

ビオチン欠乏が及ぼすラット海馬への影響

Effects of biotin deficiency on rat hippocampus

猪股智夫, 森 裕子, 遠藤 伸, 金剛寺真弓, 土岐賢司, 崎田克康, 二宮博義

麻布大学獣医学部実験動物学研究室

Tomo Inomata, Yuko Mori, Shin Endo, Mayumi Kongoji, Kenji Toki, Katsuyasu Sakita, Hiroyoshi Ninomiya

Department of Laboratory Animal Science, School of Veterinary Medicine, Azabu University

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

近年、成体海馬におけるニューロン新生はヒトを含めた哺乳類で一般的な現象として認められている。ニューロンの新生は、加齢、ストレス、学習、栄養因子などの種々の要因に影響を受けることや、脳障害や神経変性疾患との関連も報告されている¹⁾。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²⁾。共同研究者の前橋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³⁾。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⁴⁾、その海馬において長期増強(LTP)が抑制されること³⁾、神経細胞が萎縮すること、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されること⁵⁾を確認している。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、24例を用いた。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 $\mu\text{g}/\text{kg}$)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

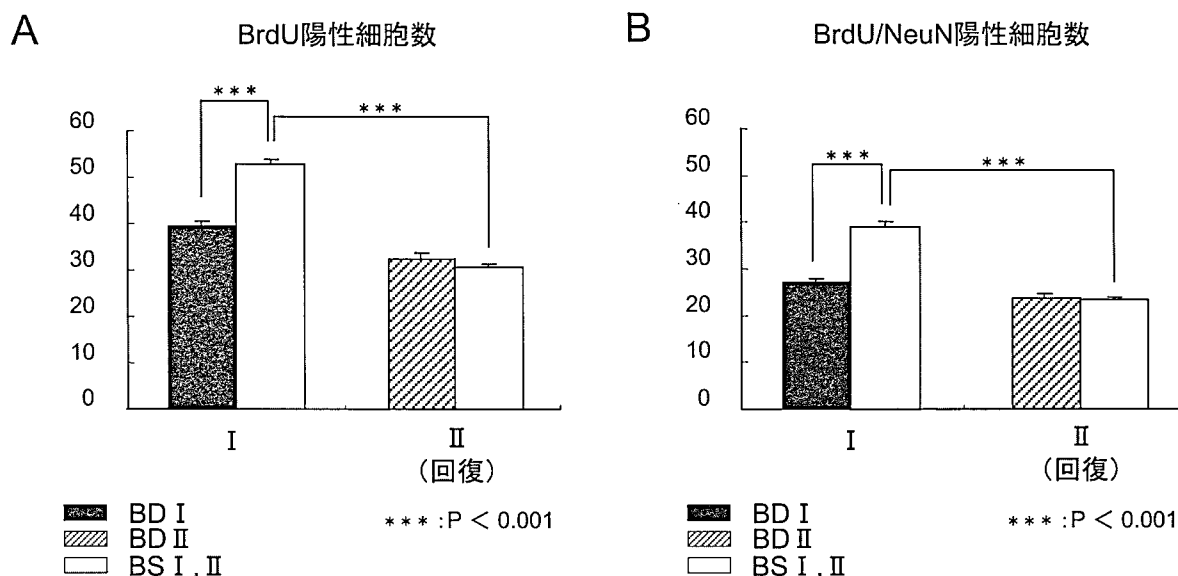


Fig.1 海馬歯状回における BrdU 陽性細胞数と BrdU/NeuN 陽性細胞数 (mean ± SEM)

BrdU 陽性細胞、BrdU/NeuN 陽性細胞ともに BD I 群は BS I 群に対して有意に低い値を示した。一方、BD II 群と BS II 群については有意な差は認められなかった。また、対照群の BS I - BS II 群間において、BrdU 陽性細胞数と BrdU/NeuN 陽性細胞数ともに BS II 群は BS I 群のそれと比べて有意 (P < 0.001) に減少していた。各群：n = 6

群・BS II 群) は BD 群へビオチンを投与し、対照群には BS I 群同様に引き続きビオチンを投与した。両群とも 4 週間後に剖検した。各群ともに海馬における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。麻酔下で全放血後、4% パラホルムアルデヒドにて灌流固定し、脳を摘出した。脳はプレグマと大脳尾側端との中間の位置で横断し、その位置から尾側に向かって厚さ 20 μm の凍結切片を個体ごとに 6 枚作製した。その後、切片は、新生ニューロンを観察するため、一部は、分裂・増殖中の細胞を検出するための抗 BrdU 抗体とニューロンを検出するための抗 neuronal nuclei (NeuN) 抗体を用いた二重免疫染色を、一部は、未熟なニューロンを検出するための抗 polysialic acid (PSA) 抗体を用いた免疫染色を、残りは抗 BrdU 抗体と神経前駆細胞を検出するために抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体を用いた二重免疫染色を施した。観察は、海馬のニューロン新生部位である歯状回顆粒細胞層およびその下層 (subgranular zone : SGZ) について行い、各染色における陽性細胞数をカウントした。

3. 結果と考察

海馬歯状回顆粒細胞層における免疫組織化学的解析の結果、新生ニューロンを示す BrdU/NeuN 陽性細胞数 (BD I : 27.1 ± 0.5, BS I : 39.1 ± 1.0) は、BS I 群と比較して BD I 群で有意 (P < 0.001) に減少していた (Fig. 1)。同様に PSA 陽性細胞数 (BD I : 58.6 ± 0.8, BS I : 67.8 ± 0.9) も、BS I 群と比較して BD I 群で有意 (P < 0.001) に減少していた (Fig. 2)。また、SGZ において神経前駆細胞を示す GFAP/BrdU 陽性細胞数 (BD I : 13.1 ± 0.4, BS I : 15.7 ± 0.9) についても BD I 群で減少する傾向 (P = 0.06) を示した (Fig. 3)。一方、回復期を設けた BD II 群・BS II 群においては、BrdU/NeuN 陽性細胞数 (BD II : 23.5 ± 0.6, BS II : 23.0 ± 0.6) は両群間でほぼ同様の値を示し (Fig. 1)、PSA 陽性細胞数 (BD II : 46.0 ± 1.6, BS II : 41.9 ± 0.8) は BD II 群のほうが BS II 群と比べて、増加する傾向 (P = 0.06) を示した (Fig. 2)。また、GFAP/BrdU 陽性細胞数 (BD II : 12.2 ± 0.7, BS II : 12.8 ± 0.4) は BrdU/NeuN と同様に両群間でほぼ同様の値を示した (Fig. 3)。

免疫組織化学的解析の結果、BD I・BS I 各群における海馬歯状回顆粒細胞層の BrdU/NeuN 陽性細胞数、PSA 陽性細胞数は、BD I 群のほうが BS I 群の

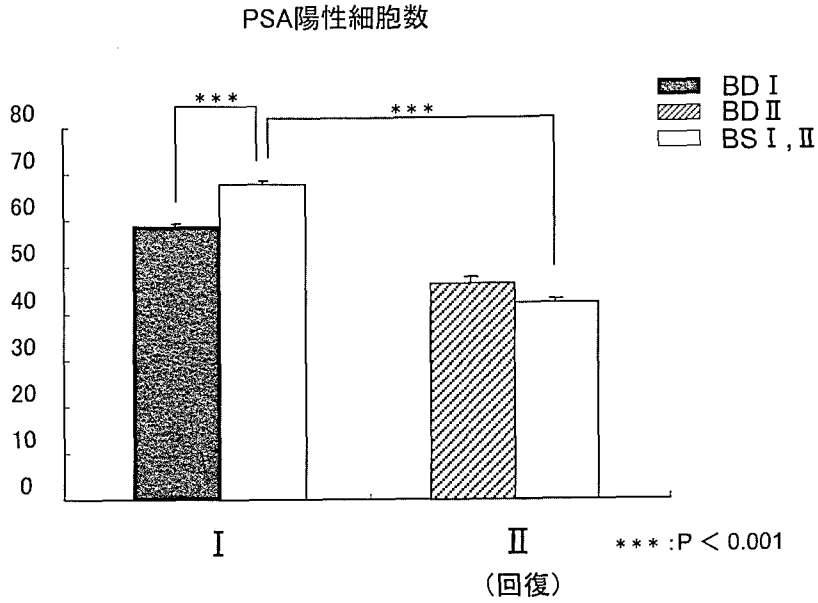


Fig.2 海馬歯状回における PSA 陽性細胞数 (mean ± SEM)

BD I 群は BS I 群に対して有意に低い値を示した。一方で BD II 群は BS II 群に比べ増加する傾向が示された (P = 0.06)。また、対照群の BS I - BS II 群間において、BS II 群の PSA 陽性細胞数は BS I 群のそれと比べて有意 (P < 0.001) に減少していた。各群: n = 6

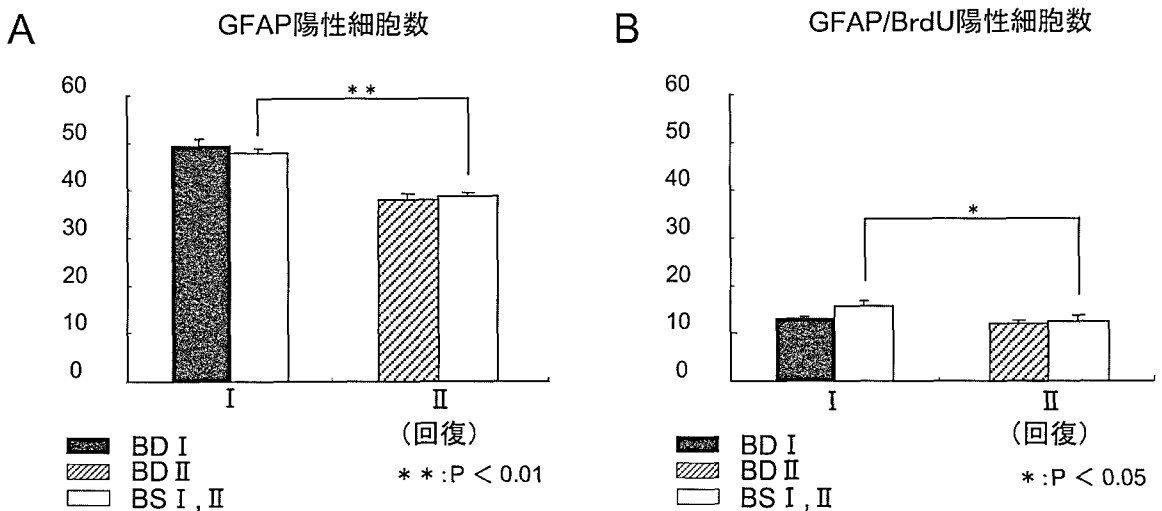


Fig.3 海馬歯状回における GFAP 陽性細胞数および GFAP/BrdU 陽性細胞数 (mean ± SEM)

BD I・BS I 群の GFAP 陽性細胞数および BD II・BS II 群の GFAP 陽性細胞数と GFAP/BrdU 陽性細胞数については有意な差は認められなかったが、BD I 群の GFAP/BrdU 陽性細胞は BS I 群に比べ減少する傾向が見られた (P = 0.06)。また、対照群の BS I - BS II 群間において、GFAP 陽性細胞数と GFAP/NeuN 陽性細胞数ともに BS II 群は BS I 群のそれと比べて有意 (それぞれ P < 0.01, P < 0.05) に減少していた。各群: n = 6

それと比べて有意に減少していた。しかし、GFAP/BrdU 陽性細胞数については BD I - BS I 群間で有意な差は認められなかった。ただし、BD I 群の GFAP/BrdU 陽性細胞数は BS I 群のそれと比べて減少する傾向を示した。以上の結果は、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ことが推察された。また、BD I

群における GFAP/BrdU 陽性細胞数が BS I 群のそれと比べて減少傾向にあったのは、神経前駆細胞が自己増殖する段階から、ある程度の増殖抑制を受けているものと考えられた。また、対照群である BS I 群、BS II 群の海馬歯状回について検討したところ、BrdU 陽性細胞数と BrdU/NeuN 陽性細胞数ともに BS II 群は BS I 群のそれと比べて有意に減少し、PSA 陽性細胞数も有意に減少していた。同様に、GFAP 陽性細胞と GFAP/BrdU 陽性細胞ともに BS II 群は BS I 群のそれと比べて有意に減少していた。BS I 群は 8 週齢で、BS II 群は 12 週齢であり、わずか 4 週間の時間経過によってニューロジェネシスは大きく減少した。この現象は、ラット海馬の新生ニューロン数は生後 6 ヶ月までは直線的に減少するが、その後は、低レベルでニューロジェネシスが続くという Seki らの報告⁶⁾と一致していた。その他に、加齢に伴うニューロジェネシスの減少は数多く報告⁶⁻⁸⁾されており、今回得られた BS I・BS II 群のデータは BD 各群を比較するのに十分に根拠のあるデータであることが示された。以上のことから、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。ビオチン欠乏 (BD) 群には生理食塩水を、対照 (BS) 群にはビオチン (200 mg/kg) を毎日腹腔内投与し、5 週間後に麻酔下で全放血後、脳を摘出し、20 μ m の連続凍結切片とした。切片は抗 BrdU 抗体と抗 neuronal nuclei (NeuN) 抗体の二重免疫染色、一部は抗 polysialic acid (PSA) 抗体による免疫染色、抗 BrdU 抗体と抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体を用いた二重免疫染色を実施し、海馬のニューロン新生部位である歯状回顆粒細胞層およびその下層 (subgranular zone : SGZ) について行い、各染色における陽性細胞数をカウントした。新生ニューロンを示す BrdU/NeuN 陽性細胞数と PSA 陽性細胞数は、BS I 群と比較して BD I 群で有意 ($P < 0.001$) に減少し

ていた。同様に SGZ において神経前駆細胞を示す GFAP/BrdU 陽性細胞数についても BD I 群で減少する傾向 ($P = 0.06$) を示した。一方、回復期を設けた BD II 群・BS II 群においては、BrdU/NeuN 陽性細胞数は両群間でほぼ同様の値を示し、PSA 陽性細胞数は BD II 群のほうが BS II 群と比べて、増加する傾向 ($P = 0.06$) を示した。GFAP/BrdU 陽性細胞数は BrdU/NeuN と同様に両群間でほぼ同様の値を示した。以上のことから、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示唆された。

文 献

- 1) Abrous D.N., Koehl M., Le Moal M. (2005) Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol. Rev.* 85: 523-569.
- 2) 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) (1989) 115-126
- 3) 前橋賢, 佐藤隆夫, 猪股智夫, アルツハイマー型痴呆とビオチン欠乏, 日本内科学会雑誌, 第 90 巻臨時増刊号 (2001) 169
- 4) Ito Y., Inomata T., Sakita K., Chida Y., Kashiwazaki N., Ninomiya H., Mabashi M. (2003) Effect of biotin deficiency on spatial learning in rats. *Exp. Anim.* 52: 232.
- 5) Mori Y., Endoh S., Yoshida S., Ito Y., Kashiwazaki N., Maebashi M., Ninomiya H., Inomata T. (2006) Effects of biotin deficiency on rat hippocampuses. *Exp. Anim.* 55: 282.
- 6) Seki T., Arai Y. (1995) Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. *J. Neuroreport.* 6: 2479-2482
- 7) Kuhn H.G., Dickinson-Anson H., Gage F.H. (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* 16: 2027-2033.
- 8) Seki T. (2002) Expression patterns of immature neuronal markers PSA-NCAM, CRMP-4 and NeuroD in the hippocampus of young adult and aged rodents. *J. Neurosci. Res.* 70: 327-334.