

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月22日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22890003

研究課題名（和文）尿酸排泄トランスポータBCRPのジスルフィド結合に着眼した痛風発症機構の解明

研究課題名（英文）Effect of oxidative stress on disulfide bond formation of uric acid efflux transporter BCRP

研究代表者 小倉 次郎 (OGURA JIRO)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：20580640

研究成果の概要（和文）：

本研究では、酸化ストレスが尿酸排泄トランスポータ BCRP へ与える影響を明らかにすることとした。加齢性の酸化ストレスはキサンチンオキシダーゼに由来するため、その基質を用いて BCRP 発現量への影響を検討した。その結果、キサンチンオキシダーゼ活性化はヒト消化管モデル Caco-2 細胞の BCRP S-S bond 形成を低下させる一方、ヒト腎由来 HK-2 細胞の S-S bond には影響しなかった。このことから、酸化ストレスによる尿酸排泄への影響は臓器により異なることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated that oxidative stress affected BCRP expression, which is a uric acid efflux transporter. It has known that aging-induced oxidative stress is caused by activation of xanthine oxidase. Thus, we used the substrates of xanthine oxidase in this study. In Caco-2 cells, the activation of xanthine oxidase was suppressed the BCRP S-S bond formation, but not in HK-2 cells. These results suggest that the effect of oxidative stress on the efflux of uric acid is different between intestine and kidney.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：応用薬理学

キーワード：痛風・キサンチンオキシダーゼ・活性酸素・トランスポータ・ジスルフィド結合

1. 研究開始当初の背景

近年、医療の目覚ましい発展により平均寿命が大幅に延長し、世界的な高齢化社会を迎えている。特に我が国は世界に類を見ない水準で高齢化が進んでおり、2050年に高齢化率が約40%という超高齢化社会へ突入する

と予測されている。こうした中、生活習慣病などの加齢性疾患患者が増加し、その根治療法の確立、患者の QOL の改善が望まれている。代表的な生活習慣病である痛風は、激しい関節痛を生じ、さらには高血圧や腎臓病など重篤な合併症を引き起こす。このため、患

者の QOL の低下が著しく、効果的な治療法、予防法の確立が早急に望まれる疾患である。

痛風の発症頻度は加齢により増加することが知られおり [Mikuls TR. et al. *Ann. Rheum. Dis.* (2005)]、加齢による何らかの生体変化が痛風発症に寄与していると考えられる。痛風発症の原因タンパク質は長らく不明であったが、2008 年、BCRP の輸送活性を低下させる一遺伝子多型 (SNPs) である Q141K などが痛風の原因として報告された [Dehghan A. et al. *Lancet* (2008)]。さらに 2009 年、BCRP が尿酸を輸送すること [Woodward OM. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2009)]、痛風患者の 8 割に BCRP の機能低下が見られることが明らかとされた [Matsuo H. et al. *Sci. Transl. Med.* (2009)]。このように BCRP の輸送活性の低下は痛風発症と密接に関連していることが、徐々に明らかになってきた。しかしながら、加齢による BCRP 機能への影響など痛風発症機構には依然として不明な点が多い。

BCRP は代表的な ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターのひとつであり、ATP の加水分解エネルギーを利用して物質の細胞内から細胞外への輸送を担っている。多くの ABC トランスポーターは 2 つの ATPase site を持つ 12 回膜貫通型タンパク質であるのに対し、BCRP は 1 つの ATPase site を持つ 6 回膜貫通型タンパク質である。このため、BCRP は Cys603 に S-S bond を形成し、homodimer として機能している。一般にタンパク質の S-S bond は酸化還元反応により形成され、S-S bond 形成は細胞内の酸化還元状態と深く関連していると考えられる。加齢時には活性酸素の産生量が増大し、生体の酸化還元状態が変化する。BCRP は特徴的な S-S bond 形成を行うため、この加齢による酸化還元状態の変化に影響される可能性が高いと考えた。

