

マウスにおけるビタミンA欠乏とミッドカインの発現変化についての研究

坂本 祥子*¹⁾ 市原 啓子*²⁾ 望月 美佳*²⁾ 村松 壽子*²⁾

ミッドカインは、胚性腫瘍細胞(EC細胞)をレチノイン酸(ビタミンA酸)で分化誘導した際に発現される遺伝子の産物として見出された。マウスおよびヒトのミッドカイン遺伝子上流域にはレチノイン酸受容体の機能的結合部位が存在することが解明されている。ミッドカインとプレイオトロフィンファミリーを形成する。このミッドカインとプレイオトロフィンをともに欠損させたダブルノックアウト(DKO)マウスは、生まれ難い、成長不良、雌の生殖能力の著しい低下、高度な難聴などの異常が認められた。ビタミンAの欠乏症では、成長不良、生殖、視覚、聴覚に異常が現れることが知られている。このようにビタミンA欠乏とDKOマウスの症状には多くの類似点が認められる。これらのことから、ビタミンAがミッドカインの発現に強く関わっていることが示唆された。そこで今回、ビタミンA欠乏マウスの脳と腎臓におけるミッドカインの発現量を調べた。

雌のICRマウスを用いてコントロール食群とビタミンA欠乏食群に分けて飼育した。ビタミンAの量は、肝臓のビタミンAを抽出し、HPLCで測定した。ミッドカインの発現量は脳と腎臓からRNAを抽出し、リアルタイムPCR法で解析した。その結果、ビタミンA欠乏食で飼育したマウスは、飼育開始8ヶ月において肝臓のビタミンA量は検出限界以下にまで減少していた。これらのマウスは、眼の網膜の組織染色等により、ビタミンA欠乏状態に陥っていたことが判明した。しかし、ミッドカインの発現量は、コントロール食群に比べて、腎臓では約1/2に低下したものの、脳では差は認められなかった。このことから、腎臓でのミッドカインの発現には、一部ビタミンAが関与しているが、脳におけるミッドカインの発現にはビタミンAは関与していないことが判明した。

キーワード：ミッドカイン、プレイオトロフィン、ビタミンA、レチノイン酸

1. 緒言

ミッドカインは胚性腫瘍(EC細胞)株HM-1¹⁾のレチノイン酸による分化誘導の初期段階に発現が誘導される遺伝子の産物として発見された²⁾。レチノイン酸は生体内で、ビタミンA(レチノール)からレチナールを経て産生される。HM-1細胞を 10^{-6} ~ 10^{-8} Mレチノイン酸で2日間処理すると、分化を開始し5~14日間の間に分化が終了する。そして、筋原細胞、神経細胞、線維芽細胞、胚体外内胚葉細胞など多彩な細胞が生じる。この系では、ミッドカイン遺伝子はレチノイン酸 10^{-6} M処理後、1日目に発現が誘導されたのである。その後の研究により、ミッドカインの発

現はレチノイン酸とその受容体により、大きく増強されることが明らかになった³⁾。そして、マウスおよびヒトのミッドカイン遺伝子上流域には、レチノイン酸受容体の機能的結合部位が存在することが解明された^{3,4)}。他の細胞系でも、レチノイン酸はミッドカインの発現を上昇させることが判明している⁵⁾。さらに、レチノールによる血管内皮細胞の線溶系活性化は抗ミッドカイン抗体により阻害され⁶⁾、ミッドカインはレチノイン酸の作用を具現化する分子の1つと考えるに至った。

ミッドカインが最も強く発現しているのは中期胚であり、上皮組織、分化中の神経組織が主な発現部位である²⁾。それに比べると成体での発現は弱いが、その中では腎臓が強く、脳での発現は弱い^{2,7)}。しかし、

*1) 愛知学院大学大学院心身科学研究科健康科学専攻

*2) 愛知学院大学心身科学部健康栄養学科

(連絡先) 〒470-0195 愛知県日進市岩崎町阿良池12 E-mail: hmurama@dpc.agu.ac.jp

成体でも組織が損傷をうけると、ミッドカインの発現は増大、あるいは新たに誘導され、細胞の生存、移動を促進する。

ミッドカインはプレイオトロフィン^{8,9)}とファミリーを形成する。プレイオトロフィンはミッドカインと50%に近いアミノ酸配列同一性を示す。プレイオトロフィンは後期胚に強く発現し、成体ではミッドカインと同様に発現は弱い、脳と腎臓に発現している。しかし、プレイオトロフィンはミッドカインと異なり、その発現は脳に強く腎臓には弱い。また、生理機能についても、ミッドカインと同様な *in vitro* 活性を示す。ミッドカインあるいはプレイオトロフィンのどちらか一方の遺伝子を欠損させた遺伝子欠損マウスでは、著しい異常は示さない^{10,11)}。しかし、ミッドカインとプレイオトロフィンともに欠損させたダブルノックアウトマウスでは、産まれ難い、成長不良、雌の生殖能力の著しい低下、高度の難聴などの異常が認められる¹²⁾。

一方、ビタミンA欠乏では、成長不良、生殖および視覚、聴覚などに異常が現れることがすでに知られている。このビタミンA欠乏症は、ミッドカイン、プレイオトロフィンダブルノックアウトマウスの症状とかなりの類似点が認められる。しかしながら、ビタミンA欠乏と成体内ミッドカインの発現量についての研究は全く行われていない。そこで今回、ビタミンA欠乏マウスを用いて、ミッドカインの脳と腎臓における発現量を調べた。

II. 方法

1. 動物及び飼育方法

3週齢のICRマウスの雌13匹を2群に分け、コントロール食群 (n=6) とビタミンA欠乏食群 (n=7) に分けて飼育した。ビタミンA欠乏食群には、コントロール食よりビタミンAのみを除いたビタミンA欠乏食(いずれもオリエンタル酵母株式会社にて調整)を、水は両群とも水道水を与え、自由に摂取させた。室温23~25°C、湿度45~65%、12時間明暗サイクル(点灯:AM8:00, 消灯PM8:00)の飼育室で最長10ヵ月(44週齢)まで飼育した。週に1回ケージ、飼料、水の交換を行い、体重測定は週に1回、個体ごとに記録した。

追加実験では、3週齢のICRマウスの雌6匹をコントロール食群 (n=3)、ビタミンA欠乏食群 (n=3) に分け、同様の条件で8ヶ月間(37週齢)飼育した。

本研究は、愛知学院大学心身科学部動物実験委員会指針に従って実施した。

2. マウス肝臓からのレチノールの抽出

飼育開始から2, 3, 4, 5, 7, 10ヶ月後の時点で、コントロール食群、ビタミンA欠乏食群より各群マウス1匹ずつの肝臓を採取し、レチノールを抽出し、HPLCの測定サンプルとした。追加実験についても、飼育8ヶ月時に同様に行った。

1) 肝臓からのレチノール抽出¹³⁾

肝臓試料1gを共栓付褐色試験管にはかりとり、1% NaCl溶液0.5ml, 3%ピロガロール/エチルアルコール溶液10ml, 60% KOH溶液1mlを加え、70°Cの恒温水槽において、ガラス棒で時々攪拌しながら30分間加熱してけん化した。冷水中で冷却後、けん化液に1% NaCl溶液22.5mlを加え、酢酸エチル/n-ヘキサン混液1/9 (V/V) 15mlを加えた。振とう器で5分間振り、遠心分離(3000rpm, 5分間)後、パスツールピペットで溶媒層(上層)を褐色ナス型フラスコに移した。水層に酢酸エチル/n-ヘキサン混液15mlを加え、抽出した(2回)。溶媒層をあわせて、溶媒をロータリーエバポレーターにより減圧乾固した。エチルアルコール約3mlを加えて試料を溶解し、全量を15mlスピッツ管に移し、遠心エバポレーターで減圧乾固し、4°Cで保存した。

2) レチノール標準試料の作成

パルミチン酸レチノール333mgを共栓付褐色試験管に量りとり、肝臓試料と同様にけん化し、不けん化物を抽出し、溶媒を乾固後、レチノールを得た。レチノールを2-プロピルアルコールで希釈し、325nmの吸光度を測定して、次式よりレチノール濃度を求めた。

$$\text{レチノール濃度} (\mu\text{g/ml}) = E \times 549/100$$

E: 325nmにおける吸光度(対照: 2-プロピルアルコール)

3. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 法

JASCO社のHPLC機器を使用した。

レチノール標準試料、肝臓からのレチノール抽出試料を用いて、HPLCでレチノールの解析を行った。カラムはODS系カラム(4.6i.d.×150mm)を使用し、流速1.0ml/min、各試料は20μlインジェクションし、325nmによる紫外吸収検出器で検出した。移動相は、水/メチルアルコール8/92 (V/V)を用いた。

肝臓レチノール量の算出に関しては、レチノール標準試料を 325nm の吸光度から算出したレチノール濃度と HPLC でのピーク面積をもとに計算した。肝臓のレチノール抽出試料は、メタノールで濃度を調整し、HPLC 試料とした。ビタミン A 欠乏により、HPLC でのピークの検出が困難な場合、希釈倍率を下げて、限界まで解析を行った。さらに、正確に測定するために追加実験の 8 ヶ月マウスの肝臓のレチノール量に関しては、レチノール標準試料の検量線を用いて測定した。

4. リアルタイム PCR 法

組織からの RNA 抽出には、MACHEREY-NAGEL 社 Total RNA Isolation NucleoSpin RNA II を使用した。また、逆転写反応には、タカラバイオ株式会社 PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) を用いて行った。さらにリアルタイム PCR に関しては、タカラバイオ株式会社 Thermal Cycler Dice Real Time System II を用いて解析した。結果は、脳と腎臓について各組織の β -actin の発現量を 1 としてミッドカイン (MK) とプレイオトロフィン (PTN) の発現量を測定した。使用したプライマーは以下の通りである。

MK Forward : ATGCAGCACCGAGGCTTCTT
 MK Reverse : CTTTGGACTTGGTCTTGGAGG
 PTN Forward : ACTGGCGCCGAGTGCAAACAG
 PTN Reverse : GAGCTTGCCACAGGGCTTGGA
 β -actin Forward : GTGGGCCGCTCTAGGCACCA
 β -actin Reverse : CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGG
 GG

反応は、(95°C, 30 秒) 1 cycle, (95°C, 5 秒, 60°C, 30 秒) 40 cycle, (95°C, 15 秒, 60°C, 30 秒, 95°C, 15 秒) 1 cycle の条件で行った。

2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 ヶ月飼育マウスについては、 $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて解析し、追加実験の 8 ヶ月飼育マウスについては、検量線を用いて解析を行った。

5. マウスの組織免疫染色法

飼育開始 7 ヶ月後、10 ヶ月後の各群のマウスについて、子宮、卵巣、皮膚、眼球 (10 ヶ月のみ) の組織を採取し、固定、パラフィン包埋後、5 μ m の厚さで組織切片を作成した。追加実験の飼育 8 ヶ月では、子宮、卵巣、皮膚、眼球に加えて、肝臓についても同様に組織切片を作成した。その後、ヘマトキシリン、エオジンで染色 (HE 染色) し、顕微鏡で観察した。

III. 結果

1. 体重変化

週 1 回の体重測定の結果を図 1 に示した。コントロール食群では、体重は増加し続けるのに対し、ビタミン A 欠乏食群では飼育 4 ヶ月ごろから増加がみられず、減少傾向が見られた。8 ヶ月での体重はコントロール食群に比べ、ビタミン A 欠乏食群では平均で約 45% 減少していた。

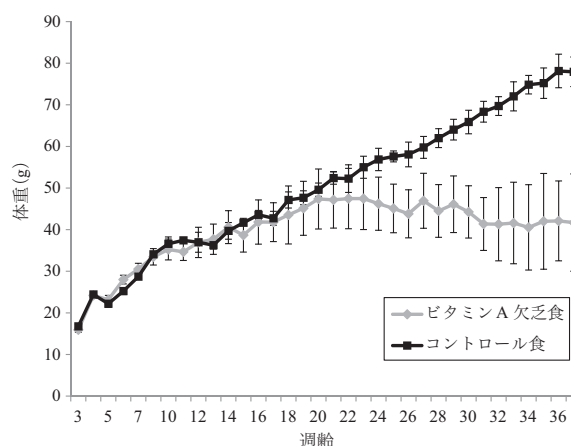


図 1 体重変化

2. HPLC によるビタミン A の定量

HPLC の結果の一例として、図 2 にスタンダードとして用いたレチノール標準試料 (A) と飼育 2 ヶ月後のコントロール食のマウスの肝臓のレチノール (B) およびビタミン A 欠乏食マウスの肝臓のレチノール (C) を示した。

レチノールのピークは約 5.8min で認められた。飼育 2 ヶ月において、コントロール食と比較し、ビタミン A 欠乏食では、著しい減少が認められた。この HPLC での結果から、それぞれのマウスの肝臓のレチノール量を算出し、図 3 と表 1 に示した。コントロールはすべての飼育期間のマウスの平均値を示しており、肝臓 1g あたり 108 μ g であった。ビタミン A 欠乏マウスでは、飼育 2 ヶ月で肝臓 1g あたり 18.9 μ g となっており、コントロールと比較して、約 6 分の 1 であった。その後、経時的に減少を示し、飼育 7 ヶ月では、0.03 μ g と肝臓のビタミン A 量は、ほとんど認められない程度にまで減少した。飼育 10 ヶ月では、今回の測定方法では、検出限界以下 (ND) であった。

飼育期間8ヶ月(37週齢)におけるマウスの肝臓のレチノール量の測定結果は、図4と表2に示した。ビタミンA欠乏マウスでは今回のHPLCの測定方法ではNDであった。コントロール食群については、肝臓1gあたり平均165 μ gであった。

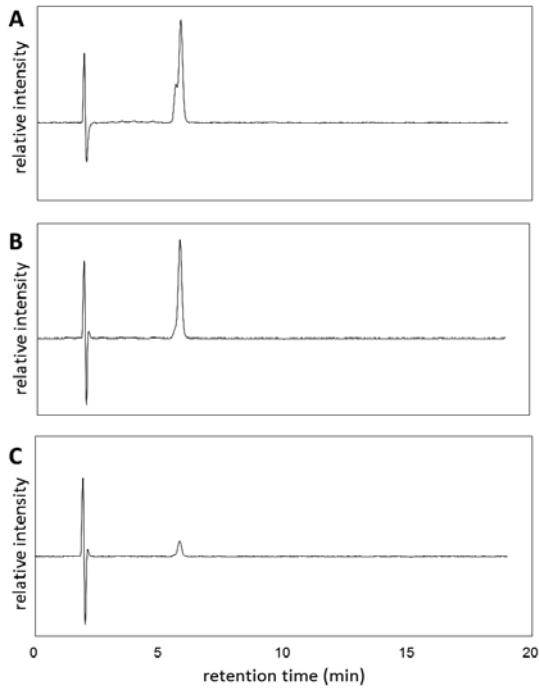


図2 HPLCによるビタミンAの定量

A: レチノール標準試料, B: コントロール食飼育2ヶ月マウス, C: ビタミンA欠乏食飼育2ヶ月マウス

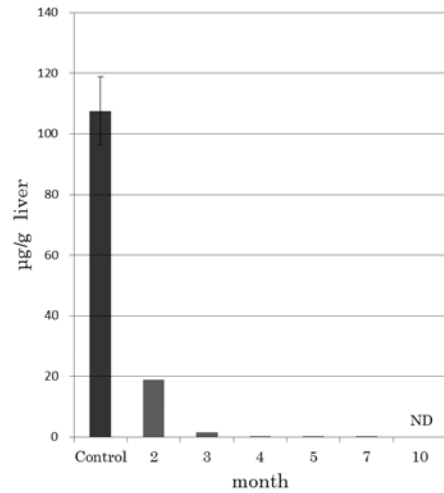


図3 ビタミンA欠乏食で飼育後のレチノール量の変化
数字はビタミンA欠乏食での飼育月数である

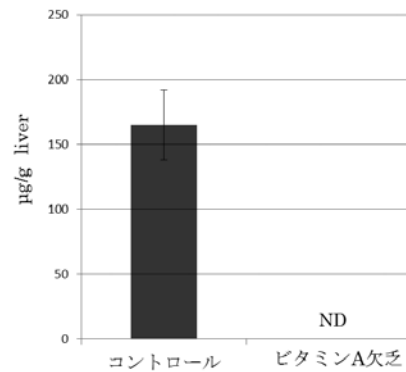


図4 飼育8ヶ月マウスの肝臓レチノール量の比較

表1 肝臓gあたりのレチノール量

飼育月数	Control (n=5)	2 (n=1)	3 (n=1)	4 (n=1)	5 (n=1)	7 (n=1)	10 (n=1)
レチノール量 (μ g)	108	18.9	1.47	0.16	0.30	0.03	ND

表2 飼育8ヶ月マウスの個々の体重と肝臓gあたりのレチノール量

	C1	C2	C3	A1	A2
解剖時の体重 (g)	84	78	72	30	53
肝臓レチノール量 (μ g)	147	218	131	ND	ND

C1~3: コントロール食マウス, A1~2: ビタミンA欠乏食マウス

3. リアルタイムPCR

飼育2, 3, 4, 5, 6, 7, 10ヶ月における脳, 腎臓からミッドカインとプレイオトロフィンのRNAを抽出

し, cDNAを作成し, リアルタイムPCR法で測定を行った(β -actinを対照とする)。

図5に飼育3ヶ月(1)および7ヶ月(2)の結果

を示した。飼育3ヶ月、7ヶ月ともに脳ではコントロール食とビタミンA欠乏食との間に大きな差は認められなかった。しかし、腎臓におけるミッドカインの発現量は、コントロールのマウスに対してビタミンA欠乏マウスは減少していた。3ヶ月では、約45%、7ヶ月では、約20%の減少が認められた。今回、図には記載しなかったが、10ヶ月においても約45%の減少が認められた。

8ヶ月の結果は、表3に示した。脳のミッドカインについては、ビタミンA欠乏食群コントロール食群の間で差は認められなかった。腎臓のミッドカインについては、ビタミンA欠乏食群がコントロール食群に比べて、約44%の減少を示した。プレイオトロフィンの発現量は、脳、腎臓ともに両群間での大きな差は認められなかった。

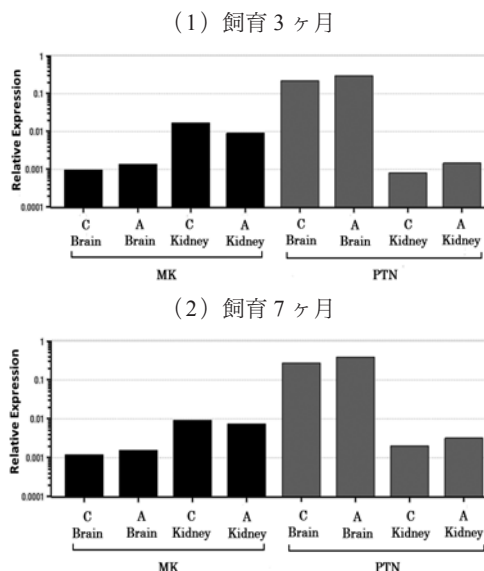


図5 ミッドカインとプレイオトロフィンの遺伝子発現量
C：コントロール食，A：ビタミンA欠乏食，MK：ミッドカイン，PTN：プレイオトロフィン

表3 飼育8ヶ月におけるミッドカインとプレイオトロフィン遺伝子の発現量 (Qty 値)

			1	2	3	平均値	相対値*
脳	MK	コントロール群	0.924	1.006	0.885	0.938	1.000
		ビタミンA欠乏群	0.962	1.368		1.165	1.242
	PTN	コントロール群	1.003	0.975	0.956	0.978	1.000
		ビタミンA欠乏群	1.349	1.355		1.352	1.383
腎臓	MK	コントロール群	1.005	0.999	0.572	0.859	1.000
		ビタミンA欠乏群	0.483	0.477		0.480	0.559
	PTN	コントロール群	0.952	1.196	1.341	1.163	1.000
		ビタミンA欠乏群	0.942	0.992		0.967	0.832

MK：ミッドカイン，PTN：プレイオトロフィン，*相対値：各遺伝子におけるコントロール群平均値を1とした値

4. 組織染色

飼育7ヶ月後のマウスについては皮膚、子宮・卵巣、10ヶ月および8ヶ月については皮膚、子宮・卵巣に加えて眼球の組織切片の観察を行った。すべての飼育期間において皮膚、子宮、卵巣についてはコントロール食群、ビタミンA欠乏食群間で著しい違いは認められなかった。しかし、眼球については、図6に示すように飼育8ヶ月マウスの網膜の厚さに著しい違いが認められた。ビタミンAを欠乏させたマウスでは、飼育10ヶ月、8ヶ月のすべてのマウスについてコントロール群のマウスに比べて、網膜が著しく薄くなっていることが確認できた。

IV. 考察

ビタミンAは、体内では主にレチニルエステルとして肝臓に貯蔵され、残りは脂肪組織に存在している。今回のビタミンA欠乏マウスの実験では、肝臓のビタミンAの測定を行った。マウス肝臓内のビタミンAは、ビタミンA欠乏飼料での飼育後2ヶ月で20%以下になり、8ヶ月では検出限界以下となった。しかし、ビタミンA欠乏8ヶ月のマウスの生体内で、完全にビタミンAが消失したとは断言できない。しかしながら、このビタミンA欠乏8ヶ月マウスは、コ

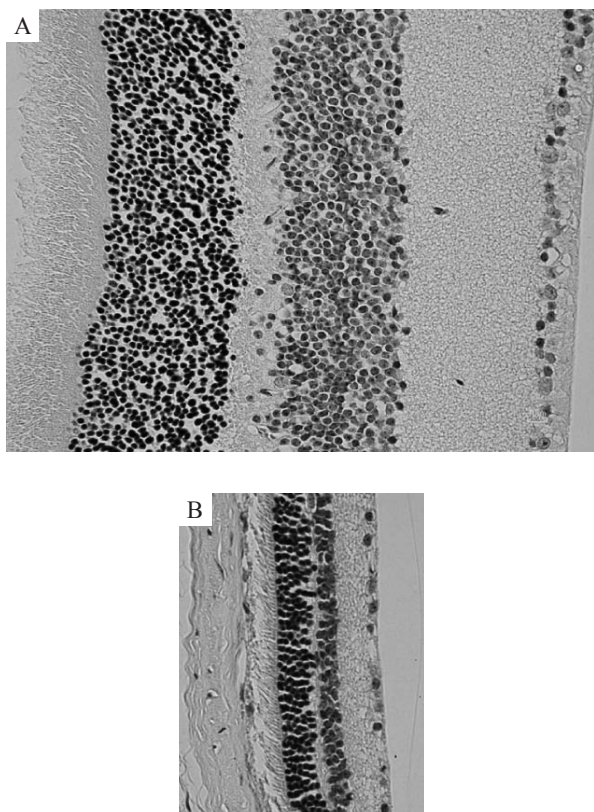


図6 網膜の構造の違い

A: コントロールマウス, B: ビタミンA欠乏マウス

ントロールマウスに比べて体重は約55%であり, 眼の網膜は著しく薄くなるという顕著な異常を呈していることから, この時点でこれらのマウスがビタミンA欠乏症に罹っていることは明らかである.

今回の実験により, ビタミンA欠乏マウスにおいて, 腎臓のミッドカイン mRNA の発現量は, ほぼ1/2に低下し, 脳のそれは, ほとんど変化しないことが判明した. この結果について, 我々は以下のように考察した.

ミッドカインは, 基本的には胎児性タンパク質であり, 成体における発現は限局され, 多くの場合少量である. マウスにおいては, 腎臓が主な発現部位であり, 脳における発現は少ないものの, 機能的に重要な可能性がある. 一方, 胚性腫瘍細胞などの胚性細胞はレチノイン酸処理しなくてもミッドカインを弱いながら発現している. このように外来性レチノイン酸なしでのミッドカインの発現を定常的発現と呼ぶことにする.

HM-1 胚性腫瘍細胞においては, 10^{-9} M レチノイン酸により定常的発現を超える発現誘導が認められる

が, 主な誘導効果は, 10^{-8} から 10^{-7} M レチノイン酸が引き起こす¹⁴⁾. 一方, 成体マウスの脳での all-trans レチノイン酸濃度は海馬での測定結果からも 10^{-8} M レベルと考えられる¹⁵⁾. 今回解析したビタミンA欠乏マウスでは肝臓のビタミンAが検出限界以下, すなわち少なくとも 10^{-8} M 以下となっている. レチノイン酸はビタミンAの代謝産物の一部に過ぎないので, 脳におけるレチノイン酸レベルは 10^{-9} M 以下に低下していると考えられる. したがってビタミンA欠乏によるレチノイン酸の濃度変化は, 胚性腫瘍細胞であればミッドカインの発現低下が起こるが, それは大幅なものでないレベルである. さらに, ミッドカインの発現制御のメカニズムは細胞によって異なっており, そのため成体の特定の臓器では, ビタミンA欠乏による, 低濃度におけるレチノイン酸の濃度変化の効果が検出しがたい可能性がある. この考えを裏書するように, ケラチノサイトのミッドカイン発現は 10^{-6} M レチノイン酸で弱く, 10^{-5} M レチノイン酸で強く誘導され, 胚性腫瘍細胞より高濃度のレチノイン酸が発現上昇に要求されている⁵⁾.

私たちは, 腎臓におけるミッドカインの発現は, 定常的発現に, あるレベルのレチノイン酸に依存する発現が加わったものであり, 脳での弱い発現はほぼ定常的発現であると考えている.

さらに, 臓器によるレチノイン酸の生産量, 蓄積量の差も考慮する必要がある. 実際, 腎臓はレチノイン酸を蓄積するが, それでもレチノール投与後に増加した濃度は17日後には減少が始まっている¹⁶⁾.

本研究の結果, マウスの腎臓ではレチノイン酸がミッドカインの発現を増強することが確認された. しかし, 脳においてはそのような効果は認められなかった. ミッドカインは神経幹細胞の生存と増殖を助け¹⁷⁾, アミロイドβペプチドの蓄積を抑えらる¹⁸⁾ので, その脳内発現レベルを保つのはアルツハイマー病予防のために重要である可能性が高い. しかし, ビタミンA欠乏が脳内ミッドカインの発現に影響を及ぼさなかったので, ビタミンA欠乏を招かない食事の効果は薄いと考えられるであろう.

引用文献

- 1) Muramatsu, H., Hamada, H., Noguchi, S., Kamada, Y., and Muramatsu, T. (1985) Cell-surface changes during in vitro differentiation of pluripotent embryonal carcinoma cells. *Dev. Biol.* 110, 284-296.
- 2) Kadomatsu, K., Tomomura, M., and Muramatsu, T. (1988)

- cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151, 1312–1318.
- 3) Matsubara, S., Take, M., Pedraza, C., and Muramatsu, T. (1994) Mapping and characterization of a retinoic acid-responsive enhancer of midkine, a novel heparin-binding growth / differentiation factor with neurotrophic activity. *J. Biochem.* 115, 1088–1096.
 - 4) Pedraza, C., Matsubara, S., and Muramatsu, T. (1995) A retinoic acid-responsive element in human midkine gene. *J. Biochem.* 117, 845–849.
 - 5) Inazumi, T., Tajima, S., Nishikawa, T., Kadomatsu, K., Muramatsu, H., and Muramatsu, T. (1997) Expression of the retinoid-inducible polypeptide, midkine, in human epidermal keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 289, 471–475.
 - 6) Kojima, S., Muramatsu, H., Amanuma, H., and Muramatsu, T. (1995) Midkine enhances fibrinolytic activity of bovine endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270, 9590–9596.
 - 7) Muramatsu, H., Shirahama, H., Yonezawa, S., Maruta, H., and Muramatsu, T. (1993) Midkine, a retinoic acid-inducible growth/differentiation factor : immunochemical evidence for the function and distribution. *Dev. Biol.* 159, 392–402.
 - 8) Li, Y.-S., Milner, P. G., Chauhan, A. K., Watson, M. A., Hoffman, R. M., Kodner, C.M., Milbrandt, J., and Deuel, T. F. (1990) Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity. *Science.* 250, 1690–1694.
 - 9) Merenmies, J., and Rauvala, H. (1990) Molecular cloning of the 18-kDa growth-associated protein of developing brain. *J. Biol. Chem.* 265, 16721–16724.
 - 10) Nakamura, E., Kadomatsu, K., Yuasa, S., Muramatsu, H., Mamiya, T., Nabeshima, T., Fan, Q.-W., Ishiguro, K., Igakura, T., Matsubara, S., Kaname, T., Horiba, M., Saito, H., and Muramatsu, T. (1998) Disruption of the midkine gene (Mdk) resulted in altered expression of a calcium binding protein in the hippocampus of infant mice and their abnormal behaviour. *Genes Cells.* 3, 811–822.
 - 11) Amet, L. E., Lauri, S. E., Hienola, A., Croll, S. D., Lu, Y., Levorso, J. M., Prabhakaran, B., Taira, T., Rauvala, H., and Vogt, T. F. (2001) Enhanced hippocampal long-term potentiation in mice lacking heparin-binding growth-associated molecule. *Mol. Cell. Neurosci.* 17, 1014–1024.
 - 12) Muramatsu, H., Zou, P., Kurosawa, N., Ichihara-Tanaka, K., Maruyama, K., Inoh, K., Sakai, T., Chen, L., Sato, M., and Muramatsu, T. (2006) Female infertility in mice deficient in midkine and pleiotrophin, which form a distinct family of growth factors. *Genes Cells.* 11, 1405–1417.
 - 13) 新美康隆編(2003). ビタミンAの定量 新・図解食品学実験, 81–84.
 - 14) Huang, R.-P., Muramatsu, H., and Muramatsu, T. (1990) Effects of different conditions of retinoic acid treatment on expression of MK gene, which is transiently activated during differentiation of embryonal carcinoma cells. *Develop. Growth. Differ.* 32, 189–195.
 - 15) Kane, M. A., Folias, A. E., Wang, C., and Napoli, J. L. (2010) Ethanol elevates physiological all-trans-retinoic acid levels in select loci through altering retinoid metabolism in multiple loci : a potential mechanism of ethanol toxicity. *FASEB J.* 24, 823–832.
 - 16) Bhat, P. V. (1997) Tissue concentrations of retinol, retinyl esters, and retinoic acid in vitamin A deficient rats administered a single dose of radioactive retinol. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75, 74–77.
 - 17) Zou, P., Muramatsu, H., Miyata, T., and Muramatsu, T. (2006) Midkine, a heparin-binding growth factor, is expressed in neural precursor cells and promotes their growth. *J. Neurochem.* 99, 1470–1479.
 - 18) Muramatsu, H., Yokoi, K., Chen, L., Ichihara-Tanaka, K., Kimura, T., and Muramatsu, T. (2011) Midkine as a factor to counteract the deposition of amyloid β -peptide plaques: in vitro analysis and examination in knockout mice. *Int. Arch. Med.* 4, 1–9.

(最終版平成 25 年 12 月 4 日受理)

Studies on the Relationship between Vitamin A Deficiency and Midkine Expression in Mice

Shoko SAKAMOTO, Keiko ICHIHARA-TANAKA, Mika MOCHIZUKI, Hisako MURAMATSU

Abstract

Midkine was found as the product of a gene, the expression of which is increased upon differentiation of embryonal carcinoma (EC) cells induced by retinoic acid (vitamin A acid). There are functional binding sites of the retinoic acid receptor in the upstream region of murine and human midkine genes. Pleiotrophin is another member of the midkine family. Mice doubly deficient in the genes of midkine and pleiotrophin are difficult to be born and exhibit female infertility and auditory deficits. These phenotypes are similar to those of vitamin A-deficient mice, namely abnormalities in growth, reproduction, vision and hearing. All these findings suggested that vitamin A might be involved in the expression of midkine through its metabolite, retinoic acid. In the present investigation, we examined expression levels of midkine gene in the brain and kidney of vitamin A deficient mice. Female ICR mice were kept with control or vitamin A-deficient food. Vitamin A levels of the animals were determined by HPLC after extraction from the liver; they became undetectable in mice fed with vitamin A deficient food for 8 months. Histological examination of these mice revealed symptoms of vitamin A deficiency, particularly abnormality in the retina. Real time PCR was used to monitor the levels of expression of midkine mRNA. We found that midkine mRNA expression was lowered to around 1/2 of the control, in the kidney of vitamin A-deficient mice. However, the expression level was unchanged in the brain. These results indicate that vitamin A is partly involved in the expression of midkine in the kidney, but is not involved in its expression in the brain.

Keywords: midkine, pleiotrophin, vitamin A, retinoic acid