

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791852

研究課題名(和文) 妊娠高血圧症候群および多胎妊娠時に併発する高尿酸血症の発症メカニズム解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism of the hyperuricemia accompanied by pregnancy induced hypertension (PIH) and multiple pregnancy.

研究代表者

木村 徹 (Kimura, Toru)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：30433725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：未だ不明な点が多い妊娠時の胎盤における尿酸輸送・尿酸代謝に関して検討を行った。帝王切開時に採取した母体血と臍帯血の血清尿酸値に大きな差は見られず、胎盤において積極的に尿酸輸送が行われていることが示唆された。胎盤には尿酸輸送体OAT4, OAT10, URATv1, ABCG2の発現を確認した。ヒト絨毛癌由来のBeWo細胞を用いて、尿酸取り込み活性を測定したが、ほとんど尿酸は細胞内には取り込まれていなかった。BeWo細胞では4条件下でもトランスウェル上下間での尿酸輸送が確認できた。したがって、胎盤においては尿酸がパラセルラー経路で輸送されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we compared maternal serum urate levels with those of umbilical cord blood and investigated urate transport mechanisms in BeWo cells, a trophoblast-derived cell line. There were no significant differences in serum urate levels between maternal blood and umbilical cord blood, suggesting that urate is freely movable at the placenta. RT-PCR and immunohistochemistry showed that urate transporters including OAT4, OAT10, URATv1 and ABCG2 were expressed in the syncytiotrophoblast cells in the placenta as well as BeWo cells. Despite expressing urate transporters, BeWo cells did not take up urate. After confirming the formation of tight junctions of these cells cultured on the transwell, urate transport between upper and lower chambers was measured. Urate moved through BeWo cell monolayers with non-saturation kinetics and this movement was observed even when the cells were incubated at 4 degree, suggesting that urate moves through the paracellular route by simple diffusion.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：胎盤 尿酸 上皮輸送 パラセルラー輸送 妊娠

### 1. 研究開始当初の背景

尿酸は、ヒトにおけるアデニンやグアノシンといったプリン体の最終代謝産物である。この尿酸の代謝経路はヒトおよびその近縁の類人猿に特有のものであり、他の種においては、尿酸は尿酸酸化酵素(ユリケース)によって開裂を受け代謝される(図1)。

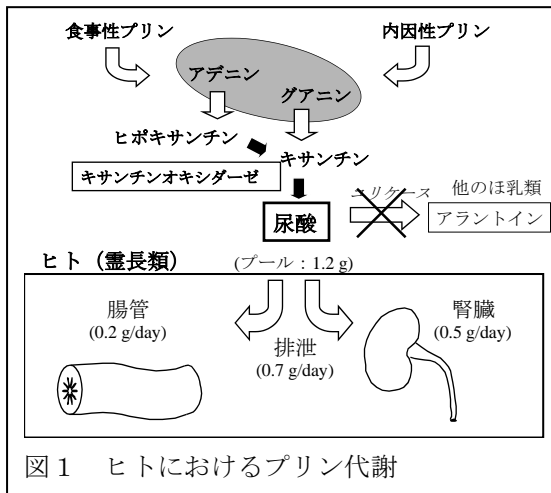


図1 ヒトにおけるプリン代謝

ユリケースをノックアウトしたマウスは、細胞の活動に伴って大量に生成される尿酸によって腎尿管の閉塞をきたし、生後まもなく腎不全により死亡する。したがって、ユリケースはマウスなどの生物にとって生命維持に必須な酵素であり、高濃度の尿酸は生体に危険な分子となる。またヒトにおいても、尿酸は高尿酸血症という不利益をもたらす原因である。尿酸の血中濃度が高度になり、尿酸塩の血清レベルが溶解度の上限を超えると、尿酸ナトリウムの結晶が軟組織や関節で形成され、通風結節とよばれる沈着物を作る。尿酸沈着物への炎症反応は、痛風性関節炎を引き起こす。このほか、尿中の尿酸濃度が高くなると尿路結石ができることも知られている。悪性物質としての側面のみが強調されてきた尿酸であるが、近年ではラジカルスカベンジャーとして中枢神経保護作用を持つことや、霊長類の寿命を決める因子ではないかということなど、生体にとって正に働いているという報告も相次いでいる。

