

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590324

研究課題名(和文)ジヒドロビオプテリンによる内皮機能障害機序の解明と病態生理学的意義の評価

研究課題名(英文)Evaluation of the role of dihydrobiopterin in the regulation of endothelial function in the normal and pathological states

研究代表者

野口 克彦 (NOGUCHI, Katsuhiko)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70156181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化性疾患などの酸化ストレス下では、NO合成酵素の必須補因子tetrahydrobiopterin (BH4)の欠乏だけでなく、BH4の酸化型である7,8-dihydrobiopterin (BH2)の増加が認められる。しかし、血管内皮細胞機能調節におけるBH2の役割は不明であった。研究代表者らは、最近、BH2それ自体で内皮機能不全を引き起こすことを見出した。そこで、本研究では、長期的な細胞内BH2増加による内皮機能障害の影響について動脈硬化モデルを用いた検討を行い、さらにBH2からのBH4生成に重要なdihydrofolate reductase遺伝子の内皮特異的欠損マウス作製を行った。

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 endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is dysfunctional, but the role of BH2 in the regulation of endothelial function in vivo remains to be clarified. This study was conducted to evaluate the effect of pharmacologically increased levels of BH2 on development of atherosclerotic lesion using a mouse arteriosclerotic model. Two-week treatment with sepiapterin and methotrexate increased aortic levels of BH2 doubly, but exacerbation of atherosclerotic lesion was not clearly found probably because of unspecific drug actions. Thus, to clarify the role of dihydrofolate reductase (DHFR), an enzyme catalyzing intracellular conversion of BH2 to BH4, in the regulation of endothelial function in vivo, we have been generating a novel mouse model with endothelial cell-specific deletion of DHFR gene.

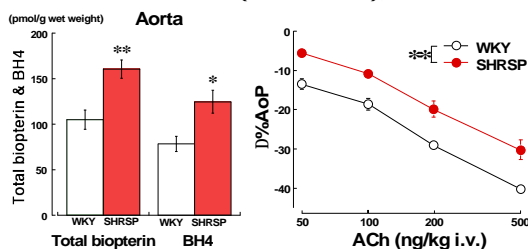
研究分野：循環器薬理学

キーワード：心血管 一酸化窒素 血管内皮細胞機能 酸化ストレス 動脈硬化 ジヒドロビオプテリン テトラヒドロビオプテリン dihydrofolate reductase

1. 研究開始当初の背景

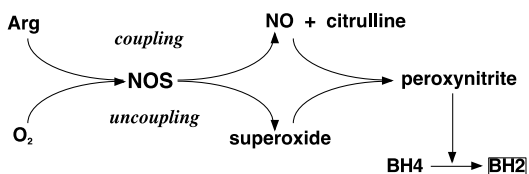
[ 研究代表者のこれまでの研究成果 ] Tetrahydrobiopterin (BH4) は、芳香族アミノ酸水酸化酵素 (フェニルアラニン水酸化酵素・チロシン水酸化酵素・トリプトファン水酸化酵素)、最近遺伝子が同定された alkylglycerol monooxygenase (ether lipid 合成) および一酸化窒素合成酵素 (NOS) の補因子である。NOS は、3 種類のアイソフォームがあり、いずれも BH4 を必須補因子として arginine から一酸化窒素 (NO) を産生する。血管系では、NO は主に内皮型 NOS (eNOS) によって産生され、内皮由来血管弛緩因子として、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 10 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 (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<sup>2</sup> (J Pharmacol Sci, 2008) と自然発症高血圧ラット (SHRSP)<sup>3</sup> (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 (下図参照)。むしろ内皮



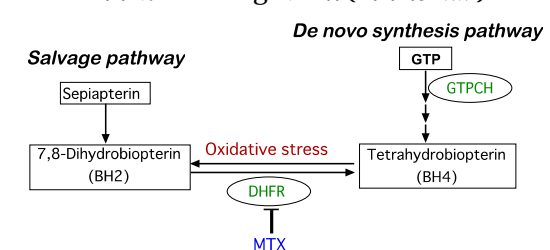
機能障害がみられる際には、常に酸化型の BH4、すなわち 7,8-dihydrobiopterin (BH2) の増加を伴うことが観察された。このことは、BH4 の絶対量や BH4/BH2 比の減少だけでなく BH2 自体の増加も生体位における負の内皮機能調節のキーファクターである可能性を示唆するものである。

[ 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<sup>3-7</sup>。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<sup>8</sup>。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 生成の salvage 経路 (下図参照) に



いて細胞内で 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、まず、マウス組織中 BH4 と BH2 定量法の確立と改良を行い、sepiapterin と MTX の併用投与で得られた細胞内 BH2 増加による病態における役割についてマウス動脈硬化モデルで検討する。さらに Dhfr 遺伝子改変マウスを用いて NOS 機能調節における DHFR の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Fukushima & Nixon 法を応用した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) 定量法の改良: 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 量を無視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。

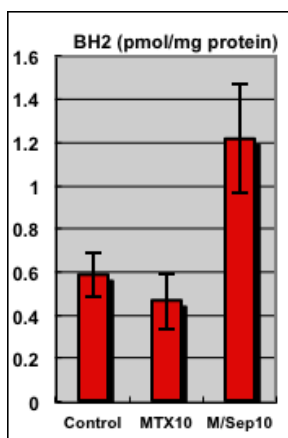
(2) 細胞内 dihydrobiopterin 増加の長期的な影響-動脈硬化モデルにおける検討: 2 週間の methotrexate と sepiapterin の併用投与

によるマウス組織中 BH2 含量の著明な増加の影響を、血管リモデリングを引き起こすことができる動脈硬化モデルであるマウス頸動脈部分狭窄モデル (Korshunov et al, ATVB, 2003; Nam et al., AJP-HCP, 2009) で検討した。methotrexate と sepiapterin の併用投与は、浸透圧ミニポンプを利用した。動脈硬化性病変は総頸動脈の HE 染色した病理組織標本で判定した。

(3) 時期及び血管内皮特異的 dihydrofolate reductase 欠損マウスの作製：一酸化窒素合成酵素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、dihydrofolate reductase (DHFR) は salvage 経路の律速酵素である。DHFR の 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、このマウスで検討を行うこととした。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、時期及び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、EMMA より薬剤誘発血管内皮特異的 Cre 発現マウス (Tie2CreERT2) をそれぞれ導入した。

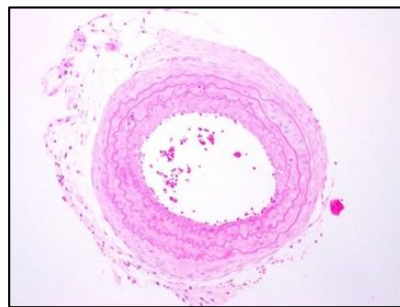
#### 4. 研究成果

(1) Fukushima & Nixon 法を応用した組織中テトラヒドロピオプテリン (BH4) とジヒドロピオプテリン (BH2) 定量法の改良：BH4・BH2・B の標準液を測定したところ、total B に対する各プテリンの割合は、それぞれ 90%、85%、94%であった。検出限界は 40-80 fmol であった。ラットでの観察と同様に、methotrexate と sepiapterin の併用投与によりマウス組織中の BH2 含量の著明な増加を検出した。以上より、本法の適用によって、従来法に比べ 1.5 倍の試料を要するものの、マウス組織中 BH2 レベルを BH4 とともに比較的簡便に評価できることが示唆された。



(2) 細胞内 dihydrobiopterin 増加の長期的な影響-動脈硬化モデルにおける検討：マウスでの methotrexate と sepiapterin の長期間投与方法 (経口投与、腹腔内投与など)・投与量の検討を行い、浸透圧ミニポンプの使用により、大動脈の組織中 BH4 には影響せずに BH2 の明らかな増加 (control の 2.1 倍) が得られる投与条件 (MTX 10 mg/kg/d i.p. + sepiapterin 10mg/kg/d for 2 week by an Alzet mini-pump) を確立した (左下図)。

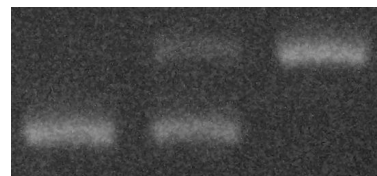
2 週間のマウス頸動脈部分結紮で、対照群では、明らかな内膜肥厚が 5 例中 4 例で認められた (下図)。しかし、methotrexate・



内膜肥厚がみられたマウス頸動脈

sepiapterin 併用投与群では、4 例中 2 例のみであった。今回用いたマウス頸動脈部分狭窄モデルの動脈硬化モデルとしての有用性は確認されたが、methotrexate・sepiapterin 併用投与による動脈硬化促進効果は認められなかった。今回の結果から、methotrexate あるいは sepiapterin の投与量の不足、あるいは副作用の影響が考えられ、薬理学的手法の限界が示唆された。

(3) 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<sup>f1/+</sup>) マウス同士の交配によりホモ接合体 (Dhfr<sup>f1/f1</sup>) を得ている (下図)。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<sup>f1/f1</sup> を交配し、Dhfr<sup>f1/+</sup>・Cre<sup>+/-</sup> を作製した。また、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<sup>f1/f1</sup> との交配の準備を行っている。



WT Heterozygote Homozygote

今後、さらに内皮特異的 DHFR 過剰発現マウスを新たに作製し、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、これまでの阻害薬を用いた研究とは異なるアプローチ

で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, Hirayama A, Nishio Y, Yoshida Y, Ohtani T, Okamura T, Masada M, Kikkawa R, Kodama K, Kashiwagi A. 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, Martíásek P, Whittsett J, Joseph J, Kalyanaraman B. 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, Yamashita T, Shinohara M, Sasaki N, Takaya T, Nakajima K, Inoue N, Masano T, Tawa H, Satomi-Kobayashi S, Toh R, Sugiyama D, Nishimura K, Yokoyama M, Hirata K, Kawashima S. Plasma tetrahydrobiopterin/dihydrobiopterin ratio: a possible marker of endothelial dysfunction. *Circ J.* 2009; 73: 955-962.
7. Sugiyama T, Levy BD, Michel T. 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 3 件)

1. Uchida T, Furuno Y, Tanimoto A, Toyohira Y, Arakaki K, Kina-Tanada M, Kubota H, Sakanashi M, Matsuzaki T, Noguchi K, Nakasone J, Igarashi T, Ueno S, Matsushita M, Ishiuchi S, Masuzaki H, Ohya Y, Yanagihara N, Shimokawa H, Otsuji Y, Tamura M, Tsutsui M. Development of an experimentally useful model of acute myocardial infarction: 2/3 nephrectomized triple nitric oxide synthases-deficient mouse. *J Mol Cell Cardiol* (査読有) 2014;77:29-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.09.021>
2. 野口 克彦, 濱館 直史, 松崎 俊博, 坂梨 まゆ子, 仲宗根 淳子, 内田 太郎, 新垣 久美子, 久保田 陽明, 石内 勝吾, 益崎 裕章, 須加原 一博, 大屋 祐輔, 坂梨 又郎, 筒井 正人 Dihydrobiopterin による内皮型一酸化窒素合成酵素機能障害. *琉球医学学会誌* (査読有) 2013; 32: 7-12
3. Sakanashi M, Matsuzaki T, Noguchi K, Nakasone J, Sakanashi M, Uchida T, Kina-Tanada M, Kubota H, Arakaki K, Tanimoto A, Yanagihara N, Sakanashi M, Ohya Y, Masuzaki H, Ishiuchi S, Sugahara K, Tsutsui M. Long-term treatment with san'o-shashin-to, a kampo medicine, markedly ameliorates cardiac ischemia-reperfusion injury in ovariectomized rats via the redox-dependent mechanism. *Circ J.* (査読有) 2013;77:1827-37. <http://doi.org/10.1253/circj.CJ-12-1434>

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 野口 克彦, 松崎 俊博, 坂梨 まゆ子, 濱館 直史, 仲宗根 淳子, 坂梨 又郎, 筒井 正人 ジヒドロピオプテリンによる生体位ラットの eNOS 機能障害. 第 13 回日本 NO 学会 沖縄県医師会館(那覇) 2013 年 6 月 28 日
2. 野口 克彦, 松崎 俊博, 坂梨 まゆ子, 仲宗根 淳子, 内田 太郎, 新垣 久美子, 久保田 陽明, 石内 勝吾, 益崎 裕章, 須加原 一博, 大屋 祐輔, 坂梨 又郎, 筒井 正人 内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の新しい活性調節機構の解明: Dihydrobiopterin による eNOS 機能不全. 第 157 回琉球医学会例会 琉球大学(西原町) 2013 年 1 月 15 日
3. 野口 克彦, 松崎 俊博, 坂梨 まゆ子, 濱館 直史, 仲宗根 淳子, 坂梨 又郎, 筒井 正人 ジヒドロピオプテリンの eNOS 機能におよぼす影響. 第 12 回日本 NO 学会 神戸国際会議場(神戸) 2012 年 6 月 29 日

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://w3.u-ryukyu.ac.jp/pharmaco/Pharmacology/youkoso\\_yao\\_lihe.html](http://w3.u-ryukyu.ac.jp/pharmaco/Pharmacology/youkoso_yao_lihe.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野口 克彦 (NOGUCHI, Katsuhiko)  
琉球大学・大学院医学研究科・准教授  
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：