed Jonckheere-Terpstra test によって傾向検定を行った。この検定によって、推定 ABCG2 機能と研究参加者の特性との正または負の関連性の有無や統計学的有意性を確認した。推定 ABCG2 機能と名義尺度 (2 値変数) の変数との関連性については Cochran-Armitage trend tests によって傾向検定を行った。尚、追跡期間中に発生した eGFR の欠損値については最小二乗法による regression imputation によって補完し、得られる eGFR slope に影響がないように考慮した。

eGFR slope の評価については、無症候性高尿酸血症集団と正常 SUA 集団との比較、また推定 ABCG2 機能カテゴリー間の比較を行うことを目的として、最小二乗法に基づく線形混合効果モデル (Linear mixed-effect model) によるモデリング解析を行った。線形混合効果モデルとは固定効果に加え、参加者間の特性をモデル内に変量効果として組み込むことが可能であり、固定効果しか用いない線形回帰モデルよりもより robust なモデル解析である。固定効果とは、研究計画時にあらかじめカテゴリー化をすることが可能な変数 (本研究では無症候性高尿酸血症の判別、ABCG2 機能推定によるカテゴリー化) であり、変量効果とはランダムサンプリングによって母集団から抽出する際に発生する変数 (参加者の特性など) であり、サンプリングが完了するまでは未知の変数である。本研究で使用した LME モデルでは、追跡期間と反復測定した eGFR との線形関係に対し、無症候性高尿酸血症と正常 SUA、また推定 ABCG2 を固定効果、研究参加者ごとの切片と eGFR slope を変量効果として混合効果モデル内に組み込んだ。無症候性高尿酸血症集団と正常 SUA 集団、また推定 ABCG2 機能グループの群間比較の指標として、eGFR slope と固定効果の交互作用を算出し、統計学的有意差を確認した。本研究で用いた LME モデルは以下の式で表され、共分散構造は変量効果の分散と誤差分散に基づく分散成分構造である。

$$Y = X\beta + Z\gamma + \varepsilon$$
$$\gamma \sim N(0, \sigma^2 D(\theta)), \varepsilon \sim N(0, \sigma^2 I_n)$$

Y: response vector.

X and Z: design matrix for fixed effect (n×p matrix) and random effect (n×s matrix).

β and τ: fixed effect parameter for X and random effect parameter for Z.

ε: error vector (n×1 vector, actual values are not observed.).

D(θ) and I_n: matrix of variance of random effect (s×s matrix) and identity matrix (n×n matrix).

変量効果の推定には、制限付き最尤法 (REML: Restricted maximum likelihood) 推定法を用いて計算した。REML 法では分散成分のみが含まれ、LME モデル内の変量効果のパラメータを推定する。βが一様な変則分布であることを仮定して以下の式で示した尤度 P(Y|β, θ, σ²) について積分したものが制限付き尤度である。

$$P(Y|\theta, \sigma^2) = \int P(Y|\beta, \theta, \sigma^2)P(\beta)d\beta = \int P(Y|\beta, \theta, \sigma^2)d\beta \\ P(\beta|Y, \hat{\theta}_R, \hat{\sigma}_R^2)$$

このアルゴリズムでは、θに関して最大化した $\hat{\theta}_R$ を、σ²に関して最大化した $\hat{\sigma}_R^2$ を求め、事後分布に関する期待値を算出することにより固定効果パラメータ β を推定する。REML 法は固定効果の推定によって失われる自由度を考慮することができるため、変量効果の分散を推定するバイアスを縮小することが可能であり、変量効果の外れ値に影響されにくくこの点からも一般線形回帰分析よりも robust である。上述の理由から、本研究の eGFR slope の評価手法として REML 法に基づく LME モデルを選択した。このモデルは、固定効果を追跡時間と無症候性高尿酸血症または ABCG2 機能低下、変量効果をランダム切片とランダム勾配と設定している。この混合効果モデルを用い、追跡期間における eGFR slope, 固定効果の交互作用を確認した。

Table 3. Summary of the analytical approach to investigate the relationship between asymptomatic hyperuricemia/SUA, ABCG2 function, and age-dependent decline in kidney function.

Comparisons of Age-dependent Decline in Kidney Function Between Asymptomatic Hyperuricemia and Normouricemia.

Predictor	Baseline SUA (SUA > 7.0 mg/dL or not)
Outcome	Repeated measures of eGFR
Approaching	Propensity score pair matching. Purpose: Adjustment of the covariables. Matched variables: Age, gender, BMI, and eGFR at baseline. Caliper width: 0.2 of the standard deviation of the logit of the propensity score. Algorithm: One-to-one optimal paired matching. Linear mixed-effect model analysis.

Purpose: To compare the declines in kidney function between SUA > 7.0 mg/dL or not.
 Estimation method: Restricted maximum likelihood method.
 Subjects: Asymptomatic hyperuricemia and an equal number of matched normouricemia.
 Subgroup: Estimated ABCG2 functional group (ABCG2 functional: full, 75%, and ≤50%).

Exploration of Condition in Which ABCG2 Modifies Age-Dependent Decline in Kidney Function.

Predictor Estimated ABCG2 function
Outcome Categorized in change in eGFR from baseline to the end of observation: <10%, 10-20%, 20-30%, and >30% decline in eGFR
Approaching **Subgrouping by the therapeutic target level of hyperuricemia and CKD stage.**
 Purpose: To explore the condition in which ABCG2 modifies the decline in kidney function.
 Subgroup 1 (n = 448): eGFR ≥ 90 ml/min/1.73 m² and SUA ≥ 6.0 mg/dL
 Subgroup 2 (n = 722): eGFR ≥ 90 mL/min/1.73 m² and SUA < 6.0 mg/dL
 Subgroup 3 (n = 406): eGFR 60-89 mL/min/1.73 m² and SUA ≥ 6.0 mg/dL
 Subgroup 4 (n = 309): eGFR 60-89 mL/min/1.73 m² and SUA < 6.0 mg/dL

Evaluation for Association Between ABCG2 Function and Age-Dependent Decline in Kidney Function.

Predictor Estimated ABCG2 function
Outcome Repeated measures of eGFR
Approaching **Propensity score pair matching.**
 Purpose: Adjustment of the covariables.
 Matched variables: Age, gender, BMI, eGFR, and SUA at baseline.
 Caliper width: 0.2 of the standard deviation of the logit of the propensity score.
 Algorithm: One-to-two optimal paired matching.
Linear mixed-effect model analysis.
 Purpose: To compare the declines in kidney function between the estimated ABCG2 functional group.
 Estimation method: Restricted maximum likelihood method.
 Subjects: Unadjusted or adjusted participants in Subgroup 3.

Table footnote: Abbreviations: SUA, serum urate concentration; BMI, body mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate.

2-7 使用したソフトウェア・実験材料

統計解析ソフトウェア

- JMP Pro 15 (SAS institute Inc., North Carolina, USA)
- R for Windows GUI front-end 3.6.3 (Comprehensive R Archive Network)
- Microsoft Excel (Microsoft Corp., Washington, DC, USA)

試薬・機器類 (品名: 品番, 提供元)

- 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol: 207-06275, Wako, Osaka
- Polyoxyethylene (10) Octylphenyl Ether (Triton X-100): 160-24751, Wako, Osaka

- 0.5M Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA): 311-90075, Wako, Osaka
- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS): 194-12841, Wako, Osaka
- Proteinase K recombinant Solution: 161-28701, Wako, Osaka
- TE saturated Phenol: 319-90093, Wako, Osaka
- 99.5% Ethanol: 057-00456, Wako, Osaka
- 2-Propanol: 166-04836, Wako, Osaka
- THUNDERBIRD Probe qPCR Mix kit: QPS-101, TOYOBO, Osaka
- Fluorescent labeled Probe: Technologies, USA
- Origo DNA primer: Eurofins Scientific, Grand Duchy of Luxembourg
- Brilliant Dye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1: BRD3-100, NIMAGEN, UK
- Prime Star GXL: R045A, TakaraBio, Siga
- QIAquick Gel Extraction Kit: 28706, Qiagen, USA
- PikoReal Real-Time PCR System (96-well block format): Thermo Fisher Scientific, Commonwealth of Massachusetts, USA
- Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer: Thermo Fisher Scientific, Commonwealth of Massachusetts, USA

第3章 結果

3-1 ベースラインにおける本研究集団の臨床的特性の評価

Figure 3 は本研究の解析フローを示す。本研究への参加に同意した痛風のない 2,600 人のうち、追跡期間 9 年未満の参加者 638 人が除外された。追跡期間によるスクリーニングによって選択バイアスが発生する可能性が潜在する。この潜在的選択バイアスの有無を評価した (**Table 4**)。本研究のデータセットは組織職員の健康診断データに基づくため、勤続年数による脱落により年齢にわずかな差が確認されたものの、おおむね均一なデータ分布であった。その後、ベースラインでのスクリーニングで腸炎患者 19 人、肝炎患者 13 人、腎症患者 11 人、またベースラインで eGFR が 60 mL/min/1.73 m²を下回っていた参加者 34 人を除外した。従って、本研究の対象集団は全数として 1,885 人が登録された。

Table 4. Population characteristics in participants of 9-10 years observation period and < 9 years.

Characteristics	Observational period 9-10 years (n = 1,962)	Observational period < 9 years (n = 638)	D
Age (y)	33.4 ± 9.2	29.8 ± 7.4	0.305
Male, n (%)	1662 (85.6%)	520 (78.9%)	0.124
Baseline eGFR (mL/min/1.73 m²)	97.4 ± 20.2	94.0 ± 15.5	0.134
Baseline CKD stage			
Normal function (eGFR ≥ 60)	1184 (61.0%)	379 (57.5%)	0.050
CKD stage G2 (eGFR = 89-60)	757 (39.0%)	280 (42.5%)	-0.050
Baseline SUA (mg/dL)	5.8 ± 1.4	5.5 ± 1.3	0.157
Hyperuricemia (SUA > 7.0 mg/dL)	326 (16.8%)	76 (11.5%)	0.108
Estimated ABCG2 function			
Full function	941 (48.5%)	325 (49.3%)	-0.011
75% function	767 (39.5%)	252 (38.2%)	0.019
≤50% function	233 (12.0%)	82 (12.5%)	-0.011

Table footnote: Values represent mean ± standard deviation. Abbreviations (conversion factors for units): BMI, body mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate; SUA, serum urate concentration (mg/dL to μmol/L, ×59.48). *D* represents standardized differences between participants of 9-10 years observation period and < 9 years. Standardized differences were calculated by the following formula; (1) Standardized difference score (continuous variables) = $(X_1 - X_2) / (S_1^2 + S_2^2)^{1/2}$, where X_1 and X_2 are sample means, and S_1^2 and S_2^2 are the variances. (2) Standardized difference score (nominal variables) = $(P_1 - P_2) / [P_1(1 - P_1) + P_2(1 - P_2)]^{1/2}$, P_1 and P_2 are the percentage.

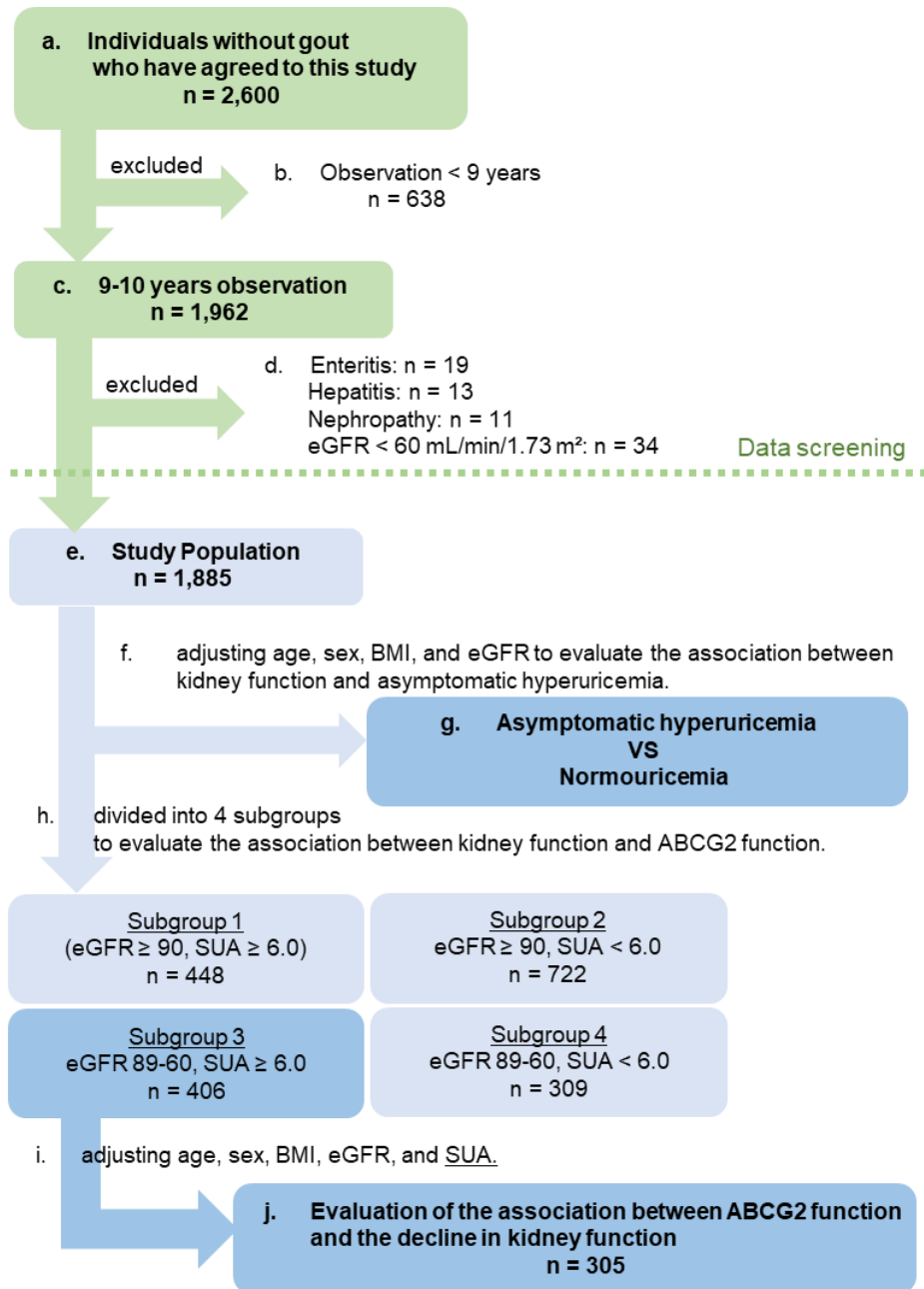


Figure 3. Flowchart for clinical biostatistics. (a) We surveyed the health examination database of 2,600 organization employee individuals without gout. (b, c) We selected 1,962 participants' datasets to screen for long-term observation in which 9-10 years of tracking data were available. (d, e) Dataset for this observational study was used except for individuals with enteritis, hepatitis, nephropathy, or kidney impairments (eGFR < 60 mL/min/1.73 m²) at entry. (f) Propensity score derived from BMI, age, sex, and eGFR at baseline was used for adjustment between asymptomatic hyperuricemia and normouricemia. (g) The comparison of age-dependent eGFR declines between asymptomatic hyperuricemia (serum urate concentration [SUA] > 7.0 mg/dL) and normouricemia. (h) Both CKD stages and cut-off SUA 6.0 mg/dL, the therapeutic target level for hyperuricemia, separated all participants into four subgroups. (i) Propensity score derived from SUA in addition to BMI, age, sex,

and eGFR at baseline was used for adjustment between ABCG2 functional groups. (j) The evaluation of the association between ABCG2 function and age-dependent declines in kidney function included 305 men.

