

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590190

研究課題名(和文) 治療薬開発を目指したリボフラビントランスポータ機能欠損の病態生理に関する研究

研究課題名(英文) Pathophysiology of riboflavin transporter deficiency for developing therapeutic drugs

研究代表者

米澤 淳(Yonezawa, Atsushi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90452341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：リボフラビントランスポータRFVT遺伝子欠損における病態生理の解明を目指して、*in vivo* や*in vitro*実験系を用いた解析を行った。その結果、マウスおよび培養細胞を用いた検討から、RFVT2は小腸下部に高発現し腸上皮細胞内への取り込みを媒介することを明示した。さらに、海外研究者との共同研究により、既報のRFVT3変異に加えて、RFVT2の機能低下がBrown-Vialetto-Van Laere syndrome (BVVLS)発症の原因になる可能性を示した。これらの成果は、BVVLSの病態生理に関する基礎的情報を得られ、治療法開発に大きく貢献したと考える。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we carried out *in vitro*, *in vivo* and clinical investigations in order to clarify the pathology of riboflavin transporter (RFVT) deficiency. The data using the mice and culture cells showed that RFVT2 is expressed in the small intestine and mediates the uptake of riboflavin into intestinal epithelial cells. In addition, in the collaboration with foreign groups, it was suggested that the deficiency of RFVT2 as well as RFVT3 causes Brown-Vialetto-Van Laere syndrome (BVVLS). These results can help to clarify the pathology and develop the therapeutic strategy for BVVLS.

研究分野：医療薬理学

キーワード：薬学 薬理学 薬物動態学 リボフラビン トランスポータ

1. 研究開始当初の背景

リボフラビン(ビタミン B2)は橙黄色の水溶性ビタミンであり、糖、脂質、アミノ酸の代謝やミトコンドリアにおける電子伝達反応において重要な役割を果たし、細胞の機能維持に必須の化合物である。一方、哺乳類ではリボフラビンの生合成経路を持たないために、体外からの補充と体内における恒常性維持が生体機能に重要である。2008年に、研究代表者らは哺乳類で初のリボフラビン輸送体となるリボフラビントランスポータ RFVT1(RFT1)の分子実体の同定に成功した。バクテリアでこれまでに報告されているリボフラビントランスポータとは全く異なった構造を示すこと、これまでに同定された哺乳類の他のトランスポータとの相同性を示さないことから、新規トランスポータファミリーに属するリボフラビン輸送体である。翌年に、RFVT1 のホモログとして小腸に高発現する RFVT3(RFT2)が同定された。さらに、我々は幅広い組織分布を示す RFT3 を同定した。

Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency (MADD; OMIM#231680) (別名: グルタル酸尿症 2 型) は脂肪酸酸化異常によりエネルギー生成不全を引き起こす疾患である。低血糖、アシドーシス、高脂肪酸血漿を呈し、新生児期に発症する重症型では死亡するケースが多い。原因遺伝子として、FADH から電子伝達系へ電子を受け渡す ETF や ETFDH の多型が同定されているが、これら遺伝子変異に関連しない MADD 症例も存在する。2010 年に申請者は、Christodoulou らと、ETF や ETFDH に変異の認められない新生児リボフラビン反応性 MADD 患者の母親に、RFVT1 の遺伝子変異があることを症例報告した。RFVT1 は胎盤に最も高発現することから、母親の RFVT1 遺伝子欠損により、母親からの胎児へのリボフラビン供給不全が原因で胎児のリボフラビン欠乏が生じたと考えられる。また、リボフラビン欠乏状態でも MADD 症状を呈することが、モデル動物で報告されている。以上より、RFT の機能異常が MADD の原因となることが強く推察される。

Brown-Vialetto-Van Laere syndrome (BVVL; OMIM#211530) は筋緊張低下や呼吸不全を引き起こす疾患である。乳児期に発症し死亡、もしくは予後が悪く進行性の橋・延髄麻痺や難聴を併発する。2011 年に、BVVL の患者で RFVT3 の遺伝子変異が発見されている。また、リボフラビンの投与によって一部症状が改善する症例も示されている。

しかし、RFVT の遺伝子変異によるリボフラビン欠乏によって異なった疾患を発症する理由、すなわち、RFVT 遺伝子変異による病態生理については明らかになっていない。また遺伝子変異による RFT のリボフラビン輸送機能への影響は不明である。

以上より、ヒトにおいて少なくとも 3 種の

リボフラビントランスポータが発現していることが判明し、リボフラビンの体内恒常性維持機構の解明とリボフラビン欠損症の診断法および治療法の開発へと繋がることが期待される。

2. 研究の目的

臨床症例報告に基づいた RFVT 遺伝子欠損における病態生理の解明と治療法の開発を目指して、in vivo や in vitro 実験系を用いた解析を行う。本研究成果は、MADD や BVVL に対し、遺伝子診断と早期治療法の確立に繋がること期待されるとともに、各種栄養素トランスポータ機能欠損症に対しても有効な治療戦略の開発に応用できると考えられる。

3. 研究の方法

RFVT ノックアウトマウスの作製

世界では全遺伝子を標的とした大規模ノックアウトマウス計画によってノックアウトマウスの提供体制が確立されつつある。国際的なマウスデータベース IMSR を用いたノックアウトマウス検索の結果、KOMP Repository (<https://www.komp.org/>) において K0 マウスが登録されている。

RFVT ノックアウトマウスにおけるリボフラビン動態解析

[³H]リボフラビンを K0 マウスに、小腸内投与、静脈内投与を行い、リボフラビンの吸収・分布・排泄における RFT の役割を評価する。また、HPLC を用いたリボフラビンの測定系を用いて、K0 マウスにおける内因性リボフラビン濃度も評価し、病態との関連を精査する。

RFVT K0 マウスの病態生理学的解析

RFVT ヘテロ K0 マウス同士の交配により、誕生する仔の遺伝子型を判定し、メンデルの法則に従うか検討する。また、RFVT K0 マウスの体重変化や生化学的検査値等の基礎的な情報を得る。さらに、既に作製済みの RFT 抗体を用いて、発現量変化や局在の確認を行う。また、MADD の発症には尿中脂肪酸濃度が鋭敏なマーカーとなることから、GC/MS を用いて評価する。

RFVT SNP の機能解析

RFVT1 は、以前報告した ETF や ETFDH 遺伝子非依存型リボフラビン反応性 MADD 患者(新生児)およびその母親における遺伝子多型や GenBank 登録の変異を含めて 6 個、RFVT3 は BVVL 患者における変異や GenBank 登録の変異 19 個、RFVT2 は GenBank 登録の 3 個の遺伝子多型が知られている。これら変異における機能変化は明らかにされていないため、in vitro 発現系を用いて遺伝子多型の機能解析を行う。すなわち、QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent

Technologies)を用いて既にクローニングした RFVT1、RFVT2、RFVT3 に変異を導入し、既に構築済みの培養細胞発現系を用いて、リボフラビン輸送活性に及ぼす遺伝子多型の影響について検討を行う。

4. 研究成果

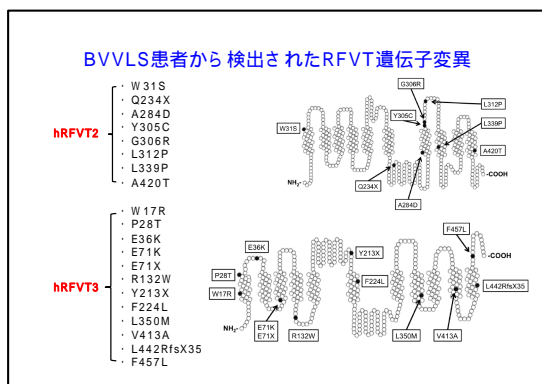
【平成 24 年度】

研究計画初年度には、リボフラビン動態解析における RFVT の役割および RFVT SNP の機能解析を行い以下の成果を得た。

T84 細胞の頂側膜における [3H] リボフラビン取り込み活性は、細胞外 pH の上昇に伴って減少し、細胞外 Na⁺ に非依存的であった。これらの輸送特性は RFVT3 の機能的特徴と酷似していた。また、頂側膜側からの [3H] リボフラビン取り込み量は、RFVT3 阻害剤であるメチレンブルーの共存により顕著に低下した。T84 細胞に RFVT3-siRNA を導入したところ、同様に頂側膜を介した [3H] リボフラビン取り込み量は有意に低下した。さらに、マウス小腸における [3H] リボフラビンの膜透過性は、メチレンブルーの共存により有意に低下した。以上のことから、RFVT3 がリボフラビンの腸管吸収に関与していることが示唆された。

BVVL 患者において RFVT2 の遺伝子多型が 2 個、RFVT3 の多型が 12 個報告されており、In vitro 発現系を用いて遺伝子多型の機能解析を行った。すなわち、QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて、既にクローニングした RFVT2、RFVT3 に変異を導入し、リボフラビン輸送活性に及ぼす遺伝子多型の影響について検討を行った。その結果、患者の重症度に対応した多型による機能低下が観察され、病態発現と RFVT 機能の関連が示唆された。

なお、昨年度 RFT は HUGO database に遺伝子名 SLC52A、タンパク名 RFVT として登録された。そのため計画書では RFT1,2,3 と記載したものを RFVT1,3,2 と変更した



【平成 25 年度】

RFVT2 および RFVT3 の生理的役割について培養細胞及びマウスを用いた検討を行った。RFVT2 は小腸下部に高発現し腸上皮細胞内へ

の取り込みを媒介することを明示した。また、RFVT3 は幅広い臓器に発現することから、今回は肝臓をモデル細胞として検討した。その結果、肝臓へのリボフラビン取り込みに大きく寄与し、血中濃度低下により発現が誘導されるなど、組織内のリボフラビン濃度の恒常性維持に寄与することが明らかとなった。

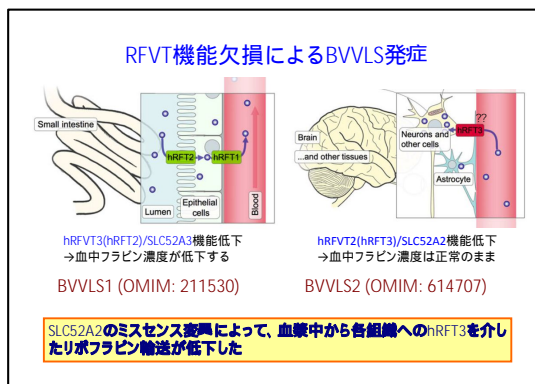
さらに、海外研究者との共同研究により Brown-Vialetto-Van Laere syndrome (BVVLS) 患者 18 名 (13 家族) の遺伝子解析および変異の機能解析を実施し、RFVT2 の機能低下が BVVLS 発症の原因になる可能性を示した。また、高用量のリボフラビン投与により症状の完全が見られ、有効な治療法に繋がると期待された。

【平成 26 年度】

最終年度には、これまでに得られた患者情報ならびに培養細胞を用いた RFVT の機能解析の結果に基づき、動物を用いた病態生理学的解析を実施した。RFVT 機能欠損マウスにおいて Brown-Vialetto-Van Laere Syndrome (BVVLS) 患者と臨床症状と合致する検査所見が観察された。さらに、ある薬物 A によってこれらが回復することを確認した。本研究成果は、本モデルマウスが BVVLS のモデル動物になることを示すとともに、治療法開発に大きく貢献するものと考えられる。

研究期間全体を通じて、培養細胞、実験動物、患者情報を組み合わせ、BVVLS の病態生理に関する基礎的情報を得られ、治療法開発に大きく貢献したと考える。特に、既報の RFVT3/SLC52A3 変異に加えて、RFVT2/SLC52A2 の変異についても BVVLS 症状を示す症例を報告した。RFVT2 遺伝子変異患者においては、RFVT3 の場合と異なりリボフラビンの血中濃度低下をほとんど示さない特徴を示すことから、OMIN の登録についても新しい分類がなされ、BVVLS2; OMIM#614707 が新たに登録された。

