

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590250

研究課題名（和文） 神経および循環器疾患に対するプテリン代謝制御療法の開発

研究課題名（英文） Development of tetrahydrobiopterin-based therapy for neurological and cardiovascular disease

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

研究成果の概要（和文）：Pts<sup>-/-</sup>DPS マウス脳のピオプテリン量は、野生型に比べて低値だった。野生型マウス脳のドーパミン量が生後経時的に増加するのに対し、Pts<sup>-/-</sup>DPS マウス脳ではドーパミンの増加がみられなかった。Pts<sup>-/-</sup>DPS マウス脳のセロトニン含量は P7 までに急激に減少した。野生型マウス脳のチロシン水酸化酵素タンパク質量は生後経時的に増加したが、Pts<sup>-/-</sup>DPS 脳では増加がみられなかった。Pts<sup>-/-</sup>DPS マウスの脳内フェニルアラニン量は P0 から P7 の間に急激に増加した。

研究成果の概要（英文）：Biopterin content in the brains of Pts<sup>-/-</sup>DPS mice was fewer than that of wild type mice. The amount of dopamine in the brains of wild type mice increased according to the date after birth, however, that of Pts<sup>-/-</sup>DPS mice did not. Serotonin content in the brains of Pts<sup>-/-</sup> mice decreased by P7. The amount of tyrosine hydroxylase protein in the brains of wild type mice increased according to the date after birth. On the contrary, that in the Pts<sup>-/-</sup>DPS brains did not. Phenylalanine content in the brains of Pts<sup>-/-</sup>DPS mice dramatically increased between P0 and P7.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,010,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：生理活性物質・テトラヒドロピオプテリン

## 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) の補酵素であり、また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。TH、TPH によって生合成されるモノアミンは中枢神経系の重要な神経伝達物質であり、

運動機能、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 関連酵素の遺伝的変異によって、悪性高フェニルアラニン血症、ドーパ反応性ジストニア (DYT5、瀬川病) といった難病が起きる。他方血管においては、内皮細胞の BH4 が eNOS のコファクターとして一酸化窒素 (NO) を産生し、平滑筋を弛緩させる。BH4 の不足状態

ではeNOSはO<sub>2</sub>-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る血管障害をおこす可能性が指摘されている。

我々の研究室では、BH<sub>4</sub>生合成の第2段階を触媒する6-ビルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素(PTS)の遺伝子ノックアウトマウス(Pts<sup>-/-</sup>)、このマウスにドパミンβ-水酸化酵素プロモーターによってヒトPTSを発現させたBH<sub>4</sub>部分欠損マウス(Pts<sup>-/-</sup>DPS)、およびquinonoid-BH<sub>2</sub>からBH<sub>4</sub>への再還元をおこなうジヒドロプテリジン還元酵素(DHPR)の遺伝子ノックアウトマウス(Dhpr<sup>-/-</sup>)を作成した。PTS<sup>-/-</sup>マウス関連の研究から、カテコラミン神経終末のTHのタンパク質量がBH<sub>4</sub>によって制御されることがわかったが、詳細なメカニズムや部位差の生じる機序は明らかにされていない。Dhpr<sup>-/-</sup>マウスはマイルドな高フェニルアラニン血症をきたし、BH<sub>4</sub>に比べBH<sub>2</sub>の比率が上昇していることが特徴で、BH<sub>4</sub>代謝の不均衡と神経および循環器疾患との関連を明らかにすることが期待できる。さらにBH<sub>4</sub>欠損マウスとして、BH<sub>4</sub>生合成の第3段階を触媒するセピアプテリンレダクターゼ(SPR)の遺伝子ノックアウトマウス(Spr<sup>-/-</sup>)を導入した。

## 2. 研究の目的

BH<sub>4</sub>生合成酵素・再還元酵素の遺伝子改変マウス個体と培養細胞系を用いて、神経・精神疾患(ジストニア、パーキンソン病、自閉症)と循環器疾患(血管内皮傷害、酸化ストレス)の発生機序を明らかにし、プテリン代謝の制御による治療法・予防法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) BH<sub>4</sub>欠乏マウスの黒質—線条体系の発達・加齢とジストニア、およびドパミン(DA)神経終末でのBH<sub>4</sub>によるTH制御のメカニズムについての研究

P(Postnatal)0, P7, P14, P28 歳の野生型およびPts<sup>-/-</sup>DPSマウスの脳ホモジネートを調製した(n=3)。タンパク質濃度はBradford法で定量した。バイオプテリン量はFukushima & Nixonの方法を用いて高速液体クロマトグラフィー(HPLC)-蛍光検出器でおこない、モノアミンはHPLC-電気化学検出器を使用しておこなった。アミノ酸はHitach L-8500アミノ酸分析器で定量した。抗TH抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、抗β-actin抗体で標準化して、生後発達に伴う変化を調べた。

(2) BH<sub>4</sub>欠乏マウスの血管機能、および高血糖・高脂血症等の病態下のBH<sub>4</sub>欠乏マウス

での血管病変の進行に関する研究

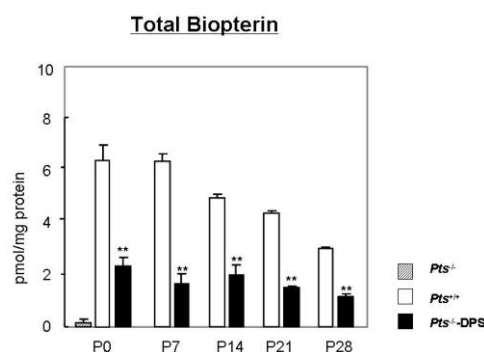
5-8週齢♂の野生型およびDhpr<sup>-/-</sup>マウスに通常飼料または1.25%コレステロール負荷飼料を与え14週間飼育した(n=3~4)。ネンブタール麻酔下に胸部大動脈を摘出し、2mm長のリング標本を作製してDMT610Mでアセチルコリン依存性の血管弛緩反応とL-NAME存在下でのSodium Nitroprussideによる血管張力を測定した。プレ収縮にはフェニレフリンを使用した。血清、脳、肝臓と残余の血管について、ポストカラム法でBH<sub>4</sub>、BH<sub>2</sub>量を測定した。血清コレステロールはabcam社のキットを使用して定量した。

本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) BH<sub>4</sub>欠乏マウスの黒質—線条体系の発達・加齢とジストニア、およびドパミン神経終末でのBH<sub>4</sub>によるTH制御のメカニズムについての研究

P0での野生型マウス脳のバイオプテリン含量は6.4±0.6 pmol/mg proteinで経時的に減少した。P0でのPts<sup>-/-</sup>DPSマウス脳のバイオプ



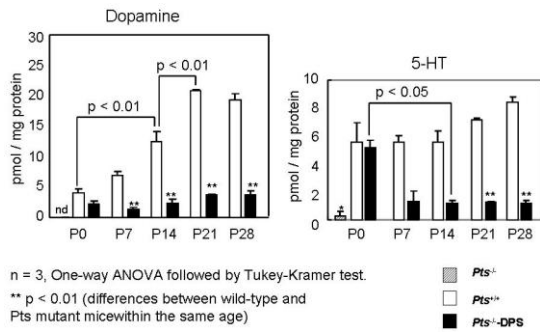
n = 3, One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test.

\*\* p < 0.01 (wild-type vs Pts<sup>-/-</sup>DPS mice)

テリン量は野生型の36%で、以後も増加せずP28では野生型の38%となった(図1)。

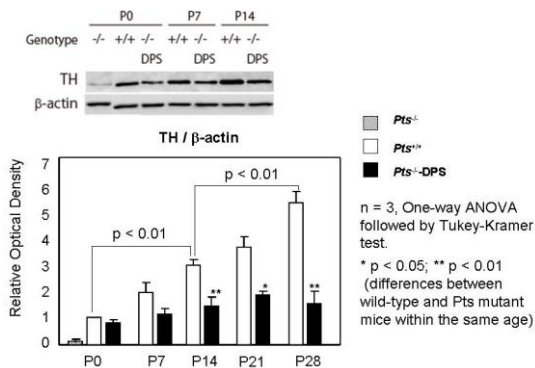
(図1) 脳内バイオプテリン量の生後変化

P0での野生型マウス脳のDA含量は4.1±0.7 pmol/mg proteinで、生後経時的に増加した。P0でのPts<sup>-/-</sup>DPS脳のDA含量は野生型の53%だったが、その後も増加せず、P28では野生型の19%となった。P0での野生型マウス脳のセロトニン(5-HT)含量は5.6±1.4 pmol/mg proteinで、その後有意な変化はなかった。P0でのPts<sup>-/-</sup>DPS脳のセロトニン含量は野生型と有意な差がなかったが、P7までに急激に減少し、P28では野生型の14%になった。(図2)



(図2) 脳内モノアミン量の生後変化

野生型マウス脳の TH タンパク質量は生後経時的に増加した。P0 での *Pts*<sup>-/-</sup>DPS 脳の TH タンパク質量は野生型の 78%だったが、その後増加せず、P28 の時点では野生型の 29%となった (図3)。*Pts*<sup>-/-</sup>DPS マウスの脳内フェニルアラニン量は P0 から P7 の間に急激に増加し、野生型の 26 倍 (26.7 ± 3.4 nmol/mg protein) に達した。*Pts*<sup>-/-</sup>DPS マウスでは TH タンパク質量が生後の発達にもなって増加しないことがわかった。脳内 DA および 5-HT は、TH タンパク質の減少、コファクターとしての BH4 の不足、生後の高フェニルアラニン血症によって脳内へのチロシン・トリプトファン<sup>\*</sup>の輸送が阻害されること、高濃度のフェニルアラニンによって TH・TPH の活性が阻害されることにより、低下すると推測された。



(図3) 脳内 TH タンパク質量の生後変化

これらの結果を *Spr*<sup>-/-</sup>マウスの生後発達と比較したところ、*Spr*<sup>-/-</sup>マウスでも脳の BH4 量は P0 では野生型の 26.1%で以後も増加しないこと、生後の DA、5-HT、TH の増加がみられないこと、尾懸垂時に異常姿勢が見られることが *Pts*<sup>-/-</sup>DPS マウスと共通していた。しかし *Pts*<sup>-/-</sup>DPS マウスで P7 から P14 にかけて線条体でストリオソーム優位の TH の減少が観察されたのに対し、*Spr*<sup>-/-</sup>ではストリオソーム・マトリックスとも並行して TH が減少した。また *Spr*<sup>-/-</sup>について肝臓の GTP シクロヒドロラーゼ 1 (GCH1) のたんぱく質量の変化をウェスタンブロッティングで調べたところ、P0 から P14 にかけて約 6 倍に増加し、野生型と有意な差はなかった。PAH も経時的

に増加したが、野生型に比較して少ない傾向があった。

BH4 による TH たんぱく質の制御について検討するため *Pts*<sup>-/-</sup>DPS マウスに BH4 および L-DOPA を腹腔内投与し、脳ホモジネート中の TH タンパク質量の変化を解析したが、TH のタンパク質量が有意に増加する条件は確定できなかった。今後血液・脳関門の未発達な時期の野生型マウスに GCH1 阻害薬を投与して BH4 の生合成を阻害すること、DNA array を用いて野生型マウスとこれらの遺伝子改変マウスの脳で発現の変化している分子を探索する。

(2) BH4 欠乏マウスの血管機能、および高血糖・高脂血症等の病態下の BH4 欠乏マウスでの血管病変の進行に関する研究  
野生型マウスでは通常飼料飼育時の血清コレステロール値は 125.8 ± 13.8 mg/dL、コレステロール負荷飼育では 243.5 ± 14.6 mg/dL、*Dhpr*<sup>-/-</sup>はそれぞれ 114.8 ± 9.4 mg/dL、244.4 ± 25.1 mg/dL であった。通常飼料飼育時、1.25%コレステロール負荷飼料飼育時とも、大動脈リング標本のアセチルコリン、Sodium Nitroprusside による血管弛緩反応は、野生型と *Dhpr*<sup>-/-</sup>の間に有意な差はなかった。通常飼料飼育群については脳、肝臓の BH4 量は野生型 (5.8 ± 0.3 pmol/mg protein, 17.6 ± 4.4 pmol/mg protein) と *Dhpr*<sup>-/-</sup> (6.5 ± 0.6 pmol/mg protein, 8.1 ± 0.3 pmol/mg protein) で有意差がなかったが、BH2 量は *Dhpr*<sup>-/-</sup>が有意に増加していた (0.2 pmol/mg protein, 0.9 pmol/mg protein vs 1.0 ± 0.1 pmol/mg protein, 7.4 ± 1.0 pmol/mg protein)。*Dhpr*<sup>-/-</sup>の血清 BH2 値 (771.8 ± 53.3 pmol/mL) は野生型 (113.2 ± 7.0 pmol/mL) よりも高値であった。血管の BH2 量は野生型 (0.15 ± 0.08 pmol/mg protein) と *Dhpr*<sup>-/-</sup> (0.43 ± 0.09 pmol/mg protein) に有意な差がなかったのに対し、BH4 は *Dhpr*<sup>-/-</sup>マウス (2.74 ± 0.38 pmol/mg protein) が野生型 (0.64 ± 0.35 pmol/mg protein) の約 5 倍の値であった。1.25%コレステロール負荷飼料飼育時についても同様の傾向であった。血管には BH4/BH2 の不均衡を是正する機構が存在することが考えられる。今後例数を増やして明確な結論を出すとともに、これらの現象のメカニズムをあきらかにする。

## 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 5 件)

①Hiroya Yagi, Sho Sanechika, Sho Shimaguchi, Hiroshi Ichinose, Chiho Sumi-Ichinose, Hiroaki Mizukami, Masashi

Urabe, Hiromi Hamada, Hiroyuki Yoshikawa, Keiya Ozawa, Akihiro Kume. Recovery of neurogenic amines in phenylketonuria mice following liver-targeted gene therapy. Neuroreport. 2012, 23(1):30-34. (査読有)

② Hirofumi Tokuoka, Shin-ichi Muramatsu, Chiho Sumi-Ichinose, Hiroaki Sakane, Masayo Kojima, Yoshinori Aso, Takahide Nomura, Daniel Metzger, and Hiroshi Ichinose. Compensatory regulation of dopamine after ablation of the tyrosine hydroxylase gene in the nigrostriatal projection. J Biol Chem. 2011, 286(50):43549-43558. (査読有)

③ Hiroaki Shiraiishi, Kazuhisa Ikemoto, Shin Tada, Yasuhiro Udagawa, Masatsugu, Ohtsuki, Chiho Sumi-Ichinose, Kazunao Kondo, and Takahide Nomura. Cilostazol Inhibits Cytokine-induced Tetrahydrobiopterin Biosynthesis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. J Ather Thromb 2011, 18(4):312-317. (査読有)

④ Daigo Homma, Chiho Sumi-Ichinose, Hirofumi Tokuoka, Kazuhisa Ikemoto, Takahide Nomura, Kazunao Kondo, Setsuko Katoh, and Hiroshi Ichinose. Partial biopterin deficiency disturbs postnatal development of the dopaminergic system in the brain. J Biol Chem. 2011, 286(2):1445-1452. (査読有)

⑤ Chiho Sumi-Ichinose, Hiroshi Ichinose, Kazuhisa Ikemoto, Takahide Nomura, and Kazunao Kondo. Regulation of dopaminergic neural transmission by tyrosine hydroxylase protein at nerve terminals. J Pharmacol Sci 2010, 114: 17 - 24. (査読有)

[学会発表] (計 16 件)

① Hiroshi Ichinose, Hirofumi Tokuoka, Shin-ichi Muramatsu, Chiho Sumi-Ichinose, Takahide Nomura, Daniel Metzger. (9-13 Sept 2012) Regulation of dopamine contain in the striatum after ablation of the tyrosine hydroxylase gene in the substantia nigra. 10th International Catecholamine Symposium. (Asilomar, USA)

② Hiroshi Ichinose, Sho Sanechika, Yoshitaka Hara, Yusuke Sudo, Feng Xu, Shun-ichiro Honda, Sho Shimaguchi, Shigeki Matsuki, Mieko Horiguchi, Masayo

Kojima, Takahide Nomura, Kazunao Kondo, Chiho Sumi-Ichinose.

Characterization of dihydropteridine reductase knockout mice  
15th International Symposium on Pteridines and Folates  
(9-13 May 2012, Antalya Turkey)

③ D. Homma, C. Sumi-Ichinose, H. Tokuoka, K. Ikemoto, T. Nomura, K. Kondo, H. Ichinose. (9-13 March, 2011) Partial biopterin deficiency disturbs postnatal development of the dopaminergic system. 10th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases. (Barcelona, Spain)

④ K. Ikemoto, C. Sumi-Ichinose, T. Nomura, K. Kondo. (20-25 February, 2011) Tetrahydrobiopterin and reactive oxygen species in cytokine-stimulated HUVEC. Gordon Research Conference, Vascular Cell Biology. (Ventura, CA, USA)

⑤ 菅沼由唯、池本和久、一瀬千穂、野村隆英、近藤一直、マウス全血におけるテトラヒドロビオプテリンの抗血小板作用  
第 86 回日本薬理学会年会 (2013 年 3 月 21 日 ~ 23 日、福岡)

⑥ 一瀬宏、本間大悟、一瀬 (鷺見) 千穂、近藤一直、ビオプテリンによる脳内ドーパミン系の発達および神経機能との関連  
第 10 回日本機能性食品医学会総会 シンポジウム 1 ビタミン研究の最前線  
(2012 年 12 月 15 日 ~ 16 日、東京)

⑦ 菅沼 由唯、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テトラヒドロビオプテリンが及ぼす影響  
第 22 回循環器薬理学会年会 (2012 年 11 月 30 日、富山)

⑧ 菅沼由唯、池本和久、一瀬千穂、野村隆英、近藤一直、テトラヒドロビオプテリンによる血小板凝集抑制効果のメカニズム解明  
第 122 回日本薬理学会近畿部会 (2012 年 11 月 16 日、豊中)

⑨ 来 延新、川畑伊知郎、一瀬千穂、近藤一直、加藤成樹、一瀬 宏、小林和人、山國 徹、チロシン水酸化酵素の転写促進因子 V-1 はドーパ脱炭酸酵素の遺伝子発現を増強する  
第 51 回日本薬学会東北支部大会 (2012 年 10 月 7 日、青森)

⑩ Hiroshi Ichinose, Yusuke Sudo, Sho

Sanechika, Koichi Tanda, Kenzo Takao, Yoshitaka Hara, Shun-ichiro Honda, Sho Shimaguchi, Masayo Kojima, Chiho Sumi-Ichinose, Takahide Nomura, Kazunao Kondo, Tsuyoshi Miyakawa, Disturbance in the biosynthesis of monoamines and PTSD-like phenotype in the dihydrpterin reductase-deficient mice.  
第 35 回日本神経科学大会 (2012 年 9 月 18~21 日、名古屋)

⑪ 菅沼由唯、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がマウス血小板凝集に及ぼす影響  
第 121 回日本薬理学会近畿部会 (2012 年 6 月 29 日、徳島)

⑫ 一瀬(鷺見)千穂、菅沼由唯、池本和久、野村隆英、近藤一直、テトラヒドロピオプテリンの欠乏はモノアミン神経系の生後発達を阻害する  
第 85 回日本薬理学会年会 (2012 年 3 月 14~16 日、京都)

⑬ Satomi Chiken, Chiho Sumi-Ichinose, Hiroshi Ichinose, Kazunao Kondo, Atsushi Nambu, Neuronal activity of the basal ganglia in a transgenic mouse model of dopa-responsive dystonia.  
第 34 回日本神経科学大会 (2011 年 9 月 14 日~17 日、横浜)

⑭ 一瀬(鷺見)千穂、池本和久、野村隆英、近藤一直、テトラヒドロピオプテリン欠損マウスの生後発達と生化学的変化  
第 118 回日本薬理学会近畿部会 (2010 年 11 月 19 日、大阪)

⑮ 千田隆夫、尾之内高慶、唐沢延幸、一瀬千穂、高雄啓三、近藤一直、宮川 剛、統合失調症様行動異常を呈する APC1638T マウスの脳におけるモノアミンの動態  
日本解剖学会第 70 回中部支部学術集会 (2010 年 10 月 16~17 日、岐阜)

⑯ 池本和久、一瀬千穂、野村隆英、近藤一直、プテリン類の分析に関する 3 項目の検討  
第 24 回 日本プテリジン研究会シンポジウム (2010 年 7 月 24 日、名古屋)

## 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

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (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

### (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