

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580428

研究課題名(和文) 神経疾患におけるビタミンB12の機能とその治療法への適用

研究課題名(英文) Function of vitamin B12 on neural cell differentiation and an insight on cognitive symptom.

研究代表者

竹中 重雄 (TAKENAKA, Shigeo)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

研究者番号：10280067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンB12(B12)は必須の栄養素であり、近年の疫学調査から認知症の発症リスクと血漿中B12量が相関するとされている。そこで、神経様細胞に分化するSH-SY5Y細胞の複数のB12代謝(Cbl)遺伝子発現を抑制し、それらの神経への分化を検討した結果、Cbl遺伝子の発現を抑制すると神経細胞への分化率が低くなることを明らかにした。また、B12欠乏症で見られるミトコンドリア障害や酸化ストレスは見られなかった。この成果は神経の発達や維持に未知の経路でB12が関与することを示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Vitamin B12 (B12) is an essential nutrient and its serum content is correlated with progression of cognitive symptom as seen in Alzheimer's and Parkinson's disease. Here I examined effects of B12 metabolizing protein down regulation using RNA interference technique on differentiation of SH-SY5Y cell by retinoic acid to have an insight on the relation between the symptom and B12. The down regulation of the genes decreased the rate of differentiation without any significant change of metabolite profile. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress which happen under B12 deficient condition were not observed in the cells. These indicate that B12 metabolism has a part in protective function on differentiation of neural cell in unknown pathway.

研究分野：獣医生化学、栄養学

キーワード：ビタミンB12 神経 分化 レイチノイン酸

1. 研究開始当初の背景

ビタミン B12 (コバラミン; 以下 B12) はコバルト (Co) をコリノイド環に配した構造を持つ (図 1)。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⁻、SO₃⁻、CN⁻などが存在するが、それらに補酵素としての働きはない。

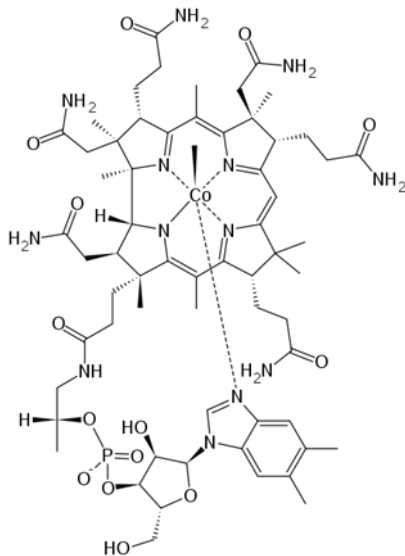


図 1 ビタミン B12

様々な上方配位子を有する Cbl 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 Cbl 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 遺伝子上の異常が生じたかによって、Cbl 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とメチルマロン酸尿症のうち、一方またはその両方が起こる。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 Cbl 欠乏が老人人口の多くを占め、Cbl 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、Cbl

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) 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球性貧血 (Megaloblastic anemia) が臨床上の問題である (Stover, Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care., 2010)。しかしながら、Cbl 欠乏による代謝異常から、神経症状や巨赤球性貧血の発症機構を説明することはできない。メタボロミクスは体液や組織、細胞などに存在する代謝物を網羅的に定性・定量し、代謝ネットワークを検証しようとする試みである (Fiehn, Comp Funct Genomics, 2001)。現在までに一度の測定からすべての代謝物を同時に検出する手法は存在しないが、近年の質量分析装置の発展によって、その測定範囲は飛躍的に向上している。申請者はこれまでに質量分析装置を用いたメタボロミクス技術による代謝解析、特に薬物による肝毒性や腎毒性、糖尿病における胎児発生異常発症、機構の解明を試み、多くの成果を挙げてきた。LCMS では代謝異常と毒性発現を関連付けるバイオマーカーの探索とその機構を明らかにする一連の手法を確立してきた (Hasegawa et al., J. Toxicol. Phatol., 2010)。TAA による肝毒性では PAG などのバイオマーカーを高精度に同定することに成功した (Hasegawa et al., Toxicol. Phatol., 2007)。また、腎毒性では病態の進行と回復の過程を生化学検査や病理検査よりも高精度に検出することに成功した (Hasegawa et al., Toxicol. Phatol., 2008)。また、GCMS でも犬特発性てんかんの診断バイオマーカー探索にも成功した (Hasegawa et al., Anal. Bioanal. Chem., in press)。本技術を用いて Cbl 代謝ノックダウンモデル細胞の代謝から、これまでに見つかっていなかった病態代謝の解明が期待出来る。申請者は HeLa 細胞を用いた Cbl 遺伝子群 RNAi によるノックダウン細胞の作製を試みた結果、Cbl 遺伝子群 RNAi による変動の大きな代謝物を見出し、Cbl 遺伝子産物それぞれの代謝への影響を、有機酸、アミノ酸、リン脂質において、想定される代謝異常状態を作出することに成功した。即ち、これまで繊維芽細胞においてのみ可能であった代謝異常と細胞機能の関係を分化誘導された株化細胞において検討することを可能にしたと言える。

2. 研究の目的

神経様培養細胞 SH-SY5 における B12 の機能: Cbl 遺伝子群のうち、これまでにその遺伝子配列が明らかにされた CblA-CblF がある。特に神経細胞においては、その機能と形態が密接に関係していることから、細胞の形態観察から細胞機能への影響を明らかにすることを目的にした。特に Cbl 遺伝子 RNAi によってメチルマロン酸蓄積モデル、

ホモシステイン蓄積モデル、そしてその両方を蓄積する代謝異常モデルを作出し、B12 欠乏状態のシミュレーションが可能な細胞モデルとして、それぞれの代謝異常が細胞分化機能へ及ぼす影響から B12 欠乏による神経症状の発症メカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

Cbl 遺伝子群 RNAi 細胞の作製

RNAi ベクター pSingleRNAi (Clontech) にメチルマロン酸蓄積モデルとして CblB, ホモシステイン蓄積モデルとして CblG, それら両方の蓄積モデルとして CblC に対するショートヘアピン配列を付加し、それぞれの Cbl 遺伝子に対する RNAi ベクターを作製した。それぞれを既報の条件によって SH-SY5Y 細胞にトランスフェクトし、選抜マーカーである G418 存在下で培養し、安定発現細胞を取得した。RNAi 効果の確認は RNAi 誘導剤であるドキシサイクリン (Dox) 存在下で 3 日間培養した細胞から抽出した RNA を用いて、それぞれの Cbl 遺伝子に対する RT-PCR から検討した。

SH-SY5Y 細胞の分化誘導

定法によって培養した SH-SY5Y 細胞に all trans retinoic acid (ATRA) を添加し、培養した。7 日後に隣の細胞とネットワークを構成している、または神経様突起の長さが細胞体の 2 倍以上になった細胞を分化した細胞として計数し、分化率を算出した。また、細胞の分化マーカーとして抗 NF-200 とファロイジンを用いたアクチンの免疫蛍光染色を行った。

細胞内代謝物の GCMS による網羅的解析

Cbl 遺伝子 RNAi により、メチルマロン酸またはホモシステインの蓄積が想定されるので、Kuhara らの方法 (J. Chromatogr. B Biomed. Sci., 2000) によって細胞内濃度を GCMS を用いて測定した。さらに ATP 含有量をルシフェラーゼ法によって測定した。

ミトコンドリア呼吸活性

RNAi 細胞のミトコンドリア呼吸活性の指標として MitoTracker CMX-ROS による染色を行った。

4. 研究成果

Cbl 遺伝子 RNAi 細胞の作製

3 種の Cbl 遺伝子 RNAi ベクターを作製し、SH-SY5Y 細胞にトランスフェクトし、抗生物質によるスクリーニングを行い、安定発現細胞を取得し、それぞれの RNAi 効率を検討した結果、それぞれは約 10~30%であったことから、十分な RNAi が行われていると判断した。また、RNAi ベクターのトランスフェクトや DOX の添加による細胞形態の変化や増殖への影響は見られなかった。

ATRA による SH-SY5Y の神経様細胞への分化に及ぼす Cbl 遺伝子 RNAi の影響

SH-SY5Y 細胞に ATRA を添加し、7 日間培養すると神経様突起を形成し、近傍の細胞とネ

ットワークを構成する。コントロール細胞では明確な神経様突起の伸長とネットワークの形成が見られたが、Cbl 遺伝子 RNAi 細胞の分化率は CblB が約 40%、CblC が約 70%、CblG が約 50%であり、Cbl 遺伝子 RNA 群では細胞体が伸長した未分化の細胞が散見された。以上の結果から、Cbl 遺伝子 RNAi によって ATRA による SH-SY5Y の神経細胞様分化が抑制されることが示された。

分化マーカーである NF-200 による免疫蛍光染色を実施した結果、それぞれの RNAi 細胞において、NF-200 の発現が確認されたが、Cbl 遺伝子 RNAi 細胞内において NF-200 がフィラメントを形成することなく、細胞質中に分散することが示唆された (図 2)。

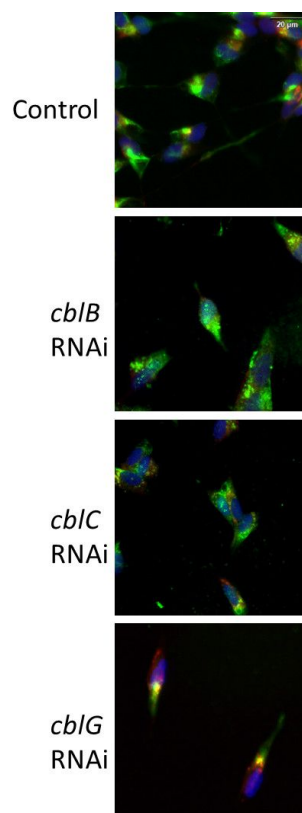


図 2 ATRA によって分化した Cbl 遺伝子 RNAi-SH-SY5Y 細胞における NF-200 の発現
NF-200 は緑で、ミトコンドリアは赤で、核は青で染色した。

Cbl 遺伝子 RNAi 細胞内代謝物プロファイルと ATP への影響

Cbl 遺伝子 RNAi によって SH-SY5Y の ATRA による神経様細胞への分化が抑制されたことから、それぞれの細胞内代謝物の変動を調べるため、細胞抽出液を調製し、GCMS による網羅的代謝物解析を行ったが、それぞれの細胞から Cbl 遺伝子抑制によって蓄積されることが期待されたメチルマロン酸、ホモシステインは検出されなかった。また、その他の低分子のプロファイルも検証したが、有意な際は認められなかった。加えて、それぞれの RNAi 細胞の ATP 含有量を検討したが、どれもコントロール細胞との間に有意な差を認め

なかった。さらに、メチルマロン酸はミトコンドリア呼吸を阻害すること、ホモシステインは酸化ストレスを与えることから、ミトコンドリア電位の検討を行ったが、ミトコンドリア電位に対する影響も認められなかった。これらの結果は、それぞれの RNAi が代謝プロファイル、さらにはエネルギー代謝である ATP 合成に対して軽微な影響しか与えていないことを示唆するものである。

以上の結果を要約すると、B12 代謝低下状態にある SH-SY5Y 細胞は神経細胞様の分化が抑制されたことから、B12 代謝の低下は神経細胞の維持に影響することが考えられる。しかしながら、その分子機構については、これまでに先天性 B12 代謝異常症において説明されてきたメチルマロン酸やホモシステインの高度な蓄積によってもたらされる電子伝達系の阻害や酸化ストレスによるものではないことが示唆された。今後、本研究において作製した B12 代謝低下神経細胞を用いて、B12 による神経保護作用の分子機構を明らかにすることが求められる。

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 13 件)

1. Oxidation of Acenaphthene and Acenaphthylene by Human Cytochrome P450 Enzymes., Shimada, T., Takenaka, S., Murayama, N., Yamazaki, H., Kim, J., Kim, D., Yoshimoto, F., Guengerich, F. & Komori, M., 査読有, *J. Toxicol. Chem.*, **28**, 268-278, 2015., DOI: 10.1021/tx500505y.
2. Profiling of serum metabolites in canine lymphoma using gas chromatography mass spectrometry., Tamai, R., Furuya, M., Hatoya, S., Akiyoshi, H., Yamamoto, R., Komori, Y., Yokoi, S., Tani, K., Hirano, Y., Komori, M. and Takenaka, S., 査読有, *J. Vet. Med. Sci.*, **76**, 1513-1518, 2014., DOI: 10.1292/jvms.14-0043.
3. Identification of vitamin B12 and pseudovitamin B12 from various edible shellfish using liquid chromatography-electrospray ionization/tandem mass spectrometry., Tanioka, Y., Takenaka, S., Furusho, T., Yabuta, Y., Nakano, Y. and Watanabe, S., 査読有, *Fish Sci.*, **80**, 1065-1071, 2014., DOI: 10.1007/s12562-014-0787-x.
4. Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Based Metabolic Profiling of Cerebrospinal Fluid from Epileptic Dogs., Hasegawa T, Sumita M, Horitani Y, Tamai R, Tanaka K, Komori M, Takenaka S., 査読有, *J Vet Med Sci.*, **76**, 517-522, 2014., DOI: 10.1292/jvms.13-0520.
5. Vitamin B12[c-lactone], a Biologically

- Inactive Corrinoid Compound, Occurs in Cultured and Dried Lion's Mane Mushroom (*Hericium erinaceus*) Fruiting Bodies., Teng F, Bito T, Takenaka S., Yabuta Y, Watanabe F., 査読有, *J Agric Food Chem.* **62**, 1726-1736, 2014., DOI: 10.1021/jf404463v.
6. Production and Characterization of Cyanocobalamin-Enriched Lettuce (*Lactuca sativa L.*) Grown Using Hydroponics. Bito T, Ohishi N, Hatanaka Y, Takenaka S, Nishihara E, Yabuta Y, Watanabe F., 査読有, *J Agric Food Chem.*, **61**, 3852-3858, 2013., DOI: 10.1021/jf305033s.
7. Metabolic Activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Aryl and Heterocyclic Amines by Human Cytochromes P450 2A13 and 2A6., Shimada T, Murayama N, Yamazaki H, Tanaka K, Takenaka S., Komori M, Kim D, Guengerich FP., 査読有, *Chem Res Toxicol.*, **26**, 529-537, 2013., DOI: 10.1021/tx3004906.
8. Binding of Diverse Environmental Chemicals with Human Cytochromes P450 2A13, 2A6, and 1B1 and Enzyme Inhibition., Shimada T, Kim D, Murayama N, Tanaka K, Takenaka S., Nagy LD, Folkman LM, Foroozesh MK, Komori M, Yamazaki H, Guengerich FP., 査読有, *Chem. Res. Toxicol.*, **26**, 517-528, 2013., DOI: 10.1021/tx300492j.
9. Characterization of Vitamin B12 compounds from the blackish-water bivalve *Corbicula japonica*., Ishihara, Y., Ueta, K., Bito, T., Takenaka, S., Yabuta, Y. and Watanabe, F., 査読有, *Fish Sci*, **79**, 321-326, 2013., DOI: 10.1007/s12562-013-0596-7.
10. Characterization of vitamin B12 compounds in biofertilizers containing purple photosynthetic bacteria., Bito, T. Ohnishi, N., Takenaka, S., Yabuta, Y., Miyamoto, E., Nishihara, E. and Watanabe, F., 査読有, *Trend Chromato.*, **7**, 23-28, 2012., URL: <http://www.researchtrends.net/tia/abstract.asp?in=0&vn=7&tid=60&aid=3687&pub=2012&type=3>
11. Identification of phosphorylation sites in *Hansenula polymorpha* Pex14p by mass spectrometry., Tanaka, K., Soeda, M., Hashimoto, Y., Takenaka, S. and Komori, Y., 査読有, *FEBS Open Bio*, **3**, 6-10, 2012., DOI: 10.1016/j.fob.2012.11.001.
12. Characterization of Vitamin B12 compounds in the wild edible mushrooms Black Trumpet (*Craterellus cornucopoides*) and Golden Chaterelle (*Cantharellus cibarius*). Watanabe, F., Schwarz, J., Takenaka, S., Miyamoto, E., Ohishi, N., Nelle, E., Hochstrasser, R., and Yabuta, Y., 査読有, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **58**,

438-411, 2012., DOI: 10.3177/jnsv.58.438.
13. Characterization of corrinoid
compounds from edible cyanobacterium
Nostochopsis sp., Hashimoto, E., Yabuta,
Y., Takenaka, S., Yamaguchi, Y., Takenaka,
H., and Watanabe, W., 査読有, *J. Nutr.
Sci., Vitaminol.*, **58**, 50-53, 2012., DOI:
10.3177/jnsv.58.50.

〔学会発表〕(計7件)

1. 馬場雄大、先天性ビタミン B12 代謝異常症遺伝子群の RNAi によるヒト神経芽細胞腫の分化抑制、日本獣医学会第 156 回大会、2014 年 9 月 10 日、北海道大学、札幌
2. 竹中重雄、アデノシルコバラミン合成酵素 RNAi による神経細胞の分化抑制、日本ビタミン学会大会、2014 年 6 月 14 日、姫路商工会議所、姫路
3. 馬場雄大、犬口腔内悪性黒色腫の GC-MS による血中代謝物プロファイル変化と放射線治療の影響、2013 年 9 月 16 日、日本医用マススペクトロメトリー学会、神戸市産業振興センター、神戸
4. 田舞理央、GC-MS を用いた腫瘍バイオマーカー探索：健常犬の血漿代謝物比較、2013 年 9 月 13 日、日本獣医学会第 155 回学術集会、岐阜大学、岐阜
5. 森田大樹、アデノシルコバラミン合成酵素 RNAi による神経細胞分化への影響、2013 年 9 月 13 日、日本獣医学会第 155 回学術集会、岐阜大学、岐阜
6. 竹中重雄、ラット脳における補酵素型ビタミン B12 の日内変化、日本ビタミン学会大会、2013 年 5 月 17 日、一ツ橋講堂、東京
7. 伊佐桃子、バイオオートグラム法を用いたラットの脳内ビタミン B12 の日内変動、日本獣医学会第 154 回学術集会、2012 年 9 月 15 日、岩手大学、岩手

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹中 重雄 (TAKENAKA, Shigeo)

大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：10280067