生体内に取り込まれた、もしくは生体内の塩基に由来するアデニンは尿酸合成酵素キサンチンオキシダーゼ (XO)によってヒポキサンチン、キサンチンを経て尿酸に、グアノシンは XO によってキサンチンを経て尿酸に代謝される(図1)。生成した尿酸は約70%が腎臓から、残り約30%が腸管から排泄される。血中尿酸値は尿酸の生成と排泄のバランスによって決定され、尿

酸の生成過剰もしくは尿酸排泄の低下が起こると高尿酸血症を発症する。

妊娠高血圧症候群 (PIH)は、主として妊娠後期に見られる高血圧と蛋白尿を主とする疾患群の総称であるが、その発症時の多くに高尿酸血症を併発することが知られている (Acien P et al. Int J Gynaecol Obstet 32: 229-235, 1990 など)。また PIH のような病的状態ではないが、多胎妊娠時においても母体血清尿酸値が上昇することが報告されている (Fischer RL, et al. Obstet Gynecol 85: 60-64, 1995 など)。高尿酸血症が内皮細胞障害を起こすことが実験的にも臨床的にも示されていることから、PIH でみられる高尿酸血症は、原病の内皮細胞障害を増悪することが考えられる。また、高尿酸血症が高血圧発症と深く関連することが明らかになっている。さらに尿酸は、胎盤でのアミノ酸輸送を直接阻害することが報告されており、高尿酸血症が胎児の発育抑制をもたらすことが示唆されている。PIH における高尿酸血症発症には、近位尿管での再吸収の増加による尿酸排泄減少と胎盤を中心とする組織破壊による尿酸産生増加が、多胎妊娠時には胎盤や胎児の総重量が増加し尿酸合成が増大することが考えられているが、それだけでは説明できない点も存在する。当研究室を含む多くの研究室で、尿酸の主要排泄器官である腎臓における尿酸値調節機構を理解すべく、様々な尿酸輸送体の同定とその機能解析が行われてきたが、他の組織での尿酸輸送に関しては未だ不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

PIH発症時および多胎妊娠時に併発する高尿酸血症発症のメカニズムの解明を目的として、未だ明らかになっていない胎盤上皮での尿酸輸送・代謝を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1)臨床検体の採取・解析

杏林大学医学部付属病院受診の妊婦よりインフォームド・コンセントを取得の上、帝王切開時に母体血・臍帯血を採取した。これら母体血・臍帯血の血清尿酸値の測定を行った。尿酸濃度の測定は、オリエンタル酵母株式会社長浜ライフサイエンスラボラトリーに依頼した。

#### (2)尿酸トランスポーターの発現解析

本学医学部付属病院において帝王切開を受

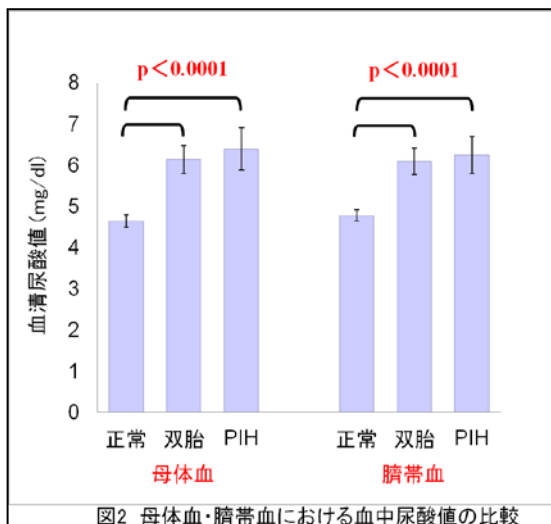
ける患者からインフォームドコンセントを取得の上、胎盤組織を採取した。この組織を用いて、RT-PCR および免疫蛍光染色により、妊娠後期胎盤に発現する尿酸トランスポーターの検出を行った。

### (3) 培養細胞を用いた尿酸輸送の解析

絨毛がん細胞由来である BeWo 細胞を用いて、放射ラベルされた尿酸の細胞内への取り込み能を測定し、トランスセルラーの輸送を検討した。また、パラセルラーの輸送は、細胞をトランスウェル上にコンフルエントになるまで培養し、トランスポーターの働かない 4°C 条件下で、トランスウェルの上部または下部に hot の尿酸を加え、一定時間後に逆側の溶液を採取し、その放射活性を測定した。この測定の際のトランスウェル上における細胞のタイトジャンクションの形成は、transepithelial electrical resistance (TER) の測定と分子量 3,000 の蛍光デキストランの透過性で評価した。

## 4. 研究成果

まずはじめに、正常単胎妊娠と双胎妊娠、PIH における母体血および臍帯血の血清尿酸値を比較した(図 2)。母体血中尿酸値は正常妊娠と比較して双胎妊娠および PIH において有意に上昇していることが分かった。また、臍帯血中尿酸値も比較した結果、双胎妊娠および PIH において有意に上昇していることが明らかとなった。



次に、母体血清尿酸値を横軸に、臍帯血清尿酸値を縦軸にとり両者を比較した(図 3)。その結果、母体血と臍帯血はほぼ同じ尿酸値を示すことが分かった。胎児における尿酸産生が尿酸値に与える影響を調べるため、臍帯の動脈血と静脈血を別々に採取し、尿酸値を比較した

(図 4)。その結果、正常、双胎、PIH のどの群においても動脈血と静脈血で尿酸値はほぼ同じ値を示した。

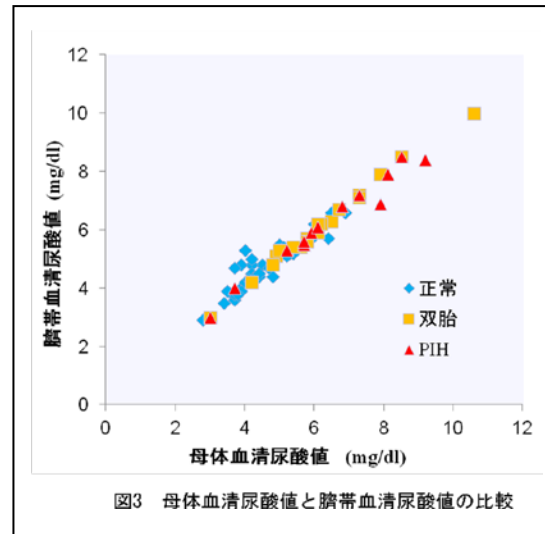


図3 母体血清尿酸値と臍帯血清尿酸値の比較

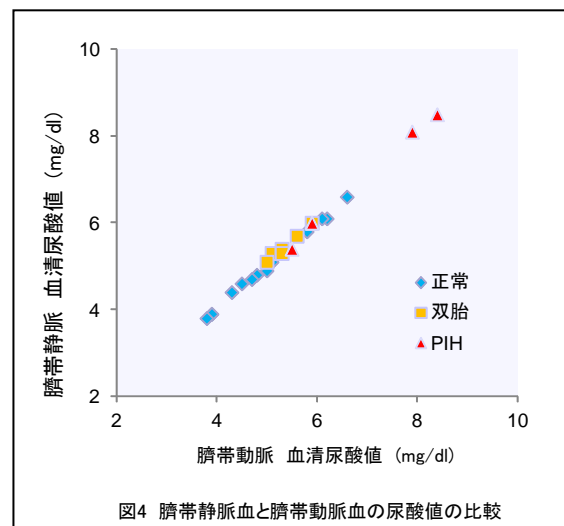


図4 臍帯静脈血と臍帯動脈血の尿酸値の比較

ここまでをまとめると、

双胎妊娠において尿酸値が高値を示した。腎機能障害のない双胎妊娠において尿酸値が高値なことより、胎盤での尿酸もしくはその前駆体産生が母体の高尿酸に関与していることが推測される。

PIH において尿酸値が高値を示したが、PIH の急性増悪期において胎児、胎盤での尿酸産生が亢進しているかどうかは不明である。

臍帯動脈・静脈間の血清尿酸値に有意な差は認められず、胎児が大きな尿酸産生源ではないことが考えられる。

母体・臍帯間の血清尿酸値に有意な差は認めなかった。

そこで、胎盤において胎児母体間の尿酸輸送が積極的に行われているのではないかと考え、胎盤上皮細胞における尿酸輸送の解析を行った。現在、尿酸を基質として輸送するトランスポ

ーターは、GLUT9/URATv1, NPT1, NPT4, OAT1, OAT3, OAT4, URAT1, OAT10, MRP4, BCRP の 10 種類が知られている。そこで、各トランスポーターに関して、RT-PCR により mRNA 発現の解析を行った(図 5)。その結果、ABCG2, OAT4, OAT10, URATv1 の尿酸トランスポーターの発現が確認された。

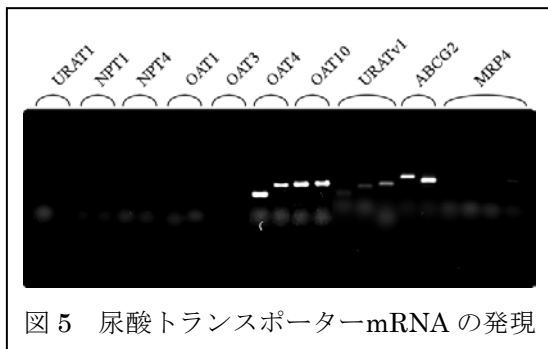


図 5 尿酸トランスポーター mRNA の発現

胎盤における母体-胎児間の尿酸輸送を理解するために、それぞれの輸送体がどの部位に発現しているのかが明らかにする必要がある。そこで免疫組織染色法を用いて、mRNA が検出されたトランスポーターが合胞体栄養膜細胞の母体側(絨毛膜)、胎児側(基底膜)、血管内皮細胞のどの部位に発現しているのか検討を行った(図 6)。また尿酸が上昇している双胎妊娠や妊娠高血圧症候群症例についても比較検討を行い、高尿酸血症による変化の相違を解析した。その結果、これまで示されているとおり、異物の排泄ポンプでもある ABCG2 は合胞体栄養膜細胞の絨毛側に発現が見られた。また有機アニオン交換輸送体である OAT4 は、合胞体栄養膜細胞の基底膜に見られ、同種の OAT10 は合胞体栄養膜細胞の全体にわたって発現が見られたが、細胞膜上には発現していないようであった。電位依存性尿酸排泄トランスポーターである URATv1 は、N 末端が短い short アイ

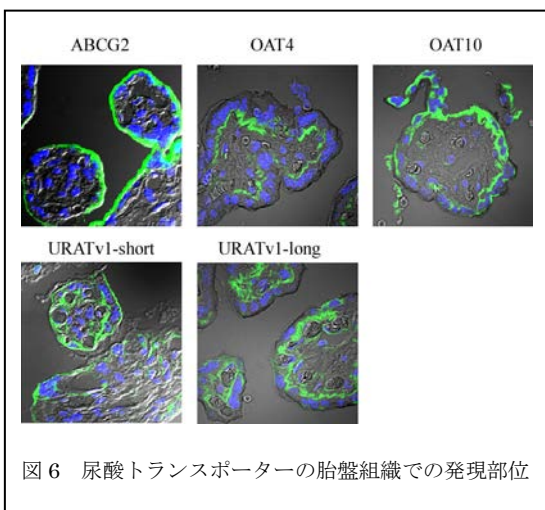


図 6 尿酸トランスポーターの胎盤組織での発現部位

ソフォームと N 末端が長い long アイソフォームの 2 種類が存在することが知られており、URATv1-short は合胞体栄養膜細胞の絨毛側と血管内皮細胞、URATv1-long は血管内皮細胞と結合組織にそれぞれ発現が見られた。今のところ、双胎妊娠や PIH においてこれらトランスポーターの局在に変化が見られていないことから、尿酸トランスポーターの発現部位の違いによって高尿酸血症を発症するという事はないと考えられる。

胎盤に発現する尿酸トランスポーターが明らかになったことから、培養細胞を用いた尿酸輸送の解析を行った。これまでの研究では、培養細胞や卵母細胞に尿酸トランスポーターを強制発現させて尿酸輸送を観察しているが、細胞そのものを使用して尿酸輸送が見られた例はほとんどない。我々は、絨毛がん細胞由来である BeWo 細胞を用いて、放射ラベルされた尿酸の細胞内への取り込み能を検討した(図 7)。この培養細胞には、胎盤組織と同様の尿酸トランスポーターの発現が見られることを確認している。時間依存的の尿酸取り込み活性を測定したが、ほとんど尿酸は細胞内には取り込まれていないことが分かった。尿酸排泄を行うトランスポーターの発現も確認されていることから、尿酸が取り込まれた後すぐに排泄されていることも考えられたが、それら排泄トランスポーターの阻害剤を用いても尿酸の取り込み能に変化は見られなかった(データは示さず)。

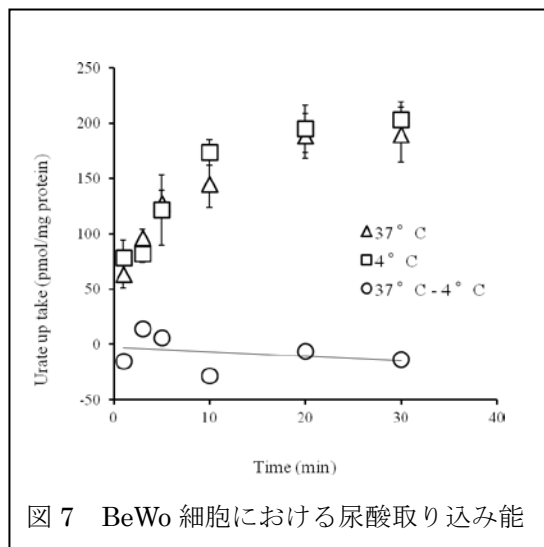


図 7 BeWo 細胞における尿酸取り込み能

上皮細胞を横切った物質の輸送の経路は、チャネルやトランスポーターを介するトランスセルラー経路だけでなく、細胞と細胞の間のタイトジャンクションを通過するパラセルラー経路がある。そこで、トランスポーターを介さない物質の輸送、

パラセルラー輸送に関して検討を行った。まず初めに、タイトジャンクションの形成を TER の測定で確認した。細胞をトランスウェル上にコンフルエントになるまで培養し、EVOM2, Epithelial Voltohmmeter for TEER and Chopstick Electrode, STX2 (World Precision Instruments, Sarasota, FL)を用いてトランスウェル上下間の抵抗 TER を測定した(表 1)。その結果、細胞がない状態では 150Ω 前後、タイトジャンクションを形成しない COS 細胞では約 200Ω を示した。これに対しタイトジャンクションを形成すると考えられる腎臓の近位尿管由来 MDCK typeII 細胞、胎盤上皮由来細胞の BeWo 細胞では 300Ω 前後の TER の上昇が確認できた。

表 1 トランスウェル上に培養した細胞の TER

Cells	TER (Ω)
empty	146 ± 9.1
BeWo	290 ± 7.2
COS-7	218 ± 3.0
MDCK	289 ± 6.0

そこで次に、トランスウェルの上部に蛍光デキストランを添加してその透過性を検討した(図 8)。その結果、タイトジャンクションを形成しない COS 細胞ではトランスウェル下部に蛍光が漏れ出しているのに対し、BeWo 細胞ではタイトジャンクションを形成する MDCK 細胞と同様にほとんど蛍光デキストリンが透過していないことを確認した。

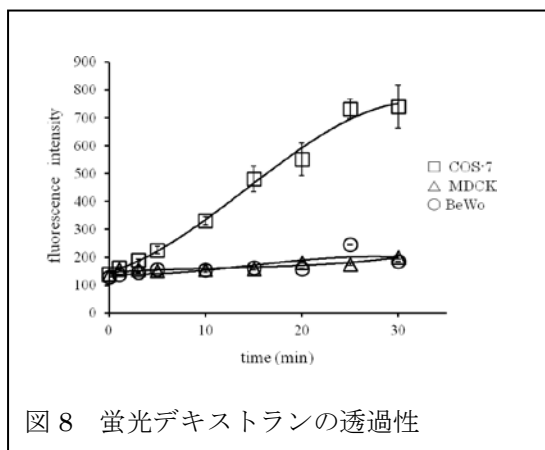


図 8 蛍光デキストランの透過性

そこで、この条件下でパラセルラーの尿酸輸送の検討を行った(図 9)。トランスポーターの働かない 4°C条件下で、トランスウェルの上部または下部に放射ラベルされた尿酸を加え、一定時間後に逆側の溶液を採取し、その放射活性を測定した。MDCK 細胞とは異なり BeWo 細胞では、

4°C条件下でも、上下間での尿酸輸送が確認されたことから、尿酸がパラセルラー経路で輸送されていることが示唆された。

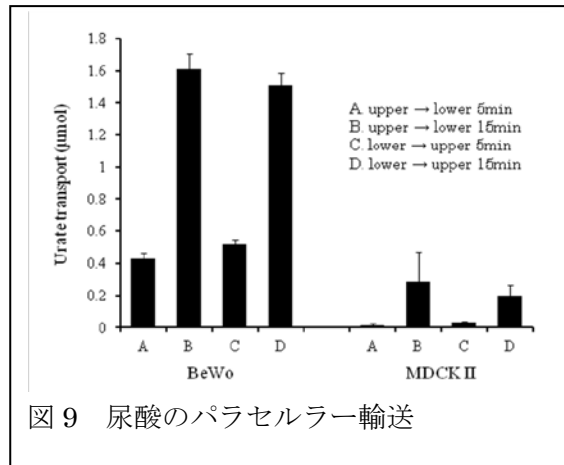


図 9 尿酸のパラセルラー輸送

したがって、胎盤組織において、尿酸はトランスポーターを介するトランスセルラーの輸送ではなく、主に細胞間隙を通るパラセルラー経路で輸送されていると考えられる。

## 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 3 件)

(1) Paracellular route is the major urate transport pathway across the blood-placental barrier.

Uehara I, Kimura T, Tanigaki S, Fukutomi T, Sakai K, Shinohara Y, Ichida K, Iwashita M, Sakurai H.

Physiol Rep. 2014;2(5). e12013. doi: 10.14814/phy2.12013. 査読あり

(2) Expression of SLC2A9 isoforms in the kidney and their localization in polarized epithelial cells.

Kimura T, Takahashi M, Yan K, Sakurai H.

PLoS One. 2014 ;9(1):e84996. doi: 10.1371/journal.pone.0084996. 査読あり

(3) 妊娠時における母体・胎児間の尿酸代謝解析

木村徹、上原一郎、谷垣伸治、岩下光利、安西尚彦、櫻井裕之

発達腎研究会誌 2013. 21 p7-11 査読なし

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 上皮細胞における尿酸の paracellular 輸送と claudin の発現

木村徹、塚田愛、大槻純男、福富俊之、市田公美、櫻井裕之

第 8 回トランスポーター研究会年会

2013 年 06 月 15 日～2013 年 06 月 16 日熊本大学

(2) 上皮細胞における尿酸輸送と claudin の発現

木村徹、塚田愛、大槻純男、福富俊之、市田公美、櫻井裕之

日本薬学会第 133 年会

2013 年 03 月 27 日～2013 年 03 月 30 日 横浜

(3) 上皮細胞における尿酸の paracellular 輸送

木村徹、塚田愛、市田公美、櫻井裕之

第 46 回 日本痛風・核酸代謝学会総会

2013 年 02 月 14 日～2013 年 02 月 15 日 新宿

(4) Uric acid crosses the placental barrier through paracellular route

Toru Kimura, Ichiro Uehara, Shinji Tanigaki, Mitsutoshi Iwashita, Hiroyuki Sakurai

2012 ASCB Annual Meeting

2012 年 12 月 15 日～2012 年 12 月 19 日

San Francisco, CA, USA

(5) Urate transport between maternal and umbilical cord blood in the placenta

木村徹、上原一郎、谷垣伸治、岩下光利、安西尚彦、櫻井裕之

International Joint Meeting of Cellular and Molecular Physiology in Epithelia

2011 年 7 月 31 日 北里大学(白金キャンパス)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 徹( KIMURA TORU )

杏林大学・医学部・助教

研究者番号:30433725

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )