

高尿酸血症併発 COPD 治療における薬剤性中枢有害作用

高尿酸血症併発 COPD 治療（課題番号：187007）

研究期間：平成30年7月31日～令和2年3月31日

研究代表者：片岡泰文 研究員：山内淳史

【背景・目的】

慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive pulmonary disease：COPD）は、進行性の気流制限を主徴とする疾患である。本邦の NICE study (Nippon COPD Epidemiology study) によると40歳以上の COPD 有病率は8.6%（男性：16.4%、女性：5.0%）、潜在患者数は530万人以上と推測されている。COPD 患者では、有害微粒子により活性化された肺マクロファージが炎症性サイトカイン／ケモカインを放出し、咳や痰および呼吸困難などの肺症状を起こす。我々は、重症 COPD モデル動物で血液脳関門（BBB）障害が発現することを突き止めた。この BBB 機能低下は、脳神経障害および薬剤に対する脳脆弱化・中枢性副作用易発症の起因となる。COPD の長期管理には、長時間作用性4級アンモニウム塩抗コリン薬（吸入）が第一選択薬として頻用される。また COPD 患者の多くが高齢者であり、排尿障害や胃腸障害などの改善を目的として4級アンモニウム塩抗コリン薬やH₂ブロッカーが投与されることも多い。高齢者における抗コリン薬の投与は、認知症の発症リスクを高めるとの報告がある。また、COPD 増悪期の薬物療法の基本となる ABC アプローチ（A：抗菌薬、B：気管支拡張薬、C：ステロイド薬）でも中枢性有害作用（痙攣、興奮、焦燥、抑うつなど）が発現する恐れがある。しかし、COPD 病態下において、BBB 機能障害を「引き金」として脳高次機能障害が発現するメカニズムは不明である。

急性期タンパク質の1つである serum amyloid A（SAA）は、急性炎症時に循環血中に急増する。肝臓特異的 SAA 過剰発現マウスがうつ病様行動および神経炎症を呈すること、また最近、ヒトを対象とした臨床研究において、SAA が BBB 障害を有する被験者において増加することが示された。これらの報告は、SAA が末梢組織から脳への炎症シグナルを伝播する分子となりう

ること、さらには SAA が BBB 破綻を契機とした脳機能低下をもたらす可能性を示唆する。COPD 患者においても、COPD 急性増悪期の血清中 SAA 濃度の上昇が報告され、急性増悪期の発現頻度は中枢性合併症の悪化と相関する。

一方、近年、高尿酸血症が生活習慣病の独立した危険因子であることが多くの臨床試験で指摘されている。血清尿酸濃度の上昇は酸化ストレスなどを介して末梢臓器障害をもたらすことが動物実験などで報告されている。同様に尿酸は血管内皮細胞傷害を惹起することが示唆されている。酸化ストレスや血管内皮傷害は COPD 病態に深く関与しており、高尿酸血症状態では、COPD 病態の増悪および COPD 患者における BBB 障害を加速する可能性がある。血中尿酸濃度は男性で高値を示し、男性で罹患の多い COPD 患者の背景因子として高尿酸血症の影響を考慮することは極めて重要である。また近年、高尿酸血症と SAA 遺伝子多型の関連についての臨床研究が報告された。さらに基礎研究では、痛風発作の原因となる難溶性の尿酸結晶刺激による炎症性サイトカインの発現に、SAA が関与することが示唆されている。したがって、高尿酸血症での臓器障害に SAA が関与しているとすれば、同時に COPD 増悪、BBB 機能障害の原因分子である可能性がある。

そこで本研究では、COPD-高尿酸血症モデル動物を作製し、高尿酸血症状態が COPD 病態に及ぼす影響について調べた。さらに、SAA がラット脳内皮細胞を用いて作製した in vitro BBB モデルのバリア機能に対して直接的な影響をもたらすかを検討した。

【研究成果】

1. 食餌性高尿酸モデルマウスの作製

[方法]

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) 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。

高尿酸血症誘発動物飼料：粉末飼料に2.5%あるいは5%オキソニン酸 (WAKO) および1%尿酸 (WAKO) を混合したものを尿酸負荷食、0.1%あるいは1%イノシン (WAKO) 単独あるいは5%オキソニン酸を混合したものをイノシン負荷食とし、それぞれ1週間自由摂食させた。

血中尿酸濃度測定：摂食開始1週間後に麻酔下にて採血を行い、尿酸C-テストワコーキット (WAKO) を用いて血中尿酸濃度を測定した。測定は duplicate とし、検量線より濃度を計算した。

[結果]

尿酸負荷食を1週間自由摂食させた時の各群の血中尿酸濃度を Fig. 1 に示した。

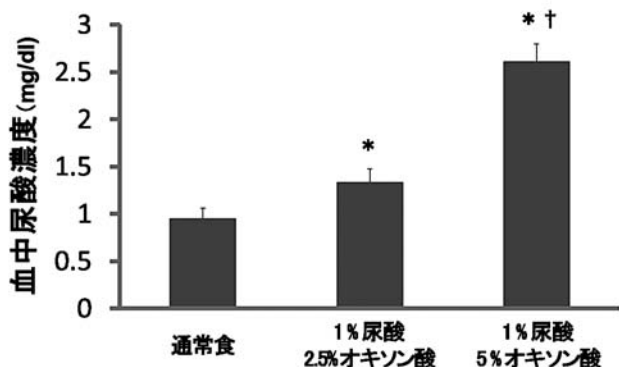


Fig. 1 尿酸負荷食を1週間自由摂食した際の血中尿酸濃度

尿酸代謝酵素ウリカーゼ阻害薬であるオキソニン酸濃度依存的に血中尿酸濃度は増加した。通常食 (0.96 ± 0.10 mg/dL) と比較して、2.5%および5%オキソニン酸含有高尿酸食では有意な尿酸濃度上昇が認められた (それぞれ 1.34 ± 0.14, 2.62 ± 0.18 mg/dL)。さらに5%オキソニン酸群の尿酸濃度は、2.5%群より有意に上昇した。

Fig. 2 には、イノシン負荷食1週間摂食後の血中尿酸濃度の結果を示した。0.1%、1%イノシン負荷食および5%オキソニン酸含有イノシン負荷食摂食群いずれの血中尿酸濃度も、通常食群と比較して上昇は認められなかった。

[考察]

ヒトのプリン代謝の最終産物は尿酸であるが、げっ歯

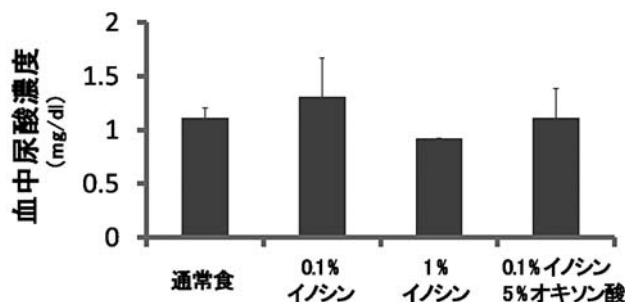


Fig. 2 イノシン負荷食を1週間自由摂食した際の血中尿酸濃度

類は尿酸分解酵素ウリカーゼを有するため血中尿酸濃度はヒトと比較して低く維持されている。従って高尿酸血症モデルマウスを作製するためには、遺伝子改変 (ウリカーゼ KO)、尿酸溶液の頻回腹腔内投与、またウリカーゼ阻害作用を有するオキソニン酸と尿酸の併用投与などが実施されてきた。本研究では、簡便性およびヒトへの外挿性を考慮し、食餌性的高尿酸血症モデル作製を企図し、飼料へのオキソニン酸、尿酸の含有濃度の検討を行った。また、尿酸の代替としてプリン代謝における尿酸前駆体であるイノシンによる高尿酸血症誘導を試みた。

粉末飼料に1%尿酸および2.5%あるいは5%オキソニン酸を混合した高尿酸食を1週間自由摂食させると、オキソニン酸濃度に依存した有意な血中尿酸濃度の上昇が認められた。1%尿酸および5%オキソニン酸摂食時の血中尿酸濃度は約2.5mg/dLで、ヒトでの検査異常値7.0mg/dLに到達していない。しかし、通常食摂食時の約2.5倍の濃度でありマウスにとっては異常高値といえ、本研究では尿酸結晶が析出しない緩徐な高尿酸血症状態とみなすことができるとした。一方、尿酸前駆体のイノシン含有飼料では、血中尿酸濃度の上昇は認められなかった。これまでの報告では、過剰プリン体 (アデニン、イノシン) 投与での高尿酸血症モデル作製が試みられているが、本研究での条件では高尿酸血症モデルとしては採用不可であった。

以上より、本研究での食餌性高尿酸血症モデル作製は、1%尿酸および5%オキソニン酸含有飼料を高尿酸食として使用した。

2. エラスターゼ気管支内噴霧による COPD 肺気腫に対する高尿酸血症の影響

[方法]

実験動物：8週齢の C57BL/6 マウスを用いた。飼料 (CE-2 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(明期 AM7：00-PM7：00) で飼育した。

実験スケジュール (高尿酸血症および COPD 肺気腫モデルの作製)：動物搬入後、通常食および高尿酸食を自由摂食させ、1週間飼育した。その後、イソフルラン麻

酔下にて MicroSprayer を用いて エラストーゼ (2 Unit) 25 μ l を気管支内に噴霧した。

肺組織染色と肺胞径の測定：エラストーゼ噴霧3週間後、麻酔下にて血液灌流を行い、左肺を摘出し直ちに4% PFA 溶液にて1日以上浸漬固定を行った。OCT コンパウンドにて組織ブロックを作製後、クリオスタットを用いて7 μ m 厚の切片を切り出し染色サンプルとした。切片を HE 染色して写真撮影し、画像処理ソフト (Adaptive Vision studio) にて肺胞数を測定し、平均肺胞径を算出した。

[結果]

通常食摂食群および高尿酸食摂食群のエラストーゼ気管支内投与後3週間目の肺組織 HE 染色像と平均肺胞径を Fig. 3 に示した。エラストーゼ噴霧により、両群ともに肺胞の拡大が認められた。組織染色像より算出した平均肺胞径は、両群間に変化は認められなかった (通常食：66.9 \pm 4.6 μ m、高尿酸食：60.1 \pm 3.7 μ m)。

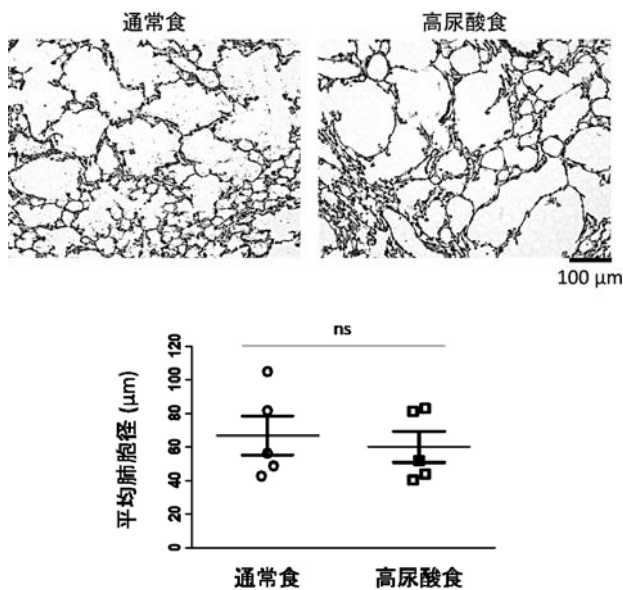


Fig. 3 エラストーゼ噴霧3週間後の肺胞拡大に及ぼす高尿酸食の影響 HE 染色像 (上) および平均肺胞径 (下)

[考察]

近年、高尿酸血症は痛風の原因だけではなく、生活習慣病を主とした末梢臓器障害の危険因子であることが指摘されている。その発現機序は明らかではないが、酸化ストレスや血管内皮傷害による全身性炎症状態が関与しているとの報告がある。COPD 病態に対する高尿酸血症の影響についての報告はないが、高尿酸血症による全身性の炎症状態が COPD 病態を増悪する可能性がある。そこで、食餌性高尿酸血症モデルを用いて、高尿酸血症が COPD 肺気腫病態である肺胞径拡大に影響するか検討を行った。

本来数十年を経て顕在化する COPD 臨床像を短期間で再現する動物モデルとして、これまでに数種のモデル作製方法が試みられている。その中で本研究ではタンパク質分解酵素であるエラストーゼ気管支内噴霧による作製方法を用いた。我々のこれまでの研究で、健常マウスの平均肺胞径は約40 μ m であった。今回のモデル作製プロトコルで通常食群の平均肺胞径は約1.5倍に拡大しており、エラストーゼによる肺気腫が誘導されていた。この平均肺胞径の拡大は、高尿酸食群において変化が認められず、高尿酸血症状態は本モデルでの COPD 肺気腫病態に影響を及ぼさないことが示唆された。

エラストーゼは、肺組織の細胞外基質であるエラスチンを分解し、肺胞の拡大 (気腫化)、肺過膨張の原因となることが知られている。エラストーゼ噴霧モデルでは噴霧後短期 (約3週間) で COPD 肺気腫病態を呈し、肺弾性繊維分解後の症状を反映させることができる一方、プロテアーゼ活性化以前の状況である急性期炎症状態を反映することが出来ないとされている。高尿酸血症が COPD 発症や急性増悪期に関与するか否か、エラストーゼ噴霧モデルとは別の病態モデルでの検討を行う必要があるだろう。

3. SAA の BBB バリア機能に及ぼす影響 —in vitro BBB モデルによる検討—

in vitro BBB モデル：3週齢 Wistar ラット脳血管内皮細胞 (RBEC) を単離・培養した後、Transwell™ インサートに播種して in vitro BBB モデルとした。

SAA 処理：作製した in vitro BBB モデルの Transwell インサートの内腔側および反管腔側を0.1、1、および5 μ g/mL の Apo-SAA (N 末端メチオニンおよび71番目のヒスチジンのアスパラギンの置換を除く、ヒト Apo-SAA 1 α に対応するコンセンサス SAA 分子) で、24時間処理した。

バリア機能評価：薬物処理後、経内皮電気抵抗 (TEER) を epithelial-volt-ohm meter および Endohm-6 chamber を用いて測定した。また、細胞間隙経路の透過性を評価する目的で、フルオレセイン Na (Na-F) 100 μ g/mL をインサートの内腔側に添加し、経時的に回収後、蛍光マルチウェルプレートリーダー (励起波長485nm、発光波長530nm) を用いて Na-F 濃度を測定して、透過係数を算出した。

[結果]

24時間の Apo-SAA 処理後、Apo-SAA (1 および 5 μ g/mL) はそれぞれ TEER を 26.3% および 44.4% 減少させた (Fig. 4 左)。さらに BBB 細胞間隙経路の指標となる Na-F の透過係数を算出した。Apo-SAA は、RBEC 単層モデルにおいて濃度依存的に RBEC の Na-F 透過性を増加させた (Fig. 4 右)。この増加は、5 μ g/mL の Apo

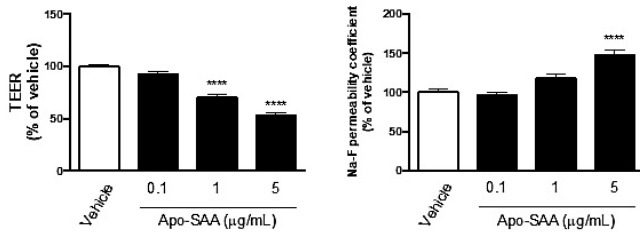


Fig. 4 BBB バリア機能に及ぼす SAA の影響. TEER (左) および Na-F 透過係数 (右)

-SAA で有意な差が認められた。

【考察】

急性期タンパク質である SAA は、COPD 病態での急性増悪期に血中で増加し、また尿酸結晶による炎症性サイトカイン発現に関与することが示唆されている。そこで、SAA が BBB バリア機能に影響を及ぼすか否か明らかにするために、in vitro BBB モデルを用いて検討を行った。Apo-SAA 処理は、時間と濃度に依存して RBEC 単層モデルの TEER 値を減少させた。TEER 値は、細胞間隙経路を透過するイオン透過性を反映することから、SAA が RBEC 単層モデルにおいて、細胞間隙経路の透過性を亢進させる可能性を示唆する。そこで、RBEC 単層モデルにおいて、SAA 誘導の細胞間隙経路透過性の亢進を確認するために、細胞間隙透過性マーカーである Na-F (分子量367) を用いて検討した。TEER 測定と一致して、Apo-SAA は RBEC 単層モデルの Na-F 透過性を濃度依存的に増加させた。以上の結果は、SAA が血管内皮細胞間隙経路のバリア機能を脆弱化させることを示唆する。

【総括】

長く痛風の原因としてのみ治療対象であった高尿酸血症について、近年、様々な末梢臓器障害の独立した危険因子である可能性を指摘する臨床報告が蓄積されている。我々は COPD および高尿酸血症が高齢男性で併発する可能性が高いことに着目し、すでに報告した COPD 病態下での BBB バリア機能低下に対して、高尿酸血症併発が影響するか否かを明らかにすることを目的とし、検討を行った。

今回作製を試みた食餌性高尿酸血症モデルマウスの血中尿酸濃度は、健常マウスの約2.5倍の値を示し、マウスにとっての高尿酸血症状態を示した。本モデルを用いてエラスターゼ気管支内投与による COPD 肺気腫を誘発させたが、高尿酸食の影響は認められなかった。また、COPD および高尿酸血症いずれの病態においても炎症誘発因子として関与することが示唆されている SAA は、BBB バリア機能を低下させる可能性が示唆された。本研究では、高尿酸血症が COPD 病態を悪化させる可

能性および BBB 機能に対する影響を明らかにすることはできなかった。今後、別の高尿酸血症モデル作製方法を用いた再検討を進めるとともに、SAA の BBB 機能低下の機序について明らかにする必要がある。

研究業績

- (1) Matsumoto J, Dohgu S, Takata F, Iwao T, Kimura I, Tomohiro M, Aono K, Kataoka Y, Yamauchi A. Serum amyloid A-induced blood-brain barrier dysfunction associated with decreased claudin-5 expression in rat brain endothelial cells and its inhibition by high-density lipoprotein in vitro. *Neurosci Lett.* 2020 738: 135352
- (2) Dohgu S, Takata F, Matsumoto J, Kimura I, Yamauchi A, Kataoka Y. Monomeric α -synuclein induces blood-brain barrier dysfunction through activated brain pericytes releasing inflammatory mediators in vitro. *Microvasc Res.* 2019 124: 61-66.
- (3) Nakashima A, Yamauchi A, Matsumoto J, Dohgu S, Takata F, Koga M, Fukae J, Tsuboi Y, Kataoka Y. Feeding-produced subchronic high plasma levels of uric acid improve behavioral dysfunction in 6-hydroxydopamine-induced mouse model of Parkinson's disease. *Behav Pharmacol.* 2019 30: 89-94.
- (4) Takata F, Dohgu S, Matsumoto J, Machida T, Sakaguchi S, Kimura I, Yamauchi A, Kataoka Y. Oncostatin M-induced blood-brain barrier impairment is due to prolonged activation of STAT 3 signaling in vitro. *J Cell Biochem.* 2018 119: 9055-9063.
- (5) Koga M, Kanaoka Y, Tashiro T, Hashidume N, Kataoka Y, Yamauchi A. Varenicline is a smoking cessation drug that blocks alveolar expansion in mice intratracheally administrated porcine pancreatic elastase. *J Pharmacol Sci.* 2018 137: 224-229.

【謝辞】

本研究の一部は、福岡大学研究推進部の研究経費によるものである (課題番号: 187007)。