

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

中島 章雄

福岡大学薬学部実務薬剤学教室, 814 - 0180 福岡市城南区七隈8丁目19-1

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

Akio Nakashima

Department of Pharmaceutical and Health Care Management, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

Abstract

The development of Parkinson's disease (PD) involves the degeneration of dopaminergic neurons caused by oxidative stress. Accumulating clinical evidence indicates that high blood levels of uric acid, an intrinsic antioxidative substance, are associated with reduced risk of PD. However, this hypothesis has not been confirmed by in vivo experiments.

The present study investigated the effects of uric acid on behavioral abnormalities in the development of PD. We used unilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned mice, which were fed on a diet with 1% uric acid and 2.5% potassium oxonate (an uricase inhibitor) to induce hyperuricemia. A significant elevation in uric acid levels was found in groups that were fed a high uric acid diet. The 6-OHDA-lesioned mice showed the impaired rotarod performance and the increased apomorphine-induced contralateral rotations. These behavioral abnormalities were significantly reversed by feeding with a uric acid diet for 1 week before and 5 weeks after surgery (subchronic hyperuricemia). These behavioral improvements occurred in parallel with recovery of tyrosine hydroxylase protein levels in the lesioned striatal side.

The present study with dietary hyperuricemia model mice confirms that uric acid exerts a neuroprotective effect on dopaminergic neuronal loss, improving motor dysfunction and ameliorating PD development.

Keywords: uric acid, Parkinson's disease, 6-OHDA, hyperuricemia

緒言

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で発症する神経変性疾患である。主な症状として震えや固縮があり、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、60歳以上では100人に約1人と極めて多い。

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。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 (ROS) の蓄積につながり、最終的に細胞死を引き起こす。このROS産生を抑制することにより、PDにおけるドパミン神経変性が回避できるのではないかと考えられている。

尿酸は痛風の原因物質であると同時に、ヒト体内での強力な抗酸化物質として機能している。近年、

尿酸の抗酸化作用に基づく神経保護作用が注目され、多くの臨床研究が行われている。PD関連では、PD患者の血中尿酸濃度が相対的に低いという報告があるが、日本人を対象とした報告はほとんどない。またPD発症・進展に対する尿酸の作用についての基礎研究も少ないのが現状である。

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学的、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、行動薬理学的、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

【方法】

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

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。

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。

【結果・考察】

PD群、非PD群の血中尿酸濃度の平均値はそれぞれ、 4.75 ± 1.3 mg/dL、 5.24 ± 1.5 mg/dLで、PD群で有意に低かった (Table.1)。年齢、性別、腎機能で調整後のロジスティック回帰分析を行ったところ、血中尿酸値が1.0上昇することによるPD罹患のオッズ比は23%減少した (Table.2A)。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))、

Table.1 Baseline characteristics of the PD and non PD group

		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

Table.2 Multivariable logistic regression analysis

(A)			(B)				
	adj. OR (95% CI)	P-value	male		female		
			adj. OR (95% CI)	P-value	adj. OR (95% CI)	P-value	
UA (mg/dL)	0.77 (0.65-0.90)	< 0.001	≤4	ref.	ref.		
age	1.03 (1.02-1.05)	< 0.001	4-5	0.76 (0.30-1.95)	0.570	0.90 (0.52-1.55)	0.700
eGFR	1.00 (0.99-1.01)	0.809	5-6	0.46 (0.18-1.22)	0.120	0.64 (0.33-1.25)	0.190
sex (ref. male)	1.29 (0.87-1.91)	0.213	>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

女：0.32 (0.12-0.88), Table.2B)

以上の結果より、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。

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

【方法】

実験動物には5-6週齢ddY雄性マウス(九動)を用いた。粉末飼料あるいは高尿酸食および水は自由に摂取できるようにし、恒温恒湿、明暗12時間周期で飼育した。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℃、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。血中尿酸濃度は、尿酸C-テストワコーキットを用いて測定した。

尿酸の脳移行性評価では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/血清比をプロットして、脳移行量を評価した。

【結果】

2-1. 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に示した。Fig.1Aより、プリン代謝に

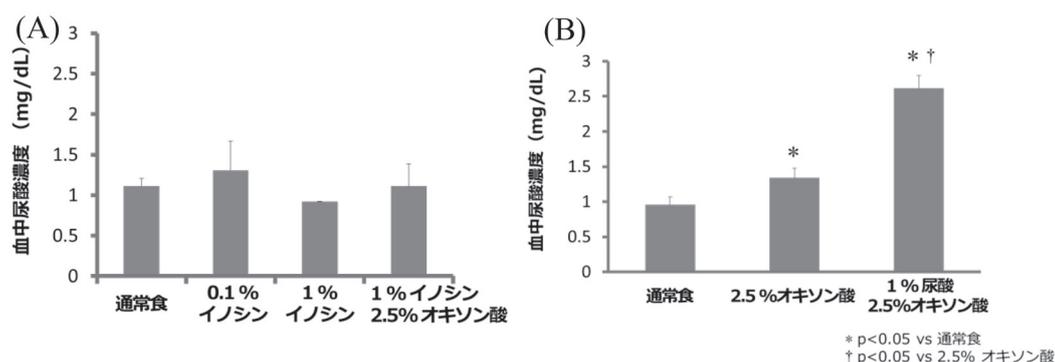


Fig.1 Effect of high UA diet-induced hyperuricemia.

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.1B, 通常食: 0.96 ± 0.10 mg/dL, 高尿酸食: 2.62 ± 0.18 mg/dL)。

3-2. 尿酸の脳移行動態

Fig.2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。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.3)。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。

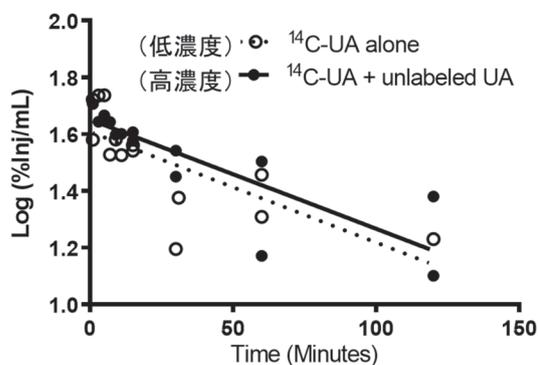


Fig.2 The correlation between serum ^{14}C -UA levels and time without (open circles) or with (closed circles) $400\mu\text{M}$ of unlabeled UA and time

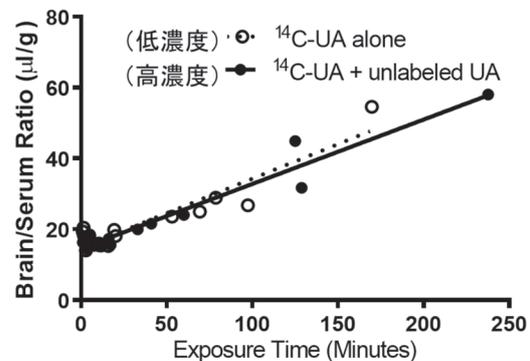


Fig.3 Unidirectional influx rate of ^{14}C -UA by brain parenchyma.

【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。

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

【方法】

実験動物には7週齢ICR雄性マウス(九動)を用いた。6-OHDAの片側線条体注入によりパーキンソン病モデルマウスPD群を作製した。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。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。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。また、Western blot法を用いTHタンパク質の発現量を求めた。

【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%オキソニン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示した(Fig.4)。

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%オキソニ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(それぞれ 3.72 ± 0.53 , 3.82 ± 0.75 mg/dL)。

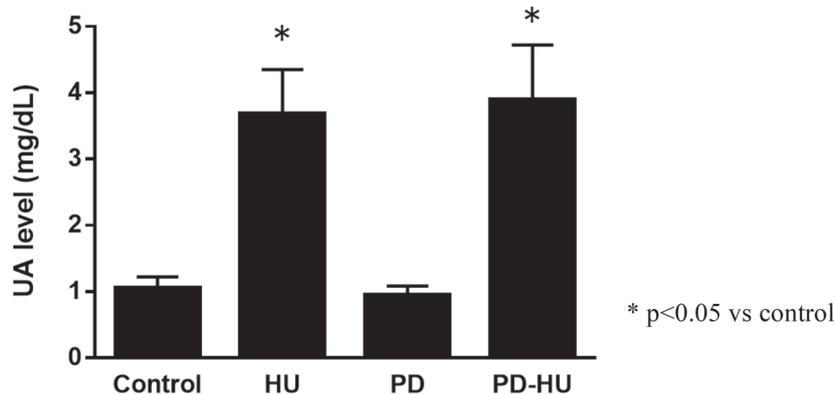


Fig.4 Diet containing 1.0% UA and 2.5% potassium oxonate increased plasma UA levels.

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.5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.6)。

3-3. 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.7)。

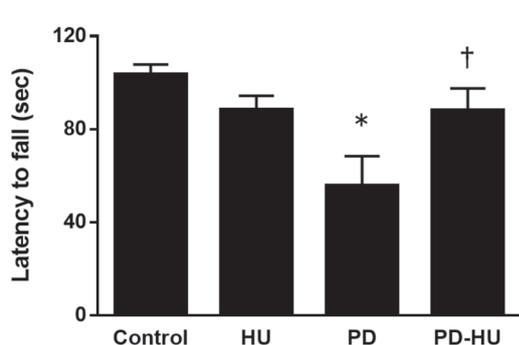


Fig.5 The latency (seconds) for maintaining rotarod performance until falling from the rotarod at a constant speed of 30 rpm was recorded.

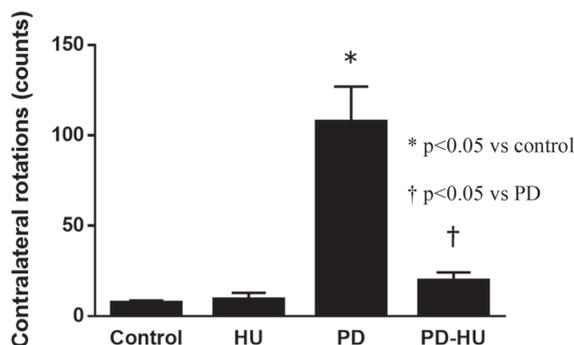


Fig.6 The apomorphine-induced rotation was observed for 15 min in mice.

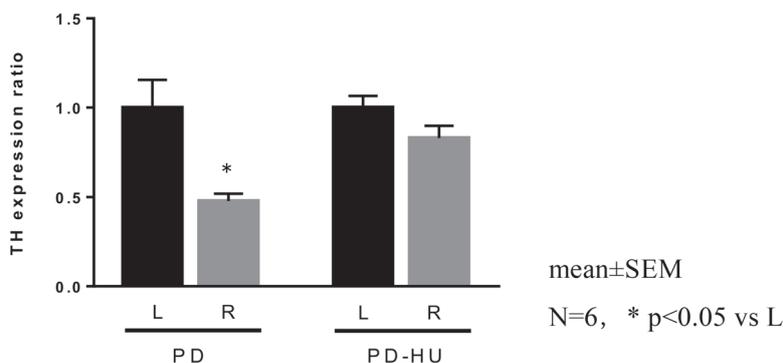


Fig.7 The protein levels of TH in the striatum were determined by Western blot analyses.

【考察】

本研究では、飼料に1%尿酸および2.5%オキソソ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り、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。この点についてはウエスタンブロット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。

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

1. Annamaki T., Muuronen A. and Murros K. (2007) Low plasma uric acid level in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 22, 1133-1137.
2. Becker B. F. (1993) Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 615-631.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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
7. Jenner P. and Olanow C. W. (1998) Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 44, S72-S84
8. 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.
9. Kutzing M. K. and Firestein B. L. (2008) Altered uric acid levels and disease states. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324, 1-7.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.

14. 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.