

福岡大学博士学位論文

血清尿酸値の変動とパーキンソン病発症・進展との関連性に関する

基礎および臨床研究

Relationship between the serum uric acid concentration and the development
and progress of Parkinson' s disease

平成 30 年 3 月

PD121004

中島 章雄

目次

緒言	1
第1章 パーキンソン病患者の血中尿酸濃度に関する観察研究.....	4
1 背景・目的	4
2 方法	5
2-1. 試験デザインとインフォームド・コンセント	5
2-2. 対象	5
2-3. 除外基準	5
2-4. 調査項目	5
2-5. 統計解析	6
3 結果	7
3-1. 患者概要と単変量解析.....	7
3-2. ロジスティック回帰分析	8
4 考察	10
第2章 高尿酸血症モデルマウスの作製と尿酸の脳移行性	11
1 背景・目的	11
2 方法	12
2-1. 実験動物	12
2-2. 高尿酸食	12
2-3. 血中尿酸濃度測定	12
2-4. 尿酸の脳移行性評価	12
2-5. 統計解析	13
3 結果	14
3-1. 血中尿酸濃度に及ぼす各種高尿酸食の影響	14
3-2. 尿酸の脳移行動態.....	15
4 考察	17

第3章 6-OHDA 誘発パーキンソン病モデルマウスを用いた尿酸の PD 発症・ 進展抑制作用	18
1 背景・目的	18
2 方法	19
2-1. 実験動物	19
2-2. 6-OHDA を用いたパーキンソン病モデルマウスの作製	19
2-3 高尿酸食を用いた高尿酸血症群の作成	19
2-4. 使用薬物と実験スケジュール	20
2-5. 血中尿酸濃度測定	20
2-6. 運動機能の評価	20
2-7. 組織免疫染色	20
2-8. ウェスタンブロッティング	21
2-9. 統計解析	21
3. 結果	22
3-1. 高尿酸血症モデルマウスの作製	22
3-2 運動機能に及ぼす尿酸の影響	22
3-3. 黒質および線条体抗 TH 抗体陽性細胞数への影響	24
3-4. 線条体 TH タンパク質発現量への影響	25
4 考察	26
総括	27
参考文献	29

緒言

パーキンソン病 (PD) は、黒質緻密質のドパミン分泌細胞の変性にともなう黒質 - 線条体ドパミン作動性神経の機能低下により発症する進行性の神経変性疾患である。主な症状としては、「静止時振戦」「無動」「固縮」「姿勢反射障害」が挙げられ、PD の 4 大症状として知られている。また長期になると、認知症や寝たきりになることがある神経難病で、患者数は 1000 人に約 1 人～1.5 人、発病は 50 歳～60 歳代で多くなり、60 歳以上の患者数は 100 人に約 1 人と極めて多い。PD の治療薬として、L-dopa、ドパミンアゴニスト、COMT 阻害剤、MAOB 阻害剤など、多くの薬剤が開発されている。現状では、PD の症状を改善させるのみで、根本的な治療法は存在しないものの、再生医療の領域で、iPS 細胞を用いた細胞移植による根本治療が実施段階に入りつつある。

PD における神経変性の要因の一つとして、酸化ストレスが関与していることが報告されている (Jenner and Olanow 1998; Mizuno et. 1998)。酸化ストレスによるミトコンドリアへの傷害は活性酸素種の蓄積につながり、最終的に細胞死を引き起こす。これがドパミン神経変性の一因であり、活性酸素種の制限をすることで PD におけるドパミン神経変性は軽減されるのではないかと考えられている。このため、抗酸化物質が保護因子となる可能性を検証する疫学研究が多く行われている。

尿酸は、プリン代謝の最終産物として、ヒポキサンチンからキサンチンオキシダーゼにより産生される。尿酸の溶解度は低く、血中濃度が上昇すると尿酸塩沈着による痛風関節炎や腎障害を発症する。高尿酸血症・痛風の治療ガイドライン(第 2 版)では、血中尿酸濃度が 7 mg/dL 以上を高尿酸血症と定義し、年齢、性別を問わないとしている。また近年、生活習慣病の発症を予測する因子

であることが示され、尿酸の末梢臓器障害作用の可能性が示唆されているが、明確な意義づけはなされておらず、治療的介入によりリスクが回避されたというエビデンスはない。生活習慣病との明確な関連性は認められないが、ガイドラインでは特に男性より低い尿酸値を示す女性においては、尿酸降下薬の適応にはならないものの、潜在する疾患の検査と生活指導を推奨している。

一方で尿酸は、内在の抗酸化物質であり、過酸化亜硝酸や過氧化物、次亜塩素酸といった活性酸素種に反応する (Davies et al. 1986 ; Becker 1993)。その抗酸化活性は、同じ内因性の抗酸化物質であるグルタチオンや外因性のアスコルビン酸などよりも強力であり、血中の抗酸化物質の 50%を占めるともいわれている。興味深いのは、この尿酸の有する強力な抗酸化能が、中枢性疾患に対しては保護的にはたらいていることが示唆されている点である。

PD と尿酸との関連についても様々な報告が行われ、特に最近 10 年の疫学的研究は活発である。1994 年、Church らは、PD 患者の黒質尿酸濃度が同年齢の健常者と比べ、54%有意に減少していたことを報告した (Church and Ward 1994)。また血中尿酸濃度との関連についても、多くの観察研究において、健常者と比較して PD 患者の血中尿酸濃度が有意に低いことが示されている。(Fitzmaurice et al. 2003; Annanmaki et al. 2007)。さらに、前向きコホート研究でも血中尿酸濃度の高い群で、PD 発症リスクの減少が報告されている (de Lau et al. 2005; Weisskopf et al. 2007)。多くの臨床研究で、ほぼ一貫して PD 患者で血中尿酸濃度が低いことが示されているが、日本人を対象とした疫学研究はほとんど行われていない。PD の有病率や罹患の性差について、欧米と日本では異なる報告があり、尿酸の影響についても日本人での調査が必要である。また、これら多くの疫学調査を裏付ける基礎研究は少なく、PD 病態としてのドパミン神経傷害に及ぼす尿酸の影響について、特に動物モデルを用いた検証が

望まれる。

そこで本研究では、PD と血中尿酸濃度との関連について、日本人を対象とした観察研究を実施し、さらに高尿酸血症と PD 病態モデル動物を作製し、PD 病態に及ぼす尿酸の影響についての行動薬理的、組織学的な基礎検討を行った。

第 1 章では、福岡大学病院神経内科受診患者を対象に、電子カルテ情報を用いて、PD 患者と非 PD 患者の血中尿酸濃度を調査し、PD 罹患に及ぼす尿酸の影響を調べた。第 2 章では、食餌性的高尿酸血症モデルマウスの作製し、血中尿酸の脳移行性を検討した。第 3 章では、高尿酸血症モデルマウスに片側 6-OHDA 注入手術を施すことで、高尿酸血症・PD 病態モデルとし、PD 病態発症・進展に及ぼす尿酸の影響について、行動薬理的、組織学的な検討を行った。

第1章 パーキンソン病患者の血中尿酸濃度に関する観察研究

1 背景・目的

PD 発症・進展と血中尿酸濃度との関連を調べた臨床報告を PubMed で検索すると、論文は 2000 年代に入り 100 報を超え、特に最近 10 年での報告が多い。1994 年の Church らの PD 患者の黒質中尿酸濃度が低値を示す報告 (Church and Ward 1994) および 1996 年の Davis らの 30 年間の追跡調査での PD 患者で有意な血中尿酸値の低下に関する報告以降、多くの臨床家の関心を集め、さかんに疫学研究が進んだ。しかし、日本人を対象とした臨床研究はほとんど実施されておらず、過去 5 年では 3 報のみで、PD 発症との関連についての報告はわずか 1 報であった。欧米と比較して、日本人の PD 有病率は低いとの報告があり、性差に関しても欧米では男性患者が多いのに対し、日本人では女性で罹患率が高いという報告もある。すなわち、PD と血中尿酸濃度との関連性については、日本人を対象とした臨床試験において検証が必要であるだろう。そこで本章では、福岡大学病院神経内科の患者を対象に後ろ向き観察研究を実施し、日本人における PD 罹患と血中尿酸値との関連を調べた。

2 方法

2-1. 試験デザインとインフォームド・コンセント

試験は、電子カルテを用いて調査項目を抽出し解析を行う後ろ向き観察研究を行った。なお本試験は、福岡大学医に関する倫理委員会に申請・審査・承認を得た（承認番号18-1-02）。既存情報の利用のため、患者から文書または口頭による同意は得ずに実施し、研究についての情報は、福岡大学病院ホームページに公開し、研究が実施されることについて、患者が拒否できる機会を保障することとした。

2-2. 対象

2016年9月～2017年8月に福岡大学病院神経内科を受診した18歳以上の日本人患者を対象とした。

2-3. 除外基準

高尿酸血症治療剤および尿酸値に影響のある薬剤（以下）を使用中の患者を除外した。

（除外対象とする尿酸値に影響を及ぼす薬剤）

高尿酸血症治療剤、サイアザイド系降圧利尿薬、ループ利尿薬、テオフィリン、ピラジナマイド、ロサルタンカリウム

2-4. 調査項目

対象患者の、年齢、性別、血清尿酸値、主病名、PD診断の有無、処方薬、血清Cr値、eGFRを診療録情報より抽出した。

主病名、診断を基に、「PD群」、「非PD群」に分類し、血清尿酸値との関連解析を行った。また2群をさらに性別で分類し同様に血清尿酸値との関連解析を行った。

2-5. 統計解析

統計解析ソフトを用いて単変量解析 (χ^2 検定, Fisher の正確検定, t 検定など) および多変量解析 (ロジスティック回帰分析) を行い、有意水準は 5 % 以下とした。

3 結果

3-1. 患者概要と単変量解析

電子カルテより調査項目を抽出し整理した結果、PD 患者群 154 名、非 PD 患者群 721 名が解析対象となった。Table. 1 に各群の患者概要を示す。

血中尿酸値 (UA) は、非 PD 患者群で 5.24 ± 1.52 mg/dL、PD 患者群で 4.75 ± 1.25 mg/dL であり、単変量解析の結果、PD 患者群で有意な低値を示した ($p < 0.001$)。尿酸値を 4 mg/dL 以下、4-5 mg/dL、5-6 mg/dL および 6 mg/dL 超の 4 つに層別した各群の人数は、PD 群で尿酸値上昇とともに減少が認められた。年齢 (age) は PD 患者群で有意に高く、eGFR は PD 患者群で有意に低かった (それぞれ $p < 0.001$ 、 $p = 0.03$)。

Table. 1 対象患者概要

		non PD	PD	P-Value
		721	154	
sex	male	349	55	
	female	372	99	
UA (mg/dL)		5.24 ± 1.52	4.75 ± 1.25	<0.001
UA	≤ 4	150	45	
	4-5	200	53	
	5-6	177	35	
	>6	194	21	
age		58.8 ± 19.5	67.9 ± 10.5	<0.001
eGFR (mL/min)		73.5 ± 24.3	68.9 ± 16.2	0.03

3-2. ロジスティック回帰分析

Table. 2 は、PD 罹患を目的関数（アウトカム）とし、説明変数に血中尿酸値（UA）、年齢（age）、eGFR、性別（sex）を組み込んでロジスティック回帰分析を行った結果を示した。尿酸値の調整済みオッズ比は 0.77（95 %信頼区間：0.65-0.90）で、1 mg/dL 低下に伴いオッズ比が 23 %、有意に低下した（ $p < 0.001$ ）。年齢も 1 歳につき 3%の有意な増加が示された（ $p < 0.001$ ）。eGFR と性別には有意な変化は認められなかった。

Table. 2 ロジスティック回帰分析結果①

	adj. OR (95% CI)	P-value
UA (mg/dL)	0.77 (0.65-0.90)	< 0.001
age	1.03 (1.02-1.05)	< 0.001
eGFR	1.00 (0.99-1.01)	0.809
sex (ref. male)	1.29 (0.87-1.91)	0.213

次に尿酸値を 3-1 と同様に層別化し解析したところ、4 mg/dL 以下の群と比較して、5-6 mg/dL 群で 42%、6 mg/dL 超群で 62%のオッズ比の低下が認められた（それぞれ、 $p=0.048$ 、 $p=0.003$ 、Table.3）。

Table. 3 ロジスティック回帰分析結果②

		adj. OR (95% CI)	P-value
	≤ 4	ref.	
UA (mg/dL)	4-5	0.86 (0.54-1.38)	0.541
	5-6	0.58 (0.34-1.00)	0.048
	>6	0.38 (0.20-0.72)	0.003

さらに、性差の有無を確認するために男女別のロジスティック回帰分析を行ったところ、いずれも尿酸値の上昇に伴い、調整済みオッズ比の低下が認められ、6 mg/dL 超群では、有意にオッズ比が低下した（男：0.35 (0.13-0.91)、女：0.32 (0.12-0.88)、Table.4)

Table. 4 ロジスティック回帰分析結果③

		male		female	
		adj. OR (95% CI)	P-value	adj. OR (95% CI)	P-value
	≤ 4	ref.		ref.	
UA (mg/dL)	4-5	0.76 (0.30-1.95)	0.570	0.90 (0.52-1.55)	0.700
	5-6	0.46 (0.18-1.22)	0.120	0.64 (0.33-1.25)	0.190
	>6	0.35 (0.13-0.91)	0.032	0.32 (0.12-0.88)	0.027
	age	1.02 (1.00-1.04)	0.076	1.04 (1.02-1.06)	< 0.001
eGFR	0.99 (0.98-1.01)	0.390	1.00 (0.99-1.02)	0.750	

4 考察

本観察研究では、日本人においても血中尿酸濃度の上昇とともに PD 罹患のオッズ比が減少することが示された。すなわち血中尿酸濃度が低値であることは、PD 発症のリスク因子である可能性が示唆された。また血中尿酸濃度と PD 罹患の関連について性差は認められなかった。本結果は日本人以外を対象とした既報の疫学研究報告の結果と一致する (Fitzmaurice et al. 2003; Annanmaki et al. 2007)。一般に、血中尿酸濃度は男性で高値を示すが、PD 罹患についての性差はないとされている。血中尿酸濃度は PD 発症の危険因子の 1 つであり、その他の因子と相互に影響を及ぼした結果として PD が発症すると考えれば、性差の矛盾については、別の危険因子の性差と相殺されたのかもしれない。

本研究では、PD 患者の対照群として、健常者ではなく神経内科受診の非 PD 患者を選定した。非 PD 患者群には PD 以外の神経変性疾患患者が含まれる。尿酸はアルツハイマー病などの神経変性疾患においても、PD と同様に低濃度で発症率が増加するとの報告があることから、尿酸の神経保護作用の可能性を明らかにするためには、神経変性疾患と除く対照群との比較が必要であるかもしれない。

また血中尿酸濃度が中枢の尿酸量に影響するのかについて、明確な報告はないものの、尿酸代謝の上流にあるイノシンの投与により、血中尿酸濃度の上昇とともに脳脊髄液中の尿酸濃度が上昇することが示されている。すなわち、血中尿酸濃度が高値であれば、中枢での尿酸濃度も高く維持され、神経保護作用を発揮している可能性がある。

尿酸が神経保護作用を有しているか否かについては、前述したように基礎研究が少ないことから、いまだ不明な点が多い。そこで第 2、3 章ではモデル動物を用いて、高尿酸血症の PD 発症に及ぼす影響を検証した。

第2章 高尿酸血症モデルマウスの作製と尿酸の脳移行性

1 背景・目的

尿酸とPD発症・進展との関連についての臨床研究が精力的に実施されている一方で、基礎研究はほとんど実施されていない。PubMedに登録されている論文は、最近5か年でわずか9報のみである。PD病態に対する尿酸の影響を詳細に検討するためには、動物モデルを使用する必要がある。PDモデル動物作製方法は、評価手技も含めて確立されたものがあるのだが、高尿酸血症モデル作製に問題点がある。ヒトにおいて尿酸は、プリン代謝の最終産物であるのに対して、げっ歯類では尿酸酸化酵素（ウリカーゼ）を有するためにアラントインまで代謝されることが知られている。このため、げっ歯類の血中尿酸濃度は低値となっている。様々な高尿酸血症モデル作製方法が報告されているものの、確立された方法はまだなく、これが基礎実験報告の少ない理由の1つとなっていると思われる。これまでに報告のある高尿酸血症モデル動物作製法は、尿酸やイノシンなどの前駆体を大量に腹腔内連続投与する方法や遺伝子改変による方法、そしてウリカーゼ阻害薬であるオキソン酸を投与する方法などが知られている。それぞれの方法で、作製の手技や期間達成される血中尿酸濃度に違いがあるため、本章では、緩徐な血中尿酸濃度上昇を得られるモデル作製方法を確立することを目指し、食餌性のモデル作製を試み、併せて尿酸の脳移行性を検討した。

2 方法

2-1. 実験動物

5-6 週齢 ddY 雄性マウス（九動）を用いた。粉末飼料（CE-2；日本クレア株式会社）あるいは高尿酸食（後述）および水は自由に摂取できるようにし、恒温恒湿、明暗 12 時間周期（明期 AM7:00-PM7:00）で飼育した。実験動物の取り扱いについては、福岡大学動物実験指針に従った。

2-2. 高尿酸食

粉末飼料に、任意の濃度のオキソソルホン酸カリウム（WAKO）、尿酸（WAKO）およびイノシンを単独あるいは複数混合したものを高尿酸食とした。

2-3. 血中尿酸濃度測定

高尿酸食を 1 週間摂食させた動物を麻酔下で、下大静脈よりヘパリン採血した。採取した血液は、4°C、3000 rpm、10 分間遠心分離を行い、血漿を使用時まで -80°C で保存した。

血中尿酸濃度は、尿酸 C-テストワコーキット（WAKO）を用いて測定した。測定は duplicate とし、検量線より濃度を計算した。

2-4. 尿酸の脳移行性評価

ウレタン麻酔下において、¹⁴C-尿酸を鎖骨下静脈より投与し、各時間（1～120 分後）において、頸動脈より動脈血を採取した。採血後、断頭し、全脳を摘出した。脳および血清を可溶化剤と混和し、溶解した後、液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定した。各測定時間における血液中 ¹⁴C-尿酸の放射活性の対数および ¹⁴C-尿酸の脳/血清比（下記算出式）をプロットして、脳移行量を評価した。

$$\text{脳/血清比 } (\mu\text{L/g}) = \frac{\text{血清の量 } (\mu\text{L}) \times \text{脳の放射活性 (cpm)}}{\text{脳の重さ (g)} \times \text{血清中の放射活性 (cpm)}}$$

2-5. 統計解析

2 群間の比較にはスチューデントの t 検定を用いた。多群間の比較には一元配置分散分析を行い、各群間の比較は Dunnett 法を用いた。データは平均値±標準誤差で表し、有意水準は 5%とした。

3 結果

3-1. 血中尿酸濃度に及ぼす各種高尿酸食の影響

各種高尿酸食を1週間自由摂食させた後の血中尿酸濃度を Fig.1、Fig.2 に示した。Fig.1 より、プリン代謝における尿酸の前駆体であるイノシンを混合した高尿酸食は、いずれの濃度においても有意な血中尿酸濃度の上昇は認められなかった。さらにウリカーゼ阻害薬オキソン酸カリウムを 2.5 %同時に混合しても、血中尿酸濃度に変化はなかった。それに対して、2.5 %オキソン酸カリウムを単独で混合した場合、1 %尿酸と同時に混合した場合はいずれも血中尿酸濃度が有意に上昇した。1 %尿酸と 2.5 %オキソン酸を混合した高尿酸食では、通常食と比較して、約 3 倍の血中尿酸濃度であった (Fig.2、通常食:0.96 ± 0.10 mg/dL、高尿酸食 : 2.62 ± 0.18 mg/dL)。本結果より、本研究に用いる高尿酸食は 1 %尿酸および 2.5 % オキソン酸を含有する飼料を用いた。

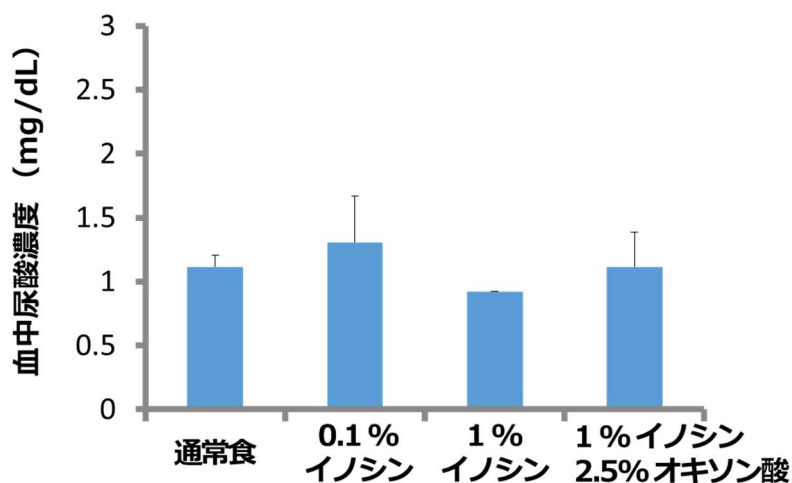


Fig. 1 血中尿酸濃度に及ぼす高尿酸食の影響①

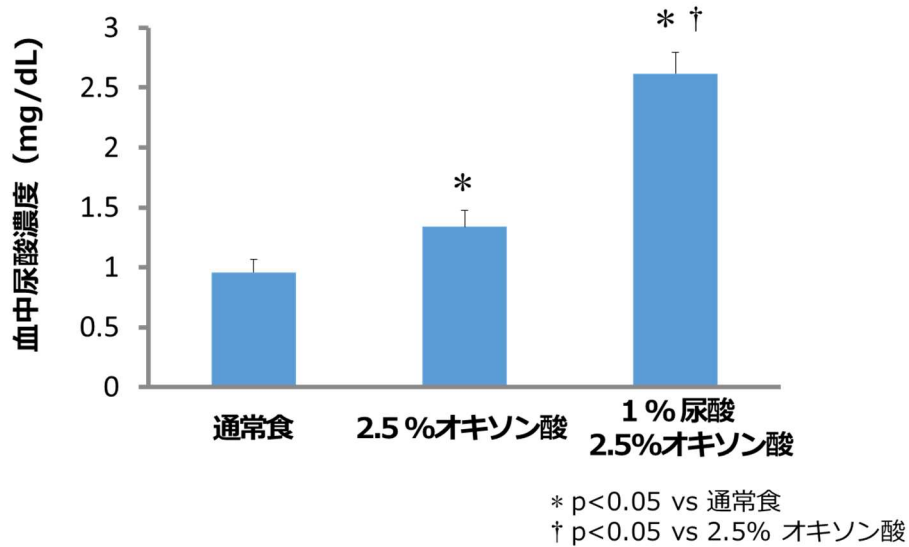


Fig. 2 血中尿酸濃度に及ぼす高尿酸食の影響②

3-2. 尿酸の脳移行動態

Fig.3 に、 ^{14}C -尿酸単独（低濃度）および ^{14}C -尿酸と $400\mu\text{M}$ 尿酸混合（高濃度）を投与した場合の、血中尿酸濃度推移を示した。用いた濃度に関わらず、尿酸は直線的に消失し、その速度定数に変化はなかった。

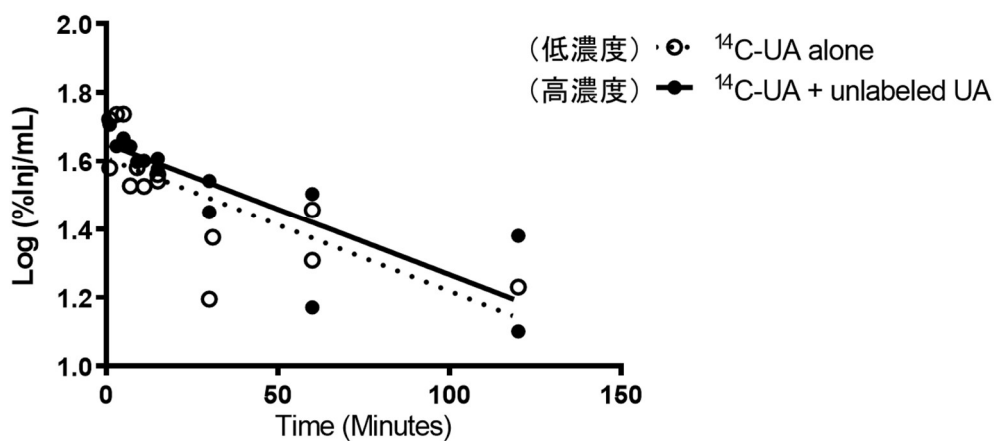


Fig. 3 血中尿酸濃度の時間推移

このときの ^{14}C -尿酸の脳/血清比は、暴露時間とともに増加し、高濃度であっても飽和性は認められなかった (Fig.4)。すなわち、尿酸は用いた濃度範囲では受動的に脳に取り込まれることが分かった。

