

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08894

研究課題名(和文) NOSの補酵素テトラヒドロビオプテリンの敗血症における動態と治療標的としての検討

研究課題名(英文) Study of the dynamics of tetrahydrobiopterin in sepsis and the potentiality of BH4 as therapeutic target.

研究代表者

安田 智嗣 (Yasuda, Tomotsugu)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：80437954

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)：敗血症性ショックは、様々な治療法が進歩した救急・集中治療領域においても未だ予後不良の疾患の一つである。本研究は、敗血症におけるテトラヒドロビオプテリン(BH4)とその関連代謝物の変化を解析し、病態との関連を検討することを目的として実施した。BH4とその関連代謝物の血中濃度は、感染からの時間経過とともに変化しており、この変化は一酸化窒素の産生量や病態の変化と関連していることが示唆された。また、敗血症モデルマウスに対し、BH4の酸化防止目的にアスコルビン酸(AsA)の投与を行った結果、生存率が改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究による成果は、未だ死亡率の高い敗血症性ショックの病態メカニズムの解明につながる。病態メカニズムが解明されることで、これまでは対症療法が主体であった敗血症に対する臨床診療においても、BH4とその関連代謝物を指標とした新しい治療法の確立が期待でき、これによって死亡率の低下を実現できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Septic shock is one of diseases whose pathogenesis is to be elucidated in spite of recent progress in critical care medicine. The aim of this study is to analyze BH4 and its related-metabolites during sepsis and reveal its pathophysiology. The values of BH4 and related-metabolites changed out of normal levels early from the onset of infection, suggesting these changes are related with NO production and clinical course. Also we administered AsA against septic model mice to prevent further oxidation and gained the result of better survival.

研究分野：集中治療、麻酔

キーワード：敗血症性ショック 敗血症 テトラヒドロビオプテリン

1. 研究開始当初の背景

敗血症性ショックは、様々な治療法が進歩した救急・集中治療領域において、未だ予後不良の疾患の一つである。敗血症性ショックの初期には、末梢血管抵抗の減弱した高心拍出量性ショック (hyperdynamic state) と呼ばれる病態を呈し、心臓エコーを用いた臨床研究から、約 50% において可逆的心機能低下が生じ、さらに、拡張障害の存在は重症敗血症/敗血症性ショックの独立した予後予測因子であることが報告されている (Eur Heart J. 2012;33:895)。敗血症性ショックの主要な病態は、末梢血管拡張に伴う血圧低下とそれに関連した臓器障害であり、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) により過剰に産生される NO が、そのショック病態発現に大きく関与すると考えられている。我々は、NOS のコファクターであるテトラヒドロbiopterin (BH4) およびその関連代謝物に焦点をあて、敗血症性ショック病態との関わりと、BH4 をターゲットとした新たな治療戦略の可能性を検討する研究を計画した。

炎症反応により生体内では iNOS の産生が誘導され、さらに BH4 およびその関連代謝物も増加する。増加した BH4 は、フリーラジカルを還元し消去する (BH4 自身は酸化されジヒドロbiopterin (BH2) になる) とともに、NOS と結合することで NOS のスーパーオキシド生成を抑制する。特に内皮型 NOS (eNOS) との結合は、細胞保護的に作用し、重要であることが報告されている。しかしその一方、一過性に NO の産生も過剰になり、過剰に産生された NO はその作用として末梢血管抵抗の減弱、微小循環障害、心筋収縮の抑制を引き起こし、また、パーオキシナイトライドに変換されて細胞を直接傷害する。細胞傷害が進むと、BH4 の生合成経路は破綻し、細胞内では BH4 が減少し、代わりに BH2 が増加する。BH2 には NOS のコファクターとしての機能はなく、NO は産生されない。生体において eNOS から産生された NO は様々な細胞保護機能も有しており、NO が産生されなくなった生体内では細胞傷害がさらに進行する。また、BH4 が減少した細胞内環境では、NOS は NO ではなくスーパーオキシドを生成することも報告されている。eNOS と BH4 とのアンカップリングにおける最近の知見では、細胞内における BH4 の濃度そのものよりも、BH4 と BH2 の比が重要であるということが述べられている。

2. 研究の目的

本研究では、敗血症性ショック病態における BH4 とその関連代謝物 (以下、プテリジンと総称する) の体内動態を把握し、病態の経時的な変化 (warm shock から cold shock へ) との関連を検討する。BH4 が、スーパーオキシドを減少させる因子として作用するのか、反対に酸化ストレスを生じる因子として作用するのか、病態の各フェーズでの BH4 の作用を解明した後、この知見を利用した BH4 濃度制御による敗血症性ショックの新しい治療戦略の有効性を動物実験で検証する。

3. 研究の方法

- (1) 当院 ICU 入室中に敗血症を発症した患者を対象とした臨床研究 (前向き観察研究) の実施
臨床研究は鹿児島大学疫学研究等倫理委員会による承認を得た後に実施した (170112 疫、190125 疫)。患者から定期的に採血し、血漿中のプテリジン濃度を経時的に測定、記録した。プテリジン濃度を測定するための検体は、最終濃度 0.2% となるように DTT を添加した後に遠心し、血漿を分離した。検体の測定は、研究分担者である東京工業大学理工学院・一瀬宏の

元で行なった。

(2) 敗血症モデルにおける経時的な血中プテリジン濃度、NO_x、臓器障害指標の測定

盲腸結紮穿孔刺 (CLP) により敗血症モデルマウスを作成し、処置3、6、12、18、24、36、48時間後の血漿中、組織中のNO_x、プテリジン濃度の変化を解析した。また、同様のタイミングでのAST、乳酸の測定も行なった。

(3) 敗血症モデルマウスに対するBH4の投与効果の検討

敗血症モデルマウスに対し、上記(2)の実験結果より決定したタイミングでBH4等の投与を行ない、非投与群との生存時間の比較を行なった。

(4) 統計学的解析

統計処理にはJMP® 15 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を使用した。p<0.05を有意とした。

4. 研究成果

(1) 当院 ICU に入室し、研究期間中に研究参加への同意を得られた患者は 34 名であった。34 名を敗血症性ショック、敗血症、ICU コントロールの 3 群に分け、BH4、BH2、ネオプテリン (NP)、ジヒドロネオプテリン (NPH2)、ビオプテリン (BP) の濃度を測定する予定であったが、新型コロナウイルス感染症の影響で東京工業大学への訪問ができず、一部の検体の測定しか実施できなかった。

(2) 敗血症モデルマウスを用いて、CLP 処置 3、6、12、24、36 時間後の血中 BH4、BH2、NP 濃度を測定した。BH4 濃度は CLP 処置 24 時間後、BH2 濃度は CLP 処置 6、12、24 時間後、NP 濃度は CLP 処置 24 時間後の値が Sham 群と比較して有意に高値であった。算出した BH2/BH4 比は、CLP 処置 6、12、24 時間後の値が有意に高値であった (図 1)。BH2 と BH2/BH4 比の上昇が感染 6 時間後からみられ、血管内皮細胞内ではこのタイミングで eNOS のアンカップリングが起こっていることが予想された。eNOS のアンカップリングは血管内皮細胞障害の原因となることが報告されており (Int J Mol Sci. 2019 Aug 2;20(15):3775.)、病態の進行を防ぐためにはより早期に BH2 の比率を抑制し、eNOS のアンカップリングを防ぐことが重要であると考えられた。

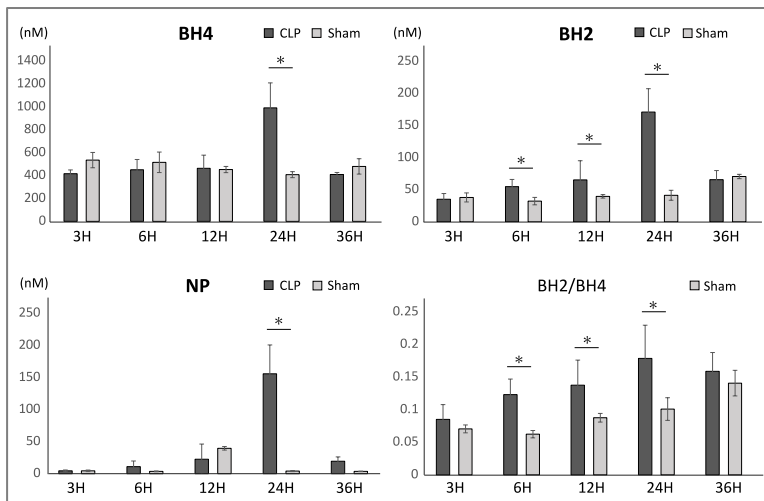


図 1. 処置からの経過時間毎のプテリジン濃度

* p < 0.05

CLP 処置 3、6、12、18、24、48 時間後の血中 NO_x 濃度は、CLP 処置 18、24 時間後の値が Sham 群と比較して有意に高値であった (図 2)。eNOS のアンカップリングが起こっているタイミング以降も NO_x の増加がみられることから、こ

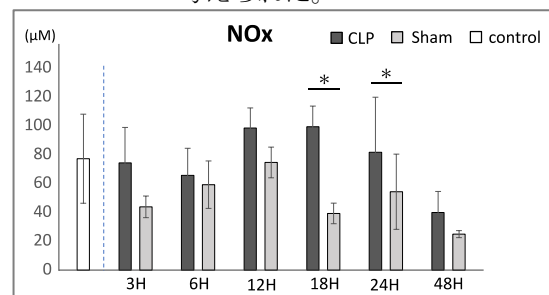


図 2. 処置からの経過時間毎の NO_x 濃度

* p < 0.05

これらの多くは、炎症によって誘導された iNOS 由来の NOx であることが考えられる。本研究で使用した敗血症モデルの生存曲線（図 3）からは、死亡イベントのほとんどが処置後 20 時間前後で発生していることがわかり、これは測定したプテリジン、NOx のピークと同じタイミングであった。敗血症性ショックによる死亡には、過剰に産生した NO とプテリジンの関与が示唆される。

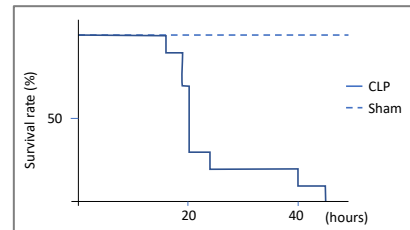


図 3. 敗血症モデルの生存曲線

乳酸値、AST 値に有意な変化はみられなかった。

- (3) (2)の結果より、感染から 6 時間以内に BH2 の比率を下げるのが効果的であると仮定した。BH2 の比率を下げるために①BH4 の投与により BH4 の比率を上げる、②BH4 の酸化を防ぐ、③BH2 を除去するという 3 つの方法を検討した。

①条件検討により投与する BH4 濃度は 10 mg/kg とした。CLP 処置直後、3 時間後、6 時間後に皮下に投与し、BH4 非投与群と生存時間を比較したが、生存率を改善することはできなかった。BH4 の投与により血中の BH4 濃度の上昇、BH2/BH4 比の低下は確認できた。

②BH4 の酸化を防ぐ物質としてアスコルビン酸 (AsA) 200 mg/kg を投与した。投与タイミングと方法は①と同様。CLP 処置直後にアスコルビン酸を投与した群では、非投与群と比較して生存率を改善することができた(図 4)。

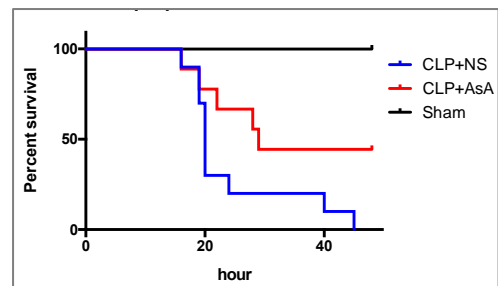


図 4. アスコルビン酸投与群と非投与群の生存曲線

③我々の過去の研究により、血液浄化療法によって

血中のプテリジン濃度が低下することはわかっているが、現在の技術では BH2 の選択的な除去はできない。プテリジンはアミノ酸代謝やエネルギー代謝に必須であり、CLP 処置 24 時間以降には血中濃度が低下に転じることを考えると、血液浄化療法によってプテリジン全体の濃度を下げってしまうことは適切ではないと考えられた。

敗血症モデルマウスにおける BH4 およびその関連代謝物の経時的変化を解明した。病態の経過と合わせて考えると、敗血症性ショックの発現および病態の進行にはプテリジンが関与していることが示唆され、BH4 の酸化を抑制することによりこれらを予防できる可能性が示された。本研究で使用したモデルでは、同一個体からの経時的な採血や循環指標のモニタリングは不可能であり、この点は今後の課題である。また、今回実施できなかった臨床検体の解析により、ヒト敗血症の経過におけるプテリジンの動態を検討する必要がある。アスコルビン酸の投与により生存率を改善できたことは非常にインパクトのある結果であり、その効果のメカニズムを解明することが重要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 政所祐太郎, 上國料千夏, 原怜, 一瀬宏, 安田智嗣
2. 発表標題 敗血症におけるプテリジン関連物質の動態とNOとの関連
3. 学会等名 日本プテリジン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江口 智洋, 上國料 千夏, 政所 祐太郎, 宮本 昇太郎, 寺田 晋作, 古別府 裕明, 二木 貴弘, 安田 智嗣, 垣花 泰之
2. 発表標題 敗血症性ショックとテトラヒドロピオプテリンの関連
3. 学会等名 日本集中治療医学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	伊藤 隆史 (Ito Takashi) (20381171)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授 (17701)	
研究分担者	上國料 千夏 (Kamikokuryo Chinatsu) (50751278)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教 (17701)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分担者	一瀬 宏 (Ichinose Hiroshi) (90192492)	東京工業大学・生命理工学院・教授 (12608)	

	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
研究 協力者	政所 祐太郎 (Madokoro Yutaro)		
研究 協力者	江口 智洋 (Eguchi Tomohiro)		

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