

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08255

研究課題名(和文)尿酸-P2X7受容体-GSK3 経路によるパーキンソン病の発症・進展制御機構

研究課題名(英文)The neuroprotective effects of uric acid on the development and progression of Parkinson's disease

研究代表者

山内 淳史(YAMAUCHI, Atsushi)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：90341453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病(PD)の発症には、ドーパミン作動性ニューロンの変性が関与している。本研究は、PD発症・進展における尿酸の影響について検討した。片側線条体6-OHDA注入によるPDモデルマウスは、ロータロッド試験での落下までの時間の減少およびアポモルフィン誘発回転運動の増加を示した。これらの行動異常は、高尿酸血症モデルマウスにおいて、有意に抑制された。また、これらの行動改善作用は、傷害側線条体のチロシンヒドロキシラーゼタンパク質レベルの回復と一致していた。本研究は、尿酸がドーパミン作動性ニューロンの保護を介して、PD発症・進展を抑制することを示唆する。

研究成果の概要(英文)：The development of Parkinson's disease (PD) involves the degeneration of dopaminergic neurons caused by oxidative stress. 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 to induce hyperuricemia. 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 confirms that uric acid exerts a neuroprotective effect on dopaminergic neuronal loss, improving motor dysfunction and ameliorating PD development.

研究分野：医療薬学

キーワード：パーキンソン病 高尿酸血症 マウス 神経保護作用 6 - ヒドロキシドーパミン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 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。近年、PD 患者は健常者対照例と比較して有意に血清尿酸値が低いことが報告され、臨床研究が続けられている。最近のメタ解析では、血清尿酸値が低いと PD 発症の危険率が上昇することが示された。また、PRECEPT 研究および DATATOP 研究など大規模研究の結果では、PD 発症後も尿酸値が高い患者は PD の進行が遅く、逆に尿酸値が低い患者は PD の進行が速いことが判った。

尿酸の PD 発症・進展抑制作用については臨床研究が先行しており、詳細なメカニズムについての基礎研究は極めて不十分である。

(2) GSK-3 と PD との関連については、遺伝子多型研究および GSK-3 阻害薬としてのリチウムの基礎実験が行われている。遺伝子多型研究の結果は一貫していないが、最近、2 か所の機能的 SNPs と PD 発症危険率についてのメタ解析が行われた。GSK-3 活性が上昇する SNPs を有する群では、PD 発症リスクが上昇することが示された (Gene 2013)。また、GSK-3 阻害薬のリチウムは、PD モデル作成時に使用される神経毒 MPTP や 6-OHDA による細胞死を抑制するとの報告がある。以上のことから、GSK-3 の活性が PD 発症・進展に関与する可能性が十分に推測できる。

(3) P2X7 受容体はイオンチャネル型のプリン受容体であり、Ca<sup>2+</sup>などのイオン流入に関与する。P2X7 受容体作動薬は神経細胞の GSK-3 を阻害し、神経保護効果を示す。一方、P2X7 受容体遮断薬は、ミクログリアの GSK-3 を阻害し、中枢保護作用を示すとの報告がある。また、P2X7 受容体の遺伝子多型は PD の危険因子として挙げられており、P2X7 受容体遮断薬は PD モデル動物の機能障害を改善する。これらは、P2X7 受容体シグナル経路が PD 病態の成因に関与することを示唆する。

## 2. 研究の目的

上述した(1)~(3)の知見を総合し、申請者は、PD 病態の形成・進展における「尿酸 P2X7 受容体-GSK-3 シグナル伝達経路」の役割を追究することにより、尿酸の PD 病態制御機構を明らかにすることを企てた。

## 3. 研究の方法

### (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) 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 0.02% を含む生理食塩水で 2mg/mL の 6-OHDA 希釈溶液を調製した。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  $\mu$ L の流速により 10  $\mu$ 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 (プレグマ) 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によっておこなった。

(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% オキソソル酸 (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。

### (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。

### (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。

### (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。

### (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。

た。

#### (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。メンブレン上の各種タンパク質を特異的抗体を用いて検出した。

#### (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 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。

### 4. 研究成果

#### (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%オキソン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.1)。通常食を与えた control 群・PD 群 (それぞれ  $1.05 \pm 0.04$ ,  $0.91 \pm 0.06$  mg/dL) と比較して、1%尿酸および 5%オキソン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  $3.72 \pm 0.53$ ,  $3.82 \pm 0.75$  mg/dL)。

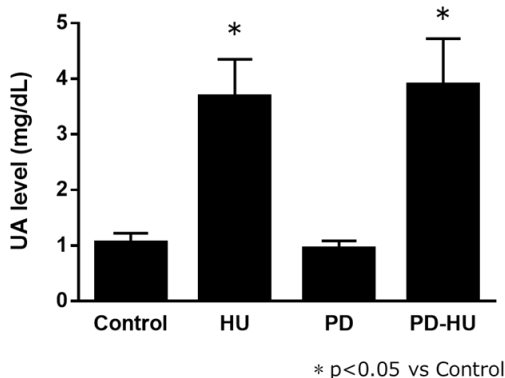


Fig. 1 高尿酸食 6 週間接種後の血中尿酸濃度

#### (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.2 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.3)。

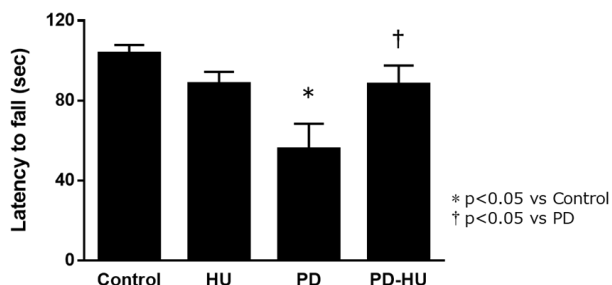


Fig. 2 落下までの時間に対する尿酸の影響

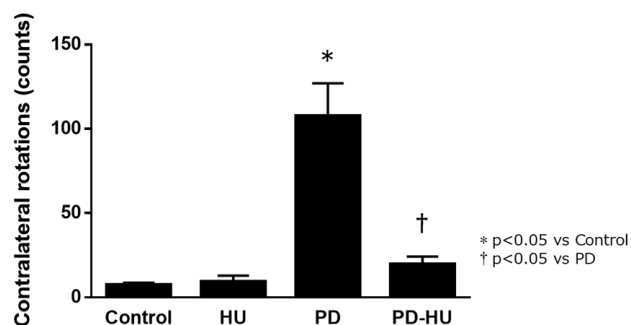


Fig. 3 アポモルフィン誘発回転運動に対する尿酸の影響

#### (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.4 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。

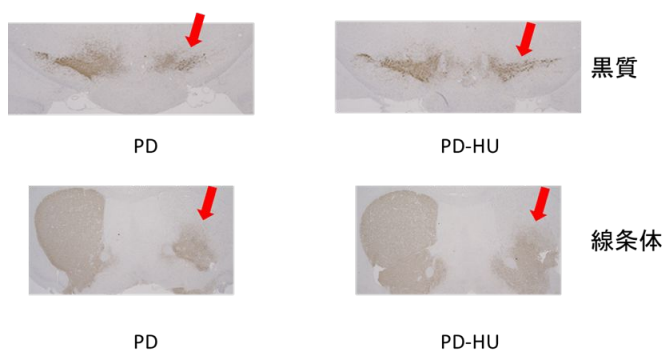


Fig. 4 黒質および線条体抗 TH 抗体陽性細胞に対する尿酸の影響

#### (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.5)。

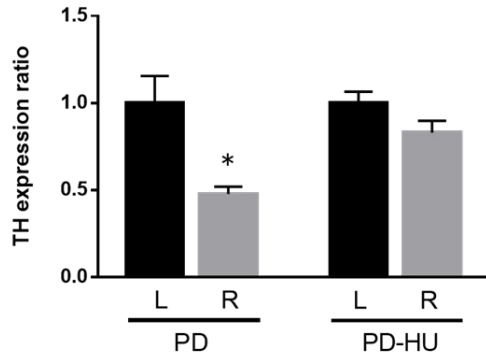
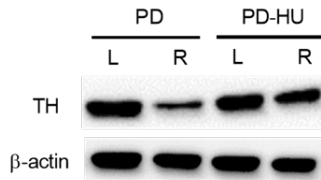


Fig. 5 線条体 TH タンパク質発現量に対する尿酸の影響

以上、食餌性高尿酸血症モデルマウスにおいて、尿酸が PD 発症・進展を抑制することが示唆された。機序に関する知見を得ることはできず、当初仮説していた P2X7 受容体-GSK-3 シグナル伝達経路の関与を明らかにすることはできなかった。

本研究は、尿酸が PD 病態であるドパミン神経傷害に対し、保護的作用を有することを基礎実験にて証明した点で意義深く、臨床研究の結果を支持するエビデンスの1つとなりうるものである。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

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. 査読有 (印刷中)

[学会発表](計1件)

中島章雄、渡辺拓也、山内淳史、片岡泰文、二神幸次郎 6-OHDA 投与パーキンソン病モデルに対する尿酸の神経保護作用 第136回日本薬学会年会 2016年3月26-29日、横浜

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

山内 淳史 (YAMAUCHI, Atshushi)  
福岡大学・薬学部・准教授  
研究者番号：90341453

##### (2)研究分担者

渡辺 拓也 (WATANABE, Takuya)  
福岡大学・薬学部・助教  
研究者番号：90509647