

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32643

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893275

研究課題名(和文)尿酸トランスポーターによる脳内尿酸動態制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the regulatory mechanism of brain urate by urate transporters

研究代表者

富岡 直子(Tomioka, Naoko H.)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：60525814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：血中尿酸値は腎臓近位尿管に発現する尿酸トランスポーターの機能により濃度が制御されていることが知られている。本研究では、マウス脳において尿酸トランスポーターが脳室内の脈絡叢上皮細胞や、脳室と脳実質を隔てる脳室上衣細胞、脳毛細血管に発現していることを明らかにした。また、脳脊髄液中尿酸濃度の測定により、脳脊髄液中の尿酸が尿酸トランスポーターURAT1により脳室から脳実質方向へと輸送される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Multiple urate transporters in the kidney are involved in the regulation of serum urate levels. In this study, we revealed that urate transporters are expressed in choroid plexus epithelial cells, ventricular ependymal cells which separates the ventricles and the parenchyma, and brain capillaries. By measuring the urate level in the cerebrospinal fluid (CSF), we revealed that urate in the CSF may be transported from the ventricle into the brain parenchyma by URAT1.

研究分野：医歯薬学

キーワード：尿酸

1. 研究開始当初の背景

高尿酸血症は成人男性の約5人に1人が罹患する頻度の高い生活習慣病であり、痛風だけでなく動脈硬化による虚血性心疾患の危険因子にもなりうるなど、一般的に尿酸値が高い状態は望ましくないとされる。一方、尿酸は強力な抗酸化物質としても知られ、*in vitro* においては尿酸添加によって、酸化ストレスによる神経細胞死が抑制されると報告されている。2000年代以降、高めの尿酸値が多発性硬化症やパーキンソン病、アルツハイマー病といった神経変性疾患の発症および症状の進行を抑制するという疫学調査結果が相次いで報告された。また、高尿酸状態によりパーキンソン病モデルマウスにおけるドパミン作動性神経の細胞死が抑制されることも報告された。さらに、最近米国でのパーキンソン病患者に対するイノシン(尿酸の前駆体)経口投与の臨床試験が行われた結果、イノシン投与により重篤な副作用なしに血中および脳脊髄液中の尿酸値が上昇することがわかり、治療への応用がさらに期待されている。

尿酸の神経保護作用について研究が進む一方、尿酸の脳内動態は明らかになっていない。腎臓の尿細管細胞に発現する主要な尿酸トランスポーターである URAT1、GLUT9/URATv1 および ABCG2 は血中尿酸値を制御するが、これらのトランスポーターは脳にも発現していることが知られている。ABCG2 は脳血管内皮細胞への局在が報告されているが、URAT1, GLUT9/URATv1 に関しては RT-PCR やウェスタンブロットによる報告しかなく、どの細胞に局在するか明らかになっていなかった。

研究代表者は、これまでにマウス脳切片を用いて免疫組織化学および免疫蛍光染色を行い、URAT1 が脳室上衣細胞の脳室側膜および繊毛に発現していることを明らかにした。脳室上衣細胞は脳室と脳実質を隔てる単

層の上皮細胞であり、脳室側に運動性の繊毛を有することが特徴である。URAT1 は乳酸など有機陰イオンを交換基質として尿酸を輸送するが、上衣細胞内の乳酸濃度は脳脊髄液より高いことが予想され、URAT1 は脳脊髄液内の尿酸を脳実質に交換輸送する可能性が考えられた。そこで、(1) 脈絡叢において毛細血管から脈絡叢上皮細胞を介して脳脊髄液中に尿酸が分泌される(体循環 脳室)、(2) 脳脊髄液中の尿酸が上衣細胞を介して経細胞性に脳実質に輸送される(脳室 脳実質)、(3) 脳実質中の尿酸が脳毛細血管管腔側に発現する ABCG2 を介して脳毛細血管へ排出される(脳実質 体循環) という尿酸輸送のモデルを考えるに至った。

2. 研究の目的

脳室上衣細胞脳実質側や脈絡叢上皮細胞に局在する尿酸トランスポーターの同定を行い、脳脊髄液から脳実質に至る尿酸の輸送機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス脳内における尿酸トランスポーターの発現解析

野生型マウス脳のホルマリン固定凍結切片、パラフィン切片、未固定凍結切片を作製し、抗 GLUT9 抗体および抗 ABCG2 抗体による免疫染色反応を行う。組織染色に適用できる抗体の選別、染色条件の検討を行い、脳内における各分子の局在部位を明らかにする。

