

胎盤における尿酸輸送機構の解明

櫻井裕之 岩下光利¹ 谷垣伸治¹
上原一朗¹ 木村徹 堅田智久
Promsuk Jutabha

杏林大学医学部薬理学

¹杏林大学医学部産婦人科学

背景と目的

妊娠と血清尿酸値が密接に関係していることが以前より知られており、特に妊娠高血圧症候群（PIH）や多胎妊娠では母体血中尿酸値が上昇することが知られている。従来血清尿酸値は、PIHの顕症化や腎機能障害の出現する以前に増加すること、中毒症の重症度と関係すること、胎児の予後を判定するには母体血圧よりも尿酸の方が優れていること、などの報告により、PIHの有用なマーカーと考えられていたが、最近高尿酸血症が尿酸塩沈着を介さずに直接的に高血圧や腎・血管障害を引き起こす事が報告され、高尿酸血症それ自身がPIHの病因である可能性が示唆されている。

尿酸はヒトにおけるプリン代謝の最終産物であり、ヒポキサンチン、キサンチンから酵素キサンチンオキシダーゼにより産生され、主に腎臓より体外に排泄される。このため高尿酸血症は尿酸産生過剰ないし腎での尿酸排泄低下により引き起こされる。PIHにみられる血清尿酸値上昇も、産生増加および排泄低下の両者に起因すると考えられており、産生増加の機序として細胞新生リモデリングの盛んな胎児・胎盤細胞が尿酸の原料となるプリン体を多く含むこと、子宮胎盤血流障害や胎盤梗塞による組織破壊からの多量のプリン体漏出、さらには低酸素、虚血・再灌流状態による血清アデノシン増加や胎盤性キサンチンオキシダーゼ増加による産生増加などが考えられている。また腎排泄低下の機序として、全身性血管収縮による腎血流量とそれに伴う糸球体ろ過量の低下と、それに伴う腎尿細管での再吸収増加によると考えられている。しかし、PIHにおける血清尿酸値上昇の詳細な機序やその意義について未だ不明の点が多い。

この中で、尿酸、そしてその前駆体であるイノシン、ヒポキサンチン、キサンチンはいずれも極性を有する物質であるため、細胞膜を単純拡散で透過することは難しく、その経細胞膜透過には「トランスポーター」と呼ばれる膜輸送タンパク質を必要とする。杏林大学医学部薬理学教室では、これまでに血清尿酸値の制御に関わる膜輸送タンパク質である尿酸トランスポーター URAT1 (Enomoto et al., *Nature*, 2002) および URATv1 (Anzai et al., *J Biol Chem*, 2008) の同定を行ってきた。上皮細胞である腎尿細管では、これらの分子がタンデムになり尿酸の経上皮輸送を担うと考えられるが、同じく上皮である胎盤における尿酸輸送の分子機序は未だに明らかになっていない。そこで、以下のことを解明することを目的とした。

(1) 正常胎盤における尿酸代謝メカニズムの解明

尿酸トランスポーターや尿酸産生酵素の局在を確定し、また母体・胎児における尿酸及びプリン体代謝物を測定することにより、胎児・胎盤・母体での尿酸代謝動態を明らかにする。

(2) 培養細胞系を用いた尿酸輸送機構の解明

初期胎盤から単離した絨毛細胞や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輸送を観察し、胎盤における尿酸輸送機構を明らかにする。

方法

A) ヒト胎盤検体を用いた検討

受理された臨床研究計画に従い、臨床検体（母体血、臍帯血、胎盤）は、インフォームドコンセントをとり、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採取した。

(1) 血清中の尿酸、クレアチニン、プリン体、尿酸中間代謝体濃度の測定

母体血および臍帯血から血清を採取し、酵素法にて尿酸値の測定を行った。また、腎機能の評価を行う必要があるため、血清クレアチニンの測定も合わせて行った。尿酸中間代謝体であるヒポキサンチン、キサンチンは、HPLCを用いて測定を行った。

