

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09438

研究課題名(和文)敗血症関連脳症におけるテトラヒドロピオプテリンの関与とその治療標的としての検討

研究課題名(英文) Tetrahydrobiopterin in sepsis associated encephalopathy and its consideration as a therapeutic target.

研究代表者

上國料 千夏 (Kamikokuryo, Chinatsu)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：50751278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、BH4の敗血症関連脳症発症メカニズムへの関与の解明と、予防・予後改善効果の検討であった。

我々はCLPマウスを用いた研究で、BH4の酸化型であるBH2の増加が血管内皮細胞障害に関与し、早期の酸化抑制が予後改善に繋がることを見出した。血中・脳組織中のBH4・BH2・フェニルアラニン(Phe)解析と脳の組織学的評価では、いずれの変化もCLP24時間後が最大であり、96時間後でも回復しなかった。ICU入室した敗血症患者を対象とした研究では、入室早期にBH4、BH2、Phe、チロシンの増加とアルギニンの減少が見られた。しかし、今回の解析ではこれらの変化と脳症発症との関連は見出せなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症関連脳症の発症メカニズムはまだ十分解明されておらず、我々の研究によってBH4の関与が示唆されたことは、予防的観点からも重要なことであると考えられる。敗血症の急性期における過剰なBH4、NOは血液浄化療法によって除去できることがわかっているが、BH4に関しては一方的な除去だけでなく濃度コントロールの必要性を意識した治療介入が重要であり、さらに今後は、BH4の不足した細胞に必要な量のBH4を届ける方法についての検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the involvement of BH4 in the pathogenesis of sepsis-related encephalopathy and to examine its preventive effect and prognosis. We found that an increase in BH2, an oxidized form of BH4, is involved in vascular endothelial cell damage, and that early inhibition of oxidation improves prognosis. Analysis of BH4, BH2, and phenylalanine (Phe) in blood and brain tissue, and histological evaluation of the brain showed that all changes were maximal at 24 hours after CLP and did not recover even at 96 hours. In a clinical study of septic patients admitted to the ICU, increased BH4, BH2, Phe, and tyrosine and decreased arginine at the beginning of admission were observed. However, in the present analysis, no association was found between these changes and the development of encephalopathy.

研究分野：敗血症

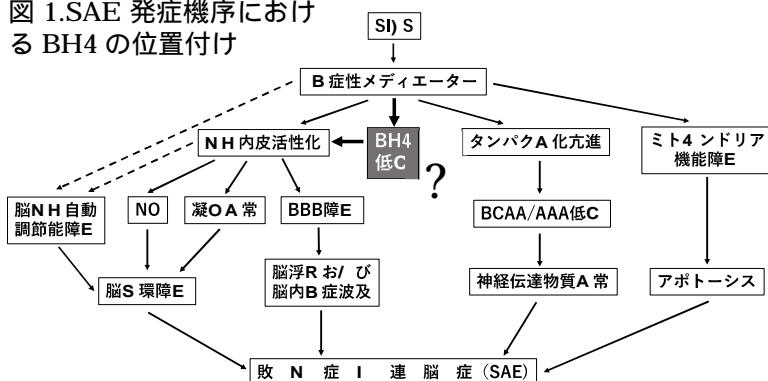
キーワード：敗血症 テトラヒドロピオプテリン 敗血症関連脳症 アミノ酸代謝

1. 研究開始当初の背景

敗血症は「感染症に対する宿主生体反応の調整障害により引き起こされる、生命を脅かす臓器障害」、敗血症性ショックは「敗血症の部分集合で、高い死亡率と関連する循環・細胞・代謝の障害を呈するもの」と定義される。世界で毎年約 3000 万人の人が敗血症に罹患し、そのうち約 600 万人が死亡する最も警戒すべき疾患であると言われている。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に予後不良の疾患である。

近年、生存率の向上とともに問題となってきたのが、患者の QOL を大幅に低下させる敗血症の後遺症としての脳機能障害の存在である。敗血症の患者では、びまん性の脳障害を呈することがしばしばみられる。感染による全身炎症反応の結果として生じるもので、興奮、易刺激性による譫妄、見当識障害、昏睡など様々な症状を呈する。これらは敗血症関連脳症(sepsis-associated encephalopathy: SAE)と呼ばれており、他の臓器不全に先行してみられることも多く(Exp Clin Cardiol. 2006 Fall;11:226-36)、SAE は転帰を悪化させることが報告されている(Crit Care Med. 18:801-806)。発症率は研究によって幅があるが 18~84%とされている。発症にはサイトカイン、NO、酸化ストレス、アミノ酸不均衡、敗血症の病態に伴う脳内の微小循環障害や凝固異常など複数の機序が関与しているとされ(図 1)、詳細な病態生理の解明はなされていない。SAE は基本的に可逆性の病態であり、敗血症の治癒により改善すると考えられてきたが、重症な敗血症患者においては、集学的治療により敗血症が治癒したとしても遷延性の意識障害または高次脳機能障害が残存する症例がある(J Crit Care. 25:406-412.2010)。SAE に対しては、明確な診断基準、治療法、予防法は存在しない。

図 1.SAE 発症機序における BH4 の位置付け



我々は、SAE 発症への関連が示唆されている物質の中でも特に芳香族アミノ酸であるフェニルアラニン、チロシン、トリプトファンに着目し、その代謝・合成経路の補酵素であるテトラヒドロピオプテリン (BH4) が SAE 発症機序において鍵を握っているのではないかと考えた。

BH4 はフェニルケトン尿 (高フェニルアラニン血) 症の標的分子として知られる物質である。BH4 反応性高フェニルアラニン血症患者では BH4 の生成やリサイクルに關与する酵素の先天的な欠損によりフェニルアラニンが代謝されずに蓄積し、新生児・乳幼児期では脳構築障害による精神発達遅滞を、成人においても様々な精神症状を引き起こすといわれている。この神経毒性メカニズムの一端として、フェニルアラニンの自己集合能力がアミロイド様の構造を形成することが報告されている (Nat Chem boil.2012;8:701-6)。さらに、BH4 の欠損 (低下) ではチロシンやトリプトファンの代謝経路も遮断される (低下する)ため、ドーパの産生低下やセロトニン低下が起こり中枢神経障害や中枢神経症状が出現するとされている。治療としては BH4 投与、神経伝達物質補充と食事療法が用いられ、治療効果をあげている。

BH4 のもう一つの重要な働きが一酸化窒素合成酵素 (NOS) の補酵素としての働きであり、これまで我々は敗血症性ショック病態の解明を目的とした研究において、BH4 およびその代謝関連物質を研究対象としてきた。敗血症では、BH4 は感染による炎症反応を契機として細胞内での合成が増加し、NO 合成やフェニルアラニンおよびモノアミンの代謝・合成に影響を与え自身はジヒドロピオプテリン (BH2) へと酸化される。病態が進むと、細胞内では BH4 生成のネガティブフィードバックが働き、さらに、BH2 を還元する BH4 リサイクル機構が破綻して BH4 の相対的な不足 (= BH2 レベルの上昇)が生じ、酸化ストレスによる細胞傷害が進行する。我々が行なった検討の結果でも敗血症患者では健康人と比較して血中 BH2 濃度が高く、BH4 : BH2 比は低下しており、上記内容を裏付けていると考えられる。BH4 の投与により敗血症の病態が改善すること (Crit Care Med 2012;40(10) :2833-40)、また、敗血症患者の血中フェニルアラニン、チロシンが相対的に増加すること (Crit Care Med. 19:753-757, 1991)も報告されていて、代謝経路の破綻が示唆される。

以上のことから、敗血症の患者では BH4 が不足し、BH4 の不足が芳香族アミノ酸の代謝異常を

引き起こして SAE が発症する、という仮説を立てた。

2. 研究の目的

SAE と BH4 およびその代謝関連物質との関連を検討した報告はこれまでに存在しない。本研究は、SAE 発症のメカニズムに BH4 が大きく関与していることを明らかにし、BH4 およびその代謝関連物質の血中濃度調整（除去と補充）によって、敗血症関連脳症の予防もしくは予後の改善が可能であるか検討することを目的として計画した。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

敗血症モデルマウス

盲腸結紮穿刺 (CLP) による敗血症モデルマウスを作成して実験を行った。敗血症の重症度は穿刺針のサイズと結紮位置で調整した。

CLP 処置からの経時的な変化を以下の項目について測定した。(血液・脳組織)

- ・フェニルアラニン (Phe)
- ・BH4、BH2、ネオプテリン (NP)、ジヒドロNP (H2NP)

脳の組織学的評価

CLP 処置からの経過時間ごとに脳組織を採取し、抗 Iba1 抗体で免疫染色を行った。

BH4、およびアスコルビン酸を投与し、敗血症モデルマウスの生存率および(2)(3)の項目が改善するかを検討した。

(2) 臨床研究

患者検体を用いて、血中BH4およびその代謝関連物質、血中アミノ酸濃度を測定し、SAE発症との関連について解析を行った。

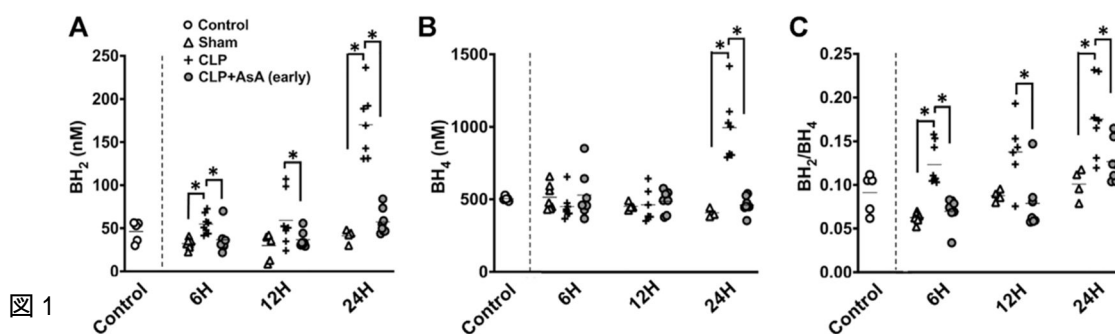
4. 研究成果

(1) 敗血症モデル

本研究では、実験内容に応じた重症度のモデル作成が必要であった。生命予後の改善効果の検討にはCLP後24時間以内に約80%の個体が死亡するような重症度の高いモデル、脳の評価には90%が96時間後にも生存する軽症モデルを使用した。

(2) 敗血症モデルマウスにおけるBH4、BH2、BH2/BH4比の変化

本研究で使用したモデルマウスにおいて、BH4およびBH2はCLP処置24時間後をピークとして上昇した。特にBH2の上昇はCLP処置6時間後から始まり、同様にBH2/BH4比も6時間後から上昇した(図1)。BH2の比率が上昇するとeNOSのアンカップリングが生じ、発生したラジカルによって内皮細胞障害が起こると言われている。本研究により、敗血症でも同様のメカニズムで血管内皮細胞が障害され、臓器障害に至ることが示唆された。BH2比率の上昇は、CLP直後にアスコルビン酸を投与することによって抑制され、これに伴い臓器障害、生命予後も改善した。一方、CLP48時間以降においては、BH4は正常コントロールより減少し、BH2の比率はさらに上昇した。



(3) 敗血症モデルマウスにおけるフェニルアラニンの変化

本研究で使用したモデルマウスにおいて、フェニルアラニン濃度はCLP処置後早期から上昇し、96時間後においても高値が持続した。細胞内ではフェニルアラニンの代謝能が低下している可能性が考えられた。CLP処置24時間後までは血中BH4濃度が高値であるのに対し肝細胞中BH4濃度は増加しておらず、細胞内においてBH4がフェニルアラニン水酸化酵素の補酵素としての機能を十分に果たしていない可能性が示唆された。

(4) 敗血症モデルマウスの脳組織

本研究で使用したモデルマウスの脳組織は、Iba1抗体にて評価した。CLP処置24時間後では、重症群、軽症群ともにミクログリアの活性化が見られ、軽症群ではCLP処置96時間後まで活性化が持続していた。

- (5) 敗血症モデルマウスへのアスコルビン酸およびBH4投与
重症群にアスコルビン酸を投与すると、BH4の酸化が抑制され、BH2の上昇が抑えられた。これにより臓器障害が改善し、生存率が改善した。一方、同様のタイミングでBH4の投与を行っても臓器障害や生存率の改善には至らなかった。BH4は病態の初期（24時間以内）に増加する生理活性物質であるため、増加のタイミングで投与しても効果が示されなかったと考えられた。敗血症モデルマウスにおいてはCLP処置48時間後にBH4が正常値より減少し、フェニルアラニンが高値であったことから、BH4が減少するタイミングでBH4を投与することにより病態を改善できる可能性があると考えられた。本研究期間内では最適な投与タイミングを見つけ出すことができなかったが、最適なタイミングでの投与により、フェニルアラニン上昇やミクログリアの活性化を抑えられる可能性があり、今後も引き続き検討を進めていく。
- (6) 敗血症患者の臨床検体におけるBH4、BH2、アミノ酸の変化
ICU入室となった敗血症患者と、予定手術後管理の理由でICU入室となった患者（比較対象）から研究用検体を取得し、BH4、BH2、各種アミノ酸を測定した。敗血症患者群ではBH4、BH2、メチオニン、フェニルアラニン、チロシンの値が高値であり、アルギニン、フィッシャー比は低値であった。チロシン水酸化酵素（TH）、フェニルアラニン水酸化酵素（PAH）、一酸化窒素合成酵素（NOS）のBH4に対するKmはそれぞれ20~100 μM 、2~3 μM 、0.02~0.03 μM であり、BH4はNOSとの親和性が極めて高い。敗血症患者におけるフェニルアラニン、チロシンの増加とアルギニン低下の一因としては以下のようなメカニズムが考えられた。感染によりBH4の生合成が増加する。炎症により新たに発現したiNOSとBH4との反応により過剰なNOが産生される。活性酸素種によるBH4の酸化が起こりBH2が増加する。BH4が不足しTH、PAHの反応が低下する。血液浄化療法による過剰なBH4・BH2の除去は、過剰なNOの除去や、内皮細胞障害の予防につながり、病態の改善に直接的な効果があると考えられた。今回の解析では、せん妄の有無とBH4、BH2、アミノ酸の変化との関連は見出せなかった。

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 1件）

1. 著者名 Yutaro Madokoro, Chinatsu Kamikokuryo, Shuhei Niiyama, Takashi Ito, Satoshi Hara, Hiroshi Ichinose, Yasuyuki Kakihana	4. 巻 -
2. 論文標題 Early ascorbic acid administration prevents vascular endothelial cell damage in septic mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2022.929448	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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、江口智洋、二木貴弘、伊藤隆史、新山修平、佐南谷瑞、原怜、一瀬宏、垣花泰之
2. 発表標題 敗血症への早期ビタミンC投与は予後を改善するのか
3. 学会等名 第48回日本集中治療医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 政所祐太郎、上國料千夏、伊藤隆史、江口智洋、古別府裕明、新山修平、安田智嗣、垣花泰之
2. 発表標題 敗血症におけるテトラヒドロピオプテリン及びその酸化物の体内変化とNOxとの関係
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 垣花泰之, 上國料千夏, 政所祐太郎	4. 発行年 2021年
2. 出版社 株式会社 総合医学社	5. 総ページ数 1047
3. 書名 ショック管理	

〔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)	熊本大学・大学院生命科学研究部(保)・教授 (17401)	
研究 分担者	原 怜 (Hara Satoshi) (70624815)	東京工業大学・生命理工学院・助教 (12608)	
研究 分担者	安田 智嗣 (Yasuda Tomotsugu) (80437954)	鹿児島大学・歯学総合研究科・客員研究員 (17701)	

	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) (40794061)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員 (17701)	

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
---------	---------