(2) マウス脳脊髄液中尿酸濃度測定系の構築

イソフルラン麻酔下で大槽穿刺により脳脊髄液を採取し、HPLC により尿酸濃度を測定する。

(3) 高感度 *in situ* ハイブリダイゼーション

ン法による尿酸トランスポーターの発現部位の検証

免疫染色で得られた発現データを検証するため、ViewRNA ISH Tissue 2 Plex Assay kit を利用し、尿酸トランスポーターの mRNA の発現部位を同定する。

(4) Uox ノックアウトマウスおよび Urat1-Uox ダブルノックアウトマウスの脳脊髄液・脳実質内における尿酸濃度の定量

脳室上衣細胞における脳脊髄液から脳実質へ向かう尿酸輸送が URAT1 の尿酸輸送機能欠損により消失することを明らかにする。

4 . 研究成果

(1) マウス脳内における尿酸トランスポーターの発現解析

免疫染色の結果、GLUT9 の染色シグナルは脳室上衣細胞の細胞全体 (核以外) 脳実質中の細胞および血管に認められた。これらの染色シグナルは抗原吸収を行った抗体を用いた場合には消失したので、GLUT9 を特異的に認識している可能性が高いと考えられた。脳実質中の染色陽性細胞は神経核マーカーである NeuN の陽性細胞と一致したため、神経細胞であると考えられた。しかし、現在の染色条件では神経細胞体形質膜上への局在が確認できていないため、神経細胞内でトランスポーター機能を有するかどうかは不明である。ABCG2 の染色シグナルは脳室上衣細胞には見られなかったが、血管および脳室の脈絡叢上皮細胞にシグナルが観察された。脳毛細血管における GLUT9 および ABCG2 の発現はいずれも血管内皮細胞管腔側であった。

(2) マウス脳脊髄液中尿酸濃度測定系の構築

脳脊髄液中の尿酸値を測定するためには、

マウス大槽部より血液の混入を避け、できるだけ多くの脳脊髄液を採取することが必要であった。脳脊髄液の採取に用いるため、ガラスキャピラリーをプラーで引き、先端を鋭利に加工したものを準備した。測定にはヒトと同程度の血中尿酸値を示すウリカーゼノックアウト (Uox-KO) マウスを用いた。マウスはイソフルラン麻酔を行い、実体顕微鏡下で大槽部を露出した。脳定位固定装置を利用してガラスキャピラリーの先端を大槽部に挿入し、脳脊髄液が毛細管現象によって吸い上げられるのを確認した。採取した脳脊髄液は HPLC で測定し、尿酸ピークが検出できることを確認できた。

(3) 高感度 in situ ハイブリダイゼーション法による尿酸トランスポーターの発現部位の検証

野生型マウスよりホルマリン固定脳パラフィン切片を作製し、ViewRNA ISH Tissue 2 Plex Assay kit を用いて *Slc22a12* (URAT1)、*Slc2a9* (GLUT9)、*Abcg2* (ABCG2) mRNA の局在を解析した。その結果、これまで免疫染色陽性であった部位においてそれぞれの mRNA の存在を確認することができた。免疫染色および *in situ* hybridization 法の両手法で発現が確認できた尿酸トランスポーターは以下の通りであった：脈絡叢上皮細胞 (ABCG2) 脳室上衣細胞 (URAT1, GLUT9)。 *Slc2a9* , *Abcg2* mRNA は脳実質領域にも発現が認められ、免疫染色の結果からは神経細胞および脳毛細血管であると予想されるが、発現細胞の同定にはさらなる検証が必要である。脳内における各尿酸トランスポーターの発現部位の情報および腎臓における各トランスポーターの尿酸輸送の方向性を踏まえると、1) 脈絡叢上皮細胞の ABCG2 を介した血液 脳脊髄液への尿酸輸送、2) 脳室上衣細胞の URAT1 および GLUT9/URATv1 を介した脳脊髄液