2. 研究の目的

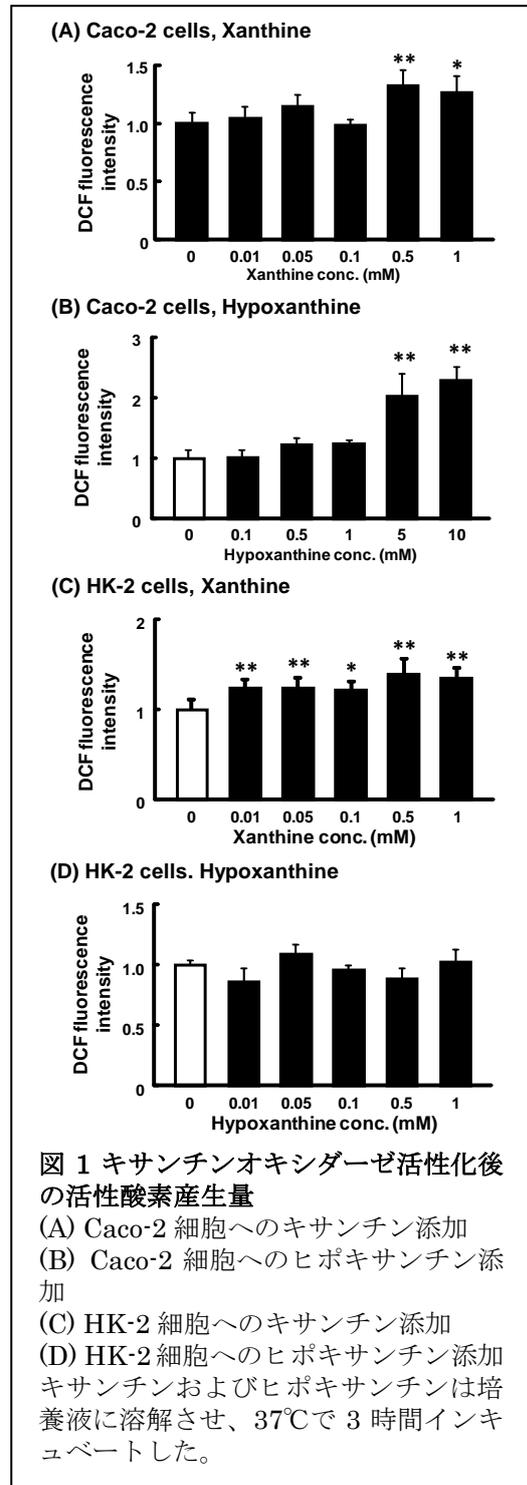
本研究では、活性酸素産生の増大が尿酸排泄トランスポーター BCRP へ与える影響を S-S bond 形成に着目して明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

加齢による酸化ストレスはキサンチンオキシダーゼ活性化に由来することから、その基質となるキサンチン、ヒポキサンチンを用いて、BCRP 発現量への影響を S-S bond 形成に着目して検討した。体内で合成された尿酸の 2/3 は腎臓から、1/3 は小腸から排泄される。そこで、本研究ではヒト正常腎細胞である HK-2 細胞ならびに消化管モデルとして汎用される Caco-2 細胞を用いた。

4. 研究成果

初めに、キサンチン、ヒポキサンチン添加により活性酸素が産生されているか否かを検討した。その結果、Caco-2 細胞では、キサンチンおよびヒポキサンチン添加により活性酸素の産生量は増大した (図 1A, 1B)。しかしながら、HK-2 細胞では、キサンチン添加により活性酸素の産生量は増大したが、ヒポキサンチン添加において活性酸素の産生量増大は見られなかった (図 1C, 1D)。



