

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460346

研究課題名(和文)テトラヒドロピオプテリン代謝の不均衡がもたらす病態とこれに対する防御機構の解明

研究課題名(英文) Study on the disease induced by imbalance of tetrahydrobiopterin-metabolism and research on the mechanisms for protection against the state.

研究代表者

一瀬 千穂 (Sumi-Ichinose, Chiho)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号：10247653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：生後発達期にBH4によって発現が影響を受ける候補分子を得た。Qdpr^{-/-}マウスでは血漿中BH2の増大にもかかわらず、大動脈のBH2/BH4比は野生型の1.6倍の増加であった。Qdpr^{-/-}マウス大動脈リング標本のアセチルコリン(ACh)に対する弛緩反応は、野生型マウスと差がなかった。Spr^{-/-}マウスは不安定な高血圧と徐脈を示し、高い比率でPriapismを生じた。組織中Biopterin,モノアミン量は、野生型に比べ著明に減少していた。Spr^{-/-}マウスの大動脈リング標本はalpha刺激薬に対する収縮反応が増強し、AChに対する弛緩反応は減弱していた。

研究成果の概要(英文)：We identified some candidate genes which are influenced by tetrahydrobiopterin (BH4) during early developmental stage after birth. Dihydrobiopterin (BH2) content in the plasma of Qdpr^{-/-} mice much increased. However, BH2/BH4 ratio in the aorta of Qdpr^{-/-} mice was only 1.6 times higher, for BH4 content in the aorta also increased. The aortic rings from Qdpr^{-/-} mice were relaxed by acetylcholine as much as those from wild type ones. Spr^{-/-} mice suffered from unstable hypertension and bradycardia, and male Spr^{-/-} mice showed serious priapism at high incidence. Biopterin- and monoamine-content were remarkably reduced in the tissue. Aortic ring of Spr^{-/-} mice was supersensitive to alpha1 agonist, and relaxation response to acetylcholine decreased.

研究分野：薬理学

キーワード：テトラヒドロピオプテリン ドパミン 一酸化窒素 高血圧 交感神経 持続勃起症

1. 研究開始当初の背景

テトラヒドロピオプテリン (BH4) は、フェニルアラニン水酸化酵素、チロシン水酸化酵素 (TH)、トリプトファン水酸化酵素 (TPH) および一酸化窒素合成酵素 (NOS) の活性に必須のコファクターである (図1)。TH、TPH によって生合成されるカテコラミン、セロトニン (5-HT) は中枢神経および自律神経系の重要な伝達物質であり、運動機能の調節、情動・思考・睡眠、内分泌、血圧・体温調節などに関わっていることから、BH4 とパーキンソン病、ジストニア、統合失調症、自閉症などの精神神経疾患との関連が注目される。他方血管内皮細胞では、BH4 は eNOS を安定化および電子供与体として一酸化窒素 (NO) を産生し平滑筋を弛緩させる。BH4 の不足状態や、BH4 に対し酸化型のジヒドロピオプテリン (BH2) が増加した状態では eNOS は O²-ラジカルを生成して血管弛緩反応を低下させ、高血圧症、動脈硬化症、糖尿病、高脂血症などともなう血管内皮の障害に関連する可能性が示唆されている。

我々の研究室では BH4 生合成酵素である 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase (PTS)、sepiapterin reductase (SPR) の遺伝子ノックアウトマウス (*Pts*^{-/-}, *Spr*^{-/-})、*Pts*^{-/-} (新生仔期に死亡) にドパミンβ-水酸化酵素 (DBH) プロモーターによってヒト PTS を発現させてレスキューした BH4 部分欠損マウス (*Pts*^{-/-}-DPS)、芳香族アミノ酸の水酸化反応に共役して産生されるキノイド型 BH2 を BH4 に再還元する quinonoid-dihydrobiopterin reductase (DHPR) の遺伝子ノックアウトマウス (*Qdpr*^{-/-}) を作成・導入し、BH4 とドパミン (DA) 神経系の機能発達、BH4 と血管病変およびその防御機構について研究してきた。これまでの研究でカテコラミン神経終末の TH のタンパク質量が BH4 の枯渇によって特異なパターンで減少し異常姿勢や協調運動の障害を示すことがわかったが、詳細なメカニズムや部位差が生じる機序については明らかでない。*Qdpr*^{-/-} マウスはマイルドな高フェニルアラニン血症をきたし、組織および血清中で BH4 に比べ BH2 の比率が上昇していた。一方 *Spr*^{-/-} マウスでは、組織中で高度な BH4 欠損を起こした。*Qdpr*^{-/-} および *Spr*^{-/-} では神経系での異常とともに循環器系の機能に異常が生じることが予測されるが、詳細な解析は行われていなかった。

2. 研究の目的

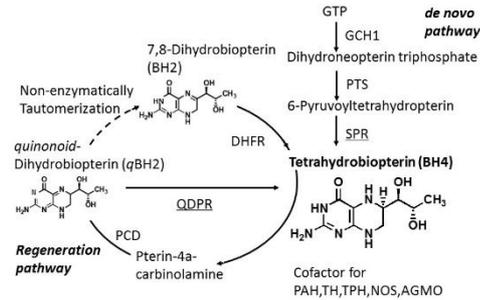
BH4 の生合成およびその再還元にかかわる複数の酵素の遺伝子改変マウスおよび培養細胞を用いて、

(1) DA 神経終末での BH4 による TH 制御のメカニズムを明らかにし、また BH4 と神経細胞死・慢性炎症との関連を調べる。

(2) BH4/BH2 比の不均衡が血管機能におよぼす影響と、その防御にかかわる分子を明

らかにする。

ことを目的とした。本研究は、神経・精神疾患 (ジストニア、パーキンソン病、統合失調症、自閉症) および循環器疾患 (血管内皮傷害、脳血管障害、酸化ストレス) の発生機序と防御にかかわる分子を明らかにすること



(図1) BH4の生合成及び再還元系

につながると期待される。

3. 研究の方法

(1) DA 神経終末での BH4 による TH 制御のメカニズム、BH4 と神経細胞死・慢性炎症

Spr^{-/-} マウスおよび野生型マウス各 1 匹に P7 から P13 まで BH4 50 mg/kg およびリン酸緩衝液 (Viechle) を 1 日 2 回皮下投与した。P14 に脳を採取し、RNA を抽出した。Affimetrix 社の Mouse 2.0 ST array を用いて発現に差のある分子をスクリーニングした。

野生型マウス 8 匹に P7 から P13 まで BH4 50 mg/kg、6 匹にリン酸緩衝液 (PBS, Viechle) を 1 日 2 回皮下投与した。P14 に脳を採取し、BH4 およびモノアミンの含量を HPLC-ECD 法で定量した。

同様の処置を行った野生型マウス各 4 匹について、3 ヶ月齢で Open field 試験と高架式十字迷路試験を行った。

(2) BH4/BH2 比の不均衡が血管機能におよぼす影響と生体内防御分子の探索

4-6 ヶ月齢の *Qdpr*^{-/-} マウス (C57BL6J/Jcl) とコントロールマウス各 6 匹につて Tail cuff 法で収縮期血圧 (SBP)、心拍数 (HR) を測定した。肝臓、大動脈、腎臓、脳、および血漿中の BH4、BH2、Biopterin をカラムで分離後、HPLC-Fluorescence 法で定量した。マウスの胸大動脈リング標本について、Acetylcholine (ACh) および Sodium nitroprusside (SNP) に対する血管弛緩反応を比較した。

4-6 ヶ月齢の *Spr*^{-/-} マウス (C57BL6J/Jcl X Balb/cAJcl) とコントロールマウス各 6 匹につて Tail cuff 法で血圧を測定した。脳・副腎・大動脈・心臓の Biopterin 量を HPLC-Fluorescence 法で、モノアミン量を HPLC-ECD 法で定量した。マウスの胸大動脈リング標本について、ACh および SNP に対する血管弛緩反応を比較した。心臓、大動脈、

Penis について組織学的解析を行った。

これらの研究は本学組み換え DNA 実験委員会と、動物実験委員会の審査ならびに認可をうけて行った。

4. 研究成果

(1) DA 神経終末での BH4 による TH 制御のメカニズム、BH4 と神経細胞死・慢性炎症

DNA array による発現解析で、生後発達期の BH4 によって発現が影響をうける候補分子が得られ、DA、5-HT 増加によるフィードバック調節が考えられた。

生後発達期の野生型マウスに BH4 を投与した実験では、BH4 投与群の脳の BH4 含量は 20.4 ± 1.2 pmol/mg protein で、PBS 投与群 (5.88 ± 0.11 pmol/mg protein) の 3.5 倍に増加しており ($p < 0.05$)、この時期には BH4 が脳内に入ることを確認した。BH4 投与群と PBS 群の脳内 DA 量はそれぞれ 8.55 ± 0.60 pmol/mg protein、 8.30 ± 0.45 pmol/mg protein、5-HT 量は 6.98 ± 0.28 pmol/mg protein、 6.23 ± 0.33 pmol/mg protein、DA 代謝物である DOPAC は 0.59 ± 0.03 pmol/mg protein、 0.56 ± 0.02 pmol/mg protein で、いずれも有意差はなかった。一方 5-HT 代謝物である 5-HIAA は BH4 投与群で 24.6 ± 0.9 pmol/mg protein、PBS 群 21.1 ± 0.9 pmol/mg protein で、BH4 投与群で有意に増加していた ($p < 0.05$)。ある程度 Mature な neuron では receptor、transporter、酵素などのフィードバック機構が働き伝達物質の量が調節をうけると思われる。5-HT 系では代謝物の増加から代謝回転が増加していることが考えられ、この時期には DA 系に比べて影響を受けやすいのではないかと思われる。

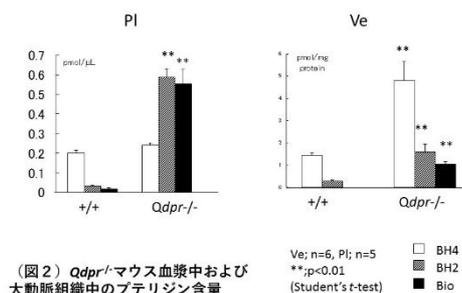
P7 から P13 まで BH4 を投与した野生型マウスと PBS を投与したマウスの 3 か月齢での Open field 試験 (10 min) では BH4 投与群と PBS 投与群の Total distance は、それぞれ 3732 ± 472.5 cm、 3739.5 ± 216.4 cm、Ambulatory time は 199.7 ± 14.4 s、 208 ± 10.6 s でいずれも有意差はなかった。高架式十字迷路 (10 min) では、BH4 投与群と PBS 投与群の Open arm 滞在時間は、それぞれ 188.5 ± 21.0 s、 162.3 ± 13.8 s、Closed arm への Total entry は 25.3 ± 1.9 times、 28 ± 3.3 times で有意差はなかった。

生後発達期に BH4 量の変化によって発現量が変化する分子の同定とそのメカニズム、伝達物質の変化、これらが成熟後の行動に影響を与えるか否かは重要な課題であり、今後の検討が必要である。

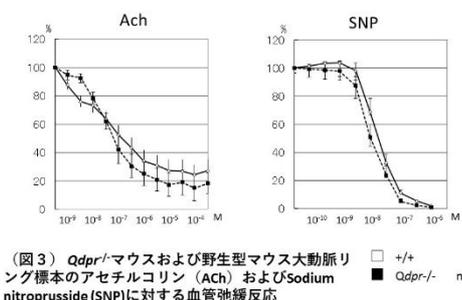
(2) BH4/BH2 比の不均衡が血管機能におよぼす影響と生体内防御分子の探索

Qdpr^{-/-}マウスの体重、SBP、HR は野生型と有意な差はなかった。*Qdpr*^{-/-}マウスの脳・肝

臓・大動脈の BH2 含量はいずれも野生型の 5.6-5.8 倍に有意に増加していた。*Qdpr*^{-/-}マウス脳の BH4 量は野生型と有意な差がなかったが、肝臓の BH4 量は野生型の 73.4%に減少していた。一方 *Qdpr*^{-/-}大動脈の BH4 量は野生型の 3.3 倍に増加していた。*Qdpr*^{-/-}マウスの血漿中の BH4 量は野生型と有意な差がなかったが、BH2 量は野生型の 18.4 倍に増加していた (図 2)。*Qdpr*^{-/-}マウスの大動脈リング標本の ACh、SNP に対する弛緩反応は、野生型マウスと有意な差がなかった (図 3)。これ



(図 2) *Qdpr*^{-/-}マウス血漿中および大動脈組織中のプテリジン含量

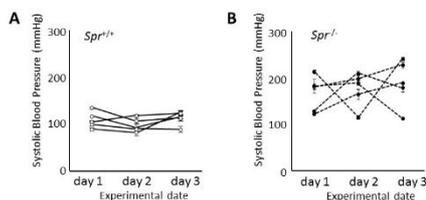


(図 3) *Qdpr*^{-/-}マウスおよび野生型マウス大動脈リング標本のアセチルコリン (ACh) および Sodium nitroprusside (SNP) に対する血管弛緩反応

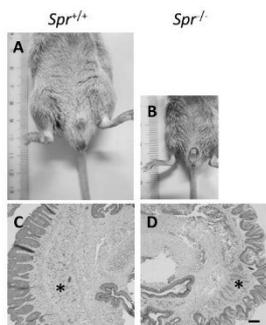
らの結果は、高 BH2 血症であるにもかかわらず大動脈組織中の BH2/BH4 比の増加が抑えられ、ACh に対する血管の弛緩反応も維持されることを示している。

4-6 か月齢での *Spr*^{-/-}マウスの平均体重は 10.6 ± 0.1 g で、野生型 litter mate の 43.0 ± 3.1 g に比較して有意に低体重であった ($p < 0.01$, $n=5-6$)。 *Spr*^{-/-}マウスは不安定な高血圧と徐脈を示した (図 4)。またの *Spr*^{-/-}マウスは 4 か月齢で 87%の比率で Priapism (持続勃起症)を生じた。組織像では Corpora cavernosa の充血が認められた (図 5)。大動脈も含め、組織中の Biopterin とモノアミンの量は、野生型に比べ著明に減少していた。*Spr*^{-/-}マウスの大動脈リング標本は $\alpha 1$ 刺激薬である phenylephrine に対する収縮反応が著明に増強し、一方 ACh に対する弛緩反応は減弱していた。大動脈と心臓の組織学的検索では、血管壁の肥厚や心室の肥大は明らかでなかった。*Spr*^{-/-}マウスの不安定な高血圧は、神経伝達物質であるモノアミンの減少に対する交感神経系の過剰な代償機構と、NO の合成障害による血管の弛緩反応の低下が原因で

あると推測された。この現象はパーキンソン



(図4) 3日間連続測定での*Spr*^{-/-}マウス収縮期血圧の変動



(図5) *Spr*^{-/-}マウスのPriapism (持続勃起症)

病、Multiple system atrophy、脊髄損傷などでみられる血圧の不安定性と共通である可能性がある。

今後 BH4 の異常と血管反応、末梢神経の代償機構、Priapism の詳細なメカニズムについて明らかにしていく予定である。

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)

Xu F, Sudo Y, Sanechika S, Yamashita J, Shimaguchi S, Honda S, Sumi-Ichinose C, Mori-Kojima M, Nakata R, Furuta T, Sakurai M, Sugimoto M, Soga T, Kondo K, Ichinose H. Disturbed bipterin and folate metabolism in the Qdpr-deficient mouse. FEBS Letters (2014) 588: 3924-3931. (査読有)

Onouchi T, Kobayashi K, Sakai K, Shimomura A, Smits R, Sumi-Ichinose C, Kurosumi M, Takao K, Nomura R, Iizuka-Kogo A, Suzuki H, Kondo K, Akiyama T, Miyakawa T, Fodde R, Senda T. Targeted deletion of the C-terminus of the mouse adenomatous polyposis coli tumor suppressor results in neurologic phenotypes related to schizophrenia. Mol Brain. (2014) 7(1):21-34. (査読有)

[学会発表](計 9 件)

Chiho Sumi-Ichinose, Yui Suganuma, Taiki Kano, Noriko Ihira, Kazuhisa Ikemoto, and Kazunao Kondo. Sepiapterin reductase knockout mice suffered from unstable hypertension and serious priapism.

第 89 回日本薬理学会年会 (2016 年 3 月 9 日 ~ 11 日、横浜)

池本和久、菅沼由唯、狩野泰輝、野村隆英、一瀬千穂、近藤一直、Hypoxia が血管内皮細胞における細胞内テトラヒドロピオプテリン量と細胞増殖に及ぼす影響

第 29 回日本プテリジン研究会 (2015 年 11 月 21 日、多摩)

一瀬 鷲見千穂、菅沼由唯、狩野泰輝、井平典子、池本和久、一瀬 宏、近藤一直、キノイド型ジヒドロピオプテリン還元酵素遺伝子ノックアウトマウス大動脈リング標本の血管弛緩反応

第 29 回日本プテリジン研究会 (2015 年 11 月 21 日、多摩)

Kazuhisa Ikemoto, Yui Suganuma, Taiki Kano, Chiho Sumi-Ichinose, Takahide Nomura, and Kazunao Kondo. The effect of hypoxia on reactive oxygen species levels and the cell proliferation in human umbilical vein endothelial cells.

第 88 回日本薬理学会年会 (2015 年 3 月 18 日 ~ 20 日、名古屋)

一瀬 (鷲見) 千穂、菅沼由唯、狩野泰輝、井平典子、池本和久、野村隆英、近藤一直、血管にはジヒドロピオプテリン負荷に対する防御機構が存在する

第 88 回日本薬理学会年会 (2015 年 3 月 18 日 ~ 20 日、名古屋)

菅沼由唯、狩野泰輝、池本和久、一瀬千穂、野村隆英、近藤一直、テトラヒドロピオプテリンによるマウス全血血小板凝集抑制効果と NO 非依存性メカニズムの検討

第 87 回日本薬理学会年会 (2014 年 3 月 19 日 ~ 21 日、仙台)

菅沼由唯、狩野泰輝、池本和久、一瀬千穂、野村隆英、近藤一直、マウス血小板凝集に対するテトラヒドロピオプテリンの作用

第 27 回日本プテリジン研究会 (2013 年 11 月 30 日、東京)

一瀬 (鷲見) 千穂、菅沼由唯、狩野泰輝、池本和久、井平典子、野村隆英、近藤一直、ジストニアモデルマウスのモノアミン神経系の生後発達

藤田保健衛生大学戦略的研究基盤形成支援事業 (精神・神経・筋疾患) 研究成果公開シンポジウム (2013 年 10 月 5 日、豊明)

菅沼由唯、狩野泰輝、池本和久、一瀬千穂、野村隆英、近藤一直、テトラヒドロピオプテリンの抗血小板作用における NO の関与
第 123 回日本薬理学会近畿部会(2013 年 7 月 12 日、名古屋)

〔図書〕(計 1 件)

Ichinose H, Homma D, Sumi-Ichinose C, Nomura T, Kondo K. GTP Cyclohydrolase Regulation: Implications for Brain Development and Function. Lee E. Eiden (Ed) Advances in Pharmacology 68 : A New Era of Catecholamines in the Laboratory and Clinic. (2013) Academic Press. pp23-35.
(査読有)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

一瀬 千穂 (Chiho Sumi-Ichinose)
藤田保健衛生大学・医学部・准教授
研究者番号：10247653

(3)連携研究者

近藤 一直 (Kazunao Kondo)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：90270983

一瀬 宏 (Hiroshi Ichinose)
東京工業大学大学院・生命理工学研究科・教授
研究者番号：90192492

(4)研究協力者

井平 典子 (Noriko Ihira)
藤田保健衛生大学・医学部・研究補助員