ベースライン調査として、登録された参加者 1,885 人全数を推定 ABCG2 機能ごとに 3 つのカテゴリー (推定 ABCG2 機能: full, 75%, ≤50%) に分類した (Table 5,6). 血液検査・尿検査のデータを集計し、それぞれの ABCG2 機能カテゴリーごとに平均値と標準偏差に要約した (Table 7). 登録された参加者 (n = 1,885) の p.Q126X, p.Q141K の MAF は、それぞれ 1.7% と 28.7% であった。参加者 1,885 人の平均年齢は 33.1 ± 9.0 歳、男性比率は 85.4%、平均追跡期間は 9.8 ± 0.4 年、ベースラインでの eGFR は 98.0 ± 19.6 mL/min/1.73 m² (eGFR ≥ 90 mL/min/1.73 m², n=1170, eGFR < 90 mL/min/1.73 m², n=715) (mean ± standard deviation) であった。本研究に登録された参加者の無症候性高尿酸血症の有病率は 16.5% (311/1,885 人) であり、そのうち 72.7% (226/311 人) は SUA 7.1-8.0 mg/dL と比較的軽症例であった。リクルート時に集計した個人回答型アンケートから、尿酸降下薬を服用していたのは 99 人 (5.3%) であり、このうち 37 人の服用者は治療目標値 (SUA < 6.0 mg/dL) に到達していた。ABCG2 推定機能の低下と無症候性高尿酸血症の有病率との明らかな関連性を認めた (p for trend < 0.001). また、推定 ABCG2 機能 100%, 75%, ≤50% カテゴリーの SUA はそれぞれ 5.7 ± 1.3 mg/dL, 5.8 ± 1.4 mg/dL, 6.1 ± 1.4 mg/dL と有意な上昇傾向を示した (p for trend < 0.001).

Table 5. Summary of frequency of rs72552713 and rs2231142 in the study population (n = 1,885).

rs number	Change in DNA sequence	AA change	MAF
rs72552713	C376T	Q126X	1.7%
rs2231142	C421A	Q141K	28.7%

Table footnote: Abbreviations: AA, amino acid; MAF, minor allele frequency.

Table 6. Summary of classification into estimated ABCG2 categories using a combination of rs72552713 and rs2231142 in the study population (n = 1,885).

Estimated ABCG2 category	Number	Percentage
Full function	916	48.6%
75% function	747	39.6%
≤50% function	222	11.8%

Table footnote: The estimated ABCG2 category was determined according to the pattern of rs72552713 and rs2231142 (see “Method section”).

Table 7 Summary of baseline clinical characteristics (n = 1,885).

Characteristics: reference ranges	Estimated ABCG2 function				P for trend
	Total (n = 1,885)	Full (n = 916)	75% (n = 747)	≤50% (n = 222)	
Basic information					
Age (y)	33.1 ± 9.0	32.7 ± 8.7	33.5 ± 9.3	33.5 ± 9.1	0.1
Male (%)	1,610 (85.4%)	788 (86.0%)	625 (83.7%)	197 (88.7%)	0.9
Observation duration (y)	9.8 ± 0.4	9.8 ± 0.4	9.9 ± 0.3	9.9 ± 0.4	0.3
Physical information					
SBP (mmHg)	125.2 ± 16.5	125.5 ± 16.7	125.1 ± 16.4	124.2 ± 16.2	0.3
DBP (mmHg)	76.2 ± 11.4	76.2 ± 11.4	76.5 ± 11.2	75.7 ± 12.0	0.8
BMI (kg/m ²)	22.7 ± 3.5	22.7 ± 3.4	22.7 ± 3.6	22.7 ± 3.6	0.8
Blood parameters					
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	98.0 ± 19.6	98.4 ± 19.3	98.2 ± 20.1	96.1 ± 19.1	0.1
WBC: 8.6-3.3 (10 ³ per μL)	6.0 ± 1.7	6.0 ± 1.7	6.0 ± 1.7	5.8 ± 1.6	0.1
RBC: male 5.55-4.35, female 4.92-3.86 (10 ⁶ per μL)	4.84 ± 0.40	4.85 ± 0.41	4.83 ± 0.37	4.89 ± 0.40	0.9
PLT: 348-158 (10 ³ per μL)	240 ± 52	243 ± 55	239 ± 49	235 ± 49	0.05
TP: 8.1-6.6 (g/dL)	7.4 ± 0.4	7.4 ± 0.4	7.4 ± 0.4	7.4 ± 0.4	0.9
AST: 30-13 (IU/L)	23 ± 9	23 ± 10	23 ± 8	23 ± 9	0.9
ALT: male 42-10, female 23-7 (IU/L)	25 ± 19	25 ± 18	25 ± 19	25 ± 19	0.9
γ-GTP: male 64-13, female 32-9 (IU/L)	41 ± 42	40 ± 42	41 ± 42	40 ± 40	0.9
ALP: 322-106 (IU/L)	205 ± 56	206 ± 58	204 ± 56	205 ± 52	0.6
TG: 248-142 (mg/dL)	105 ± 92	106 ± 94	105 ± 94	99 ± 77	0.7
TCh: 248-142 (mg/dL)	192 ± 35	191 ± 34	194 ± 36	193 ± 32	0.07
HDL-Ch: 90-38 (mg/dL)	63 ± 15	63 ± 15	64 ± 16	64 ± 14	0.3
LDL-Ch: 163-65 mg/dL	113 ± 30	112 ± 30	114 ± 31	113 ± 31	0.3
BUN: 20-8 mg/dL	13 ± 3	13 ± 3	13 ± 3	13 ± 3	0.6
SUA: male 7.8-3.7, female 5.5-2.6 (mg/dL)	5.8 ± 1.4	5.7 ± 1.3	5.8 ± 1.4	6.1 ± 1.4	<0.001
Hyperuricemia (SUA > 7.0 mg/dL)	311 (16.5%)	115 (12.6%)	133 (17.8%)	63 (28.4%)	<0.001
Blood glucose: 109-73 (mg/dL)	92.1 ± 16.9	92.2 ± 18.5	92.5 ± 16.4	90.7 ± 10.4	0.7
HbA1c: 6.0-4.9 (%)	5.3 ± 0.6	5.3 ± 0.6	5.3 ± 0.5	5.2 ± 0.4	0.8
Urine parameters (%)					
Urine occult blood					0.5
Negative	1,816 (97.4%)	884 (97.8%)	717 (96.8%)	215 (97.7%)	
Positive	49 (2.6%)	20 (2.2%)	24 (3.2%)	5 (2.3%)	
NA = 20					
Urinary protein					0.9
Negative	1,838 (97.6%)	893 (97.6%)	730 (97.7%)	215 (97.3%)	
Positive	45 (2.4%)	22 (2.4%)	17 (2.3%)	6 (2.7%)	
NA = 2					

Table footnote: Values represent mean ± standard deviation or n (%). Abbreviations (conversion factors for units): BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; eGFR, estimated glomerular filtration rate; WBC, white blood cell count; RBC, red blood cell count; PLT, platelet count; TP, serum total protein; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; γ-GTP, γ-glutamyl transferase; TG, triglyceride; TCh, total cholesterol; HDL-Ch, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-Ch, low-density lipoprotein cholesterol; BUN, blood urea nitrogen; SUA, serum urate concentration; blood glucose; NA, not available.

3-2 腎機能低下と無症候性高尿酸血症との関連解析

経時的な腎機能低下と無症候性高尿酸血症との関連性について調査するため、無症候性高尿酸血症群 (SUA > 7.0 mg/dL) と正常 SUA 群 (SUA ≤ 7.0 mg/dL) の共変量 (年齢, 性別, BMI, eGFR) をベースラインで補正し, eGFR の変動を追跡した. 調整前後の共変量のバランスについては群間での標準化差によって評価した (Table 8). 同様に推定 ABCG2 カテゴリーごとに共変量を調整し, 調整前後の共変量のバランスを群間での標準化差によって評価した. Propensity score paired matching (one-to-one matching) による調整後の共変量は, 調整前と比較して平均差, 標準化差ともに縮小した.

Table 8. Summary of characteristics before and after matching using propensity scores.

		Before Propensity matching			After Propensity matching		
		HU	NU	<i>D</i>	HU	NU	<i>D</i>
Unclassified	Number	146	1,024		143	143	
Normal kidney	Male	146 (100%)	805 (78.6%)	0.522	143 (100%)	143 (100%)	0.000
	Age	31.6 ± 7.9	28.9 ± 7.1	0.254	31.7 ± 8.0	30.6 ± 7.8	0.098
	BMI	24.5 ± 4.0	21.9 ± 3.2	0.508	24.2 ± 3.7	24.3 ± 3.8	-0.019
	eGFR	103.0 ± 11.0	110.4 ± 15.8	-0.384	103.1 ± 11.1	103.4 ± 10.0	-0.020
	SUA	7.8 ± 0.6	5.2 ± 1.1	2.075	7.8 ± 0.6	5.7 ± 0.9	1.941
Unclassified	Number	165	550		159	159	
CKD stage G2	Male	165 (100%)	494 (89.8%)	0.337	159 (100%)	159 (100%)	0.000
	Age	40.2 ± 7.7	39.2 ± 8.2	0.089	39.8 ± 7.6	39.2 ± 7.8	0.055
	BMI	25.2 ± 3.6	23.1 ± 3.3	0.430	24.9 ± 3.4	24.9 ± 3.6	0.000
	eGFR	78.3 ± 7.3	79.5 ± 7.0	-0.119	78.7 ± 7.1	78.6 ± 7.6	0.010
	SUA	7.8 ± 0.7	5.7 ± 0.9	1.842	7.8 ± 0.7	5.5 ± 0.7	2.323
Fully ABCG2	Number	54	522		51	51	
Normal kidney	Male	54 (100%)	419 (80.3%)	0.495	51 (100%)	51 (100%)	0.000
	Age	31.8 ± 8.0	28.8 ± 6.9	0.284	31.7 ± 8.2	31.4 ± 8.4	0.026
	BMI	24.7 ± 3.9	22.0 ± 3.2	0.535	24.1 ± 3.1	23.7 ± 3.2	0.090
	eGFR	103.0 ± 10.9	110.3 ± 15.0	-0.394	103.1 ± 11.1	101.3 ± 9.3	0.124
	SUA	7.8 ± 0.7	5.2 ± 1.9	1.842	7.8 ± 0.7	5.5 ± 1.1	1.764
Fully ABCG2	Number	61	279		60	60	
CKD stage G2	Male	61 (100%)	254 (91.0%)	0.314	60 (100%)	60 (100%)	0.000
	Age	40.2 ± 7.0	38.4 ± 8.1	0.168	40.4 ± 6.9	41.3 ± 7.3	-0.090
	BMI	25.2 ± 3.0	23.1 ± 3.3	0.471	25.1 ± 2.9	25.0 ± 3.2	0.023
	eGFR	78.3 ± 8.1	79.6 ± 7.2	-0.120	78.2 ± 8.2	77.8 ± 7.3	0.036
	SUA	7.8 ± 0.7	5.7 ± 0.9	1.842	7.8 ± 0.7	5.8 ± 0.8	1.881
75% ABCG2	Number	62	402		60	60	
Normal kidney	Male	62 (100%)	307 (76.4%)	0.556	60 (100%)	60 (100%)	0.000
	Age	32.4 ± 8.4	29.1 ± 7.3	0.297	32.5 ± 8.5	32.2 ± 9.0	0.024
	BMI	24.2 ± 3.9	21.9 ± 3.2	0.456	23.9 ± 3.5	24.0 ± 3.5	-0.020
	eGFR	103.9 ± 12.2	110.6 ± 16.9	-0.321	103.9 ± 12.3	104.5 ± 13.6	-0.033
	SUA	7.7 ± 0.6	5.2 ± 1.1	1.995	7.7 ± 0.6	5.6 ± 0.9	1.941
75% ABCG2	Number	71	212		67	67	
CKD stage G2	Male	71 (100%)	185 (87.3%)	0.381	67 (100%)	67 (100%)	0.000
	Age	40.1 ± 8.4	40.0 ± 8.3	0.008	40.2 ± 8.5	40.9 ± 6.9	-0.064
	BMI	25.4 ± 4.0	23.1 ± 3.5	0.433	24.8 ± 3.2	24.8 ± 3.1	0.000
	eGFR	78.8 ± 7.1	79.4 ± 6.9	-0.061	79.0 ± 7.1	78.5 ± 7.3	0.049
	SUA	7.9 ± 0.7	5.6 ± 1.0	1.884	7.9 ± 0.8	5.9 ± 0.9	1.661
≤50% ABCG2	Number	30	100		19	19	
Normal kidney	Male	30 (100%)	79 (79.0%)	0.516	19 (100%)	19 (100%)	0.000

	Age	29.6 ± 6.8	28.8 ± 6.7	0.084	31.8 ± 7.3	31.7 ± 7.8	0.009
	BMI	24.6 ± 4.5	21.4 ± 3.1	0.586	23.1 ± 3.3	23.4 ± 3.7	-0.061
	eGFR	101.2 ± 8.5	110.7 ± 15.6	-0.535	103.0 ± 8.9	104.3 ± 10.8	-0.093
	SUA	7.8 ± 0.6	5.3 ± 1.1	1.995	7.7 ± 0.6	5.6 ± 0.7	2.278
≤50% ABCG2	Number	33	59		29	29	
CKD stage G2	Male	33 (100%)	55 (93.2%)	0.270	29 (100%)	29 (100%)	0.000
	Age	40.3 ± 7.6	39.7 ± 8.4	0.053	40.4 ± 7.7	39.2 ± 7.5	0.112
	BMI	24.8 ± 3.8	22.9 ± 2.7	0.408	23.9 ± 2.9	23.6 ± 3.0	0.072
	eGFR	77.5 ± 6.4	79.2 ± 6.7	-0.183	78.5 ± 6.1	77.7 ± 6.8	0.088
	SUA	7.8 ± 0.5	5.8 ± 0.8	2.120	7.7 ± 0.5	5.9 ± 0.8	1.908

Table footnote: Values represent mean ± standard deviation. Abbreviations (conversion factors for units): HU: asymptomatic hyperuricemia; NU, normouricemia; BMI, body mass index; eGFR (mL/min/1.73 m²), estimated glomerular filtration rate; SUA (mg/dL), serum urate concentration (mg/dL). Normal kidney and CKD stage G2 represent ≥90 and 60-89 mL/min/1.73 m² of eGFR. Standardized differences were calculated by following formula; (1) Standardized difference score (continuous variables) = $(X_{HU} - X_{NU}) / (S_{HU}^2 + S_{NU}^2)^{1/2}$, where X_{HU} and X_{NU} are sample means in the participants with asymptomatic hyperuricemia and normouricemia, and S_{HU}^2 and S_{NU}^2 are the variances. (2) Standardized difference score (nominal variables) = $(P_{HU} - P_{NU}) / [P_{HU}(1 - P_{HU}) + P_{NU}(1 - P_{NU})]^{1/2}$, P_{HU} and P_{NU} are the percentage in the participants with asymptomatic hyperuricemia and normouricemia.

共変量調整後，無症候性高尿酸血症群と正常 SUA 群の追跡期間における eGFR 低下速度を比較するため，LME モデル解析を実施した．LME モデルの結果および各群の eGFR slope を **Figure 4** に示す．推定 ABCG2 機能で未分類，または推定 ABCG2 機能 100%，75% カテゴリーにおける eGFR の経時的な低下速度は無症候性高尿酸血症群，正常 SUA 群間で統計的な有意差を認めなかった (**Fig. 4-a, b**)．しかしながら，推定 ABCG2 機能 ≤50% カテゴリーにおいて，CKD stage G2 (eGFR: 60-89 mL/min/1.73 m²) では無症候性高尿酸血症の eGFR slope は正常 SUA と比較して，有意に eGFR 低下を加速した (p for interaction = 0.027, **Fig. 4-b**)．

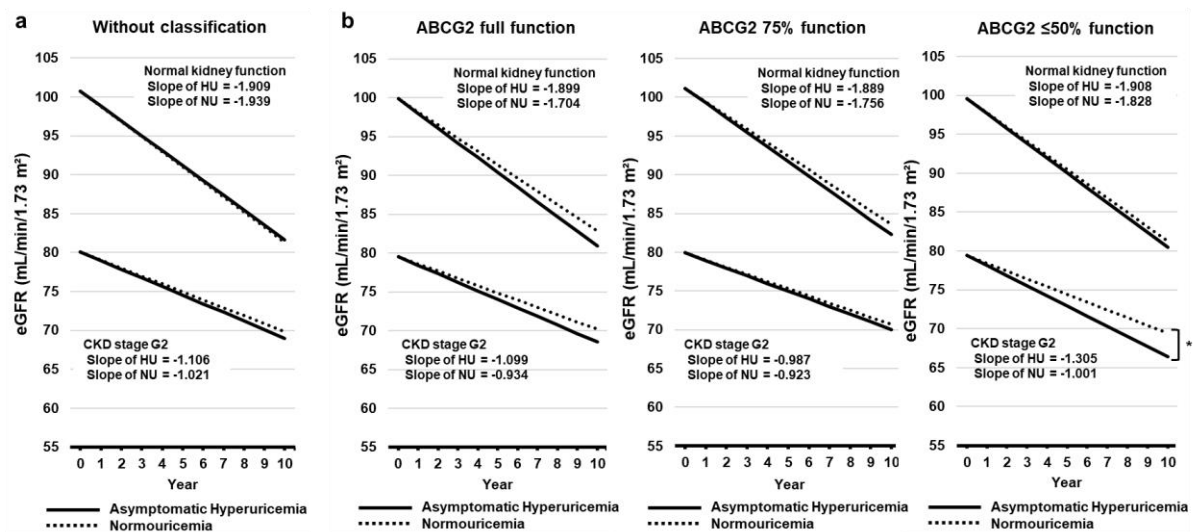


Figure 4. Comparison of eGFR decline between asymptomatic hyperuricemia and normouricemia with and without classification by ABCG2 estimation. Participants with asymptomatic hyperuricemia (HU, serum urate concentrations > 7.0 mg/dL) were matched to an equal number of participants with normouricemia (NU, serum urate concentrations ≤ 7.0 mg/dL) by propensity score based on age, sex, baseline body mass index, and baseline eGFR (See Table 2 for a detailed summary). (a) eGFR declines in asymptomatic hyperuricemia and normouricemia patients without classification by estimated ABCG2 function. (b) A comparison of eGFR decline between asymptomatic hyperuricemia and normouricemia with classification by estimated ABCG2 function (p* for interaction = 0.027).

3-3 腎機能低下と ABCG2 機能との関連解析

腎機能低下に対する ABCG2 の修飾効果を検討するため、登録された参加者 (n = 1,885) を SUA とベースラインの eGFR から 4 つのサブグループに分類し、それぞれのサブグループごとに eGFR の変動を追跡した。サブグループの作成には、痛風治療の目標 SUA 値 (6.0 mg/dL) と CKD stage を cut-off point として用い、以下の様に分類した: subgroup 1 (n = 448), eGFR ≥ 90 ml/min/1.73 m², SUA ≥ 6.0 mg/dL; subgroup 2 (n = 722), eGFR ≥ 90 mL/min/1.73 m², SUA < 6.0 mg/dL; subgroup 3 (n = 406), eGFR 60-89 mL/min/1.73 m², SUA ≥ 6.0 mg/dL; subgroup 4 (n = 309), eGFR 60-89 mL/min/1.73 m², SUA < 6.0 mg/dL. サブグループ間での追跡期間の最大差は 1.5 カ月未満であった。

これらのサブグループでそれぞれ追跡開始時から追跡終了時にかけての eGFR の変化率を算出した (Fig 5)。Subgroup 3 において、追跡開始から終了時にかけて eGFR 低下率が 20% を超えていた割合は推定 ABCG2 機能の低下に比例して増加し、推定 ABCG2 機能が 100%, 75%, ≤50% でそれぞれ 12.6%, 20.9%, 32.8% であった (p for trend < 0.001)。

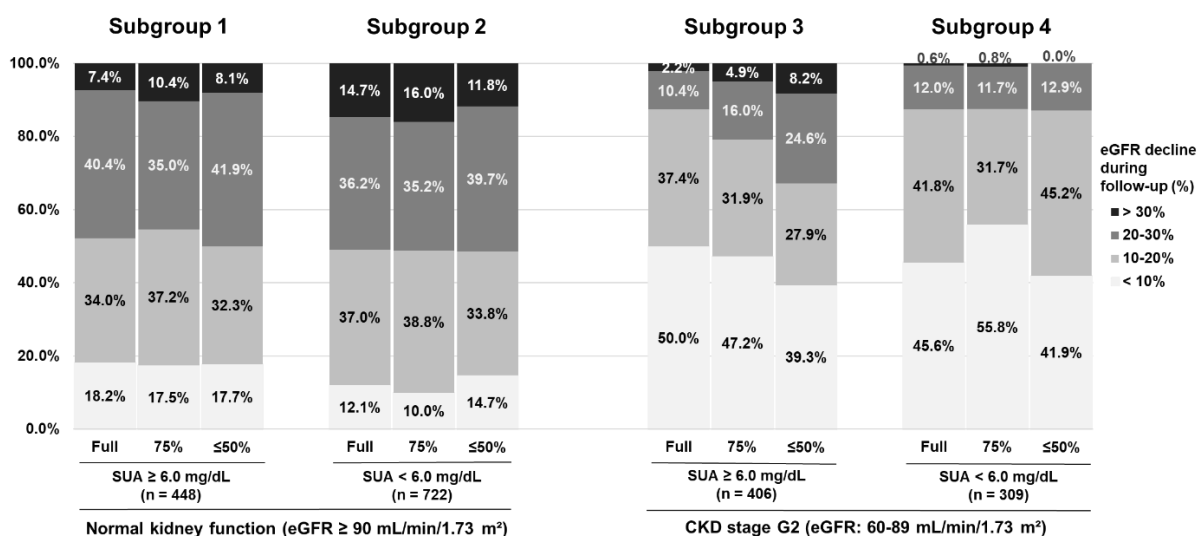


Figure 5. Changes of eGFR during the observational period in subgroup analysis. All participants

were divided by CKD stages (cut-off eGFR, ≥ 90 or 89-60 mL/min/1.73 m²) and therapeutic target serum urate concentration (SUA) of hyperuricemia (cut-off SUA, < 6.0 or ≥ 6.0 mg/dL) into 4 subgroups. Proportions of participants whose $> 20\%$ eGFR decline in subgroup 3 increased with ABCG2 dysfunction; 12.6%, 20.9%, and 32.8% in ABCG2 full, 75%, and $\leq 50\%$ functional groups, respectively (p for trend < 0.001 by the Cochran-Armitage trend test).

ABCG2は強力な SUA 関連因子であるため、サブグループ内においても SUA が交絡因子として残存すると考えられた。従って、上述した subgroup 3 においてベースラインの SUA を含めた共変量調整を行い、再度 eGFR slope を算出した。経時的な腎機能低下と ABCG2 との関連性について調査するため、最も例数の少ない ABCG2 機能 $\leq 50\%$ カテゴリーを基準として、ABCG2 機能 100%、ABCG2 機能 75%カテゴリー間で SUA を含む共変量 (年齢、性別、BMI、eGFR、SUA) をベースラインで補正し、eGFR の変動を追跡した。調整前後の共変量のバランスについては群間での標準化差によって評価した (Table 9)。Propensity score paired matching (one-to-one matching) による調整後の共変量は、調整前と比較して平均差、標準化差ともに縮小した。

Table 9. Summary of characteristics in subgroup 3 before and after propensity score matching.

		Estimated ABCG2 function				
		Full function	75% function	$\leq 50\%$ function	D1	D2
Before adjusting	Number	182	163	61	-	-
	Male	180 (98.9%)	163 (100%)	61 (100%)	0.105	0.000
	Age	39.3 \pm 7.8	39.8 \pm 8.2	40.9 \pm 7.9	0.139	0.092
	BMI	24.2 \pm 3.4	24.4 \pm 3.9	24.0 \pm 3.4	-0.049	-0.080
	Baseline eGFR	78.5 \pm 7.6	79.5 \pm 6.7	77.6 \pm 6.5	-0.090	-0.201
	Baseline SUA	6.9 \pm 0.8	7.1 \pm 0.9	7.2 \pm 0.8	0.237	0.053
After adjusting	Number	122	122	61	-	-
	Male	122 (100%)	122 (100%)	61 (100%)	0.000	0.000
	Age	40.8 \pm 7.1	40.3 \pm 8.2	40.9 \pm 7.9	0.047	0.005
	BMI	23.9 \pm 3.2	23.9 \pm 3.5	24.0 \pm 3.4	0.028	0.027
	Baseline eGFR	78.2 \pm 7.7	78.2 \pm 6.5	77.6 \pm 6.5	-0.056	-0.085
	Baseline SUA	7.1 \pm 0.8	7.1 \pm 0.8	7.2 \pm 0.8	0.034	0.047

Note: Values represent mean \pm standard deviation. Abbreviations (conversion factors for units): BMI, body mass index (kg/m²); eGFR (mL/min/1.73 m²), estimated glomerular filtration rate; SUA (mg/dL), serum urate concentration. D1 and D2 represent standardized differences between ABCG2 full and $\leq 50\%$ functional groups, or between ABCG2 75% and $\leq 50\%$ functional groups, respectively. Standardized differences were calculated by following formula; (1) Standardized difference score (continuous variables) = $(X_1 - X_2) / (S_1^2 + S_2^2)^{1/2}$, where X_1 and X_2 are sample means, and S_1^2 and S_2^2 are the variances. (2) Standardized difference score (nominal variables) = $(P_1 - P_2) / [P_1(1 - P_1) + P_2(1 - P_2)]^{1/2}$, P_1 and P_2 are the percentage.

共変量調整後、追跡期間における eGFR 低下速度を ABCG2 機能グループ間で比較するため、LME モデル解析を実施した。LME モデルの結果および各群の eGFR slope を **Figure 6** に示した。共変量調整前では、ABCG2 機能 100%、75%、 $\leq 50\%$ カテゴリーの eGFR slope はそれぞれ -0.988 ± 0.040 , -1.076 ± 0.043 , -1.148 ± 0.069 (mL/min/1.73 m²/year, mean \pm SEM) であり、ABCG2 機能 $\leq 50\%$ カテゴリーは 100%機能カテゴリーと比較して有意に eGFR 低下速度が加速していた ($p = 0.046$)。共変量調整後では、ABCG2 機能 100%、75%、 $\leq 50\%$ カテゴリーの eGFR slope はそれぞれ -0.946 ± 0.049 , -1.040 ± 0.046 , -1.148 ± 0.069 (mL/min/1.73 m²/year, mean \pm SEM) であった。ABCG2 機能低下の代表的な表現型である SUA の上昇を調整しても、調整前と同様に ABCG2 機能 $\leq 50\%$ カテゴリーは 100%機能カテゴリーと比較して有意に eGFR 低下速度が加速していた ($p = 0.015$)。

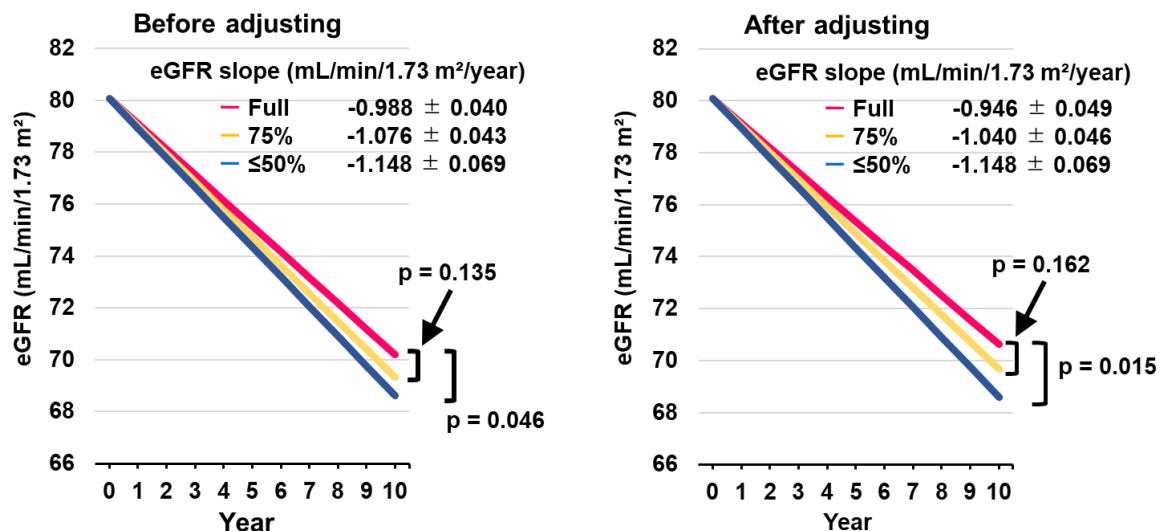


Figure 6. Evaluation of the association between ABCG2 function and age-dependent eGFR decline before and after matching using propensity scores. The slope of eGFR decline before and after *adjusting by serum urate concentration on top of age, body mass index, and eGFR at baseline. $\leq 50\%$ functional ABCG2 significantly accelerated the decline in eGFR compared to full functional ABCG2 regardless of adjustment (before adjustment, p for interaction = 0.046; after adjusting, p for interaction = 0.015). Sample sizes of the full, 75%, and $\leq 50\%$ function group were 182, 163, and 61 men and women before adjustment, and 122, 122, and 61 men after adjustment, respectively (See Table 3 for a detailed summary).

第4章 考察

SUAの上昇と腎機能との関連性については、これまで多くの疫学研究で検討されており、それらの多くがSUAの上昇が腎機能の予後不良を予測することを示唆している^{13, 14, 17, 29-31}。国内で60年以上継続して実施されている大規模前向き研究である久山町研究では、尿酸塩の析出が起きにくいSUA 7.0 mg/dL以下であっても、SUAの上昇に伴ってCKD発症リスクが高い状況が報告されている⁷⁵。また、腎生検検体を用いた検討では、SUAと動脈硬化性病変との関連性が見出されており、尿酸析出を介さない動脈硬化に関連した腎機能低下を促進することも報告されている⁷⁶。これらの結果から、慢性的なSUAの上昇は、典型的腎病理像である痛風腎だけでなく、尿酸塩の析出に依存しない動脈硬化による腎障害を促進する可能性が示唆されてきた。しかしながら、無症候性高尿酸血症への治療的介入が腎機能の保全につながるか否かに対しては、未だ明確な結論は得られていない。実際、我が国で上梓されている【高尿酸血症・痛風の治療ガイドライン 第3版】では、「腎障害を有する高尿酸血症の患者において尿酸降下薬は無投薬に比して推奨できるか？」というクリニカルクエスチョンに対し、「腎機能低下を抑制する目的で尿酸降下薬を用いることを中等度に推奨する。」と回答されているが、この根拠となった文献の異質性が高いことを同ガイドライン内で指摘している⁷⁷。一方、国外のガイドラインにおいては尿酸降下薬の臓器保護についての言及はなく、無症候期の高尿酸血症に対しての尿酸降下薬の使用は推奨されていない⁶⁹。近年に実施されたCKD-FIX試験でも、CKD患者に対するアロプリノールによる尿酸降下療法はCKD進行を抑制しなかったと報告している³³。この結果は、CKD進行に対する無差別的なアロプリノールによる尿酸降下療法は有益ではない可能性を示唆している。しかしながら、CKD-FIX試験ではSUAが正常域の参加者を含むことや、高度に進行したCKD患者(stage G3-G4)を対象としていること、参加者の大多数(76%)がレニン-アンギオテンシン系阻害薬を服用していたことにより、血清尿酸による同系を介した影響を減弱している可能性があることも言及している。従って、特定のサブグループに尿酸降下療法が有効か否かについては帰結しておらず、SUAと腎機能との関連性についての明確なエビデンスは未だ不足している。

本研究では、ABCG2の $\leq 50\%$ 機能低下と無症候性高尿酸血症(SUA > 7.0 mg/dL)が共存するCKD stage G2サブグループにおいて、腎機能の低下が加速する可能性が示唆された。更に、SUAを痛風の治療目標値である6.0 mg/dLにサブグループを拡大した際もABCG2の腎機能への影響が残存した。本研究の結果は高度なABCG2機能の低下は高尿酸血症による腎障害の修飾因子となりうることを示唆している。本研究はp.Q126Xとp.Q141Kの変異頻度の高い日本人集団を扱ったことから、これら2つの変異の組み合わせによる機能推定を行った。この推定方法はp.Q141K単一と比較してより感度を高くABCG2の機能を評価している^{42, 56, 57}。これまでSUAの上昇による腎機能の低下の機序として尿酸塩沈着や、末梢血管抵抗上昇と腎血流量低下を伴う糸球体硬化が考えられてきたが、ABCG2の機能低下型SNPs、特にp.Q141Kの変異頻度が世界的に見ても非常に高いことから、これら従来の病態に加えABCG2機能低下が腎障害に関与している可能性を示唆している。以上を踏まえると、今後

に腎機能と SUA との関連性を調査する上で、ABCG2 を重要な遺伝的影響因子として考慮する必要がある。

また CKD-FIX 試験を含むこれまでの臨床試験^{32,33}との異質性として、本研究で用いられた集団は比較的若年層で構成され、腎機能がある程度保たれた参加者に限定されている。以前の研究から、20歳代以下の日本人痛風発症者の88.2%が ABCG2 機能低下型 SNPs を有しており、ABCG2 機能低下型 SNPs は20歳代以下の痛風発症のリスクを最大22.2倍に高めることが報告されている⁴⁴。また世界的に見て痛風・高尿酸血症の発症率が高いチェコ人の症例においても、ABCG2 の機能欠損型変異が小児の高尿酸血症に関連すること⁷⁸、ABCG2 の非同義遺伝子変異を2つ以上有する場合、発症年齢が明らかに若年化することが認められている⁷⁹。これらの研究は、ABCG2 機能低下が痛風発症の若年化、小児期からの SUA の上昇に関連していることを示唆するものである。本研究集団が20-40歳台からなる若年者を中心に構成された集団であること、本研究集団においても ABCG2 機能低下による著明な SUA の上昇傾向を認めたことを踏まえると、ABCG2 機能低下による若年時からの SUA の上昇は痛風発症のみならず、腎機能低下を惹起する可能性が示唆される。

本研究で提示された ABCG2 機能低下による腎機能低下の想定機序として、第一に尿中尿酸排泄の増加による腎負荷が挙げられる。先行研究より、*Abcg2*-knockout mice において SUA の上昇に伴い、尿中への代償的な尿酸排泄量の増加を報告している⁶²。これらの所見から、ABCG2 機能低下は高尿酸尿を介して腎・尿路における尿酸塩結晶の形成リスクを増加させることが予想される。類似した機序として、ベンズブロマロンなどの尿酸排泄促進薬によっても尿中尿酸排泄の増加が認められる。投与による尿酸プールの減少に伴い尿中尿酸排泄量は徐々に減少する。従って、投与開始時期を除いて排泄量の増価は比較的僅かであり、尿酸排泄促進薬を投与による腎機能低下との関連性は今のところ確認されていない^{80,81}。ABCG2 機能低下による尿中尿酸排泄の増加の病態機序は、腸管などからの腎外排泄低下による尿酸プールの増加を本態とする⁶²。すなわち、ABCG2 機能低下による尿酸の尿中排泄量の増加は恒常的であることが想定され、この恒常的な尿中尿酸濃度の増加が腎機能に及ぼす影響については更なる検討が必要である。

第二の機序として、ABCG2 機能低下による尿毒症物質の蓄積が想定される。ABCG2 は広範な基質特異性を有するトランスポーターであり、尿酸だけではなくインドキシル硫酸を輸送・排泄していることが報告されている⁶⁶。インドキシル硫酸は腸内細菌によって産生されるインドールの代謝物であり、代表的な尿毒症物質である⁸²。腎機能が正常に機能している場合には尿とともに排泄されるが、腎機能低下による排泄量の低下に伴い血中、近位尿細管細胞中に蓄積される^{83,84}。実際、循環血中のインドキシル硫酸濃度は健常者では10 μL 未満であるが、末期腎不全患者では平均で約250 μL、最大で550 μL 程度まで上昇する⁸⁵。インドキシル硫酸は末期腎不全患者の死亡率と関連するが⁸⁶⁻⁸⁸、インドキシル硫酸による組織の繊維化は活性酸素種による NF-κβ の活性化、それに伴う p53 や Stat3 などの発現誘導を介した α-smooth muscle actin (α-SMA) の増加やレニン-アンジオテンシン系の亢進によると考えられている⁸⁹⁻⁹²。この ABCG2 とインドキシル硫酸、それに伴う身体への影響については近

年研究が進められており、*in vivo* 実験から CKD モデルの ABCG2-knockout mice では野生型と比較して血中インドキシル硫酸濃度、死亡率の上昇が認められた⁶⁶。また末期腎不全患者集団での検討では、ABCG2 機能の高度低下は SUA とは独立した総死亡リスクであることが報告されている⁹³。これらの知見は ABCG2 機能低下により蓄積されたインドキシル硫酸が組織障害を惹起する可能性を提示している。本研究においても腎機能が軽度低下した ABCG2 機能低下群のみで腎機能低下の加速を認めたこと、またベースラインでの SUA の補正に関わらずこの腎機能低下の加速が残存したことを考慮すると、ABCG2 機能低下が SUA の上昇のみならず、尿毒症物質など間接的な機序によって早期 CKD 発症・進行を促進しうることを示唆する結果であった。

ABCG2 機能は薬物間との相互作用によっても変動する。ABCG2 過剰発現した細胞膜小胞を使用した検討から、SUA の変動させることが報告されている 25 種の薬物のうち、フェブキソスタットやベンズプロマロンなどの尿酸降下薬を含む 10 種の薬物の共存下で ABCG2 の尿酸輸送活性を 20% 以下まで低下させることが明らかとなっている⁹⁴。このことは尿酸降下薬の本来の薬効とは別に、ABCG2 を介した尿酸排泄を阻害している可能性を示すものである。更に *in vivo* 実験において、特にフェブキソスタットは臨床上到達しうる血中濃度において ABCG2 の輸送活性を強く阻害しうるということが明らかとなった⁹⁴。なお、この知見に基づき実施された臨床試験においても、臨床用量のフェブキソスタットが腸管の ABCG2 輸送活性を阻害することを示唆する結果が報告されている⁹⁵。このことから尿酸降下作用の一部が相殺され、期待される薬理作用が減弱していることが予想されている。本研究の結果と同様に、腎機能が軽度低下した高尿酸血症のサブグループにおいて、ABCG2 の輸送活性を阻害しうる一部の薬剤の使用は前述の想定機序により腎予後に関連する可能性があり、今後更なる検討が必要である。

本研究は非介入の観察研究であり、いくつかの制約や限界があることを理解する必要がある。第一に、潜在的バイアスの存在である。本研究は組織職員の定期健康診断のデータを集積したものとリクルート時に回収した参加者自記のアンケート調査を用いたデータセットを使用している。故に、使用可能な変数は限られており、観測不可能な潜在的因子が多分に含まれている。本研究では追跡開始前に ABCG2、無症候性高尿酸血症、腎機能の経時的推移の関連性について解析上の交絡となりうる要因をスクリーニングしているが、完全には排除できていない。また尿中尿酸、インドキシル硫酸の測定は行っておらず、本研究で確認された ABCG2 機能低下による腎機能低下の因果関係や具体的機序についての断定はできない。

第二の限界として、本研究は ABCG2 遺伝因子と腎予後との関連性について追跡した観察研究としては初めての報告であるため、現状では独立した検証用コホートが存在しない。本研究の集団規模は比較的小さく、特に推定機能 $\leq 50\%$ 以下の ABCG2 を有する個体数が少なかった。本研究の結果の再現性・頑強性を担保するため、高尿酸血症・高度機能低下 ABCG2 を有する個体をより捕捉できるよう大規模な集団で検証する必要がある。

第三の限界として、本研究で募集された参加者が日本人に限定されている点である。本研究で ABCG2 の機能推定に使用した p.Q126X と p.Q141K の頻度は地域性が高く、特にアジア

人で頻度が高い^{50, 96}。特に p.Q141K については国際的に広く研究されており、日本人 (32%) と漢民族 (34%) に多いが、アメリカやヨーロッパ人では中程度 (11-12%)、アメリカ系アフリカ人 (5%)、サハラ以南のアフリカ人 (1%) ではまれな変異として存在する^{50, 96}。また、本研究の ABCG2 機能推定で使用された p.Q126X と p.Q141K 以外にも、非常に低頻度ではあるが ABCG2 機能に影響を与える rare variants が存在するが、本研究ではそれらの rare variants については考慮していない。これらの ABCG2 の機能低下・欠損を伴う rare variants は痛風発症に対して関連することが報告されており⁹⁷、今後の解析にはそれらの影響も加味して再検討する必要がある。加えて、チェコ人集団と日本人集団から見出された機能低下・欠損を伴う rare variants の間には重複が認められず、人種差・地域差が認められた⁹⁷。以上を踏まえると、本研究から得られた結果を国際的な一般集団に外挿するためには、上述した人種差・地域差を念頭に置いて一般化可能性を考慮する必要がある。同様に、本研究の検証コホート分析や今後の ABCG2 関連研究の実施を検討する際には、対象集団の選定等、研究デザインについても考慮しなくてはならない。

