

令和元年6月20日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18878

研究課題名(和文)高尿酸血症モデルマウスにおけるアルツハイマー病予防機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of protective effects against Alzheimer's disease using hyperuricemic mice

研究代表者

富岡 直子 (Tomioka, Naoko H.)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：60525814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：尿酸は脳内で神経保護的に働き、パーキンソン病モデルマウスでは神経細胞死を抑制することが報告されている。本研究では、アルツハイマー病において尿酸が保護的に働くことを検証するためのツールとして、次世代型アルツハイマー病モデルマウス(AppNL-G-F/NL-G-F)と、尿酸分解酵素ウリカーゼのノックアウトマウスを組み合わせた複合変異マウスを樹立した。7～8ヶ月齢のマウスを用いてアミロイド β の免疫染色およびY迷路試験を行ったが、尿酸値をマイルドに上昇させたマウスにおいてアミロイド β の蓄積抑制や認知機能の低下の抑制は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

痛風患者においてアルツハイマー病の発症率が低いという疫学的報告や、他の神経変性疾患モデル動物における解析から、尿酸や尿酸代謝関連物質あるいは代謝酵素がアルツハイマー病の病態に関わっている可能性は高い。本研究では尿酸値の上昇がアミロイド β の蓄積を抑制する可能性は低いことを見出したのに加え、尿酸値上昇モデルの妥当性や認知機能異常解析の適切なタイミング等、尿酸とアルツハイマー病の関連を解析する上での今後の課題が明らかとなった。適切な尿酸値コントロールのエビデンスを得るためには、さらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Uric acid has been reported to be neuroprotective and inhibits neuronal death in Parkinson's disease model mice. In this study, we established double mutant mouse of novel Alzheimer's disease model mice (AppNL-G-F/NL-G-F) and knockout mice of uricase, which metabolize uric acid to allantoin. We performed immunohistochemistry of amyloid β and Y-maze test using 7-8 months old mice. However, we did not observed inhibition of accumulation of amyloid β and inhibition of reduced cognitive function.

研究分野：神経科学

キーワード：アルツハイマー病 尿酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

尿酸は痛風の原因物質のみならず虚血系心疾患および腎障害の独立した危険因子であることから、高尿酸状態はヒトにとって望ましくない状況であると一般的に考えられている。一方で、尿酸は強力な抗酸化作用を持ち、生体にとって有利な作用を示すことも知られている。疫学的に高尿酸血症がパーキンソン病の発症および症状の進展を抑制することが2000年以降報告されており、モデル動物での解析も進められている。

同じ神経変性疾患であるアルツハイマー病と尿酸値の関連については、これまでの症例対照研究では相反する報告があったが、2015年3月に報告された大規模コホート研究により、痛風患者ではアルツハイマー病を発症するリスクが24%減少することが明らかとなった。アルツハイマー病においてもパーキンソン病同様、高尿酸血症が病態に対して予防的に働く可能性が示唆された。

これまでアルツハイマー病のモデルマウスとして、A β の前駆体であるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の過剰発現マウスが用いられてきたが、非生理的な行動異常が見られたり、A β の蓄積の仕方においてヒトの老人斑との類似性が乏しいという問題点があった。2014年に理化学研究所のグループにより、ノックイン手法を用いた次世代型アルツハイマー病モデルマウス (APP-KIマウス) が作製され、既存のモデルよりヒトの病態を忠実に再現し、より早期から老人斑を形成することが報告された。上記のマウスは理研バイオリソースセンターから入手可能なため、我々が所有する高尿酸モデルマウスとの交配により、高尿酸状態におけるアルツハイマー病の病態変化を解析することを着想した。

ヒトとマウスでは尿酸代謝経路が異なり、ヒトでは尿酸がプリン体代謝の最終産物であるが、マウスでは尿酸分解酵素ウリカーゼ (Uox) によって尿酸がさらに代謝されるため、野生型マウスでは血中尿酸値がヒトの約30分の1と非常に低くなっている。ウリカーゼ活性阻害薬や尿酸の静注による血中尿酸値上昇と違い、長期間にわたり安定的な高尿酸モデルマウスとして使用できる Uox-KO マウスは本研究に有用であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、高尿酸血症がアルツハイマー病の発症を抑制することを個体レベルで示すことを目的とし、高尿酸血症がアルツハイマー病の病理学的変化を抑制するかどうか、血中尿酸値の上昇が脳内のどの領域の尿酸値を高めるのかを明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) 高尿酸血症-次世代型アルツハイマー病複合モデルマウスの系統樹立

