

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10070

研究課題名(和文)疾患モデルマウスを用いたSLC19A3欠損症の治療法の確立

研究課題名(英文) Search for the therapeutic methods for SLC19A3 deficiency using disease model mice.

研究代表者

若松 延昭 (Wakamatsu, Nobuaki)

香川大学・医学部・客員研究員

研究者番号：60274198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：チアミントランスポーター、SLC19A3の欠損症は常染色体劣性疾患であり、乳児期に発症する重症例では、著しい脳障害がみられ、チアミン以外の有効な薬物の同定が急務である。本研究では、チアミン制限餌で飼育したSlc19a3遺伝子のホモ欠失(KO)マウスに薬物を投与し、免疫組織学的手法を用いて脳の病態を解析した。その結果、ミノマイシンとエクセンディン投与群では、無処理のKOマウスと同様に、視床のNeuN陽性細胞は脱落し、GFAP陽性細胞とIba1陽性細胞の増加が見られたが、NAC投与のKOマウスでは上記の脳病理所見が軽度であった。NACはチアミン制限による脳病態の増悪を抑制できると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チアミントランスポーターであるSLC19A3遺伝子の欠損症では、チアミンの摂取量が著しく低下するので、脳の活性型チアミン二リン酸(チアミンピロリン酸：TPP)が不足し、主にミトコンドリアでのエネルギー産生が障害され、リー脳症に類似した脳症状や脳MRI所見が見られる。従って、本研究により、体内で欠乏しているチアミン以外の本欠損症に有効な薬物を同定することは、本欠損症のみならず、リー脳症の原因となる様々なミトコンドリアに異常が見られる疾患の治療に有効と考えられる。本研究では、NAC(Nアセチルシステイン)が本欠損症に有効なことを明らかにした。従って、NACはリー脳症の治療の候補薬である。

研究成果の概要(英文)：Deficiency of a thiamine transporter, SLC19A3, is an autosomal recessive disorder and infantile case shows most severe phenotype of brain disturbance. Thiamine is effective in patients with SLC19A3 deficiency, but there is an urgent need to identify another effective drug to improve symptoms. In the present study, drugs were administered to homozygous deletion (KO) mice of Slc19a3 gene fed a thiamine-restricted diet, and the pathological findings of the brains were analyzed using an immunohistological method. As a result, in the group treated with minomycin and exenadin, the loss of NeuN-positive cells in the thalamus and the increase of GFAP-positive cells and Iba1-positive cells in the thalamus were observed as in the untreated KO mice. However, NAC-treated KO mice had reduced abnormal brain findings. Taken together, NAC can suppress the exacerbation of brain damage due to thiamin restriction in Slc19a3 KO mice.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：SLC19A3遺伝子 チアミン 疾患モデルマウス 治療 ミクログリア 神経細胞死

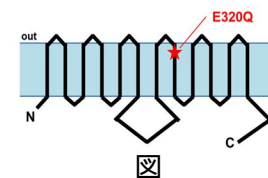
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ビタミン B1 (別名チアミン、以下チアミンと記す) は必須の水溶性ビタミンである。ヒトの体はチアミンを生産することができず、成人は 1 日当たり約 1~1.2 mg のチアミンを継続的に摂取する必要がある。ヒトには、チアミントランスポーター 1 (SLC19A2) とチアミントランスポーター 2 (SLC19A3) の 2 つのチアミントランスポーターがあり、両トランスポーターは膜貫通ドメイン (12 回) を持つタンパク質である (図)。食事のチアミンは、主に SLC19A3 によって十二指腸から上部腸管で吸収され、門脈をへて各臓器の細胞に取り込まれる。チアミンは、細胞内酵素であるチアミンピロホスホキナーゼ (TPK; EC 2.7.6.2) によって補酵素型のチアミンピロリン酸 (TPP) に変換され、TPP は細胞内において 4 つの既知の酵素に組み込まれ、3 つの代謝経路 [ペントースリン酸経路におけるトランスケトラーゼ、トリカルボン酸 (TCA) 回路に関連するピルビン酸デヒドロゲナーゼおよび α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼと 3 つの分岐鎖アミノ酸 (ロイシン、イソロイシン、バリン) の異化に関する分岐鎖 α -ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体] に関与する。従って、チアミンは、TCA サイクルを介したミトコンドリアでの ATP 産生に関連する酵素の補酵素として極めて重要である。

近年、SLC19A3 遺伝子の異常によるチアミン欠乏症が明らかになった。先にピオチン反応性大脳基底核疾患 (biotin-responsive basal ganglia disease : BBGD) またはチアミン反応性脳症 (thiamine-responsive encephalopathy) として報告された疾患であり (参考論文 1)、現在はチアミン代謝機能障害症候群-2 (Thiamine metabolism dysfunction syndrome 2 : THMD2; OMIM 607483) と命名されている。THMD2 は、染色体 2q36 上のヒトチアミントランスポーター 2 をコードする遺伝子である SLC19A3 遺伝子の機能喪失型変異によって引き起こされる常染色体劣性遺伝の神経変性疾患である (参考論文 2)。我々は、本邦で最初の乳幼児の症例を報告した。患者は乳児てんかん性痙攣 (生後 2.5 か月後) 重度知的障害と精神運動発達遅滞がみられ、脳 MRI 画像で進行性の脳萎縮、両側の視床と大脳基底核に異常信号がみられた。家系内に類似の症状を呈する患者が見られ、全ての患者から SLC19A3 遺伝子のホモ接合性変異 (c.958G>C [p.E320Q])、両親よりヘテロ接合性変異を同定した。SLC19A3 遺伝子の 958 番目の G が C になるホモ接合性の変異で、その結果、タンパク質の第 320 番目のアミノ酸であるグルタミン酸 (E) がグルタミン (Q) になる (図) (参考論文 3)。現在までに、SLC19A3 遺伝子の多くの変異が THMD2 の患者から同定されており、THMD2 の発症年齢と臨床症状が多様であることが明らかになった。

我々は、患者より同定した (c.958G>C [p.E320Q]) 変異と同じ変異を持つ Slc19a3 ノックイン (KI) マウスを作製した。また、海外で作製された Slc19a3 ノックアウト (KO) マウスを入手し、両系統のマウスをチアミン制限餌で飼育すると KO マウスは 14 日以内に、KI マウスは 30 日以内に死亡することを明らかにした。さらに、その際、KO マウスでは急激に、KI マウスでは比較的緩徐に脳視床の神経細胞が変性していることを明らかにした。



(参考論文)

- 1) Ozand PT, Gascon GG, et al. Biotin-responsive Basal Ganglia Disease: A Novel Entity. Brain 121:1267-1279, 1998.
- 2) Zeng WQ, Al-Yamani E, et al. Biotin-responsive Basal Ganglia Disease Maps to 2q36.3 and Is Due to Mutations in SLC19A3. Am J Hum Genet 77:16-26, 2005.
- 3) Yamada K, Miura K, et al. A Wide Spectrum of Clinical and Brain MRI Findings in Patients With SLC19A3 Mutations. BMC Med Genet 11:171, 2010.

2. 研究の目的

THMD2 では、チアミンの大量投与が治療に有効である。しかし、新生児または乳児に発症する重症型では、チアミンの大量投与を行っても、脳障害の後遺症が見られる場合が多く、症状が進行して死に至る症例も報告されている。一方、SLC19A3 の 2 種類の変異 (G23V と T422A) がみられる患者では、ピオチンが有効と報告されている。すなわち、チアミン以外の薬剤で治療できる可能性が示唆されている。従って、チアミン以外に THMD2 に有効な薬剤を同定し、新生児または乳児に発症する重症型に対する治療法を確立することは急務である。我々は、Slc19a3 ノックアウト (KO) マウスをチアミン制限餌で飼育すると脳視床の神経細胞変性等の所見が出現し、死亡することを報告した (発表論文 1)。従って、同マウスの脳病変を解析することで薬剤の治療効果が判定できると判断した。本研究では、KO マウスを用いてチアミン以外の

THMD2 に有効な薬剤の検索を行う。

3．研究の方法

(1) KO マウスをチアミン制限食で飼育し、視床の神経細胞の変性、活性化アストロサイト (GFAP 陽性細胞)、活性化ミクログリア (Iba1 陽性細胞) と ICAM1 陽性血管の出現を継時的に解析する。

(2) 活性酸素の増加を防ぐ N-アセチルシステイン (NAC)、ミクログリアの活性化を防ぐミノマイシン、保護的ミクログリアを活性化するエクセンディン-4 (Exendin-4) の 3 薬剤を個々に投与する。チアミン制限餌で KO マウスの飼育を開始すると同時に上記の 3 薬剤の投与を開始し、5 日間継続投与を行う。

(3) 4%PFA にて灌流固定して、マウス脳を摘出した。視床を含む組織のパラフィン切片を製作し、H&E 染色、Klüver-Barrera 染色と各種免疫染色 (NeuN、TUNEL、GFAP、Iba1、ICAM1) を行った。

4．研究成果

(1) KO マウスはチアミン制限食を開始し、約 8 日で死亡した。KO マウスの視床の NeuN 陽性細胞はチアミン制限食を開始後、5 日目に顕著に減少した。一方、3 日目より、視床の GFAP 陽性細胞、Iba1 陽性細胞と ICAM1 陽性血管が出現し、経時的に徐々に増加した。

(2) ミノマイシンと Ex-4 投与群では、PBS 投与の KO マウスと同様に、視床に NeuN 陽性細胞脱落領域がみられた。

(3) ミノマイシンと Ex-4 投与群では、PBS 投与の KO マウスと同様に、視床に GFAP 陽性細胞と Iba1 陽性細胞の増加、ICAM-1 陽性血管の増生が見られた。

(4) 一方、NAC 投与群では、視床において GFAP 陽性細胞と Iba1 陽性細胞の増加、ICAM-1 陽性血管の増生が見られず、NeuN 陽性細胞の脱落もほとんど見られなかった。

(5) 以上より、NAC は視床において、チアミン制限によって引き起こされる様々な生体反応を抑制することが明らかとなった。すなわち、NAC は、SLC19A3 欠損患者の急性期の脳病変を保護する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fukushi D, Yamada K, Suzuki K, Inaba M, Nomura N, Suzuki Y, Katoh K, Mizuno S, Wakamatsu N.	4. 巻 655
2. 論文標題 Clinical and genetic characterization of a patient with SOX5 haploinsufficiency caused by a de novo balanced reciprocal translocation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 65-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2018.02.049.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Suzuki K, Yamada K, Fukuhara Y, Tsuji A, Shibata K, Wakamatsu N.	4. 巻 12(6)
2. 論文標題 High-dose thiamine prevents brain lesions and prolongs survival of Slc19a3-deficient mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0180279	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fukushi D, Kurosawa K, Suzuki Y, Suzuki K, Yamada K, Watanabe S, Yokochi K, Wakamatsu N.	4. 巻 173(8)
2. 論文標題 Clinical and molecular genetic characterization of two siblings with trisomy 2p24.3-pter and monosomy 5p14.3-pter.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Am J Med Genet A	6. 最初と最後の頁 2201-2209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.a.38313	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Y, Enokido Y, Yamada K, Inaba M, Kuwata K, Hanada N, Morishita T, Mizuno S, Wakamatsu N.	4. 巻 8(28)
2. 論文標題 The effect of rapamycin, NVP-BEZ235, aspirin, and metformin on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway of PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS).	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 45470-45483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.17566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Teraishi M, Takaishi M, Nakajima K, Ikeda M, Higashi Y, Shimoda S, Asada Y, Hijikata A, Ohara O, Hiraki Y, Mizuno S, Fukada T, Furukawa T, Wakamatsu N, Sano S.	4. 巻 19
2. 論文標題 Critical involvement of ZEB2 in collagen fibrillogenesis: the molecular similarity between Mowat-Wilson syndrome and Ehlers-Danlos syndrome.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 46565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep46565	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanigawa J, Mimatsu H, Mizuno S, Okamoto N, Fukushi D, Tominaga K, Kidokoro H, Muramatsu Y, Nishi E, Nakamura S, Motooka D, Nomura N, Hayasaka K, Niihori T, Aoki Y, Nabatame S, Hayakawa M, Natsume J, Ozono K, Kinoshita T, Wakamatsu N, Murakami Y.	4. 巻 38(7)
2. 論文標題 Phenotype-genotype correlations of PIGO deficiency with variable phenotypes from infantile lethality to mild learning difficulties.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hum Mutat	6. 最初と最後の頁 805-815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/humu.23219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ono H, Kurosawa K, Wakamatsu N, Masuda S.	4. 巻 57(4)
2. 論文標題 Hearing impairment in a female infant with interstitial deletion of 2q24.1q24.3.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Congenit Anom (Kyoto)	6. 最初と最後の頁 118-121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12207	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakanishi K, Niida H, Tabata H, Ito T, Hori Y, Hattori M, Johmura Y, Yamada C, Ueda T, Takeuchi K, Yamada K, Nagata K, Wakamatsu N, Kishi M, Albert Pan Y, Ugawa S, Shimada S, Sanes JR, Higashi Y, Nakanishi M.	4. 巻 29(9)
2. 論文標題 Isozyme-Specific Role of SAD-A in Neuronal Migration During Development of Cerebral Cortex.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cereb Cortex	6. 最初と最後の頁 3738-3751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cercor/bhy253.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishihara Y, Itoh K, Oguro A, Chiba Y, Ueno M, Tsuji M, Vogel CFA, Yamazaki T.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Neuroprotective activation of astrocytes by methylmercury exposure in the inferior colliculus.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 13899
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50377-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Y, Hirooka K, Chiba Y, Ueno M, Ojima D, Hossain MR, Takahashi H, Yamamoto T, Kiuchi Y.	4. 巻 11(3)
2. 論文標題 Retinal ganglion cell loss in kinesin-1 cargo Alcadein deficient mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death Dis	6. 最初と最後の頁 166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-020-2363-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yanase K, Uemura N, Chiba Y, Murakami R, Fujihara R, Matsumoto K, Shirakami G, Araki N, Ueno M.	4. 巻 40(1)
2. 論文標題 Immunoreactivities for hepcidin, ferroportin, and hephaestin in astrocytes and choroid plexus epithelium of human brains.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 75-83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12611	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計16件(うち招待講演 2件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Suzuki K, Yamada K, Tsuji A, Shibata K, Wakamatsu N
2. 発表標題 Thiamine restriction induces thalamic neurodegeneration in Slc19a3-deficient mice.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤君子, 相場佳織, 福士大輔, 鈴木康予, 山田憲一郎, 若松延昭
2. 発表標題 症状が異なるXq27.1q28欠失の2女児例のX染色体不活性化解析.
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田憲一郎, 千葉陽一, 河内真知, 加藤君子, 野村紀子, 上野正樹, 若松延昭
2. 発表標題 疾患モデルマウスを用いたSLC19A3欠損症の初期脳病態の解明.
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木康予, 近田彩香, 加藤君子, 山田憲一郎, 福士大輔, 石浦浩之, 出口一志, 三井 純, 辻 省次, 若松延昭
2. 発表標題 パーキンソン病の新規GBA変異の同定と患者由来リンパ芽球の機能解析.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 友松典子, 榊原崇文, 山田憲一郎, 若松延昭, 嶋緑倫
2. 発表標題 チアミンとピオチン併用療法を行ったBiotin-responsive Basal Ganglia Diseaseの1例.
3. 学会等名 第120回日本小児科学会学術集会(東京)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 谷河純平、村上良子、富永康仁、見松はるか、岡本伸彦、青天目信、若松延昭、木下タロウ、大園恵一
2. 発表標題 高ALP血症を呈するPIGO欠損症における遺伝子型と臨床症状の関係.
3. 学会等名 The 12th Biennial Scientific Meeting of the ALPS Research Society (大阪)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Katoh K, Aiba K, Fukushi D, Suzuki Y, Yamada K, Wakamatsu N
2. 発表標題 Two female patients with Xq27.3q28 deletion and skewed X-inactivation display similar phenotypes as Hunter syndrome.
3. 学会等名 XXIII World Congress of Neurology (WCN 2017) (Kyoto, Japan) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 若松延昭、鈴木 香、辻 愛、柴田克己、山田憲一郎
2. 発表標題 疾患モデルマウスを用いたチアミントランスポーター (SLC19A3) 欠損症の病態解明.
3. 学会等名 平成29年度香川県医学会 (観音寺)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fukushi D, Kurosawa K, Suzuki Y, Suzuki K, Yamada K, Watanabe S, Yokochi K, Wakamatsu N
2. 発表標題 Clinical and molecular genetic characterization of two siblings with trisomy 2p24.3-pter and monosomy 5p14.3-pter.
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第62回大会 (神戸)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田憲一郎、鈴木 香、福原弥生、辻 愛、柴田克己、若松延昭
2. 発表標題 モデルマウスを用いたSLC19A3欠損症の病態解明とチアミン治療の検証.
3. 学会等名 2017年度 生命化学系学会合同年次大会 ConBio2017 (神戸)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木康予、榎戸 靖、山田憲一郎、稲葉美枝、花田直樹、森下 剛、水野誠司、若松延昭
2. 発表標題 メトホルミンがPIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS) 患者由来細胞におよぼす治療効果.
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 (神戸)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中西圭子, 丹伊田浩行, 田畑秀典, 伊東 剛, 堀 裕生, 服部円香, 城村由和, 山田千里, 山田憲一郎, 武内恒成, 永田浩一, 若松延昭, 岸 将史, 東雄二郎, 中西 真.
2. 発表標題 SAD-Aキナーゼは脳皮質神経細胞移動を制御する.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会 (神戸)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千葉陽一
2. 発表標題 老化促進モデルマウス (SAM) : 促進老化・高酸化ストレス状態モデルを用いた老化依存性病態の解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会 (シンポジウム: 招待講演) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 若松延昭、千葉陽一、河内真知、加藤君子、野村紀子上野正樹、山田憲一郎。
2. 発表標題 疾患モデル動物を用いたSLC19A3欠損症の病態解明と治療薬の検索。
3. 学会等名 日本ビタミン学会第71回大会（鳥取）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉陽一
2. 発表標題 老化と認知症の神経病理：ヒトとSAMマウスの接点を考える。
3. 学会等名 第34回老化促進モデルマウス（SAM）学会（教育講演：招待講演）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chiba Y, Matsumoto K, Murakami R, Uemura N, Mashima M, Yanase K, Fujihara R, Kawauchi M, Ueno M.
2. 発表標題 Expression of transporters of glucose and fructose in epithelial cells of the choroid plexus and ependymal cells of human and mouse brains.
3. 学会等名 19th International Congress of Neuropathology. . (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	野村 紀子 (Nomura Noriko) (00393132)	愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・遺伝子医療研究部・専門員 (83902)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山田 憲一郎 (Yamada Kenichiro) (30291173)	愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・遺伝子医療研究部・主任研究員 (83902)	
研究 分 担 者	千葉 陽一 (Chiba Yoichi) (30372113)	香川大学・医学部・講師 (16201)	