

テトラヒドロビオプテリンの薬理作用と臨床応用について

大橋 晶子 高橋 富久

日本大学歯学部解剖学第I講座
日本大学歯学部総合歯学研究所機能形態部門

要旨: テトラヒドロビオプテリン(BH₄)は、フェニルアラニン水酸化酵素、チロシン水酸化酵素およびトリプトファン水酸化酵素の補酵素として働き、フェニルアラニン代謝やドーパミン、ノルアドレナリン、セロトニンなどの神経系に広く分布する芳香族モノアミンの生合成を調節する。また、BH₄は一酸化窒素合成酵素(NOS)の補因子としても働き、肝臓、腎臓、肺、心臓などの酸化ストレス応答を制御している。したがって、芳香族モノアミンの減少に起因するパーキンソン病や鬱病などの中枢神経系疾患や、NOS機能障害にともなう高血圧や糖尿病に対して、BH₄の持続的な補充はそれら疾患の症状の寛解につながる可能性をもつと考えられている。しかし、現行のBH₄投与方法では、脳に十分量のBH₄が還流されないことや、投与後の急速なBH₄の酸化誘導が生じることから、未だにBH₄補充療法は確立された治療法として認知されていない。このような問題を解決するには、「投与されたBH₄が生体内で標的となる組織にどのように取込まれて蓄積するか」というBH₄の体内動態と輸送メカニズムの解明が必要である。本稿ではBH₄の薬理学効果とBH₄の生体内輸送について、将来的な臨床応用を視野に入れて概説した。

キーワード: テトラヒドロビオプテリン, 補酵素, 補因子, フェニルアラニン代謝, 一酸化窒素合成酵素

The pharmacological effects and clinical application of tetrahydrobiopterin

Akiko Ohashi, Tomihisa Takahashi

Department of Anatomy, Nihon University School of Dentistry
Division of Functional Morphology, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry

Abstract: Tetrahydrobiopterin (BH₄) acts as a coenzyme of hydroxylases required for the metabolism of phenylalanine, tyrosine, and tryptophan, and it promotes the synthesis of aromatic monoamines, such as dopamine, noradrenaline, and serotonin, in the central nervous system. BH₄ also functions as a cofactor for production of nitric oxide synthase (NOS) and regulates the blood-vascular system of the liver, kidney, lung, and heart. These findings suggest that BH₄ administration may ameliorate the severe symptoms in neuropathies, Parkinson's disease, and depression caused by the reduction of aromatic monoamines, and in conditions associated with NOS dysfunction, including hypertension and diabetes. However, clinical studies of BH₄ have been hampered by a number of problems, including lack of accumulation of BH₄ at appropriate levels in the brain and the rapid oxidation of BH₄ in a variety of tissues and cells. To resolve these problems, basic studies on BH₄ kinetics and the transport mechanisms by which administered BH₄ is taken up and accumulated in target tissues *in vivo* are required. This article describes the pharmacological effects of BH₄, focusing on its accumulation and transport mechanisms.

Keywords: tetrahydrobiopterin, nitric oxide synthase (NOS), dopamine, serotonin, NOS-dysfunctions

1. はじめに

6*R*-L-erythro-5, 6, 7, 8-テトラヒドロビオプテリン(BH₄)は、葉酸と同じプテリン構造をもつ複素環化合物である。このうち、C6位に糖由来の側鎖[L-erythro型, -CH(OH)-CH(OH)-CH₃]を有するものをビオプテリンと呼

ぶ。1963年にビオプテリンの還元型であるBH₄が、フェニルアラニン水酸化酵素(PAH)の補酵素であることが発見された¹⁾。その後、BH₄がセロトニン、ドーパミン、ノルアドレナリンなどの芳香族モノアミンを合成するチロシン水酸化酵素²⁾(TH)やトリプトファン水酸化酵素³⁾(TPH)の補酵素であることが報告された。さらに、BH₄

(受付: 令和2年10月7日)
責任著者連絡先: 大橋晶子
日本大学歯学部解剖学第I講座
日本大学歯学部総合歯学研究所機能形態部門
〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

TEL: 03-3219-8120
FAX: 03-3219-8318
E-mail: oohashi.akiko@nihon-u.ac.jp

は補酵素よりも安定に一酸化窒素合成酵素(NOS)へ結合し、NOSへ電子を補給するための補因子として機能することも明らかになった^{4,5)}。このような背景からBH₄は、哺乳類において、フェニルアラニン代謝や芳香族モノアミンの生合成、およびNOSの機能保持に重要な役割をもった生理活性物質として位置づけられている。

2. BH₄の生合成と分布

BH₄は中枢神経の脳、フェニルアラニン代謝に関わる主要な臓器の肝臓、アドレナリンを産生する副腎、およびセロトニンを合成する膵臓など、特に芳香族アミノ酸水酸化酵素が発現する組織で確認されている⁶⁾。これらの組織が産生するBH₄量は、芳香族アミノ酸水酸化酵素に対して十分に飽和していないため、BH₄量の増加にともない、THとTPHの酵素の活性は上昇し、その結果、芳香族モノアミンの合成は促進する⁷⁾。一般に、ピオプテリンは酸化型(BP)、ジヒドロ型(BH₂)あるいはテトラヒドロ型(BH₄)の分子形状をとる⁸⁾。生体内に存在するピオプテリンの90%以上がテトラヒドロ型のBH₄で、酵素反応にともない酸化され、キノノイドジヒドロピオプテリン(qBH₂)となる。このqBH₂は同一細胞内に存在するジヒドロピオプテリジン還元酵素(DHPR)によって速やかに再還元され、BH₄に変化する(図1)。このリサイクル系は、BH₄が消費されずに補酵素として働き続ける必要のプロセスのため、DHPRの欠損ではBH₄の供給不足となる。

一般に、補酵素分子はビタミンであることが多いが、BH₄は生体内で生合成されるためビタミンではない。BH₄の生合成には、サルベージ経路と新生合成と呼ばれる2つの経路が関与している(図2)。サルベージ経路は、BH₄の新生合成経路における中間代謝産物の酸化物であるセピアプテリン(SP)からBH₂を介してBH₄が合成さ

れる経路であり、1970年に報告された⁹⁾。一方、新生合成は、GTPからBH₄が合成される経路であり、1983年に発見された¹⁰⁾。新生合成経路における律速段階は、GTPを基質とする最初の反応である。この反応を触媒するGTPシクロヒドロラーゼI(GTPCH I)は、単独でも酵素活性をもつが、通常、GTPCHフィードバック調節タンパク質(GFRP)と複合体を形成することで、L-フェニルアラニンやBH₄、あるいはGTPによってフィードバック調節を受ける。GTPCH IとGFRPの複合体は、L-フェニルアラニンと結合して活性型となり、GTPCH Iの活性を上昇させるが、逆にBH₄やGTPと結合することで不活性型となり、GTPCH I活性は減弱する^{11,12)}。実際、高フェニルアラニン血症(HPA)を発症した患者は、血漿中のフェニルアラニン濃度の上昇に追従し、GTPCH I活性は促進するが、同時に血漿BH₄濃度の上昇も観察されている¹³⁾。また、BH₄のピリミジン環のアナログである2,4-ジアミノ-6-ヒドロキシピリミジンは、GTPCH IとGFRPの複合体と結合し、BH₄の合成を阻害する¹⁴⁾。

3. 芳香族アミノ酸水酸化酵素の補酵素としてBH₄

生まれながらBH₄リサイクル系の機能不全、あるいはBH₄の合成経路(サルベージ経路と新生合成経路)が障害を受けた場合、先天性BH₄欠損症となる。主な症状は、血漿中のフェニルアラニン濃度の上昇であり、BH₄欠損の程度が大きい場合は、脳中の芳香族モノアミン量の低下に起因する運動機能の低下や神経障害が現れる^{15,16)}。BH₄欠損症に対する治療は、BH₄投与による補充が基本であるが、投与されたBH₄は脳内には十分に還流されない。従って、現行のBH₄補充療法の効果は、肝臓におけるフェニルアラニン代謝の改善に限定したものである。神経障害が重篤な場合には、脳内の芳香族モノアミン生合成の不足を補うために、BH₄に加えてモノアミン前駆

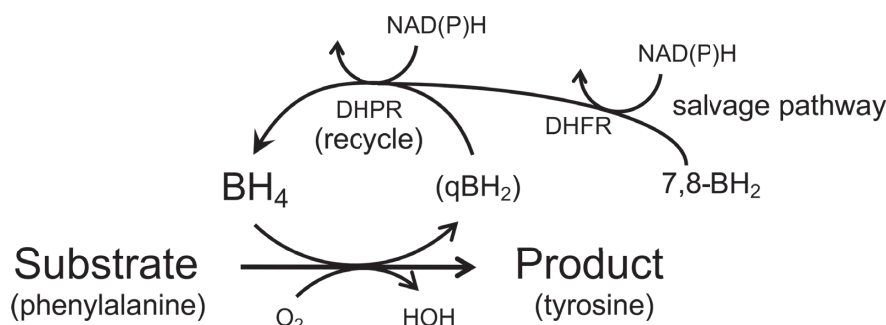


図1 BH₄が関与する酵素反応

BH₄はモノオキシゲナーゼ反応を触媒する一連の酵素の補酵素である。酵素反応に伴ってBH₄は酸化されてqBH₂となる。BH₄のqBH₂への酸化反応は4a-ヒドロキソテトラヒドロピオプテリンを経由するが、図では省略した。qBH₂は同一細胞内で速やかにDHPRによって還元されるため、補酵素量(BH₄+qBH₂)は維持される。一部のqBH₂は7,8-ジヒドロピオプテリン(7,8-BH₂)に転化し、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)によってBH₄へ再還元される。DHPRの機能不全ではBH₄は補酵素としてではなく、使い切りの基質となるため、供給が追いつかずに、補酵素不足となる。したがって、DHPRがあって初めて、細胞内のBH₄レベルが維持され、その結果、BH₄は補酵素として働くことができる。

アミノ酸の5-ヒドロキシトリプトファンとL-ドーパ、および芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素の末梢性阻害剤(カルビドパやベンゼラジド)が投与される¹⁷⁾。

先天性BH₄欠損症に限らず、中枢神経系における芳香族モノアミン欠乏症に対しては、モノアミンの補充治療法が第一選択となる。パーキンソン病などの運動失調を特徴とするドーパミン欠乏症では、L-ドーパの投与によるドーパミンの補充が行われている¹⁸⁾。セロトニン濃度の低下、あるいは枯渇と関連付けられる精神疾患には選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)が投与されるが、この薬剤はセロトニンの再取り込みを阻害し、シナプス周縁の遊離セロトニンレベルの上昇を期待して用いられる^{19,20)}。このように、今日の医療において中枢神経疾患の治療を目的としたドーパミン、ノルアドレナリン、セロトニンの補充効果の必要性は疑う余地はないが、同

時に、それらの生合成を調節しているBH₄の増加も、中枢神経系におけるこれらの芳香族モノアミン量を確実に上昇させる^{7,21)}。脳内のドーパミン、ノルアドレナリン、セロトニンの合成を促進する目的で、BH₄の補充療法は早い時期から試みられたが、残念ながら現在に至っても十分な効果は得られていない²¹⁻²⁵⁾。なぜなら、血液脳関門の存在が、BH₄の脳への還流を著しく阻害しているからである。したがって中枢神経疾患に対して、現行では対症療法としての治療薬しかなく、血液脳関門におけるBH₄の輸送阻害メカニズムが解明できれば新しい作用機序をもつ治療薬の開発へ繋がると考える。

4. NOSの補因子としてのBH₄

NOSは3つのアイソフォームがあることが知られてい

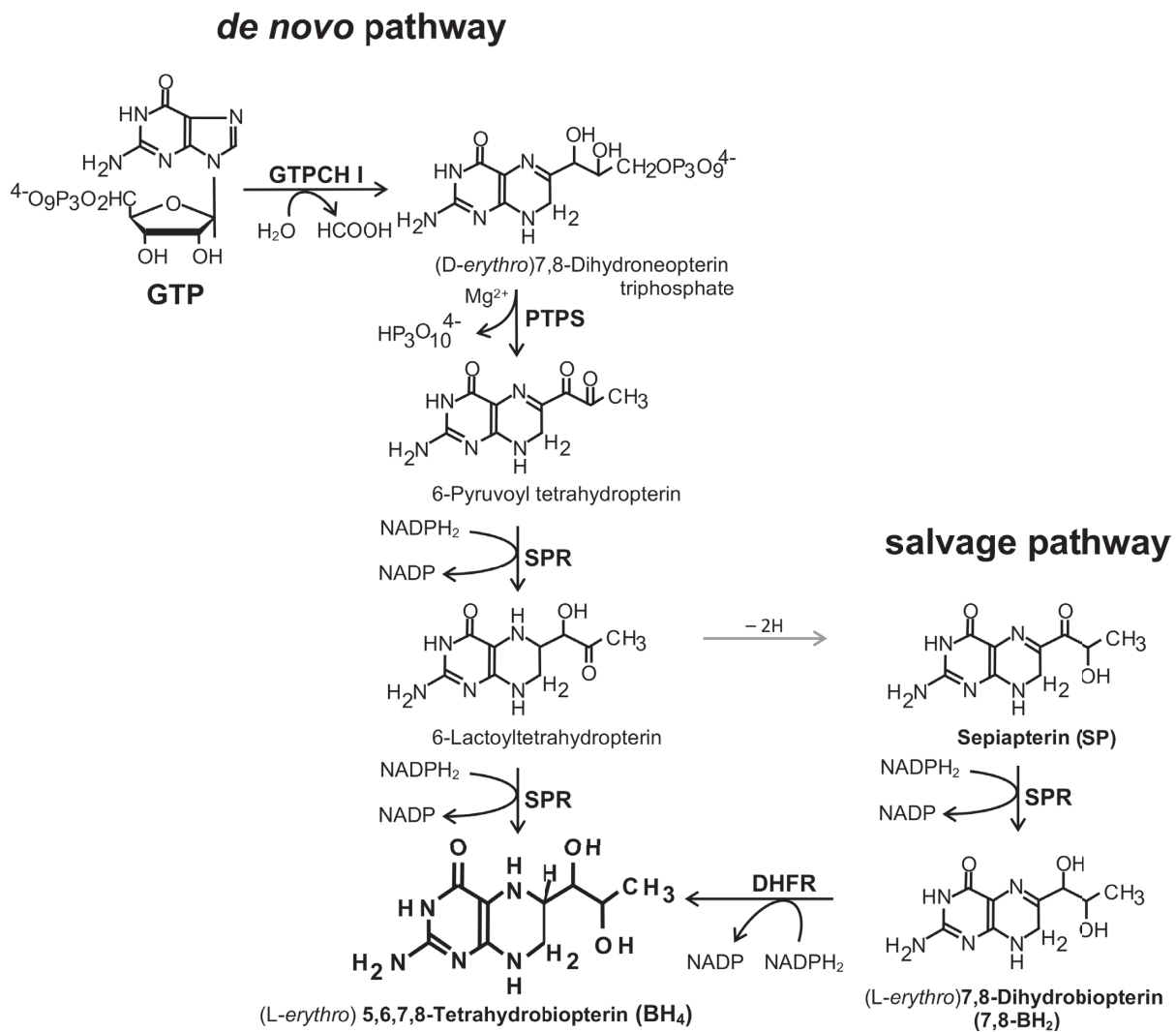


図2 BH₄の生合成経路

BH₄はGTPから生合成される新生合成経路(*de novo* pathway)とセピアプテリン(SP)と7,8-ジヒドロビオプテリン(7,8-BH₂)を介して合成されるサルベージ経路(*salvage pathway*)がある。新生合成経路の最初の反応を触媒するGTPCH IはBH₄合成の律速酵素である。GTPシクロヒドロラーゼI(GTPCH I)、6-ピルボイルテトラヒドロプテリンシンターゼ(PTPS)、セピアプテリン還元酵素(SPR)

る。最も生体内に広く分布しているのは、nNOS(nervous type NOS)で、脳抽出液からはじめて抽出されたことから神経型と呼ばれている²⁶⁾。次に同定されたiNOS(induced NOS)はマクロファージなどに発現し、炎症時に生体防御反応の1つとして一酸化窒素の放出を促進する²⁷⁾。最も遅くに同定されたeNOS(endothelial type NOS)は、主に血管の弛緩や血管内皮への細胞接着、および血小板凝集能の抑制など血管の恒常性を維持している²⁸⁾。NOSは、アルギニンに対する2回のモノオキシゲナーゼ反応を介して、シトルリンと一酸化窒素(NO^{*}, *はラジカル記号)を合成する。この時、BH₄は電子の伝達という重要な役割を演じている。一連の反応によって酸化されたBH₄は、NOSに結合した状態で再還元されるため、BH₄はNOSから遊離せずに15~26分子のNO^{*}を産生する。その後、BH₄はNOSから遊離して、新しいBH₄分子に置換される²⁹⁾。このとき、NOSに対するBH₄結合の有効濃度は低く(Kd値は30~100nM程度)、またBH₂もBH₄と同程度のNOSへの親和性を示す³⁰⁾ことから、BH₄とBH₂が共存する場合は、NOSへの結合過程でBH₄とBH₂は競合する。BH₂が結合したNOSはNO^{*}ではなくスーパーオキシド(O₂^{•-})を放出する³¹⁾。これをNOSの脱共役という(図3)。NOSが高い密度で分布する細胞膜近傍では、NOSの脱共役によって、水酸化ラジカルや、ペルオキシナイトライトなどの活性酸素を生成する。これらのラジカル分子の作用によってさらにBH₄が酸化され、細胞膜近傍のBH₂が増加し、その結果、NOSの脱共役が急速に促進するという悪循環に

陥る^{30, 32)}。NOSの脱共役からの離脱には、BH₂とBH₄の比率(BH₂比率; BH₂/BH₄)を下げるのが重要である³³⁾。今日、糖尿病、高血圧症、アテローム性動脈硬化症などの生活習慣病において、BH₂比率の上昇が確認されており、NOSの脱共役がこれらの疾患の誘導因子、あるいは増悪因子と考えられている^{30, 32)}。そこでBH₂比率を低下させる試みの1つに、「生体外からのBH₄投与」が注目されている。動物実験レベルでは一定の成果が得られているが、臨床試験段階では必ずしも成功に至っていない。この理由として、①原因不明のBH₄の酸化によってBH₂の増加が生じる³⁴⁾、②ヒト血管内皮細胞のジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)活性が低く、増加したBH₂から十分な量のBH₄を還元できない³⁵⁾ことがあげられる。

5. BH₄ 補充療法の現状

BH₄ 補充療法で用いられるBH₄は、天然型の6Rジアステレオマー^{36, 37)}であり、サプロプテリンと呼ばれる。日本では、薬品名「ビオブテン(第一三共)」, 欧米では薬品名「KUVAN(バイオマリン)」として供給されている。このBH₄製剤は、BH₄欠乏が原因のHPAと、一部のフェニルケトン尿症(PKU)を適用対象とする希少疾病医薬品として承認されている。PKUは、BH₄欠損ではなく、PAHのアポ酵素の遺伝子異常に起因する。日本における発生率は海外に比べると極めて低く、約10万人に1人程度である。このPKU患者の約50%程度で、BH₄投与によってフェニルアラニン代謝の改善がみられたことから³⁸⁾、このPKUを特にBH₄反応性PKUと呼ぶよう

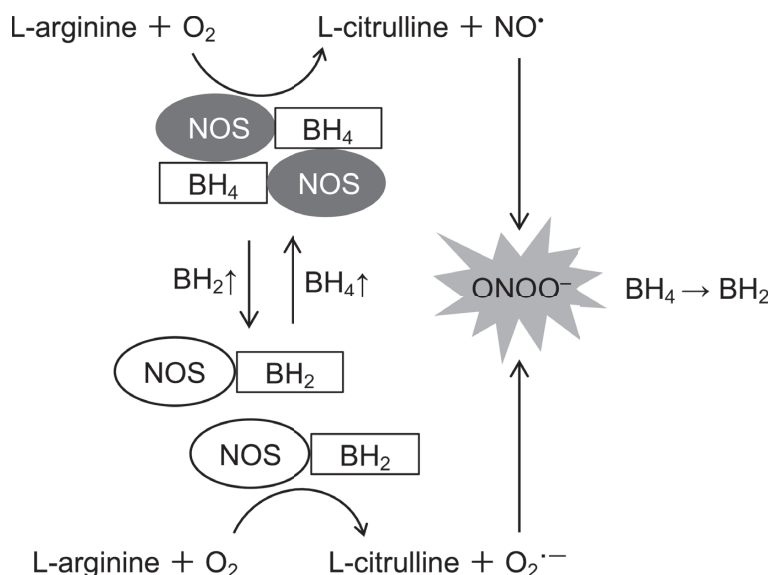


図3 BH₄とBH₂の比率とNOS活性

NOSはアルギニンからシトルリンとNOを産生する。この反応においてBH₄は電子の伝達とNOSの二量体形成に必要である。NOSに対するBH₄とBH₂の親和性は同程度であるため、NOSに結合するとき、BH₄とBH₂は競合する。BH₂が結合したNOSは二量体を維持できないため、NOではなくO₂^{•-}が放出される。これをNOSの脱共役という。O₂^{•-}はNOと反応し、ペルオキシナイトライト(ONOO⁻)を産生する。ONOO⁻によってBH₄が酸化されるため、BH₂が増加し、NOSの脱共役が促進される。

になった。2008年にBH₄反応性PKUに対してBH₄の補充療法が適用となった。BH₄反応性PKUに対するBH₄の作用機序は未だ不明だが、BH₄が変性状態のPAHに結合することで、PAHの構造と活性が正常な状態に維持されるというシャペロン効果をBH₄がもつと考えられている。PKUの症状がみられるHPAでは、血液中のフェニルアラニン濃度を下げるために低フェニルアラニン食事療法が実践されている。しかし、低フェニルアラニン食事療法は低タンパクなため、患者はフェニルアラニン以外のアミノ酸を補うための風味が著しく悪い特殊ミルクを摂取しなければならず、このような食事療法を一生継続することは、しばしば困難であった。特に、PKUの出現率が比較的高いヨーロッパ(1万人に1人程度)では大きな問題であったが、BH₄補充療法が適用されてからは、食事療法の厳しさから患者は解放され、その結果、治療中のQOLを著しく向上させた³⁹⁾。

6. BH₄の体内動態と輸送

上述したように、中枢性の芳香族モノアミン欠乏症や生活習慣病の治療法として、BH₄の補充療法の研究と開発が急務だが、残念ながら今日に至っても、どちらも臨床応用されていない。この現状から脱却するには、外的に投与されたBH₄が細胞・組織にどのように取り込まれ、その後、蓄積するかというBH₄輸送メカニズムの解明が必要である。そこで、近年、明らかになった生体におけるBH₄の動態と輸送の概要について述べる。

1) 腸管からのBH₄の吸収

消化管における栄養素の吸収は上皮細胞を介した経細

胞輸送のため、細胞膜を2回通過しなければならない、腸管からの親水性分子の拡散による透過効率極低とされてきた。BH₄も多くの親水基をもった化合物であることから、腸管からの吸収率も著しく低いと考えられていたために、BH₄の吸収メカニズムについての研究はほとんど進まなかった。しかし、Sawabeら⁴⁰⁾のマウスを用いたBH₄投与実験から、経口投与と腹腔内投与で肝臓に蓄積されるBH₄量に大きな差はなく、BH₄は消化管から十分に吸収されることが示された。この消化管からのBH₄の吸収は、Caco-2細胞を用いたBH₄の経細胞輸送の研究でも報告されており⁴¹⁾、漏出や物理的拡散では説明できない急速な経細胞性のBH₄輸送が観察された。また、この経細胞輸送は低濃度の輸送体阻害剤ベンズブロマロン(10 μM)で強く抑制されたことから、BH₄はある種の輸送体を介して消化管粘膜から十分に吸収されることが証明された(図4)。その後、腸管の経細胞輸送に関して、BH₄を効率よく吸収するための「輸送体」の存在が注目されはじめた。輸送体がBH₄の細胞膜透過能を決定することは、BH₄の体内動態がそれぞれの細胞・組織に発現する輸送体によって規制されることを意味し、適切なドラッグデリバリーシステムを利用することで、十分な量のBH₄を目的の組織に補充できることが示唆された。

2) 腎臓における排出

BH₄は主に尿に排出されるが、親水性化合物という理由からBH₄の尿中への排出メカニズムについては、腸管と同様にほとんど研究されてこなかった。しかし、BH₄の尿中への排出をコントロールすることが可能となれ

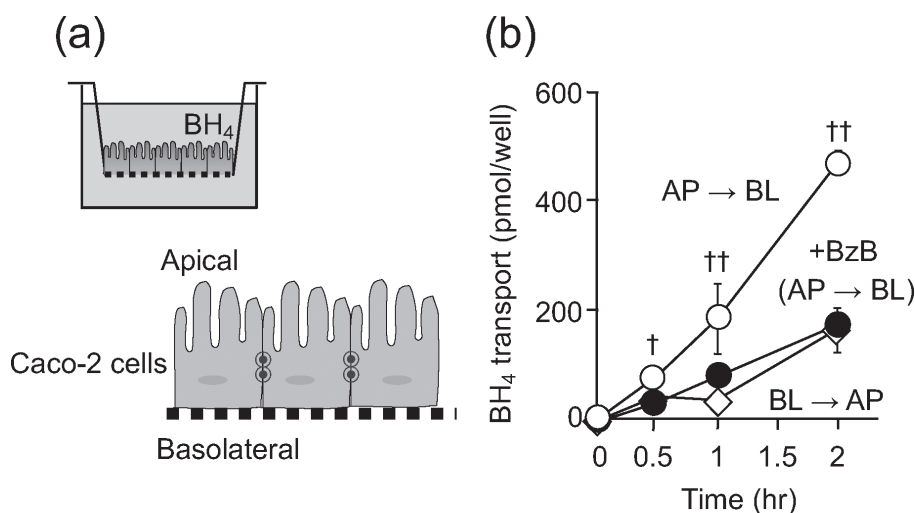


図4 腸管上皮細胞におけるBH₄の経細胞輸送

(a)多孔性膜上にCaco-2細胞を単層培養したときの模式図を示す。膜上で培養することで細胞極性が生じる。細胞の管腔側と基底側が同一方向に揃い、タイトジャンクション(●)によって細胞同士が密に接着する。(b)多孔性膜上にCaco-2細胞を単層培養(20日間)し、電気抵抗が1300 Ω・cm²に達した細胞シートを用いて、BH₄(100 μM)の経細胞輸送を観察した。管腔側(AP; apical side, ○), 基底側(BL; basolateral side, ◇)。BH₄の経時的な移行はAP → BLはBL → APよりも大きく、さらに輸送体阻害剤であるベンズブロマロン(BzB, 10 μM, ●)によって強く阻害された⁴¹⁾。BzBなし(AP → BL)vs BzBあり(AP → BL) † $P < 0.05$, † † $P < 0.01$ (Student's *t*-test)

ば、BH₄ 補充療法において、その投与量の減少にもつながる。そこで、著者らは、BH₄ の尿中排出メカニズムを検討するために、ラットに BH₄ を静脈内投与し、血液、胆汁および尿中のビオプテリン量を経時的に測定した。その結果、BH₄ は非選択的な糸球体濾過と尿細管からの分泌によって排出されることが明らかになった⁴²⁾。また、BH₄ の尿中排出を速度論的に解析した結果、血漿 BH₄ 濃度が定常の約 100 倍(10 μM 以上)の高濃度に上昇したときに、極めて速い分泌排出が観察された(図 5 a ~ c)。

BH₄ の尿細管上皮からの分泌排出に関わる輸送体を同定するために、ラットの腎臓皮質スライス片⁴³⁾を利用した BH₄ の取り込み実験と競合阻害実験がおこなわれた⁴⁴⁾。その結果、抗生物質などの生体異物の尿中排出を担う有機陰イオン輸送体(OAT)の OAT1 と OAT3 が BH₄ の尿細管からの分泌にも関与することが明らかになった(図 5 d)。OAT1 と OAT3 によるビオプテリン化合物の輸送は、それぞれのタンパクを過剰発現させた尿細管上皮由来細胞(LLC-PK1)の実験系でも証明された

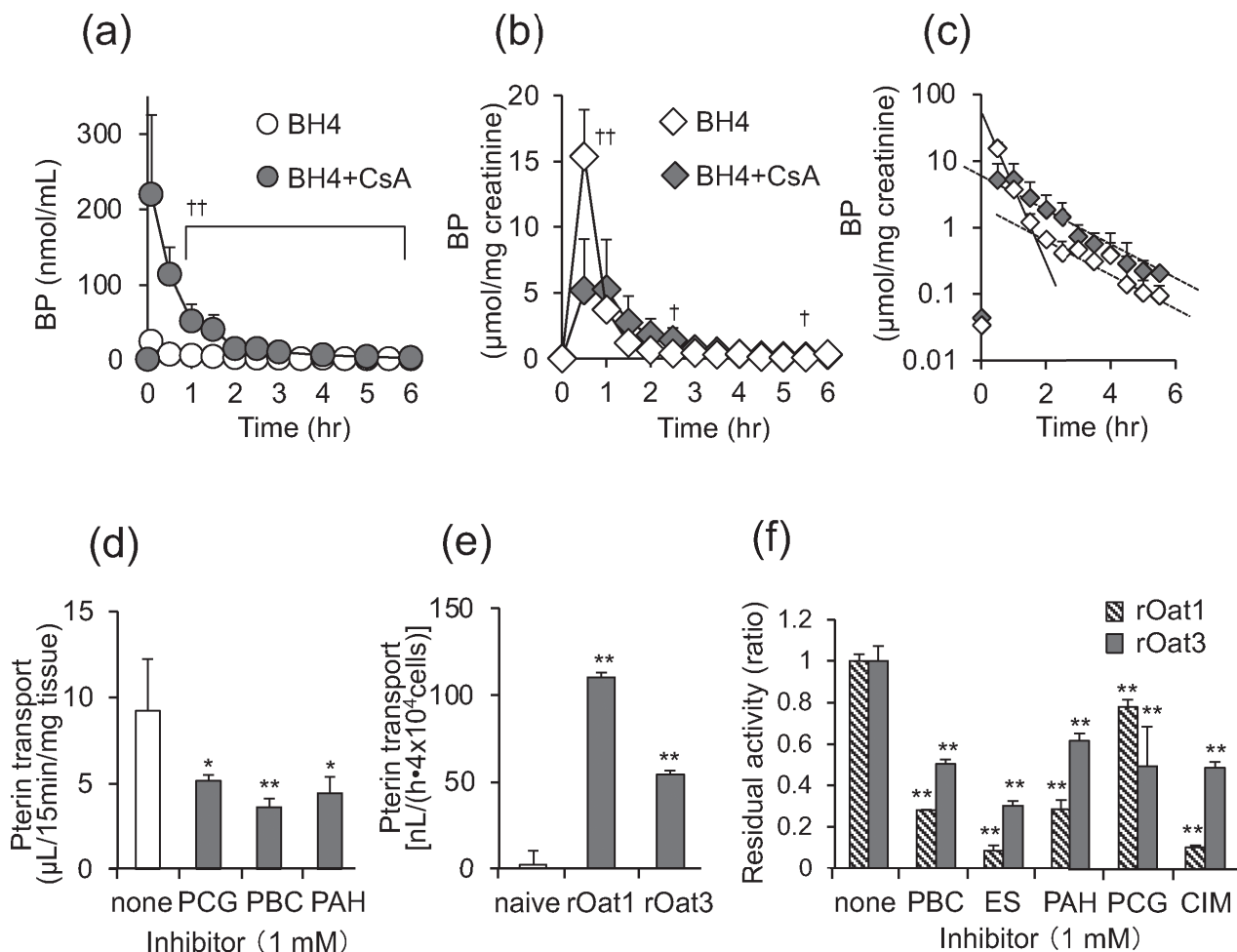


図 5 BH₄ 投与後の尿細管上皮細胞における分泌排出と輸送体の確認

ラットにシクロスポリン A(CsA)存在下(●, ◆), および非存在下(○, ◇)に BH₄ を投与し(5 mg/kg, i.v.), 血液(a)と尿(b, c)中の BH₄ 量の変化を観察した。(c)は(b)を片対数表示した。BH₄ 単独投与の場合、尿中への BH₄ 排出は、2 相性を示し、投与 2 時間後までの半減時間は約 16 分で、2 時間以降の半減時間は約 53 分であった。CsA 存在下では、BH₄ 投与直後の急激な排出が消失したが、それに対応して血液中の BH₄ 量が増加した⁴²⁾。(d)ラット腎臓皮質のスライス片に、図中に示した阻害剤(各 1 mM)存在下(■), および非存在下(□)に BH₄ (10 μM)を 10 分間与え、蓄積した BH₄ 量を測定した。これは尿細管上皮への取り込みの指標である⁴³⁾。(e)強制発現させていない LLC-PK1 細胞(naive, □)と OAT1 または OAT3 を強制発現させた LLC-PK1 (■)に BH₄ (50 μM)を 1 時間与え、細胞内に蓄積した BH₄ 量を測定した。LLC-PK1 細胞では OAT の発現が極めて低いため⁵⁴⁾, OAT を強制発現させていない細胞の BH₄ 輸送は、OAT によるものではない⁴⁵⁾が、rOat1, あるいは rOat3 の発現で、BH₄ の取り込み量が増加した。(f)rOat1 (▨)または rOat3 (■)を強制発現させた LLC-PK1 細胞に、OAT ファミリーの阻害剤または基質(各 1 mM)存在下に BH₄ (50 μM)を 1 時間与え、細胞内に蓄積した BH₄ 量を定量した。阻害剤または競合基質非存在下における BH₄ 輸送を 1 として、残存する輸送活性を示した。(a)BH₄ vs BH₄ + CsA, (b)BH₄ vs BH₄ + CsA, (d)阻害剤なし vs 阻害剤あり, (e)naive vs rOat 導入, (f)阻害剤なし vs 阻害剤あり inhibitor, (a, b) † P < 0.05, † † P < 0.01(Student's t-test), (d, e, f) * P < 0.05, ** P < 0.01(Holm's test)。

プロベネシド(PBC), ペニシリン G(PCG), パラアミノ馬尿酸(PAH), エストロン硫酸(ES), シメチジン(CIM)

(図5e, f)。つまり、OAT1またはOAT3が尿管上皮細胞の基底側からBH₄を管腔内に運ぶ輸送体で、BH₄の分泌排出に関与することが示された⁴⁵⁾。尿中のこれらの輸送体によってBH₄の分泌排出が抑制できれば、血漿中のBH₄量を維持でき、BH₄補充療法におけるBH₄投与量の減少につながると考える。

3) サルベージ経路前駆体の細胞膜を介する輸送とBH₄蓄積

以前から、組織や細胞内のBH₄量を増加させるには、BH₄を投与するよりもサルベージ経路におけるBH₄前駆体であるSPやBH₂を用いたほうが効率的であることが知られていた^{9,10,46)}(図6a)。このような背景から、SPやBH₂の細胞膜輸送についての研究がおこなわれ、平衡型核酸輸送体(ENT)のENT1とENT2が、SPやBH₂の輸送体の候補として同定された⁴⁷⁾。ENTのbiopterin化合物に対する輸送活性は、アフリカツメガエル卵母細胞にENT1またはENT2をそれぞれ強制発現させた実験系で観察されている(図6b)。強制発現細胞で増加したSPとBH₂の細胞内取り込み量は、ENTに特異的な阻害剤のニトロベンジルチオイノシンあるいはENTの基質存在下で減少したことから、SPやBH₂を投与した場合にみられるBH₄の細胞内での蓄積量の増加は、輸送体のENT1またはENT2が関係していることが明らかになった^{47, 48)}。

これまで、組織や細胞内でのBH₄の蓄積メカニズムは、BH₄投与後の酸化反応によって増加したBH₂が細胞内に取り込まれ、DHFRの作用で再度BH₄に還元される仕組みであった⁴⁹⁻⁵¹⁾。なぜ、BH₄よりもBH₂が選択的に取り込まれるのかは不明であったが、ENTのbiopterin化合物に対する基質親和性によって、その機構がはじめ

て説明された。しかし、依然として、生体内のどこで、どのように投与されたBH₄が酸化されるのかという重大な問題が残されたままである^{34, 52, 53)}。BH₄酸化を自由にコントロールできれば、NOS機能障害に対するBH₄補充療法の一助になると考える。

7. まとめ

今日、先天性BH₄欠損と、BH₄反応性PKUの患者には希少疾病医薬品の6R-BH₄が投与されているが、いずれ効率の良いSPに置き換わると思われる。その根拠として、細胞レベルで観察された輸送体の存在とBH₄合成に関わるサルベージ経路の存在が挙げられる。一方、慢性的なNOS機能不全で発症する糖尿病や高血圧を治療する手段として、BH₄補充療法の期待度は依然として大きい。しかし、現状では、6R-BH₄投与をSP投与に置き換えても、2次的に生成されたBH₄が再び酸化によってBH₂へ変化する可能性が高く、すぐに承認できるものではない。また、SPから直接生成されるBH₂の影響も検討しなければならない。生体内BH₄の酸化メカニズムの全貌が解明できれば、「BH₄補充療法」は的確にターゲットを選別できると考えられる。

本論文に関して、開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Kaufman S (1963) The structure of the phenylalanine-hydroxylation cofactor. Proc Natl Acad Sci U S A 50, 1085-1093.
- 2) Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S (1964) Tyrosine hydroxylase: the initial step in norepinephrine biosynthesis. J Biol Chem 239, 2910-2917.

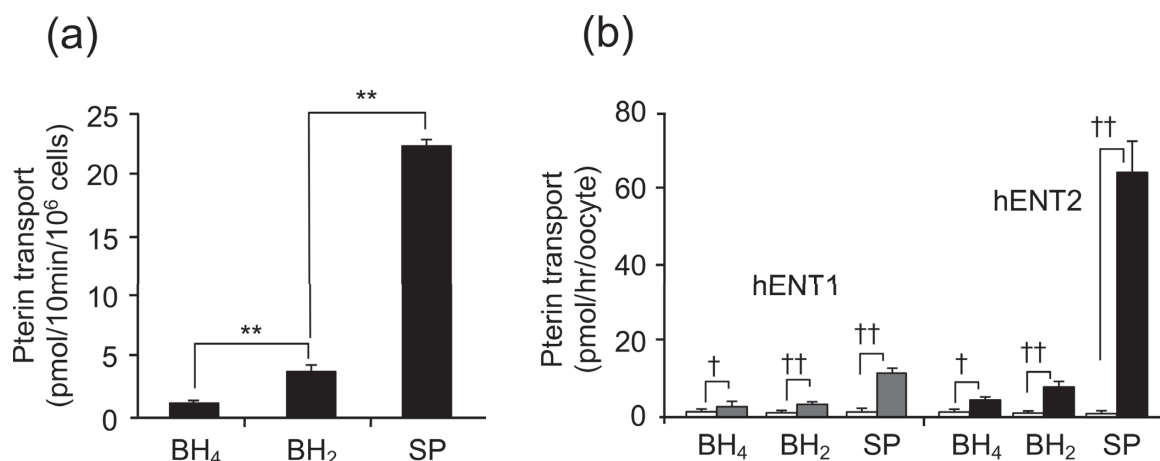


図6 biopterin化合物の輸送時にみられる基質親和性の比較

血管内皮細胞と輸送体を強制発現させたアフリカツメガエル卵母細胞のbiopterin類(BH₄, BH₂, SP)の輸送能を比較した。(a)ラット内皮初代培養細胞にbiopterin類(各10 μM)を加え10分後の細胞内に蓄積したbiopterin量を測定した。(b)ENT遺伝子を導入しない卵母細胞(□)とhENT1(■)およびhENT2(■)を発現させた卵母細胞にBH₄, BH₂(各50 μM)を加え60分後の細胞内に蓄積したbiopterin量を定量した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Holm's test), † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ (Student's *t*-test)

- 3) Lovenberg W, Jequier E, Sjoerdsma A (1967) Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science* 155, 217-219.
- 4) Kwon NS, Nathan CF, Stuehr DJ (1989) Reduced bipterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. *J Biol Chem* 264, 20496-20501.
- 5) Mayer B, John M, Heinzel B, Werner ER, Wachter H, Schultz G, Bohme E (1991) Brain nitric oxide synthase is a bipterin- and flavin-containing multi-functional oxidoreductase. *FEBS Lett* 288, 187-191.
- 6) Hoshiga M, Hatakeyama K, Watanabe M, Shimada M, Kagamiyama H (1993) Autoradiographic distribution of [¹⁴C] tetrahydrobiopterin and its developmental change in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 267, 971-978.
- 7) Miwa S, Watanabe Y, Hayaishi O (1985) 6 R-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin as a regulator of dopamine and serotonin biosynthesis in the rat brain. *Arch Biochem Biophys* 239, 234-241.
- 8) Wei C-C, Crane BR, Stuehr DJ (2003) Tetrahydrobiopterin radical enzymology. *Chem Rev* 103, 2365-2383.
- 9) Fukushima T (1970) Biosynthesis of pteridines in the tadpole of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Arch Biochem Biophys* 139, 361-369.
- 10) Nichol CA, Lee CL, Edelstein MP, Chao JY, Duch DS (1983) Biosynthesis of tetrahydrobiopterin by *de novo* and salvage pathways in adrenal medulla extracts, mammalian cell cultures, and rat brain *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 1546-1550.
- 11) Werner-Felmayer G, Golderer G, Werner ER (2002) Tetrahydrobiopterin biosynthesis, utilization and pharmacological effects. *Curr Drug Metab* 3, 159-173.
- 12) Schmidt TS, Alp NJ (2007) Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clin Sci (Lond)* 113, 47-63.
- 13) Ponzzone A, Guardamagna O, Spada M, Ponzzone R, Sartore M, Kierat L, Heizmann CW, Blau N (1993) Hyperphenylalaninemia and pterin metabolism in serum and erythrocytes. *Clin Chim Acta* 216, 63-71.
- 14) Kobayashi T, Hasegawa H, Kaneko E, Ichiyama A (1991) Gastrointestinal serotonin: depletion due to tetrahydrobiopterin deficiency induced by 2,4-diamino-6-hydroxypyrimidine administration. *J Pharmacol Exp Ther* 256, 773-779.
- 15) Bartholome K (1974) Letter: A new molecular defect in phenylketonuria. *Lancet* 2, 1580.
- 16) Kaufman S (1975) Letter: Pterin administration as a therapy for P.K.U. due to dihydropteridine-reductase deficiency?. *Lancet* 2, 767.
- 17) Bartholome K, Byrd DJ (1975) Letter: L-dopa and 5-hydroxytryptophan therapy in phenylketonuria with normal phenylalanine-hydroxylase activity. *Lancet* 2, 1042-1043.
- 18) Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (2007) *Neuroscience: exploring the brain*. 3rd edition, LWW, Philadelphia : 加藤宏司, 後藤 薫, 藤井 聡, 山崎良彦訳 (2009) *神経科学—脳の探求—*. 第1版. 西村書店, 新潟, 351-372.
- 19) Cooper JR, Bloom FE, Roth RH (2003) *The biochemical basis of neuropharmacology*. 8th edition, OUP, Oxfordshire: 樋口宗史訳 (2005) *神経薬理学—生化学からのアプローチ—*. 第1版. メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, 235-278.
- 20) Boneh A (2017) Phenylketonuria and BH4 deficiencies. *J Inherit Metab Dis* 40, 39-80.
- 21) Kettler R, Bartholini G, Pletscher A (1974) *In vivo* enhancement of tyrosine hydroxylation in rat striatum by tetrahydrobiopterin. *Nature* 249, 476-478.
- 22) Niederwieser A, Curtius HC, Wang M, Leupold D (1982) Atypical phenylketonuria with defective bipterin metabolism. Monotherapy with tetrahydrobiopterin or sepiapterin, screening and study of biosynthesis in man. *Eur J Pediatr* 138, 110-112.
- 23) Curtius HC, Niederwieser A, Levine RA, Lovenberg W, Woggon B, Angst J (1983) Successful treatment of depression with tetrahydrobiopterin. *Lancet* 1, 657-658.
- 24) Levine RA, Zoepfel GP, Niederwieser A, Curtius HC (1987) Entrance of tetrahydropterin derivatives in brain after peripheral administration: effect on biogenic amine metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 242, 514-522.
- 25) Brand MP, Hyland K, Engle T, Smith I, Heales SJ (1996) Neurochemical effects following peripheral administration of tetrahydropterin derivatives to the hph-1 mouse. *J Neurochem* 66, 1150-1156.
- 26) Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347, 768-770.
- 27) Hevel JM, White KA, Marletta MA (1991) Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem* 266, 22789-22791.
- 28) Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F (1991) Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10480-10484.
- 29) Klatt P, Schmid M, Leopold E, Schmidt K, Werner ER, Mayer B (1994) The pteridine binding site of brain nitric oxide synthase. Tetrahydrobiopterin binding kinetics, specificity, and allosteric interaction with the substrate domain. *J Biol Chem* 269, 13861-13866.
- 30) Crabtree MJ, Smith CL, Lam G, Goligorsky MS, Gross SS (2008) Ratio of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin to 7,8-dihydrobiopterin in endothelial cells determines glucose-elicited changes in NO vs. superoxide production by eNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H1530-H1540.
- 31) Stuehr D, Pou S, Rosen GM (2001) Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem* 276, 14533-14536.
- 32) Vásquez-Vivar J, Whittsett J, Derrick M, Ji X, Yu L, Tan S (2009) Tetrahydrobiopterin in the prevention of hypertonia in hypoxic fetal brain. *Ann Neurol* 66, 323-331.
- 33) Crabtree MJ, Tatham AL, Al-Wakeel Y, Warrick N, Hale AB, Cai S, Channon KM, Alp NJ (2009) Quantitative

- regulation of intracellular endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) coupling by both tetrahydrobiopterin-eNOS stoichiometry and biopterin redox status: insights from cells with tet-regulated GTP cyclohydrolase I expression. *J Biol Chem* 284, 1136-1144.
- 34) Cunnington C, Van Assche T, Shirodaria C, Kylintireas I, Lindsay AC, Lee JM, Antoniadis C, Margaritis M, Lee R, Cerrato R, Crabtree MJ, Francis JM, Sayeed R, Ratnatunga C, Pillai R, Choudhury RP, Neubauer S, Channon KM (2012) Systemic and vascular oxidation limits the efficacy of oral tetrahydrobiopterin treatment in patients with coronary artery disease. *Circulation* 125, 1356-1366.
- 35) Crabtree MJ, Channon KM (2009) Dihydrofolate reductase and biopterin recycling in cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol* 47, 749-751.
- 36) Hasegawa H, Imaizumi S, Ichiyama A, Sugimoto T, Matsuura S, Oka K, Kato T, Nagatsu T, Akino M (1979) Cofactor activity of diastereoisomers of tetrahydrobiopterin. *Chemistry and Biology of Pteridines*. Kisliuk RL, Brown GM eds, Elsevier North-Holland, New York, 183-188.
- 37) Matsuura S, Sugimoto T, Hasegawa H, Imaizumi S, Ichiyama A (1980) Studies on biologically active pteridines. III. The absolute configuration at the C-6 chiral center of tetrahydrobiopterin cofactor and related compounds. *J Biochem* 87, 951-957.
- 38) Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, Sakamoto O, Fujii K, Matsubara Y, Narisawa K (1999) Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 135, 375-378.
- 39) 大浦敏博, 新宅治夫, 高柳正樹, 呉 繁夫, 大和田操, 松原洋一, 芳野 信, 岡野善行, 伊藤哲哉, 奥山虎之, 中村公俊, 松尾雅文, 遠藤文夫(2009)テトラヒドロビオプテリン(BH4)反応性高フェニルアラニン血症に対する天然型BH4製剤塩酸サプロプテリンの適正使用に関する暫定指針. *日小児会誌* 113, 649-653.
- 40) Sawabe K, Wakasugi KO, Hasegawa H (2004) Tetrahydrobiopterin uptake in supplemental administration: elevation of tissue tetrahydrobiopterin in mice following uptake of the exogenously oxidized product 7,8-dihydrobiopterin and subsequent reduction by an anti-folate-sensitive process. *J Pharmacol Sci* 96, 124-133.
- 41) Ohashi A, Fukumuro M, Sawabe K, Mamada K, Sugawara Y, Matsuoka H, Hasegawa H (2009) Transcellular relocation of tetrahydrobiopterin across Caco-2 cells: a model study of tetrahydrobiopterin absorption through epithelial cells of intestinal mucosa. *J Inherit Metab Dis* 32, 73-78.
- 42) Ohashi A, Suetake Y, Saeki Y, Harada T, Aizawa S, Hasegawa H (2012) Rapid clearance of supplemented tetrahydrobiopterin is driven by high-capacity transporters in the kidney. *Mol Genet Metab* 105, 575-581.
- 43) Wedeen RP, Weiner B (1973) The distribution of p-aminohippuric acid in rat kidney slices. I. Tubular localization. *Kidney Int* 3, 205-213.
- 44) Ohashi A, Saeki Y, Harada T, Naito M, Takahashi T, Aizawa S, Hasegawa H (2016) Tetrahydrobiopterin supplementation: elevation of tissue biopterin levels accompanied by a relative increase in dihydrobiopterin in the blood and the role of probenecid-sensitive uptake in scavenging dihydrobiopterin in the liver and kidney of rats. *PLoS One* 11, e0164305.
- 45) Ohashi A, Mamada K, Harada T, Naito M, Takahashi T, Aizawa S, Hasegawa H (2017) Organic anion transporters, OAT1 and OAT3, are crucial biopterin transporters involved in bodily distribution of tetrahydrobiopterin and exclusion of its excess. *Mol Cell Biochem* 435, 97-108.
- 46) Yamamoto K, Nagano M, Nakanishi N, Hasegawa H (1996) A comparison of sepiapterin and tetrahydrobiopterin uptake by RBL2H3 cells. *Pteridines* 7, 154-156.
- 47) Ohashi A, Sugawara Y, Mamada K, Harada Y, Sumi T, Anzai N, Aizawa S, Hasegawa H (2011) Membrane transport of sepiapterin and dihydrobiopterin by equilibrative nucleoside transporters: a plausible gateway for the salvage pathway of tetrahydrobiopterin biosynthesis. *Mol Genet Metab* 102, 18-28.
- 48) Ohashi A, Mamada K, Tsuboi I, Aizawa S, Hasegawa H (2011) Asymmetric uptake of sepiapterin and 7,8-dihydrobiopterin as a gateway of the salvage pathway of tetrahydrobiopterin biosynthesis from the luminal surface of rat endothelial cells. *Mol Genet Metab* 104, 404-406.
- 49) Sawabe K, Suetake Y, Wakasugi KO, Hasegawa H (2005) Accumulated BH4 in mouse liver caused by administration of either 6R- or 6SBH4 consisted solely of the 6R-diastereomer: evidence of oxidation to BH2 and enzymic reduction. *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1, S145-S147.
- 50) Sawabe K, Suetake Y, Nakanishi N, Wakasugi KO, Hasegawa H (2005) Cellular accumulation of tetrahydrobiopterin following its administration is mediated by two different processes; direct uptake and indirect uptake mediated by a methotrexate-sensitive process. *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1, S133-S138.
- 51) Hasegawa H, Sawabe K, Nakanishi N, Wakasugi OK (2005) Delivery of exogenous tetrahydrobiopterin (BH4) to cells of target organs: role of salvage pathway and uptake of its precursor in effective elevation of tissue BH4. *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1, S2-S10.
- 52) Crabtree MJ, Channon KM (2011) Synthesis and recycling of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Nitric Oxide* 25, 81-88.
- 53) Werner ER, Blau N, Thony B (2011) Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. *Biochem J* 438, 397-414.
- 54) 楠原洋之(2006)有機アニオントランスポーター OATs. 創薬動態—医薬品創製のための考え方と最新情報—. 第1版, DMPK誌ニュースレター編集委員会編, 日本薬物動態学会, 東京, 123-133.