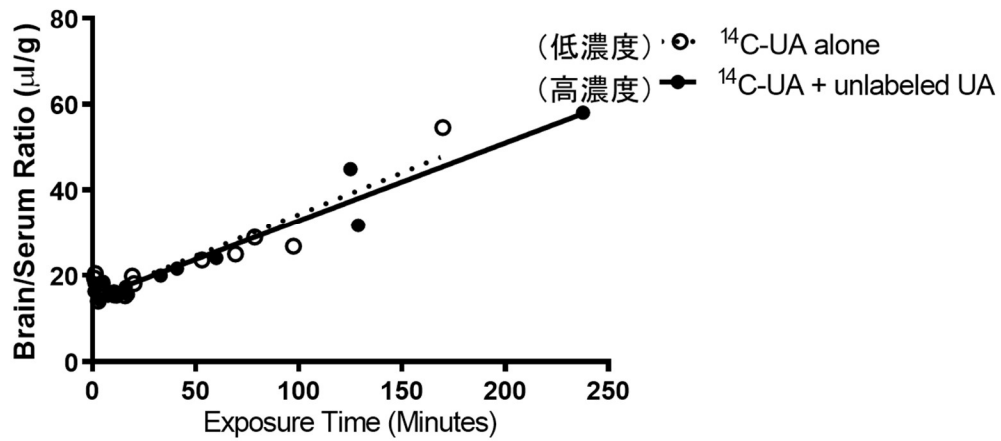


Fig. 4 尿酸の脳/血清比と暴露時間との関係

4 考察

げっ歯類での高尿酸血症モデル作製方法として、食餌による緩徐な血中尿酸濃度上昇を目的とし、ウリカーゼ阻害薬オキソン酸カリウム、尿酸およびイノシンを用いて条件検討を行った。オキソン酸単独、イノシン単独およびオキソン酸との混合食餌では、血中尿酸濃度の上昇が不十分であった。最終的に、通常食群の血中尿酸濃度の約4倍の濃度を達成するが可能なオキソン酸2.5%と1%尿酸の混合食餌を採用することとした。

これまでのげっ歯類での高尿酸血症モデルは、尿酸の大量腹腔内連続投与やウリカーゼ遺伝子改変モデルが使用されている。これらのモデルは、高い血中尿酸濃度が達成可能であるが、頻回の侵襲や遺伝子操作および高濃度による末梢臓器の傷害などが問題点として挙げられる。そこで、実臨床に近いモデルとして、本研究で採用した食餌性モデルは有用であると考えられる。

血中尿酸濃度の上昇が脳内尿酸濃度と関連するかについては、詳細な検討は行われていない。本研究での脳移行性実験の結果からは、今回使用した高尿酸血症モデルの血中尿酸濃度範囲において、尿酸は受動拡散により脳内へ移行することが示唆された。尿酸の体内動態には、URAT1、GLUT9、ABCG2など数種のトランスポーターが関与していることが知られている。血液脳関門に発現しているトランスポーターは明確ではないが、脳移行にトランスポーターが関与している可能性があることから、今後の検討が必要である。

第 3 章 6-OHDA 誘発パーキンソン病モデルマウスを用いた尿酸の PD 発症・進展抑制作用

1 背景・目的

尿酸が PD 発症・進展抑制作用を有するか否かについては実証されておらず、またそのメカニズムについても明らかになっていない。細胞レベルでは、尿酸が神経毒である 6-hydroxydopamine (6-OHDA) による細胞障害に対し保護作用を持つことが多く報告されている (Zhu et al. 2012)。動物モデルを用いた研究は極めて少ないが、GSK-3 β シグナルが関与する可能性が示唆されている (Gong et al. 2012)。これまでの動物モデルでの報告は、遺伝子操作や頻回の注射によって動物に高尿酸血症を引き起こしており、臨床で得られる血中尿酸濃度よりも高濃度での検討となっている。

そこで本章では、第 2 章で検討した食餌性的高尿酸血症モデルマウスに対して、片側線条体 6-OHDA 注入を行い、PD-高尿酸モデルマウスを作製した。本モデルの血中尿酸濃度は中等度の高値をしめすことから、臨床に近いモデルといえる。本モデルを用いて、尿酸の PD 病態に及ぼす影響について、行動学的、組織学的検討を行った。

2 方法

2-1. 実験動物

7週齢 ICR 雄性マウス（九動）を用いた。粉末飼料（CE-2；日本クレア株式会社）および水は自由に摂取できるようにし、恒温恒湿、明暗 12 時間周期（明期 AM7:00-PM7:00）で飼育した。実験動物の取り扱いについては、福岡大学動物実験指針に従った。

動物は、健常群と PD モデル群に分け、各群通常食あるいは高尿酸食で飼育し、それぞれ control、HU、PD、PD-HU 群とした。

2-2. 6-OHDA を用いたパーキンソン病モデルマウスの作製

アスコルビン酸 0.2%を含む生理食塩水で 2mg/mL の 6-OHDA 希釈溶液を調製した。10 μ L のハミルトンマイクロシリンジのステンレス針に、6-OHDA 希釈液を充填した。

ペントバルビタールナトリウム (50mg/kg 体重) 腹腔内注射による麻酔下で、マウスの頭部を脳定位固定装置に固定し、脳定位固定術によって、6-OHDA 希釈溶液を毎分 0.1 μ L の流速により 10 μ g を 2 分間で圧注入した。注入部は右脳の線条体領域で、頭蓋骨冠矢状縫合の交差点 (ブレグマ) を基点にして、+0.5 mm AP, +2 mm ML, -2.8 mm DV とした。部位への移動は、マイクロマニピュレータ (成茂化学 SM-11) によっておこなった。

2-3 高尿酸食を用いた高尿酸血症群の作成

飼料に 2.5%あるいは 5%オキソニン酸 (WAKO) および 1%尿酸 (WAKO) を混合したものを高尿酸食とし、PD モデル作製 1 週間前より自由摂食させた動物を高尿酸血症群とした。

2-4. 使用薬物と実験スケジュール

PD モデルマウスの作製後、5 週間目に運動機能評価を行い、血液および脳を採取した。血液はヘパリン採血とし、4℃、3000 rpm、10 分間遠心分離を行い、血漿を使用時まで -80℃で保存した。脳は 4%パラフォルムアルデヒド溶液で固定した。

2-5. 血中尿酸濃度測定

血中尿酸濃度は、尿酸 C-テストワコーキット (WAKO) を用いて測定した。測定は duplicate とし、検量線より濃度を計算した。

2-6. 運動機能の評価

運動機能評価は、ロータロッドテストおよびアポモルフィン誘発回転運動数の測定を行った。ロータロッドテストは、手術前に十分な訓練を行い、5 週間目に評価した。回転数は 30rpm で、120 秒間を最大運動時間とし、落下までの時間を計測した。アポモルフィン誘発回転運動は、手術後 2~5 週後に、アポモルフィン(1mg/kg)を腹腔内投与し、傷害側と反対方向への回転運動数を測定した。

2-7. 組織免疫染色

5 週間目に、ペントバルビタールナトリウム深麻酔下 (50mg/kg 体重腹腔内注射) で、心臓カテーテルを介して、4%パラフォルムアルデヒドで灌流固定した。灌流固定後、摘出した脳を 1 昼夜同固定液に浸した後、氷晶防止のために 30%ショ糖リン酸緩衝液に浸して、脳組織にショ糖を浸み込ませた。その後、-80℃に保存した。薄切標本は以下の抗体による免疫組織化学に用いたドパミン神経の損傷程度を調べるために、抗チロシンヒドロキシラーゼ (TH) 抗体 (希釈濃度 1 : 8000、4℃・一昼夜反応) による免疫組織化学をおこなった。

2-8. ウェスタンブロッティング

5週間目に頸椎脱臼後、全脳を摘出しブレインマトリクス上で線条体領域を切り出し、ペトリディッシュ上で左右線条体領域を分画した。ただちに、あらかじめ RIPA バッファーを分注したチューブに入れ、ホモジネートし、常法に従いタンパク質を抽出した。タンパク定量後、SDS-PAGE にて電気泳動し、メンブレンに転写した。メンブレン上の TH タンパク質を抗 TH 抗体にて検出した。

2-9. 統計解析

2群間の比較にはスチューデントの t 検定を用いた。多群間の比較には一元配置分散分析を行い、各群間の比較は Dunnet 法を用いた。データは平均値±標準誤差で表し、有意水準は 5%とした。

3. 結果

3-1. 高尿酸血症モデルマウスの作製

粉末飼料に1%尿酸および2.5%オキソソル酸を混合した高尿酸食を6週間自由摂食させた時の各群の血中尿酸濃度をに示した (Fig.5)。

通常食を与えた control 群・PD 群(それぞれ 1.05 ± 0.04 , 0.91 ± 0.06 mg/dL)と比較して、1%尿酸および5%オキソソル酸含有高尿酸食を与えた HU 群・PD-HU 群では有意な尿酸濃度上昇が認められた(それぞれ 3.72 ± 0.53 , 3.82 ± 0.75 mg/dL)。

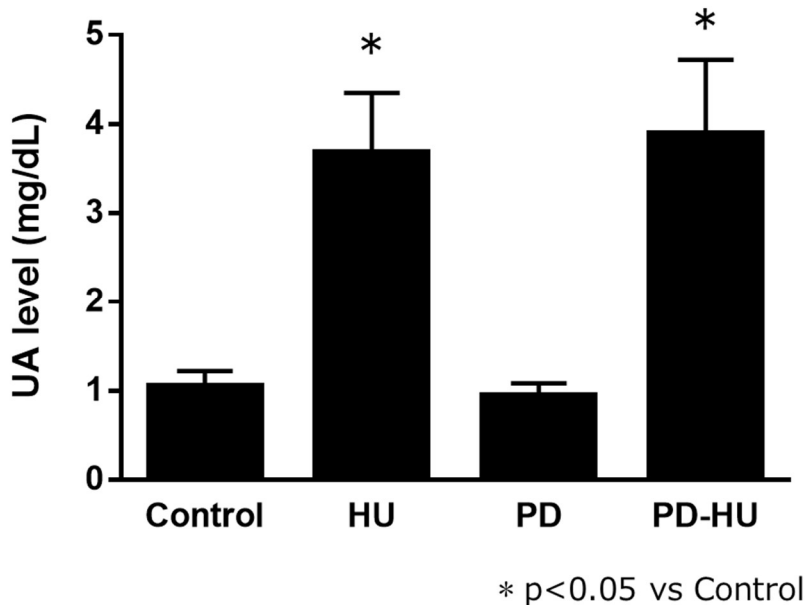


Fig. 5 高尿酸食6週間接種後の血中尿酸濃度

3-2 運動機能に及ぼす尿酸の影響

ロータロッドテストの結果を、Fig.6 に示した。落下までの時間は、Control 群、HU 群と比較して、PD 群で有意に短縮した。この時間の短縮は、PD-HU 群で有意に抑制されていた。また、アポモルフィン誘発回転運動数は、Control

群、HU 群でわずかであったのに比較して、PD 群で有意な増加が認められた。
この増加は、PD-HU 群で抑制されていた (Fig.7)。

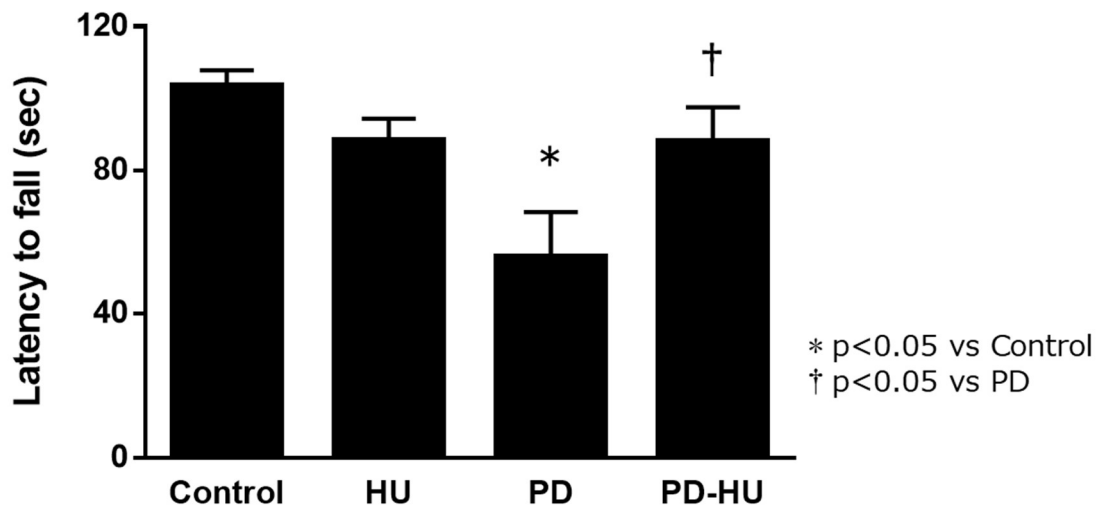


Fig. 6 落下までの時間に対する尿酸の影響

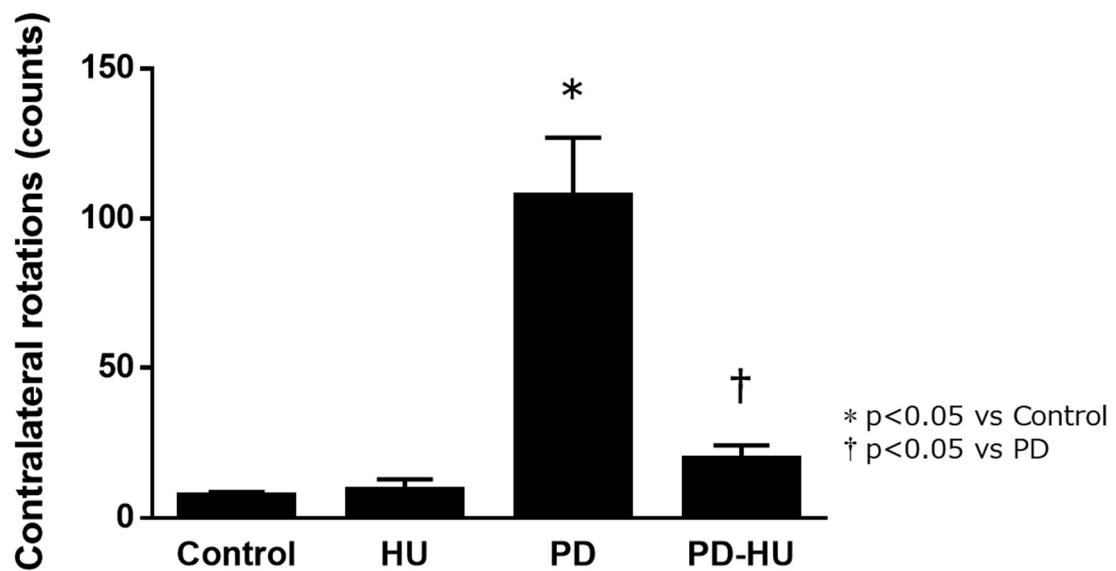


Fig. 7 アポモルフィン誘発回転運動に対する尿酸の影響

3-3. 黒質および線条体抗 TH 抗体陽性細胞数への影響

黒質および線条体領域の抗 TH 抗体陽性細胞の比較を Fig.8 に示した。黒質、線条体いずれにおいても、PD 群では健常な左側と比較して右側で抗体陽性反応の減少が認められ、PD-HU 群では、この減少が抑制された。

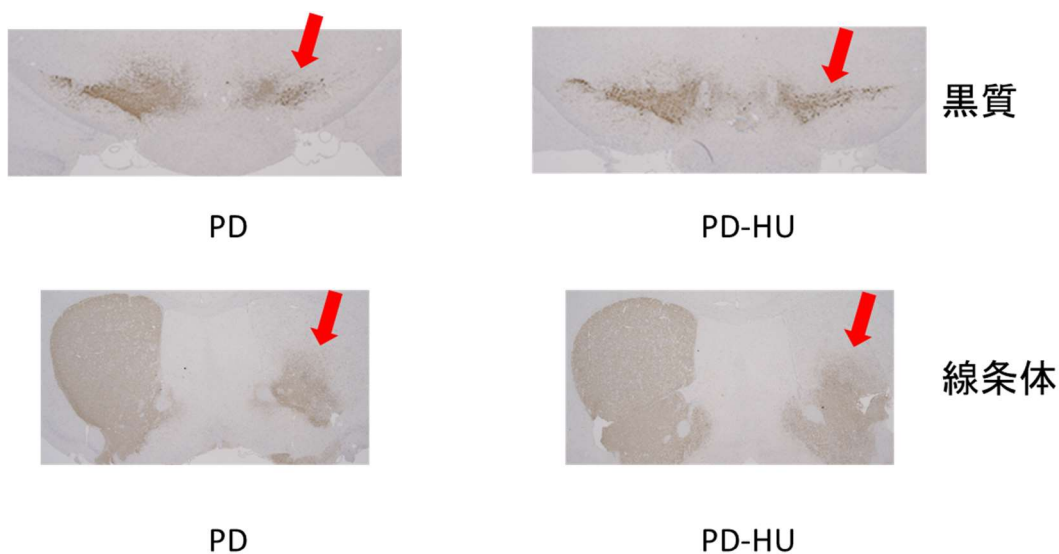


Fig. 8 黒質および線条体抗 TH 抗体陽性細胞に対する尿酸の影響

3-4. 線条体 TH タンパク質発現量への影響

線条体 TH タンパク質発現量は、PD 群で健常な左側と比較して右傷害側で有意な減少が認められた。この減少は、PD-HU 群では抑制されていた (Fig.9)。

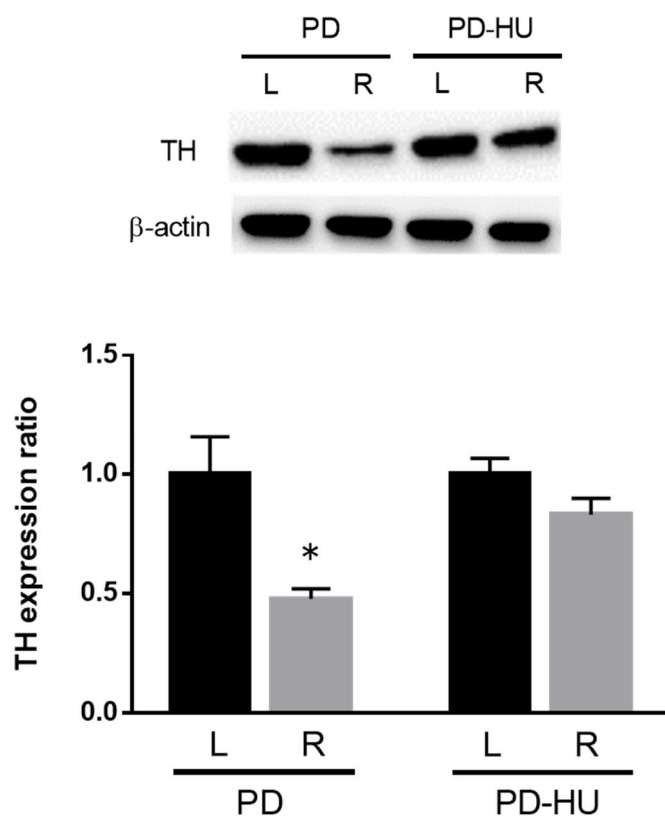


Fig. 9 線条体 TH タンパク質発現量に対する尿酸の影響

4 考察

本研究では、飼料に1%尿酸および2.5%オキソソクシン酸を混合した高尿酸食を6週間自由摂食させることで、高尿酸血症モデルを作成した。通常食を与えたcontrol群・PD群と比較して、1%尿酸および2.5%オキソソクシン酸含有高尿酸食を与えたHU群・PD-HU群では有意な尿酸濃度上昇が認められた。これは、Control群と比較して約3~4倍の濃度であり、高尿酸血症状態であると考えられた。

