

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08095

研究課題名(和文) RFVTノックアウトマウスを用いた病態メカニズム解析

研究課題名(英文) Pathological analysis of RFVT knockout mice

研究代表者

米澤 淳 (Yonezawa, Atsushi)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：90452341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：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、アミノ酸の代謝などで重要な役割を果たす。リボフラビントランスポーターRFVT 遺伝子欠損における病態生理の解明を目的とし研究を行なった。その結果、マウスにおいてRFVTの欠損により、エネルギー源の代謝異常が確認され、これはリボフラビンの欠乏に起因することが明示された。本研究成果は、RFVT遺伝子欠損の関わる希少疾患の治療法開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Riboflavin (Vitamin B2) is a orange-yellow water-soluble vitamin, which plays important roles in the metabolism of glucose, amino acids and lipids. In the present study, we analyzed the pathology of the disruption in riboflavin transporter RFVT gene. It was revealed that the disruption of RFVT gene induced metabolic disorders, caused by riboflavin deficiency, in mice. These results will contribute to the development of therapy in RFVT-genetic rare diseases.

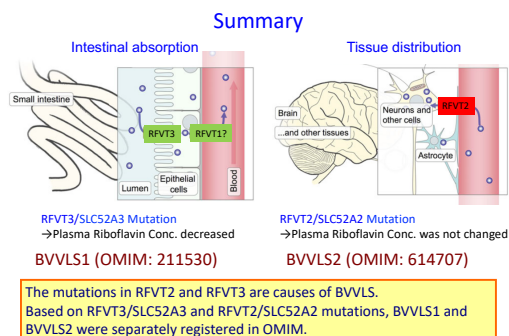
研究分野：薬物動態学

キーワード：ビタミンB2 トランスポータ 薬学 リボフラビン

## 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。これまでに、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ー RFVT1 および RFVT3 の分子実体の同定に成功した。さらに、分子機能解析、*in vivo* 動態解析を行い、RFVT の生理的役割の解明を進めてきた。

Brown-Vialetto-Van Laere syndrome (BVVLS; 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。また、脂肪酸代謝異常も報告されており、一部 MADD や脂肪酸代謝関連遺伝子欠損と似た症状を示す。2010 年から、BVVLS の患者で RFVT3/SLC52A3 の遺伝子変異が発見されている。また、我々は RFVT2/SLC52A2 の変異についても同様に、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 の場合とこと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。このことから、OMIM 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。両遺伝子変異患者において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。したがって、RFVT の遺伝子欠損によるリボフラビン欠乏が BVVLS 発症に関与する可能性が示唆されているが、数少ない症例報告であることから詳細なメカニズムは不明である。



## 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を目的とし、KO マウスや *in vitro* 実験系を用いた解析を行う。また、メタボローム解析の手法を用いてリボフラビンのエネルギー代謝における役割解明も行なう。本研究成果は、希少疾患である BVVLS に対し、遺伝子診断と早期治療法の確立に繋がることが期待されるとともに、類似の病態を示す多くの脂肪酸代謝異常症に対しても有効な治療法の開発に応用できると考えられる。

## 3. 研究の方法

### ① RFVT ノックアウトマウスの表現系解析

既に樹立した RFVT3 ノックアウトマウスの表現系の解析を実施する。ヘテロ KO 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 KO 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 RFVT 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。外部受託試験（島津テクノロジー）により GC/MS を用いて評価する。

### ② 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 KO 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 RFVT の役割を評価する。特に、RFVT は小腸や腎臓に発現が高いことから、RFVT KO マウスでは吸収および排泄の解析を実施する。また、RFVT1 は幅広い組織分布を示すことから、各組織への取り込み能を中心に解析を行う。

### ③ RFVT KO マウスの病態生理学的解析

本 BVVLS モデルマウスは、脂肪酸代謝異常症モデルマウスと似た病態を示すと考えられる。これらのマウスにおいて、脂肪酸代謝異常に加えて低血糖、アミノ酸代謝異常等のエネルギー代謝異常を示す。しかし、各マウスにおいて異なったプロファイルを示すことから、RFVT 欠損マウスにおいて、脂肪酸代謝異常に加えてどのようなエネルギー代謝変化を引き起こすかを、メタボローム解析 (C-SCOPE、HMT Inc.) により解析を行う。さらに、疑われる代謝異常に注目して標識代謝物を用いる標識メタボローム解析 (F-SCOPE、HMT Inc.) によって、代謝経路ごとの活性の増減やその反応方向を決定する。

### ④ RFVT を介したリボフラビンの輸送解析

RFVT 発現細胞にリボフラビン、FMN もしくは FAD を処置し、細胞内のそれらの濃度を HPLC 法により測定する。また、排出実験では、RFVT 発現細胞を PBS でインキュベーションしたのち同様に細胞内濃度の測定を行う。

## 4. 研究成果

### ① RFVT ノックアウトマウスの表現系解析

既に樹立した RFVT3 ノックアウトマウスの表現系の解析を実施した。ヘテロ KO マウス同士の交配により、誕生する仔の遺伝子型

を判定し結果、メンデルの法則に従い誕生することが明らかとなった。出生時の RFVT ノックアウトマウスの体重は野生型に比して有意に低値を示し、出生 1~2 日でほとんどが死亡することが判明した。また、RFVT ノックアウトマウス新生児ではと Brown-Vialletto-Van Laere syndrome (BVVLS) で幾つか報告されているアシルカルニチンの上昇が観察された。

### ② RFVT ノックアウトマウスにおけるリボフラビン動態解析

RFVT ノックアウトマウス新生仔の血中および組織中 (脳、腎臓、肝臓、心臓、肺) のリボフラビン濃度は野生型に比して著明に低下していた。妊娠 16 日目のヘテロノックアウトマウスに [3H]リボフラビンを投与したところ、RFVT ノックアウトマウス胎児中の放射活性は野生型胎児に比して有意に低値を示した。

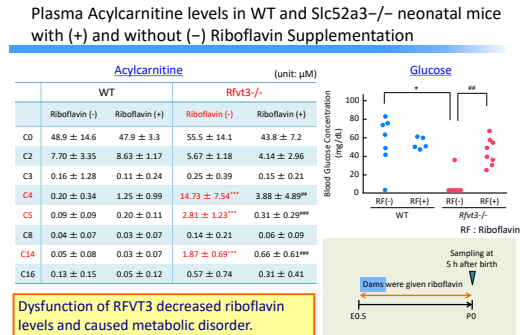
以上より、RFVT3 は胎盤において胎児へのリボフラビンの移行に関与することが明らかとなり、機能欠損に伴う移行性の低下は新生児のリボフラビン欠乏を来すことが示された。

### ③ RFVT KO マウスの病態生理学的解析

メタボローム解析や種々の検討の結果、RFVT3 KO マウスでは脂肪酸代謝異常に加えて低血糖や一部のアミノ酸代謝異常が認められた。また、これらの現象は、母体へのリボフラビンの過剰投与により抑制された。また、生後 1 日以内に死亡した RFVT3 KO マウス新生仔は、リボフラビンの投与により長期的に生存することが確認され、リボフラビン投与の中止により低血糖が再発することが確認された。

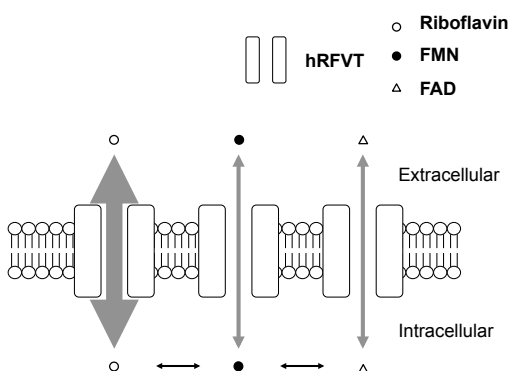
以上より、RFVT3 の欠損により、エネルギー源の代謝異常が確認され、これはリボフラビンの欠乏に起因することが明示された。

RFVT3 遺伝子多型と Brown-Vialetto-Van Laere syndrome (BVVLS) の関係が示唆されており、BVVLS 治療にリボフラビンが有用である可能性が示唆された。



④ リボフラビンの細胞内恒常性維持機構解明

RFVT はリボフラビンの細胞膜透過を司る。RFVT の基質認識特製の解析の結果、リボフラビンは良好な基質となり輸送されるものの、活性体である FMN と FAD は輸送されないことが判明した。すなわち、リボフラビンが細胞内に取り込まれて FMN や FAD の活性体となると細胞外に出て行きにくくなり、細胞内に維持され恒常性が維持されると考えられた。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Yoshimatsu H, Yonezawa A, Yamanishi K, Yao Y, Sugano K, Nakagawa S, Imai S,

Omura T, Nakagawa T, Yano I, Masuda S, Inui K, Matsubara K. Disruption of Slc52a3 gene causes neonatal lethality with riboflavin deficiency in mice. Sci Rep 6:27557, 2016 DOI: 10.1038/srep27557

- ② Jin C, Yao Y, Yonezawa A, Imai S, Yoshimatsu H, Otani Y, Omura T, Nakagawa S, Nakagawa T, Matsubara K. Riboflavin Transporters RFVT/SLC52A Mediate Translocation of Riboflavin, Rather than FMN or FAD, across Plasma Membrane. Biol Pharm Bull. 40(11):1990-1995, 2017 DOI: 10.1248/bpb.b17-00292

[学会発表] (計 1 件)

- ① Atsushi Yonezawa, Kazuo Matsubara. Asymmetric riboflavin distribution in Brown-Vialetto-Van-Laere syndrome patients with SLC52A mutations. 10th BioMedical Transporters Conference, 2017 (招待講演) (国際学会)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

米澤 淳 (YONEZAWA, Atsushi)  
京都大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号: 90452341