

厚生労働科学研究研究費補助金

小児疾患臨床研究事業

小児期発症のミトコンドリア脳筋症に対するL-アルギニン
およびジクロロ酢酸療法の効果判定と分子病態を踏まえた
新しい治療法開発に関する臨床研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 古賀 靖敏

平成17(2005)年4月

目 次

I. 総括研究報告		
小児期発症のミトコンドリア脳筋症に対するL-アルギニンおよびジクロロ酢酸療法の効果判定と分子病態を踏まえた新しい治療法開発に関する臨床研究	-----	1
古賀靖敏		
(資料)	MELASの診断基準 Leigh脳症の診断基準 ミトコンドリア脳筋症の重症度分類	
II. 分担研究報告		
1. ミトコンドリアtRNA-Leu(UUR)領域点変異とアンチコドン修飾異常に関する研究	-----	13
後藤雄一		
2. ミトコンドリア脳筋症に対するL-アルギニンおよびジクロロ酢酸療法の臨床的検討に関する研究	-----	16
岡 明		
3. MELAS細胞における細胞死過程とその抑制系の検討に関する研究	-----	18
森 雅人		
4. 小児期発症のミトコンドリア脳筋症に関する研究		
(1) Leigh脳症(8993T→G変異)における経時的頭部画像変化の検討		
(2) 細胞内Ca ²⁺ imaging、細胞内pHを指標とした培養細胞における薬物の影響に関する検討		
杉江秀夫	-----	22
5. MELAS細胞における細胞死過程とその抑制系の検討に関する研究	-----	25
内藤悦雄		
6. 近赤外分光法によるミトコンドリアミオパチー患者の筋血流、酸素摂取率の検討に関する研究	-----	28
萩野谷和裕		
7. Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) の死亡原因に関する研究	-----	33
田辺雄三		
8. 小児期発症のミトコンドリア脳筋症に対する治療法開発のための基礎および臨床研究	-----	36
中野和俊		
9. 高乳酸血症と脳卒中様症状を伴うミトコンドリア脳筋症の臨床的研究	-----	40
松岡太郎		
10. ミトコンドリア異常を持つ培養細胞における動態変化に関する検討	-----	42
馬嶋秀行		
11. ミトコンドリア脳筋症および川崎病における血管内皮機能の検討	-----	46
石井正浩		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	49
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	53

総括研究報告

小児期発症のミトコンドリア脳筋症に対するL-アルギニンおよびジクロロ酢酸療法の
効果判断と分子病態を踏まえた新しい治療に関する研究

主任研究者 古賀靖敏 久留米大学医学部小児科教授

研究要旨

日本におけるミトコンドリア病疫学調査の結果、小児に多いMELASおよびLeigh脳症の2病型で診断基準策定、重症度分類を作成した。国内でのMELAS急性発作期のL-アルギニン使用症例の解析では、8症例11回の脳卒中エピソードで10回(91%)で有効という結果となり、何ら副作用は報告されていない。また、L-アルギニン投与で脳内乳酸値の低下も証明された。ミトコンドリア遺伝子異常を持つ筋芽細胞は、エネルギー供給不足により細胞死を起し、DCA添加により用量依存的に細胞死は抑制された。この筋芽細胞を用いた実験系は、薬剤の効果判定に有用である。細胞障害の指標として細胞内Ca²⁺濃度、および細胞内pHの2種類を指標として考えた。これにより、病的細胞における薬物の影響をin vitroで検討することが可能であり、薬物の薬理作用と臨床応用の関連について基礎データが提供できると思われる。ビタミンB1反応性PDHC異常症の診断方法を確立した。髄液中の14-3-3タンパクは脳破壊の指標となり、小児のMELAS患者でも陽性率が高く、広範な脳障害を反映していると考えられた。HeLa細胞由来のmitochondria-less(ρ0)細胞と血小板の融合によりできたcybrid細胞から、核がなくてミトコンドリア活性を持った“ミトコンドリア細胞”を樹立した。この培養システムは、薬剤がミトコンドリア機能に与える影響を評価するシステムとして利用可能である。新しく開発したヒドロキシラジカル検出試薬を用い、共焦点レーザー顕微鏡にて生細胞を観察し、細胞中の活性酸素発生を検出して、細胞内活性酸素の分布を調べた。その結果、小児期発症のミトコンドリア脳筋症の発症機序の一つにミトコンドリアから発生する活性酸素であることが判明した。ミトコンドリア病の診断および治験ネットワークシステムなどのインフラ整備事業がほぼ完成し、治験の迅速化がなされるものと期待される。MELASに対するL-アルギニンの急性期静注および内服療法の効果判定を行い、L-アルギニンの急性期および発作間歇時の予防に有効であることを示した。また、L-アルギニンの新たな薬理作用の検討を行い、L-アルギニンには、神経終末における興奮性神経伝達物質の放出を抑制する作用が存在することを見出した。MELASに対するL-アルギニン療法は、世界に先駆けて日本で開発した独自の治療法であり、その高い臨床効果と副作用が無いことが担保されている治療法と考えられ、治験研究として日本で整備されることが期待された。この研究班の成果として、ミトコンドリア病を対象とする治療研究のインフラ整備が完成したと考えられる。

分担研究者

後藤 雄一	国立精神・神経センター神経研究所部長
岡 明	国立成育医療センター神経内科医長
森 雅人	自治医科大学小児科学講師
杉江 秀夫	浜松市発達医療総合センター所長
内藤 悦雄	徳島県立ひのみね整肢医療センター 小児科部長
萩野谷和裕	東北大学大学院小児病態学分野 助教授
田辺 雄三	千葉県こども病院第一内科部長
中野 和俊	東京女子医科大学小児科講師
松岡 太郎	市立豊中病院小児科副部長
馬嶋 秀行	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 腫瘍学講座顎顔面放射線学研究分 野・宇宙環境医学講座教授
石井 正浩	北里大学医学部小児科教授

A.研究目的

ミトコンドリア病は、エネルギー産生障害を来し、種々の症状を呈するヒトで最も多い遺伝病である。小児の難病であるにもかかわらず、我が国における本症の診断基準は未だ確立されたものは無く、また効果的な治療方針も決められてはいない。このような状況の中で、本症の効果的診断法を確立し、有効な治療指針を決定する事は、現行の医療制度の中では、社会的医療援助が受けられていない本症の病気に苦しむ患者に光明を与え、後遺障害を予防出来、ひいては日本国の医療費削減に寄与できるものであり、一日も早いミトコンドリア病の治療環境の整備が必要である。本研究では、本症の新しい治療法の研究開発を主体とし、同時にその診断基準および重症度分類、治療指針を作成し、小児慢性特定疾患対象疾病としての治療環境の基盤整備を目的とする。

B.研究方法

1. 国内での MELAS 急性発作期の L-アルギニン使用症例の解析。ミトコンドリア病に対する薬物治療に関して、ミトコンドリア病の病状進展

防止に効果があることを見出した (Koga Y. et al. Neurology 58:827-828, 2002)。この知見を踏まえて、MELAS23 例の 36 回の脳卒中エピソードに、L-アルギニンが使用された。この臨床的な治療効果を確認する為、詳細にデータを解析した。

2. ミトコンドリア脳筋症の分子基盤解明への研究。①3243 近傍の点変異と臨床病型、②MELAS 筋細胞における細胞死過程とその抑制系の検討、③細胞内 Ca²⁺ imaging、細胞内 pH を指標とした培養細胞における薬物の影響に関する検討、④ Leigh 脳症 (8993T→G 変異) 患児に対する creatine 療法の経験、⑤ビタミン B1 反応性ピルビン酸脱水素酵素複合体異常症の診断と治療法開発に関する研究、⑥MELAS における髄液 14-3-3 蛋白、⑦近赤外分光法によるミトコンドリアミオパチー患者の筋血流、酸素摂取率の検討、⑧核がなくてミトコンドリア活性を持った“ミトコンドリア細胞、⑨ミトコンドリア異常を持つ培養細胞におけるフリーラジカル動態変化に関する検討、⑩A3243G 変異を持つ MELAS14 例のミトコンドリア DNA 全周解析、⑪Leber 遺伝性視神経萎縮症 14 例のミトコンドリア DNA 全周解析、⑫電撃型の経過をたどった MELAS 症例の剖検解析、⑬Klotho KO マウスにおけるミトコンドリア機能異常の解析、⑭ミトコンドリア脳筋症における血管内皮機能の評価、⑮ミトコンドリアから発生する活性酸素の検出方法の開発。

3. ミトコンドリア病の診断システムなどのインフラ整備。レジストリーを行う患者は、異常遺伝子の同定、電子伝達系酵素活性のレベル、臓器内変異遺伝子の分布などが確定していることが、その後の治療の効果判定を行う上で重要である。この為に、ミトコンドリア病の診断システムを確立し、治験に向かう為のインフラ整備を行った。

4. MELAS に対する L-アルギニン内服療法の効果判定。国内の臨床病理学的遺伝学的に MELAS と確定した症例で、内服による予防効果に対する詳細な検討を行った。

5. L-アルギニンの新たな薬理作用の検討。

6. ミトコンドリア病 (MELAS、および Leigh 脳症の 2 病型) の我が国における診断基準および重症度分類の策定。ミトコンドリア病患者の社会的救済を行うためにも、診断基準および重症度分類が必要である。日本に即したものが必要であり、国際基準に配慮した基準造りを行う。

(倫理面への配慮)

研究に先立ち、患者には研究の目的および、主旨を十分に説明し、同意が得られた場合のみ、研究に使用した。疫学調査に関しては、指針に準拠して行う。また、多施設共同研究の場合は、基本内容を一致させた上で研究参加施設の倫理委員会の承認を得た。遺伝子解析研究に関しては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守した。

C. 研究結果

1. 日本におけるミトコンドリア病疫学調査の結果、小児に多い MELAS および Leigh 脳症の 2 病型で診断基準策定、重症度分類を作成した (資料 1、資料 2、資料 3)。

2. 国内での MELAS 急性発作期の L-アルギニン使用症例の解析。国内で 11 例の MELAS に L-アルギニンが使用され、14 回のエピソードに関し、その有効性、副作用を検討した (図 1)。

症例	年齢	性別	発症年齢	臨床診断	遺伝子診断	重症度	投与量	効果判定	パラメーター
1.	16歳	女性	5歳	MELAS	A3243G	中	15g	あり	MRSでの乳酸値低下 発症後5時間
2.	13歳	女性	10歳	MELAS	A3243G	中	0.5g/kg	あり	乳酸値の低下あり 発症後2日
3.	19歳	女性	5歳	MELAS	A3243G	中	0.5g/kg	なし	発症後11時間
4.	10歳	女性	10歳	MELAS	A3243G	中	0.5g/kg	あり	発症後35分
5.	12歳	女性	10歳	MELAS	検査中	中	0.5g/kg	不明	発症後2日
6.	13歳	男性	12歳	MELAS	不明	中	0.5g/kg	不明	発症後38時間
7.	14歳	男性	11歳	MELAS	A3243G	中	0.5g/kg	著効	発症後60分
8.	12歳	女性	6歳	MELAS	A3243G	中	0.5g/kg	著効	発症後60分
9.	15歳	男性	12歳	MELAS	A3243G	中	0.5g/kg	あり	発症後2日 発症後12時間 乳酸値の低下
10.	3歳6m	女性	1歳	Leigh脳症? MELAS	A3243G	重症	0.5g/kg	不明	発症後12時間 心筋梗塞合併 今まで脳卒中のエピソード無し
11.	11歳	女性	7歳	MELAS	不明	中	0.5g/kg	著効	症状の早期消失 発症後7時間

図 1. 国内での L-アルギニン使用症例 (久留米大学以外の施設)

MELAS と診断出来ない 3 例を除き、8 症例 11 回の脳卒中エピソードに関し解析すると、L-アル

ギニンの効果が著効ないし効果ありと判断されるケースは、10 回 (91%) であり、何ら副作用は報告されていない。これら症例の中には、L-アルギニン投与で脳内乳酸値の低下を証明した初めての報告も存在する (Kubota M.他, Brain Dev 26(7):481-483, 2004) (図 2)。

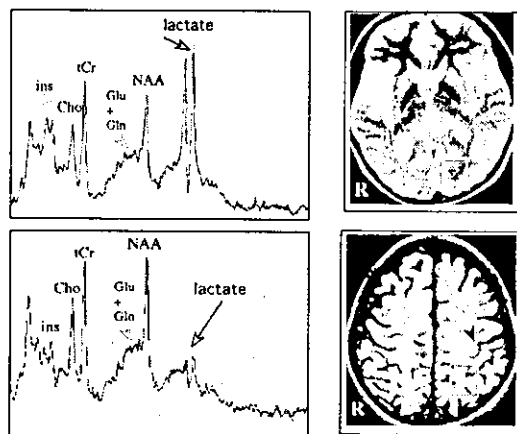


図 2. MELAS 症例での L-アルギニン静注による乳酸値低下 (MRS 画像)

3. ミトコンドリア病の分子基盤の解明。ミトコンドリア遺伝子異常を持つ筋芽細胞は、エネルギー供給不足により細胞死を起し、DCA 添加により用量依存的に細胞死は抑制された。この筋芽細胞を用いた実験系は、薬剤の効果判定に有用である。細胞障害の指標として細胞内 Ca²⁺濃度、および細胞内 pH の 2 種類を指標として考えた。これにより、病的細胞における薬物の影響を in vitro で検討することが可能であり、薬物の薬理作用と臨床応用の関連について基礎データが提供できると思われる。ビタミン B1 反応性 PDHC 異常症の診断方法を確立した。髄液中の 14-3-3 タンパクは脳破壊の指標となり、小児の MELAS 患者では脳卒中発作を起してしばらく経過した時が最も陽性度が高く、広範な脳障害を反映していると考えられた。HeLa 細胞由来の mitochondria-less (ρ0) 細胞と血小板の融合によりできた cybrid 細胞から、核がなくミトコンドリア活性を持った“ミトコンドリア細胞”を樹立した。この培養システムは、薬剤がミトコンドリア機能に与える影響を評価するシステムとして

