

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08238

研究課題名(和文)血管内皮におけるdihydrofolate reductaseの役割の解明

研究課題名(英文)Role of dihydrofolate reductase in the regulation of endothelial function

研究代表者

野口 克彦 (Noguchi, Katsuhiko)

琉球大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：70156181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスを伴う循環器疾患でみられる内皮機能不全の原因として、内皮型NO合成酵素の必須補因子であるテトラヒドロビオプテリン(BH4)の欠乏やBH4の酸化型であるBH2の増加の関与が示唆されている。しかし、BH2からBH4への変換を行うジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)の生体位における役割については調べられていない。そこで、本研究では、血管内皮細胞特異的Dhfr遺伝子欠損マウス、時期及び内皮特異的Dhfr欠損マウス、および内皮特異的ヒトDHFR遺伝子導入マウスを新たに作製し、これらの遺伝子改変マウスの表現型を対照マウスと比較することにより血管内皮機能調節におけるDHFRの役割を解析した。

研究成果の概要(英文)：An elevation of oxidized forms of tetrahydrobiopterin (BH4), especially dihydrobiopterin (BH2), has been reported in the setting of oxidative stress, such as atherosclerotic disorders, where eNOS is dysfunctional, but a role of dihydrofolate reductase (DHFR), an enzyme catalyzing intracellular conversion of BH2 to BH4, in the regulation of endothelial function in vivo remains to be clarified. To this end, we generated novel mice with endothelium-specific deficiency of Dhfr gene, endothelium-specific and temporal deficiency of the gene and with endothelium-specific expression of DHFR transgene, and we examined characteristics of phenotypes of these mice.

研究分野：循環器薬理学

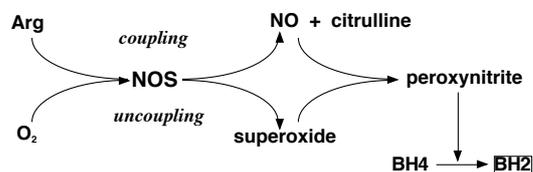
キーワード：一酸化窒素 血管内皮細胞機能 ジヒドロビオプテリン テトラヒドロビオプテリン ジヒドロ葉酸還元酵素 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

[研究代表者のこれまでの研究成果] Tetrahydrobiopterin (BH4) は、芳香族アミノ酸水酸化酵素 (フェニルアラニン水酸化酵素・チロシン水酸化酵素・トリプトファン水酸化酵素)、最近遺伝子が同定された alkylglycerol monooxygenase (ether lipid 合成)、および一酸化窒素合成酵素 (NOS) の補因子である。NOS は、3 種類のアイソフォームがあり、いずれも BH4 を必須補因子として arginine から一酸化窒素 (NO) を産生する。血管系では、NO は主に内皮型 NOS (eNOS) によって産生され、内皮由来血管弛緩因子として、また、抗動脈硬化因子として、血管機能維持に重要な役割を担っている。

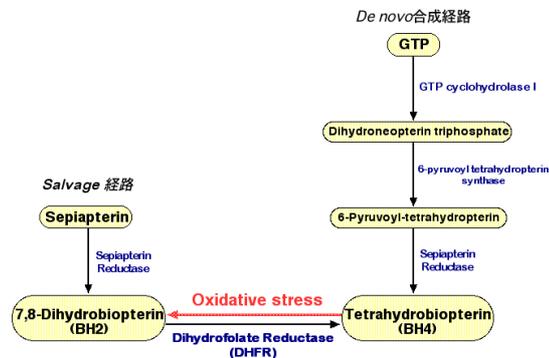
研究代表者は、一貫して循環器薬理学の研究に従事してきたが、ここ 15 年ほど BH4 の心血管系における役割をテーマにした研究を中心に行ってきた。2002 年には、世界に先駆けて心臓の虚血再灌流障害に対して BH4 が心保護効果を示すことを報告した¹ (J Thorac Cardiovasc Surg)。さらに、内因性の血管内 BH4 レベルと血管内皮機能の関係を正常ラット² (J Pharmacol Sci, 2008) と自然発症高血圧ラット (SHRSP)³ (Eur J Pharmacol, 2010) で調べた。これらの研究から、予想外にも血管内 BH4 レベルの増減と血管内皮機能が必ずしも一致しないことが明らかになった。むしろ内皮機能障害がみられる際には、常に酸化型の BH4、すなわち 7,8-dihydrobiopterin (BH2) の増加を伴うことが観察された。このことは、BH4 の絶対量や BH4/BH2 比の減少だけでなく BH2 自体の増加も生体位における負の内皮機能調節のキープクターである可能性を示唆するものである。

[国内外の研究動向と解決すべき課題] Arginine や BH4 の不足、あるいはその酸化が生じたときなどに、神経型・誘導型・内皮型 NOS の 3 種類いずれのアイソフォームも、NO と citrulline の代わりにスーパーオキシドを産生する NOS uncoupling (下図) が



引き起こされる。NOS uncoupling が指摘されている病態には、高血圧、動脈硬化、糖尿病などが知られている。これらの酸化ストレスが関与する心血管病では、BH4 の減少だけでなく、BH2 の増加を伴うことが報告されている^{3,7}。しかし、BH2 自体の内皮細胞機能への影響を調べた in vivo 研究はこれまで全く行われていなかった。2011 年に研究代表者らは、細胞内 BH2 増加それ自体で BH4 レベルと無関係に内皮機能不全を引き起こすことを報告した⁸。この内皮依存性血管弛緩反応の減弱は SOD 処置で抑制され、血管内 superoxide 産

生の亢進が見られたことから、少なくとも一部は NOS uncoupling に由来することが示唆された。しかし、BH2 がどのような分子機構で NOS 機能に影響しているか、さらに長期的な影響については未解明であった。研究代表者は、sepiapterin、および BH4 生合成の salvage 経路 (下図参照) において細胞内で



Tetrahydrobiopterin (BH4)の生合成経路

BH2 を経て BH4 を生成する dihydrofolate reductase (DHFR) の選択的阻害薬 methotrexate (MTX) との併用を行うことによって、細胞内 BH4 の変化を伴わずに BH2 のみを増加させることに成功していた。

2. 研究の目的

本研究では、Dhfr 遺伝子改変マウスを用いて、NOS の必須補因子である BH4 生合成の salvage 経路の意義を明らかにするため、この合成経路の律速酵素である DHFR の生理学的役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 血管内皮特異的 dihydrofolate reductase 欠損マウスの作製: NOS の活性化に必須の補酵素である tetrahydrobiopterin (BH4) の合成系には de novo 合成経路と salvage 合成経路の 2 つの経路があり、DHFR は salvage 経路の律速酵素である。DHFR を全身性に欠失させた conventional ノックアウトマウスでは胎生致死の可能性が大きいため、本研究では、Cre-loxP システムを利用した conditional ノックアウトマウスを新たに作製した。このため、Dhfr 遺伝子のエクソン 3 を flox した遺伝子改変マウスを理研より導入した。Flpe-Tg マウスと交配することによりネオマイシンカセットを除去した後、臓器特異的に遺伝子欠失を起こすため、医薬基盤研究所より血管内皮特異的 Cre 発現マウス (VE-cadherin Cre) を導入し、Dhfr 遺伝子 flox マウス (Dhfr^{fl/fl}) と交配した。

(2) 時期及び血管内皮特異的 dihydrofolate reductase 欠損マウスの作製: Dhfr 遺伝子 flox マウス (allele は、loxP/exon3/loxP) のヘテロ接合体 (Dhfr^{fl/+}) マウス同士の交配により得たホモ接合体 (Dhfr^{fl/fl}) マウスと EMMA より導入した薬剤誘発血管内皮特異的 Cre 発現マウス (Tie2CreERT2) を交配し、tamoxifen 誘発時に内皮特異的に Dhfr を欠損するマウスを作製した。

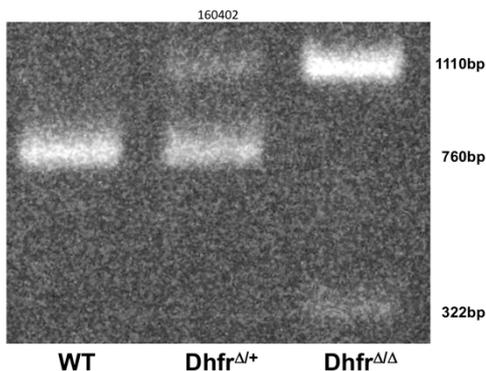
(3) 内皮特異的ヒト DHFR 遺伝子導入マウス：ヒト DHFR cDNA を tie2 プロモーター下流に導入することにより 3 ラインの内皮特異的ヒト DHFR 遺伝子導入ファウンダー(F0)マウスを作製した。

(4) 組織中テトラヒドロビオプテリン(BH4)とジヒドロビオプテリン(BH2)定量：Biopterin(B)の測定は、逆相 HPLC システム(Shimadzu, LC20)に連結した蛍光検出器(RF-20A)により行った。BH4 量は、Fukushima & Nixon 法に準じて、酸性下(BH4+BH2+B = total B)とアルカリ性下(BH2+B)でヨウ素酸化を行い、その差から算出した。これまでの方法では、組織中の B 量を見逃してアルカリ性での酸化生成物を BH2 量とみなしてきたが、今回は実際に B 量そのものを定量し BH2 量を算出した。本法を適用し、マウス肝・肺・心臓・大動脈を麻酔下に摘出して、各組織中の BH4・BH2 量を測定した。

(5) DHFR 活性の測定：Dihydrofolate Reductase Assay Kit (Sigma) を用いてマウス組織ホモジネート液の DHFR 活性を評価した。

4. 研究成果

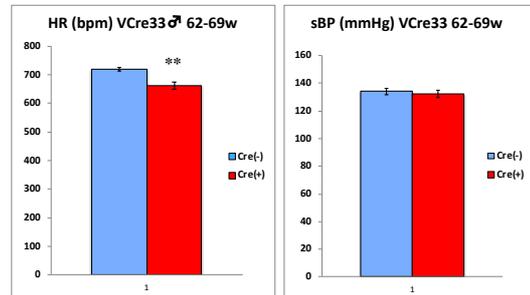
(1) 血管内皮特異的 Dihydrofolate reductase 欠損マウスの作製と表現型の解析：Dhfr 遺伝子 flox マウス (allele は、loxP/exon3/loxP) のヘテロ接合体 (Dhfr^{flox/+}) マウス同士の交配によりホモ接合体 (Dhfr^{flox/flox}) を得た。なお、このマウスの外観上の異常は認められていない。さらに、血管内皮特異的 Cre recombinase 発現マウスである VE-cadherin Cre マウスと Dhfr^{flox/flox} を交配し、血管内皮特異的に Dhfr を欠損している Dhfr^{Δ/Δ}・Cre⁺を作製した (下図)。



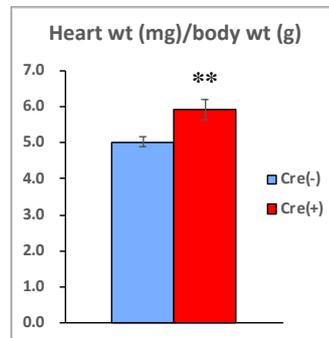
①表現型の解析：Cre recombinase が導入され血管内皮特異的に Dhfr を欠損しているマウス (Cre⁺) の表現型を Cre recombinase が導入されていないマウス (Cre⁻) と比較した。

これらのマウスには外見上の違いはなく、24 時間の摂餌量・飲水量・尿量・糞重量は両群とも同様で、体重の経時変化 (成長曲線) にも雌雄ともに Cre の有無で差はみられなかった。また、血漿の生化学的指標 (血糖値、総コレステロール、中性脂肪) にも両群間で有意の差

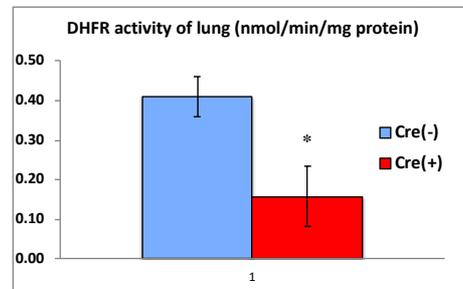
を認めなかった。しかし、Tail-cuff 法で測定した無麻酔下の心拍数は、50~69 週齢の Cre⁺マウスで Cre⁻マウスに比べ有意の減少を示した (下図)。なお、10~40 週齢ではこのような差はみられず、また、血圧はどの週齢でも有意の差を示さなかった。



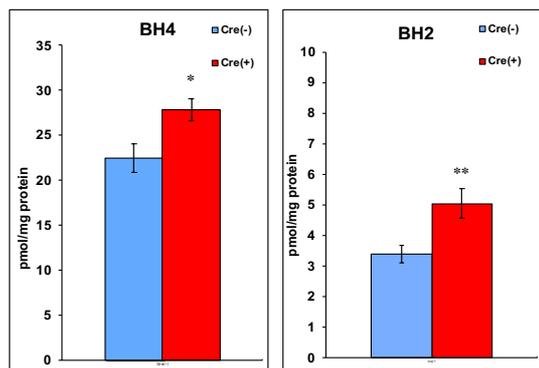
また、Cre⁺マウスでは、Cre⁻マウスに比べ心臓重量の有意の増大が認められ (P<0.01)、心肥大をきたしていることが示唆された (下図)。



②DHFR 活性の測定：血管を豊富に含む肺の DHFR 活性は Cre⁺で Cre⁻に比べ有意 (P<0.05) に減少していた (下図)。



③組織 BH2 含量：肺組織中の BH2 含量は Cre⁺マウスで Cre⁻に比べ明らかな増加 (49%, P<0.01) を示した (下図)。BH4 含量も有意の増加 (24%, P<0.05) がみられたが、BH2 の変化より軽度であった。



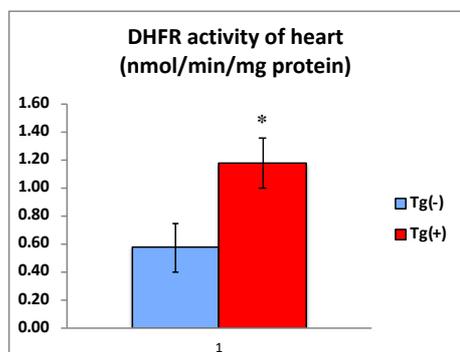
(2) 時期及び血管内皮特異的 Dihydrofolate reductase 欠損マウスの作製: tamoxifen 誘発内皮特異的に Cre recombinase を発現する Tie2CreERT2 マウスを導入し、Dhfr^{fl/fl} との交配により Dhfr^{fl/fl}・Tie2CreERT2^{+/+}を作製した。

①表現型の解析: 2 ラインの時期及び内皮特異的 Dhfr 欠損マウスを得た。これらのマウスには外見上の異常は見られなかった。しかし、本研究期間では、他の研究を優先したため、この遺伝子改変マウスの tamoxifen 投与後の表現型解析を行うことができなかった。そのため、凍結胚を作製し今後の検討に備えた。

(3) 内皮特異的 DHFR 過剰発現マウスの作製と表現型の解析: 内皮特異的ヒト DHFR 遺伝子導入 (DHFR-Tg) マウスと C57BL/6 と交配することにより得られる Tg⁺マウスと Tg⁻マウスを用いて両者の表現型を比較した。

①表現型の解析: Tg⁺と Tg⁻のマウスの外見上の差は認められなかった。12~15 週齢の体重にも雌雄ともに DHFR-Tg の有無で差はみられなかった。30 週齢の血圧を測定したが、心拍数、収縮期血圧ともに両群間で有意差は認められなかった。

②DHFR 活性の測定: 組織中の DHFR 活性は、Tg⁺マウスで Tg⁻のマウスに比べ約 2 倍の活性増加を示した (下図)。



③組織 BH2 含量: 肺組織中の BH4・BH2 含量には、DHFR-Tg の有無による有意の影響は認められなかった。

今後、今回の結果を踏まえ、頸動脈部分結紮による動脈硬化モデルやアンジオテンシン II 負荷モデルなどを用いて、酸化ストレス負荷状態での今回新たに作成した遺伝子改変マウスの表現型解析を行うことにより、BH4 合成の salvage 経路、とくに DHFR の血管機能調節における役割と病態生理学的意義についてさらに明らかにする予定である。

<引用文献>

- ① Yamashiro S, Noguchi K, Matsuzaki T, Miyagi K, Nakasone J, Sakanashi M, Koja K, Sakanashi M. Beneficial effect of tetrahydrobiopterin on ischemia-reperfusion injury in isolated perfused rat

hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002; 124: 775-784.

- ② Hamadate N, Noguchi K, Sakanashi M, Matsuzaki T, Nakasone J, Sakanashi M. Effect of decreased levels of intrinsic tetrahydrobiopterin on endothelial function in anesthetized rats. *J Pharmacol Sci.* 2008; 107: 49-56.
- ③ Noguchi K, Hamadate N, Matsuzaki T, Sakanashi M, Nakasone J, Sakanashi M, Tsutsui M, Sakanashi M. Improvement of impaired endothelial function by tetrahydrobiopterin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2010; 631: 28-35.
- ④ Shinozaki K, et al. Coronary endothelial dysfunction in the insulin-resistant state is linked to abnormal pteridine metabolism and vascular oxidative stress. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 38: 1821-1828.
- ⑤ Vásquez-Vivar J, et al. The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogues controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: an EPR spin trapping study. *Biochem J.* 2002; 362: 733-739.
- ⑥ Takeda M, et al. Plasma tetrahydrobiopterin/dihydrobiopterin ratio: a possible marker of endothelial dysfunction. *Circ J.* 2009; 73: 955-962.
- ⑦ Sugiyama T, et al. Tetrahydrobiopterin recycling, a key determinant of endothelial nitric-oxide synthase-dependent signaling pathways in cultured vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2009; 284: 12691-12700.
- ⑧ Noguchi K, Hamadate N, Matsuzaki T, Sakanashi M, Nakasone J, Uchida T, Arakaki K, Kubota H, Ishiuchi S, Masuzaki H, Sugahara K, Ohya Y, Sakanashi M, Tsutsui M. Increasing dihydrobiopterin causes dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in rats in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; 301: H721-H729

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 2 件)

- ① Kina-Tanada M, ... Noguchi K (25 名中 6 番目), ... Tsutsui M (25 名中最後). Long-term dietary nitrite and nitrate deficiency causes metabolic syndrome, endothelial dysfunction, and cardiovascular death in mice. *Diabetologia* (査読有) 2017; 60(6): 1138-1151. doi: 10.1007/s00125-017-4259-6
- ② Noguchi K, ... Tsutsui M (14 名中最後). Effect of caffeine contained in a cup of coffee on microvascular function in

heathy subjects. *J Pharmacol Sci* (査読有) 2015; 127: 217-222. doi: 10.1016/j.jphs.2015.01.003

[学会発表] (計 4 件)

- ① 久保田陽秋、野口克彦、坂梨まゆ子、松崎俊博、仲宗根淳子、下川宏明、須加原一博、垣花 学、筒井正人。脳梗塞における NO 合成酵素の有害な作用：性差およびテストステロンの関与。第 46 回日本心脈管作動物質学会。2017 年
- ② 戸塚裕一、坂梨まゆ子、松崎俊博、野口克彦、仲宗根淳子、国吉幸男、筒井正人。3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase 欠損マウスにおける高血圧。第 46 回日本心脈管作動物質学会。2017 年
- ③ 坂梨まゆ子、平良雄司、内田太郎、松崎俊博、野口克彦、仲宗根淳子、下川宏明、筒井正人。2/3 腎摘 NO 合成酵素完全欠損マウスの突然死における性差。第 46 回日本心脈管作動物質学会。2017 年
- ④ 喜名美香、坂梨まゆ子、谷本昭英、松崎俊博、野口克彦、仲宗根淳子、下川宏明、喜名振一郎、砂川 元、大屋祐輔、新崎 章、筒井正人。食事中の nitrite および nitrate の不足は代謝症候群、内皮機能不全、および心血管死を惹起する。第 46 回日本心脈管作動物質学会。2017 年

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
http://w3.uryu.ac.jp/pharmaco/Pharmacology/youko_so_yao_lihe.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 克彦 (NOGUCHI, Katsuhiko)
琉球大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：70156181

(2) 研究分担者

筒井 正人 (TSUTSUI, Masato)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70309962

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()