(2) 尿酸トランスポーターおよび尿酸産生酵素のタンパク質発現解析

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それぞれの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。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。

B) 絨毛癌由来細胞 BeWo における尿酸輸送特性の解析

初期の胎盤から採取した絨毛細胞またはヒト絨毛癌由来の BeWo 細胞を用いたトレーサー実験により、尿酸輸送活性の測定、およびそれに対するトランスポーター阻害剤の影響を観察し、その輸送特性の検討を行った。また、上皮細胞の上下間の輸送やパラセラーによる輸送を検討するため、トランスウェル上に細胞を培養して、同様にトレーサー実験を行った。

結 果

母体および臍帯の血中尿酸値

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。以前から示されているとおり、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。以上の結果から、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、胎児、胎盤での尿酸産生が母体の高尿酸に関与していることが推測された。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。

次に、母体血清尿酸値と臍帯血清尿酸値を比較したところ、母体血と臍帯血はほぼ同じ尿酸値を示すことが明らかとなった。これに対し、尿酸の前駆体であるキサンチンやヒポキサンチンは母体/臍帯血間で血中濃度に差が見られていた。また、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ところ、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。したがって、胎児が大きな尿酸産生源ではないことが考えられた。

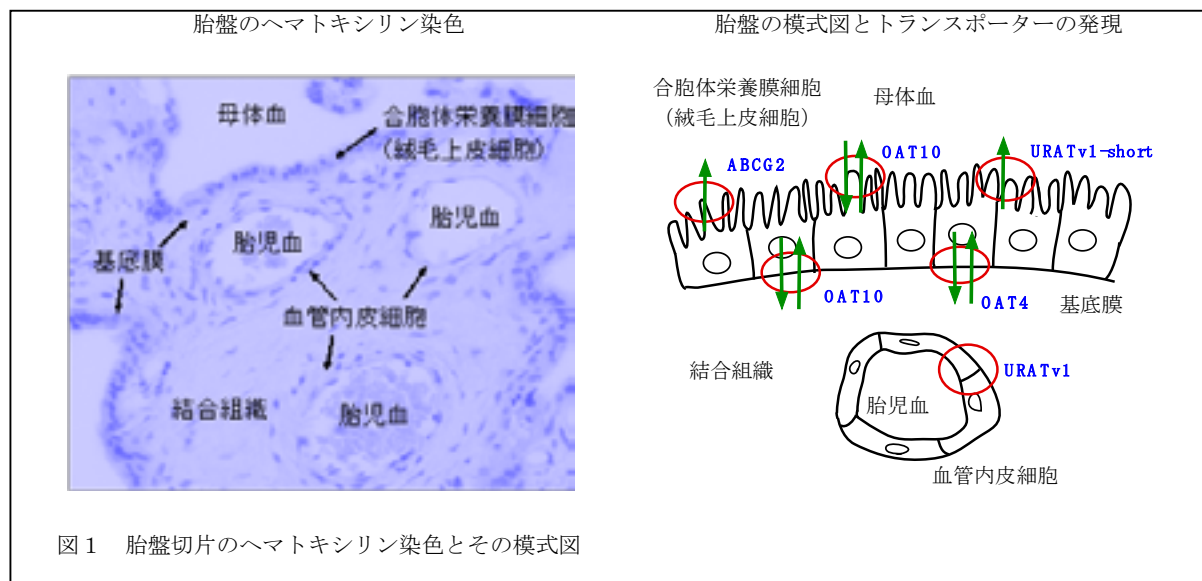
胎盤組織における尿酸トランスポーターの発現

上記の結果から、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、胎盤に発現する尿酸トランスポーターの解析を行った。現在、尿酸を基質として輸送するトランスポーターは、表1に示した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2組のプライマーペアを用いて、RT-PCRによりmRNA発現の解析を行った。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。(表1)

