

## セピアプテリンの末梢投与による脳内セロトニン代謝回転の亢進

大橋 晶子<sup>1,2</sup> 永島 利通<sup>3,4</sup> 酒井 嶺<sup>5,6</sup>  
 外木 守雄<sup>4,7</sup> 佐藤 秀一<sup>6,8</sup> 高橋 富久<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 日本大学歯学部解剖学第 I 講座

<sup>2</sup> 日本大学歯学部総合歯学研究所 機能形態学部門

<sup>3</sup> 日本大学大学院 歯学研究科 歯学専攻 口腔構造機能学分野

<sup>4</sup> 日本大学歯学部口腔外科第 I 講座

<sup>5</sup> 日本大学大学院 歯学研究科歯学専攻 応用口腔科学分野

<sup>6</sup> 日本大学歯学部歯科保存学第 III 講座

<sup>7</sup> 日本大学歯学部総合歯学研究所 生体防御部門

<sup>8</sup> 日本大学歯学部総合歯学研究所 高度先端医療研究部門

## 要旨:

目的: テトラヒドロbiopterin (BH<sub>4</sub>) は、トリプトファン水酸化酵素 (TPH) やチロシン水酸化酵素に共通する補酵素である。モノアミン作動性神経細胞内の BH<sub>4</sub> 濃度の上昇はモノアミンの生合成を促進するが、BH<sub>4</sub> を末梢から投与しても脳内のモノアミンの生合成を促進しないため、BH<sub>4</sub> は血液脳関門 (BBB) を通過しないと言われている。BH<sub>4</sub> のサルベージ経路合成系の基質であるセピアプテリン (SP) は、細胞内に BH<sub>4</sub> を補充する能力が優れていることから、SP の投与によって細胞および脳内のセロトニン (5HT) 合成が促進するかどうかを検討した。

方法: 高速液体クロマトグラフィーと蛍光検出器を使用して、BH<sub>4</sub> と SP による *in vitro* での BBB 透過量と、5HT 産生細胞 (RBL2H3) への BH<sub>4</sub> 補充効率と TPH 活性の上昇効率をそれぞれ比較した。また、SP の末梢投与後、マウス脳内の BH<sub>4</sub> と 5HT 量の変化と、それらの代謝産物の経時変化も測定した。

結果: SP の BBB 透過量は BH<sub>4</sub> と有意な差がなかったが、RBL2H3 への BH<sub>4</sub> 補充効率、およびこれに起因する TPH 活性の促進効果は BH<sub>4</sub> に比べて約 20 倍も高かった。SP のマウス腹腔内への投与によって、脳内 5HT 量は変化しなかったが、5HT の代謝産物量は約 2 倍上昇した。

結論: SP の末梢投与が非侵襲的に脳内の BH<sub>4</sub> レベルを増加させ、セロトニン合成を促進する薬剤となる可能性が示唆された。

キーワード: テトラヒドロbiopterin, セピアプテリン, 抗うつ薬, セロトニン生合成, 血液脳関門

## Peripheral Administration of Sepiapterin Increases Brain-serotonin Turnover

Akiko Ohashi<sup>1,2</sup>, Toshimichi Nagashima<sup>3,4</sup>, Ryo Sakai<sup>5,6</sup>,  
 Morio Tonogi<sup>4,7</sup>, Shuichi Satoh<sup>6,8</sup>, Tomihisa Takahashi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Anatomy, Nihon University School of Dentistry

<sup>2</sup> Division of Functional Morphology, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry

<sup>3</sup> Division of Oral Structural and Functional Biology Nihon University Graduate School of Dentistry

<sup>4</sup> Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Nihon University School of Dentistry

<sup>5</sup> Division of Applied Oral Science, Nihon University Graduate School of Dentistry

<sup>6</sup> Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry

<sup>7</sup> Division of Immunology and Pathobiology, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry

<sup>8</sup> Division of Advanced Dental Treatment, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry

**Abstract:** Purpose: Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) is a coenzyme of tryptophan hydroxylase (TPH) and tyrosine hydroxylase involved in aromatic monoamine biosynthesis in monoaminergic neurones. However, peripheral BH<sub>4</sub> administration does not increase monoamine biosynthesis in the brain as it cannot cross the blood-brain barrier (BBB). As sepiapterin (SP), a substrate required for the BH<sub>4</sub> salvage pathway, can replenish BH<sub>4</sub> in

(受付: 令和 3 年 12 月 10 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

various cell types, we investigated whether SP can promote the BBB permeability and increase serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) synthesis in the brain.

Methods: High-performance liquid chromatography and fluorescence analyses were performed to determine the BBB permeability, BH<sub>4</sub> replenishment efficiency and TPH enzyme activity in 5-HT-producing RBL2H3 cells treated with BH<sub>4</sub> or SP. Time-dependent changes in the levels of BH<sub>4</sub> and 5-HT as well as their metabolites were also examined in mice peripherally administered SP.

Results: In contrast to the extremely weak BBB permeability of SP in our *in vitro* model, the BH<sub>4</sub> replenishment efficiency and TPH activity in SP-treated RBL2H3 cells were increased by approximately 20-fold compared to cells treated with BH<sub>4</sub>. Furthermore, intraperitoneal administration of SP approximately doubled the levels of 5-HT-derived metabolites compared to those of BH<sub>4</sub>.

Conclusion: The results of this study suggested that SP has therapeutic potential for increasing BH<sub>4</sub> levels and serotonin synthesis in the brain.

**Keywords:** tetrahydrobiopterin, sepiapterin, antidepressant, serotonin biosynthesis, blood-brain barrier

## 緒 言

グアノシン三リン酸から新生合成される複素環化合物であるテトラヒドロbiopterin (BH<sub>4</sub>) は、芳香族アミノ酸水酸化酵素であるトリプトファン水酸化酵素 (TPH) やチロシン水酸化酵素 (TH) の補酵素として働き、一酸化窒素合成酵素 (NOS) の補因子でもある<sup>1)</sup>。このほか、BH<sub>4</sub> は T 細胞の増殖や神経細胞からのモノアミン放出の促進など、多くの細胞機能の維持に関与することが知られているが、その作用メカニズムは十分に解明されていない<sup>2,4)</sup>。BH<sub>4</sub> がドーパミンやノルアドレナリン、およびセロトニン (5HT) などのモノアミンの生合成を律速するために働く TPH や TH の補酵素であることが明らかになって以降、モノアミン性神経伝達物質のレベル低下によって発症する中枢性の精神疾患や運動疾患の治療法の一つとして、末梢から BH<sub>4</sub> を投与してモノアミン作動性の神経細胞内に BH<sub>4</sub> を補充するという試みが行われた<sup>5)</sup>。

この治療法は、脳内の BH<sub>4</sub> 量を増加させることで、モノアミン生合成を促し、モノアミン性神経伝達物質の低下が原因の中枢疾患を完治させるという考えに基づいて立案された。実際に、実験動物を使用した脳への BH<sub>4</sub> の直接投与によって TPH と TH の酵素活性が上昇することから、これら酵素の補酵素として働く内因性の BH<sub>4</sub> の濃度は決して過剰ではなく、ヒトへの応用が可能であることが示唆された<sup>2,6)</sup>。しかし、BH<sub>4</sub> の末梢からの投与によって脳内の BH<sub>4</sub> 濃度が上昇したという報告はなく、「BH<sub>4</sub> は血液脳関門 (BBB) を通過しない」ことが定説となっている<sup>7-11)</sup>。そのため、現在に至っても脳内の BH<sub>4</sub> レベルを上昇させることを目的とした BH<sub>4</sub> の末梢投与は行われていない。一方、BH<sub>4</sub> の末梢からの投与は、先天性 BH<sub>4</sub> 欠損症や BH<sub>4</sub> 反応性フェニルケトン尿症に起因する高フェニルアラニン血症の治療に有効であり、血液中のフェニルアラニン濃度を顕著に低下させることが明

らかになっている<sup>12,13)</sup>。

一般的にこれらの疾患に対しては、希少疾病用医薬品として BH<sub>4</sub> 製剤 (塩酸サプロプテリン, 第一三共, 東京) が投与される<sup>13)</sup>。しかし、一日の BH<sub>4</sub> 排出量から算出できる BH<sub>4</sub> 必要量に比べて過剰量の BH<sub>4</sub> を投与しなければ、BH<sub>4</sub> によるフェニルアラニン低下効果が得られない。また、BH<sub>4</sub> の薬価は高額であるため、高血圧や糖尿病、脂質異常症などに起因する内皮型血管機能障害に対して BH<sub>4</sub> を使用することは経済的な観点から現実的ではない。中枢神経系のモノアミン不足や血管障害のように BH<sub>4</sub> 補充療法の効果が期待される疾患は多岐にわたる。特に、中枢性の神経疾患の治療に BH<sub>4</sub> の補充療法を適用させるには、BBB を通過して脳内に BH<sub>4</sub> を補充することが必要である。

このようなことを背景に、我々は末梢から投与した BH<sub>4</sub> の体内動態について研究を行ってきた。その結果、1) 経口的に投与した BH<sub>4</sub> の他に、BH<sub>4</sub> のサルベージ経路前駆体のジヒドロbiopterin (BH<sub>2</sub>) とセピアプテリン (SP) が小腸から効率よく吸収されること<sup>14,15)</sup>、2) 小腸と腎臓の吸収上皮細胞によって BH<sub>4</sub>、BH<sub>2</sub>、および SP が経細胞性に輸送されること<sup>16,18)</sup>、さらに 3) BH<sub>4</sub> 投与によって体内に著しく上昇した血液中の BH<sub>4</sub> は、腎臓における糸球体濾過と尿細管の分泌排出によって、大部分がすみやかに尿中に排出されることを明らかにした<sup>18,19)</sup>。これらの結果によって、経口投与された BH<sub>4</sub> の急速な尿中排出が BH<sub>4</sub> の投与量を必要量以上に増やす原因であることを明らかにした。しかし、投与された BH<sub>4</sub> の排泄を抑制するための有効な解決策はいまだに見出されていない。

一方、BH<sub>4</sub> の動態研究を行う中で、SP の末梢投与は組織中の BH<sub>4</sub> を増加させることが可能であり、その能力は BH<sub>4</sub> を直接投与するよりも顕著に優れていることが明らかになった<sup>14,20)</sup>。もともと SP に生理活性はないが、細胞に取り込まれると BH<sub>4</sub> サルベージ経路によって補酵素活性を有する BH<sub>4</sub> に還元される<sup>14,21,22)</sup>。したがって、SP

を末梢から投与すれば、非侵襲的に脳内のセロトニン合成を促進できると考えられる。末梢から投与されたSPが中枢効果を示すためには、BBBを通過し、モノアミン作動性の神経細胞に取り込まれた後、サルベージ経路によってBH<sub>4</sub>に変換され、TPHやTHの補酵素として利用される必要がある。

そこで本研究では、1)脳内血管壁モデルを使用してSPがBBBを通過できるかどうかを観察し、2)5HT産生細胞におけるSPのTPH活性の促進効果を検討した。さらに、3)SPの末梢投与が脳内5HTの合成と分解に影響を与えるかどうかを脳内5HT量とその代謝産物の5-ヒドロキシインドール酢酸(5HIAA)を定量することで検討した。

## 材料および方法

### 1. 試薬

テトラヒドロピオプテリン(BH<sub>4</sub>)はサントリー(現第一三共、東京)から提供された。セピアプテリン(SP)はSchircks Laboratories(Jona SG, Switzerland)、5-ヒドロキシ-L-トリプトファン(5HTP)、5HT、5HIAAおよび3-ヒドロキシベンジルヒドラジン(NSD-1015)はSigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)から購入した。

### 2. 細胞

ラット好塩基性白血病由来株化細胞のRBL2H3は、JCRB細胞バンク(医薬基盤・健康・栄養研究所、茨木)から購入し、10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)で、通常に従って5% CO<sub>2</sub>、37℃の環境下で単層培養した。実験には、あらかじめTPHを活性化させた細胞を使用した<sup>23)</sup>。すなわち、96ウェル培養プレートに1ウェルあたり1×10<sup>5</sup>個になるようにRBL2H3を播種し、18時間培養した後、A23187(30 nM)を含むDMEMで細胞を2時間培養し、さらにA23187を除いて4時間培養することで細胞のTPHを活性化した。

### 3. マウスへのBH<sub>4</sub>またはSPの投与

動物実験は帝京科学大学実験動物委員会の許可を得(B-08005)た後、同委員会の「動物実験実施規定」および日本薬理学会の「動物実験に関する日本薬理学会指針」に従って行った。実験には日本エスエルシーから購入したNZB/NSIcマウスとNZW/NSIcマウスとの交雑F1マウス(以下、BWF1)を使用した。マウスは室温21~24℃、湿度40~60%で、明期12時間、暗期12時間の明暗サイクル下で飼育した。BWF1マウスにBH<sub>4</sub>またはSPをそれぞれ腹腔内投与し(10 mg/kg)、所定時間に安楽死させて、血液、脳、および肝臓を採取した<sup>15)</sup>。採取した組織を氷冷した生理食塩水で洗浄した後、余分な水分を除去し秤量し、液体窒素で凍結後、-80℃で保存した。

4. *in vitro* BBB再構成系モデルを使用した透過度測定  
SPとBH<sub>4</sub>のBBB透過性の評価は、ラット*in vitro*

BBB検定モデルのBBBKit(RBT-24; ファーマコセル、長崎)を使用した。キットは、24ウェルプレートと多孔性膜インサート(#PISP 12R 48)から構成される立体細胞培養装置を使用して、ラット脳毛細血管内皮細胞、周皮細胞、および星状神経膠細胞(アストログリア)を共培養することで、生体内のBBBに近似したモデルを*in vitro*で構築した。キットの解凍と培養はマニュアルに従って行い、血管内皮細胞層のバリア機能は、EVOM resistance meter (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)で、経内皮電気抵抗(TEER)を測定することで評価した。実験には、TEERが150 Ω·cm以上に達した細胞(通常、解凍5日後の細胞)を使用した。SP、BH<sub>4</sub>および5HTPの輸送実験は、アストログリアを含まない24ウェルプレートに内皮細胞の密着したメンブレンインサートを移しておこなった。実験は、ジチオスレイトール(DTT, 1 mM)を含むハンクス平衡塩溶液を使用して、インサート(血液側; Luminal)にSP、BH<sub>4</sub>または5HTP(それぞれ100 μM)を添加し、30分間にインサートの外側(脳側; Abluminal)に移行した量、すなわちインサートをセットした24ウェルプレート内の溶液に含まれるSP、BH<sub>4</sub>、5HTP量を定量した。BBBの透過度を示す透過係数(Papp)は以下の式で算出した。

$$P_{app}(cm/s) = \frac{0.9cm^3}{0.33cm^2 \times [C]_{Luminal}} \times \frac{\Delta[C]_{Abluminal}}{\Delta t(min) \times 60s} \times 10^6$$

### 5. 培養細胞(生細胞)におけるTPH活性の測定

TPH活性は、Carlssonら<sup>24)</sup>の方法に従った。NSD-1015を加えて芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)活性を阻害し、5HTPから5HTの産生を停止させることで、一定時間に蓄積した5HTP量を測定した。実際は、活性化させた細胞にBH<sub>4</sub>(0~1 mM)またはSP(0~50 μM)を30分間取り込ませた後、細胞外のBH<sub>4</sub>またはSPを除去し、NSD-1015(400 μM)を含むDMEMに交換することでAADCの阻害を開始した<sup>25)</sup>。5HTPを30分間蓄積させた後、DTT(1 mM)と過塩素酸(PCA, 6%)を加えてTPHを失活させ、5HTPの蓄積量を測定した。

### 6. BH<sub>4</sub>関連化合物の定量

細胞内のBH<sub>4</sub>定量はTPH代謝アッセイ終了後、また組織中のBH<sub>4</sub>の定量は、組織重量の5倍の塩酸(0.1 M)で組織を破碎した後に実施した。BH<sub>4</sub>は主に、Fukushima & Nixon法に従って酸性/アルカリ性分別酸化によって定量した<sup>14,26)</sup>。細胞あるいは組織破碎液に酸性ヨード溶液(2% I<sub>2</sub>, 3% KI/0.1 M HCl)またはアルカリ性ヨード溶液(2% I<sub>2</sub>, 3% KI/0.2 M NaOH)を加え、室温で1時間の酸化反応をおこなった。その後、ヨード溶液と等量のアスコルビン酸(4%)を含むPCA(0.4 M)を加えて反応を終了した。反応液を遠心(14,000 rpm, 4℃, 10 min)し、得られた上清を高速液体クロマトグラフィー

(HPLC)／蛍光検出器によって分析した。HPLC の固定相は Finepak SIL C18T-5(日本分光, 八王子), 移動相は 7% メタノールを使用した。蛍光検出器(FP-920, 日本分光)は励起光 350 nm と蛍光 450 nm に設定した。なお, 培養細胞あるいは組織にみられる総ビオプテリン量(BH<sub>2</sub>とBH<sub>4</sub>の合計)に対するBH<sub>4</sub>の割合は, すべて 90%以上であった。

#### 7. 5HT 関連化合物の定量

脳内の 5HT と 5HIAA は, 組織の破砕液に DTT (1 mM) を含む PCA (6%) を加え, 遠心(14,000 rpm, 4 °C, 10 分)し, 得られた上清を HPLC/ 蛍光検出器によって定量した<sup>27)</sup>。HPLC の固定相は Finepak SIL C18 T-5(日本分光), 移動相は 40 mM 酢酸ナトリウム(pH3.5) : メタノール : アセトニトリルの割合が 100 : 5 : 7 の溶液を使用した。蛍光検出器(FP-920 ; 日本分光)の設定は, 励起光 302 nm と蛍光 350 nm とした<sup>23)</sup>。

#### 8. 統計学的分析

有意差検定は, 統計解析ソフト Pharmaco Basic, ver. 14(ヒューマンライフ, 東京)を用いて, Student *t*-検定, Tukey 検定あるいは Dunnett 検定を行った。個別データ群の近似曲線は, Microsoft Excel 16.55 の機能によって得た。

## 結 果

### 1. 脳血管壁モデルを利用した SP の BBB 透過性についての検討

BBB キットによって SP, BH<sub>4</sub>, および 5HTP のラット脳血管内皮細胞層の透過性を検討した結果を図 1 に示す。SP の透過係数は, BH<sub>4</sub> および 5HTP よりも有意に大きかったのに対して(Tukey 検定, SP vs BH<sub>4</sub> *P*=0.0121, SP vs 5HTP *P*=0.0443), BH<sub>4</sub> と 5HTP の透過係数は差が認められなかった。

### 2. SP と BH<sub>4</sub> がモノアミン産生細胞内の TPH 活性に与える影響

SP と BH<sub>4</sub> がモノアミン産生細胞に取り込まれ, 補酵素として TPH 活性を促進するかどうかを比較した結果を図 2 に示す。細胞内の BH<sub>4</sub> 量は, 投与した SP, および BH<sub>4</sub> の濃度の増加に伴って上昇した(図 2 a, 線形表示; 図 2 b, 片対数表示)。細胞内 BH<sub>4</sub> 量を添加したプテリン濃度の関数として求めた近似式は, それぞれ, BH<sub>4</sub>(SP) = 0.541*x* + 3.53 (*n*=47, *R*<sup>2</sup>=0.995) と BH<sub>4</sub>(BH<sub>4</sub>) = 0.0216*x* + 3.92 (*n*=48, *R*<sup>2</sup>=0.937) であり, その結果, SP は BH<sub>4</sub> の 25 倍効率よく細胞内に BH<sub>4</sub> を蓄積させた。

次に, SP または BH<sub>4</sub> を加えて培養した RBL2H3 の TPH 活性の変化を評価したところ(図 2 c, 線形表示; 図 2 d, 片対数表示), SP または BH<sub>4</sub> を加えない場合の細胞内 BH<sub>4</sub> 量は 3.23 ± 0.285 pmol/ ウェル (*n*=8) であり, このときの TPH 活性は 18.4 ± 1.11 pmol/30 min/ ウェル

(*n*=8) であった。TPH 活性は, 加えたプテリン濃度の増加に伴い飽和状態まで増加した。TPH 活性を 1.26 ~ 1.28 倍に増加させるのに必要な BH<sub>4</sub> 濃度は 3 μM であり, SP 濃度は 0.1 μM であった。また, BH<sub>4</sub> と SP を同じ濃度で加えた場合, SP を与えたほうが BH<sub>4</sub> を与えるよりも有意に TPH 活性が上昇した(Student *t*-検定, 1 μM, *P*=0.012 ; 10 μM, *P*=0.001 ; 30 μM, *P*=0.001)。

SP および BH<sub>4</sub> の添加によって増加した TPH 活性が, 細胞内 BH<sub>4</sub> 量の増加と相関しているかどうかを確認した。その結果, 細胞内 BH<sub>4</sub> 量に対する TPH 活性の二重逆プロットから得られた近似式が一次関数[図 3 e の破線; *y*(SP) = 0.0944*x* + 0.0199 (*R*<sup>2</sup>=0.815), 図 3 g の破線; *y*(BH<sub>4</sub>) = 0.112*x* + 0.0156 (*R*<sup>2</sup>=0.861)] であることから, ミカエリスメンテン式を使用して回帰曲線を求めた(図 3 f の破線; *R*<sup>2</sup>=0.852, 図 3 h の破線; *R*<sup>2</sup>=0.914)。得られた回帰曲線から算出された酵素パラメーター(K<sub>m</sub>, V<sub>max</sub>)は, SP 添加と BH<sub>4</sub> 添加とではほぼ等しかった(SP 添加では K<sub>m</sub>=3.46 pmol/ ウェル, V<sub>max</sub>=44.6 pmol/30 min/ ウェル, BH<sub>4</sub> 添加では K<sub>m</sub>=3.73 pmol/ ウェル, V<sub>max</sub>=46.1 pmol/30 min/ ウェル)。

### 3. 末梢投与された SP の各組織中 BH<sub>4</sub> レベルに与える影響

末梢から投与された SP が, 脳の 5HT 合成を促進するかどうかを検討するために, 血液, 肝臓, および脳内の BH<sub>4</sub> 量を定量した結果を図 3 に示す。プテリン投与前の BWF1 マウスの血液, 肝臓, 脳内の BH<sub>4</sub> 量はそれぞれ, 0.485 ± 0.031 nmol/mL, 5.38 ± 0.314 nmol/g, 0.537 ± 0.017 nmol/g であった。BH<sub>4</sub> または SP の投与によって血液中の BH<sub>4</sub> 量は上昇し, その後, 速やかに減少した(図 3 a)。肝臓にみられる BH<sub>4</sub> 量の経時変化は, 概ね血流中の BH<sub>4</sub> 量の変化と同じであった(図 3 b)。一方, SP 投与または BH<sub>4</sub> 投与による脳内の BH<sub>4</sub> 量の増加は, 末梢組織に比べて比較的小さかったが, SP の投与によって, 1 時間後までの BH<sub>4</sub> 量が定常値に比べて有意に高かった(Dunnett 検定, 0 hr vs 0.5 hr ; *P*<0.001, 0 hr vs 1 hr ; *P*=0.015, 図 3 c)。SP 投与 30 分後の脳内 BH<sub>4</sub> の平均値は, プテリン投与前の平均値よりも約 2.5 倍, BH<sub>4</sub> 投与では約 1.5 倍増加した(Dunnett 検定, BH<sub>4</sub> ; *P*<0.001)。なお, 摘出された脳に残留する血液量は, 脳組織重量の約 1.3% ほどであった。脳採取時の血液中の BH<sub>4</sub> 量(図 3 a)と脳組織中に残留する血液量から, 血液中の BH<sub>4</sub> 量を算出した結果, 脳組織で観察された BH<sub>4</sub> 増加分の約 15% 程度が残留血液のものだった。

そこで, 脳内の 5HT およびその代謝産物である 5HIAA を定量し, 5HT 合成と分解の速度(5HT 代謝回転)を 5HIAA/5HT で評価した。その結果, プテリン投与前の脳内 5HT, および 5HIAA 量はそれぞれ, 4.37 ±

0.272 nmol/g, 1.62±0.145 nmol/gであった。SPおよびBH<sub>4</sub>のどちらかを投与しても、脳内の5HT量に有意な変化は認められなかった。これに対して、SP投与では、5HIAAレベルの顕著な上昇が観察でき、投与1~14時間後までの5HIAA/5HTがSP投与前の値に比べて有意に高かった(Dunnett検定, 0 hr vs 1, 2, 6, 14 hr;  $P=0.006$ ,  $P<0.001$ ,  $P<0.001$ ,  $P<0.001$ , 図3d)。しかしBH<sub>4</sub>投与は、5HIAA/5HTを有意に増加させなかった。

考 察

哺乳動物において、BH<sub>4</sub>は新生合成経路<sup>28)</sup>とサルベージ経路<sup>29)</sup>によって生合成される。サルベージ経路は、BH<sub>4</sub>の新生合成経路における中間代謝産物の酸化によって生じたSPからBH<sub>2</sub>を経由してBH<sub>4</sub>を再生する経路である。つまりサルベージ経路の基質となるSPやBH<sub>2</sub>を投与した方が、BH<sub>4</sub>を投与した場合よりも細胞内のBH<sub>4</sub>の蓄積効率が上昇する<sup>14,21,22)</sup>。すなわち、通常、細胞内のSP濃度は検出限界以下のため、SP投与直後は細胞内外で生じるSPの濃度勾配は著しく高い。この濃度勾配に従い細胞内にSPが取り込まれるが、細胞内外のSP濃度が平衡に達すると取り込みは停止する。細胞内に取り込まれたSPはサルベージ経路の働きによって直ちにBH<sub>4</sub>に還元されるため、細胞内のSP濃度は上昇しない。したがって細胞内外のSPの濃度勾配は常に高い状態のまま維持され、細胞内にSPが取り込まれ続け、BH<sub>4</sub>

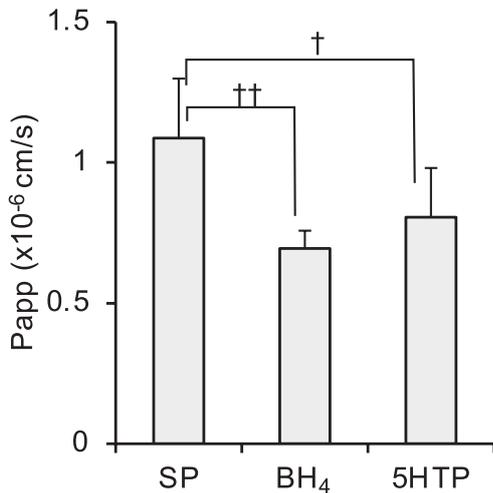


図1 SP, BH<sub>4</sub>, および5HTPの脳血管壁モデル透過性  
多孔性膜上にラット脳血管内皮細胞を単層培養(主に5日間)し、電気抵抗が150 Ω・cm<sup>2</sup>に達した細胞シートを用いた。BBBキットのインサート(血液側)にSP, BH<sub>4</sub>, および5HTP(それぞれ100 μM)添加し、脳側に移行した量を定量し、算出した透過係数を示した。SPのBBB透過性はBH<sub>4</sub>と5HTPに比べて有意に高かった。各データは平均値±標準偏差で表した。SP vs BH<sub>4</sub>, SP vs 5HTP, BH<sub>4</sub> vs 5HTP, †  $P<0.05$ , ††  $P<0.01$ (Tukey検定, n=4~6)

が蓄積する<sup>20)</sup>。しかし、投与されたBH<sub>4</sub>は、細胞内外の濃度勾配が平衡に達した時点で、その輸送は停止するの

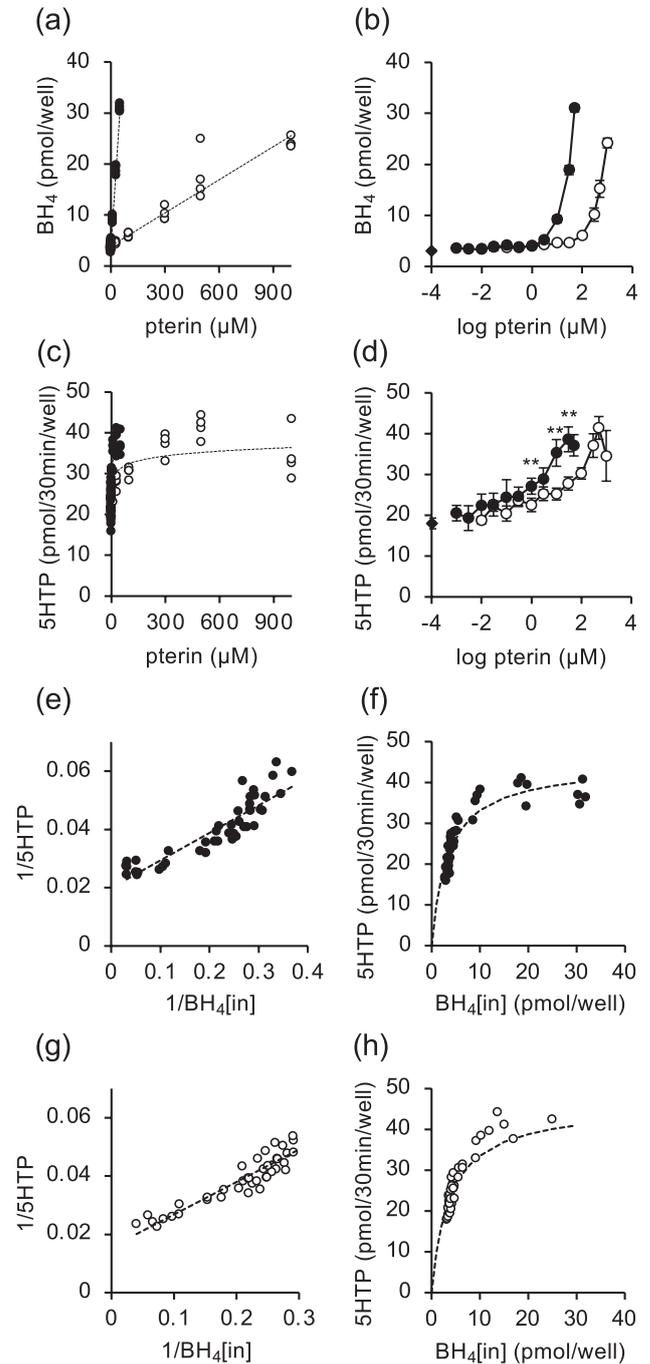


図2 SPとBH<sub>4</sub>の細胞内BH<sub>4</sub>補充効率とTPHの活性促進効果の比較  
SP(●), およびBH<sub>4</sub>(○)添加後の細胞内BH<sub>4</sub>量(a:線形表示, b:片対数表示)とTPHの活性(c:線形表示, d:片対数表示)を示した。(a)と(c)は個別データを示し,(b)と(d)は平均値±標準偏差で表した(n=4)。細胞内BH<sub>4</sub>とTPH活性二重逆プロット(e, g)とミカエリスメンテン式を使用して細胞内BH<sub>4</sub>量に対するTPH活性の回帰曲線を示した(f, h)。SP添加のTPH活性 vs BH<sub>4</sub>添加のTPH活性\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ (Student *t*-検定, n=4)

で、SP 投与に比べて BH<sub>4</sub> 補充効率が著しく低い<sup>20)</sup>。一方、ビオプテリン化合物の細胞膜輸送において、平衡型核酸輸送体 1 (ENT1) と ENT2 が関与し、それらの基質親和性は BH<sub>4</sub> より SP の方が高いことが報告されている<sup>30)</sup>。これは細胞内の BH<sub>4</sub> 補充に関して、SP は BH<sub>4</sub> よりも効率的に細胞内へ取り込まれることを裏づけるものである。これらの報告から、SP が代謝されるサルベージ経路と ENT の基質親和性が細胞内の BH<sub>4</sub> 補充における優位性を決定していると考えられる。ENT1 と ENT2 は脳においても発現し<sup>31)</sup>、また脳内でもサルベージ経路が機能することから<sup>32)</sup>、脳内への BH<sub>4</sub> 補充に関しては SP を投与した方が、より効率的に働くと考えられる。

末梢投与された SP が中枢の 5HT 生合成を促進するには、BBB を通過した後、5HT 産生細胞に取り込まれ、細胞内で還元された BH<sub>4</sub> が TPH を活性化する必要がある<sup>1)</sup>。そこで最初の関門である BBB を SP が透過できるかどうかを *in vitro* 脳血管壁モデルを使用して検討した。その結果、SP、BH<sub>4</sub>、および 5HTP の BBB 透過量は、脳血管内皮細胞をほとんど通過しない水溶性化合物であるスクロースとほぼ等しかった ( $1.05 \times 10^{-6}$  cm/sec)<sup>33)</sup> ことから、これらの水溶性化合物の BBB を通過する能力は、著しく低いことが明らかになった。しかし、脳内の 5HT 不足の治療ために末梢投与される 5HTP は、脳内の 5HT レベルを上昇させる<sup>13)</sup>。これは投与した 5HTP が僅かではあるが、BBB を通過して脳内のモノアミン産生細胞に取り込まれ、細胞内の AADC によって 5HT に変換されたことを意味する。これに対して、BH<sub>4</sub> の末梢投与は、脳内のモノアミン生合成を促進しない<sup>7-11)</sup> ことから、たとえ僅かに BBB を通過できたとしても、BH<sub>4</sub> はモノアミン産生細胞内には取り込まれず、5HT の合成活性も促進しないと考えられる。すなわち、5HTP と BH<sub>4</sub> の中枢作用の有無は BBB 透過性の他に、モノアミ

ン作動性神経細胞の取り込み量にも依存すると考えられた。

5HT 産生細胞に取り込まれた SP からサルベージ経路によって変換された外因性の BH<sub>4</sub> が、TPH 活性を促進するかどうかを検討した結果、BH<sub>4</sub> を投与した場合よりもはるかに低い濃度の SP によって細胞内 TPH 活性が促進することが確認できた。この事実は、SP が BH<sub>4</sub> よりも効率良く細胞内の BH<sub>4</sub> 量を蓄積できることを裏付けた。また、本研究から生細胞 (RBL2H3) 内の BH<sub>4</sub> 濃度とそれに対応する TPH 活性が初めて明らかになった。今回、生細胞において測定された TPH 活性の Km 値は 3.46 pmol/ ウェルであり、この値は RBL2H3 の内因性 (プテリンを与えない場合) BH<sub>4</sub> 量とほぼ同程度であった。また、測定された最大活性 (Vmax) は 44.6 pmol/30 min/ ウェルであり、内因性の TPH ( $18.4 \pm 1.11$  pmol/30 min/ ウェル) の約 2 倍であった。これは RBL2H3 のもつ内因性の BH<sub>4</sub> 濃度が TPH の Km と近似していることを意味している。さらにこの値は、ラットの脳への BH<sub>4</sub> の直接投与した報告と<sup>2)</sup>、脳スライスに BH<sub>4</sub> を浸漬させた報告<sup>6)</sup> からそれぞれ得られた TPH の BH<sub>4</sub> における Km 値とほぼ一致した。これらの結果は、生細胞における TPH 活性は、細胞内の BH<sub>4</sub> 量の増加に依存すること、および添加した SP または BH<sub>4</sub> によって細胞内に増加した外因性の BH<sub>4</sub> も内因性の BH<sub>4</sub> と同様に補酵素として利用されることを示した。つまり、SP は細胞内 BH<sub>4</sub> 量を効率的に増加させることで、TPH 活性を顕著に上昇させることが明らかになった。

マウスに SP を腹腔内投与し、末梢組織と脳内の BH<sub>4</sub> 量の変化を観察した結果、末梢組織における SP 投与または BH<sub>4</sub> 投与による BH<sub>4</sub> 量の経時変化は、系統の異なるマウス (C57 BL/6 J) を用いたこれまでの報告<sup>14)</sup> と矛盾はなかった。一方、脳内の BH<sub>4</sub> 量の増加は、末梢組織の

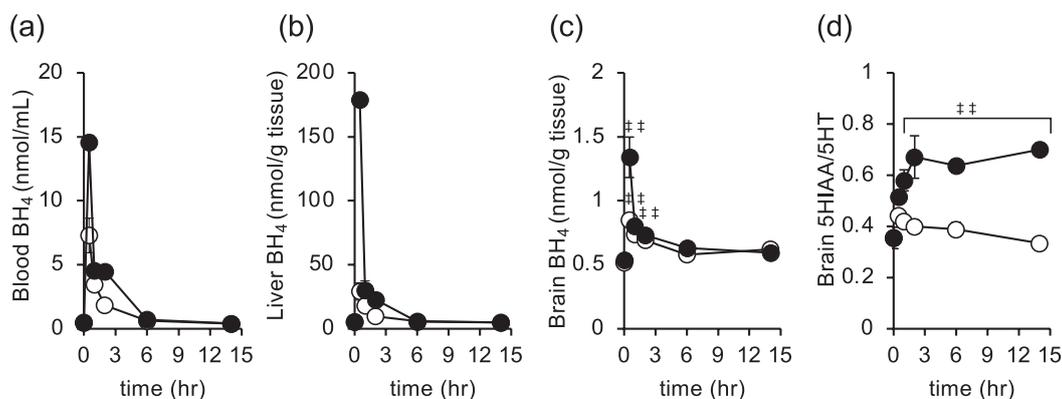


図 3 SP または BH<sub>4</sub> 投与後の末梢組織と脳内の BH<sub>4</sub> 量、および脳内 5HT 代謝の経時変化  
SP (●), および BH<sub>4</sub> (○) の投与後の血液 (a), 肝臓 (b), 脳 (c) 内の BH<sub>4</sub> 量、および脳内の 5HT と 5HIAA 量とその比率 (5HIAA/5HT) (d) の経時変化を示した。それぞれの値は平均値 ± 標準誤差で表した (n = 4~8)。脳内 BH<sub>4</sub> 量 : 0 hr (非投与) vs 0.5, 1, 2, 6, 14 hr, 脳内 5HIAA/5HT : 0 hr (非投与) vs 0.5, 1, 2, 6, 14 hr, † P < 0.05, †† P < 0.01 (Dunnnett 検定)

BH<sub>4</sub>増加に比べてその変化は甚だ小さかったが、脳においてもBH<sub>4</sub>の増加が示された。SP投与とBH<sub>4</sub>投与の両方で、脳におけるBH<sub>4</sub>の有意な増加が確認できたことは、従来、BBBの存在で無効と考えられていたBH<sub>4</sub>の末梢投与でも脳内BH<sub>4</sub>濃度を上昇させることを示すものである。一方、末梢からSPを投与しても脳内の5HT量の有意な増加は認められなかったが、5HTの分解産物である5HIAA量が増加し、5HTの合成と分解の速度(代謝回転)を示す5HIAA/5HTが持続的に高いレベルを保っていた。5HTの分解量に依存する5HIAA量が増加したにもかかわらず、5HTが減少しなかったことは、脳内の5HT合成が促進したためと推測される。

### 結 論

SPを細胞およびマウス腹腔へ投与して、BH<sub>4</sub>の増加と、それに伴う5HTの代謝促進作用を検討し、以下の結論を得た。

1. SPのBBB透過性は低く、BH<sub>4</sub>と同程度であった。
2. SPは5HT産生細胞内にBH<sub>4</sub>を補充する効率が優れており、BH<sub>4</sub>を投与した場合よりもはるかに低い濃度で細胞内TPH活性を促進できた。
3. 末梢投与したSPが脳内5HT合成を促進し、5HT代謝回転を亢進することを明確にした。

以上のことから、SPの末梢投与による脳内のモノアミン合成の促進は、モノアミン神経伝達物質の低下に伴う神経疾患患者に有効となる可能性が示唆された。

なお、本研究の一部は、日本大学総合歯学研究所研究費(B)、日本大学歯学部佐藤研究費、JSPS科研費JP19K10079およびJSPS科研費JP20K09999によってなされた。

本論文に関して、開示すべき利益相反はない。

### 文 献

- 1) Werner ER, Blau N, Thony B (2011) Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. *Biochem J* 438, 397-414.
- 2) Miwa S, Watanabe Y, Hayaishi O (1985) 6R-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.
- 3) Koshimura K, Ohue T, Watanabe Y, Miwa S (1993) 6R-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin: a regulator of neurotransmitter release. *Adv Exp Med Biol* 338, 313-319.
- 4) Koshimura K, Takagi Y, Miwa S, Kido T, Watanabe Y, Murakami Y, Kato Y, Masaki T (1995) Characterization of a dopamine-releasing action of 6R-L-erythro-tetrahydrobiopterin: comparison with a 6S-form. *J Neurochem* 65, 827-830.
- 5) Schaub J, Daumling S, Curtius HC, Niederwieser A, Bartholome K, Viscontini M, Schircks B, Bieri JH (1978) Tetrahydrobiopterin therapy of atypical phenylketonuria due to defective dihydrobiopterin biosynthesis. *Arch Dis Child* 53, 674-676.
- 6) Sawada M, Sugimoto T, Matsuura S, Nagatsu T (1986) (6R)-tetrahydrobiopterin increases the activity of tryptophan hydroxylase in rat raphe slices. *J Neurochem* 47, 1544-1547.
- 7) Kettler R, Bartholini G, Pletscher A (1974) *In vivo* enhancement of tyrosine hydroxylation in rat striatum by tetrahydrobiopterin. *Nature* 249, 476-478.
- 8) Niederwieser A, Curtius HC, Wang M, Leupold D (1982) Atypical phenylketonuria with defective biopterin metabolism. Monotherapy with tetrahydrobiopterin or sepiapterin. screening and study of biosynthesis in man. *Eur J Pediatr* 138, 110-112.
- 9) 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.
- 10) Curtius H-C, Ghisla S, Hasegawa H, Blau N, Rebrin I (1993) Progress in the study of biosynthesis and role of 7-substituted pterins: function of pterin-4 a-carbinolamine dehydratase. *Adv Exp Med Biol* 338, 107-110.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) Blau N, Burgard P (2006) Disorders of phenylalanine and tetrahydrobiopterin metabolism. *Physician's guide to the diagnosis, treatment, and follow-up of metabolic diseases*, Blau N, Duran M, Gibson KM, Vici CD, Springer-Verlag, Heidelberg, 25-34.
- 14) 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.
- 15) Sawabe K, Saeki Y, Ohashi A, Mamada K, Wakasugi KO, Matsuoka H, Hasegawa H (2009) Tetrahydrobiopterin in intestinal lumen: its absorption and secretion in the small intestine and the elimination in the large intestine. *J Inherit Metab Dis* 32, 79-85.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
  - 19) 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.
  - 20) Sawabe K, Yamamoto K, Harada Y, Ohashi A, Sugawara Y, Matsuoka H, Hasegawa H (2008) Cellular uptake of sepiapterin and push-pull accumulation of tetrahydrobiopterin. *Mol Genet Metab* 94, 410-416.
  - 21) Yamamoto K, Nagano M, Nakanishi N, Hasegawa H (1996) A comparison of sepiapterin and tetrahydrobiopterin uptake by RBL2H3 cells. *Pteridines* 7, 154-156.
  - 22) Sawabe K, Yamamoto K, Kamata T, Wakasugi KO, Hasegawa H (2001) Sepiapterin administration raises tissue BH4 levels more efficiently than BH4 supplement in normal mice. *Chemistry and biology of pteridines and folates*. Milstien S, Kapatoss G, Levine RA, Shane B, Kluwer Academic Publishers, Boston, 199-204.
  - 23) Hasegawa H, Kojima M, Iida Y, Oguro K, Nakanishi N (1996) Stimulation of tryptophan hydroxylase production in a serotonin-producing cell line (RBL2H3) by intracellular calcium mobilizing reagents. *FEBS Lett* 392, 289-292.
  - 24) Carlsson A, Davis JN, Kehr W, Lindqvist M, Atack CV (1972) Simultaneous measurement of tyrosine and tryptophan hydroxylase activities in brain *in vivo* using an inhibitor of the aromatic amino acid decarboxylase. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 275, 153-168.
  - 25) Hasegawa H, Oguro K, Naito Y, Ichiyama A (1999) Iron dependence of tryptophan hydroxylase activity in RBL2H3 cells and its manipulation by chelators. *Eur J Biochem* 261, 734-739.
  - 26) Fukushima T, Nixon JC (1980) Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids. *Anal Biochem* 102, 176-188.
  - 27) Iida Y, Sawabe K, Kojima M, Oguro K, Nakanishi N, Hasegawa H (2002) Proteasome-driven turnover of tryptophan hydroxylase is triggered by phosphorylation in RBL2H3 cells, a serotonin producing mast cell line. *Eur J Biochem* 269, 4780-4788.
  - 28) 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.
  - 29) Fukushima T (1970) Biosynthesis of pteridines in the tadpole of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Arch Biochem Biophys* 139, 361-369.
  - 30) 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.
  - 31) Lu H, Chen C, Klaassen C (2004) Tissue distribution of concentrative and equilibrative nucleoside transporters in male and female rats and mice. *Drug Metab Dispos* 32, 1455-1461.
  - 32) Koshimura K, Miwa S, Watanabe Y (1994) Dopamine-releasing action of 6 R-L-erythro-tetrahydrobiopterin: analysis of its action site using sepiapterin. *J Neurochem* 63, 649-654.
  - 33) Nakagawa S, Niwa M (2014) Isolation of cells constituting the blood-brain barrier and reconstruction of the *in vitro* BBB model. *Nihon Yakugaku Zasshi*, 143, 137-143.