理化学研究所バイオリソースセンターより APP^{NL-G-F/NL-G-F}マウス (APP-KIマウス) を導入し、高尿酸血症モデルであるウリカーゼノックアウトマウス (Uox-KOマウス) と交配し、ダブルホモマウスを作出した。

(2) アミロイドの免疫染色

マウスを4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィンに包埋し、5 μ m厚のパラフィン切片を作製した。ギ酸処理による抗原賦活化後、抗アミロイド (38-42)(44A3)抗体 (IBL) を用いて、ABC法により免疫組織化学染色を行い、DABで発色、対比染色としてヘマトキシリン染色を行った。アミロイド斑の比較では、ImageJを用いて大脳皮質領域における500 μ m²以上の大きさのアミロイド斑の占有率を算出した。

(3) Y迷路試験

走路が40cmの灰色塩ビ製のY迷路を作製、使用した。7分間、迷路内を自由に行動させてマウスの移動した経路を記録し、自発的交替行動率、総進入回数を求めた。

4. 研究成果

(1) 高尿酸血症-次世代型アルツハイマー病複合モデルマウスの系統樹立

ダブルヘテロマウス同士の一度の交配では目的のマウスが得られなかったため、先にノックイン遺伝子をホモ化した後、ダブルホモマウスを得た。ダブルヘテロマウスの作出後は、Uoxノックアウトホモ出生子の生存率改善のため、尿酸生成抑制薬であるアロプリノールを含有する飼料で飼育した。アロプリノール添加飼料での飼育下で、ダブルホモマウス雌雄個体による繁殖維持が可能であることが確認できた。Uox-KOでは腎障害を起こすことがあり、今回は講習齢で解析を行うことを考慮して、ダブルホモマウスはアロプリノール添加飼料で飼育維持することにした。アロプリノール添加時のUox-KOマウスの血漿尿酸値は2~3mg/dLであった。今後は、尿酸値がヒトの高尿酸血症と同程度まで上昇したマウスを作製、長期飼育可能な条件を見出すことが課題である。

(2) アミロイドの免疫染色

16, 32週齢におけるマウスの大脳皮質領域でのアミロイド斑の占有率を比較したところ、APP-KI-Uox-KOマウスでは、APP-KIマウスに比べて占有率が上昇しており、血中尿酸値をマイルドに上昇させた状態ではアミロイド斑の蓄積は抑制されず、逆に増強されることが明らかと

なった。この結果から、尿酸値の上昇はアミロイド の蓄積抑制を介した保護作用を示さない可能性、あるいは中程度の尿酸値の上昇では蓄積抑制に至らない可能性が考えられた。

(3) Y 迷路試験

野生型マウス (C57BL/6J)、APP-KI マウス、APP-KI-Uox-KO マウスの各系統について、29~31 週齢の雄マウスを用いて Y 迷路試験を行った。自発的交替行動率は、3 回連続して異なるアームに進入した回数を、総進入回数-2 で割ることによって求めた。野生型マウスでは交替行動率が 70%前後に収束したが、APP-KI マウスバックグラウンドでは個体差が非常に大きく、40~80% 台となり、29~31 週齢では異常を示すものとまだ発症していないものが混在していると考えられた。本研究期間中に、APP-KI マウスで行動解析を行った論文が複数報告されたが、実験施設間で行動解析の結果が異なっているものや、最初の論文で報告された 6 ヶ月齢よりも高週齢で異常がより見られたものがあり、今後当実験施設において認知機能の解析に最適な週齢や解析手法を検討する。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Morimura N, Yasuda H, Yamaguchi K, Katayama KI, Hatayama M, Tomioka NH, Odagawa M, Kamiya A, Iwayama Y, Maekawa M, Nakamura K, Matsuzaki H, Tsujii M, Yamada K, Yoshikawa T, Aruga J.

Autism-like behaviours and enhanced memory formation and synaptic plasticity in Lrfrn2/SALM1-deficient mice.

Nat Commun. 2017 Jun 12;8:15800. doi: 10.1038/ncomms15800. (査読有)

Tomioka NH, Tamura Y, Takada T, Shibata S, Suzuki H, Uchida S, Hosoyamada M.

Immunohistochemical and in situ hybridization study of urate transporters GLUT9/URAT1, ABCG2, and URAT1 in the murine brain.

Fluids Barriers CNS. 2016 Dec 12;13(1):22. (査読有)

〔学会発表〕(計 12 件)

細谷 拓司、富岡 直子、細山田 真

新規高尿酸血症モデル HPRT 高活性 Uox-KO マウスに対するプリン型及び非プリン型キサンチン酸化還元酵素阻害薬の効果

日本薬学会第 139 年会

2019 年 3 月 22 日

富岡 直子、鈴木 友也、和崎 敦子、細山田 真

アルツハイマー病モデルマウスにおける血中尿酸値上昇の影響の解析

日本薬学会第 139 年会

2019 年 3 月 21 日

細谷 拓司、内田 俊也、柴田 茂、富岡 直子、細山田 真

新規高尿酸血症モデル HPRT 高活性 Uox-KO マウスに対するプリン型および非プリン型 XOR 阻害薬の尿酸代謝に与える影響

第 52 回 日本痛風・核酸代謝学会総会

2019 年 2 月 15 日

富岡 直子、細山田 真

モデルマウスを用いた中枢神経系における尿酸の機能解析

第 52 回 日本痛風・核酸代謝学会総会

2019 年 2 月 14 日

Makoto Hosoyamada, Naoko H Tomioka, Tomoko Fukuuchi, Toshio Ohtsubo, Kiyoko Kaneko, Kimiyoshi Ichida

Life span extension of xanthine oxidoreductase knockout mouse by increase of HPRT activity
18th World Congress of basic and clinical Pharmacology (国際学会)

2018 年 7 月 3 日

細山田 真、福内 友子、富岡 直子、市田 公美、金子 希代子、大坪 俊夫

Hprt 高活性 Xor ノックアウトマウスの寿命延長メカニズムの検討

第 61 回日本腎臓学会学術総会

2018 年 6 月 9 日

細山田 真、富岡 直子、大坪 俊夫、市田 公美、内田 俊也、鎌谷 直之
ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Hprt)高活性キサンチンデヒドロゲナーゼ
(XDH)ノックアウトマウスの作出
第 51 回日本痛風・核酸代謝学会総会
2018 年 2 月 23 日

細山田 真、山崎 綾子、富岡 直子、押鐘 浩之、岡本 研
ヒト尿酸トランスポーターURAT1 のリコンビナント発現・精製系の検討
第 51 回日本痛風・核酸代謝学会総会
2018 年 2 月 23 日

安藤 太介、福内 友子、藤田 恭子、富岡 直子、金子 希代子、細山田 真、市田公美
キサンチンデヒドロゲナーゼノックアウトマウスが短命である理由の検討
日本薬学会第 138 年会
2018 年 3 月 26 日

山崎 綾子、富岡 直子、押鐘 浩之、岡本 研、細山田 真
Pichia pastoris を用いたヒト尿酸トランスポーターURAT1 リコンビナントの発現・精製の検討
日本薬学会第 138 年会
2018 年 3 月 26 日

渡邊 楊叡、秋山 秀樹、東 奈実、福内 友子、山岡 法子、富岡 直子、細山田 真、安田 誠、
馬渡 健一、中込 和哉、金子 希代子
高尿酸血症モデルマウスにおける漢方薬のプリン・ピリミジン代謝への影響
日本薬学会第 138 年会
2018 年 3 月 27 日

富岡 直子、細山田 真
Urat1-Uox ダブルノックアウトマウスの脳内尿酸濃度解析
第 50 回 日本痛風・核酸代謝学会総会
2017 年 02 月 17 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。