脳実質への尿酸輸送、3) 血管における GLUT9/URAT1 および ABCG2 を介した脳実質 血液への尿酸輸送が存在する可能性が示唆された。

(4) Uox ノックアウトマウスおよび Urat1-Uox ダブルノックアウトマウスの脳脊髄液・脳実質内における尿酸濃度の定量

Uox-KO マウスと Urat1-Uox ダブルノックアウトマウス (DKO マウス) の尿酸値を比較するため、尾静脈より採血して血漿を調製し、脳脊髄液の採取および脳ホモジネートの調製を行った。血漿、脳ホモジネートサンプルは除タンパク操作を行い、脳脊髄液は希釈して HPLC を用いて尿酸濃度を測定した。DKO マウスの血漿尿酸値は Uox-KO マウスよりも低下していたが、脳脊髄液および脳ホモジネート中の尿酸値には有意な差は見られなかった。脳脊髄液は血液をもとにし、脳室内の脈絡叢において産生される。本実験において脳脊髄液中尿酸値 / 血漿尿酸値の比は DKO マウスにおいて上昇傾向にあり、尿酸が脳室上衣細胞上の URAT1 によって脳実質内に輸送されている可能性が示唆された。脳実質中の局所的濃度変化を明らかにするためには全脳のホモジネートの濃度解析ではなく、別の解析法を試みる必要がある。

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 2 件)

Watanabe T, Tomioka NH, Watanabe S, Suzuki Y, Tsuchiya M, Hosoyamada M. The mechanism of false in vitro elevation of uric acid level in mouse blood. Biol Pharm Bull. *in press* (2016) 査読有

Hosoyamada M, Tsurumi Y, Hirano H,

Tomioka NH, Sekine Y, Morisaki T, Uchida S.

Urat1-Uox double knockout mice are experimental animal models of renal hypouricemia and exercise-induced acute kidney injury.

Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. *in press* (2016) 査読有

[学会発表](計 9 件)

富岡 直子, 青木 小海, 道志 勝, 細山田 真.

ウリカーゼ欠損マウスの脳内尿酸濃度に対する尿酸トランスポーターURAT1の関与. 日本薬学会第136年会
2016年3月29日 横浜

平野 秀憲, 関根 祐子, 富岡 直子, 細山田 真.

腎性低尿酸血症モデルUrat1-Uox-double KOマウスにおけるアロプリノール中断後急性腎障害の経日的経過
日本薬学会第136年会
2016年3月29日横浜

河野 眞土加, 早川 洸, 秋元 南, 東 奈実, 酒井 紫帆, 富岡 直子, 福内 友子, 山岡 法子, 安田 誠, 馬渡 健一, 中込 和哉, 細山田 真, 金子 希代子.

LC-MSを用いた高プリン体食負荷におけるマウス血しょう、尿および臓器中のプリン・ピリミジン塩基の体内動態の評価
日本薬学会第136年会
2016年3月28日 横浜

富岡 直子, 田村 好古, 高田 龍平, 鈴木 洋史, 内田 俊也, 細山田 真

Immunohistochemical analysis of urate transporters in mouse brain.
第89回日本薬理学会年会

2016年3月11日 横浜

細山田 真, 富岡 直子, 小林 千夏, 鶴見
ゆう, 関根 祐子
Urat1-Uox ダブルノックアウトマウスの尿
中オキシプリン排泄量に対するアロプリノ
ールおよびフェブキソスタットの作用
第 89 回日本薬理学会年会
2016年3月10日 横浜

細山田 真, 富岡 直子, 金子希代子
Urat1-Uox ダブルノックアウトマウスの尿
中尿酸排泄量に対するフェブキソスタット
の作用
第 49 回日本痛風・核酸代謝学会総会
2016年2月19日大阪・豊中

富岡 直子, 田村 好古, 高田 龍平, 内田
俊也, 細山田 真
マウス脳内における尿酸トランスポーター
の発現解析
第 49 回日本痛風・核酸代謝学会総会
2016年2月18日 大阪・豊中

Hosoyamada M, Tsurumi Y, Tomioka
NH, Sekine Y, Morisaki T, Uchida S
Urat1-Uox double knockout mice are
experimental animal model of renal
hypouricemia and exercise-induced acute
kidney injury.
16th International Symposium on Purine
and Pyrimidine Metabolism in Man
2015年6月8日 New York, USA

富岡 直子, 道志 勝, 渡部 多真紀, 土屋
雅勇, 細山田 真
脳室上衣細胞における尿酸トランスポー
ターの発現解析
日本薬学会第 135 年会
2015年3月28日 神戸

〔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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富岡 直子 (TOMIOKA, Naoko H.)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号: 60525814

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし