

## 寄附講座「救急集中治療生命科学研究講座」における成果報告書

### 1 部局名

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

### 2 寄附講座等の名称

救急集中治療生命科学研究講座

### 3 設置期間

令和5年4月1日～令和8年3月31日

### 4 寄附者

社会医療法人 恒心会

### 5 寄附金額

計 3,660万円（令和5年度～令和7年度）

### 6 担当教員名及び職名

新山 修平 教授：令和7年4月1日～令和8年3月31日

原 怜 特任助教：令和5年4月1日～令和7年5月31日

岩永 千尋 特任助教：令和7年6月1日～令和8年3月31日

垣花 泰之 教授：令和5年4月1日～令和7年3月31日

客員教授：令和7年4月1日～令和8年3月31日

### 7 研究課題および成果

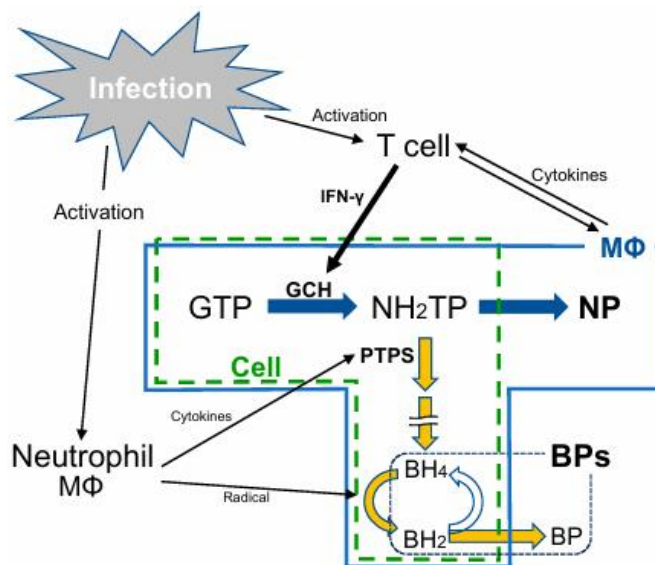
生理活性を有する還元型ビオプテリン（テトラヒドロビオプテリン；BH4）はカテコールアミンやセロトニン生合成の律速段階を触媒するチロシン水酸化酵素やトリプトファン水酸化酵素の補酵素である。それ以外にもBH4はフェニルアラニン代謝に働くフェニルアラニン水酸化酵素や、一酸化窒素(NO)産生に関与するNO合成酵素（NOS）の必須の補酵素でもある。このようにBH4は神経系や内分泌系、免疫系、循環系など生体内の様々な機能の調節因子として重要な働きをしている。特にeNOS（endothelial NOS）は、主に血管の弛緩や血管内皮への細胞接着、および血小板凝集能の抑制など血管の恒常性を維持しているため、重篤な病態における微小循環障害を回避するにはBH4の働きが重要である。BH4は、補酵素として利用された後、酸化されBH2へと変換されるが、ジヒドロプテリジン還元酵素（DHPR）の働きにより直ちにBH4へと再還元されている。しかし、炎症や侵襲により還元酵素の働きが低下すると、BH2からBH4への還元が障害される。BH4とBH2はNOSへの結合過程で競合し、BH2がNOSに結合するとNOではなくスーパーオキシドラジカルを放出することになる。さらに水酸化ラジカルや、ペルオキシナイトライトなどの活性酸素を生成するため、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がさらに増加し、内皮細胞障害、多臓器不全などに繋がることがわかっている。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も、BH2比率の上昇が確認され、内皮細胞障害にともなう血管拡張反応低下がこれら疾患の主要な病因であることが明らかになってきた。さらに、最近の我々の研究においても敗血症性ショックにおいてはBH2/BH4の上

昇が認められ、内皮細胞機能障害や多臓器不全と密接に関連 [Madokoro et al. (2022) *Front Pharmacol*] していることもわかってきた。

ネオプテリン (NP) は生体内で様々な生理機能を担うBH4の中間代謝産物で、細胞性免疫活性化の指標として知られている。またビオプテリン (BP : BH4、BH2、BP) は同一代謝経路に属する関連物質であり、感染症で変動することが知られている。なお、BPsはBH4+BH2+BPを意味する (図)。

我々はNPがCOVID-19などのウイルス疾患で感染早期から著明に増加することを見出してきた [Hara et al. (2022) *Helvion*]。血中ネオプテリンはHIVや肝炎ウイルスなど幅広いウイルス感染で感染の初期から増加することが報告されており、EUでは献血された血液のウイルス感染の有無を調べる検査として実際に導入されている。

そこで重症感染症におけるBH4、BH2、BPおよびNPの早期バイオマーカーとしての役割、また基礎実験系においてそれら代謝系の解明を行った。



### ① 「COVID-19 患者および二次性細菌感染患者における血中NPおよびBPsの比較研究」研究業績6

【研究の背景および目的】 COVID-19は重症化する可能性があり、さらに入院患者では二次性細菌感染がしばしば合併し、死亡率を大きく上昇させる。実臨床では重症化の早期予測と細菌感染の早期検出に役立つバイオマーカーが求められる。そこで本研究では我々は血中NPとBPsの比較検討を行った。【方法と対象】 COVID-19患者52名 {重症群 (挿管+人工呼吸管理) 10名、中等症群 (非挿管+酸素投与) 42名}。測定項目として血漿NP、血漿BPs、IFN- $\gamma$ 、リンパ球数、CRPおよびIL-6を計測した。重症群のうち4名は治療中に二次性細菌感染を発症した。比較対象として、細菌性敗血症 (ウイルス感染なし) 患者 25 名の NP/BPsも測定した。【主要な結果】 重症COVID-19 群ではNPs、IL-6、CRP、SOFAスコアが有意に高値であった。一方、IFN- $\gamma$ とリンパ球数は低値で、免疫抑制と炎症亢進が同時に存在していた。NPの上昇は発症後1週間までに限られ、時間依存性が示唆された。二次性細菌感染を合併した患者ではBPsが上昇し、細菌感染の指標として有用である可能性が示された。細菌性敗血症患者でもBPsは高値であり、ウイルス感染とは異なる代謝反応が示唆された。【結論】 血漿NPによって重症度を評価するには、検体採取のタイミングが重要である。一方、血漿BPsは、COVID-19患者における二次性細菌感染の発症を特定するための有用な診断ツールとなり得る。同じ生合成経路に参与するNPとBPsが、病原体の種類によって異なる形で活性化されるメカニズムを明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

### ② 「キノノイド型ジヒドロビオプテリンの結合プロファイル：キノノイド型ジヒドロプテリジンレダクターゼを対象とした in silico および in vitro 解析」研究業績3

【研究の背景および目的】 キノノイド・ジヒドロプテリジンレダクターゼ (GDPR) は、キノノイド型ジヒドロビオプテリン (qBH2) を BH4に還元する重要酵素である。BH4は神経伝達物質合成に不可欠であり、また寄生原虫 (*Leishmania*, *Trypanosoma*) が外因性ビオプテリンを必要とすることから、

感染症治療の創薬ターゲットとしても注目されている。しかし、qBH2が不安定なため、QDPRの詳細な反応機構は十分に解明されていない。【方法】研究では以下の2つのアプローチを組み合わせている。in silico（計算科学）解析（ドッキングシミュレーションで qBH2の結合様式を予測、分子動力学（MD）シミュレーションで最も妥当な結合モードを検証）と in vitro（実験）解析（変異体QDPRを用いて、計算で予測された結合様式が実際の酵素反応と一致するかを検証）である。【主要な結果】qBH2の最も妥当な結合モードが原子レベルで明らかになった。予測された結合様式は、QDPR変異体の実験データと一致し、モデルの妥当性が確認された。キノノイド型ジヒドロ葉酸（qDHF）もQDPRの生理的基質となり得ることが示され、QDPRが二機能酵素である可能性が示唆された。【結論】QDPRの基質結合機構が明確化され、ピオプテリン代謝と葉酸代謝の両方に関与する可能性が示された。

### ③ 「QDPRの阻害はメトトレキサートと協調して、細胞内BH4プロファイルを相乗的に調節する」研究業績5

【研究の背景および目的】BH4は容易に酸化され qBH2となるため、QDPRがqBH2をBH4に戻す役割を担う。しかし、QDPRの特異的阻害剤が存在しなかったため、BH4代謝制御の詳細は不明だった。そこで本研究ではQDPRの特異的阻害剤を探索し、その作用機序と細胞内BH4代謝への影響を明らかにする。さらに、DHFR阻害剤であるメトトレキサート（MTX）との併用効果を検証する。【方法】ハイスループットスクリーニングによりQDPR阻害剤「Compound 9b」を同定（ $IC_{50} = 0.72 \mu M$ ）した。酵素動態解析および分子動力学シミュレーションで阻害機構を解析した。HepG2、Jurkat、SH-SY5YおよびPC12D細胞で、9b単独および9b+MTXの細胞内BH4/BH2バランスを測定した。【主要な結果】9bはQDPRを強力に阻害し、BH4の酸化型（BH2）への偏りを増加させた。9bとMTXを併用すると、細胞内の酸化還元状態が著しく酸化側に傾いた。これは、QDPRとDHFRの2つのBH4再生経路を同時に阻害したためと考えられた。この相乗効果により、MTXの抗がん作用・免疫抑制作用が増強される可能性が示唆された。【結論】QDPR阻害剤9bは、BH4代謝を強力に制御できる新規化合物である。MTXとの併用により、BH4の酸化還元バランスを大きく変化させ、治療効果を高める可能性がある。BH4代謝制御は、がんや自己免疫疾患治療の新たな戦略となり得る。

### ④ 「細菌性およびウイルス性免疫刺激による NF- $\kappa$ B 経路を介した GTP シクロヒドロラーゼ I 遺伝子の転写制御」研究業績8

【研究の背景および目的】免疫刺激によりマクロファージで BH4が増加することが知られているが、どの転写経路がGCH1を制御しているかは十分に解明されていなかった。そこで、細菌性刺激（LPS）およびウイルス様刺激（poly(I:C)、R848）が どの細胞内シグナル経路を介してGCH1発現を誘導するのかを明らかにする。【方法】マクロファージ様細胞 RAW264.7を用いて、LPS（細菌由来）、poly(I:C)、R848（RNAウイルスに対するTLRリガンドのアナログ）によるGCH1発現量とBH4量の変化を測定した。NF- $\kappa$ B経路阻害剤を用いて、転写誘導の依存性を解析した。ルシフェラーゼレポーター解析により、GCH1遺伝子のどの領域が誘導に必要なかを特定した。マウス腹腔マクロファージを用いた in vivo 検証も実施した。【主な結果】LPS、poly(I:C)、R848のいずれもGCH1発現とBH4量を増加させた。NF- $\kappa$ B経路阻害剤により、この誘導は強く抑制された。つまりGCH1発現はNF- $\kappa$ B 依存的に制御されていることが示唆された。LPSによる GCH1誘導に必須の領域は、エクソン1の5' 非翻訳領域（149 bp）であることを初めて特定した。マウス腹腔マクロファージでも、NF- $\kappa$ B阻害によりLPS誘導性GCH1発現が強く抑制された。【結論】細菌性およびウイルス様免疫刺激は、NF- $\kappa$ B 経路を介して GCH1遺伝子の転写を誘導し、BH4 合成を増加させる。これは、炎症時にBH4が増加する分子基盤を説明する重要な知見であり、痛み・炎症・免疫応答の制御機構の理解に寄与する。

さらにもう一つの研究の柱である高齢者の認知機能低下とBH4の関連を検討し論文作成中（R8年3月末時点）である。

認知症の中で最も多いアルツハイマー型認知症は、脳神経が変性して脳の一部が萎縮していく疾患であり、次いで多い血管性認知症は、脳梗塞や脳出血などの脳血管障害によっておきる認知症である。これらの認知症は、糖尿病や脳血管障害など生活習慣から引き起こされる病気との関連が強く示唆されており、一方、生活習慣病の発症には、BH2比率の上昇（BH4の低下）が関与していることが確認されている。BH4は、フェニルアラニン代謝を司るフェニルアラニン水酸化酵素の補酵素である。また、神経伝達物質やホルモンとして働くドーパミン・ノルアドレナリン・アドレナリンやセロトニン・メラトニンなどの生理活性アミンの生合成、血管弛緩因子や逆行性神経伝達物質であるNOの生合成、脂質代謝に関わるグリセリルエーテルモノオキシゲナーゼなど重要な酵素反応の補酵素として多様な生理機能に関与している。前頭側頭型認知症（frontotemporal dementia, FTD）の髄液中のBPs値は、健常者と比較して70%に低下していることが報告され、BH4欠乏症では、ドーパミン欠乏や高フェニルアラニン血症により認知機能低下を呈することが報告されている。Satoら（Sci Adv. 7:eabd5046, 2021）は、認知症モデルマウスに7種類のアミノ酸を摂取させたところ、異常なタンパク質の蓄積に打ち勝って、神経細胞死による脳の萎縮が顕著に抑制されることを報告しており、高齢者の認知症発症にアミノ酸代謝が大きく関連していることは明らかである。つまり、高齢者の認知症発症に生理活性アミンの生合成や血管内皮細胞の機能維持に重要な働きをしているBH4の産生低下やBH4への還元機能低下が関与している可能性がある。BH4低下と認知機能障害の関連が認められれば、認知症発症に新たなメカニズムを提示することになる。

⑤ 「NPを指標とした免疫活性化は、高齢期の認知症関連の機能障害および全般的認知機能と独立して関連する：免疫-代謝横断解析」（R8年3月末時点で論文投稿準備中）

【研究の背景および目的】認知機能障害や認知症に関連する機能低下は、免疫および代謝の異常を伴う全身性の状態として認識されつつある。しかし、免疫活性化や関連する代謝経路が独立してどの程度寄与しているかは明らかでない。本研究では、免疫活性化およびビオプテリン代謝の指標が、高齢期の認知機能および日常生活機能の低下と関連するかを検討した。【方法】高齢者

（施設入所中の基準を満たした83名を対象）の横断研究において

Variable	DCS (n = 83) $\beta$ (95% CI)	p value	HDS-R (n = 83) $\beta$ (95% CI)	p value
Age, years	0.249 (0.052 to 0.446)	0.0136	-0.251 (-0.535 to 0.032)	0.0814
Sex, female	0.534 (-1.23 to 2.301)	0.548	0.761 (-1.784 to 3.307)	0.5532
Tetrahydrobiopterin (BH <sub>4</sub> ), nmol/L	-0.447 (-1.194 to 0.299)	0.2365	0.077 (-0.999 to 1.154)	0.8865
<b>Neopterin (NP), nmol/L</b>	<b>0.131 (0.038 to 0.222)</b>	<b>0.0061</b>	<b>-0.147 (-0.28 to -0.014)</b>	<b>0.0299</b>
eGFR, mL/min/1.73 m <sup>2</sup>	0.077 (0.021 to 0.134)	0.0082	-0.08 (-0.162 to 0.0017)	0.0549
C-reactive protein, mg/dL	-0.675 (-1.823 to 0.471)	0.2445	-0.768 (-2.423 to 0.886)	0.3578

て、認知症関連の機能障害はDementia Composite Score (DCS)、全般的な認知機能は長谷川式認知症スケール改訂版 (HDS-R) を用いて評価した。血漿中のプテリジン類 (NPおよびビオプテリン関連指標) と特定のアミノ酸を測定した。年齢、性別、腎機能、炎症を調整した多変量解析により関連を検討した。【主要な結果】NPの高値は、より高度な機能障害および低い認知スコアと独立して関連していた (表)。この関連は、NPをNP/BPs比に置き換えても一貫していた。BH4は機能障害の悪化と非有意ながら正の関連を示し、BH2は機能障害と逆相関したが、認知機能とは関連しなかった。アミノ酸関連指標の関連はより弱かった。【結論】NPを指標とした免疫活性化は、高齢期の認知および機能障害と独立して関連しており、加齢に伴う脆弱性を免疫・代謝経路が関与する可能性を支持する。

## 8 研究業績

1. Nago-Iwashita Y, Moriya Y, Hara S, Ogawa R, Aida R, Miyajima K, Shimura T, Muramatsu S I, Ide S, Ikeda K, Ichinose H. Overexpression of tyrosine hydroxylase in dopaminergic neurons increased sensitivity to methamphetamine. *Neurochem Int*;164:105491, 2023.
2. Shimono K, Ito T, Kamikokuryo C, Niiyama S, Yamada S, Onishi H, Yoshihara H, Maruyama I, Kakihana Y. Damage-associated molecular patterns and fibrinolysis perturbation are associated with lethal outcomes in traumatic injury. *Thromb J*;21(1):91, 2023.
3. Kono H, Hara S, Furuta T, Ichinose H. Binding profile of quinonoid-dihydrobiopterin to quinonoid-dihydropteridine reductase examined by in silico and in vitro analyses. *J Biochem*;174(5):441-450, 2023.
4. Yamaguchi H, Hara S, Ichinose H, Nagasaki H, Nakashima A. Role of NT5DC2 in tyrosine hydroxylase phosphorylation based on the analysis of NT5DC2-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun*;703:149698, 2024.
5. Hara S, Kono H, Suto N, Kojima H, Kishimoto K, Yoshino H, Niiyama S, Kakihana Y, Ichinose H. Inhibition of QDPR synergistically modulates intracellular tetrahydrobiopterin profiles in cooperation with methotrexate. *Biochem Biophys Res Commun*;717:150059, 2024.
6. Eguchi T, Niiyama S, Kamikokuryo C, Madokoro Y, Shimono K, Hara S, Ichinose H, Kakihana Y. Comparative Study of Blood Neopterin and Biopterins in Patients with COVID-19 and Secondary Bacterial Infection. *J Clin Med*;13(15):4365, 2024.
7. Sagata Y, Kamikokuryo C, Madokoro Y, Niiyama S, Kakihana Y. Analysis of changes over time in blood amino acids during online hemodia-filtration dialysis in acute liver failure patients with hepatic encephalopathy. *Adv Exp Med Biol*;1463:129-134, 2024.
8. Ozawa M, Hara S, Sakamoto M, Suzuki T, Niiyama S, Kakihana Y, Ichinose H. Transcriptional regulation of the GTP cyclohydrolase I gene via the NF- $\kappa$ B pathway by bacterial and viral immune stimulants. *J Biochem*;179(1):51-59, 2026.