

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07770

研究課題名(和文) 神経疾患をもたらすビタミンB12代謝の解明と新治療法開発基盤構築

研究課題名(英文) Vitamin B12 metabolism and its relation for neural and cognitive functions

研究代表者

竹中 重雄 (Takenaka, Shigeo)

大阪府立大学・総合リハビリテーション学研究科・教授

研究者番号：10280067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンB12 (B12) の潜在的な欠乏は認知症リスクファクターであることを示唆する報告があるが、その分子機構は不明である。そこでB12代謝異常モデル神経幹細胞を作製し、その細胞分化を検討した結果、樹状突起の形成がされない状態にあり、アクチンフィラメントの形成に問題が生じていることを示唆する結果を得た。また、食餌性B12-葉酸欠乏モデルを用いて認知機能に及ぼすB12欠乏の影響を検討した結果、学習能に影響が生じたが、脳組織上の変化は認められなかった。以上の結果から、個体のB12レベル低下が認知機能に影響を及ぼすことが示唆され、それは神経細胞の分化、維持に関わることが示された。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that vitamin B12 (Cobalamin, B12) might be a risk factor for cognitive function in elderly people, but its biochemical and molecular mechanisms are remained unclear. Here I examined the mechanism with a neural stem cells which knockdown or knockout its B12 metabolize enzymes and with a B12 and/or folate-deficient mice model. The cbl genes which are B12-metabolizing protein coding genes, in SH-SY5Y cell, a model cell of neurite formation, were down-regulated with a RNAi plasmid or edited CRISPR/CAS9 system. The dendrites formation induced by all trans retinoic acid were inhibited and the formation of actin filaments under the dendrites were reduced in the cells. The learning ability was significantly reduced in the B12 and folate-deficient mice. In conclusion, B12-deficiency might reduce the learning ability in mice and might be involved in the neural cell differentiation and their viability.

研究分野：食品栄養学

キーワード：ビタミンB12 神経細胞 認知機能 欠乏

### 1. 研究開始当初の背景

ビタミン B<sub>12</sub> (コバラミン; 以下 B<sub>12</sub>) はコバルト (Co) をピロール環に配した構造を持つ (右図)。一般に動物性食品にのみ含有され、一部の海藻類を除く植物性食品には含まれていないとされている (Takenaka et al., *Br. J. Nut.*, 2001)。Co 原子の上方に位置する上方配位子 (R) がメチル基のメチルコバラミン (Me-Cbl) とアデノシル基のアデノシルコバラミン (Ado-Cbl) が、それぞれメチオニン合成酵素 (MetS) とメチルマロニル CoA ムターゼ (MCM) の補酵素として機能している。それら以外の上方配位子として OH<sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CN<sup>-</sup>などが存在するが、それらに補酵素としての働きはない。

様々な上方配位子を有する B<sub>12</sub> が食物として摂取・吸収され、細胞内で補酵素型へと変換される (Carmel et al., *Hematol.*, 2003)。細胞への吸収と代謝に関わる先天性代謝異常患者からその相補遺伝子として *CblA* から *CblG* の 7 遺伝子が提唱されている。これら先天性代謝異常患者由来の繊維芽細胞を用いた研究から下図のような B<sub>12</sub> 代謝経路の存在が示唆されている (Galius et al., *J. Mol. Med.*, 2010)。どの *Cbl* 遺伝子の異常が生じたかによって、B<sub>12</sub> を補酵素とする生体内の二つの酵素活性の一方または両方が低下し、ホモシステイン尿症かメチルマロン酸尿症、またはその両方が発症する。ホモシステインとメチルマロン酸はともに細胞毒性を持つ代謝物であり、通常は低レベルにその代謝が抑制されているが、それらの蓄積による代謝障害が生じる。また、近年の疫学調査によって、潜在的な B<sub>12</sub> 欠乏が老人人口の多くを占め、B<sub>12</sub> 欠乏の進行とともにアルツハイマー病や痴呆等の病態を生じることが報告され、ホモシステイン、メチルマロン酸ともに、先天性代謝異常のバイオマーカーとしてだけでなく、老齢性疾患のバイオマーカーとして注目されている (Scott et al., *J. Neuro. Sci.*, 2004)。しかしながら、B<sub>12</sub> 欠乏は代謝疾患以外にも様々な神経疾患を発症し、特に多発性硬化症 (multiple sclerosis) と称される混合疾患を生じるとされている (Scarabrino, *J. Neuro. Chem.*, 2009)。加えて、赤血球の分化異常に起因する巨赤芽球性貧血 (Megaloblastic anemia) が臨床上的問題である (Stover, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, 2010)。しかしながら、B<sub>12</sub> 欠乏による代謝異常から、神経症状や巨赤芽球性貧血の発症機構を説明することはできない。

### 2. 研究の目的

B<sub>12</sub> 欠乏に起因する代謝異常によって、ホモシステイン尿症やメチルマロン酸尿症、多発性硬化症、巨赤芽球性貧血など様々な症状が呈するが、それに至る分子機構は不明なままである。これまでの申請者の研究からホモシステイン尿症とメチルマロン酸尿症、その

両方を発症する培養細胞モデルを作出し、そのどれもが神経細胞への分化とその維持に影響を与えることを明らかにした。本研究ではその発症機構を分子レベルから解明することを主眼としている。これまで先天性代謝異常症患者由来培養細胞や B<sub>12</sub> 欠乏動物モデルにおいて検討することが出来ていない機能性細胞レベルにおける解明に極めて重要なシステムを構築した。即ち、B<sub>12</sub> 欠乏による神経症状の発症機構を明らかにしようとするものであり、その知見は栄養療法を含む新たな神経疾患治療法への適用が期待出来る。これまで食事療法による対処療法的手法が治療の中心であった B<sub>12</sub> 欠乏症患者の生活の質 (Quality of Life) は低いものであったが、新たな治療戦略から代謝上の問題を改善する手法を見出せれば、症状の抑制に留まらず、QOL の向上が期待できる。さらには高齢化による様々な神経疾患に B<sub>12</sub> が関与することが疫学調査から報告されており、B<sub>12</sub> の新たな栄養学的意義を明確にすることは将来の医療費削減に繋がる基盤的知見を得ることになる。

そこで、B<sub>12</sub> 代謝異常細胞を用いた神経細胞分化モデルにおけるメカニズム解析を試みるとともに、食餌性 B<sub>12</sub> 欠乏モデル、さらには B<sub>12</sub> とともに相関性の高い葉酸欠乏モデルを作製し、それぞれの認知機能に及ぼす影響を検討することを目的にした。

### 3. 研究の方法

#### B<sub>12</sub> 代謝異常細胞作製とその分化

SH-SY5Y 細胞を神経細胞モデルとして用い、それをプラスミド pSingle-tTS-shRNA を用いた B<sub>12</sub> 代謝酵素 RNAi 法によるノックダウン細胞と CRISPR-CAS 法を用いた B<sub>12</sub> 代謝酵素ノックアウト細胞を作成した。それらの細胞の分化は Presgraves らの方法 (2004) に則って *all trans retinoic acid* (ATRA) を用いて実施した。分化後の樹状突起形成への影響を評価した。SH-SY5Y は分化を誘導されると神経細胞の分化マーカーであるニューロフィラメントを発現する (Gimenez-Cassina et al., 2006)。また、神経細胞における樹状突起の形成にはアクチンの再構成が関与することが報告されている (Tasaka et al., 2012)。SH-SY5Y の分化マーカーであるニューロフィラメントを構成するタンパク質 Neurofilament triplet proteins の 1 つである NF-200、そしてアクチンの蛍光染色から分化抑制機構を検討した。また、ミトコンドリア活性は MitoTrackerRed CMXRos を用いて評価した。

#### B<sub>12</sub> 欠乏モデル動物作製とその認知機能評価

3-4 週齢雄性 C57BL/6J (オリエンタル酵母) を用いた。大阪府立大学動物センターの SPF 施設で飼育した。動物実験の各操作は、大阪府立大学動物実験規程に従った。

American Institute of Nutrition から 1993 年に発表されたマウス・ラット用の栄養

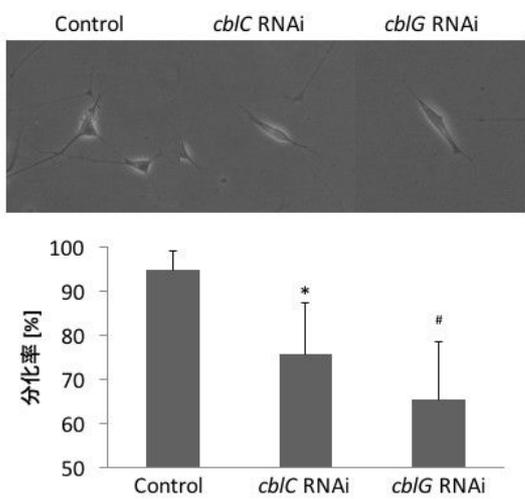


図1 ATRAによって分化したSH-SY5Yの形態と分化細胞の割合

研究のための標準飼料であるAIN-93Gを用いた。AIN-93Gをコントロール食とし、葉酸を取り除いた葉酸欠乏食 (FD), B<sub>12</sub>を取り除いたB<sub>12</sub>欠乏食 (B<sub>12</sub>D), B<sub>12</sub>と葉酸を取り除いたB<sub>12</sub>葉酸欠乏食 (B<sub>12</sub>・FD)をオリエンタル酵母より購入した。各飼料を5匹ずつ, 12週ないし16週間給餌した。5, 16週目にオープンフィールド試験, マーブルベリング試験, 恐怖条件付け試験を行った。また, 欠乏状態の評価は肝臓のB<sub>12</sub>と葉酸, 血中のホモシステインとメチルマロン酸の測定から行った。

#### 4. 研究成果

##### B12代謝酵素異常細胞の分化

ノックダウン細胞の分化能を樹状突起の形成を指標に評価した結果, 作成した何のノックダウン細胞においても低下していた。特に顕著であったホモシステイン症とメチルマロン酸症のモデルの結果を示す(図1)。

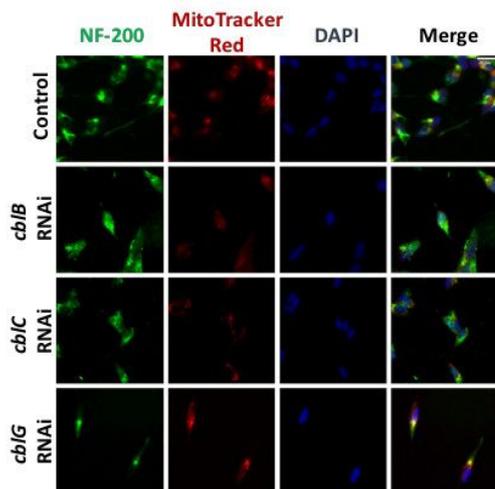


図2 ATRAによる分化誘導後のSH-SY5YにおけるNF-Hの発現。分化誘導したSH-SY5YをNF-H (抗NF-200抗体とAnti-Rabbit IgG Alexa 488), ミトコンドリア (MitoTracker Red), DNA (DAPI) で染色した。右上のバーは20 μmを示す。

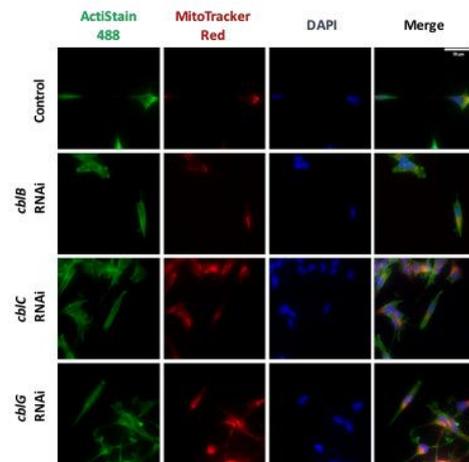


図3 ATRA分化誘導後のSH-SY5Yにおけるアクチンフィラメント。分化誘導したSH-SY5Yのアクチン (ActiStain488TM phalloidin), ミトコンドリア (MitoTracker Red), DNA (DAPI) の染色像。右上のバーは50 μmを示す。

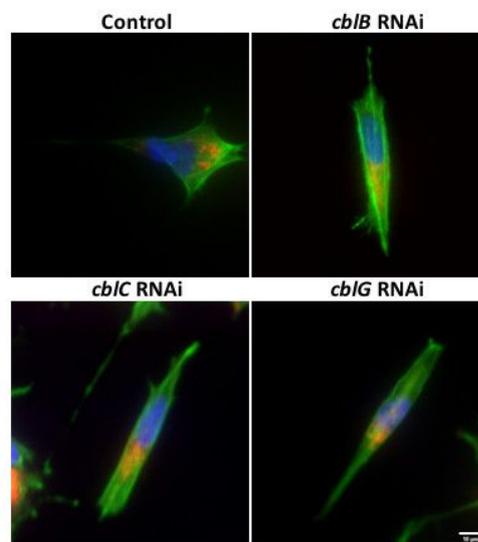


図4 ATRA分化誘導後のSH-SY5Yにおけるアクチンフィラメント (強拡大像)。分化誘導したSH-SY5Yのアクチン (ActiStain488TM phalloidin), ミトコンドリア (MitoTracker Red), DNA (DAPI) の染色像。右下のバーは10 μmを示す。

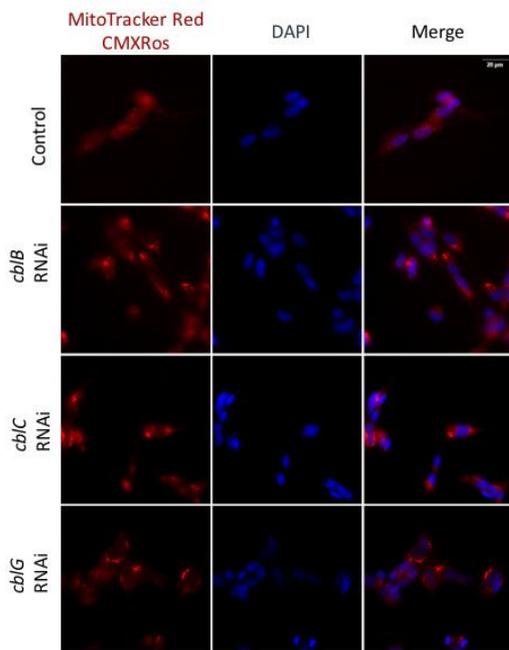


図 5 SH-SY5Yにおけるミトコンドリア活性。SH-SY5Yのミトコンドリア (MitoTracker Red) , DNA (DAPI) の染色を定量化した。右下のバーは 10  $\mu$ mを示す。

それらにおける神経細胞のマーカーである NF-200 の発現を検討した結果、それらの発現は認められたが、樹状突起の形成には用いられていなかった。(図 2)。そこで、アクチンフィラメントの形成を検討した結果、アクチンの発現量にも影響がないが、樹状突起の下での集積が認められない(図 3)。強拡大像を見ると、アクチンフィラメントがラメリポディアを形成できずに樹状突起の形成が遅れていることが示唆された(図 4)。また、ミトコンドリア活性の低下も認められた(図 5)。さらに同酵素のノックアウト細胞を作成し、検証した結果も同様であった。したがって、細胞レベルにおいて  $B_{12}$  代謝酵素の活性低下が生じることによって、細胞内におけるホモシステインとメチルマロン酸の代謝に影響が生じることによって細胞の分化能、特にアクチンフィラメントの樹状突起下での集積ができずに分化ができない状態になることが示唆された。

### 食餌性 $B_{12}$ 並びに葉酸欠乏動物における認知機能

欠乏食による飼育を行った結果、 $B_{12}$  と葉酸を欠乏させた群においてのみ有意な体重の減少がみられた(図 6)。

欠乏状態を評価するため、肝臓中の  $B_{12}$ 、葉

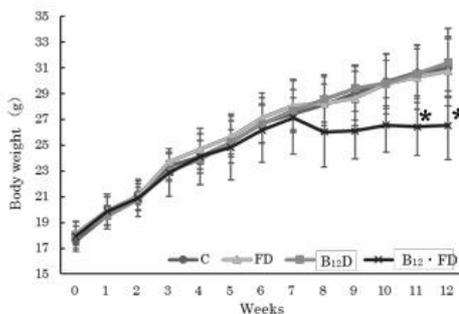


図 6 食餌性  $B_{12}$  並びに葉酸欠乏食摂取が体重変化に及ぼす影響。

酸、ホモシステイン、メチルマロン酸の測定を行った結果、 $B_{12}$  欠乏飼料を摂取した軍においては肝臓中  $B_{12}$  の有意な低下とホモシステイン、メチルマロン酸の増加を認めたが、葉酸欠乏食群においては肝臓中の葉酸が減少傾向にとどまり、また、ホモシステインも上昇がわずかであった。このことは葉酸欠乏モデル作製時には飲用水中に抗菌剤を加えることが多くされているのに対して、本研究実施の飼育環境において飲用水中に抗菌剤を加えられなかったこと起因すると考えられる。しかしながら、SPF 環境における飼育では抗菌剤を使用せずと同じ期間の飼育によって葉酸欠乏モデルの作出に成功している

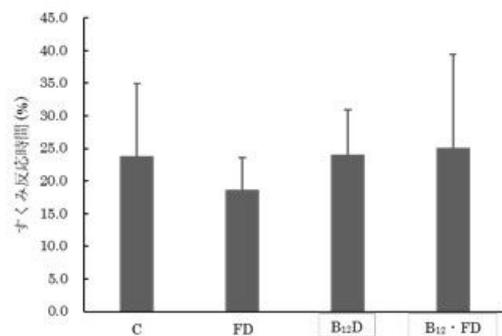


図 8 恐怖条件付け試験 Context すくみ反応時間。

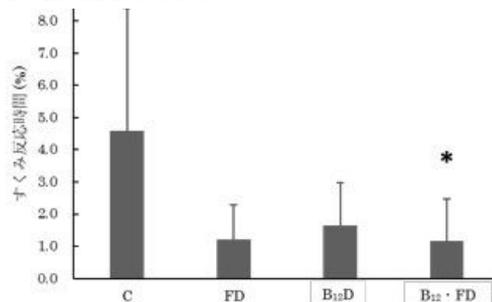


図 7 恐怖条件付け試験 Conditioning すくみ反応時間。

例もあることから今後の検討課題の一つである。したがって、本実験に供した食餌性欠乏モデルの  $B_{12}$  は軽い欠乏状態にあるが、葉酸は潜在的欠乏状態にあると判定した。

認知機能を評価するため、オープンフィールド試験、マーブルベリング試験、恐怖条件付け試験を実施した。オープンフィールド試験は総移動距離からマウスの運動性、中心滞在頻度からマウスの不安情動行動への影響を評価する手法である。総移動距離、中心滞在頻度についてどの群間にも有意な差は見られなかった。よってどの群についても運動性や情動行動への影響はみられなかった。マーブルベリング試験は埋没されたビー玉の数から強迫性障害への影響を評価する手法である。今回、どの群間にも差は見られず、強迫性障害に対する影響はみられなかった。恐怖条件付け試験は文脈記憶への影響を評

価する手法である。Conditioning について、総移動距離は群間に有意な差は見られなかったが、すくみ反応時間についてはC群と比べ B<sub>12</sub>・FD 群で有意に低下、その他の欠乏群で低下傾向がみられ、学習能力の低下がみられた(図7)。Context について、総移動距離、すくみ反応時間は群間に有意な差はみられなかった(図8)。本来 Conditioning において学習能力への影響がないことが、Context での文脈記憶を評価する前提条件であるため、今回文脈記憶への影響は評価不能であった。したがって、軽い B<sub>12</sub> 欠乏で、潜在的な葉酸欠乏状態にあるマウスにおいては学習能力に問題を生じることが示唆された。B<sub>12</sub> 輸送タンパク質レセプターCD320 ノックアウトマウスの行動実験についての報告がされた(Arora et al, *PLoS One* 2017)。このマウスは空間記憶学習能力の低下や不安行動の増大を示した。また、海馬における神経伝達の遅延や錐体ニューロン核の減少がみられたと報告されており、B<sub>12</sub> 欠乏は海馬における認知記憶能力への影響が示唆されている。彼らの報告は本研究結果と類似している。しかしながら、本研究に用いた動物において脳組織の異常は検出されなかった。それは報告のノックアウトマウスでは脳においてのみ B<sub>12</sub> 欠乏状態となっていたこと、また、本研究は軽い B<sub>12</sub> 欠乏状態であるから、欠乏の程度が異なると推定できるが、それでも同様の症状が見られたことは認知機能に及ぼす B<sub>12</sub> の影響が大きいことを示唆するものである。

#### 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 10 件)

1. Cytochrome P450 2A6 and other human P450 enzymes in the oxidation of flavone and flavanone. Kakimoto K, Murayama N, Takenaka S, Nagayoshi H, Lim YR, Kim V, Kim D, Yamazaki H, Komori M, Guengerich FP, Shimada T., *Xenobiotica*. 2018 Jan 29;1-12. doi: 10.1080/00498254.2018.1426133. 査読有
2. Oxidation of 1-chloropyrene by human CYP1 family and CYP2A subfamily cytochrome P450 enzymes: catalytic roles of two CYP1B1 and five CYP2A13 allelic variants. Shimada T, Murayama N, Kakimoto K, Takenaka S, Lim YR, Yeom S, Kim D, Yamazaki H, Guengerich FP, Komori M. *Xenobiotica*, 21,1-11, 2017. 査読有
3. Roles of Human CYP2A6 and Monkey CYP2A24 and 2A26 Cytochrome P450 Enzymes in the Oxidation of 2,5,2',5'-Tetrachlorobiphenyl. Shimada T, Kakimoto K, Takenaka S, Koga N, Uehara S, Murayama N, Yamazaki H, Kim D, Guengerich FP, Komori M. *Drug Metab Dispos.*, 44, 1899-1909, 2017. 査読有
4. Structure-Function Studies of Naphthalene, Phenanthrene, Biphenyl, and Their Derivatives in Interaction with and Oxidation by Cytochromes P450 2A13 and 2A6. Shimada T, Takenaka S, Kakimoto K, Murayama N, Lim YR, Kim D, Foroozesh MK, Yamazaki H, Guengerich FP, Komori M. *Chem Res Toxicol.* 29, 1029-1040, 2016. 査読有
5. Oxidation of pyrene, 1-hydroxypyrene, 1-nitropyrene and 1-acetylpyrene by human cytochrome P450 2A13, Shimada, T., Takenaka, S., Murayama, N., Kramlinger V.M., Kim, J.H. Kim, D., Liu, J., Forozesh, M.K., Yamazaki, H., Guengerich, F.P. and Komori, M., *Xenobiotica*, 46, 211-224, 2016. 査読有
6. Yolk of the Century Egg (Pidan) Contains a Readily Digestible Form of Free Vitamin B12. Teng F, Bito T, Takenaka S, Yabuta Y, Watanabe F. *J Nutr Sci Vitaminol.* 2016;62(5):366-371. 査読有
7. Determination and characterization of corrinoid compounds in truffle (*Tuber* spp.) and shoro (*Rhizopogon rubescens*) fruiting bodies. Teng, F., Bito, T., Takenaka, S., yabuta, Y., Shimomura, N. and Watanabe, F. *Mushroom Sci. Biotech.*, 22, 159-164, 2015. 査読有
8. Proteomic analysis of the hippocampus in naïve and ischemic-preconditioned rat. Nakajima, T, Hata, R, Kondo, T, Takenaka, S. *J Neuro Sci.*, 358, 58-71, 2015. 査読有
9. Profiling of plasma metabolites in canine oral melanoma using gas chromatography-mass spectrometry. Kawabe, M., Baba, Y., Tamai, R., Yamamoto, R., Komori, M., Takenaka, S. *J. Vet. Med. Sci.*, 77, 1025-1028, 2015. 査読有

[学会発表](計 7 件)

1. CRISPR/Cas9 法によるビタミン B12 代謝関連遺伝子ノックアウト細胞作製、平岩悟、小柳友和、小森雅之、竹中重雄、日本獣医学会第 160 回学術集会、2017。
2. 食餌による葉酸とビタミン B<sub>12</sub> 欠乏モデルマウス作製の試み、小柳友和、平岩悟、小森雅之、竹中重雄、日本獣医学会第 160 回学術集会、2017。
3. ビタミン B<sub>12</sub> 代謝異常がヒト慢性骨髄性白血病細胞の分化に及ぼす影響、巨海竜一、平岩悟、小柳友和、小森雅之、竹中重雄、第 69 回日本ビタミン学会大会、

- 2017.
4. ビタミン B<sub>12</sub>代謝異常と低酸素による慢性骨髄性白血病細胞分化への影響、巨海竜一、平岩悟、小柳友和、小森雅之、竹中重雄、日本獣医学会第 159 回学術集会、2016.
  5. ヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y におけるビタミン B<sub>12</sub>代謝異常と酸化ストレス、竹中重雄、山木隆裕、巨海竜一、小森雅之、第 69 回日本ビタミン学会大会、2016.
  6. 先天性ビタミン B<sub>12</sub>代謝異常症遺伝子群 RNAi によるヒト神経芽腫細胞の分化抑制、山木隆裕、馬場雄大、巨海竜一、小森雅之、竹中重雄、渡辺文雄、中野長久、日本ビタミン学会第 68 回大会、2015.
  7. ビタミン B<sub>12</sub>代謝遺伝子 RNAi はヒト神経芽腫細胞のストレス感受性を増加させる、山木隆裕、巨海竜一、小森雅之、竹中重雄、日本獣医学会第 158 回学術集会、2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

竹中 重雄 (TAKENAKA SHIGEO)  
大阪府立大学・総合リハビリテーション学  
研究科・教授  
研究者番号： 10280067

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

( )