利用可能である。新しく開発したヒドロキシラジカル検出試薬を用い、共焦点レーザー顕微鏡にて生細胞を観察し、細胞中の活性酸素発生を検出して、細胞内活性酸素の分布を調べた。その結果、小児期発症のミトコンドリア脳筋症の発症機序の一つにミトコンドリアから発生する活性酸素であることが判明した。

4. ミトコンドリア病の診断および治験ネットワークシステムなどのインフラ整備事業。ミトコンドリア病の迅速診断システム整備を完成し、同時に治験を押し進める為のミトコンドリア病ネットワークワークセンターを開設した(図3)。

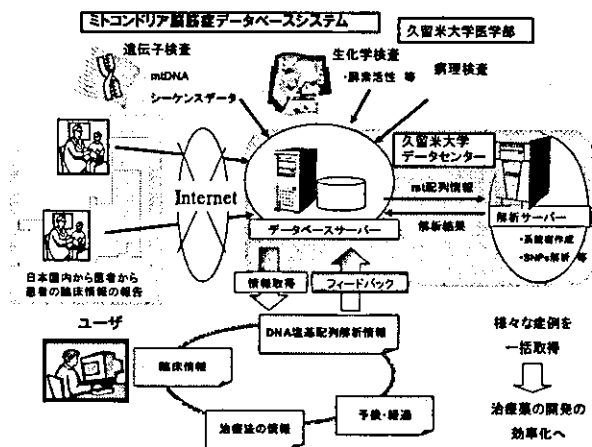


図3.ミトコンドリア脳筋症データベースシステム

これにより、患者が発生した場合の生化学、組織化学、遺伝子検索、および治療法などの総合的な解析が可能であり、治験の迅速化がなされるものと期待される。

5. MELAS に対するL-アルギニンの急性期静注および内服療法の効果判定。MELAS 患者 24 名の脳卒中様発作の急性期に L-アルギニンを静注することにより、症状の軽減と次の発作の予防が可能であることを示した(図4)。

Biochemical parameters after L-arginine loading in the acute phase of MELAS

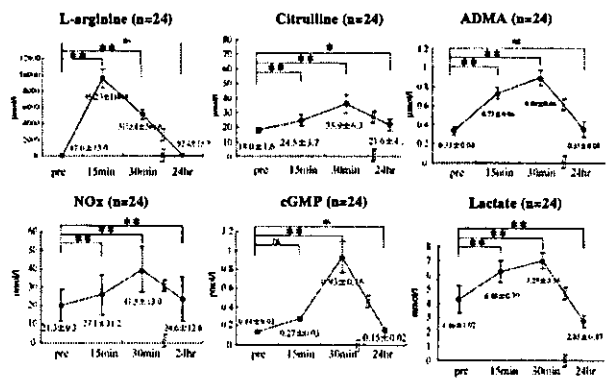


図4. L-アルギニン静注時の生化学的指標

また、6名の頻回発作型の MELAS 患者でL-アルギニンの内服を行い発作の重症度および頻度を有意に低下させ、発作間歇時の予防に有効であることを示した(図5)。

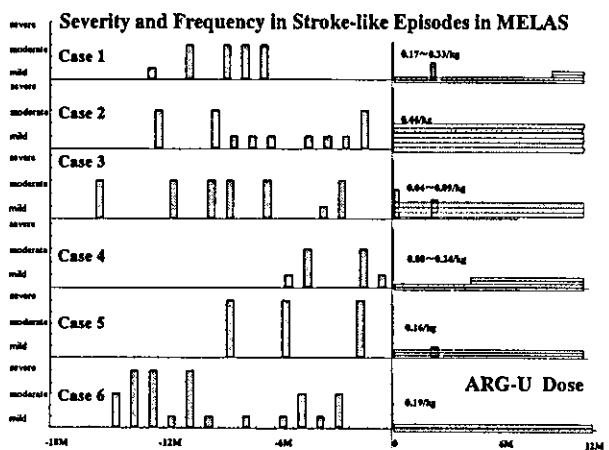


図5. L-アルギニン内服による発作予防効果

この報告は Neurology の 2005 年 2 月 23 日号の Highlighting paper に推薦され注目された(Koga Y 他、Neurology2005)。

6. L-アルギニンの新たな薬理作用の検討。分離シナプトソームを用いてL-アルギニンの神経終末における薬理作用を検証した。その結果、L-アルギニンには、神経終末における興奮性神経伝達物質の放出を抑制する作用が存在することを見出した。

D.考察

1. 本研究の成果の中で、ミトコンドリア病の Nationwide survey により、日本における患者の実

数を明らかにし、MELAS および Leigh 脳症の日本の診断基準および重症度分類を策定することで、ミトコンドリア病の治療適応とする薬剤開発の基盤を整える事が出来たと考えられる。また、これらのプロセスは、今後ミトコンドリア病に対する厚生医療行政の中で、医療支援事業を計画する上での大きな指標となり得、将来的には本症に対する小児慢性特定疾患、成人の特定疾患研究事業の基盤ともなり得ると評価できる。また、本研究の一つの目標である新しい薬剤開発研究は、時間、費用およびシステム整備という面で残念ながら班研究期間内では達成する事が出来なかった。しかしながら、本研究から見出された多くの新しい臨床知見は、今後の厚生医療研究に大いに役立つと考えられる。特に MELAS に対する L-アルギニン療法は、世界に先駆けて日本で開発した独自の治療法であり、Neurology 誌に 2 報続けて Highlighting paper に推薦された意義は大きい (2002、2005 年)。出来ればこの治療法に関し、治験研究として日本で整備されることを期待する。

2. ミトコンドリア病の Nationwide survey は、世界初の研究事業であり、疫学調査結果として班研究成果として国際誌に報告する予定である。また、MELAS に対する L-アルギニン療法は、他に特効薬的治療法の無い現在、日本のみでなく、米国、英国、イタリアなどミトコンドリア病研究の先進国から治験研究の要望が高く、また、スウェーデンオーファン社、イタリアシグマタウ社などからも問い合わせが来ている。是非日本から世界へ発信したい治療法である。患者家族の会でも、治療薬としての開発要望が高く、多くの患者からの問い合わせがあり、医師の方が逆に患者側から情報を得ている状態である。ある種の小児ガン患者より遙かに多い有病数ながら、治療法開発に対して全く注目されていない進行性難治性疾病である。治療する事で、確実に患者の社会生活を豊かにする事が可能であり、日本国の医療費削減に寄与でき

るものと考えられる。

3. 今後の展望について

MELAS に対する L-アルギニン療法は、世界に先駆けて日本で開発した独自の治療法であり、その高い臨床効果と副作用が無いことが担保されている治療法と考えられ、治験研究として日本で整備されることを期待する。

E. 結論

ミトコンドリア病の治療研究の基盤整備が、本厚生研究により確立出来たと考えられる。この基盤に立ったミトコンドリア病に対する新しい治験研究が日本で開始される事を希望する。それには、まずは MELAS に対する L-アルギニン療法の治験研究が最適と考えられる。安全で副作用の無い薬剤開発に限った医師主導型治験の早急な研究開始が望まれる。

F. 健康危険情報

特記すべき事なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 古賀靖敏 : MELAS の新しい治療法 - L-アルギニン. 臨床検査 2005 ; 49(1) : 83-88.
- 2) Koga Y : MELAS and L-arginine therapy. Brain & Development 2004; 26:480.
- 3) Yamashita Y, Kusaga A, Koga Y, Nagamitsu S, Matsuishi T : Noonan syndrome, moyamoya-like vascular changes, and antiphospholipid syndrome. Pediatric Neurology 2004; 31(5): 364-366.
- 4) Koga Y, Akita Y, Nishioka J, Yatsuga S, Povalko N, Tanabe Y, Fujimoto S, Matsuishi T : L-arginine improves the symptoms of stroke-like episodes in MELAS. Neurology 2005 Feb;64(4):710-712.
- 5) Povalko N, Zakharova E, Rudenskaia G, Akita Y, Hirata K, Matsuishi T, Koga Y . A new sequence variant in mitochondrial DNA associated with high penetrance of Russian Leber hereditary optic

neuropathy. Mitochondrion 2005 (in press)

- 6) Tsuneoka M, Teye K, Arima N, Soejima M, Otera H, Ohashi K, Koga Y, Fujita H, Shirouzu K, Kimura H, Koda Y. A novel MYC-target gene, mimitin, that is involved in cell proliferation of esophageal squamous cell carcinoma. J Biol Chem. 2005 Mar 17 (in press)
2. 学会発表
- 1) 古賀靖敏, 秋田幸大, 西岡淳子, 柗山了, 植木勲, 松石豊次郎: MELASの脳卒中様発作急性期および寛解期におけるL-アルギニン療法の効果. 第107回日本小児科学会総合シンポジウム3「小児の難病はどこまで治るようになったか」. 2004.4.9-11 (岡山)
- 2) 西岡淳子, 古賀靖敏, 秋田幸大, 植木勲, 後藤憲志, 江上公康, 柗山了, 松石豊次郎: 発症後電撃的な経過をとったMELASの一症例: ミトコンドリア全周解析法をふまえて. 第107回日本小児科学会. 2004.4.9-11 (岡山)
- 3) 秋田幸大, 柗山了, 植木勲, 西岡淳子, 古賀靖敏, 松石豊次郎: 意識消失発作を契機に糖尿病と診断され, mtDNA異常G3316Aを認めた症例. 第107回日本小児科学会. 2004.4.9-11 (岡山)
- 4) 古賀靖敏, 秋田幸大, 西岡淳子, 松石豊次郎: MELASにおけるL-アルギニン療法. 第45回日本神経学会. 2004.5.11-14 (東京)
- 5) 米田誠, 中川広人, 安藤純哉, 井川正道, 藤井明弘, 栗山勝, 古賀靖敏: MELASの致死的脳卒中様発作に対するL-アルギニンの効果. 第45回日本神経学会. 2004.5.11-14 (東京)
- 6) 後藤憲志, 西岡淳子, 秋田幸大, 江上公康, 八ツ賀秀一, 古賀靖敏, 松石豊次郎: 劇症型転帰を取ったミトコンドリア脳筋症の一例. 第430回日本小児科学会福岡地方会. 2004.6.26 (福岡: 九州大学)
- 7) 古賀靖敏, 秋田幸大, 西岡淳子, Povalko Nataliya, 松石豊次郎: MELAS急性期および寛解期におけるL-アルギニン療法. 第46回日本小児神経学会. 2004.7.15-17 (東京)
- 8) 西岡淳子, 秋田幸大, 古賀靖敏, 松石豊次郎: 発症後電撃的な経過をとったMELASの一症例: ミトコンドリア全周解析法をふまえて. 第46回日本小児神経学会. 2004.7.15-17 (東京)
- 9) 秋田幸大, 西岡淳子, 古賀靖敏, 松石豊次郎: 老化促進モデルマウス (Klotho KO マウス) におけるミトコンドリアエネルギー代謝. 第46回日本小児神経学会. 2004.7.15-17 (東京)
- 10) Povalko Nataliya, 秋田幸大, 西岡淳子, 古賀靖敏: ロシア人Leber遺伝性視神経萎縮症家系における全周ミトコンドリアDNA解析. 第46回日本小児神経学会. 2004.7.15-17 (東京)
- 11) 瀬島斉, 石崎茜, 南憲明, 木村正彦, 古賀靖敏, 後藤雄一, 山口清次: L-アルギニン内服治療を継続しているMELASの幼児例—短期効果の検討—. 第46回日本小児神経学会. 2004.7.15-17 (東京)
- 12) Hirata K, Akita Y, Koga Y: Effect of L-arginine on the transmission of neurotransmitter and mitochondrial respiration in mouse brain. 第77回日本生化学会2004.10.13-16 (横浜)
- 13) 平田孝治, 秋田幸大, Povalko Nataliya, 西岡淳子, 石田香織, 西村美紀, 光益千秋, 古賀靖敏: 老化モデルマウスと正常加齢マウスのミトコンドリアエネルギー代謝・組織化学的相関. 第4回日本ミトコンドリア研究会年会. 2004.12.16-19 (東京)
- 14) Povalko N, Akita Y, Hirata K, Nishioka J, Koga Y: A novel point mutation associated with high penetrance of Russian Leber's hereditary optic neuropathy. 第4回日本ミトコンドリア研究会年会. 2004.12.16-19 (東京)
- 15) Koga Y, Akita Y, Nishioka J, Povalko N, Matsuishi T: MELAS and L-arginine Therapy. 6th European Meeting on Mitochondrial Pathology. 2004.6.30- 7.4 (Nijmegen, Holland)
- 16) Povalko N, Zakharova E, Akita Y, Nishioka J, Koga Y: Entire mtDNA sequence analysis in Russian LHON family. 6th European Meeting on

Mitochondrial Pathology.2004.6.30- 7.4 (Nijmegen, Holland)

- 17) Akita Y, Hirata K, Povalko N, Nishioka J, Ishida K, Nishimura M, Mitsumasu C, Koga Y: Mitochondrial energy metabolism in the klotho KO mouse. The American society of human genetics 54th Annual Meeting. 2004.10.26-30 (Toronto, Canada)
- 18) Hirata k, Akita Y, Povalko N, Nishioka J, Ishida K, Nishimura M, Mitsumasu C, Koga Y: Effect of L-arginine on the neurotransmission and the mitochondrial respiration of mice brain synaptosome. The American society of human genetics 54th Annual Meeting. 2004.10.26-30 (Toronto, Canada)
- 19) Ishida K, Akita Y, Povalko N, Hiratà K, Nishioka J, Nishimura M, Mitsumasu C, Koga Y: The entire mitochondrial DNA analysis of 9 MELAS patients

with an A3243G mutation. The American society of human genetics 54th Annual Meeting. 2004.10.26-30 (Toronto, Canada)

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

ミトコンドリア機能異常に起因する疾患における臨床症状発現の予防・治療的組成物（出願番号：特許 2002-299575）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

資料1. MELAS の診断基準

MELAS の診断基準	
疾患系統	厚生労働科学研究：古賀班 2005年3月作成
疾病系統	神経系
主な症状	ミトコンドリア病の一病型である。頭痛と嘔吐に加え、痙攣、片麻痺、同名半盲や、皮質盲などの脳卒中様発作を主徴とし、難聴、知的退行、精神症状などの中樞神経系症状がみられる。中樞神経系以外の症状として、筋力低下、低身長、心筋症などを起こすほか、糖尿病、腎不全などを併発することもある慢性進行性の疾患である。遺伝性、家族性にあらわれるものがある。多くは20歳以前に発症する。
認定基準	<p>確実例：下記のA. 卒中様の臨床所見の<u>2項目</u>を満たし、かつB. ミトコンドリア異常の根拠の<u>2項目</u>を満たすもの（計4項目以上必要）</p> <p>疑い例：下記のA. 卒中様の臨床所見の<u>1項目</u>を満たし、かつB. ミトコンドリア異常の根拠の<u>2項目</u>を満たすもの（計3項目以上必要）</p> <p>A. 卒中様の臨床所見</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 頭痛／嘔吐 2 痙攣 3 片麻痺 4 同名半盲または皮質盲 5 脳画像上脳の急性局所異常所見^{注釈1} <p>B. ミトコンドリア異常の根拠</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 血中又は髄液の乳酸値がくり返し高いか、またはミトコンドリア関連酵素の欠損^{注釈2} 2 筋生検でミトコンドリアの形態異常^{注釈3} 3 (MELAS 関連の) 既知の遺伝子変異^{注釈4}

注釈1：頭部CT、MRIなどの脳画像検査で、脳の局所病変が存在する。

注釈2：安静臥床時の血中乳酸値、もしくは髄液の乳酸値が2 mmol/L (18mg/dl) 以上か、あるいは、体細胞由来（筋組織が望ましい）の酵素検索で、電子伝達系、ピルビン酸代謝関連及びTCA サイクル関連酵素、脂質代謝系関連酵素などの酵素欠損がある場合。

注釈3：筋病理で、赤色ぼろ線維(ゴモリトリクローム変法染色におけるRRF: ragged-red fibers)、コハク酸脱水素酵素染色におけるRRFやSSV (strongly SDH-reactive blood vessels)、チトクロームc酸化酵素欠損線維、電子顕微鏡によるミトコンドリア形態異常の存在など。

注釈4：MELAS の原因遺伝子として報告されている既知の遺伝子異常が存在する（ミトコンドリア tRNA-Leu(UUR)遺伝子のA3243G、G3244A、A3252G、A3260G、T3271C、T3291C、ミトコンドリア tRNA-Val 遺伝子のG1642A、ミトコンドリア tRNA-Cys 遺伝子のA5814G、ミトコンドリア COXIII 遺伝子のT9957C、ミトコンドリア ND5 遺伝子のG13513A 変異など）。

資料 2. Leigh 脳症の診断基準

厚生労働科学研究：古賀班 2005年3月作成

Leigh 脳症の診断基準

疾病系統	神経系
主な症状	ミトコンドリア病の一病型である。中枢神経系のエネルギー産生障害により、新生児もしくは幼児期より精神・運動発達遅滞、筋緊張低下、摂食障害、眼球運動異常、呼吸障害、不随意運動、視神経萎縮、けいれん、小脳症状など多岐にわたる症状を呈する。中枢神経系以外の症状として、筋力低下、低身長、心筋症などを起こす。症状は、常に進行性で知的退行が進み、主に小児期に死亡する難治性慢性進行性疾患である。遺伝性、家族性にあらわれるものがある。頭部画像上、もしくは神経病理学的に脳幹、大脳基底核の両側対称性病変が認められる。
認定基準	<p>確実例：</p> <p>I 下記の A. 臨床所見の 3 項目すべてを満たし、かつ、B. ミトコンドリア異常の根拠の 1 項目を満たすもの（計 4 項目以上必要）。</p> <p>II 下記の A. 臨床所見のうち 3 を含む 2 項目を満たし、かつ、B. ミトコンドリア異常の根拠の 2 項目を満たすもの（計 4 項目以上必要）。</p> <p>III 剖検、脳神経病理所見で特徴的な壊死性病変を認めたもの。</p> <p>疑い例：</p> <p>I 下記の A. 臨床所見の 2 項目を満たし、かつ、B. ミトコンドリア異常の根拠の 1 項目を満たすもの（計 3 項目以上必要）。</p> <p>A. 臨床所見</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 幼児期以前に発症する進行性の知的または運動発達の障害。 2. 不随意運動、哺乳嚥下障害、呼吸障害、眼球運動障害、失調などの大脳基底核、脳幹の障害に起因する中枢神経症状を認める。 3. 大脳基底核、脳幹に頭部 CT で低吸収域・MRI の T2 及び Flair 画像検査で高信号域を両側対称性に認める。 <p>B. ミトコンドリア異常の根拠</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 血中又は髄液の乳酸値がくり返し高いか、またはミトコンドリア関連酵素の欠損^{注釈 1} 2 筋生検でミトコンドリアの形態異常^{注釈 2} 3 (Leigh 脳症関連の) 既知の遺伝子変異^{注釈 3}

注釈 1：安静臥床時の血中乳酸値、もしくは髄液の乳酸値が 2 mmol/L (18mg/dl) 以上か、あるいは、体細胞由来（筋組織が望ましい）の酵素検索で、電子伝達系、ピルビン酸代謝関連及び TCA サイクル関連酵素、脂質代謝系関連酵素などの酵素欠損がある場合。

注釈 2：筋病理で、赤色ぼろ線維（ゴモリトリクローム変法染色における RRF: ragged-red fibers）あるいは、チトクローム C 酸化酵素欠損、コハク酸脱水素酵素欠損が認められるか、電子顕微鏡によるミトコンドリア形態異常が存在するなど。

注釈 3：Leigh 脳症の原因遺伝子として報告されている既知の遺伝子異常が存在する（ミトコンドリア DNA の異常として、ATP6 の T8993G、T8993C、T9176C、T9176G、ND3 のサブユニット 3 の T10158C、サブユニット 5 の 13730、サブユニット 6 の G14459A、複合体 IV のサブユニット 3 の G9379A、tRNA-Leu(UUR) 遺伝子の A3243G、tRNA-Val 遺伝子の C1624T、tRNA-Lys 遺伝子の A8344G、tRNA-Tr y 遺伝子の 5537T の一塩基挿入などが存在する。核の異常として、複合体 I のサブユニット NDUFV1、NDUFS3、NDUFS4、NDUFS7、NDUFS8 など、複合体 II のサブユニット SDHA、複合体 III のサブユニット BCS1L、複合体 IV のサブユニット COX10 および COX15 およびアッセンブリー遺伝子 SURF1、ピルビン酸脱水素酵素 PDHA1、ピルビン酸カルボキシラーゼなどの異常など）。

資料3. ミトコンドリア脳筋症の重症度スコア

ミトコンドリア病の重症度スコア

European NeuroMuscular Conference (ENMC) mitochondrial disease rating scale を改変^{注1}

評価可能対象年齢 6歳以上

厚生労働科学研究：古賀班 2005年3月

作成

Section 1 セクション1: activities of daily living 日常生活動作

A. Speech 会話

0・normal 正常

1・mildly affected, no difficulty being understood 軽度障害 会話は理解出来る

2・moderately affected, may be asked to repeat 中等度障害 聴きなおされる事がある

3・severely affected, frequently asked to repeat 重度障害 しばしば聴きなおされる

4・unintelligible most of time 最重度障害 ほとんど内容が聴き取れない

B. Swallowing 嚥下

0・normal 正常

1・rare choking まれにむせる

2・occasional choking 時にむせる

3・requires soft food 刻みあるいはペースト食

4・requires nasogastric or gastrostomy tube 経管栄養または胃瘻

C. Handwriting 書字

0・normal 正常

1・slightly small or slow 軽度障害、僅かに小字あるいはゆっくり書字

2・all words small but legible 中等度障害、小さいが判読可能

3・severely affected, not all words legible 重度障害 ほとんど判読可能

4・majority illegible 最重度障害、ほとんど判読不能

D. Cutting food・handling utensils 食物を刻む-道具の使用(手の巧緻性)

0・normal 正常

1・somewhat slow and clumsy but no help needed やや緩慢で不器用だが介助不要

2・can cut most foods, some help needed ほぼ刻むことは可能だが一部介助が必要

3・food must be cut, but can feed self 自分では刻めないが、食べることは出来る

4・needs to be fed 食事は全介助

E. Dressing 更衣

0・normal 正常

1・somewhat slow and clumsy but no help needed やや緩慢で不器用だが介助不要

2・occasional help with buttons or arms in sleeves 時にボタンや着衣に介助が必要

3・considerable help required but can do some things alone

多くの介助を要するが自分で出来ることもある

4・helpless 全介助

F. Hygiene 洗面・入浴

0・normal 正常

1・somewhat slow and clumsy but no help needed やや緩慢で不器用だが介助不要

2・needs help with shower or bath or very slow in hygienic care

入浴介助が必要あるいは非常に緩慢で時間を要

3・requires assistance for washing, brushing teeth, going to bathroom

洗顔、歯磨き、風呂場に行くのに介助を要す

4・helpless 全介助

G. Falling 転倒

0・none なし

1・rare falling まれに転倒

2・less than one per day 一回/日未満

3・average of once per day 平均一回/日

4・more than one per day 一回/日以上

H. Paroxysmal event (migraine, seizures) 発作症状 (片頭痛、けいれん)

0・none なし

1・< 1 every 1 month 1回/月未満

- 2- > 1 every 1 month < 1 every week 1回/月 - 1回/週
- 3- > 1 every 1 week < 1 every day 1回/週 - 1回/日
- 4- > 1 every day/ status 1回/日以上・痙攣重積

Section 2: セクション2 motor 運動

A. Proximal muscle strength (modified MRC) 近位筋筋力 (MRC 修正)

- 0- normal 正常
- 1- slight reduction of power (grade4 MRC) 軽度筋力低下 (MRC4)
- 2- moderate impairment, able to overcome gravity(MRC3)中等度筋力低下、抗重力運動可能 (MRC3)
- 3- severe weakness, unable to overcome gravity (MRC2) 重度筋力低下、抗重力運動不能 (MRC2)
- 4- severe weakness, flicker only (MRC1) 重度筋力低下、僅かに動く(MRC1)
- 5- no voluntary muscle activity (MRC0) 最重度筋力低下、随意運動不能(MRC0)

B. Upper limb coordination (modified ICARS) 上肢の協調運動
(修正 ICARS, International Cooperative Ataxia Rating Scale)

- 0- normal 正常
- 1- mild clumsiness- no significant disability 軽度協調運動異常
- 2- moderate clumsiness- poor writing, able to perform ADL 中等度協調運動異常
書字に影響あるものの日常生活動作に問題なし
- 3- severe clumsiness- unable to write 重度協調運動異常、書字不能
- 4- severe clumsiness- unable to feed 重度協調運動異常 食事摂取不能

C. Walking 歩行

- 0- no limitation 全く問題なし
- 1- limited a little (getting tired after 1-2 km) 軽度障害、1-2km 歩行で疲労
- 2- moderately limited (difficulties keeping up with friends)中等度障害、健常人について歩くのが困難
- 3- severe limited (having to stop every 100-400m to rest) 重度障害、100-400m で休息必要
- 4- no walking distance beyond 10m 最重度障害、10m 以上歩けない

D. Moderate motor activities (such as vacuum cleaning, carrying groceries, climbing one flight of stairs, preparing your bed) 中等度の運動活動、電気掃除機の操作、買い物、階段昇降、ベッドメイキングなど

- 0- no limitation 制限なし
- 1- limited a little 僅かに制限
- 2- moderately limited 中等度制限
- 3- severely limited 高度に制限
- 4- not capable 不可能

E..Vigorous motor activities (such as running, climbing several flights of stairs, or participating on other strenuous sports) 活発な運動 (走る、階段を一気に昇る、激しいスポーツに参加する)

- 0- no limitation 制限なし
- 1- limited a little 僅かに制限
- 2- moderately limited 中等度制限
- 3- severely limited 高度に制限
- 4- not capable 不可能

Section 3 セクション3: special sensory 感覚

A. Vision 視覚

- 0- Normal 正常
- 1- unable to drive or equivalent (i.e. unable to read traffic or shop signs)
交通標識が読めず運転出来ない (18歳以下では、黒板の字・看板が読めない)
- 2- unable to read normal print books 普通の大きさの活字が読めない
- 3- unable to read standard large print books 標準拡大活字が読めない (眼鏡が必要)
- 4- unable to watch TV TV を見る事が出来ない
- 5- no useful vision ADL に著しく影響し、視力がほとんど無い

B. Auditory 聴覚

- 0- < 10dB loss
- 1- 10-20 dB loss (軽度難聴)

- 2. 20-40 dB loss (ささやき声が聞こえない)
- 3. severe >40 dB but improves with hearing aid 補聴器が必要
- 4. severe >40 dB loss and dose not improve with hearing aid 補聴器でも改善しない

Section 4 セクション4: endocrine 内分泌障害

- 0. normal 正常
 - 1. single endocrine organ involvement 単一内分泌臓器障害
 - 2. 2 endocrine organs involved 二つの内分泌臓器障害
 - 3. 3 endocrine organs involved 三つの内分泌臓器障害
- For diabetes, add 1 for insulin treated インスリンを要する糖尿病は1点追加

Section 5 セクション5: cardiac 心合併症

- 0. normal ECG and ECHO 正常心電図、心エコー
- 1. conduction system disease, mild impaired LV function (EF >60%) or asymptomatic hypertrophy 不整脈、軽度左室機能低下(EF >60%)、無症候性肥大型心筋症
- 2. ECHO evidence of cardiomyopathy and restricted physical activity (EF <60%) or cardiac pacemaker 心エコーで心筋症所見あり EF 低下 (<60%) またはペースメーカー装着
- 3. Moderate cardiomyopathy (EF <40-60%) 中等度心筋症(EF <40-60%)
- 4. Severe cardiomyopathy 重度心筋症

Section 6 セクション6: 腎機能^{注2}

- 0. 正常
- 1. クレアチンクリアランス <50-90%
- 2. クレアチンクリアランス 30-50%
- 3. クレアチンクリアランス 10-30%
- 4. クレアチンクリアランス <10ml/min もしくは透析が必要

Section 7 セクション7: cognition and impairment 高次脳機能と障害

A. intellectual impairment 知的障害

- 0. normal 正常
- 1. mild (consistent forgetfulness with partial recollection of events with no other difficulties) 軽度記憶力障害、日常上問題にならない程度だが、一部に健忘がある
- 2. moderate memory loss with disorientation and moderate difficulty handling complex problems 中等度記憶力障害、見当識障害があるが簡単な対応は出来る
- 3. severe memory loss with disorientation to time and often place, severe impairment with problems 重度記憶力障害、時間や場所の見当識障害があり著しく日常生活が困難
- 4. severe memory loss with orientation only to person, unable to make judgments or solve problems 重度記憶力障害、人に対してのみ見当識は保たれているが日常生活上の問題対応能力は皆無

B. Motivation and drive 動機付けと意欲

- 0. Normal 正常
- 1. lacking in energy, dose not restrict activities ただ何となく気力がない
- 2. lacking in energy, restricts hobbies and interests 気力がなく、限定した興味
- 3. lacking in energy, restricts day to day(routine) activities 気力がなく、日常生活が制限される
- 4. unable to carry out any task どんな作業でも遂行することができない

注1: ENMC では主として成人年齢を対象とすることを前提するものと推定され、日本語版では小児年齢も含めるため対象年齢明記

注2: セクション6 腎機能は日本語版で追加

分 担 研 究 報 告

ミトコンドリア tRNA-Leu(UUR)領域点変異とアンチコドン修飾異常

-MELAS の臨床病型との関連-

分担研究者 後藤 雄一 国立精神・神経センター神経研究所部長

研究要旨

ミトコンドリアDNAのtRNA-Leu(UUR)領域の点変異のうち、MELAS患者の認められる点変異(5種類)とMELASではない臨床症状をもつ患者で認められた点変異(4種類)について、アンチコドン修飾異常の有無を調べた。MELASで認められる点変異では、アンチコドン修飾異常が確認でき、MELASの表現型とアンチコドン修飾異常とは何らかの関係のあることが示唆された。

A.研究目的

ミトコンドリア病(脳筋症)の原因として、ミトコンドリアDNA点変異が数多く報告されている。中でも tRNA-Leu(UUR)領域は変異のホットスポットといわれている。

我々は、ミトコンドリア病で最も頻度の高い A3243G 変異を発見し、その後同じ tRNA-Leu(UUR)領域において、3250、3260、3271、3291 などの変異を報告してきた。その多くは MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) の臨床病型を示すが、その他のミトコンドリア病の原因とされる変異の報告もされており、多彩な病型を呈することが明らかになってきた。

点変異の tRNA 機能への効果がいかなるものかについて、最も頻度の高い 3243 変異があると当該 tRNA のアンチコドンの修飾異常の起きることが報告されている。

今回我々は、この tRNA 領域の MELAS をおこす変異 (A3243G 変異、G3244A 変異、T3258C 変異、T3271 変異、T3291 変異) と MELAS とは異なる臨床型をおこす変異 (G3242A 変異、T3250C 変異、C3254T 変異、A3280G 変異) でのアンチコドン修飾異常について調べ、MELAS とアンチコ

ドン修飾異常との関連を検討した。

B.研究方法

各変異を持つ患者骨格筋から RNA を抽出し、プライマー伸長法を用いてアンチコドン修飾の有無を調べた (図1)。

(倫理面への配慮)

国立精神・神経センター倫理委員会で承認を受けた説明文書を用いて、主治医が診断、検体保存、研究利用について説明し、同意書に署名をしていただいた試料を用いた。

C.研究結果

図2に示すように、MELAS の臨床病型をとる、3243、3244、3258、3271、3291 ではアンチコドン修飾異常が認められた。一方、MELAS ではない 3242、3250、3254、3280 では、修飾異常は認めなかった。

D.考察

MELAS 患者では、その 80%以上がミトコンドリア DNA 上の tRNA-Leu(UUR)領域の点変異をもつことが知られている。したがって、MELAS の表現型と tRNA-Leu(UUR)領域の点変異とに何

らかの因果関係が存在するものと推測されていたが、その本態は不明である。3243変異や3271変異が存在すると、アンチコドン修飾異常の起きることが2000年に報告された(Yasukawa, et al. JBC 275: 4251-7, 2000)。その後、その主食の本態は、タウリン修飾であることが示された(Suzuki, et al. EMBO J 21: 6581-9, 2002)。

今回は、このtRNA領域内に点変異を持つ症例を用いて、MELASの臨床病型を示した5個の点変異、MELAS以外の臨床病型を示した4種類、合計9種類点変異について、アンチコドン修飾異常の有無を調べた。結果は、MELASの臨床病型の5個の点変異がすべて修飾異常を示し、それ以外は修飾異常を示さなかった。

この結果は、MELASの臨床病型とアンチコドン修飾異常をもたらすtRNA-Leu(UUR)内点変異とが強く関連することを示すものである。

E. 結論

MELASの病態を形成する要因として、tRNA-Leu(UUR)のアンチ修飾異常が関わっていることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 後藤雄一、ミトコンドリア機能異常と変性性痴呆との関連、日本臨床 62 巻増刊号4、220-223、2004

- 2) 後藤雄一、ミトコンドリア病の分子メカニズム、Molecular Medicine、41 巻、299-305、2004
- 3) 後藤雄一、ミトコンドリア脳筋症の病態と治療への展望、神経治療学、21 巻5号、521-528、2004
- 4) 後藤雄一、ミトコンドリア病の組織診断-ゴモリ染色、活性染色、免疫染色、臨床検査、49 巻1号、45-49、2005
- 5) Matsunaga T, Kumanomido H, Shiroma M, Goto Y, Usami S. Audiological features and mitochondrial DNA sequence in a large family carrying mitochondrial A1555G mutation without use of aminoglycoside. Annals of Otology, Rhinology & Laryngology, 114: 153-160, 2005

2. 学会発表

(国際学会)

- 1) Mimaki M, Nishino I, Nonaka I, Goto Y: Novel mtDNA G3242A and G3244A mutations adjacent to a common A3243G mutation. The 52th Meeting of American Society of Human Genetics, Toronto, Canada, 10.27, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

图1

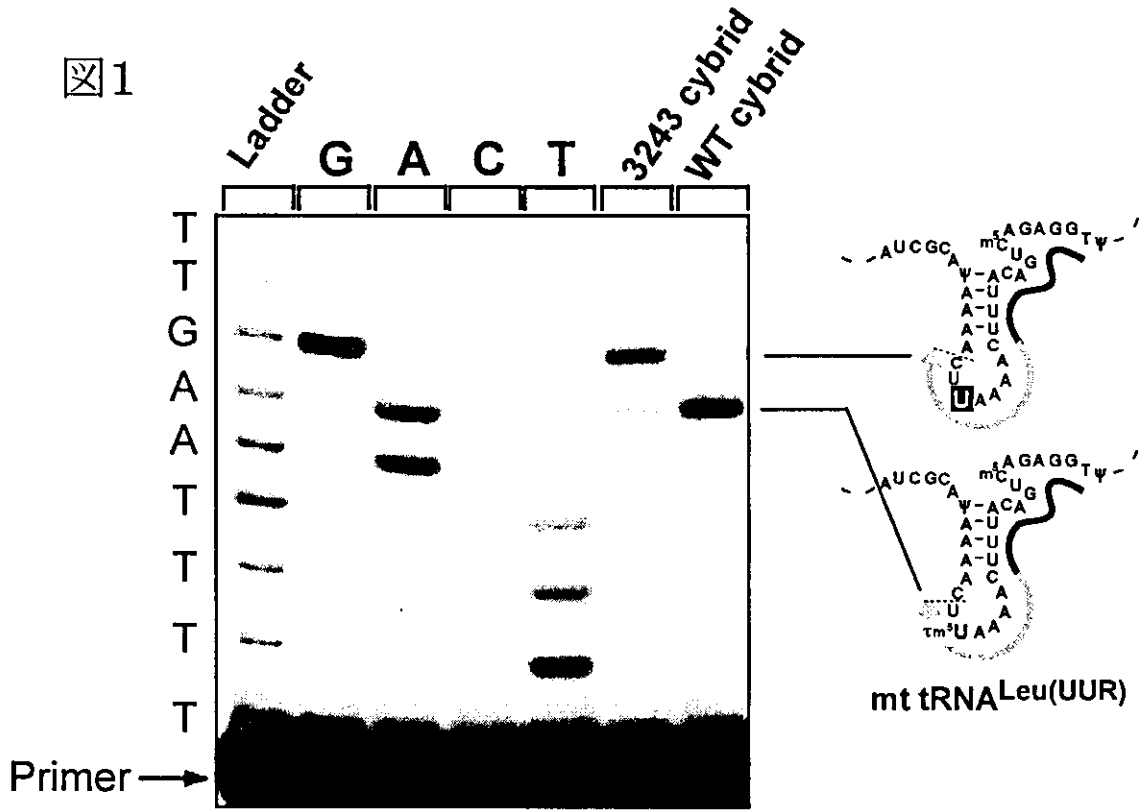
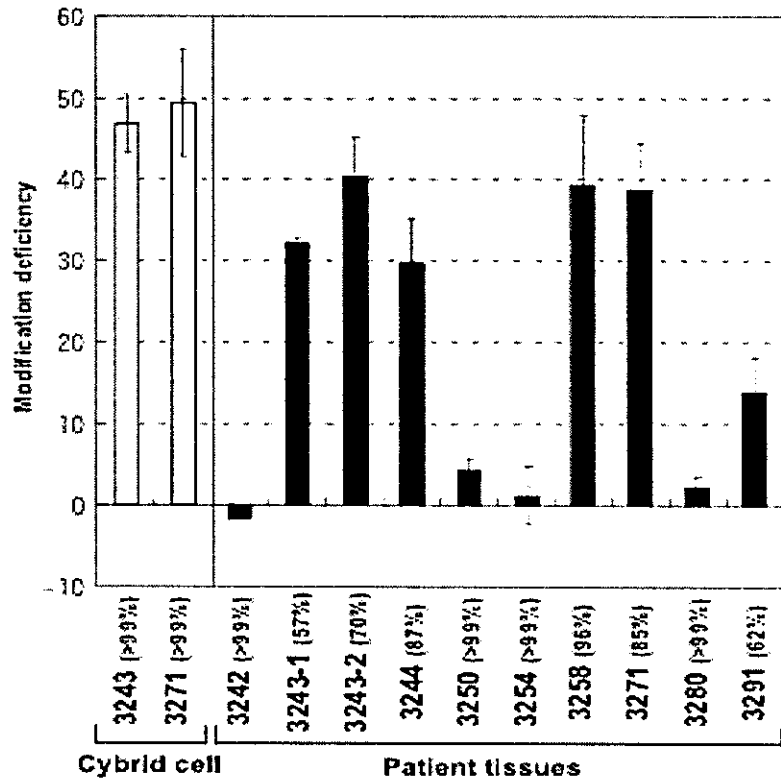


图2



ミトコンドリア脳筋症に対する L-アルギニンおよびジクロロ酢酸療法の臨床的検討

分担研究者 岡 明 国立成育医療センター神経内科医長

研究協力者 長澤哲郎、阿部裕一

研究要旨

ミトコンドリア脳筋症患者に対し、L-Arginineおよびジクロロ酢酸の投与を行った。L-Arginine は、これまでの報告のように、急性症状発現から短時間に投与すれば、症状の改善に有用である可能性が示された。ジクロロ酢酸は、MELASまたはLeigh脳症において有効なケースがあり、症例により試みるべき治療法であると考えられた。

A.研究目的

ミトコンドリア脳筋症における高乳酸血症に対する治療法として、L-アルギニン(L-Ar)およびジクロロ酢酸(DCA)による治療法を行い、その臨床的評価を行った。L-Ar は、MELAS 患者における、脳卒中様発作時の急性期の治療として、1 例の患者に施行した。DCA は、主に慢性期の治療として、4 例の患者に投与し、臨床症状の変化を観察した。

B.研究方法

ミトコンドリア DNA3243A→G 変異を認める 2 例の MELAS 患者および、ミトコンドリア DNA8993T→G および 8993T→C 変異を認める各 1 例の Leigh 脳症の患者に対して、治療を行った。1 例の MELAS 患者については、L-Ar 療法と DCA 療法を、他 3 例には DCA 療法を施行した。

L-Ar は、血液ガス検査により卒中様発作が疑われた場合には、L-Ar 製剤 0.5g/kg (5ml/kg)を 1 時間で点滴静注施行し、症状の改善が不十分な場合には翌日も施行した。

DCA は、急性の意識障害で発症した Leigh 脳症の 1 例には初日に 150mg/kg/日投与し、以後漸減した。他 3 例は慢性期に 10-30mg/kg で開始し、血中および髄液中の乳酸値を参考にして量を

調節した。

(倫理面への配慮) 当院倫理委員会の承認を得た上で、十分な説明の後に、文書によりインフォームドコンセントを得た。

C.研究結果

比較的短期間ではあるが、肝機能障害、末梢神経障害を含め明らかな有害事象は認められなかった。

①L-Ar 療法

3242A→G 変異を認める児に対し、4 回の、MELAS の卒中様発作に対し使用した。

発症後半日してから投与した 2 回においては、不機嫌・嘔吐などの症状は、L-Ar 投与後にも認められ、明らかな症状の改善は確認されなかった。発作症状の発現から投与まで時間は短時間であった場合には、L-Ar 投与後 1 日以内に症状は改善した。

②DCA 療法

2 例の MELAS 患者に投与した。1 例は、MELAS の卒中様発作を 2-3 月に 1 回反復していたが、投与開始後の乳酸アシドーシスの発作は、L-Ar 投与にて容易に改善された。投与開始して半年後ころより、そうした発作も認められなくなり、発熱などに際しても嘔吐・不機嫌・意識障害など