

ビオチン欠乏がラット海馬に及ぼす影響

Effects of biotin deficiency on rat hippocampuses

遠藤 伸¹, 吉田しおり¹, 崎田克康³, 永井哲志⁴, 上條信一⁵,
前橋 賢⁶, 柏崎直巳², 二宮博義¹, 猪股智夫¹

¹麻布大学 獣医学部 実験動物学研究室, ²麻布大学 獣医学部 動物繁殖学研究室, ³日本動物愛玩協会,
⁴南大谷クリニック, ⁵三菱化学生命科学研究所, ⁶本荘第一病院

Shin Endo¹, Shiori Yoshida¹, Katsuyasu Sakita³, Tetsushi Nagai⁴, Shinichi Kamijo⁵,
Masaru Maebashi⁶, Naomi Kashiwazaki², Hiroyoshi Ninomiya¹, Tomo Inomata¹

¹ Lab. of Anim. Sci., Azabu Univ. and

² Lab. of Anim. Reprod., Azabu Univ., Kanagawa,

³ Pet Care Assoc., Tokyo,

⁴ Minamiohya Clin., Tokyo,

⁵ Mitubishikagaku Inst., Tokyo, and

⁶ Honjo Daiichi Hosp., Akita, Japan

Abstract. We previously confirmed that learning ability of a biotin-deficient (BD) rat decreased and LTP of its hippocampus was suppressed. In this study, the neurogenesis of hippocampal dentate gyruses of rats in BD conditions were investigated immunohistochemically. Wistar strain rats, 3-week-old, were fed BD diet. BD group was subjected to daily i.p. injection of saline for 5 weeks. Control (BS) group received same diet with daily injection of biotin (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.). The rats of the BD and BS groups were administered 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, 50 mg/kg, i.p.) every 5 days, at a total of 4 times before autopsy. After exsanguination under anesthesia, the brains were removed, fixed with 4% para-formaldehyde, sectioned 20 μm thick, and stained immunohistochemically with anti-neuronal nuclei (NeuN) and anti-BrdU antibodies. The numbers of BrdU positive cells of BD and BS were 39.1 ± 1.0 and 53.0 ± 0.8 , respectively, and the numbers of BrdU/NeuN positive cells were 26.8 ± 0.7 and 39.3 ± 0.6 , respectively. Both numbers of BrdU and BrdU/NeuN positive cells of the BD group showed significantly small values ($p < 0.001$). The neurogenesis of the hippocampus was suppressed in the BD condition. This suggests that biotin has an important role in the development and maintenance of brain functions.

1. 目的

水溶性ビタミンB群に属するビオチン (Biotin; Vitamin H) は、糖新生, 分岐鎖アミノ酸代謝, 脂肪酸合成に深く関与する (1)。我々は掌蹠膿疱症とアルツハイマー型認知症を併発した患者に対し, 掌蹠膿疱症の治療目的でビオチンを投与したところ, 両疾患が改善したことを報告している (2)。また, 過

去にビオチン欠乏ラットの迷路学習能が低下することや, その海馬において長期増強 (LTP) が抑制されること, 神経細胞が縮小あるいは萎縮すること, さらに細胞間・細胞内情報伝達に関わる複数の遺伝子の発現が抑制することを確認している (3, 4)。本研究ではビオチン欠乏時および回復後のラット海馬歯状回のニューロジェネシスについて免疫組織化学的に検証した。

2. 方法

Wistar系雄ラットを24例用いた。離乳直後からビオチン欠乏飼料を与え、ペアフィーディング（以下PF）を行い、ビオチン欠乏群（BD群）には生理食塩水を、対照群（BS群）にはビオチン（200 μg/kg）をそれぞれ毎日腹腔内投与した。半数（BD I群・BS I群）は5週間後に剖検し、残りの半数（BD II群・BS II群）はBD群へビオチンを投与し4週間回復させた後に剖検した。また、新生細胞を観察するためそれぞれ剖検前のPF15日目よりBD I群・BS I群は5日毎に計4回、またBD II群・BS II群は4週間5日毎に計6回、それぞれ5-Bromo-2'-deoxyuridine（BrdU）（50 mg/kg）を腹腔内投与した。麻酔下で4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定後、脳を摘出した。脳は海馬の同一部位を厚さ20 μmの凍結切片を個体ごとに6枚作製し、神経細胞核マーカーである抗Neuronal Nuclei（NeuN）抗体と抗BrdU抗体を用いた二重免疫染色を施し、BrdU陽性細胞数およびBrdU/NeuN陽性細胞数を計測した。各群の結果はすべて平均値±SEMの形で表記し、体重、脳重量はStudent's-t検定を、陽性細胞数は一元配置分散分析を用い比較検討した。結果は、P<0.05の場合を有意とした。

3. 結果と考察

各群の脳重量は、BD I群では1.79 ± 0.02 gであり、

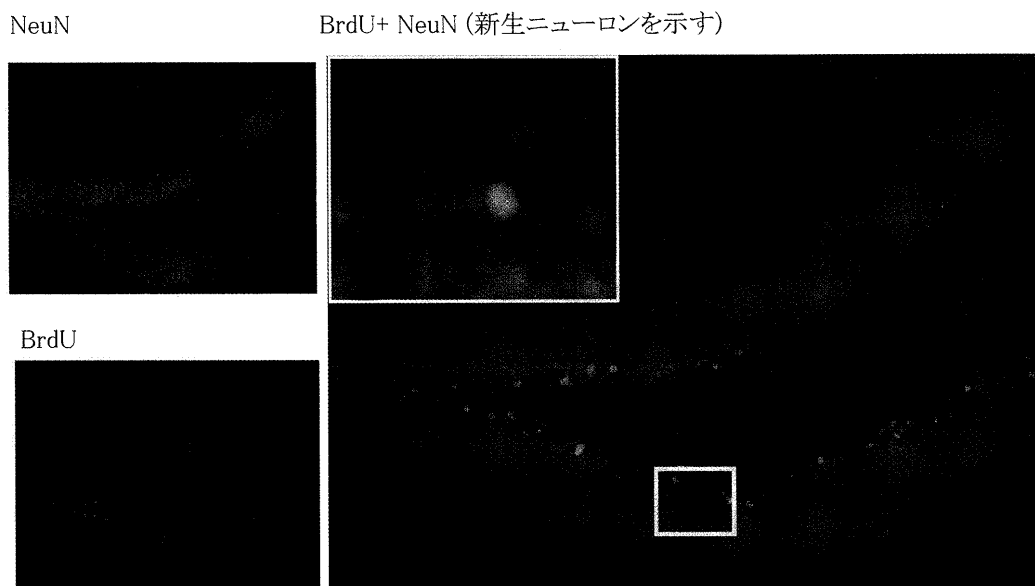
BS I群では1.79 ± 0.04 gであり、それぞれ有意な差は認められなかった。また、BD II群では1.83 ± 0.04 gであり、BS II群では1.78 ± 0.05 gであり、それぞれ有意な差は認められなかった。

BD I群・BS I群において、BrdU陽性細胞数（39.10 ± 0.98 vs 52.96 ± 0.82）とBrdU/NeuN陽性細胞数（26.77 ± 0.67 vs 39.25 ± 0.60）のどちらも有意に減少していた（P<0.001）。また、PFを5週間行ったBS I群の新生細胞数は9週間行ったBS II群のそれと比べて減少していた。さらに、回復期を設けたBD II群・BS II群においては、BrdU陽性細胞数（30.90 ± 1.40 vs 29.95 ± 0.89）とBrdU/NeuN陽性細胞数（23.45 ± 1.05 vs 22.86 ± 0.97）は、ほぼ同様の値を示した。

ビオチン欠乏によってニューロジェネシスが抑制されることを示しており、この抑制は神経前駆細胞そのものが減少した結果ではなく、前駆細胞が増殖しニューロンまで分化・発達する段階で、ビオチン欠乏による影響を受けた結果であると推察された。逆にビオチン欠乏状態回復後では加齢に伴う新生細胞数の減少は観察されたものの、対照群のそれと比べて同等のレベルまで改善することが確認された。

ビオチン欠乏が及ぼす海馬歯状回におけるニューロジェネシスの抑制が起こる要因として、以下の2つの理由が考えられる。

- (1) DNA合成、RNA合成におけるビオチンの作用
Bhullar と Dakshinamurti は、HeLa細胞をビオチン



欠乏培地で培養したところ、その細胞内のタンパク合成率、DNA合成率、細胞成長率のそれぞれが減少し、細胞周期がG1期で停止することを報告している(5)。さらに、その培地にビオチンを添加すると、グアニル酸シクラーゼ (guanylate cyclase: GC) およびRNAポリメラーゼII活性が上昇し、これらの影響は改善されるという(6)。ビオチンがRNAポリメラーゼII活性に関与しているのならば、RNAの合成にも影響しているといえる。以上のことから、ビオチンは細胞内におけるDNA、RNAおよび細胞分裂に関与している可能性がある。つまり、ビオチン欠乏状態では神経前駆細胞の分裂・増殖が阻害されると考えられる。

(2) 細胞内情報伝達系とビオチン

森らはマイクロアレイ法を用いて、ビオチン欠乏ラットの海馬でアデニル酸シクラーゼ (adenylate cyclase: AC) 遺伝子が抑制されることを報告している(4)。ACはアデノシン三リン酸 (ATP) から環状アデノシン一リン酸 (cAMP) を合成する。次に合成されたcAMPはプロテインキナーゼA (protein kinase A: PKA) を活性化し、cAMP応答配列結合タンパク (cAMP response element binding protein: CREB) をリン酸化している。また、ビオチンは先に述べたように、細胞内のグアニル酸シクラーゼ (guanylate cyclase: GC) の活性を高めることが知られている。GCはグアノシン三リン酸 (GTP) から環状グアノシン一リン酸 (cGMP) を合成する酵素であり、ビオチンがGCを介してcGMPの細胞内レベルを上昇させることも報告されている(7,8)。このcGMPは、プロテインキナーゼG (protein kinase G: PKG) を活性化し、PKAと同様に、CREBをリン酸化することが報告されており、リン酸化CREB (phosphorylated CREB: pCREB) は、海馬LTPの維持に必要なタンパク合成に関与していることが示唆されている(9)。さらに、歯状回顆粒細胞層のBrdU陽性あるいはPSA陽性の新生ニューロンは、pCREBを発現していることが報告されており、このpCREBは神経成長因子のシグナリングに関与し、前駆細胞の増殖と分化に影響を与えることも示唆されている(10)。以上のことから、ビオチンは細胞内でAC、GCを活性化することで二次的にCREBのリン酸化に関与している可能性があり、ビオチン欠乏状態ではこの情報伝達

系が機能しにくい状態になっていると考えられる。

以上のこのことから、ビオチンは神経細胞の新生および分化、つまり脳機能の維持・発達に重要な役割を果たしているものと推察された。

4. 要約

ビオチン欠乏時および回復後のラット海馬歯状回のニューロジェネシスについて免疫組織化学的に検証した。Wistar系雄ラットを用いた。離乳直後からビオチン欠乏飼料を与え、ペアフィーディング(以下PF)を行い、ビオチン欠乏群(BD群)には生理食塩水を、対照群(BS群)にはビオチン(200 µg/kg)をそれぞれ毎日腹腔内投与した。半数(BD I群・BS I群)は5週間後に剖検し、残りの半数(BD II群・BS II群)はBD群へビオチンを投与し4週間回復させた後に剖検し、脳を摘出した。脳は海馬の同一部位を厚さ20 µmの凍結切片を個体ごとに6枚作製し、神経細胞核マーカーである抗Neuronal Nuclei (NeuN)抗体と抗BrdU抗体を用いた二重免疫染色を施し、BrdU陽性細胞数およびBrdU/NeuN陽性細胞数を計測した。BD I群・BS I群において、BrdU陽性細胞数とBrdU/NeuN陽性細胞数のどちらも有意に減少していた(P<0.001)。さらに、回復期を設けたBD II群・BS II群においては、BrdU陽性細胞数とBrdU/NeuN陽性細胞数は、ほぼ同様の値を示した。

ビオチン欠乏状態では海馬歯状回のニューロジェネシスは抑制され、逆にビオチン欠乏状態回復後では加齢に伴う新生細胞数の減少は観察されたものの、対照群のそれと比べて同等のレベルまで改善することが確認された。このことから、ビオチンは神経細胞の新生および分化、つまり脳機能の維持・発達に重要な役割を果たしているものと推察された。

文献

- 1) Dakshinamurti K., Chauhan J. Vitam. Horm. 45: 337-384 (1989)
- 2) 前橋賢, 佐藤隆夫, 猪股智夫, 日本内科学会雑誌, 90: 169 (2001)
- 3) Ito Y., Inomata T., Sakita K., Chida Y., Kashiwazaki N., Ninomiya H., Mabashi M. Exp. Anim. 52: 232 (2003)
- 4) Mori Y., Endoh S., Yoshida S., Ito Y., Kashiwazaki N., Maebashi M., Ninomiya H., Inomata T. Exp. Anim. 55:

- 282 (2006)
- 5) Bhullar R.P., Dakshinamurti K. J. Cell Physiol. 123: 425-430 (1985)
- 6) Singh I.N., Dakshinamurti K. Mol. Cell Biochem. 79: 47-55 (1988)
- 7) Vesely D.L. Science 216: 1329-1330 (1982)
- 8) 山田秀明, 和泉好計, 第7章ビオチン, ビタミン
 ハンドブック 水溶性ビタミン, 編集 日本ビタミン学会 (初版, 化学同人, 京都) 115-126 (1989)
- 9) Lu Y.F., Hawkins R.D. J. Neurophysiol. 88: 1270-1278 (2002)
- 10) Nakagawa S., Kim J.E., Lee R., Chen J., Fujioka T., Malberg J., Tsuji S., Duman R.S. J. Neurosci. 22: 9868-9876 (2002)