ロータロッドテストによる運動機能の評価において、PD群では有意な運動時間の減少が起これ、この減少はPD-HU群で抑制された。ロータロッドテストは協調運動機能の評価として一般的な試験であり、パーキンソン病の主な症状として無動などの運動機能障害の評価に使用される。すなわち、尿酸値上昇による運動機能改善作用が認められた。また、ドパミンアゴニストであるアポモルフィン誘発による傷害野反対側への回転運動の増加は、傷害側のドパミン神経細胞死による後シナプスのハイパーセンシティブリティが関与していると考えられている。すなわち、PD群ではドパミン神経細胞変性が惹起され、それが尿酸により抑制されたことが示唆される。この点については組織染色による黒質および線条体の抗TH抗体陽性細胞数の検出、並びにウエスタンブロッティングによる線条体THタンパク質発現量の検出結果と一致した。

以上より、尿酸は黒質-線条体領域のドパミン神経細胞保護作用を有し、PD病態を改善していると考えられる。

総括

パーキンソン病 (PD) は、中脳黒質のドパミン神経細胞が変性することにより発症する神経変性疾患である。PD の神経変性には酸化ストレスが関与していることが判明している。最近、高尿酸血症が PD の発症を抑制し、その進行も遅くすることが報告され注目されており、尿酸の強い抗酸化作用がドパミン神経保護作用を持っている可能性が考えられている。本研究では、PD 発症に及ぼす尿酸の影響について、臨床および基礎研究を行い、以下の知見を得た。

第 1 章では、福岡大学病院神経内科受診患者を対象に、電子カルテ情報を基に後ろ向き観察研究を行った。PD 患者の血中尿酸濃度の平均値は、非 PD 患者と比較し有意に低かった。ロジスティック回帰分析による多変量解析では、血中尿酸濃度の上昇により PD 罹患の調整済みオッズ比が減少し、4 mg/dL 以下の群と比較して、5~6 mg/dL 群、6 mg/dL 以上群で、有意な PD 罹患オッズ比の低下が認められた。さらに、このオッズ比の低下に性差は認められなかった。

第 2 章では、基礎実験において PD 病態に対する尿酸の影響を明らかにするべく、まず食餌性高尿酸血症モデルマウスの作製を行った。高尿酸食として、1%尿酸および尿酸代謝酵素阻害薬であるオキソン酸カリウム 2.5%を含有するマウス飼料を作製し、1 週間摂食させたところ、血中尿酸濃度は、通常食群と比較して有意な上昇を示し、約 3~4 倍の濃度となった。また尿酸の脳移行動態は受動拡散であることを明らかにし、高尿酸血症状態であっても脳移行性は良好であることが示された。

第 3 章では、前章の高尿酸血症モデルマウスに対し、神経毒である 6-OHDA

を片側線条体に注入して PD モデルを作製し、PD 病態に及ぼす尿酸の影響について行動学的、組織学的評価を行った。ロータロッドテストの結果より、PD 群では協調運動機能障害が起こり、PD-高尿酸血症 (HU) 群で回復していた。またアポモルフィン誘発による傷害反対側への回転運動数は、PD 群で有意に増加し、その増加は PD-HU 群で抑制された。組織学的には、黒質および線条体での抗チロシンヒドキシラーゼ (TH) 抗体陽性反応が、PD 群では傷害側 (右線条体) で減少し、PD-HU 群ではその減少が抑制されていた。同様の結果が、線条体 TH タンパク質発現量で認められた。

本研究より、血中尿酸濃度の低下は PD 罹患リスクを高めることを明らかとし、適切な血中尿酸濃度を設定することにより、尿酸のドパミン神経保護作用を介して、PD 発症・進展を予防あるいは遅延できる可能性を示した。尿酸の詳細な作用機序について、さらに検討を行う必要があるが、本研究は、今後の PD 治療において新たな選択肢を提示するものである。

以上、本研究は、尿酸が PD 発症・進展抑制作用を有する可能性を、臨床および基礎研究で検証し、臨床応用に向けた基盤となる情報を提示した点で意義深い

参考文献

Annamaki T., Muuronen A. and Murros K. (2007) Low plasma uric acid level in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 22, 1133-1137.

Becker B. F. (1993) Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 615-631.

Church W. H. and Ward V. L. (1994) Uric acid is reduced in the substantia nigra in Parkinson's disease: effect on dopamine oxidation. *Brain Res. Bull.* 33, 419-425.

Davies k. N. J., Sevanian A., Muakkassah-Kelly S. F. and Hochstein P. (1986) Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem. J.* 235, 747-754.

Fitzmaurice P. S., Ang L., Guttman M., Rajput A. H., Furukawa Y. and Kish S. J. (2003) Nigral glutathione deficiency is not specific for idiopathic Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 18, 969-976.

Gong L., Zhang Q. L., Zhang N., Hua W. Y., Huang Y. X., Di P. W., Huang T., Xu X. S., Liu C. F., Hu L. F. and Luo W. F. (2012) Neuroprotection by urate on 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease: linking to Akt/GSK3 β signaling pathway. *Journal of neurochemistry.* 123, 876-885

Jenner P. and Olanow C. W. (1998) Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 44, S72-S84

Johnson R.J., Kang D.H., Feig D., Kivlighn S., Kanellis J., Watanabe S., Tuttle K. R., Rodriguez-Iturbe B., Herrera-Acosta J. and Mazzali M. (2003) Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *Hypertension* 41, 1183-1190.

Kutzing M. K. and Firestein B. L. (2008) Altered uric acid levels and disease states. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324, 1-7.

de Lau L. M., Koudsttal P. J., Hofman A. and Breteler M. M. (2005) Serum uric acid levels and the risk of Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 58, 797-800.

Mizuno Y., Yoshino H., Ikebe S., Hattori N., Kobayashi T., Shimoda-Matsubayashi S., Matsumine H. and Kondo T. (1998) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 44, S99-S109.

Schwarzschild M. A., Schwid S. R., Marek K. et al. (2008) Serum urate as a predictor of clinical and radiographic progression in Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 65, 716-723.

Weisskopf M. G., O'Reilly E., Chen H., Schwarzschild M. A. and Ascherio A. (2007) Plasma urate and risk of Parkinson's disease. *Am. J. Epidemiol.* 166, 561-567.

Zhu T. G., Wang X. X., Luo W.F., Zhang Q. L., Huang T. T., Xu X. S. and Liu C. F. (2012) Protective effects of urate against 6-OHDA-induced cell injury in PC12 cells through antioxidant action *Neurosci. Lett.* 506, 175-179.