

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462913

研究課題名(和文) Thバランス制御を介したビオチンによるアレルギー性疾患治療効果

研究課題名(英文) Therapeutic effects of biotin on allergic dermatitis through Th balance modulation

研究代表者

黒石 智誠 (Kuroishi, Toshinobu)

東北大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30400261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ビオチンは水溶性ビタミンB群に属し、細胞内において5種類のカルボキシラーゼの補酵素として機能する。これまでに、アトピー性皮膚炎患者における血清中ビオチン濃度の低下が報告されている。本研究では、マウスモデルを用いて、アトピー性皮膚炎発症に対するビオチン摂取量の影響を解析したが、その影響は認められなかった。

一方、ビオチン欠乏マウスでは、ビオチン充足マウスと比較して肝臓中のアミノ酸(メチオニン、システインなど)含有量が低下していた。さらに、ビオチン欠乏に伴う抗酸化能の低下も認められた。

研究成果の概要(英文)：Biotin is a water-soluble B complex vitamin and functions as a co-factor of five indispensable carboxylases in cells. It was reported that serum biotin concentrations are significantly lower in atopic dermatitis patients. In this study, we investigated the effects of biotin intake on atopic dermatitis by using mouse model. However, no significant differences were detected in symptoms of atopic dermatitis between biotin-deficient and biotin-sufficient mice. On the other hand, concentrations of several amino acids, such as methionine and cysteine were significantly lower in liver taken from biotin-deficient mice than biotin-sufficient mice. Moreover, anti-oxidant capacities were significantly lower in biotin-deficient cells than biotin-sufficient cells.

研究分野：免疫学

キーワード：ビオチン アトピー性皮膚炎 接触性過敏症 メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

ビオチンは水溶性ビタミン B 群に属し、細胞内において 5 種類のカルボキシラーゼの補酵素として機能する。ビオチン依存性カルボキシラーゼは糖新生、エネルギー代謝、脂肪酸合成、アミノ酸代謝などに関係する生命活動に必須の酵素である。このため、これらビオチン依存カルボキシラーゼのビオチン化を触媒するホロカルボキシラーゼ合成酵素など、生体内でのビオチン代謝に関わる酵素の遺伝子変異は先天的代謝異常を引き起こし、ビオチン投与等の適切な治療を施さなければ致死となりうる。また、ビオチン欠乏症では脱毛や皮膚炎が認められ、金属アレルギー、関節リウマチ、クローン病等の慢性炎症性疾患や自己免疫疾患において血清ビオチン濃度が低下することが報告されている。

これまでに研究代表者らは、ビオチン欠乏マクロファージ様細胞株およびビオチン欠乏マウスを用いた研究から 1) ビオチン欠乏により炎症性サイトカインである Tumor necrosis factor (TNF) および Interleukin (IL)-1 産生が増強される、2) ビオチン欠乏マウスでは金属アレルギー性炎症が悪化し、ビオチン投与により炎症反応が改善されることを明らかにした (*J. Leukoc. Biol.* **83**: 912-920, 2008. *J. Nutr.* **39**: 1031-1036, 2009.)

アトピー性皮膚炎 (AD) 患者においても血清中ビオチン濃度の低下が報告されている。AD は増悪・寛解を繰り返す、掻痒性湿疹を主病変とする慢性難治性皮膚疾患であり、様々な遺伝的・環境的要因が指摘されている。その特徴として、2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) 反応の増強 (血中 IgE 濃度の上昇や IL-4 産生亢進) と 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1) 反応の減弱 (Interferon (IFN) - 産生の低下) が知られている。このため、Th バランスを制御し Th1 反応を増強させることにより AD を改善する試みが多くなされている。これまでに、ビオチンサプリメントの摂取によるヒト末梢血単核球での IFN- 発現の増強と IL-4 発現の低下が報告されており、ビオチンによる Th1 反応の増強が示されている。このことは、代表的な Th2 型疾患である AD に対するビオチンの治療効果を示唆する。

ビオチンは多くの食品中に広く含まれ、一般的な食生活を送っている限り栄養性ビオチン欠乏症にはなりにくいと考えられている。その一方、アレルギー治療用特殊ミルクにはビオチンが添加されていないことから、このミルクを長期摂取した乳児でのビオチン欠乏症と AD 様の皮膚炎が報告されている。このことからビオチンとアレルギーおよび AD の関連が示唆されるが、詳細は明らかではない。

AD と様々なアレルギー性疾患の関連は良く知られており、歯科・口腔領域では金属アレルギーとの関連が指摘されている。また、

近年、金属やレジンを含むハプテンへの長期間の暴露がアトピー性皮膚炎の増悪因子となり得るという “Hapten-atopy hypothesis” も提唱されている。さらに、口腔アレルギー症候群と AD の関連も報告されている。

2. 研究の目的

上述の様に、AD 患者での血中ビオチン濃度の低下やビオチンによる Th1/Th2 バランスの制御が報告されているにも関わらず、AD に対するビオチンの治療効果とその作用機序について詳細に解析した研究はこれまでに無い。

本研究では、モデルマウスを用いてビオチン摂取量と AD 発症の関連を検討し、その発症機構に対するビオチン欠乏の影響を詳細に解析する。これにより、古典的ビタミンであるビオチンの新たな生理活性を明らかにし、アレルギー性疾患に対するビオチン治療の科学的根拠を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ビオチン欠乏マウスの作製

ビオチン含有 (0.8 mg/kg) もしくはビオチン除去 AIN-76 標準飼料でマウスを 8 週間飼育し、ビオチン充足 (BS) およびビオチン欠乏 (BD) マウスとした。これまでの研究から、ビオチン欠乏飼料で 8 週間飼育することにより比較的軽度のビオチン欠乏になることを確認している。

(2) AD 自然発症モデルマウス

NC/Nga マウスは通常環境下 (非 SPF 環境下) で飼育することにより 7~8 週齢でアトピー性皮膚炎様症状を自然発症し、17 週齢頃にその症状がピーク (プラトー) に達することが報告されている。そこで、アトピー性皮膚炎症状 (皮膚炎症状、病理組織学的解析、血中 IgE・サイトカイン濃度等) に対する飼料中ビオチン含有量の影響を検討した。

(3) 接触性過敏症 (CHS) モデルマウス

BALB/cA マウスを用いて、以下の 3 種類の CHS モデルマウスを作製し、アレルギー反応に対する飼料中ビオチン含有量の影響を検討した。

FITC 誘導性 CHS モデル: 本モデルは Th2 型反応依存性 CHS モデルである。FITC を脇腹に塗布し (感作) 5 日後に FITC を耳介部へ塗布することにより (チャレンジ) 炎症 (耳介部の腫脹) を惹起した。

Oxazolone (Ox) 単回塗布誘導性 CHS モデル: 本モデルは Th1 型反応依存性 CHS モデルである。マウスの脇腹に Ox を塗布し (感作) 7 日後に Ox を耳介部へ塗布することにより

(チャレンジ) 炎症(耳介部の腫脹)を惹起した。

0x 頻回塗布誘導性 CHS モデル:本モデルでは Th1 型反応から Th2 型反応に移行することが知られている。マウスの耳介部に 0x を塗布し(感作)、感作7日後から2日おきに計8回 0x を塗布した(チャレンジ)。

(4) メタボローム解析

BS および BD マウスより肝臓を採取し、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析装置(capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry, CE-TOFMS)による水様性代謝産物の網羅的解析(メタボローム解析)を行った。

(5) 細胞傷害性試験

ヒト肝癌由来 HepG2 細胞を薬理的(10 nM)、生理的(750 pM)および欠乏(25 pM)ピオチン濃度で2週間以上培養した後、供試した。過酸化水素(H₂O₂)による細胞傷害性は培養上清中乳酸脱水素酵素(LDH)活性を指標として測定した。

4. 研究成果

(1) AD 自然発症マウスに対するピオチン摂取量の影響

BS および BD マウスともに、10 週齢(BS/BD 条件 7 週目)からアトピー性皮膚炎様症状(引っ掻き行動)が認められ、耳介部からの出血を伴う重度の皮膚炎を示す個体も認められた。しかしながら、いずれの群においてもその症状に個体差が大きく、BS および BD マウスの両群間に有意な差は認められなかった。

また、本マウスでは、アトピー性皮膚炎様症状発症に伴い、血清 IgG1 および IgE 濃度が上昇し、Th2 細胞に依存した免疫反応が増強されることが報告されている。そこで、BS および BD マウスについて経時的に血清 IgG1 および IgE 濃度を測定した。その結果、いずれの群においても、特に 17 週齢(BS/BD 条件 14 週目)で血清 IgG1 および IgE 濃度の上昇が認められたが、アトピー性皮膚炎症状と同様に個体差が大きく、BS/BD 群間に有意な差は認められなかった。

以上の結果は、ピオチン欠乏に伴いアトピー性皮膚炎様症状が悪化するという、当初の予想とは異なるものであった。

(2) CHS に対するピオチン摂取量の影響

FITC 誘導性 CHS モデル

本モデルは Th2 型反応依存性 CHS モデルである。BS および BD マウスいずれにおいても

チャレンジ 1-2 日後をピークとする耳介部の腫脹が認められた。しかしながら、BS/BD 両群間に有意差は認められなかった。

0x 単回塗布誘導性 CHS モデル

本モデルは Th1 型反応依存性 CHS モデルである。BS および BD マウスいずれにおいてもチャレンジ 1 日後をピークとして耳介部の腫脹が認められたが、FITC 誘導性 CHS モデルと同様に、BS/BD 両群間に有意差は認められなかった。

0x 頻回塗布誘導性 CHS モデル

本モデルは 0x 頻回塗布に伴い、Th1 型反応から Th2 型反応に移行する CHS モデルである。0x・2 回チャレンジでは表皮内での膿瘍形成および真皮内への炎症性細胞浸潤が認められた。0x・4 回チャレンジでは表皮内膿瘍が減少し、表皮の肥厚が認められ始めた。0x・8 回チャレンジでは真皮内への炎症性細胞浸潤が減少し、表皮の肥厚が顕著となった。また、0x チャレンジ回数に依存して Th2 型免疫グロブリンである IgG1 および IgE の血清中濃度の上昇が認められた。しかしながら、BS/BD 両群間に有意差は認められなかった。

(3) ピオチン欠乏に伴うアミノ酸代謝異常と抗酸化能の低下

ピオチンは細胞内カルボキシルラーゼの補酵素として機能し、糖新生やアミノ酸代謝、脂肪酸代謝に関与している。このため、ピオチン欠乏に伴い種々の代謝異常が誘導される。近年、代謝産物の網羅的解析(メタボローム解析)が代謝異常を研究する上で非常に有用な手法として注目されているが、ピオチン欠乏に伴うメタボローム解析の報告は無い。そこで、BS および BD マウスより採取した肝臓についてメタボローム解析を行った。

その結果、BD マウスでは BS マウスに比較して肝臓中の必須アミノ酸(メチオニン; Met、ロイシン; Leu、イソロイシン; Ile、スレオニン; Thr およびバリン; Val)含有量が有意に低下していることが明らかとなった(図1)。さらに、準必須アミノ酸であり、メチオニン異化によって生合成されるシステイン(Cys)の肝臓中含有量も BD マウスで有意に低下していた。

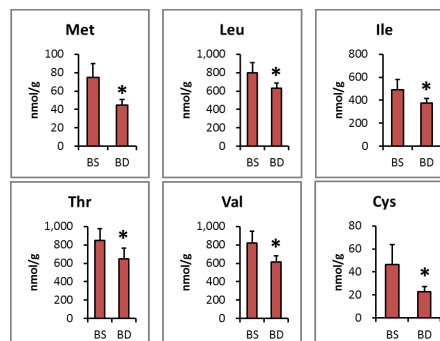


図1 BSおよびBDマウス肝臓におけるアミノ酸含有量。n=5,*P<0.05

システインは主要な抗酸化物質であるグルタチオン (GSH、 γ -Glu-Cys-Gly) を構成するアミノ酸である。GSH は Cys とグルタミン酸 (Glu) の結合により合成される γ -Glu-Cys にグリシン (Gly) が結合することにより生合成される。BD マウスでは BS マウスに比較して、肝臓中におけるグルタチオン合成経路産物の含有量が低下していた (図 2)。

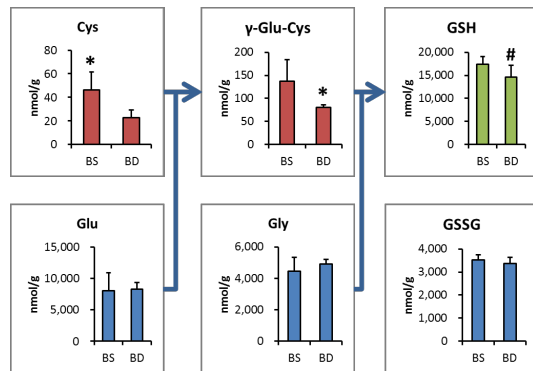


図2 BSおよびBDマウス肝臓におけるGSH合成経路産物の含有量。n = 5, * $P < 0.05$, # $P < 0.1$

さらに、ヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞をピオチン欠乏条件下で培養すると、過酸化水素による酸化ストレス (細胞傷害性) に対する感受性が有意に増強された (図 3)。

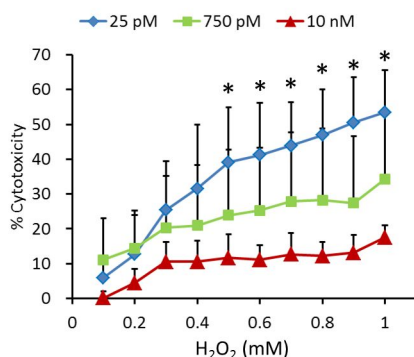


図3 H₂O₂によるHepG2細胞への細胞傷害性に対するピオチン濃度の影響。n = 4, * $P < 0.05$, vs. 10 nM

以上の結果から、ピオチン欠乏によりアミノ酸代謝異常が誘導され、グルタチオン含有量の低下と酸化ストレスに対する感受性の増強が誘導されることが明らかとなった。

(4) 今後の展開

研究計画立案時の作業仮説とは異なり、AD 自然発症および各種 CHS モデルにおいて、ピオチン欠乏に伴うアレルギー反応の悪化は認められなかった。その一方、我々は、ピオチン欠乏に伴う金属アレルギー性炎症の悪化を既に報告している。これまでの研究から、ハプテン誘導性 CHS はその炎症の程度 (耳介部の腫脹、細胞浸潤など) が金属アレルギー

に比較して強いことが明らかとなっている。このため、ピオチン欠乏によって誘導された皮膚免疫機構の変化が炎症症状に反映され難かったと考えられる。

また、本研究で用いた BD マウスは比較的軽度のピオチン欠乏であり、ヒトのピオチン欠乏症で認められる脱毛や皮膚炎症などを示さなかった。一方、飼料のタンパク源に乾燥卵白 (ピオチンに対して高親和性のアビジンを多く含み、ピオチンの吸収を阻害する) を用いることにより、重度のピオチン欠乏状態を誘導できることが報告されている。このため、この乾燥卵白飼料により重度のピオチン欠乏状態を作製し、各種アレルギー症状の変化を解析する必要がある。

一方、BD マウス由来肝臓のメタボローム解析から、ピオチン欠乏状態ではアミノ酸代謝異常が誘導され、抗酸化能も低下していることが明らかとなった。特に、必須アミノ酸含有量が有意に低下していたことから、アミノ酸取り込み機構に対するピオチン欠乏の影響が考えられるが、その詳細は明らかでなく、今後の検討課題である。また、ピオチン欠乏に伴う抗酸化能の低下に関しても、in vivo における詳細な解析が必要である。

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 4 件)

黒石智誠、ピオチン依存性カルボキシラーゼによる Th17 分化の制御 . ビタミン . 査読有 . 90 巻、2016 年、122-125 .

Kinbara, M., Bando, K., Shiraishi, D., Kuroishi, T., Nagai, Y., Ohtsu, H., Takano-Yamamoto, T., Sugawara, S., Endo, Y. Mast cell histamine-mediated transient inflammation following exposure to nickel promotes nickel allergy in mice. 査読有, *Experimental Dermatology* 25: 466-471, 2016, doi: 10.1111/exd.12985.

Kuroishi, T. Regulation of immunological and inflammatory functions by biotin. 査読有, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 93: 1-6, 2015. doi:10.1139/cjpp-2014-0460.

Bando, K., Takahashi, H., Kinbara, M., Tanaka, Y., Kuroishi, T., Sasaki, K., Takano-Yamamoto, T., Sugawara, S., Endo, Y. Resin monomers act as adjuvants in Ni-induced allergic dermatitis in vivo. 査読有, *Journal of Dental Research* 93: 1101-1107, 2014. doi: 10.1177/0022034514552674

〔学会発表〕(計5件)

Kuroishi, T., Bando, K., Shishido, K., Tanaka, Y., Kinbara, M., Endo, Y., Sugawara, S. CXCL4 is a novel nickel binding protein and augments nickel allergy at elicitation phase. 第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月20日、札幌コンベンションセンター(札幌市)。

黒石智誠・ピオチンによる代謝制御と遺伝子発現制御。第26回フォーラム・イン・ドージン、2015年11月13日、熊本ホテルキャッスル(熊本市)。

根本恭利、黒石智誠、菅原俊二。ヒト唾液腺細胞はATP刺激によりIL-6を産生する。第57回歯科基礎医学会学術大会、2015年9月12日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟市)。

黒石智誠、菅原俊二。ピオチン欠乏に伴うアミノ酸代謝異常と抗酸化能の低下。日本ビタミン学会第67回大会、2015年6月6日、奈良春日野国際フォーラム(奈良市)。

黒石智誠、田中志典、遠藤康男、菅原俊二。ピオチン欠乏マウスにおける表皮免疫担当細胞の解析。日本ビタミン学会第66回大会、2014年6月13日、姫路商工会議所(姫路市)。

〔その他〕

ホームページ等

東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座
口腔分子制御学分野ホームページ

<http://www.oral-immunology.dent.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒石 智誠 (KUROISHI, TOSHINOBU)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：30400261

(2) 研究分担者

菅原 俊二 (SUGAWARA, SHUNJI)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：10241639

田中 志典 (TANAKA, YUKINORI)

東北大学・大学院歯学研究科・JSPS 特別研究員 (PD)

研究者番号：60637958