

尿酸の傍細胞輸送の調節機構と高尿酸血症・痛風治療薬の創製

木村 徹

杏林大学医学部薬理学

【背景と目的】

尿酸は、ヒトにおいてアデノシ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。したがって、ヒトでは血清尿酸値が高値を示し、尿酸の排泄低下や産生亢進によって高尿酸血症を発症する。よって、生体内における尿酸の排泄・再吸収を行うシステムの機能解析が重要である。上皮細胞は腎臓の尿管や腸管上皮を形成する外界と接している細胞であり、タイトジャンクションによって管腔側と血管側が隔てられている。また、胎盤においては、母体血と胎児血とのバリアー機能を有しているものが胎盤上皮細胞になる。尿酸のpKaは5.75であり、生理的条件下ではそのほとんどが陰イオンの形をとっている。上皮細胞を横切った電解質の輸送にはいくつかのルートがある。トランスポーターやチャンネルを介する transcellular ルートや、エンドサイトーシス/エキソサイトーシスを介したベシクル輸送、そして細胞と細胞の間を通る傍細胞 (paracellular) ルートである。これまでの腎臓や消化管での尿酸輸送の解析は、トランスポーターを介したトランスセラー輸送がほとんどであった。そこで本研究では、上皮細胞を用いた尿酸の傍細胞輸送およびそれに関与するであろう claudin について検討を行った。

【材料・方法】

(1) 使用した上皮由来細胞

胎盤絨毛上皮由来細胞として、BeWo細胞、JEG-3細胞、腎臓上皮由来細胞として、MDCK細胞、LLC-PK1細胞、腸管上皮由来細胞として2種類のCaco-2細胞を用いた。

(2) タイトジャンクションの形成

トランスウェル上に細胞をコンフルエントになるまで培養し、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。

(3) 尿酸の paracellular 輸送

トランスポーターの働かない4℃条件下において、放射ラベルされた尿酸のトランスウェル上下間の輸送を測定した。

(4) claudin の同定

細胞の膜画分を調製し、質量分析計を用いて、発現している claudin 分子の同定を行った。

【結果・考察】

(1) タイトジャンクションの形成

タイトジャンクションの形成をTERの測定で検討した。その結果、細胞が存在しない状態ではトランスウェル上下間の抵抗値が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胎盤上皮由来細胞のBeWo、JEG-3細胞や、腎臓の近位尿管由来とされるMDCK typeII、LLC-PK1細胞では300Ω前後のTERの上昇が確認できた。また、腎臓の遠位尿管由来とされるMDCK typeIや腸管由来のCaco-2細胞では1000Ω以上の高いTERが観察された。

次にタイトジャンクションの形成を分子量3000の蛍光デキストランの透過性で評価した。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、4℃にて上部に蛍光デキストランを添加し、一定時間後に下部の溶液の蛍光強度を測定することでその透過性を検討した。タイトジャンクションを形成しないCOS細胞やARPE細胞では時間経過ごとに蛍光デキストランが下部に漏れ出していた。これに対して、TERの上昇も見られた、タイトジャンクシ

ンを形成する上皮由来細胞では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。そこでこの条件下で尿酸のparacellular輸送の検討を行った。

(2) 尿酸の paracellular 輸送 (図1)

胎盤上皮由来のBeWo細胞やJEG-3細胞では4℃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paracellular経路で輸送されていることが示唆された。同様に腎臓上皮由来細胞のMDCK, LLC-PK1細胞に関して検討を行った結果、腎臓由来細胞では4℃条件下では尿酸をほとんど輸送しなかった。また、由来の異なる2種類の腸管上皮細胞, Caco-2細胞に関して検討を行った結果、尿酸をparacellularでよく輸送するセルラインとほとんど輸送しないセルラインが存在することが分かった。これらの結果から、尿酸の上皮輸送は、腎臓ではtranscellular経路、胎盤ではparacellular経路、腸管では両者が混在していると考えられた。

(3) 発現する claudin の同定

上皮細胞におけるイオンのparacellular輸送に関与するものがclaudin分子である。尿酸も生体内ではイオンの形をとるため、claudinが重要であると考えられた。そこで、尿酸のparacellular輸送が見られたBeWo細胞, Caco-2細胞におけるclaudin分子種の同定を質量分析計を用いて解析した。その結果、BeWo細胞, Caco-2細胞は共に

claudin 1, 3, 4, 6, 7, 12を発現していた。しかしながら、これらのclaudinを尿酸のparacellular輸送が見られないMDCK細胞に過剰発現させても、尿酸の輸送に変化は見られなかった。よって、claudin以外の分子が関与していることが考えられ、現在検討を行っている。

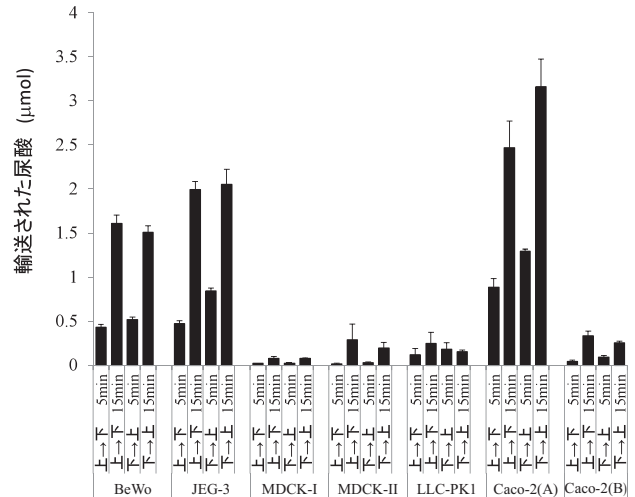


図1 各細胞モノレイヤーの尿酸の paracellular 輸送

トランスウェル上に細胞を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℃条件下において、放射ラベルされた尿酸のトランスウェル上下間の輸送を測定した。