

機関番号：27103

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500715

研究課題名（和文） ビタミンB1欠乏症候群の発現に関与する遺伝子の同定

研究課題名（英文） Exploration of genes involved in susceptibility to thiamin (vitamin B1) deficiency

研究代表者

濱田 俊 (HAMADA SHUN)

福岡女子大学・人間環境学部・教授

研究者番号：60282349

研究成果の概要（和文）：チアミン（ビタミンB1）の欠乏により生じる脳障害（ウェルニッケ-コルサコフ症候群）の発症には、地域差や個人差が観察され、何らかの遺伝的要因が関与していると考えられてきた。本研究では、私達が見出したチアミン欠乏に対し高感受性を示すマウス系統を用い、チアミン欠乏に対する感受性に関与する遺伝子の探索を行った。その結果、チアミン欠乏感受性に関わる遺伝子座が複数存在し、そのうち少なくとも一つはミトコンドリアDNAに存在することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Wernicke-Korsakoff syndrome is a neuropsychiatric disorder resulting from thiamin deficiency (vitamin B1). It has been believed that genetic factors are important in its pathogenesis because of inter-individual and inter-regional differences in susceptibility to this disorder. In this project, we explored genetic factors by using a mouse strain which shows higher sensitivity to thiamin deficiency than the other strains. Our results from interbreeding of this strain combined with experimental thiamin deficiency suggest that multiple genes are involved in susceptibility to thiamin deficiency, and that at least one of them is located in mitochondrial DNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食と栄養、ビタミン

1. 研究開始当初の背景

ビタミンB1は最初に発見されたビタミンであり、その欠乏は脚気や Wernicke-Korsakoff 症候群 (WKS) といった欠乏症を

引き起こすことが古くから知られている。今日でも、発展途上国では摂取量の不足によるビタミンB1欠乏症がみられ、先進諸国でもアルコール依存症、偏食、医療過誤によって

生じる WKS は依然として重要な栄養学的・医学的課題となっている。

WKS は、従来から東洋諸国で少なく、西洋諸国で多く発症し、アルコール大量飲酒者で発症しやすいといった疫学的特徴がみられることが知られている (review, Sechi & Serra, *Lancet Neurol.*, 2007)。神経病理学的には乳頭体、第三脳室・中脳水道周囲、四丘体などの脳の特定の領域に出血を伴う壊死巣が認められる。ビタミン B1 活性を担うチアミンニリン酸は、糖代謝系補酵素として作用するため、糖代謝率の高い神経細胞から脳全体で障害が起こると予想されるが、実際の WKS では、これら特定領域のみが出血性壊死を起こす。

チアミン欠乏による神経細胞死の原因については、グルタミン酸による興奮性神経細胞死や酸化ストレスなどが関与することが報告されている。しかし、WKS で特定領域のみが障害されるメカニズムや疫学的に多様性 (アルコールとの関連、地域差、個人差) がみられる理由については未だに推論の域を出ていない (「ビタミン研究のブレークスルー」、日本ビタミン学会編 2002)。

従来から WKS の発症リスクに、チアミンニリン酸を補酵素とするトランスケトラーゼの多型性が関与しているのではないかという生化学的な結果が得られている (Blass and Gibson, *New Eng. J. Med.*, 1977)。その一方で、WKS 患者でトランスケトラーゼ遺伝子自体の塩基配列多型は見つかっておらず、分子遺伝学による原因遺伝子の追及はほとんど進んでいない。

2. 研究の目的

本研究は、WKS の発症に影響を与える遺伝子

を同定することを目的とする。本研究では、遺伝学実験に適したマウスを用いて、次の 3 つのアプローチにより WKS 感受性遺伝子を探索する。

(1) 申請者らは近年、チアミン欠乏に対して高感受性を示すマウス系統 (チアミン欠乏高感受性マウス) を見出した。この系統は、後述のチアミン欠乏実験をおこなうと、C57BL/6 (B6) 系統に比較して、早期から神経学的異常を示し、死亡する。このマウス系統を利用し、チアミンを補酵素とする酵素遺伝子やトランスポータについて、B6 系統のものとの塩基配列を比較し、遺伝子多型の有無を検討する。

(2) チアミン欠乏高感受性マウスを B6 系統へ戻し交配し、原因遺伝子座を絞り込むためのコンジェニック系統を作成する。

(3) 既知遺伝子でチアミン欠乏による神経細胞死に関連する可能性がある候補遺伝子について、遺伝子改変マウスを入手し、チアミン欠乏に対する感受性を調べ、原因遺伝子の候補に成り得るかどうか検討する。

3. 研究の方法

(1) チアミン欠乏高感受性マウスにおけるチアミン関連遺伝子の多型解析

チアミン欠乏高感受性マウスと B6 マウスの脳から全 RNA を抽出し、チアミンニリン酸を補酵素とする酵素やチアミントランスポータの cDNA を RT-PCR 法で増幅する。増幅産物の塩基配列を解析し、系統間で多型がみられるかどうか検討する。本研究では、生化学的検討から多型の存在が示唆されているトランスケトラーゼ、および 2009 年に WKS 様の症状を示した兄弟で変異が同定されたチアミントランスポータ 2 の遺伝子、

SLC19A3 (Kono et al., *New Eng. J. Med.* 2009) の cDNA 塩基配列解析を行った。

(2) チアミン欠乏高感受性マウスにおける原因遺伝子座の絞込み

チアミン欠乏高感受性マウスと B6 マウスとを交配し、雑種第一代 (F1) を得る。まず、チアミン欠乏高感受性マウス、B6 マウス、F1 マウスについて、チアミン欠乏飼料とチアミン拮抗薬であるピリチアミンを投与し、実験的チアミン欠乏状態にする (pyrithiamine-induced thiamin deficiency: PTD)。PTD はチアミン欠乏モデルげっ歯類を作成するための標準的な手法である。PTD 実験を行うと、チアミン欠乏高感受性マウスは B6 マウスよりも 1~2 日早く活動低下が目立つようになり、痙攣や後弓反張などの神経学的異常が現れる。一方、B6 マウスでは神経学的異常の出現はまれであった。当初、神経学的異常の出現等を指標とし、チアミン高感受性マウスを B6 系統へと戻し交配し、コンジェニック系統を作成することを予定していたが、F1 はすべて B6 系統、すなわちチアミン低感受性を示した。このため、優性の表現型であるチアミン欠乏低感受性を示すマウスを選抜する方針に変更した。

まずチアミン欠乏高感受性マウスと B6 マウスの生存率解析を行った (研究成果・図 1、チアミン欠乏高感受性マウス: TD-HS、B6 マウス: B6)。チアミン欠乏高感受性マウスは 13 日目までにすべて死亡したが、B6 マウスは 80% 以上生存していた。そこで、F1 をチアミン欠乏高感受性系統に戻し交配した戻し交配第 1 代 (B1) で PTD 実験を行い、PTD15 日目以降に生存している個体を選抜し、コンジェニック系統を樹立しようと考え

た。しかし、この時期にチアミン補充を行っても、マウスを回復させることが困難であることが判明したため、B6 マイクロサテライト多型マーカーの PCR 解析を行い、チアミン欠乏感受性を支配する遺伝子の染色体上の位置を推測することにした。

また、チアミン欠乏高感受性マウスへの戻し交配第 2 代 (B2) マウスを作成し、PTD 実験を行い、チアミン欠乏に対し抵抗性の B1 マウスを識別し、コンジェニック系統が樹立できるかどうか検討した。

(3) チアミン欠乏に関連すると予想される既知遺伝子改変マウスに対する PTD 実験

非受容体型チロシンキナーゼ Fyn はエタノール依存性に NMDA 受容体 2B サブユニットのチロシン残基をリン酸化し、NMDA 受容体の機能を修飾する。また、Fyn 欠損マウスはアルコール摂取に対し高感受性を示す (Miyakawa et al., *Science*, 1997)。一方、チアミン欠乏による神経細胞死には NMDA 受容体を介したグルタミン酸による興奮毒性が関与していること、疫学的に WKS がアルコール大量飲酒者にみられることから、我々は Fyn を WKS の発症に関わる候補遺伝子と考えた。そこで、Fyn 欠損マウスを用いて PTD 実験を行い、同腹の野生型マウスと脳障害の程度について比較した。PTD 開始後 11 日目に、ブアン液で灌流固定し、パラフィンに包埋した。全脳のニッスル染色標本を作成し、神経細胞死の程度や壊死領域の分布について評価を行った。

また、チアミン欠乏により減少することが報告されているシナプス・タンパク質 Complexin II (Hazell and Wang, *J. Neurosci. Res.*, 2005) についても候補遺伝子

と考へ、Complexin II 欠損マウス（高知大学医学部、加藤邦夫教授より供与）を入手し、PTD 実験と脳障害の程度について Fyn 欠損マウスと同様に組織学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) チアミン欠乏高感受性マウスにおけるチアミン関連酵素遺伝子の多型解析

チアミン欠乏高感受性マウスおよび B6 マウス間でトランスケトラーゼ cDNA の塩基配列決定を行ったが、塩基配列多型は見いだせなかった。

チアミントランスポータ 2 をコードする SLC19A3 遺伝子についても cDNA をそれぞれ増幅し塩基配列を比較検討したが、両系統間で差違はみられなかった。今後、他のチアミン関連遺伝子についても多型を検討していく。

(2) チアミン欠乏高感受性マウスにおける原因遺伝子座の絞込み

まずチアミン欠乏高感受性マウスの雄と B6 マウスの雌を交配して得た F1 を用いて PTD 実験を行った。チアミン欠乏感受性の指標として PTD 開始後の生存率を検討したところ、F1 は B6 マウスと同様にチアミン欠乏感受性が低く、チアミン欠乏高感受性は男性の形質であることが明らかとなった。

次に、F1 をチアミン欠乏高感受性マウスに戻し交配した B1 マウスで PTD 実験を行ったところ、親である F1 が雌 (B1♀) と雄 (B1♂) の場合とで有意な差がみられ、母性遺伝の関与が示唆され (図 1)、ミトコンドリア DNA 上にチアミン欠乏感受性を左右する遺伝子が存在することが示唆された。現在、チアミン欠乏高感受性マウスのミトコンドリア DNA の塩基配列解析を進めている。

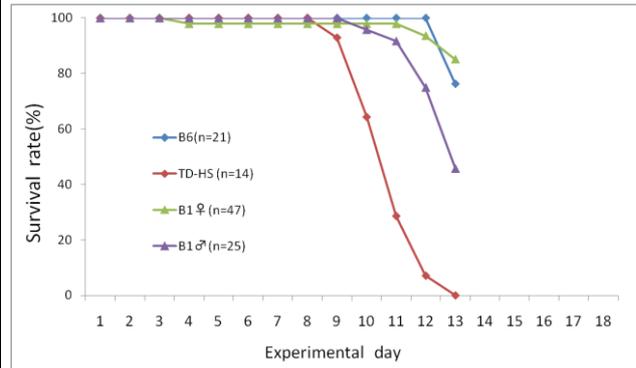


図 1 TD-HS: チアミン欠乏高感受性系統、B6: C57BL/6 系統、B1♂: 戻し交配第 1 代 (F1♂×TD-HS♀)、B1♀: 戻し交配第 1 代 (F1♀×TD-HS♂)

また、B1♂マウスの生存率はチアミン欠乏高感受性マウスよりも有意に高いことから、染色体上にも複数のチアミン欠乏感受性を司る遺伝子座が存在することが示唆された。チアミン欠乏に抵抗性を示す遺伝子座は B6 由来の染色体領域に存在すると考えられ、現在、B1 マウスで PTD 実験 15 日目以降に生存しているマウスから DNA を抽出し、マイクロサテライト多型解析により B6 由来の染色体を調べるための準備を進めている。

さらに、戻し交配第 2 代 (B2) で PTD 実験を行ったところ、B2 マウスのチアミン欠乏感受性を調べることにより、チアミン欠乏に抵抗性の B1 マウスを選抜できると考えられる結果が得られ、コンジュニック系統の作成が可能であると考えられる。現在交配を進めている。

(3) チアミン欠乏に関連すると予想される既知遺伝子改変マウスに対する PTD 実験

Fyn 欠損マウスと同腹の野生型マウスを用いて PTD 実験を行い、ニッスル染色により神経細胞死の程度や壊死領域の分布について評価を行った。しかし、Fyn 欠損マウスと野生型マウスとの間で大きな差は認められなかった。

一方、Complexin II 欠損マウスを用いて、

同様に PTD 実験を行い、神経細胞死の程度や壊死領域の分布について評価を行った。その結果、視床（外側膝状体）におけるチアミン欠乏神経細胞死が有意に増加していることが示唆された。現在、個体数を増やし、抗 NeuN 抗体による神経細胞密度の定量を行う確認実験を進めている。

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 5 件）

① Fukuda E., Hamada S., Hasegawa S., Katori S., Sanbo M., Miyakawa T., Yamamoto T., Yamamoto H., Hirabayashi T., Yagi T. Down-regulation of protocadherin-a A isoforms in mice changes contextual fear conditioning and spatial working memory. *Eur J Neurosci.* (査読有) 28(7), 1362-1376, 2008.

② Hamaguchi-Hamada K., Fujisawa Y., Koizumi O., Muneoka Y., Okado N., Hamada S. Immunohistochemical evidence for the existence of novel mammalian neuropeptides related to hydra GLW-amide neuropeptide family. *Cell Tissue Res.* (査読有) 337(1), 15-25, 2009.

③ Katori S., Hamada S. (co-first author). Noguchi Y., Fukuda E., Yamamoto T., Yamamoto H., Hasegawa S., Yagi T. Protocadherin- α family is required for serotonergic projections of appropriately innervate target brain areas. *J Neurosci.* (査読有) 29(29), 9137-9147, 2009.

④ Ohsawa S., Hamada S., Asou H., Kuida K., Uchiyama Y., Yoshida H., Miura M. Caspase-9 activation revealed by Semaphorin 7A cleavage is independent of apoptosis in the aged olfactory bulb. *J Neurosci.* (査読有) 29(36), 11385-11392, 2009.

⑤ Ohsawa S., Hamada S., Kuida K., Yoshida H., Igaki T., Miura M. Maturation of the olfactory sensory neurons by Apaf-1/caspase-9-mediated caspase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (査読有) 107(30), 13366-71, 2010.

⑥ 荒木彩 平嶋浩子 車田麻美 濱田俊

チアミン欠乏によって生じる中枢神経障害：Wernicke-Korsakoff 症候群 ビタミン (査読有) 84(11) 510-516. 2010

〔学会発表〕（計 7 件）

① 濱田俊、今枝真祐子、濱口-濱田香世子 チアミン（ビタミン B1）欠乏により生じる領域特異的神経細胞死のマウス系統差 第 31 回日本神経科学大会 2008 年 7 月 10 日 東京国際フォーラム、東京

② 濱田俊、荒木彩、今枝真祐子、濱口-濱田香世子 チアミン（ビタミン B1）欠乏により生じる嗅球での神経細胞死とその系統差 第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2009 年 3 月 28 日 岡山理科大学 岡山

③ 荒木彩、富岡未帆、濱口-濱田香世子、濱田俊 チアミン（ビタミン B1）欠乏により生じる嗅球での神経細胞死とその系統差 日本ビタミン学会第 61 回大会 2009 年 5 月 30 日 京都学園大学 京都

④ Itoga, Y., Makino, K., Hamada, S., Hirabayashi, K., Yagi, T. Analysis of gamma-protocadherin conditional targeted mice. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuro2009), September 16, 2009, Nagoya Congress Center, Nagoya

⑤ Hamada, S., Hamaguchi-Hamada, K., Koizumi, O. Immunohistochemical evidence for the existence of novel mammalian neuropeptides related to the hydra GLWamide neuropeptide family. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuro2009), September 17, 2009, Nagoya Congress Center, Nagoya

⑥ 平嶋浩子、濱田俊 チアミン欠乏により生じる領域特異的な神経細胞死に局所の神経活動が及ぼす影響 日本ビタミン学会第 62 回大会 2010 年 6 月 12 日 アイーナ（いわて県民情報交流センター）盛岡

⑦ 車田麻美、美濃部純子、小泉修、濱田俊 神経細胞の相互認識・組織化の起源を探る 日本比較生理生化学会第 32 回大会 2010 年 7 月 19 日 九州産業大学 福岡

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fwu.ac.jp/nh/hamada/hamada.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

濱田 俊 (Hamada Shun)

福岡女子大学・人間環境学部・教授

研究者番号：60282349

(2)研究分担者

濱田 香世子 (Hamaguchi-Hamada Kayoko)

福岡女子大学・人間環境学部・学術研究員

研究者番号：20448814

(3)連携研究者

八木 健 (Yagi Takeshi)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：10241241