第四の制約として、本研究では ABCG2 の輸送活性について直接的な測定や評価をしたわけではなく、あくまで頻度の高い SNPs である p.Q126X と p.Q141K の組み合わせによって推定したのみである。従って、上述した rare variants の潜在的な効果やタンパク質への翻訳過程における発現量の差異は考慮されていない。近年では赤血球を用いた ABCG2 の発現量の測定方法や⁹⁸、Positron emission tomography (PET) を用いた ABCG2 の輸送活性の測定方法などが確立されてきている⁹⁹。本稿の方法による ABCG2 機能推定ではサンプル数と研究デザインの観点から遺伝因子のみを用いた。これは血液や唾液から簡単にサンプルが採取可能であるゲノム DNA を用いるため侵襲性が非常に低く、臨床応用に易いという利点があるものの、本研究の結果を多角的に検証するためには、より簡便な ABCG2 輸送活性を測定する方法の樹立が望まれる。

結論として、ABCG2 は無症候性高尿酸血症と腎機能の関係性における効果修飾因子であることが明らかとなった。これまで、国際的に軽度の無症候性高尿酸血症は医学的治療を要しないとされてきたが、高度 ABCG2 機能低下例についてはその限りではないことが示唆された。特に ABCG2 機能低下・欠損型 SNPs の頻度が高いアジア圏において、本研究の結果は無症候性高尿酸血症への治療介入の意義を考えるうえで、重要なエビデンスとなりうる知見である。本研究から得た知見から、ABCG2 の遺伝的要因は今後の研究、特に尿酸に関連した疫学研究の際には十分に考慮されるべき背景因子となりうるということが明かされた。

総括

ヒトのプリン体代謝の最終産物である尿酸は、肝臓での産生、腎臓・消化管での排泄の均衡により SUA はある一定の恒常性を保っている。この均衡が瓦解すると SUA は上昇し、炎症・組織障害を惹起する。高尿酸性腎症の典型的な臨床病像は痛風腎であり、濃度飽和により析出した尿酸塩結晶により腎機能低下を引き起こすことが知られている。一方で、尿酸塩の析出を認めない場合、すなわち、SUA の上昇そのものが腎機能低下を引き起こすことが、多数の疫学研究や腎病理面から支持されている^{13, 14, 17, 29-31}。しかしながら、介入研究からは尿酸降下薬が腎機能低下を抑制することへの否定的な報告が散見され^{32, 33}、無症候期の高尿酸血症と腎機能低下との関連性については未だ明瞭な結論へと至っていない。

SUA に強い影響を与える遺伝因子として、腎近位尿細管・消化管において尿酸排泄ポンプとして発現している ABCG2 が挙げられる。ABCG2 は特に消化管からの尿酸排泄の中心的な制御分子として機能しており、ABCG2 機能低下は消化管での尿酸排泄低下を介し SUA を上昇させ、結果的 (代償的) に尿中への尿酸排泄量を増加させることが知られている⁶²。このことは ABCG2 による腎外尿酸排泄が、SUA の恒常性の維持において思いのほか大きく寄与していることが示しており、上述の病態は高尿酸血症の新たな分類である“腎外排泄低下型高尿酸血症”として注目されている。また、近年では ABCG2 はインドキシル硫酸などの尿毒症物質を輸送する生体防御因子としても働いていることが明らかとなっている⁶⁶。従って、これらの知見から ABCG2 機能低下による SUA 上昇に伴う尿酸の腎負荷や尿毒症の蓄積により腎機能に影響している可能性、すなわち ABCG2 が高尿酸性腎症の効果修飾因子となりうることを示唆されていた。しかしながら、ABCG2 と腎機能の推移を縦断的に追跡した疫学研究は乏しく、ABCG2 機能低下による腎機能への影響は未実証であった。

本研究では、尿酸トランスポーターとして知られる ABCG2 に焦点を当て、無症候性高尿酸血症と腎機能低下との関連性を疫学的な視点から調査した。ABCG2 は機能欠損・低下型の多型 (p.Q126X, p.Q141K) が高頻度で認められており、この2つの変異は同一染色体上に存在しないこと、ABCG2 の rare variants の頻度が両変異と比較して非常に低いことから、両変異の組み合わせによって実際の ABCG2 機能を反映したカテゴリー化 (ABCG2 機能 100%, 75%, 50% 以下) を行うことが可能である。本研究集団は正常な腎機能 (eGFR > 60 mL/min/1.73 m²) を有する一般集団 (n = 1,885) であり、311 例が高尿酸血症 (SUA > 7.0 mg/dL) を有していた。本研究では参加者から得られた ABCG2 の遺伝情報と年次ごとに実施される健康診断のデータセットを用いて、9~10 年間 eGFR を追跡した後ろ向きコホート研究を実施した。本研究では腎予後のサロゲートエンドポイントとして eGFR slope (mL/min/1.73 m²/year) と観察期間における eGFR 変化率 (%) とし、ABCG2、無症候性高尿酸血症と腎機能との関連性を調査した。

我々はまず無症候性高尿酸血症と腎機能低下の関連性において、ABCG2 が効果修飾因子として機能するか否かを検討した。本研究集団を推定 ABCG2 機能カテゴリーごとにサブグループ化した ABCG2 機能 100%カテゴリー、75%カテゴリー、50%以下カテゴリーの3群に、

ABCG2 機能未分類の群を合わせた 4 つのサブグループで検証した。サブグループ解析ではベースライン上で CKD stage ごとに年齢, 性別, BMI, eGFR を共変量として propensity score を作成し, optimal matching による補正を行った。これらのサブグループ内のうち ABCG2 機能 100%群, 75%群, また未分類の集団において, 無症候性高尿酸血症は正常 SUA 域とほぼ同等の eGFR slope であった。これに対し ABCG2 機能 50%以下かつ CKD stage G2 の群では, 無症候性高尿酸血症は正常 SUA 域と比較して有意に腎機能低下を加速した (p for interaction = 0.027)。ABCG2 が正常~軽度低下, また ABCG2 機能が未分類のサブグループで eGFR slope が同等であったこと, ABCG2 が高度に低下した場合のみ無症候性高尿酸血症による腎機能低下が顕著であったことを考慮すると, 本研究の結果は ABCG2 が無症候性高尿酸血症と腎機能低下の関連性において効果修飾因子として作用している可能性を示唆するものである。

次に, ABCG2 機能低下が腎機能低下を促進する上での条件検討を行った。ここでは CKD stage に加え, 痛風の治療目標値である SUA 6.0 mg/dL を cut-off point とし, 4 つのサブグループを作成した: subgroup 1 (n = 448), eGFR \geq 90 mL/min/1.73 m², SUA \geq 6.0 mg/dL; subgroup 2 (n = 722), eGFR \geq 90 mL/min/1.73 m², SUA < 6.0 mg/dL; subgroup 3 (n = 406), eGFR 60-89 mL/min/1.73 m², SUA \geq 6.0 mg/dL; subgroup 4 (n = 309), eGFR 60-89 mL/min/1.73 m², SUA < 6.0 mg/dL。Subgroup 1,2,4 では ABCG2 機能低下と腎機能との関連性は確認できなかった。Subgroup 3 では, ABCG2 機能の低下に伴い eGFR 低下率が上昇し, 追跡開始から終了時にかけて eGFR 低下率が 20%を超えていた割合は, 推定 ABCG2 機能が 100%, 75%, \leq 50%でそれぞれ 12.6%, 20.9%, 32.8%であった (p for trend < 0.001)。この結果は, ABCG2 が腎機能に影響する生理的条件として, 少なくとも SUA が高値であること, また腎機能が軽度低下することが示唆された。これは, ABCG2-knock-out mice を用いた先行研究の結果と部分的に一致しており, 先行研究では CKD モデルの ABCG2-knock-out mice において死亡率が増加していた⁶⁶。本研究においても腎機能が低下した際に ABCG2 の腎機能への影響が明瞭化し, 先行研究と矛盾しない結果であった。

この ABCG2 による影響が著明に表れた subgroup 3 において, ベースライン上の年齢, 性別, BMI, eGFR に加え, SUA を共変量に加え propensity score による補正を行い, 共変量調整前後の eGFR slope を ABCG2 カテゴリーごとに算出した。共変量調整前では, ABCG2 機能 100%カテゴリー, 75%カテゴリー, 50%以下カテゴリーの eGFR slope はそれぞれ -0.988 ± 0.040 , -1.076 ± 0.043 , -1.148 ± 0.069 (mL/min/1.73 m²/year, mean \pm SEM) であり, ABCG2 機能 \leq 50%カテゴリーは 100%機能カテゴリーと比較して有意に eGFR 低下速度が加速していた (p = 0.046)。共変量調整後では, ABCG2 機能 100%カテゴリー, 75%カテゴリー, \leq 50%カテゴリーの eGFR slope はそれぞれ -0.946 ± 0.049 , -1.040 ± 0.046 , -1.148 ± 0.069 (mL/min/1.73 m²/year, mean \pm SEM) であった。ABCG2 機能低下の代表的な表現型である SUA の上昇を調整しても, 調整前と同様に ABCG2 機能 \leq 50%カテゴリーは 100%機能カテゴリーと比較して有意に eGFR 低下速度が加速していた (p = 0.015)。SUA の補正後も ABCG2 機能低下による腎機能低下の修飾効果が残存した本結果は, この修飾効果が血清尿酸値の上昇を介さない独立し

た効果である可能性を示唆している。

本研究から、**ABCG2** が高度に機能低下した例において、高尿酸血症は無症候期においても腎機能低下を促進しうる可能性が示唆された。この想定機序として、**ABCG2** 機能低下による代償的な尿中尿酸排泄量の恒常的な上昇、またインドキシル硫酸を始めとした尿毒症物質の蓄積が挙げられる。しかしながら研究限界として、本研究のデザインは一般的な健康診断データを用いた後ろ向きコホート研究であるため、尿中尿酸排泄量や血中インドキシル硫酸の濃度は測定できていない。従って、将来的には本結果を実証するために、これらのデータを捕捉した検証用の二次的コホートが必要である。

これまで、国際的に軽度の無症候性高尿酸血症は医学的治療を要しないとされてきたが、高度 **ABCG2** 機能低下例についてはその限りではないことが示唆された。本稿で示された新規知見は、今後の腎/尿酸関連の疫学研究において **ABCG2** の重要性を提起するとともに、無症候期の高尿酸血症への治療的介入の意義を議論する上で重要なエビデンスとなりうるものである。

謝辞

本研究および本稿の作成にあたり、主指導者として終始、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました本大学・病態生理学教室 市田公美教授に甚深なる謝意を表します。

本研究および本稿の作成にあたり、多大なる御指導、御鞭撻を頂きました本大学・病態生理学教室 長谷川弘講師、藤田恭子講師、関根舞助教に謹んで感謝の意を表します。また、共同研究者として多大なる御尽力を賜りました東京慈恵会医科大学 栗山哲先生、横尾隆先生、東京国税局診療所・健康管理センター 中野知子先生、東京大学・薬剤部 高田龍平先生、防衛医科大学校・分子生体制御学講座 松尾洋孝先生、中山昌喜先生、豊田優先生、河村優輔先生、同大学医学教育部医学科 中村好宏先生に深く御礼申し上げます。

本研究および本稿の作成にあたり、副指導者としてご指導いただきました本大学・病態生化学 野水基義教授に謹んで感謝の意を表します。

最後に、研究活動に当たり本学の皆様をはじめ、先輩同輩後輩の皆様には様々な御協力・御指導を頂きました。また、本研究の実施に当たり、研究に参加していただいた方も含めまして、ここに御名前を挙げるができなかった多くの方々にも心より感謝申し上げます。

論文目録

本研究の内容は以下の論文に発表した。

Ohashi Y, Kuriyama S, Nakano T, et al. Urate Transporter ABCG2 Function and Asymptomatic Hyperuricemia: A Retrospective Cohort Study of CKD Progression. *Am J Kidney Dis*. 2022.

引用文献

1. Levey, A. S.; Eckardt, K. U.; Tsukamoto, Y.; Levin, A.; Coresh, J.; Rossert, J.; De Zeeuw, D.; Hostetter, T. H.; Lameire, N.; Eknoyan, G., Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* **2005**, *67* (6), 2089-100.
2. GBD Chronic Kidney Disease Collaboration, Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* **2020**, *395* (10225), 709-733.
3. Imai, E.; Horio, M., [Prevalence and perspectives of CKD in Japan]. *Nihon Jinzo Gakkai Shi* **2006**, *48* (8), 703-10.
4. Nitta, K.; Goto, S.; Masakane, I.; Hanafusa, N.; Taniguchi, M.; Hasegawa, T.; Nakai, S.; Wada, A.; Hamano, T.; Hoshino, J.; Joki, N.; Abe, M.; Yamamoto, K.; Nakamoto, H., Annual dialysis data report for 2018, JSDT Renal Data Registry: survey methods, facility data, incidence, prevalence, and mortality. *Renal Replacement Therapy* **2020**, *6* (1).
5. Shankar, A.; Klein, R.; Klein, B. E., The association among smoking, heavy drinking, and chronic kidney disease. *Am J Epidemiol* **2006**, *164* (3), 263-71.
6. Tozawa, M.; Iseki, K.; Iseki, C.; Oshiro, S.; Ikemiya, Y.; Takishita, S., Influence of smoking and obesity on the development of proteinuria. *Kidney Int* **2002**, *62* (3), 956-62.
7. Klag, M. J.; Whelton, P. K.; Randall, B. L.; Neaton, J. D.; Brancati, F. L.; Stamler, J., End-stage renal disease in African-American and white men. 16-year MRFIT findings. *JAMA* **1997**, *277* (16), 1293-8.
8. Klag, M. J.; Whelton, P. K.; Randall, B. L.; Neaton, J. D.; Brancati, F. L.; Ford, C. E.; Shulman, N. B.; Stamler, J., Blood pressure and end-stage renal disease in men. *N Engl J Med* **1996**, *334* (1), 13-8.
9. Tozawa, M.; Iseki, K.; Iseki, C.; Kinjo, K.; Ikemiya, Y.; Takishita, S., Blood pressure predicts risk of developing end-stage renal disease in men and women. *Hypertension* **2003**, *41* (6), 1341-5.
10. Yamagata, K.; Ishida, K.; Sairenchi, T.; Takahashi, H.; Ohba, S.; Shiigai, T.; Narita, M.; Koyama, A., Risk factors for chronic kidney disease in a community-based population: a 10-year follow-up study. *Kidney Int* **2007**, *71* (2), 159-66.
11. Iseki, K.; Oshiro, S.; Tozawa, M.; Ikemiya, Y.; Fukiyama, K.; Takishita, S., Prevalence and correlates of diabetes mellitus in a screened cohort in Okinawa, Japan. *Hypertens Res* **2002**, *25* (2), 185-90.
12. Muntner, P.; Coresh, J.; Smith, J. C.; Eckfeldt, J.; Klag, M. J., Plasma lipids and risk of developing renal dysfunction: the atherosclerosis risk in communities study. *Kidney Int* **2000**, *58* (1), 293-301.

13. Iseki, K.; Ikemiya, Y.; Inoue, T.; Iseki, C.; Kinjo, K.; Takishita, S., Significance of hyperuricemia as a risk factor for developing ESRD in a screened cohort. *Am J Kidney Dis* **2004**, *44* (4), 642-50.
14. Iseki, K.; Oshiro, S.; Tozawa, M.; Iseki, C.; Ikemiya, Y.; Takishita, S., Significance of hyperuricemia on the early detection of renal failure in a cohort of screened subjects. *Hypertens Res* **2001**, *24* (6), 691-7.
15. Hsu, C. Y.; Iribarren, C.; McCulloch, C. E.; Darbinian, J.; Go, A. S., Risk factors for end-stage renal disease: 25-year follow-up. *Arch Intern Med* **2009**, *169* (4), 342-50.
16. Wang, S.; Shu, Z.; Tao, Q.; Yu, C.; Zhan, S.; Li, L., Uric acid and incident chronic kidney disease in a large health check-up population in Taiwan. *Nephrology (Carlton)* **2011**, *16* (8), 767-76.
17. Mok, Y.; Lee, S. J.; Kim, M. S.; Cui, W.; Moon, Y. M.; Jee, S. H., Serum uric acid and chronic kidney disease: the Severance cohort study. *Nephrol Dial Transplant* **2012**, *27* (5), 1831-5.
18. Boss, G. R.; Seegmiller, J. E., Hyperuricemia and gout. Classification, complications and management. *N Engl J Med* **1979**, *300* (26), 1459-68.
19. Mulay, S. R.; Anders, H. J., Crystal nephropathies: mechanisms of crystal-induced kidney injury. *Nat Rev Nephrol* **2017**, *13* (4), 226-240.
20. Shrikant; Shi, C.; Ma, X.; Hans, Novel insights into crystal-induced kidney injury. *Kidney Diseases* **2018**, *4* (2), 49-57.
21. Bardin, T.; Nguyen, Q. D.; Tran, K. M.; Le, N. H.; Do, M. D.; Richette, P.; Letavernier, E.; Correas, J. M.; Resche-Rigon, M., A cross-sectional study of 502 patients found a diffuse hyperechoic kidney medulla pattern in patients with severe gout. *Kidney Int* **2021**, *99* (1), 218-226.
22. Dalbeth, N.; House, M. E.; Aati, O.; Tan, P.; Franklin, C.; Horne, A.; Gamble, G. D.; Stamp, L. K.; Doyle, A. J.; McQueen, F. M., Urate crystal deposition in asymptomatic hyperuricaemia and symptomatic gout: a dual energy CT study. *Ann Rheum Dis* **2015**, *74* (5), 908-11.
23. Wang, P.; Smith, S. E.; Garg, R.; Lu, F.; Wohlfahrt, A.; Campos, A.; Vanni, K.; Yu, Z.; Solomon, D. H.; Kim, S. C., Identification of monosodium urate crystal deposits in patients with asymptomatic hyperuricemia using dual-energy CT. *RMD Open* **2018**, *4* (1), e000593.
24. Rao, G. N.; Corson, M. A.; Berk, B. C., Uric acid stimulates vascular smooth muscle cell proliferation by increasing platelet-derived growth factor A-chain expression. *J Biol Chem* **1991**, *266* (13), 8604-8.
25. Kang, D. H.; Nakagawa, T.; Feng, L.; Watanabe, S.; Han, L.; Mazzali, M.; Truong, L.; Harris, R.; Johnson, R. J., A role for uric acid in the progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* **2002**, *13* (12), 2888-97.
26. Johnson, R. J.; Kang, D. H.; Feig, D.; Kivlighn, S.; Kanellis, J.; Watanabe, S.; Tuttle, K. R.; Rodriguez-Iturbe, B.; Herrera-Acosta, J.; Mazzali, M., Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *Hypertension* **2003**, *41* (6), 1183-90.
27. Kanellis, J.; Watanabe, S.; Li, J. H.; Kang, D. H.; Li, P.; Nakagawa, T.; Wamsley, A.;

- Sheikh-Hamad, D.; Lan, H. Y.; Feng, L.; Johnson, R. J., Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2. *Hypertension* **2003**, *41* (6), 1287-93.
28. Talaat, K. M.; el-Sheikh, A. R., The effect of mild hyperuricemia on urinary transforming growth factor beta and the progression of chronic kidney disease. *Am J Nephrol* **2007**, *27* (5), 435-40.
29. Chonchol, M.; Shlipak, M. G.; Katz, R.; Sarnak, M. J.; Newman, A. B.; Siscovick, D. S.; Kestenbaum, B.; Carney, J. K.; Fried, L. F., Relationship of uric acid with progression of kidney disease. *Am J Kidney Dis* **2007**, *50* (2), 239-47.
30. Bellomo, G.; Venanzi, S.; Verdura, C.; Saronio, P.; Esposito, A.; Timio, M., Association of uric acid with change in kidney function in healthy normotensive individuals. *Am J Kidney Dis* **2010**, *56* (2), 264-72.
31. Obermayr, R. P.; Temml, C.; Gutjahr, G.; Knechtelsdorfer, M.; Oberbauer, R.; Klausner-Braun, R., Elevated uric acid increases the risk for kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **2008**, *19* (12), 2407-13.
32. Kimura, K.; Hosoya, T.; Uchida, S.; Inaba, M.; Makino, H.; Maruyama, S.; Ito, S.; Yamamoto, T.; Tomino, Y.; Ohno, I.; Shibagaki, Y.; Imuro, S.; Imai, N.; Kuwabara, M.; Hayakawa, H.; Ohtsu, H.; Ohashi, Y.; Kimura, K.; Hosoya, T.; Ito, S.; Inaba, M.; Tomino, Y.; Uchida, S.; Makino, H.; Matsuo, S.; Yamanaka, H.; Yamamoto, T.; Ohno, I.; Shibagaki, Y.; Imuro, S.; Imai, N.; Kuwabara, M.; Hayakawa, H.; Akizawa, T.; Teramoto, T.; Kasanuki, H.; Yoshimura, K.; Kimura, K.; Hosoya, T.; Shibagaki, Y.; Ohno, I.; Sato, H.; Uchida, S.; Horikoshi, S.; Maruyama, S.; Inaba, M.; Moriwaki, Y.; Uchida, H.; Kaneshiro, N.; Imai, N.; Moriya, H.; Komatsu, Y.; Kaname, S.; Hanaoka, K.; Ogura, M.; Ikeda, M.; Kasai, K.; Sugiura, A.; Takahashi, K.; Kojima, K.; Nitta, K.; Tamai, H.; Nagaya, H.; Okuno, S.; Kakiya, R.; Takeoka, H.; Hirata, K.; Asano, K.; Fukaya, Y.; Iwaida, Y.; Tsuneda, Y.; Nishimura, S.; Hiramatsu, T.; Isaka, Y.; Ito, T.; Yuzawa, Y.; Yamagata, K.; Sofue, T.; Jinguji, Y.; Hirano, K.; Matsuyama, K.; Mizumoto, T.; Shibuya, Y.; Sugawara, M.; Kadomura, M.; Teshima, Y.; Ohtani, H.; Kamata, H.; Okawara, S.; Fukushima, M.; Takemura, K.; Kinugasa, E.; Kogure, M.; Ehara, Y., Febuxostat therapy for patients with stage 3 CKD and asymptomatic hyperuricemia: a randomized trial. *American Journal of Kidney Diseases* **2018**, *72* (6), 798-810.
33. Badve, S. V.; Pascoe, E. M.; Tikva, A.; Boudville, N.; Brown, F. G.; Cass, A.; Clarke, P.; Dalbeth, N.; Day, R. O.; De Zoysa, J. R.; Douglas, B.; Faull, R.; Harris, D. C.; Hawley, C. M.; Jones, G. R. D.; Kanellis, J.; Palmer, S. C.; Perkovic, V.; Rangan, G. K.; Reidlinger, D.; Robison, L.; Walker, R. J.; Walters, G.; Johnson, D. W., Effects of allopurinol on the progression of chronic kidney disease. *N Engl J Med* **2020**, *382* (26), 2504-2513.
34. Li, X.; Meng, X.; Timofeeva, M.; Tzoulaki, I.; Tsilidis, K. K.; Ioannidis, P. A.; Campbell, H.; Theodoratou, E., Serum uric acid levels and multiple health outcomes: umbrella review of evidence from observational studies, randomised controlled trials, and Mendelian randomisation studies. *BMJ* **2017**, j2376.

35. The International HapMap Consortium, The International HapMap Project. *Nature* **2003**, *426* (6968), 789-796.
36. The 1000 Genomes Project Consortium, A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* **2010**, *467* (7319), 1061-1073.
37. Fox, C. S.; Larson, M. G.; Leip, E. P.; Culleton, B.; Wilson, P. W.; Levy, D., Predictors of new-onset kidney disease in a community-based population. *JAMA* **2004**, *291* (7), 844-50.
38. Kottgen, A.; Glazer, N. L.; Dehghan, A.; Hwang, S. J.; Katz, R.; Li, M.; Yang, Q.; Gudnason, V.; Launer, L. J.; Harris, T. B.; Smith, A. V.; Arking, D. E.; Astor, B. C.; Boerwinkle, E.; Ehret, G. B.; Ruczinski, I.; Scharpf, R. B.; Chen, Y. D.; de Boer, I. H.; Haritunians, T.; Lumley, T.; Sarnak, M.; Siscovick, D.; Benjamin, E. J.; Levy, D.; Upadhyay, A.; Aulchenko, Y. S.; Hofman, A.; Rivadeneira, F.; Uitterlinden, A. G.; van Duijn, C. M.; Chasman, D. I.; Pare, G.; Ridker, P. M.; Kao, W. H.; Witteman, J. C.; Coresh, J.; Shlipak, M. G.; Fox, C. S., Multiple loci associated with indices of renal function and chronic kidney disease. *Nat Genet* **2009**, *41* (6), 712-7.
39. Kottgen, A.; Pattaro, C.; Boger, C. A.; Fuchsberger, C.; Olden, M.; Glazer, N. L.; Parsa, A.; Gao, X.; Yang, Q.; Smith, A. V.; O'Connell, J. R.; Li, M.; Schmidt, H.; Tanaka, T.; Isaacs, A.; Ketkar, S.; Hwang, S. J.; Johnson, A. D.; Dehghan, A.; Teumer, A.; Pare, G.; Atkinson, E. J.; Zeller, T.; Lohman, K.; Cornelis, M. C.; Probst-Hensch, N. M.; Kronenberg, F.; Tonjes, A.; Hayward, C.; Aspelund, T.; Eiriksdottir, G.; Launer, L. J.; Harris, T. B.; Rampersaud, E.; Mitchell, B. D.; Arking, D. E.; Boerwinkle, E.; Struchalin, M.; Cavalieri, M.; Singleton, A.; Giallauria, F.; Metter, J.; de Boer, I. H.; Haritunians, T.; Lumley, T.; Siscovick, D.; Psaty, B. M.; Zillikens, M. C.; Oostra, B. A.; Feitosa, M.; Province, M.; de Andrade, M.; Turner, S. T.; Schillert, A.; Ziegler, A.; Wild, P. S.; Schnabel, R. B.; Wilde, S.; Munzel, T. F.; Leak, T. S.; Illig, T.; Klopp, N.; Meisinger, C.; Wichmann, H. E.; Koenig, W.; Zgaga, L.; Zemunik, T.; Kolcic, I.; Minelli, C.; Hu, F. B.; Johansson, A.; Igl, W.; Zaboli, G.; Wild, S. H.; Wright, A. F.; Campbell, H.; Ellinghaus, D.; Schreiber, S.; Aulchenko, Y. S.; Felix, J. F.; Rivadeneira, F.; Uitterlinden, A. G.; Hofman, A.; Imboden, M.; Nitsch, D.; Brandstatter, A.; Kollerits, B.; Kedenko, L.; Magi, R.; Stumvoll, M.; Kovacs, P.; Boban, M.; Campbell, S.; Endlich, K.; Volzke, H.; Kroemer, H. K.; Nauck, M.; Volker, U.; Polasek, O.; Vitart, V.; Badola, S.; Parker, A. N.; Ridker, P. M.; Kardia, S. L.; Blankenberg, S.; Liu, Y.; Curhan, G. C.; Franke, A.; Rochat, T.; Paulweber, B.; Prokopenko, I.; Wang, W.; Gudnason, V.; Shuldiner, A. R.; Coresh, J.; Schmidt, R.; Ferrucci, L.; Shlipak, M. G.; van Duijn, C. M.; Borecki, I.; Kramer, B. K.; Rudan, I.; Gyllenstein, U.; Wilson, J. F.; Witteman, J. C.; Pramstaller, P. P.; Rettig, R.; Hastie, N.; Chasman, D. I.; Kao, W. H.; Heid, I. M.; Fox, C. S., New loci associated with kidney function and chronic kidney disease. *Nat Genet* **2010**, *42* (5), 376-84.
40. Lander, E. S., The new genomics: global views of biology. *Science* **1996**, *274* (5287), 536-9.
41. Wuttke, M.; Li, Y.; Li, M.; Sieber, K. B.; Feitosa, M. F.; Gorski, M.; Tin, A.; Wang, L.; Chu, A. Y.; Hoppmann, A.; Kirsten, H.; Giri, A.; Chai, J. F.; Sveinbjornsson, G.; Tayo, B. O.; Nutile, T.; Fuchsberger, C.; Marten, J.; Cocca, M.; Ghasemi, S.; Xu, Y.; Horn, K.; Noce, D.; van

der Most, P. J.; Sedaghat, S.; Yu, Z.; Akiyama, M.; Afaq, S.; Ahluwalia, T. S.; Almgren, P.; Amin, N.; Arnlov, J.; Bakker, S. J. L.; Bansal, N.; Baptista, D.; Bergmann, S.; Biggs, M. L.; Biino, G.; Boehnke, M.; Boerwinkle, E.; Boissel, M.; Bottinger, E. P.; Boutin, T. S.; Brenner, H.; Brumat, M.; Burkhardt, R.; Butterworth, A. S.; Campana, E.; Campbell, A.; Campbell, H.; Canouil, M.; Carroll, R. J.; Catamo, E.; Chambers, J. C.; Chee, M. L.; Chee, M. L.; Chen, X.; Cheng, C. Y.; Cheng, Y.; Christensen, K.; Cifkova, R.; Ciullo, M.; Concas, M. P.; Cook, J. P.; Coresh, J.; Corre, T.; Sala, C. F.; Cusi, D.; Danesh, J.; Daw, E. W.; de Borst, M. H.; De Grandi, A.; de Mutsert, R.; de Vries, A. P. J.; Degenhardt, F.; Delgado, G.; Demirkan, A.; Di Angelantonio, E.; Dittrich, K.; Divers, J.; Dorajoo, R.; Eckardt, K. U.; Ehret, G.; Elliott, P.; Endlich, K.; Evans, M. K.; Felix, J. F.; Foo, V. H. X.; Franco, O. H.; Franke, A.; Freedman, B. I.; Freitag-Wolf, S.; Friedlander, Y.; Froguel, P.; Gansevoort, R. T.; Gao, H.; Gasparini, P.; Gaziano, J. M.; Giedraitis, V.; Gieger, C.; Girotto, G.; Giulianini, F.; Gogele, M.; Gordon, S. D.; Gudbjartsson, D. F.; Gudnason, V.; Haller, T.; Hamet, P.; Harris, T. B.; Hartman, C. A.; Hayward, C.; Hellwege, J. N.; Heng, C. K.; Hicks, A. A.; Hofer, E.; Huang, W.; Hutri-Kahonen, N.; Hwang, S. J.; Ikram, M. A.; Indridason, O. S.; Ingelsson, E.; Ising, M.; Jaddoe, V. W. V.; Jakobsdottir, J.; Jonas, J. B.; Joshi, P. K.; Josyula, N. S.; Jung, B.; Kahonen, M.; Kamatani, Y.; Kammerer, C. M.; Kanai, M.; Kastarinen, M.; Kerr, S. M.; Khor, C. C.; Kiess, W.; Kleber, M. E.; Koenig, W.; Kooner, J. S.; Korner, A.; Kovacs, P.; Kraja, A. T.; Krajcoviechova, A.; Kramer, H.; Kramer, B. K.; Kronenberg, F.; Kubo, M.; Kuhnel, B.; Kuokkanen, M.; Kuusisto, J.; La Bianca, M.; Laakso, M.; Lange, L. A.; Langefeld, C. D.; Lee, J. J.; Lehne, B.; Lehtimaki, T.; Lieb, W.; Lifelines Cohort, S.; Lim, S. C.; Lind, L.; Lindgren, C. M.; Liu, J.; Liu, J.; Loeffler, M.; Loos, R. J. F.; Lucae, S.; Lukas, M. A.; Lyytikainen, L. P.; Magi, R.; Magnusson, P. K. E.; Mahajan, A.; Martin, N. G.; Martins, J.; Marz, W.; Mascalzoni, D.; Matsuda, K.; Meisinger, C.; Meitinger, T.; Melander, O.; Metspalu, A.; Mikaelsdottir, E. K.; Milanese, Y.; Miliku, K.; Mishra, P. P.; Program, V. A. M. V.; Mohlke, K. L.; Mononen, N.; Montgomery, G. W.; Mook-Kanamori, D. O.; Mychaleckyj, J. C.; Nadkarni, G. N.; Nalls, M. A.; Nauck, M.; Nikus, K.; Ning, B.; Nolte, I. M.; Noordam, R.; O'Connell, J.; O'Donoghue, M. L.; Olafsson, I.; Oldehinkel, A. J.; Orho-Melander, M.; Ouwehand, W. H.; Padmanabhan, S.; Palmer, N. D.; Palsson, R.; Penninx, B.; Perls, T.; Perola, M.; Pirastu, M.; Pirastu, N.; Pistis, G.; Podgornaia, A. I.; Polasek, O.; Ponte, B.; Porteous, D. J.; Poulain, T.; Pramstaller, P. P.; Preuss, M. H.; Prins, B. P.; Province, M. A.; Rabelink, T. J.; Raffield, L. M.; Raitakari, O. T.; Reilly, D. F.; Rettig, R.; Rheinberger, M.; Rice, K. M.; Ridker, P. M.; Rivadeneira, F.; Rizzi, F.; Roberts, D. J.; Robino, A.; Rossing, P.; Rudan, I.; Rueedi, R.; Ruggiero, D.; Ryan, K. A.; Saba, Y.; Sabanayagam, C.; Salomaa, V.; Salvi, E.; Saum, K. U.; Schmidt, H.; Schmidt, R.; Schottker, B.; Schulz, C. A.; Schupf, N.; Shaffer, C. M.; Shi, Y.; Smith, A. V.; Smith, B. H.; Soranzo, N.; Spracklen, C. N.; Strauch, K.; Stringham, H. M.; Stumvoll, M.; Svensson, P. O.; Szymczak, S.; Tai, E. S.; Tajuddin, S. M.; Tan, N. Y. Q.; Taylor, K. D.; Teren, A.; Tham, Y. C.; Thiery, J.; Thio, C. H. L.; Thomsen, H.; Thorleifsson, G.; Toniolo, D.; Tonjes, A.; Tremblay, J.; Tzoulaki, I.; Uitterlinden, A. G.; Vaccargiu, S.; van Dam, R. M.; van der Harst, P.; van Duijn, C. M.;

Velez Edward, D. R.; Verweij, N.; Vogelesang, S.; Volker, U.; Vollenweider, P.; Waeber, G.; Waldenberger, M.; Wallentin, L.; Wang, Y. X.; Wang, C.; Waterworth, D. M.; Bin Wei, W.; White, H.; Whitfield, J. B.; Wild, S. H.; Wilson, J. F.; Wojczynski, M. K.; Wong, C.; Wong, T. Y.; Xu, L.; Yang, Q.; Yasuda, M.; Yerges-Armstrong, L. M.; Zhang, W.; Zonderman, A. B.; Rotter, J. I.; Bochud, M.; Psaty, B. M.; Vitart, V.; Wilson, J. G.; Dehghan, A.; Parsa, A.; Chasman, D. I.; Ho, K.; Morris, A. P.; Devuyst, O.; Akilesh, S.; Pendergrass, S. A.; Sim, X.; Boger, C. A.; Okada, Y.; Edwards, T. L.; Snieder, H.; Stefansson, K.; Hung, A. M.; Heid, I. M.; Scholz, M.; Teumer, A.; Kottgen, A.; Pattaro, C., A catalog of genetic loci associated with kidney function from analyses of a million individuals. *Nat Genet* **2019**, *51* (6), 957-972.

42. Matsuo, H.; Nakayama, A.; Sakiyama, M.; Chiba, T.; Shimizu, S.; Kawamura, Y.; Nakashima, H.; Nakamura, T.; Takada, Y.; Oikawa, Y.; Takada, T.; Nakaoka, H.; Abe, J.; Inoue, H.; Wakai, K.; Kawai, S.; Guang, Y.; Nakagawa, H.; Ito, T.; Niwa, K.; Yamamoto, K.; Sakurai, Y.; Suzuki, H.; Hosoya, T.; Ichida, K.; Shimizu, T.; Shinomiya, N., ABCG2 dysfunction causes hyperuricemia due to both renal urate underexcretion and renal urate overload. *Sci Rep* **2014**, *4*, 3755.

43. 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.; 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* **2009**, *1* (5), 5ra11.

44. Matsuo, H.; Ichida, K.; Takada, T.; Nakayama, A.; Nakashima, H.; Nakamura, T.; Kawamura, Y.; Takada, Y.; Yamamoto, K.; Inoue, H.; Oikawa, Y.; Naito, M.; Hishida, A.; Wakai, K.; Okada, C.; Shimizu, S.; Sakiyama, M.; Chiba, T.; Ogata, H.; Niwa, K.; Hosoyamada, M.; Mori, A.; Hamajima, N.; Suzuki, H.; Kanai, Y.; Sakurai, Y.; Hosoya, T.; Shimizu, T.; Shinomiya, N., Common dysfunctional variants in ABCG2 are a major cause of early-onset gout. *Sci Rep* **2013**, *3*, 2014.

45. Sarkadi, B.; Homolya, L.; Hegedus, T., The ABCG2/BCRP transporter and its variants - from structure to pathology. *FEBS Lett* **2020**, *594* (23), 4012-4034.

46. Huls, M.; Brown, C. D.; Windass, A. S.; Sayer, R.; van den Heuvel, J. J.; Heemskerk, S.; Russel, F. G.; Masereeuw, R., The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane. *Kidney Int* **2008**, *73* (2), 220-5.

47. Maliepaard, M.; Scheffer, G. L.; Faneyte, I. F.; van Gastelen, M. A.; Pijnenborg, A. C.; Schinkel, A. H.; van De Vijver, M. J.; Scheper, R. J.; Schellens, J. H., Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* **2001**, *61* (8), 3458-64.

48. Vlaming, M. L.; Lagas, J. S.; Schinkel, A. H., Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in Abcg2 knockout mice. *Adv Drug Deliv Rev* **2009**, *61* (1), 14-25.

49. Robey, R. W.; To, K. K.; Polgar, O.; Dohse, M.; Fetsch, P.; Dean, M.; Bates, S. E., ABCG2: a perspective. *Adv Drug Deliv Rev* **2009**, *61* (1), 3-13.
50. Maekawa, K.; Itoda, M.; Sai, K.; Saito, Y.; Kaniwa, N.; Shirao, K.; Hamaguchi, T.; Kunitoh, H.; Yamamoto, N.; Tamura, T.; Minami, H.; Kubota, K.; Ohtsu, A.; Yoshida, T.; Saijo, N.; Kamatani, N.; Ozawa, S.; Sawada, J., Genetic variation and haplotype structure of the ABC transporter gene ABCG2 in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet* **2006**, *21* (2), 109-21.
51. Yamasaki, Y.; Ieiri, I.; Kusuhara, H.; Sasaki, T.; Kimura, M.; Tabuchi, H.; Ando, Y.; Irie, S.; Ware, J.; Nakai, Y.; Higuchi, S.; Sugiyama, Y., Pharmacogenetic characterization of sulfasalazine disposition based on NAT2 and ABCG2 (BCRP) gene polymorphisms in humans. *Clin Pharmacol Ther* **2008**, *84* (1), 95-103.
52. Kesitalo, J. E.; Zolk, O.; Fromm, M. F.; Kurkinen, K. J.; Neuvonen, P. J.; Niemi, M., ABCG2 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther* **2009**, *86* (2), 197-203.
53. Merino, G.; Alvarez, A. I.; Pulido, M. M.; Molina, A. J.; Schinkel, A. H.; Prieto, J. G., Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion. *Drug Metab Dispos* **2006**, *34* (4), 690-5.
54. Sparreboom, A.; Gelderblom, H.; Marsh, S.; Ahluwalia, R.; Obach, R.; Principe, P.; Twelves, C.; Verweij, J.; McLeod, H. L., Diflomotecan pharmacokinetics in relation to ABCG2 421C>A genotype. *Clin Pharmacol Ther* **2004**, *76* (1), 38-44.
55. Woodward, O. M.; Kottgen, A.; Coresh, J.; Boerwinkle, E.; Guggino, W. B.; Kottgen, M., Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106* (25), 10338-42.
56. Matsuo, H.; Tsunoda, T.; Ooyama, K.; Sakiyama, M.; Sogo, T.; Takada, T.; Nakashima, A.; Nakayama, A.; Kawaguchi, M.; Higashino, T.; Wakai, K.; Ooyama, H.; Hokari, R.; Suzuki, H.; Ichida, K.; Inui, A.; Fujimori, S.; Shinomiya, N., Hyperuricemia in acute gastroenteritis is caused by decreased urate excretion via ABCG2. *Sci Rep* **2016**, *6*, 31003.
57. Nakayama, A.; Matsuo, H.; Nakaoka, H.; Nakamura, T.; Nakashima, H.; Takada, Y.; Oikawa, Y.; Takada, T.; Sakiyama, M.; Shimizu, S.; Kawamura, Y.; Chiba, T.; Abe, J.; Wakai, K.; Kawai, S.; Okada, R.; Tamura, T.; Shichijo, Y.; Akashi, A.; Suzuki, H.; Hosoya, T.; Sakurai, Y.; Ichida, K.; Shinomiya, N., Common dysfunctional variants of ABCG2 have stronger impact on hyperuricemia progression than typical environmental risk factors. *Scientific Reports* **2015**, *4* (1).
58. Oda, M.; Satta, Y.; Takenaka, O.; Takahata, N., Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications. *Mol Biol Evol* **2002**, *19* (5), 640-53.
59. 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.; Endou, H., Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* **2002**, *417* (6887), 447-52.

60. 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.; Nagaraja, R., The GLUT9 gene is associated with serum uric acid levels in Sardinia and Chianti cohorts. *PLoS Genet* **2007**, *3* (11), e194.
61. Anzai, N.; Ichida, K.; Jutabha, P.; Kimura, T.; Babu, E.; Jin, C. J.; Srivastava, S.; Kitamura, K.; Hisatome, I.; Endou, H.; Sakurai, H., Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter URATv1 (SLC2A9) in humans. *J Biol Chem* **2008**, *283* (40), 26834-8.
62. 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 urate excretion is a common cause of hyperuricemia. *Nat Commun* **2012**, *3*, 764.
63. Braga, T. T.; Forni, M. F.; Correa-Costa, M.; Ramos, R. N.; Barbuto, J. A.; Branco, P.; Castoldi, A.; Hiyane, M. I.; Davanso, M. R.; Latz, E.; Franklin, B. S.; Kowaltowski, A. J.; Camara, N. O., Soluble uric acid activates the NLRP3 inflammasome. *Sci Rep* **2017**, *7*, 39884.
64. Moe, O. W., A generic crystallopathic model for chronic kidney disease progression. *J Clin Invest* **2021**, *131* (16).
65. Hong, Y. J.; Yang, S. Y.; Nam, M. H.; Koo, Y. C.; Lee, K. W., Caffeic acid inhibits the uptake of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) by inducing the efflux transporters expression in Caco-2 cells. *Biol Pharm Bull* **2015**, *38* (2), 201-7.
66. Takada, T.; Yamamoto, T.; Matsuo, H.; Tan, J. K.; Ooyama, K.; Sakiyama, M.; Miyata, H.; Yamanashi, Y.; Toyoda, Y.; Higashino, T.; Nakayama, A.; Nakashima, A.; Shinomiya, N.; Ichida, K.; Ooyama, H.; Fujimori, S.; Suzuki, H., Identification of ABCG2 as an exporter of uremic toxin indoxyl sulfate in mice and as a crucial factor influencing CKD progression. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 11147.
67. Matsuo, S.; Imai, E.; Horio, M.; Yasuda, Y.; Tomita, K.; Nitta, K.; Yamagata, K.; Tomino, Y.; Yokoyama, H.; Hishida, A.; Collaborators developing the Japanese equation for estimated, G. F. R., Revised equations for estimated GFR from serum creatinine in Japan. *Am J Kidney Dis* **2009**, *53* (6), 982-92.
68. Inker, L. A.; Astor, B. C.; Fox, C. H.; Isakova, T.; Lash, J. P.; Peralta, C. A.; Kurella Tamura, M.; Feldman, H. I., KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. *Am J Kidney Dis* **2014**, *63* (5), 713-35.
69. Fitzgerald, J. D.; Dalbeth, N.; Mikuls, T.; Brignardello - Petersen, R.; Guyatt, G.; Abeles, A. M.; Gelber, A. C.; Harrold, L. R.; Khanna, D.; King, C.; Levy, G.; Libbey, C.; Mount, D.; Pillinger, M. H.; Rosenthal, A.; Singh, J. A.; Sims, J. E.; Smith, B. J.; Wenger, N. S.; Bae, S. S.; Danve, A.; Khanna, P. P.; Kim, S. C.; Lenert, A.; Poon, S.; Qasim, A.; Sehra, S. T.; Sharma, T. S. K.; Toprover, M.; Turgunbaev, M.; Zeng, L.; Zhang, M. A.; Turner, A. S.; Neogi, T., 2020 American

college of rheumatology guideline for the management of gout. *Arthritis Care & Research* **2020**, *72* (6), 744-760.

70. Perkovic, V.; Craig, J. C.; Chailimpamontree, W.; Fox, C. S.; Garcia-Garcia, G.; Benghanem Gharbi, M.; Jardine, M. J.; Okpechi, I. G.; Pannu, N.; Stengel, B.; Tuttle, K. R.; Uhlig, K.; Levey, A. S., Action plan for optimizing the design of clinical trials in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl (2011)* **2017**, *7*(2), 138-144.

71. Palmer, S. C.; Sciancalepore, M.; Strippoli, G. F., Trial quality in nephrology: how are we measuring up? *Am J Kidney Dis* **2011**, *58* (3), 335-7.

72. Biomarkers Definitions Working, G., Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* **2001**, *69* (3), 89-95.

73. Baigent, C.; Herrington, W. G.; Coresh, J.; Landray, M. J.; Levin, A.; Perkovic, V.; Pfeffer, M. A.; Rossing, P.; Walsh, M.; Wanner, C.; Wheeler, D. C.; Winkelmayer, W. C.; McMurray, J. J. V.; KDIGO Controversies Conference on Challenges in the Conduct of Clinical Trials in Nephrology Conference Participants, Challenges in conducting clinical trials in nephrology: conclusions from a Kidney Disease-Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int* **2017**, *92* (2), 297-305.

74. Austin, P. C., Optimal caliper widths for propensity-score matching when estimating differences in means and differences in proportions in observational studies. *Pharm Stat* **2011**, *10* (2), 150-61.

75. Takae, K.; Nagata, M.; Hata, J.; Mukai, N.; Hirakawa, Y.; Yoshida, D.; Kishimoto, H.; Tsuruya, K.; Kitazono, T.; Kiyohara, Y.; Ninomiya, T., Serum uric acid as a risk factor for chronic kidney disease in a Japanese community- the Hisayama study. *Circ J* **2016**, *80* (8), 1857-62.

76. Kohagura, K.; Kochi, M.; Miyagi, T.; Kinjyo, T.; Maehara, Y.; Nagahama, K.; Sakima, A.; Iseki, K.; Ohya, Y., An association between uric acid levels and renal arteriopathy in chronic kidney disease: a biopsy-based study. *Hypertens Res* **2013**, *36* (1), 43-9.

77. Hisatome, I.; Ichida, K.; Mineo, I.; Ohtahara, A.; Ogino, K.; Kuwabara, M.; Ishizaka, N.; Uchida, S.; Kurajoh, M.; Kohagura, K.; Sato, Y.; Taniguchi, A.; Tsuchihashi, T.; Terai, C.; Nakamura, T.; Hamaguchi, T.; Hamada, T.; Fujimori, S.; Masuda, I.; Moriwaki, Y.; Yamamoto, T., Japanese Society of Gout and Uric & Nucleic Acids 2019 guidelines for management of hyperuricemia and gout 3rd edition. *Gout and Uric & Nucleic Acids* **2020**, *44* (Supplement), sp-1-sp-40.

78. Toyoda, Y.; Pavelcová, K.; Bohatá, J.; Ješina, P.; Kubota, Y.; Suzuki, H.; Takada, T.; Stiburkova, B., Identification of two dysfunctional variants in the ABCG2 urate transporter associated with pediatric-onset of familial hyperuricemia and early-onset gout. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22* (4), 1935.

79. Toyoda, Y.; Mancikova, A.; Krylov, V.; Morimoto, K.; Pavelcova, K.; Bohata, J.; Pavelka, K.; Pavlikova, M.; Suzuki, H.; Matsuo, H.; Takada, T.; Stiburkova, B., Functional characterization of clinically-relevant rare variants in ABCG2 identified in a gout and hyperuricemia cohort. *Cells* **2019**, *8*

(4).

80. Yu, H.; Liu, X.; Song, Y.; Cheng, J.; Bao, H.; Qin, L.; Zhou, X.; Wang, L.; Peng, A., Safety and efficacy of benzbromarone and febuxostat in hyperuricemia patients with chronic kidney disease: a prospective pilot study. *Clinical and Experimental Nephrology* **2018**, *22* (6), 1324-1330.
81. Chou, H.-W.; Chiu, H.-T.; Tsai, C.-W.; Ting, I. W.; Yeh, H.-C.; Huang, H.-C.; Kuo, C.-C., Comparative effectiveness of allopurinol, febuxostat and benzbromarone on renal function in chronic kidney disease patients with hyperuricemia: a 13-year inception cohort study. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2017**.
82. Niwa, T.; Miyazaki, T.; Hashimoto, N.; Hayashi, H.; Ise, M.; Uehara, Y.; Maeda, K., Suppressed serum and urine levels of indoxyl sulfate by oral sorbent in experimental uremic rats. *Am J Nephrol* **1992**, *12* (4), 201-6.
83. Miyazaki, T.; Aoyama, I.; Ise, M.; Seo, H.; Niwa, T., An oral sorbent reduces overload of indoxyl sulphate and gene expression of TGF-beta1 in uraemic rat kidneys. *Nephrol Dial Transplant* **2000**, *15* (11), 1773-81.
84. Enomoto, A.; Takeda, M.; Tojo, A.; Sekine, T.; Cha, S. H.; Khamdang, S.; Takayama, F.; Aoyama, I.; Nakamura, S.; Endou, H.; Niwa, T., Role of organic anion transporters in the tubular transport of indoxyl sulfate and the induction of its nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* **2002**, *13* (7), 1711-20.
85. Niwa, T.; Ise, M., Indoxyl sulfate, a circulating uremic toxin, stimulates the progression of glomerular sclerosis. *J Lab Clin Med* **1994**, *124* (1), 96-104.
86. Cao, X. S.; Chen, J.; Zou, J. Z.; Zhong, Y. H.; Teng, J.; Ji, J.; Chen, Z. W.; Liu, Z. H.; Shen, B.; Nie, Y. X.; Lv, W. L.; Xiang, F. F.; Tan, X.; Ding, X. Q., Association of indoxyl sulfate with heart failure among patients on hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol* **2015**, *10* (1), 111-9.
87. Vanholder, R.; Schepers, E.; Pletinck, A.; Nagler, E. V.; Glorieux, G., The uremic toxicity of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate: a systematic review. *J Am Soc Nephrol* **2014**, *25* (9), 1897-907.
88. Nangaku, M.; Mimura, I.; Yamaguchi, J.; Higashijima, Y.; Wada, T.; Tanaka, T., Role of uremic toxins in erythropoiesis-stimulating agent resistance in chronic kidney disease and dialysis patients. *J Ren Nutr* **2015**, *25* (2), 160-3.
89. Shimizu, H.; Bolati, D.; Adijiang, A.; Enomoto, A.; Nishijima, F.; Dateki, M.; Niwa, T., Senescence and dysfunction of proximal tubular cells are associated with activated p53 expression by indoxyl sulfate. *Am J Physiol Cell Physiol* **2010**, *299* (5), C1110-7.
90. Shimizu, H.; Bolati, D.; Adijiang, A.; Muteliefu, G.; Enomoto, A.; Nishijima, F.; Dateki, M.; Niwa, T., NF-kappaB plays an important role in indoxyl sulfate-induced cellular senescence, fibrotic gene expression, and inhibition of proliferation in proximal tubular cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **2011**, *301* (5), C1201-12.
91. Saito, S.; Shimizu, H.; Yisireyili, M.; Nishijima, F.; Enomoto, A.; Niwa, T., Indoxyl sulfate-induced activation of (pro)renin receptor is involved in expression of TGF-beta1 and alpha-smooth

- muscle actin in proximal tubular cells. *Endocrinology* **2014**, *155* (5), 1899-907.
92. Saito, S.; Yisireyili, M.; Shimizu, H.; Ng, H. Y.; Niwa, T., Indoxyl sulfate upregulates prorenin expression via nuclear factor-kappaB p65, signal transducer and activator of transcription 3, and reactive oxygen species in proximal tubular cells. *J Ren Nutr* **2015**, *25* (2), 145-8.
93. Nakashima, A.; Ichida, K.; Ohkido, I.; Yokoyama, K.; Matsuo, H.; Ohashi, Y.; Takada, T.; Nakayama, A.; Suzuki, H.; Shinomiya, N.; Urashima, M.; Yokoo, T., Dysfunctional ABCG2 gene polymorphisms are associated with serum uric acid levels and all-cause mortality in hemodialysis patients. *Hum Cell* **2020**, *33* (3), 559-568.
94. Miyata, H.; Takada, T.; Toyoda, Y.; Matsuo, H.; Ichida, K.; Suzuki, H., Identification of febuxostat as a new strong ABCG2 inhibitor: potential applications and risks in clinical situations. *Front Pharmacol* **2016**, *7*, 518.
95. Lehtisalo, M.; Keskitalo, J. E.; Tornio, A.; Lapatto-Reiniluoto, O.; Deng, F.; Jaatinen, T.; Viinamaki, J.; Neuvonen, M.; Backman, J. T.; Niemi, M., Febuxostat, but not allopurinol, markedly raises the plasma concentrations of the breast cancer resistance protein substrate rosuvastatin. *Clin Transl Sci* **2020**, *13* (6), 1236-1243.
96. Heyes, N.; Kapoor, P.; Kerr, I. D., Polymorphisms of the multidrug pump ABCG2: a systematic review of their effect on protein expression, function, and drug pharmacokinetics. *Drug Metabolism and Disposition* **2018**, *46* (12), 1886-1899.
97. Higashino, T.; Takada, T.; Nakaoka, H.; Toyoda, Y.; Stiburkova, B.; Miyata, H.; Ikebuchi, Y.; Nakashima, H.; Shimizu, S.; Kawaguchi, M.; Sakiyama, M.; Nakayama, A.; Akashi, A.; Tanahashi, Y.; Kawamura, Y.; Nakamura, T.; Wakai, K.; Okada, R.; Yamamoto, K.; Hosomichi, K.; Hosoya, T.; Ichida, K.; Ooyama, H.; Suzuki, H.; Inoue, I.; Merriman, T. R.; Shinomiya, N.; Matsuo, H., Multiple common and rare variants of ABCG2 cause gout. *RMD Open* **2017**, *3* (2), e000464.
98. Fujita, S.; Kashiwagi, H.; Tomimatsu, T.; Ito, S.; Mimura, K.; Kanagawa, T.; Endo, M.; Miyoshi, T.; Okamura, Y.; Tani, Y.; Tomiyama, Y.; Kimura, T., Expression levels of ABCG2 on cord red blood cells and study of fetal anemia associated with anti-Jr(a). *Transfusion* **2016**, *56* (5), 1171-81.
99. Hernandez Lozano, I.; Bauer, M.; Wulkersdorfer, B.; Traxl, A.; Philippe, C.; Weber, M.; Hausler, S.; Stieger, B.; Jager, W.; Mairinger, S.; Wanek, T.; Hacker, M.; Zeitlinger, M.; Langer, O., Measurement of hepatic ABCB1 and ABCG2 transport activity with [¹¹C]tariquidar and PET in humans and mice. *Mol Pharm* **2020**, *17* (1), 316-326.