そこで次に、これらトランスポーターの胎盤組織内の発現部位の解析を行った。胎盤の凍結組織切片を用いて、mRNAの発現が確認されたABCG2, OAT4, OAT10, URATv1に関して、蛍光免疫染色を行った。その結果、ABCG2は合胞体栄養膜細胞の絨毛側、OAT4は、合胞体栄養膜細胞の基底膜、OAT10は合胞体栄養膜細胞の全体、URATv1-shortアイソフォームは合胞体栄養膜細胞の絨毛側と血管内皮細胞、URATv1-longアイソフォームは血管内皮細胞と結合組織にそれぞれ発現が見られた。胎盤組織のヘマトキシリン染色と模式図、トランスポーターの発現部位を図1にまとめた。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極在部位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のではないと考えられる。

表1 尿酸を基質として輸送するトランスポーター

名称	別名	報告されている発現部位
SLC2A9	GLUT9/URATv1	腎臓, 肝臓, 小腸, 胎盤, 肺, 白血球
SLC17A1	NPT1	腎臓, 肝臓
SLC17A3	NPT4	腎臓, 肝臓, 小腸, 精巣
SLC22A6	OAT1	腎臓, 胎盤, 脳
SLC22A8	OAT3	腎臓, 脳, 骨格筋, 形成中の骨
SLC22A11	OAT4	腎臓, 胎盤
SLC22A12	URAT1	腎臓
SLC22A13	OAT10	腎臓, 結腸, 小腸, 脳, 心臓
ABCC4	MRP4	腎臓, 肝臓, 平滑筋
ABCG2	BCRP	腎臓, 腸, 胎盤, 乳腺



培養細胞を用いた尿酸輸送機構の解析

妊娠初期胎盤から単離した絨毛細胞や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。これら培養細胞には、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。時間依存的および濃度依存的の尿酸取り込み活性を測定したが、尿酸は細胞内にはほとんど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。そこで、トランスポーターを介さない物質の輸送、パラセルラー経路に関して検討を行った。パラセルラーの輸送は、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。その結果、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。したがって、胎盤組織においても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、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。

講演記録

1. 木村徹, 上原一朗¹, 谷垣伸治¹, 岩下光利¹, 安西尚彦², 櫻井裕之 (杏林大・医・産科婦人科,²独協医大・医・薬理): 胎盤における母体・胎児間の尿酸輸送機構 第124回日本薬理学会関東部会, 東京, 平成23年6月4日
2. 木村徹, 上原一朗¹, 谷垣伸治¹, 岩下光利¹, 安西尚彦², 櫻井裕之 (杏林大・医・産科婦人科,³独協医大・医・薬理): PIH発症時および多胎妊娠時に併発する高尿酸血症発症メカニズム解明に向けた胎盤における尿酸輸送機構の解析 第6回トランスポーター研究会年会, 仙台市, 平成23年6月11-12日
3. Kimura T, Uehara I¹, Tanigaki S¹, Iwashita M¹, Anzai N², & Sakurai H (杏林大・医・産科婦人科,²独協医大・医・薬理): Urate transport between maternal and umbilical cord blood in the placenta. International Joint Meeting of Cellular and Molecular Physiology in Epithelia, Tokyo, July 30-31, 2011
4. 木村徹, 上原一朗¹, 谷垣伸治¹, 岩下光利¹, 安西尚彦², 櫻井裕之 (杏林大・医・産科婦人科,²独協医大・医・薬理): 胎盤上皮細胞における尿酸輸送機構. 上皮細胞の恒常性維持機構におけるイオン・物質輸送の新しい分子生理 岡崎市, 平成23年11月21-22日
5. 木村徹, 上原一朗¹, 谷垣伸治¹, 篠原佳彦², 市田公美², 岩下光利¹, 安西尚彦³, 櫻井裕之 (杏林大・医・産科婦人科,²東京薬科大・薬・病態生理,³独協医大・医・薬理): 胎盤における母体・胎児間の尿酸輸送機構 日本薬学会第132年会, 札幌市, 平成24年3月28-31日