

## 109. 脳神経変性疾患におけるビタミン K 合成機構の解明

廣田 佳久

\*鈴鹿医療科学大学 薬学部 薬学科 衛生薬学講座

Key words : 脳神経変性疾患, ビタミン K, 神経修復, 遺伝子欠損マウス, 創薬

### 緒言

わが国では急速な高齢化社会の訪れと共に、骨粗鬆症や脳神経変性疾患などの加齢性疾患が急増している。このような疾患の予防法・治療法の開発は、国民の健やかで快適な生活を維持するために重要であり、国家的な急務といえる。特に統合記憶システムとして生物の生命活動に必須の神経系の破綻は、すべての身体能力に甚大な影響を与えることとなり、脳神経変性疾患の発症を予防・治療することは最も重要な課題である。脳神経変性疾患の中でもアルツハイマー病 (AD) は、世界的にも 1,500 万人近い患者が存在し加齢に伴い発症率が増加する進行性の難病である。最近、AD 患者において、血清中のビタミン K 濃度が低下することが報告された。さらに我々はアルツハイマー病患者の脳検体を用いて、脳内ビタミン K 濃度およびビタミン K 合成酵素 UbiA prenyltransferase domain containing protein 1 (UBIAD1) の遺伝子発現量が低下する事を見出した。また、Vos らは *ubiad1* 遺伝子を欠損させたショウジョウバエでは、ミトコンドリアの呼吸鎖の機能障害が起こるためパーキンソン病様症状を示し、ビタミン K を与えると症状が著しく改善することを報告した<sup>1)</sup>。このような脳神経変性疾患に影響を及ぼすビタミン K は、ヒトが主に摂取するビタミン K<sub>1</sub>: phylloquinone (PK) と組織内で PK から変換されるビタミン K<sub>2</sub>: menaquinone-4 (MK-4) に分類される<sup>2)</sup>。この変換反応を担う酵素は UBIAD1 であり<sup>3,4)</sup>、我々はこれまでに *Ubiad1* を全身性に欠損させたマウスが胎生致死となることを明らかにした<sup>5)</sup>。MK-4 は脳に高濃度に存在し UBIAD1 も強く発現することから、MK-4 や UBIAD1 は脳機能に重要な役割を担っている可能性が高い。そこで、本研究では、脳における MK-4 合成の意義を解明するために、神経幹細胞特異的な *Ubiad1* 遺伝子改変マウスを作出し、UBIAD1 および MK-4 の脳における機能解析を行った。さらに、AD を中心とした脳疾患に対するビタミン K の栄養学的観点に立った予防策の提示およびビタミン K を分子基盤とした治療薬の評価系の構築を試みた。

### 方法

#### 1. 神経幹細胞特異的な *Ubiad1* 欠損マウスの作出および表現型解析

*Ubiad1* の exon1 の上流と下流に *loxP* 配列を挿入した *Ubiad1*<sup>fllox/fllox,+/+</sup> (WT) マウスを作出した。WT マウスと脳神経幹細胞の中間径フィラメントである *nestin* のプロモーター下流に *cre* リコンビナーゼを発現したマウスを交配させることにより *Ubiad1*<sup>fllox/+,cre/+</sup> (Hetero) マウスを取得し、Hetero マウスを交配させることにより神経幹細胞特異的に *Ubiad1* を欠損 (*Ubiad1*<sup>fllox/fllox,cre/+</sup>; *nestin*-cKO) したマウスを作出した。作出したマウスの尾より DNA を抽出し、PCR により遺伝子型を決定した。本研究では、雄マウスを用い大脳中 *Ubiad1* 発現量は Real time-PCR により評価し、MK-4 濃度は LC-APCI MS/MS により定量した。

#### 2. ビタミン K の中枢神経再生メカニズムの解明

中枢神経再生メカニズムを評価するため、脳神経の 1 つである視神経を中枢神経モデルとして用いた。Sprague-Dawley 系のオスラットを本実験に供し、ペントバルビタールを腹腔内投与した後、MK-4 を 5  $\mu$ L マイクロシリンジにて硝子体内注射を行った。その後、外眼角切開を行い、顕微鏡下で眼球から 2 mm 離れた視神経を鉗子で 10 秒間はさみ、視神経損傷ラットを作製した。このラットを 14 日後に屠殺し、4 %パラホルムアルデヒドで灌流固定し、摘出し

\*現所属：芝浦工業大学 システム理工学部 生命科学科 生化学研究室

た視神経を包埋後、厚さ  $14\mu\text{m}$  の切片を作製した。作製した切片は、Gap43 抗体により神経修復した視神経軸索を免疫組織染色し、蛍光顕微鏡により観察した。再生した軸索数は Leon らの方法により、定量を行った<sup>6)</sup>。

### 3. 脳神経変性疾患に対する創薬を志向した新規ビタミン K 誘導体の評価

胎生 14 日齢のマウス胎仔大脳より神経幹細胞を単離し、ビタミン K 誘導体を  $10^{-6}$  M となるように添加し、4 日間培養した。培養した細胞をニューロンに特異的に発現する microtubule associated protein 2 (Map2) に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により分化誘導活性を評価した。Map2 陽性のニューロン数は、同じ蛍光強度で撮影した写真を Photoshop によりピクセル値に換算し定量した。8 視野以上の写真を定量する事により、数値を算出した。

## 結果および考察

### 1. 神経幹細胞特異的な *Ubiad1* 欠損マウスの作出および表現型解析

nestin-cKO マウスは、出生後より低体重であり、体長も WT マウスと比較しても有意に低値であった (図 1A、B)。さらに、大脳における *Ubiad1* mRNA 発現量は著しく低値であり、大脳内の組織中 MK-4 濃度は検出限界以下であった (図 1C、D)。このような結果および脳組織全体の免疫組織染色の結果から、我々は神経幹細胞特異的な *Ubiad1* 欠損マウスを作出したと判断した。これまでに表現解析は全て終了していないが、作出したマウスの行動解析から自発性交替行動率や短期記憶力が低下した AD 様の表現型を示すマウスであることが分かった。今後、このマウスの表現型を解析することによって、脳内におけるビタミン K の重要性やビタミン K 合成酵素 UBIAD1 の脳における役割や生理的な意義解明を明らかに出来ると考えられる。また、AD 様症状を示す nestin-cKO マウスを用いる事で、アミロイド  $\beta$  やタウタンパク質などの蓄積や、免疫組織染色から大脳皮質における神経細胞の著しい脱落、老人斑と神経原線維変化の沈着など AD 発症に対する UBIAD1 や UBIAD1 により合成されるビタミン K の役割やそのメカニズムを明確に出来ることが期待される。

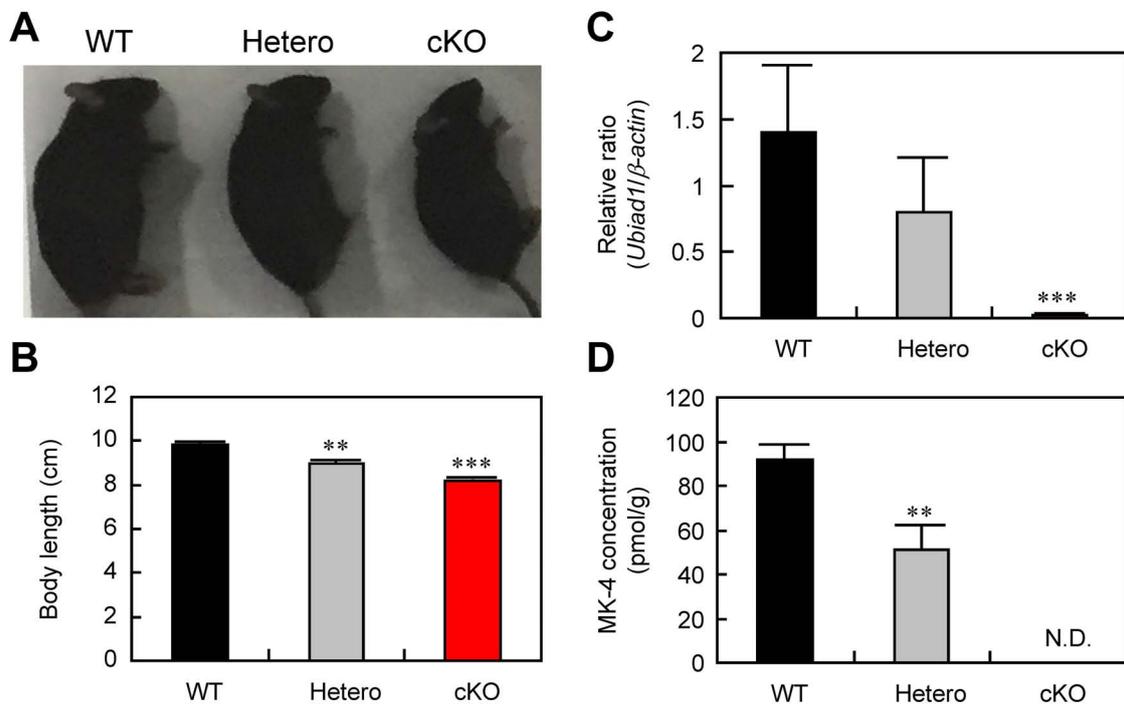


図 1. 神経幹細胞特異的な *Ubiad1* 欠損マウスの作出

(A) 12 週齢雄マウスの外観、(B) 12 週齢雄マウスの体長 (各  $n=8$ )、(C) 大脳中 *Ubiad1* mRNA 発現量、(D) 大脳内の MK-4 濃度。Not Detected : N.D. Error bar : S.D. Asterisk : \* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  (Dunnett's test vs WT) .

## 2. ビタミン K の中枢神経再生メカニズムの解明

ラットに MK-4 を硝子体内注射した後、視神経を損傷し 14 日後の軸索伸長を評価した。その結果、MK-4 を注射したラットにおいて、損傷部位から 200  $\mu\text{m}$  以上離れた位置に Gap43 陽性の軸索が複数存在し、中枢神経再生が認められた (図 2B, b)。また、コントロールとして用いた EtOH を注射したラットと比較して、有意に軸索の再生数が増加することが明らかになった (図 2C)。ビタミン K による中枢神経再生メカニズムが解明できれば、AD などの脳神経変性疾患や脊髄損傷といった不可逆的な神経損傷に対して、ビタミン K が有効なアプローチになると期待される。

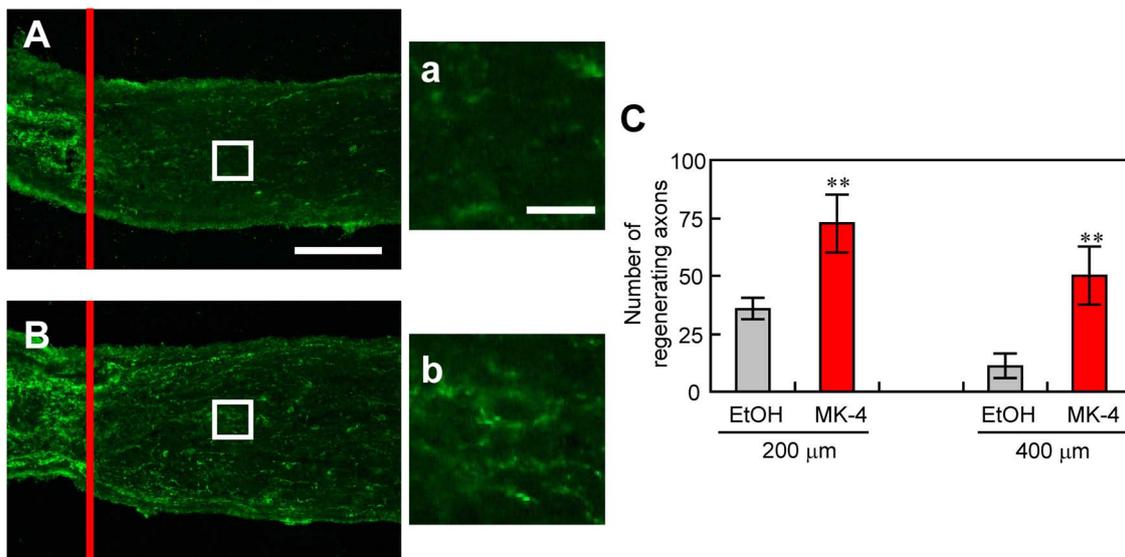


図 2. MK-4 によるラット視神経再生

(A, B) EtOH (A) または MK-4 (B) を硝子体内注射したラット視神経損傷部位 (red line) からの Gap43 陽性軸索 (緑色) の伸長。Scale bar=250  $\mu\text{m}$ 。

(a, b) A と B の white box の拡大図。Scale bar=50  $\mu\text{m}$ 。

(C) ラット視神経損傷部位から 200  $\mu\text{m}$ 、400  $\mu\text{m}$  離れた軸索の再生数。

Error bar: S.D. Asterisk: \*\* $p$ <0.01 (student's t-test vs EtOH) .

## 3. 脳神経変性疾患に対する創薬を志向したビタミン K 誘導体の評価

神経幹細胞をニューロンへ最も効率よく分化させる MK-4 と近いサイズになるように、イソプレニル側鎖が 1 つ短い MK-3 を基に側鎖末端の脂溶性を増加させる誘導体を合成し本研究に用いた (図 3)。

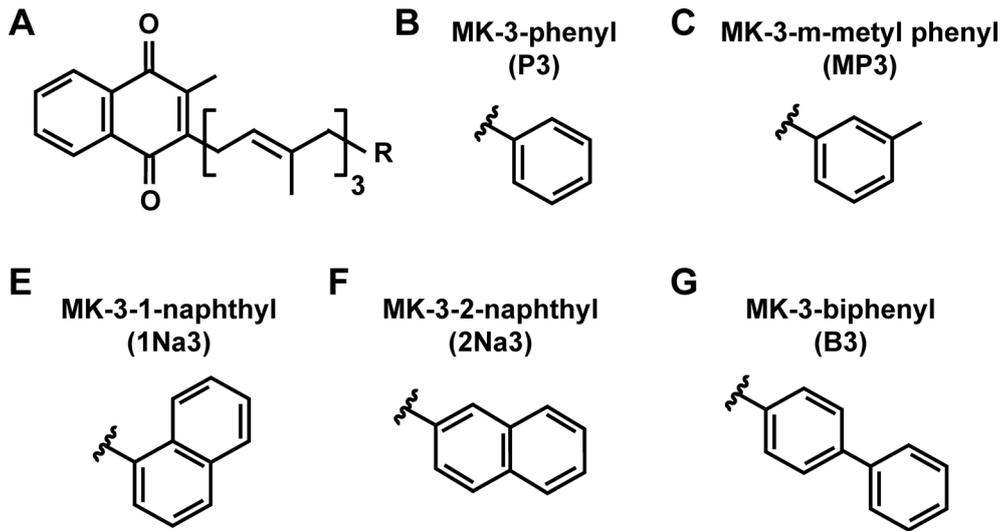


図3. 新規ビタミン K (MK-3) 誘導体の構造式

(A) Menaquinone-3: MK-3、(B) MK-3-phenyl: P3、(C) MK-3-m-methyl phenyl: MP3、(D) MK-3-1-naphthyl: 1Na3、(E) MK-3-2-naphthyl: 2Na3、(F) MK-3-biphenyl: B3。

ポジティブコントロールとして用いた MK-4 および MK-3 は、Map2 陽性のニューロンへの分化が確認された (図 4B、C)。また、ビタミン K 誘導体である 2Na3 と B3 では分化は認められず (図 4G、H)、P3、MP3、1Na3 では MK-3 よりも強く分化誘導することが明らかになった (図 4D、E、F)。同じ分子量をもつ 1Na3 と 2Na3 における、ニューロン分化誘導作用の違いが認められた理由として、ニューロン分化を担う作用タンパク質への結合様式の違いが原因と考えられる。これまでに、我々は Molecular Operating Environment (MOE) を用いたドッキングシミュレーションから、作用タンパク質のあるアミノ酸が、ビタミン K と疎水結合を形成するが、2Na3 はその結合を阻害することを見出した<sup>7)</sup>。今後、作用タンパク質に対して強いアゴニスト作用を有するビタミン K 誘導体を探索することが出来れば、脳神経変性疾患の治療薬へつながることが期待される。

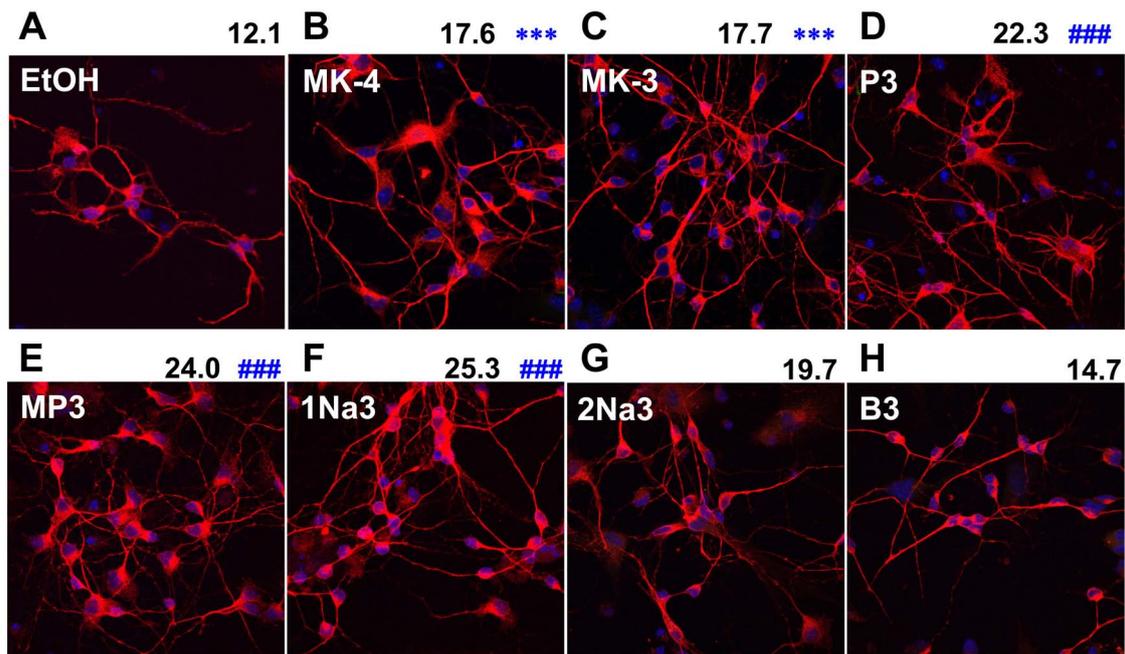


図4. 新規ビタミン K 誘導体による脳神経幹細胞のニューロンへの分化誘導作用

脳神経幹細胞に (A) EtOH (B) MK-4 (C) MK-3 (D) P3 (E) MP3 (F) 1Na3 (G) 2Na3 (H) B3 を処理し、Map2 陽性ニューロンへの分化誘導能を評価した。

Asterisk: \*\*\*p < 0.001 (Dunnett's test vs EtOH) , ###p < 0.001 (Student's t-test vs MK-3) .

細胞から動物まで統一的に解析する本研究を通して、UBIAD1 の脳内における機能を解析することは、脳内でビタミン K を合成する意義を明らかにし、脳機能の維持や AD のような脳疾患予防・治療薬の開発に有益な情報を提供できると確信する。今後、様々な組織特異的な *Ubiad1* 欠損マウスが作出されれば、ビタミン K と疾患との関連性がより明確になると考えられる。その結果、これまでの栄養学的研究からはもたらされなかったビタミン K の真の生理的役割が解明され、ビタミン K が栄養素の枠を超え、生体内でホルモンとしての役割を担うことが明らかに出来る。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、神戸薬科大学大学院薬学研究科の岡野登志夫および中川公恵、芝浦工業大学システム理工学部生命科学科の須原義智、鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科の郡山恵樹である。本稿を終えるにあたり、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

### 文献

- 1) Vos M, Esposito G, Edirisinghe JN, Vilain S, Haddad DM, Slabbaert JR, et al. Vitamin K<sub>2</sub> is a mitochondrial electron carrier that rescues pink1 deficiency. *Science*. 2012 ;336 (6086) :1306-1310. doi: 10.1126/science.1218632. PMID: 22582012
- 2) Hirota Y, Tsugawa N, Nakagawa K, Suhara Y, Tanaka K, Uchino Y, et al. Menadione (vitamin K<sub>3</sub>) is a catabolic product of oral phylloquinone (vitamin K<sub>1</sub>) in the intestine and a circulating precursor of tissue menaquinone-4 (vitamin K<sub>2</sub>) in rats. *J Biol Chem*. 2013 ;288 (46) :33071-33080. doi: 10.1074/jbc.M113.477356. PMID: 24085302
- 3) Nakagawa K, Hirota Y, Sawada N, Yuge N, Watanabe M, Uchino Y, et al. Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature*. 2010 ;468 (7320) :117-121. doi: 10.1038/nature09464. PMID: 20953171
- 4) Hirota Y, Nakagawa K, Sawada N, Okuda N, Suhara Y, Uchino Y, et al. Functional characterization of the vitamin K<sub>2</sub> biosynthetic enzyme UBIAD1. *PLoS One*. 2015 ;10 (4) :e0125737. doi: 10.1371/journal.pone.0125737. PMID: 25874989

- 5) Nakagawa K, Sawada N, Hirota Y, Uchino Y, Suhara Y, Hasegawa T, et al. Vitamin K<sub>2</sub> biosynthetic enzyme, UBIAD1 is essential for embryonic development of mice. PLoS One. 2014 ;9 (8) :e104078. doi: 10.1371/journal.pone.0104078. PMID: 25127365
- 6) Leon S, Yin Y, Nguyen J, Irwin N, Benowitz LI. Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. J Neurosci. 2000 ;20 (12) :4615-4626. PMID: 10844031
- 7) Suhara Y, Hirota Y, Hanada N, Nishina S, Eguchi S, Sakane R, et al. Synthetic Small Molecules Derived from Natural Vitamin K Homologues that Induce Selective Neuronal Differentiation of Neuronal Progenitor Cells. J Med Chem. 2015 ;58 (17) :7088-7092. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00999. PMID: 26305288