

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591201  
 研究課題名（和文）アルギニン代謝関連分子（NO、ADMA）による生体機能修飾についての統合的研究  
 研究課題名（英文）Integrative study on the biological response modifications by arginine-related molecules including NO and ADMA  
 研究代表者  
 塚原 宏一（TSUKAHARA HIROKAZU）  
 福井大学・医学部附属病院・講師  
 研究者番号：90207340

研究成果の概要：生体には L-arginine/NO synthase/NO 系と protein-arginine methyltransferase (PRMT)/ADMA/dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) 系が並立し、相互作用しながら血管機能・酸化還元環境を制御することを、様々な小児患者を対象に複数のバイオマーカーを計測することで示した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：成育医学

## 1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素 (NO) は血管内皮由来弛緩因子の本体として脚光を浴びている gaseous mediator である。NO はおもに NO 合成酵素 (NOS) により  $O_2$  と L-arginine から生成させる。生体には少なくとも 3 種類の NOS が存在する。内皮型酵素 (eNOS) は血管内皮細胞に分布する。緊密な制御のもと eNOS により生成される NO は血流保持、白血球接着抑制、血小板凝集抑制、活性酸素消去、細胞増殖制御などの働きにより組織保護的に作用する。神経型酵素 (nNOS) は神経線維に分布し、神経伝達や可塑性に関与する。誘導型酵素 (iNOS) は生理的状況ではあまり発現していないが、炎症時には内皮細胞、上皮細胞、平滑筋細胞、浸潤白血球など多くの細胞に発現する。NO は生命維持のための必須分子である。し

かし、iNOS が過剰に誘導された場合には活性酸素 ( $O_2^-$  など) と反応して組織障害性の強い窒素酸化物 (ONOO<sup>-</sup> など) を形成し、組織・臓器に対する酸化ストレス負荷を亢進させる。近年、慢性心臓血管疾患 (動脈硬化、高血圧など)、慢性腎臓疾患 (慢性腎炎、腎不全など)、糖・脂質代謝異常症 (糖尿病、metabolic syndrome など) が血管内皮機能不全と酸化ストレス亢進を共通項にする慢性炎症疾患群として認識されるようになった。この場合、iNOS の誘導というよりも eNOS の減弱に伴う活性酸素の過剰生成 (“eNOS uncoupling” と呼ばれる) がより基本的な病態であり、eNOS 機能の保持や増強がこれらの疾患とその合併症の抑止に効果的であると考えられる (塚原宏一・日本小児アレルギー学会誌 2002; 日本小児科学会雑誌 2004)。

## 2. 研究の目的

急性・慢性の炎症性病態における酸化ストレス増強の要因として活性酸素以外に、最近ではNOとはまた別のL-arginine代謝物 - asymmetric dimethylarginine (ADMA) によるNOS抑制、酸化ストレス増強、血管収縮作用が注目されている。ADMAは組織構成蛋白中のL-arginineがprotein-arginine methyltransferase (PRMT) によるメチル化、その後の加水分解を受けて生成され、腎臓からそのまま排泄されるか、組織中のdimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) の働きを受けて分解される。

換言すれば、生体にはL-arginine / NOS / NO系とPRMT / ADMA / DDAH系の2つのシステムが存在し、相互に作用しながら血管機能を調節すると想定される。前述の血管内皮機能不全と酸化ストレス負荷を特徴とする慢性疾患を有する成人患者では血液中のADMA濃度が増加すること、それが病状の進展に関与することが報告されている。

## 3. 研究の方法

健常対照の小児、慢性心臓血管疾患、慢性腎臓疾患、糖・脂質代謝異常症の小児患者を対象に安定NO代謝物(nitrite/nitrate)、ADMAなどのmediatorsを同時に計測し、両システムが並立することの生理学的・病態学的意義を明らかにする。酸化ストレス環境、薬物療法との関連性についても評価する。

早産～正期産で出生した児の臍帯血、母乳中のnitrite/nitrate、ADMAなどの計測を行い、ヒトの成育過程における両システムの生理学的意義について検討する。

## 4. 研究成果

おもな研究成果を以下に示す。生体マーカーとして血中・尿中NO代謝物(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)、血中ADMA、血中TBARS、酸化型LDL、尿中acrolein-lysine、8-OHdGなどの酸化ストレスマーカーを計測した。結果は平均値で表した。

(1) 対象は胎児・新生児(臍帯静脈)、小児、成人である。各群で血中ADMAは1.71、0.71、0.52 μmol/L、血中NOは23.3、43.4、40.8 μmol/L、ADMA/NO比は0.085、0.020、0.019であった。血中ADMA(またはADMA/NO比)は胎児・新生児で最も高く、小児、成人に向かうにつれて低くなった。未熟な血管系の緊張維持にADMA系が主体的に作動する可能性が示唆された(Metabolism 2008)。

(2) 肝障害を伴わない先天性肝内門脈-静脈

シャントの患者では対照と比べて、血中ADMA(0.82対0.63 μmol/L)、ADMA/NO比(0.052対0.023)、ET-1(3.0対1.9 pg/mL)が高く、NO(22対30 μmol/L)が低く、血中TBARS(5.0対3.9 mmol/L)、尿中acrolein-lysine(331対255 nmol/mg Cr)、8-OHdG(26対19 ng/mg Cr)が高かった。シャント率は血中ADMA、ADMA/NO比と正の相関を示した。肝硬変などの後天性シャントと違い、今回の患者は肝障害をほとんど呈していない。よって、シャント自体がNO-ADMA系でのADMA優位、酸化ストレス亢進、血管内皮機能不全をもたらすこと、肝臓がレドックス制御の重要臓器であることが示唆された(Metabolism 2009)。

(3) 先天性尿素サイクル異常(OTC、ASS、ASLの各異常)を有している患者(アルギニン補充を受けてその血中濃度は基準値の約2倍に達している)では対照と比べて、OTC異常では血中NOがアルギニンに正相関して高く(67対39 μmol/L)、ASS異常では血中NOがアルギニンに負相関して低く(22対39 μmol/L)、ASS、ASL異常では血中ADMAがシトルリンに正相関して高かった(それぞれ1.42、1.13対0.51 μmol/L)。特にASS異常ではADMA/NO比が高かった(0.061対0.019)。ASSはシトルリン→アルギニンの律速酵素であるが、その異常ではアルギニン補充下でもADMA/NO比が高く、血管内皮機能不全が存在することが示唆された(Metabolism 2009)。

(4) 別の尿素サイクル異常であるシトルリン欠損症を有している患者(乳児期に“肝内胆汁うっ滞性新生児肝炎”を起こした後、現在は軽度の高シトルリン血症を呈するのみで見かけ上健常である)では対照と比べて、血中NO、ADMAに差はないが、血中コレステロール(213対169 mg/dL)、酸化型LDL(82対25 U/L)、SOD(1.49対1.06 U/mg protein in RBC)、catalase(3.60対2.96 pmol/mg protein in RBC)、尿中acrolein-lysine(481対272 nmol/mg Cr)、8-OHdG(67対19 ng/mg Cr)が高かった。シトルリン欠損症患者の約1/10は成人期に、重篤な肝障害(脂肪肝、線維化)・精神神経障害(てんかん、意識障害、統合失調症、うつ病)を発症する。乳児期以降のsilent phaseでも脂肪代謝障害、酸化ストレス亢進が存在することが示されたが、それが成人期の再発症の機序と関連すると思われた(Mol Genet Metab 2009)。

(5) 血球貪食性リンパ組織球増殖症のトルコ人男児(3歳)において、HO-1の活性中心でのホモ型ミスセンス変異(Gly139Val)、各種の血管内皮障害マーカー、酸化ストレスマーカー(尿中acrolein-lysine、8-OHdG、

pentosidine、NO) の高値、腎臓・骨代謝障害 (尿中 albumin、NAG、pyridinoline、deoxy pyridinoline の高値) が見出された。興味あることに尿中バイオピリンも高かった (8.0 対 1.7 U/g Cr 対照)。健常な両親、兄では以上のうち尿中 acrolein-lysine のみが高かった。本例は世界で 2 例目の HO-1 異常の患者である。ヘム-ビリルビン代謝障害に伴う酸化ストレス亢進、血管内皮機能不全が本患者の病態形成に寄与していると推察された

(American Society of Hematology Meeting 2007 で発表、論文は準備中)。

(6) 先天性尿路異常症患者で尿中酸化ストレスマーカーを計測したところ、対照に比べて機能的に単腎かそれに近い状態 (多嚢腎など) で尿中 acrolein-lysine が高かった。尿中 8-OHdG、NO では差がなかった。これらの疾患群での酸化ストレス (脂質過酸化) 亢進が示された (American Society of Nephrology Meeting 2007 で発表、日本小児腎臓病学会雑誌 2007)。

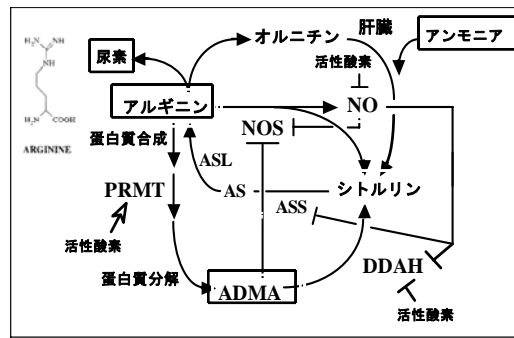
(7) 酸化ストレスマーカーの臨床応用: 2008 年 3 月の小児医学川野賞受賞の記念講演 (埼玉)、4 月の日本感染症学会での特別講演 (島根) などで、尿を用いた酸化ストレスマーカー・セット検査の現況と今後の展開を述べた。このことが契機になり、他施設との共同研究が進んでいる。腎性低尿酸血症 (腎臓の尿酸トランスポーターに異常があり、非ミオグロビン性運動後急性腎不全をきたす)、他のアミノ酸代謝異常症 (フェニルケトン尿症など) などである。

以上はすべて過去に報告のない知見である。

### 研究成果の総括と今後の展開:

NO-ADMA 系は帰還回路を巡らせながら血管機能を制御する。一方、アルギニンを中心とする尿素サイクルは肝臓が主体的であるが、それは不完全ながら多くの臓器・組織に分布し機能する。腎臓、血管内皮ではシトルリン→アルギニン→NO の経路が重要である。尿素サイクルはミトコンドリアでは好氣的解糖、酸化的リン酸化、細胞質では嫌氣的解糖、糖新生と緊密に連関する。

研究成果 (2)~(4) により、肝臓機能が正常に機能しない状況では NO-ADMA 系での ADMA 優位あるいは酸化ストレス亢進がもたらされることが示された。肝-腎-血管-肺-脳などの多臓器連関の重要性が科学的データに基づいて再確認された。



本発表者は、NO-ADMA 系や酸化ストレスの生体マーカーは単に病態生理や治療介入の評価の指標としてではなく、疾患分類の再構築や特殊疾患の鑑別、重篤な先天異常疾患に対する新規の効果的予防・治療の開発にも有用と考えている。ここ数年発表した一連の論文が橋渡しになって、現在、国内外の多くの研究者と共同研究を進めている。今後も継続して、多種多様な先天代謝異常症の解析を行う予定である。

### 謝辞:

本研究は、福井大学医学部小児科の大嶋勇成先生、眞弓光文先生、同看護学科の重松陽介先生、同産婦人科の西島浩二先生、高橋 仁先生、小辻文和先生、大阪市立大学医学部小児科の岡野善行先生、千葉県こども病院小児科の長坂博範先生、鹿児島大学医学部医化学講座の小林圭子先生、防衛医科大学校分子生体制御学講座の松尾洋孝先生、四ノ宮成祥先生、ドイツハイデルベルグ大学医学部小児科の Johann Greil 先生、米国ニューヨーク州立大学化学科の Takanobu Ishida 先生のご指導・ご協力を得て進められた。各先生に深謝いたします。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 28 件)

#### <英文>

(1) Takatani T, Nagasaka H, Sugamoto K, Aizawa M, Miida T, Yorifuji T, Tajima G, Sakura N, Murayama K, Sanayama T, Okano Y, Mayumi M, Kobayashi K, Hirano K, Takayanagi M, **Tsukahara H**. Nitric oxide metabolism in asymptomatic preschool children with congenital anomalous portal veins presenting porto-systemic venous shunt flow. *Metabolism* 2009 (in press). **査読有り**

(2) Nagasaka H, Yorifuji T, Momoi T, Yorifuji J, Hirano K, Ota A, Takatani T, **Tsukahara H**, Takayanagi M, Kobayashi K, Chiba H, Sato Y, Miida T. Lipoprotein

profiles in children with two common cholesteryl ester transfer protein gene mutations, D442G and I14A, during the first year of life. *Clin Chim Acta* 2009 (in press). 査読有り

(3) Nagasaka H, Okano Y, Tsukahara H, Shigematsu Y, Momoi T, Yorifuji J, Miida T, Ohura T, Kobayashi K, Saheki T, Hirano K, Takayanagi M, Yorifuji T. Sustaining hypercitrullinemia, hypercholesterolemia and augmented oxidative stress in Japanese children with aspartate/glutamate carrier isoform 2-citrin- deficiency even during the silent period. *Mol Genet Metab* 97 (1): 21-26, 2009 (May). 査読有り

(4) Nagasaka H, Tsukahara H, Yorifuji T, Miida T, Murayama K, Tsuruoka T, Takatani T, Kanazawa M, Kobayashi K, Okano Y, Takayanagi M. Evaluation of endogenous nitric oxide synthesis in congenital urea cycle enzyme defects. *Metabolism* 58 (3): 278-282, 2009 (Mar). 査読有り

(5) Nagasaka H, Yorifuji T, Hirano K, Ota A, Toyama-Nakagawa Y, Takatani T, Tsukahara H, Kobayashi K, Takayanagi M, Inomata Y, Uemoto S, Miida T. Effects of bezafibrate on dyslipidemia with cholestasis in children with familial intrahepatic cholestasis-1 deficiency manifesting progressive familial intrahepatic cholestasis. *Metabolism* 58 (1): 48-54, 2009 (Jan). 査読有り

(6) Nagasaka H, Yorifuji T, Hirano K, Ota A, Toyama-Nakagawa Y, Takatani T, Tsukahara H, Kobayashi K, Takayanagi M, Inomata Y, Uemoto S, Miida T. Effects of bezafibrate on dyslipidemia with cholestasis in children with familial intrahepatic cholestasis-1 deficiency manifesting progressive familial intrahepatic cholestasis. *Metabolism* 58 (1): 48-54, 2009 (Jan). 査読有り

(7) Tsukahara H, Ohta N, Tokuriki S, Tamura S, Toyo-oka M, Nishijima K, Orisaka M, Kotsuji F, Ohta N, Kawakami H, Sekine K, Nagasaka H, Mayumi M. Clinical significance of the balance between the L-arginine/NOS/NO pathway and the PRMT/ADMA/DDAH pathway. *J Dev Nephrol* 16 (1): 21-28, 2008 (Jul). 査読無し

(8) Nagasaka H, Miida T, Hirano K, Ota A, Murayama K, Yorifuji T, Kobayashi K, Takatani T, Tsukahara H, Hui SP, Takayanagi

M, Chiba H. Fluctuation of lipoprotein metabolism linked with bile acid-activated liver nuclear receptors in Alagille syndrome. *Atherosclerosis* 198 (2): 434-440, 2008 (Jun). 査読有り

(9) Nagasaka H, Miida T, Hirano K, Ota A, Yorifuji T, Takatani T, Tsukahara H, Takayanagi M, Hui SP, Kobayashi K, Chiba H. Reduced apolipoprotein E-rich high-density lipoprotein level at birth is restored to the normal range in patients with familial hypercholesterolemia in the first year of life. *J Clin Endocrinol Metab* 93 (3): 779-783, 2008 (Mar). 査読有り

(10) Tsukahara H, Ohta N, Tokuriki S, Nishijima K, Kotsuji F, Kawakami H, Ohta N, Sekine K, Nagasaka H, Mayumi M. Determination of asymmetric dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in umbilical blood. *Metabolism* 57 (2): 215-220, 2008 (Feb). 査読有り

(11) Kobata R, Tsukahara H, Ohshima Y, Ohta N, Tokuriki S, Tamura S, Mayumi M. High levels of growth factors in human breast milk. *Early Hum Dev* 84 (1): 67-69, 2008 (Jan). 査読有り

(12) Tokuriki S, Ohshima Y, Yamada A, Ohta N, Tsukahara H, Mayumi M. Leukotriene D4 enhances the function of endothelin-1-primed fibroblasts. *Clin Immunol* 125 (1): 88-94, 2007 (Oct). 査読有り

(13) Nagasaka H, Chiba H, Hui SP, Takikawa H, Miida T, Takayanagi M, Yorifuji T, Hasegawa M, Ota A, Hirano K, Kikuchi H, Tsukahara H, Kobayashi K. Depletion of high-density lipoprotein and appearance of triglyceride-rich low-density lipoprotein in a Japanese patient with FIC1 deficiency manifesting benign recurrent intrahepatic cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 45 (1): 96-105, 2007 (Jul). 査読有り

(14) Tsukahara H. Biomarkers for oxidative stress: Clinical application in pediatric medicine. *Curr Med Chem* 14 (3): 339-351, 2007 (Mar). 査読有り

(15) Matsubara K, Kawai M, Nakahata T, Kato F, Tsukahara H, Yamakawa M, Hashimoto K, Shimada S, Maeda S, Okumura M, Kanaoka H. Procedures for prevention of perinatal group B streptococcal diseases: A multicenter questionnaire survey of

hospitals in the Kyoto Neonatal Disease Study Group, Japan. *J Infect Chemother* 13 (1): 59-62, 2007 (Feb). 査読有り  
(16) Tsukahara H, Mayumi M. Lowest effective dose of dexamethasone in the respiratory care of very preterm infants. *Early Hum Dev* 83 (1): 3, 2007 (Jan). 査読有り

#### <和文>

(1) 徳力周子, 巨田尚子, 古畑律代, 田村知史, 川谷正男, 畑 郁江, 塚原宏一, 眞弓光文. 超早産児のナトリウム補充に関する検討: 晩期循環不全発症予防における電解質管理の重要性. 発達腎研究会誌 2009 (in press). 査読無し  
(2) 徳力周子, 塚原宏一, 巨田尚子, 田村知史, 小倉一将, 川谷正男, 畑 郁江, 眞弓光文. 早産児の慢性肺疾患における酸化ストレスの病態学的意義についての検討: CO-Hb と Met-Hb を指標として. *小児科臨床* 62 (5): 925-930, 2009 (May). 査読有り  
(3) 塚原宏一, 巨田尚子, 徳力周子, 森夕起子. 知っておきたい泌尿器科の知識 (その 1) - 2. 周産期における腎機能の発達. *小児外科* 41 (2): 98-103, 2009 (Feb). 査読無し  
(4) 巨田尚子, 田村知史, 徳力周子, 小倉一将, 畑 郁江, 塚原宏一, 鈴木千代, 西島浩二, 折坂 誠, 小辻文和, 眞弓光文. 動脈管早期閉鎖により新生児遷延性肺高血圧症をきたした 1 例. *小児科臨床* 61 (8): 1685-1689, 2008 (Aug). 査読有り  
(5) 徳力周子, 塚原宏一, 古畑律代, 巨田尚子, 田村知史, 鈴木孝二, 畑 郁江, 眞弓光文. 超早産児での晩期循環不全発症予防におけるナトリウム補充の重要性. *小児科臨床* 61 (8): 1679-1684, 2008 (Aug). 査読有り  
(6) 野入英世, 伊西洋二, 塚原宏一, 菅谷健. 座談会: AKI の早期診断・早期治療へ向けて. *内科* 102 (1): 115-124, 2008 (Jul). 査読無し  
(7) 塚原宏一. 新生児の循環の適応生理: 新生児の心臓血管ホルモンの適応生理. *Neonatal Care* 21 (5): 437-444, 2008 (May). 査読無し  
(8) 塚原宏一. 慢性腎臓病の予防に向けた腎機能検査: 小児医療における腎機能評価. *臨床化学* 37 (1): 35-44, 2008 (Jan). 査読無し  
(9) 塚原宏一, 平岡政弘, 森夕起子, 巨田尚子, 徳力周子, 川谷正男, 長坂博範, 川上寿子, 関根恭一, 眞弓光文. 先天性腎尿路異常症患者における酸化ストレス環境の評価: 当院の年齢別基準値に基づいて. *小児腎臓病学*

会雑誌 20 (2): 131-135, 2007 (Nov). 査読有り

(10) 塚原宏一. 酸化ストレスとレドックス制御. *総合臨床* 56 (10): 2915-2918, 2007 (Oct). 査読無し  
(11) 塚原宏一, 小倉一将, 古畑律代, 田村知史, 眞弓光文, 西島浩二, 宿南憲一, 小辻文和, 上野正樹. エリスロポイエチン高値の生体応答学的意義について. 発達腎研究会誌 15 (1): 25-33, 2007 (Jul). 査読無し  
(12) 塚原宏一. 慢性腎臓病 - CKD キャンペーンをめぐる話題. 国内外の CKD に対するエビデンス: 小児 CKD. *内科* 100 (1): 79-83, 2007 (Jul). 査読無し

#### [学会発表] (計 9 件)

(1) 塚原宏一. 先天性腎尿路異常症患者における酸化ストレス環境の評価. 第 55 回日本臨床検査医学会学術集会, 2008 年(11 月), 名古屋.  
(2) 長坂博範, 塚原宏一, 依藤 亨, 岡野善行, 村山 圭, 高柳正樹. 尿素サイクル異常症と NO 産生. 第 50 回日本先天代謝異常学会, 2008 年 (11 月), 米子.  
(3) 塚原宏一, 森夕起子, 眞弓光文. 酸化ストレスマーカーの臨床応用. 第 16 回中部小児腎臓病研究会, 2008 年 (10 月), 松本.  
(4) Greil J, Verga-Falzacappa M, Tsukahara H, Behnisch W, Heimpel H, Schneider M, Janka G, Claus M, Muckenthaler M, Kulozik AE. Activating mutation of heme oxygenase (HO)-1: A novel disease entity characterized by microcytic, hemolytic anemia, a defect of bilirubin synthesis and hereditary hemophagocytic lymphohistiocytosis. 49th Annual Meeting of American Society of Hematology, 2007 年 (12 月), Georgia, USA.  
(5) 長坂博範, 塚原宏一, 村山 圭, 高柳正樹. Congenital porto-systemic venous shunt の病的意義. 第 49 回日本先天代謝異常学会, 2007 年 (11 月), 山形.  
(6) 塚原宏一, 眞弓光文. TNF-alpha によるヒト肺微小血管内皮細胞での接着分子・ケモカイン発現過剰に対するレドックス制御の抗炎症性効果. 第 39 回日本小児感染症学会総会・学術集会, 2007 年 (11 月), 横浜  
(7) Tsukahara H, Hiraoka M, Mori Y, Tamura S, Kawakami H, Sekine K, Mayumi M. Oxidative stress status in children with congenital renal anomalies. 40th Annual Meeting of American Society of Nephrology, 2007 年 (11 月), San Francisco,

USA.

(8) **塚原宏一**, 巨田尚子, 田村知史, 眞弓光文, 西島浩二, 折坂 誠, 小辻文和, 長坂博範, 川上寿子, 太田徳仁, 関根恭一. ヒトにおける L-arginine/NOS/NO 系と PRMT/ADMA/DDAH 系のバランスの生理学的意義について. 第 16 回発達腎研究会, 2007 年 (8 月), 東京.

(9) **塚原宏一**, 平岡政弘, 森夕起子, 眞弓光文, 川上寿子, 関根恭一. 先天性腎尿路異常症患者における酸化ストレス環境の評価: 当院の正常参考値に基づいて. 第 42 回日本小児腎臓病学会学術集会, 2007 年 (6 月), 横浜.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塚原 宏一 (TSUKAHARA HIROKAZU)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 90207340

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし