

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08986

研究課題名(和文) 尿酸とL-dopaの相互調節機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of co-regulation mechanism of uric acid and L-dopa

研究代表者

田中 弦 (Tanaka, Gen)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：20615570

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)：尿酸はパーキンソン病の発症と進行に保護的な役割を果たすことが報告されている。パーキンソン病の治療薬でありドパミン前駆体であるL-dopaと尿酸の血中濃度に相関があることが日本人の血中代謝物データベースより示された。そこでこの機序を解明するため、種々の尿酸輸送体による尿酸輸送がL-dopa及びその代謝物により変化するかアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて検討した。結果、主要な尿酸輸送体の一つがL-dopaの代謝物のdopachromeによって非競合的に阻害されることが示された。脳への尿酸輸送がdopachromeによって影響される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では抗酸化物質である尿酸とL-dopaの血中濃度に高い相関があることから、これがどのような機序によるのかを検討し、L-dopaの代謝物の一つが尿酸の主要な輸送体の一つを阻害することを明らかにした。これはパーキンソン病治療薬として用いられるL-dopaが持つ副作用を増幅させる要因となっている可能性があり、研究がさらに進展すれば副作用が少ない新たな治療薬や予防薬の開発へとつながるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Uric acid is reported to have a protective role against Parkinson's disease. According to the Japanese Multi Omics Reference Panel, the serum concentration of uric acid is correlated with L-dopa, which is a precursor of dopamine and used for the treatment of Parkinson's disease. In this research, we tried to elucidate the mechanism of this relationship using xenopus oocyte expression system and radiolabeled uric acid. As a result, we showed that dopachrome, which is a metabolite of L-dopa, inhibited one of the uric acid transporters in noncompetitive manner. As it is expressed in the brain, dopachrome might inhibit the transport of uric acid into the brain.

研究分野：薬理学

キーワード：尿酸 輸送体 パーキンソン病 L-dopa

1. 研究開始当初の背景

プリン体の最終代謝物である尿酸は痛風の原因物質として広く知られているが、近年の疫学調査では血清尿酸値が高いほどパーキンソン病の発症リスクが低いこと、また発症後の進行も遅いことが報告されている。これは尿酸が脳内で抗酸化物質として神経保護作用を発揮しているためだと考えられており、血清尿酸値を上昇させることでパーキンソン病の進行を抑制しようとする試みもなされている。しかし尿酸が脳内へどのように輸送され制御されるのか明らかになっておらず、その解明が望まれている。

パーキンソン病の治療薬でありドパミン前駆体の Levodopa (L-dopa)は、血清尿酸値を上昇させることが古くから報告されている。その機序として L-dopa もしくはその代謝物が尿酸の尿中排泄を阻害するためだと Bierer らは結論付けているが、その機序の詳細は明らかとなっていない。また最近公開された日本人の血中代謝物を網羅的に解析した多層オミックス参照パネル (jMorpe)より、L-dopa と尿酸の血中濃度は非常に高い相関があることが判明した。このことは健康人においてもドパミン前駆体の L-dopa と尿酸が相互に関連していることを示している。

2. 研究の目的

本研究では、パーキンソン病治療薬として用いられるドパミン前駆体の L-dopa が尿中尿酸排泄量を減少させることに着目し、L-dopa により尿酸輸送が変化するトランスポーターを探索し同定することで、尿酸と L-dopa の動態を解明することを目指した。腎臓において尿酸の排泄・再吸収を担う尿酸トランスポーターは脳でも発現していることから、本研究で見出すトランスポーターは脳における尿酸と L-dopa を制御している可能性が高い。本研究により神経保護作用を有する尿酸がドパミン作動性神経細胞へのどのように輸送され制御されているか、その一端が明らかとなるはずである。これによりパーキンソン病の新規の治療法並びに予防法の開発へと展開されること、また L-dopa の長期使用による酸化ストレスで誘発されるジスキネジアの発現機序の解明にもつながるはずである。

3. 研究の方法

本研究では、尿酸を輸送することが知られているトランスポーターをアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、L-dopa 及びその代謝物が尿酸輸送を変化させるかを放射性標識した尿酸を用いて検討した。尿酸トランスポーターに影響を与える L-dopa の代謝物の候補の一つとして尿酸と同じ複素環式化合物である dopachrome を L-dopa を酸化させて合成し実験に用いた。

(1) 尿酸を輸送するトランスポーターのクローニング

尿酸の再吸収を担う主要なトランスポーターである URAT1、GLUT9a、GLUT9b、また尿酸輸送能を有することが報告されている NPT1、NPT4、MCT9 の各遺伝子は既にクローニング済みであり、尿酸を排出を担うトランスポーターの ABCG2、脳での発現が報告されている NPT3 の輸送体について、遺伝子クローニングを行った。

(2) L-dopa の代謝物の合成トランスポーターの尿酸輸送を変化させる L-dopa の代謝物の候補として、尿酸と同じ複素環式化合物である dopachrome に着目した。これは化学的安定性が高くなく自発的に脱炭酸し重合し最終的にメラニンを生成するため合成後速やかに実験に用いる必要がある。過ヨウ素酸ナトリウムを用いて L-dopa を酸化する手法、もしくは Tyrosinase による酵素反応による手法で合成した。Dopachrome の産生は吸収スペクトルを測定し特徴的な 475nm の波長を元に検出した。

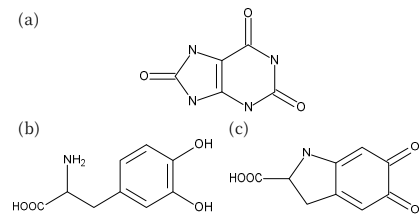


Fig.1 本研究で用いた(a)尿酸、(b)L-dopa、(c)dopachrome の化学構造

(3) L-dopa 及び dopachrome による尿酸輸送への影響

尿酸を輸送することが知られているトランスポーターをアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、放射性標識した尿酸を作用させることでその輸送能を確認した。また L-dopa 及びその代謝物である dopachrome を尿酸と共に作用させ、尿酸の輸送が変化するか検討した。

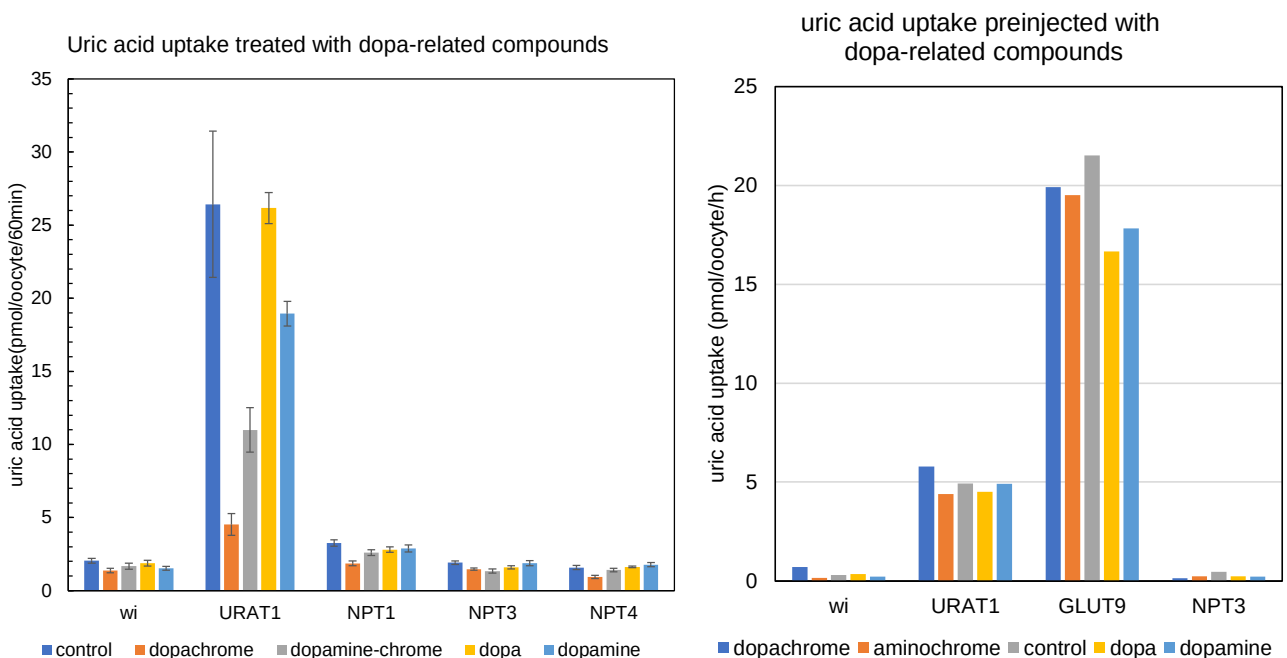


Fig.2 Xenopus oocyte 上に発現させた尿酸トランスポーターの dopa 代謝物による尿酸輸送の阻害。(左)放射性標識した尿酸と dopa 代謝物を同時に投与し尿酸の輸送量を測定。(右) dopa 代謝物を予め oocyte に注入した後、尿酸の輸送量を測定。

4. 研究成果

L-dopa 代謝物の一つである dopachrome の合成は、当初過ヨウ素酸ナトリウムを用いて L-dopa を酸化することで合成した後、安定性が低いため精製せずに速やかに使用したが夾雑物による尿酸輸送への影響が見られた。そこで L-dopa を tyrosinase による酵素反応で合成し遠心機を用いた限外濾過にて tyrosinase を除く手法に切り替えた。合成の際の反応時間、基質濃度、酵素量は、特徴的な 475nm の波長の吸光度をモニターし最適化した。

L-dopa、dopachrome、dopamine 及び dopamine を同様に酸化し合成した dopaminechrome など L-dopa の代謝によって産生される化合物により、尿酸トランスポーターによる尿酸輸送が変化するかアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて検討を行った。その結果、腎近位尿細管で尿酸の再吸収を担う URAT1 による oocyte 内への尿酸輸送が dopachrome によって大きく阻害されることが明らかとなった(Fig.2 左)。dopachrome を oocyte 中に予めインジェクションした後に尿酸を取り込ませると阻害が見られなかったことから (Fig.2 右)、dopachrome は尿酸と同じ側から投与した際に URAT1 の尿酸輸送を阻害することが示された。

この dopachrome による URAT1 の尿酸輸送阻害に関し詳細に解析するため、dopachrome 存在下、非存在下で尿酸の投与時間を変えて尿酸の取り込み量を検討した (Fig.3 左)。その結果、URAT1 による尿酸輸送量は少なくとも 30 分までは時間に比例して増え、それは dopachrome 存在下でも同様だった。続いて一定量の dopachrome 存在下で尿酸の濃度を変えて URAT1 の尿酸輸送量を検討した (Fig.3 右)。輸送時間は取り込み量が線形で増加する 30 分で行った。その結果、尿酸の濃度が増えるにしたがって尿酸の輸送量は増え飽和していく様子が観察された。dopachrome 存在下では、非存在下と同様に輸送量は飽和していったが、その輸送量は非存在下と比較し低かった。得られた輸送量から算出した輸送初速度と、作用させた尿酸濃度より、Eadie-Hofstee プロットを行ったところ

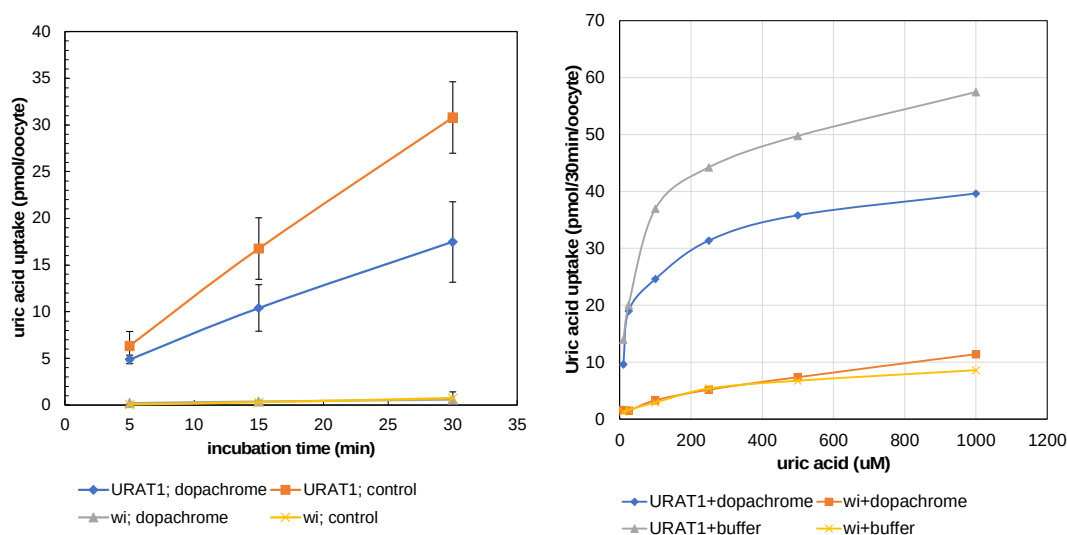


Fig.3 URAT1 による尿酸輸送。(左) URAT1 による尿酸の輸送量を dopachrome の存在下、非存在下で輸送時間を変えて測定。(右) URAT1 による尿酸の輸送量を dopachrome の存在下、非存在下で尿酸の濃度を変えて測定。

dopachrome 存在下、非存在下ともに直線性を示した。得られた直線より V_{max} と K_m を求めたところ dopachrome 存在下、非存在下では K_m の値は変わらなかったが、 V_{max} は dopachrome 存在下では非存在下と比較し 43%低かった。これらのことから dopachrome は尿酸を非競合的に阻害していると考えられる。

また、dopachrome による URAT1 の尿酸輸送が可逆的か検討するため、URAT1 を発現させた oocyte に予め dopachrome を作用させた後、洗浄し、その後放射性標識された尿酸を作用させその取り込み量を検討した。その結果、dopachrome を予め作用させておいた後洗浄しても尿酸の輸送能は大きく減少したままであった。このことは URAT1 による尿酸の輸送は dopachrome によって非可逆的に阻害されている可能性を示している。

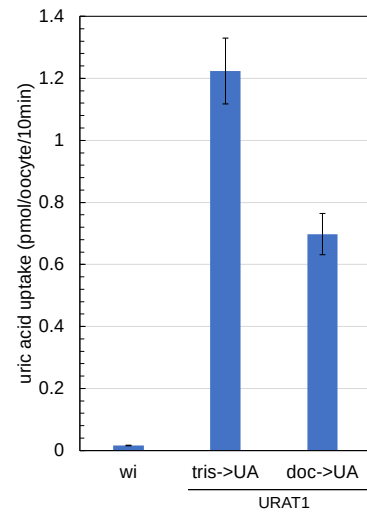


Fig.4 dopachrome を事前処理した後、洗浄し尿酸の輸送を検討

これらのことから dopachrome によって URAT1 の尿酸輸送が阻害されることが示された。主要な尿酸トランスポーターの一つである GLUT9 は阻害されなかった。dopa や dopamine 由来のキノン化合物は反応性が高く種々のタンパク質のチオール基と結合することでミトコンドリアの障害やプロテアソームの機能の阻害を引き起こし、細胞毒性を発揮することが知られている。本研究で示された dopachrome による URAT1 の尿酸輸送の阻害は URAT1 へ化学的な結合によってもたらされたと考えられる。URAT1 は腎臓だけでなく脳でも発現していることから、パーキンソン病への患者への L-dopa の投与により dopachrome が増えることで、抗酸化作用を有する尿酸の脳内への輸送が減少し、dopa、dopamine 由来の毒性にさらに影響を受けやすくなるのかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Seki Satowa, Tanaka Gen, Kimura Toru, Hayashida Mari, Miyoshi Jun, Matsuura Minoru, Sakurai Hiroyuki, Hisamatsu Tadakazu	4. 巻 37
2. 論文標題 Functional analysis of mutant SLC02A1 transporters found in patients with chronic enteropathy associated with SLC02A1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1776~1784
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jgh.15968	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 —

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福岡利仁, 佐藤徹, 李恵怜, 田中弦, 木村徹, 川上貴久, 岸本暢将, 駒形嘉紀, 櫻井裕之, 要伸也
2. 発表標題 イグラチモド投与によって血清尿酸値の低下を認めた1例.
3. 学会等名 第52回臨床体液研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Gen Tanaka, Toru Kimura
2. 発表標題 Investigation of zinc transport via ZIP13 using a xenopus oocyte expression system.
3. 学会等名 第5回ZIP13 meeting
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 關 里和, 田中 弦, 久松 理一, 櫻井 裕之
2. 発表標題 ヒト難治性小腸潰瘍の原因となる変異体SLC02A1トランスポーターの機能解析
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

杏林大学：医学部：教員紹介：田中 弦
<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/medicine/education/staff/detail/?id=med50009ed50009>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------