

【8】

氏 名	木 内 香 織
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第687号
学位授与の日付	平成29年3月7日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (産科婦人科学)
学位論文題目	Characterization of urate transport system in JAR and JEG-3 cells, human trophoblast-derived cell lines (ヒトトロホプラスト由来細胞株JARおよびJEG-3における尿酸輸送系の特性)
論文審査委員	(主査) 教授 釜 井 隆 男 (副査) 教授 杉 本 博 之 教授 山 口 重 樹

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

尿酸はヒトにおける核酸代謝の最終産物である。尿酸は水溶性の物質であるため、細胞膜を透過するために「トランスポーター」と呼ばれる膜性タンパク質が必要となる。妊娠高血圧腎症において血中尿酸値の上昇が指摘されているが、その明確な機序は未だ解明されていない。妊婦における胎盤上皮細胞（合胞体栄養膜細胞＝トロホプラスト）は、母体血と胎児血のバリアー機能を有しており、いわゆる血液胎盤関門と呼ばれる。これまでに、同細胞においていくつかの尿酸トランスポーター発現が報告されているが、血液胎盤関門における尿酸処理への寄与については依然不明である。

【目 的】

近年、ヒト絨毛癌細胞株のひとつであるBeWo細胞を用いて尿酸が胎盤において単純拡散による細胞間輸送をしていることが明らかにされた。しかし、この細胞は栄養膜細胞由来上皮癌細胞株の一種に過ぎない。今回われわれは、胎盤における尿酸の透過のためのトランスポーターの寄与を更に明らかにするため、有機溶質輸送の分析のために多く用いられている、他のヒト絨毛癌由来細胞株であるJARおよびJEG-3細胞における尿酸トランスポーターの発現を調べ、尿酸輸送特性を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

JAR, JEG-3細胞での尿酸トランスポーターmRNAの同定にはreverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて調べた。

JAR, JEG-3細胞を、それぞれ10% FBSを含むRPMI1640とMEM培地を用いてpoly D-lysineでコートされた24ウェルプレートで37°C、5% CO₂環境下で培養した。培地を取り除いた後でHank's balanced salt solution (HBSS) で2回洗浄し、同じ溶液で37°Cで10分培養した後、37°Cと4°Cの5 μMの¹⁴C標識尿酸で30分培養し、冷たいHBSSで3回洗浄した後、細胞を0.1NのNaOHで可溶化し液体シンチレーションスペクトロメーターにより放射能を測定し、細胞内に取り込まれた尿酸を測定した。

また、JAR, JEG-3細胞を、37°Cの5 μMの¹⁴C標識尿酸で30分培養し、細胞を洗浄した後Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) 阻害薬であるfumitremorgin C (FMC) を1 μM, 5 μM存在下で37°Cで30分培養し、細胞内とbuffer中の放射能を測定し、排出された尿酸と細胞内に残存する尿酸を測定した。

統計は2群間のStudent's *t*検定と、多群間の一元配置分析を用い、*p*<0.05を統計学的有意差有りとした。

【結 果】

RT-PCRでJAR細胞はOAT4, BCRP, MRP4のmRNAを発現しており、JEG-3細胞はOAT10とともにBCRPのmRNAを発現していた。JAR, JEG-3細胞における [¹⁴C] 標識尿酸の取り込みは37°Cで時間依存性に増加した。一方で4°Cではほとんど増加しなかったため、トランスポーターは拡散よりも尿酸取り込みに携わっていることが示唆された。またURATv1を強く、URAT1を弱く阻害するベンズブロマロンの存在下で尿酸の取り込み実験を行ったところ、尿酸取り込みに変化がみられなかったことから、JAR, JEG-3細胞がURAT1やURATv1のどちらの尿酸輸送システムも有していないことが判明した。

また、BCRP阻害薬であるFMCの存在下で尿酸排出を調べたところ、¹⁴C標識尿酸の排出はJAR, JEG-3細胞の双方で明らかに抑制された。これらの結果は¹⁴C標識尿酸がJAR, JEG-3細胞においてBCRPを経由して排出することを示す結果と思われる。

【考 察】

JAR, JEG-3細胞の両者がBCRP mRNAを強く発現しており尿酸排泄がBCRP阻害薬に感受性があることから、BCRPはいわゆる合胞体栄養膜細胞といわれる胎盤細胞で作られる尿酸の透過のために寄与していることが示唆された。以前の報告で、尿酸値は尿酸産生酵素であるキサンチンオキシダーゼと同等に妊娠高血圧腎症の患者で増加するが、これは酸化ストレスにさらされるためと言われてきた。ゆえに、本研究において妊娠高血圧腎症の症例において尿酸は胎盤細胞内で産生され、蓄積した尿酸がBCRPにより排出されることが示唆される結果となった。妊娠高血圧腎症の患者においてなぜ高尿酸血症がおこるかそのメカニズムは不明だが、この報告は胎盤におけるBCRPのような尿酸トランスポーターが関与する尿酸処理としてはじめての報告である。

【結 論】

この報告において、われわれはヒト栄養膜細胞由来のJAR, JEG-3細胞におけるいくつかの尿酸トランスポーターの発現と尿酸輸送の特徴を調査した。そして、ATP駆動型トランスポーターであるBCRPは、おそらく胎盤でつくられた尿酸を血液循環に透過させるための胎盤における尿酸処理に重

要な役割を果たしている。

論文審査の結果の要旨

【論文概要】

尿酸はヒトにおける核酸代謝の最終産物であり水溶性の物質であることから、細胞膜を透過するためには「トランスポーター」と呼ばれる膜性タンパク質が必要である。妊娠高血圧腎症において血清尿酸値の上昇が指摘されており、妊婦の胎盤上皮細胞（合胞体栄養膜細胞＝トロホブラスト）に注目し、いくつかの尿酸トランスポーターの発現が報告されている。しかし、胎盤での尿酸輸送や処理機構の明確な機序は未だ不明である。申請論文は胎盤における尿酸の透過におけるトランスポーターを分子のレベルから更に明らかにするため、胎盤における有機溶質輸送の分析で広く用いられている、ヒト絨毛癌由来細胞株であるJAR細胞およびJEG-3細胞における尿酸トランスポーターの発現と尿酸輸送特性を検討した。

申請者は尿酸トランスポーターmRNAの同定にreverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いてJAR細胞ではOAT4、BCRPとMRP4が、またJEG-3細胞ではOAT10とBCRPのmRNAが発現していることを同定した。また、JAR細胞とJEG-3細胞に¹⁴C標識尿酸を取り込ませ、トランスポーターの機能を停止した後、細胞を液体シンチレーションスペクトロメーターで放射能を測定し、細胞内に取り込まれた尿酸を測定した。条件1では37℃と4℃の培養下で、条件2では主なURATv1の阻害薬であるベンズブロマロンの存在下で、条件3では4種のbufferを用いて異なる電位の下で解析を行った。JAR細胞とJEG-3細胞における [¹⁴C] 標識尿酸の取り込みは37℃で時間依存性に増加したが、4℃ではほとんど増加しなかったため、尿酸輸送にはトランスポーターが関与していることが示唆された。また、ベンズブロマロンの存在下と異なる4種の電位の条件下ではいずれも尿酸取り込みに変化がみられなかったことから、JAR細胞とJEG-3細胞がURAT1やURATv1のどちらの尿酸輸送システムも有していないことが判明した。最後にJAR細胞とJEG-3細胞に、¹⁴C標識尿酸を取り込ませた後、Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) 阻害薬であるfumitremorgin C (FMC) の存在下で尿酸排出を調べたところ、¹⁴C標識尿酸の排出はJAR細胞とJEG-3で共に明らかに抑制された。これらの結果は¹⁴C標識尿酸がJAR細胞とJEG-3細胞においてBCRPを經由して排出される機構を支持する結果であった。

以上の結果と、先行研究で妊娠高血圧症候群患者において、尿酸産生酵素であるキサンチンオキシダーゼの増加が知られていることから、胎盤細胞内で産生・蓄積した尿酸がBCRPにより排出されることを示唆する結果となった。

【研究方法の妥当性】

申請論文ではトランスポーターの標準的な実験方法であるRT-PCRや¹⁴C標識尿酸を用いてその核種の放射エネルギーを3～4回測定し得られたデータを客観的な統計解析を用いて解析しており、本研究は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

近年、栄養膜細胞由来上皮癌細胞株でヒト絨毛癌細胞株のひとつであるBeWo細胞を用いた研究から、尿酸は胎盤を単純拡散により細胞間輸送されることが示唆された。しかし、本研究では他のヒト絨毛癌細胞株であるJAR細胞およびJEG-3細胞の2種類の細胞を用いて両細胞には同様な結果が得られたことから、その結果は普遍的で、胎盤におけるBCRPが関与する尿酸処理については初めての報告となった。

【結論の妥当性】

申請論文では適切な実験手法を用いて検討しており、導かれた結論は論理的に矛盾するものではなく、既存のトランスポーターの知見を踏まえても妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文はヒト絨毛癌細胞株のJAR細胞およびJEG-3細胞においていくつかの尿酸トランスポーターが発現していることと、その尿酸輸送の特徴としてBCRPが重要な役割を果たしていることを証明した。これは、妊娠高血圧腎症において胎盤で作られた尿酸がBCRPを經由して血中に排出されることを支持する結果となった。

【申請者の研究能力】

申請者は産婦人科学と薬理学の理論を学び実践した上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な治験を得ている。その研究成果は本学の医学会雑誌に掲載予定であり、申請者の研究能力は高いと評価出来る。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Dokkyo Journal of Medical Sciences

44 : 31-38, 2017