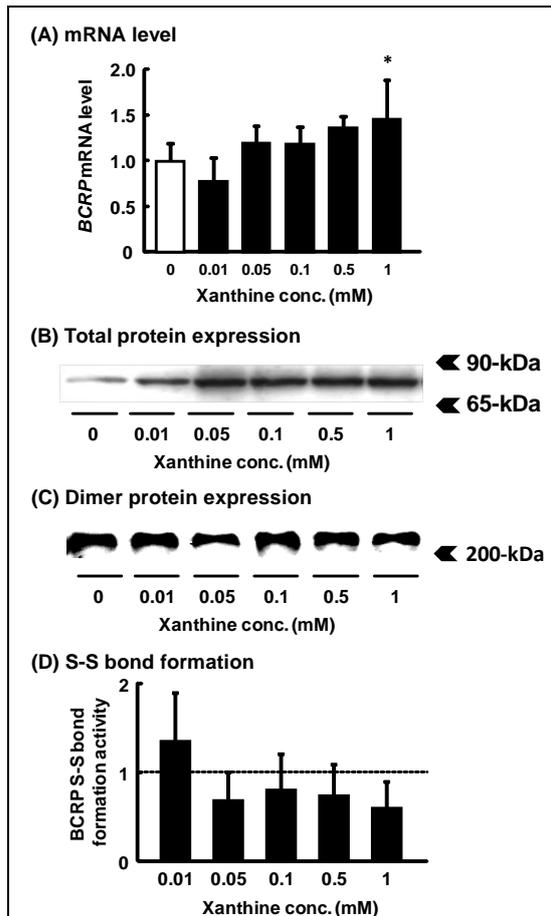


図 2 Caco-2 細胞におけるキサンチン添加後の BCRP 発現量

- (A) mRNA 量
 (B) 全 BCRP タンパク質発現量
 (C) BCRP dimer 発現量
 (D) BCRP S-S bond 形成

キサンチンは培養液に溶解させ、37°C で 3 時間インキュベートした。

次に、キサンチン、ヒポキサンチン添加による BCRP mRNA 量、タンパク質発現量、S-S bond 形成能を検討した。なお、S-S bond 形成能は、全 BCRP 発現量に対するダイマー量の比をとることで評価した。Caco-2 細胞では、キサンチン添加により BCRP の mRNA 量 (図 2A) およびタンパク質発現量 (図 2B) は濃度依存的に増加した。しかしながら、BCRP のダイマー量に変動はなく (図 2C)、S-S bond 形成能は低下した (図 2D)。また、活性酸素種のひとつである過酸化水素、及びキサンチンオキシダーゼ活性化の最終代謝物である尿酸は BCRP の mRNA 量に影響を与えなかったことから、キサンチン添加による BCRP の mRNA 量の変動は、キサンチンオキシダーゼ活性化によるものではなく、キサンチン自体によるものであると推察された。さらに、ヒポキサンチン添加では、BCRP の mRNA 量及びタンパク質発現量に変動は見られなかった。一方、BCRP のダイマー量

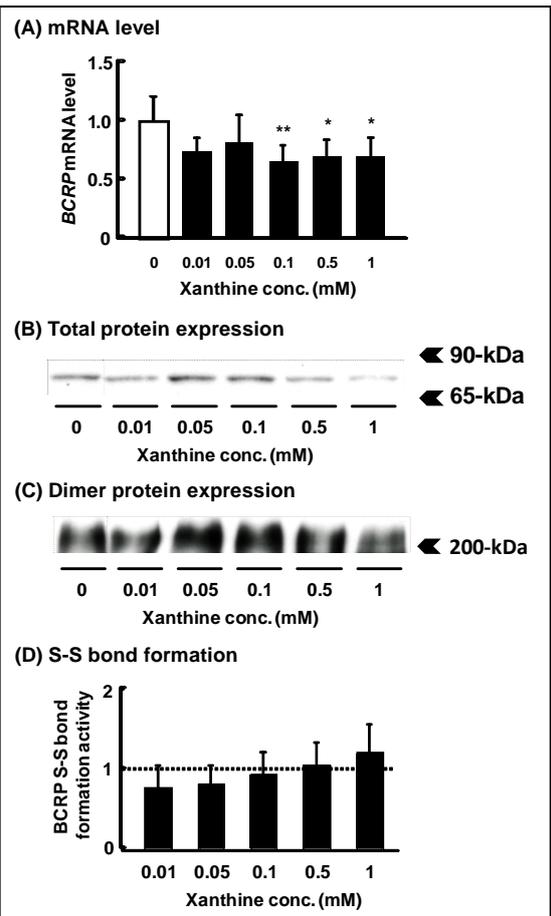


図 3 HK-2 細胞におけるキサンチン添加後の BCRP 発現量

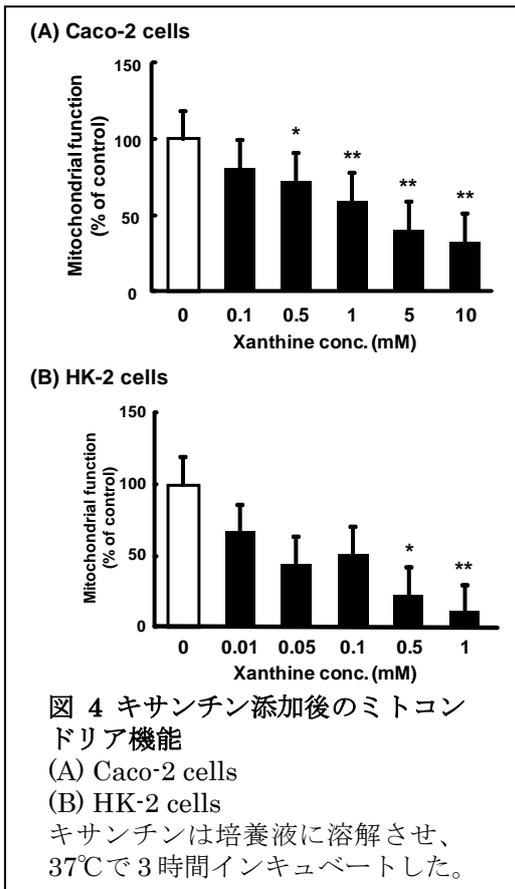
- (A) mRNA 量
 (B) 全 BCRP タンパク質発現量
 (C) BCRP dimer 発現量
 (D) BCRP S-S bond 形成

キサンチンは培養液に溶解させ、37°C で 3 時間インキュベートした。

は減少し、S-S bond 形成能は低下した。以上の結果から、Caco-2 細胞では、キサンチンオキシダーゼ活性化により BCRP の S-S bond 形成が抑制されることが示された。続いて、HK-2 細胞を用いて同様の検討を行った。HK-2 細胞ではキサンチン添加により、BCRP の mRNA 量 (図 3A) およびタンパク質発現量 (図 3B) は 0.1 mM 以上で減少した。さらに、BCRP のダイマー量も減少した (図 3C) が、S-S bond 形成に大きな変化は見られなかった (図 3D)。一方、ヒポキサンチン添加では BCRP の mRNA 量、タンパク質発現量、ダイマー量に変動は見られず、S-S bond 形成にも変化は見られなかった。以上の結果は Caco-2 細胞の結果とは異なる傾向であり、HK-2 細胞はキサンチンオキシダーゼの基質及びその活性化に対し、Caco-2 細胞と異なる反応を示すことが明らかとなった。

筆者はこれまでに、ミトコンドリア機能の低下により BCRP の S-S bond 形成が抑制さ

れることを明らかとしている。そこで、キサンチン添加がミトコンドリア機能に与える影響を MTT assay により検討した。その結果、Caco-2 細胞、HK-2 細胞ともに、キサンチンは濃度依存的にミトコンドリア機能に障害を及ぼした (図 4)。このことから、Caco-2 細胞におけるキサンチンオキシダーゼ活性化後の BCRP S-S bond 形成の抑制にミトコンドリア機能の低下が寄与している可能性が示唆された。しかしながら、S-S bond 形成が維持された HK-2 細胞においてもミトコンドリア機能が低下しており、ミトコンドリア機能低下の関連を明らかにするためには、更なる検討が必要である。



本研究により、キサンチンオキシダーゼ活性化は小腸の BCRP S-S bond 形成を低下させる一方、腎臓の BCRP S-S bond 形成には影響しないことが示唆された。このことから、酸化ストレスによる尿酸排泄への影響は臓器により異なることが推察された。尿酸は腎臓から7割が、小腸から3割が排泄されるが、BCRP は腎臓に比べ小腸に多く発現している。痛風発症に関する検討は主に腎臓に焦点を当てた研究が成されてきた。しかしながら、BCRP と痛風の関連が明らかになったことを契機に、小腸への排泄にも注目が集まりつつある。本研究は痛風発症における小腸からの尿酸排泄の重要性を示唆する成果であると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Ogura J, (1st/14) Intestinal ischemia-reperfusion increases efflux for uric acid via paracellular route in the intestine, but decreases that via transcellular route mediated by Bcrp. J. Pharm. Pharm. Sci. 15, 295-304 (2012). <http://ejournals.library.ualberta.ca/index.php/JPPS/article/view/12242>

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小倉 次郎 (OGURA JIRO)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：20580640

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし