

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10079

研究課題名(和文) 歯周病を含む糖尿病合併症に対する新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic agents for diabetic complications including periodontal disease

研究代表者

大橋 晶子 (OHASHI, Akiko)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：00571019

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)：eNOSの機能不全に起因する血管障害に対して、eNOS反応を調節するテトラヒドロビオプテリン(BH4)の補充が効果的であるが、ヒト臨床試験では十分な結果が得られていない。その原因がBH4の酸化とBH4補充効率の悪さであることに着目した。本研究では、BH4の酸化が自動酸化ではなく、細胞や組織において酵素的に起こること、およびこのBH4酸化にNADPHオキシダーゼが関与することを示した。他方、BH4補充効率を決定する輸送体が浸透圧の影響を受けることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病の主な合併症は細小血管症(腎症、網膜症、神経障害)、大血管症(脳梗塞、心筋梗塞)である。これら血管症に次ぐ合併症として歯周病が注目されている。歯周病と糖尿病は相互に負の影響を与えるため、糖尿病患者において有意に悪化するだけでなく、歯周病が糖尿病の合併症(腎症、心疾患)を悪化させる。本研究成果は、BH4の酸化とBH4補充効率を改善する一助であり、歯周病ならびに糖尿病の合併症の有効な治療によって、多くの患者の生活の質の維持と健康寿命の延長への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In studies using model animals, supplementation with tetrahydrobiopterin (BH4), which regulates the eNOS response, is effective for angiopathy caused by eNOS dysfunction. However, sufficient results have not been obtained in clinical trials. We noted that the causes were the oxidation of BH4 and the inefficiency of BH4 replenishment. In this study, we showed that BH4 oxidation occurs enzymatically in cells and tissues rather than autoxidation, and that NADPH oxidase is involved in this BH4 oxidation. On the other hand, it was shown that the activity of the transporter responsible for BH4 transport, which determines the BH4 replenishment efficiency, is affected by osmotic pressure.

研究分野：薬物動態学

キーワード：テトラヒドロビオプテリン 血管障害 酸化ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病の三大合併症である糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、糖尿病性神経障害の増悪などは、eNOS 機能不全による非局所的な血管障害が主因である。eNOS 機能不全の主なものとして eNOS アンカッピングといわれ、NOS 分子に結合した BH4 が酸化体 BH2 に置き換わることでペルオキシナイトライト (ONOO<sup>-</sup>) が発生する (J Biol Chem 276 (2001) 14533-6, Biochem J 362 (2002) 733-9 より)。ONOO<sup>-</sup> は細胞傷害性が高いだけでなく、BH4 を選択的に酸化するため、BH2 生成が加速し、さらに eNOS のアンカッピングが促進するという悪循環を引き起こす。すなわち、BH2 の BH4 に対する相対量 (BH2/BH4 比) の増大は血管障害の原因・増悪因子である (Nitric Oxide 25 (2011) 81-89)。

eNOS に結合した BH4 が酸化・脱落すると BH2 となるが、通常は細胞内のサルベージ経路で速やかに還元されるため、細胞内 BH2/BH4 比は低く維持されている。しかし、糖尿病などの病態では、酸化還元バランスの崩れから、BH4 の酸化と BH2 の還元の不均衡が生じ、BH2/BH4 比が増大し、eNOS 機能不全が進行する。現在、eNOS 機能不全による心血管イベントの抑制のために、BH2/BH4 比を改善する最も直接的な方法として BH4 の投与が試みられている。しかし、ヒト臨床試験において、良好な結果が得られていない。これは、BH4 投与直後に起こる BH4 酸化によって BH2 が増加し、BH2/BH4 比が改善されないためである (Circulation 125 (2012) 1356-66)。この BH4 の酸化を抑制できなければ BH4 は治療薬として成立しない。すなわち、「投与された BH4 の酸化抑制」が eNOS 機能不全を予防・治療する薬剤開発の核心的な問題である。

### 2. 研究の目的

本研究は、BH4 投与時に観察される BH4 の大量酸化を抑制する方法を確立し、eNOS 機能不全に起因する血管障害の治療薬を探索することを目的とする。これまで、投与された BH4 の酸化は非酵素的な自動酸化と考えられており、生体内で起こる自動酸化を人為的に制御することは不可能とされていた。これに対して、申請者は、BH4 の大量酸化は、非生理的高濃度の生理活性物質 BH4 に曝された細胞のホメオスタシスの 1 つ、すなわち、生物反応であると考えた。細胞内で酵素的に起こる生物反応は、抑制することが可能であり、個体で観察される酸化問題と細胞レベルの酸化が BH4 の輸送体によって同時に理解・解決できる。

BH4 投与時に観察される BH4 の酸化は細胞外における自動酸化ではなく、細胞内で起こる生物反応であり、以下の 3 つの過程で説明される：(1) BH4 の細胞への取り込み、(2) 細胞内における BH4 の酵素的な酸化、(3) BH2 の細胞からの放出。すなわち、BH4 が細胞に取り込まれなければ、BH4 の急激な酸化は起こらない。BH4 は親水性化合物であるため、細胞膜を介した移行には輸送体の媒介が必要である。現在までに BH4 の輸送体は同定されていない。そこで本研究では、BH4 の取り込みを担う輸送体を同定し、その阻害剤を探索することで、BH4 投与時の BH4 酸化を抑制する。この研究により、BH2/BH4 比の増加が抑制できれば、糖尿病性の合併症治療薬の創薬研究におけるマイルストーンとなる。

### 3. 研究の方法

培養細胞を用いて BH4 輸送の解析を行う。特に、基質濃度依存性、ATP 感受性、金属イオンの効果、類似化合物による競合阻害が BH4 輸送に与える影響から輸送特性を観察する。BH4 の輸送特性と類似する輸送体を TP-Search, ABC transporters, Solute Carriers などのデータベースを用いて、検索する。候補となった輸送体の基質や阻害剤の BH4 輸送への阻害効果と抗 BH4 酸化効果を評価する。他方、実験動物へ BH4 を投与した場合の組織への BH4 蓄積 (特に肝臓への蓄積) に対する候補輸送体阻害剤の効果を評価する。

### 4. 研究成果

#### (1) 培養細胞を用いた BH4 輸送の解析

培養細胞 (HepG2) に暴露し、一定時間に細胞内に取り込まれた BH4 量を HPLC/蛍光検出により定量した。

培養細胞に BH4 を与えると細胞内に経時的に BH4 が蓄積するが、同時に酸化型のピオプテリン化合物 (ここでは BH2 と示す) も蓄積した (図 1)。細胞に BH4 を与える条件 (特に、基質濃度依存性、ATP 感受性、金属イオンの効果、類似化合物による競合阻害) を検討した結果、浸透圧に感受性を示した。すなわち、低張溶液を用いて実験を行ったところ BH4 の蓄積が数倍に上昇することが明らかになった。ただし、酸化型のピオプテリン化合物量には優位な変化は観察されなかった。

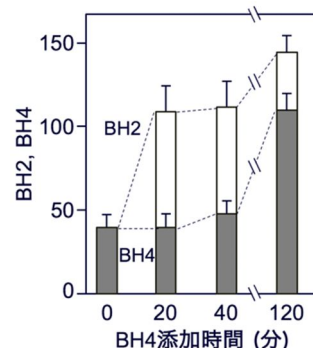


図 1. BH4 添加時の細胞内 BH4 酸化  
培養細胞に取り込まれた BH4 は、速やかに酸化され、細胞内に BH2 が増加する。

上記で観察された浸透圧感受性の BH4 輸送について詳細に検討を行った。その結果、Transient Receptor Potential (TRP) チャネルの阻害剤によって浸透圧感受性の BH4 輸送が完全に抑制された。TRP チャネルは、温度・機械・浸透圧・pH などの物理・化学的な刺激で活性化されるチャネルである。TRP は、ナトリウムイオン (Na<sup>+</sup>) やカリウムイオン (K<sup>+</sup>) に加えて、カルシウムイオン (Ca<sup>2+</sup>) やマグネシウムイオン (Mg<sup>2+</sup>) も透過するカチオンチャネルである。複素環化合物である BH4 が TRP チャネルの基質として輸送されることは考えにくいので、BH4 を輸送する輸送体の活性が TRP で調節されていると考えられた。TRP チャネルは TRPA, TRPC, TRPM, TRPV, TRPML そして TRPP の 6 つのファミリーに分類される。どの TRP ファミリーが低張溶液依存性に BH4 輸送を調節するのかを阻害剤を用いて検討した結果、TRPA, および TRPC に比較的特異性のある阻害剤によって、低張溶液下で促進された BH4 輸送が有意に抑制された。しかし、TRPA および TRPC の活性を調節するとの報告のある Ca<sup>2+</sup>イオン濃度を細胞内、細胞外で枯渇させたにもかかわらず、BH4 輸送は変化しなかった。これらの結果は、浸透圧感受性の TRP チャネルが BH4 輸送を担う輸送体の上流に位置し、その活性を調節していることを示唆した。

TRP の調節を受ける BH4 輸送体の輸送特性検討を行った。これまでの結果から、BH4 輸送は等張条件下で活性が抑制され、低張条件下で TRP を介して活性化されると考えられた。そこで、低張条件下で BH4 輸送体の輸送特性を改めて検討することとした。まず、ピオプテリン化合物を輸送する事が報告されている「平衡型拡散輸送体 (ENT)」と「有機陰イオン輸送体 (OAT)」の阻害剤、および基質を用いて BH4 輸送に対する影響を観察した。その結果、OAT への阻害効果を持つことが知られているプロベネシド、および OAT の基質であるエストロン硫酸やペニシリン G では BH4 輸送を阻害しなかった。これに対して、ENT への阻害効果をもつニトロベンジルチオイノシン (NBMPR)、および核酸 (アデノシン、ウリジン、チミジン) 存在下に BH4 輸送が有意に減少した(図 2)。なお、低張条件下観察された NBMPR や核酸による BH4 輸送への阻害効果は、等張条件下では観察されなかった。これらの結果は、浸透圧感受性に TRP を介して活性化される BH4 輸送体が ENT であることが示唆された。これまで、ENT が TRP による調節を受けることは報告されていない。

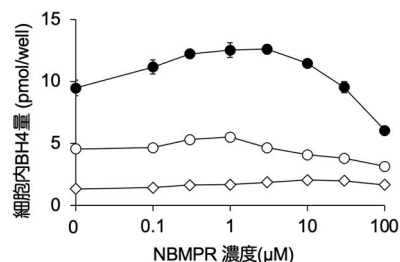


図 2. 浸透圧感受性の BH4 取込みに対する輸送体阻害剤の効果  
平衡型核酸輸送体の阻害剤であるニトロベンジルチオイノシン (NBMPR) の濃度依存的に BH4 の輸送が抑制された。 ; 低張溶液下, ; 等張溶液下, ; BH4 なし

培養細胞における BH4 酸化について詳細に検討を行った。細胞内 BH4 と細胞外 BH4 の安定性を BH4 のサルベージ経路前駆体であるセピアプテリンを用いて検討した結果、研究を計画した当初は BH4 の酸化が「細胞内」で行われると考えていたが、検討の結果、「細胞外」で BH4 が酸化されていることが明らかになった。また、BH4 の酸化産物は、フクシマ-ニクソン法に準じた酸性/アルカリ性条件下のヨード酸化において、プテリン (2-amino-4-oxopteridine) として検出された。さらに、BH4 の酸化は低温 (8 ) ではほとんど観察されないこと、およびニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) オキシダーゼの阻害剤存在下に BH4 酸化が有意に抑制された。NADPH オキシダーゼは、膜結合酵素複合体で、6 つのサブユニットで構成される。また、主要な活性酸素種 (ROS) 源の 1 つである。これらの結果は、BH4 の酸化が酵素的に行われている事、および BH4 を酸化する化合物が ROS である可能性を示唆した。

## (2) 実験動物を用いた解析

上記(1)の で HepG2 細胞を使用して観察された浸透圧感受性の BH4 輸送が生体内でも機能しているかどうかを実験動物 (C57BL/6J マウス) を用いて検討した。すなわち、マウスの肝臓を浸透圧の異なるハックス溶液で還流し、肝臓に残存する BH4 量を定量した。その結果、等張ハックス溶液で還流した肝臓の BH4 量に比べて、低張ハックス溶液で還流した肝臓に残存する BH4 量の方が有意に低かった。この結果は、浸透圧による BH4 輸送の調節機構が生体においても、機能することを示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 大橋晶子, 高橋富久	4. 巻 94
2. 論文標題 テトラヒドロピオプテリンの薬理作用と臨床応用について	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日大歯学	6. 最初と最後の頁 55-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Nishitani N, Ohmura Y, Nagayasu K, Shibui N, Kaneko S, Ohashi A, Yoshida T, Yamanaka A, Yoshioka M	4. 巻 1719
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated in vivo gene editing reveals that neuronal 5-HT1A receptors in the dorsal raphe nucleus contribute to body temperature regulation in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Res.	6. 最初と最後の頁 243-252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2019.06.009	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 -

1. 著者名 Tsukune N, Naito M, Ohashi A, Ninomiya T, Sato S, Takahashi T	4. 巻 375
2. 論文標題 Forced expression of mouse progerin attenuates the osteoblast differentiation interrupting catenin signal pathway in vitro.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 655-664
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-018-2930-y.	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 大橋晶子, 高橋富久
2. 発表標題 Dynamic change of tetrahydrobiopterin and dihydrobiopterin in plasma and erythrocytes
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名	HIROTO MINAMINO, YOSHIHITO FUJITA, YASUO OGURI, TSUYOSHI GOTO, AKIKO OHASHI, FUTOSHI FURUYA, NOZOMI ISOMURA, TAKESUE KOHEI, YING LI, SATOKO KAWARASAKI, TERUO KAWADA, HIROYUKI HASEGAWA and NOBUYA INAGAKI
2. 発表標題	Maternal Supplementation of Tetrahydrobiopterin Regulates Differentiation of Fetal Brown Adipose Tissue and Contributes to Offspring Metabolic Health
3. 学会等名	American Diabetes Association's 80th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	大橋晶子, 原田智則, 二宮禎, 藤原恭子, 高橋富久, 長谷川宏之
2. 発表標題	モノアミン産生細胞におけるテトラヒドロピオプテリンの2つの効果
3. 学会等名	日本ビタミン学会第71回大会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	高橋富久, 大橋晶子, 二宮禎
2. 発表標題	Lamin Aの遺伝子変異体のprogerinの発現が骨芽細胞分化に与える影響
3. 学会等名	第61回歯科基礎医学会学術集会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	二宮禎, 中村純基, 永島利通, 大橋晶子, 高橋富久
2. 発表標題	マウス歯根膜細胞のLRP1発現による抜歯窩修復への寄与
3. 学会等名	第61回歯科基礎医学会学術集会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名 Minamino H, Fujita Y, Oguri Y, Goto T, Ohashi A, Furuya F, Isomura N, Kawarasaki S, Kawada T, Hasegawa H, Inagaki N
2. 発表標題 Tetrahydrobiopterin Regulates Developmental Differentiation of Brown Adipose Tissue
3. 学会等名 79th American Diabetes Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minamino H, Fujita Y, Oguri Y, Goto T, Ohashi A, Furuya F, Isomura N, Kawarasaki S, Kawada T, Hasegawa H, Inagaki N
2. 発表標題 Tetrahydrobiopterin Is Required for Brown Adipose Tissue Development and Differentiation
3. 学会等名 The 11th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----

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