今後、本研究で作成したモデル動物について論文報告をするとともに、病態生理の解明と治療法の開発につなげる予定である。



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5件)

1. Yoshimatsu H, Yonezawa A, Yao Y, Sugano K, Nakagawa S, Omura T, Matsubara K. Functional involvement of RFVT3/SLC52A3 in intestinal riboflavin absorption. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 306(2): G102-10, 2014 DOI: 10.1152/ajpgi.00349.2013.
2. Foley AR, Menezes MP, Pandraud A, Gonzalez MA, Al-Odaib A, Abrams AJ, Sugano K, Yonezawa A, 他 46 名. Treatable childhood neuronopathy caused by mutations in riboflavin transporter RFVT2. Brain. 137(Pt 1): 44-56, 2014 DOI: 10.1093/brain/awt315.
3. Yao Y, Yonezawa A, Yoshimatsu H, Omura T, Masuda S, Matsubara K. Involvement of Riboflavin Transporter RFVT2/Slc52a2 in Hepatic Homeostasis of Riboflavin in Mice. Eur J Pharmacol. 714(1-3): 281-287, 2013 DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.07.042.
4. Yonezawa A, Inui K. Novel riboflavin transporter family RFVT/SLC52: Identification, nomenclature, functional characterization and genetic diseases of RFVT/SLC52. Mol Aspects Med. 34(2-3): 693-701, 2013 [Review] DOI: 10.1016/j.mam.2012.07.014
5. Haack TB, Makowski C, Yao Y, Graf E, Hempe M, Wieland T, Tauer U, Ahting U, Mayr JA, Freisinger P, Yoshimatsu H, Inui K, Strom TM, Meitinger T, Yonezawa A, Prokisch H. Impaired riboflavin transport due to missense mutations in SLC52A2 causes Brown-Vialetto-Van Laere syndrome. J Inher Metab Dis. 35(6): 943-948, 2012 DOI: 10.1007/s10545-012-9513-y

[学会発表](計6件)

1. 山西香里、米澤 淳、吉松宏樹、八尾祉顕、中川俊作、大村友博、今井哲司、中川貴之、松原和夫；リマウスにおいてリボフラビントランスポータ3(Rfvt3)の欠損は、リボフラビンの欠乏によるエネルギー代謝異常と新生児死亡を引き起こす、第8回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 平成26年11月15日 熊本
2. 米澤 淳、八尾祉顕、吉松宏樹、菅野久美子、山西香里、大村友博、中川俊作、

- 松原和夫；リボフラビントランスポータ RFVT 変異による希少疾患 BVVLS の発症、医療薬学フォーラム 2014 / 第 22 回クリニカルファーマシーシンポジウム 平成 26 年 6 月 29 日 東京 Invited Lecture
3. 吉松宏樹、米澤 淳、山西香里、八尾祉顕、中川俊作、大村友博、松原和夫；RFVT3 ノックアウトマウスにおけるリボフラビン恒常性の破綻、日本薬学会第 134 年会 平成 26 年 3 月 29 日 熊本
 4. 菅野久美子、米澤 淳、吉松宏樹、八尾祉顕、大村友博、John Christodoulou、松原和夫；Brown-Vialetto-Van Laere syndrome (BVVLS)患者におけるリボフラビントランスポータ2(RFVT2/SLC52A2) 遺伝子多型の機能解析、第7回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2013 年 11 月 23 日 仙台
 5. 吉松 宏樹、米澤 淳、八尾 祉顕、桂 敏也、松原 和夫；リボフラビンの腸管吸収における RFVT3/SLC52A3 の役割、日本薬学会第 133 年会 2013 年 3 月 27 日 横浜
 6. 八尾 祉顕、米澤 淳、吉松宏樹、増田智先、桂 敏也、松原和夫；リボフラビンの肝取り込みにおける RFVT/SLC52A の関与、第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2012 年 11 月 16 日 京都

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~yakuzai/practice.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米澤 淳 (YONEZAWA ATSUSHI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：90452341

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし