

トコンドリア脳筋症の症例において、筋病理上アポトーシスが途中段階で停止していることを報告している(2002)。しかしこれまでは脳の検体で検討したものはない。そこで我々は脳の検体においてアポトーシスの有無を検討してみることとした。

## 2. ミトコンドリア細胞の増殖の検討

従来ミトコンドリアは細胞外で培養は不可能と考えられてきた。我々はミトコンドリアの性質を保ちながら核を有しないミトコンドリア細胞 (MitoCell) の cell line を分離することに成功し報告してきた(Mitochondrion)。MitoCell の増殖機序には、①核を有しないミトコンドリア細胞が増殖する、②核を有するごく少数のミトコンドリア細胞が基細胞となって増殖しその後核が消失していく、または、血小板のように基細胞から fragment として分離される、が考えられる。Flow cytometer を用いたこれまでの検討では①を支持するものであったが②の可能性を除外することはできなかった (2003 年小児神経学会)。今回、Pore Filter を用いて、ミトコンドリア細胞の増殖機序について検討し報告する。

## **B.研究方法**

### 1. ミトコンドリア脳筋症におけるアポトーシスの検討

対象：

症例は Leigh 症候群の女児。1歳5ヶ月時死亡。41週3日 3760gにて仮死で出生した(Apgar7)。同胞6人、第2/4子は死産、1y3mよりシリーズ形成する痙攣が出現し中枢性無呼吸で死亡した。対照の症例は Reye 症候群の男児。0歳10ヶ月時死亡。

周産期・発達正常であった。10ヶ月時発熱時に約30分の痙攣重積が出現しチアノーゼ・尿毒症・アシドーシス・著明な出血傾向となり代謝障害による心不全で死亡した。

方法：

各症例の大脳皮質(頭頂葉)からホルマリン固定パ

ラフィン包埋切片作成した。これらを H&E 染色、TUNEL 染色、caspase 3 と Bax の免疫組織化学染色を行った。

### 2. ミトコンドリア細胞の増殖の検討

対象：

Leigh 症候群の原因となる T9176C mitochondria DNA (mtDNA)変異を示す患者と健常ボランティアから cell line 作成に関する informed consent を得た上で採血を行い、血小板を分離した。血小板と HeLa mitochondria-less (Rho0)細胞を融合させた cybrid 細胞から形質変換したミトコンドリア細胞を cell line 化して培養し増殖実験に用いた。

方法：

ミトコンドリア細胞を培養した後、ミトコンドリア細胞を核より小さな均一な孔の開いたフィルターを通過させ、それぞれ培養を続けた。フィルターは(直径 1.2  $\mu$ m、3.0  $\mu$ m)ポリカーボネート製アイソポアメンブラン(Millipore 社)を使用した。

1週間ごとに光学顕微鏡下で増殖の様子を観察し、また、AQueousOne を用い、酵素活性を利用して細胞量を計測した。

対照には、Cybrid cell を用いた。

AQueousOne を用いた細胞量の測定は

①細胞を含む RPMI1640 培地を 100  $\mu$ l ずつ 96 穴マイクロプレートに分注

②AQueousOne を各ウェルに 20  $\mu$ l 加える

③37°C で 1 時間培養

④490nm で吸光度を測定

で行った。

## **C.研究結果**

### 1. ミトコンドリア脳筋症におけるアポトーシスの検討

Leigh 症候群の病理組織ではニューロンとグリアの核が TUNEL 染色陽性像を示した。Caspase 3 と Bax では control と同様陰性であった。

### 2. ミトコンドリア細胞の増殖の検討

今回、核が通過しない直径  $1.2\mu\text{m}$ 、 $3.0\mu\text{m}$  の孔を通過したミトコンドリア細胞が増殖する事を確認した。このことはこれまでの実験で示唆された。ミトコンドリア細胞が核を有しないにも関わらず増殖することを裏付けた。

#### D.考察

##### 1. ミトコンドリア脳筋症におけるアポトーシスの検討

今回初めてミトコンドリア脳筋症の1型である Leigh 症候群の病理においてアポトーシスによる細胞死が確認された。一般にはアポトーシスの経路には TNF- $\alpha$ 、FAS/FAS-L を介するカスパーゼ依存性経路、ミトコンドリアのチトクローム C の細胞質遊離を介するカスパーゼ依存性経路がある。今回、Leigh 症候群の検討では Caspase 3 と Bax が陰性であったことはこれらの経路を介さないカスパーゼ非依存性の経路が推測された。

##### 2. ミトコンドリア細胞の増殖の検討

細胞小器官であるミトコンドリアはかつて自由に生きていた細菌（原核細胞）であって、2億年前にこの細菌が宿主（有核細胞）と共生したという仮説が広く考えられている。最近の研究でミトコンドリアと  $\alpha$ -proteobacteria は多くの遺伝的相同性が認められておりこの仮定は支持されている (Gray W., et al. Science 283, 1476-1481:1999)。しかし、永年の進化の過程で共生した原核細胞の DNA の多くは核に移行したため、これまではミトコンドリアは独自に増殖する能力が無いと考えられてきた (Martin W., Science 287, 1219 :2000)。

我々は核がなくても持続的に培養可能なミトコンドリア活性を示すミトコンドリア細胞を作り出した (Nakano K, et al Mitochondrion 3:21-27:2003)。今回の検討でも、このミトコンドリア細胞は核を有しなくても増殖が可能であることを確認できた。今後、mtDNA 変異によるミトコンドリア細胞の特異性への理解が深まれば、L-アルギニン、ジクロロ酢酸 Na、クレアチンなどが選

択的に使用可能となると考える。

#### E.結論

本年度の研究において、ミトコンドリア脳筋症の Leigh 症候群におけるアポトーシスの検討を組織免疫法で行い、Tunnel 法でアポトーシスによる細胞死を確認した。さらに、Caspase 3 と Bax が陰性であったことはこれらのカスパーゼ依存性の経路を介さないカスパーゼ非依存性の経路が推測された。これらの結果はアポトーシスがその病態に深く関与していることを示唆するものである。治療薬の開発、選択にその病態が重要な位置を占める可能性があり、さらに検討を深めることが必要と考える。

ミトコンドリアの働きを理解する基礎的研究として、核より小さな均一な孔の開いたフィルターを通過させてミトコンドリア細胞増殖を解析した。ミトコンドリア細胞がフィルターを通して増殖することから原核細胞の性質を持つことを再確認した。今後このミトコンドリア細胞を用いて、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を構築したい。

#### F.健康危険情報

特になし

#### G.研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakano K, Noda N, Tachikawa E. et al., A Preliminary Study of Methylcobalamin Therapy in Autism 東女医大誌 75(3/4/5)::2005(in press)
- 2) Shidara K, Yamagata K, Kanamori T, Nakano K, et al. Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention for apoptosis. Cancer Res 66(5):1-9:2005

##### 2. 学会発表

- 1) 野田尚子、中野和俊、中山智博ら。ミトコンドリア脳筋症におけるアポトーシス。第4回ミトコンドリア研究会、東京、2004
- 2) 田良島美佳子、中野和俊、佐々木香織ら。Leigh症候群の亜型分類 -脳 MRI 所見を中心に- 第4回ミトコンドリア研究会、東京、2004
- 3) 立川恵美子、中野和俊、中山智博ら。Rho<sup>0</sup>細胞と血小板ミトコンドリアを融合したサイブリッド細胞から形質変化したミトコンドリア細胞の増殖の検討。第47回 日本先天代謝異常学会、宇都宮、2004
- 4) 中山智博、中野和俊、野田尚子ら。核をもたないミトコンドリア細胞の細胞生物学的研究。第46回小児神経学会、東京、2004
- 5) 村上てるみ、中野和俊、中山智博ら。当科における MELAS 患者の脳卒中様発作に対する L-アルギニン療法の効果。第46回小児神経学会、東京、2004
- 6) 松崎美保子、中野和俊、佐々木香織ら。小児発症 MELAS の予後。第46回小児神経学会、東京、2004
- 7) 中野和俊。ミトコンドリア病の治療法。平成16年度第25回遺伝カウンセリングリフレッシュセミナー 東京 2005

#### H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
 発明名称「核を持たずにミトコンドリア活性を示す培養可能なミトコンドリア細胞」(出願番号：特許 2002-139673) として特許を取得した。
2. 実用新案登録  
 なし
3. その他  
 なし

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

分担研究者 松岡太郎 市立豊中病院小児科副部長  
研究協力者 鳥邊泰久、鈴木保宏 大阪府立母子保健総合医療センター  
真野利之 大阪府立急性期総合医療センター  
沖永剛志 大阪大学附属病院

研究要旨

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 (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes、以下 MELAS) でみられる脳卒中様症状は、難治性でしばしば反復し、症例の神経学的予後を決定する。近年 L-アルギニン製剤の使用が脳卒中様症状の急性期に有効であることが報告された。今回私達は、4 例の MELAS 症例の卒中様症状の急性期に L-アルギニン製剤を使用し、その有効性を確認したので報告する。

A.研究目的

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 (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes、以下 MELAS) の脳卒中様症状の急性期における L-アルギニン製剤の有効性を明らかにする。

B.研究方法

4 例の MELAS 症例を対象とした。性別は男性 2 例と女性 2 例であった。3 例でミトコンドリア DNA 塩基番号 3243 のアデニンからグアニンへの点変異を認めた。発症年齢は 3 歳から 9 歳であった。L-アルギニン製剤を初めて使用した年齢は 8 歳から 16 歳で、各々の症例にとっては 1 回目から 12 回目の卒中様症状に対してであった。脳卒中様症状は、頭痛や嘔吐、けいれん、意識障害、視力障害を様々な組み合わせで認めた。

L-アルギニンの臨床研究実施計画書（厚生労働科学研究費補助金 効果的医療技術の確立推進臨床研究事業 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 15 年度総括・分担研究報告書）に基づき、各々の施設の倫理委員会での承認と、患者保護者の文書での同意を取得後に、脳卒中様症状発現後 12 時間以内に、10%塩酸 L-アルギニン製剤 5 ml/kg を点滴静注した。併用薬剤は、ジアゼパム、ミダゾラム、濃グリセリン、リン酸デキサメタゾンナトリウムなどであった。

有効と考えられた症例では、脳卒中様症状の再発時に L-アルギニン製剤を再投与した。投与回数は症例ごとに 1 回から 11 回であった。

C.研究結果

合計 17 回の脳卒中様症状に対して L-アルギニン製剤を使用した。L-アルギニンの臨床研究実施計画書（厚生労働科学研究費補助金 効果的医療技術の確立推進臨床研究事業 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 15 年度 総括・分担研究報告書）に基づき、L-アルギニン製剤の投与で有効性は「改善あり」と判定された。特記すべき副作用の出現はなかった。

#### D.考察

MELAS の脳卒中様症状は、従来は各種薬剤への反応がないか、あっても一過性で、治療に難渋することが多かった。遷延する発作から回復後に、神経学的に、あるいは精神医学的に大きな障害を残すこともしばしばであった。今回の検討で L-アルギニン製剤の使用は、発作の頓挫という急性期の治療の観点からはある程度以上の有効性を示した。

今後は発作予防を目的とした薬剤の開発とその適切な投与方法の検証が必要であると考えられた。

#### E.結論

L-アルギニン製剤の点滴静注療法は、MELAS

における脳卒中様症状の急性期に試みるべき治療法である。

#### F.健康危険情報

特になし

#### G.研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### 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

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  
—細胞内活性酸素発現変化及び遺伝子発現変化—

分担研究者 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

研究協力者 犬童寛子、富田和男

研究要旨

小児期発症のミトコンドリア脳筋症ではミトコンドリアDNA突然変異がその原因であることが知られている。ミトコンドリアDNAは1細胞内におよそ1,000ほどのコピーがある。ミトコンドリア脳筋症では、特定部位の突然変異がその原因であり、全てのミトコンドリアDNAコピーが突然変異となっているものをhomoplasmyと言い、一部が突然変異となっているものをheteroplasmyと言う。ミトコンドリア脳筋症早期では、その突然変異率(全体に対する突然変異の割合)が小さく、この検出には、再原性、精度に優れた検出法の開発が望まれている。本研究では、このミトコンドリアDNA突然変異率の高感度検出法を確立したので報告する。これにより、より信頼性に優れたミトコンドリア脳筋症診断法を確立することができた。

A.研究目的

小児期発症のミトコンドリア脳筋症ではミトコンドリアDNA突然変異がその原因であることが知られている。ミトコンドリアDNA突然変異等ミトコンドリア障害を有するとこれにより活性酸素が発生し、これがミトコンドリア脳筋症の病因となっている可能性が高い。

本研究では、感度に優れた特定部位の突然変異

率検出法の確立を試みた。

B.研究方法

1細胞内には、およそ1,000ものミトコンドリアDNAがあるとされている(図1)。本研究では、PCR法(DNA増幅法)を用い、より検出感度の高い、高感度突然変異検出方法確立を試みた。

(倫理面への配慮)本研究では培養細胞を用いている為、倫理面に問題はないと考える。

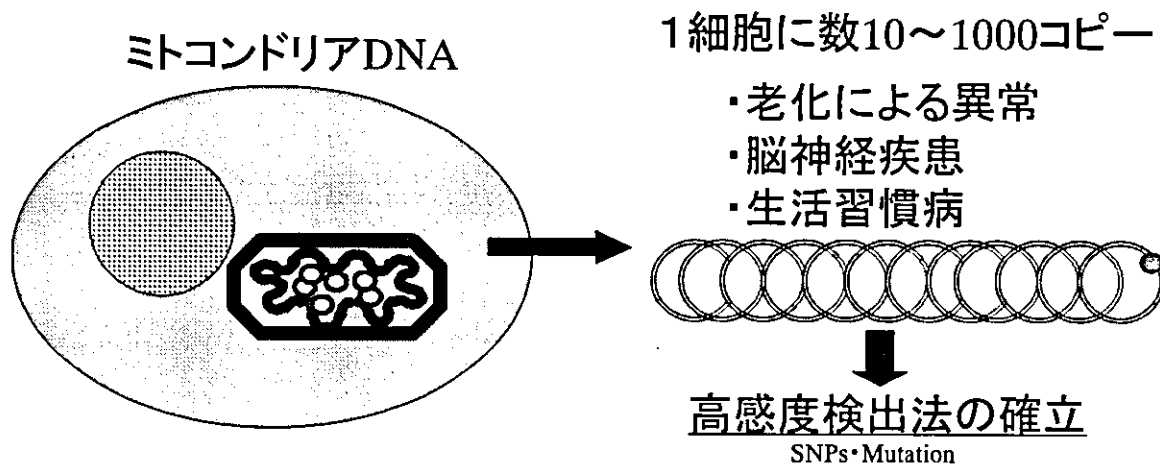
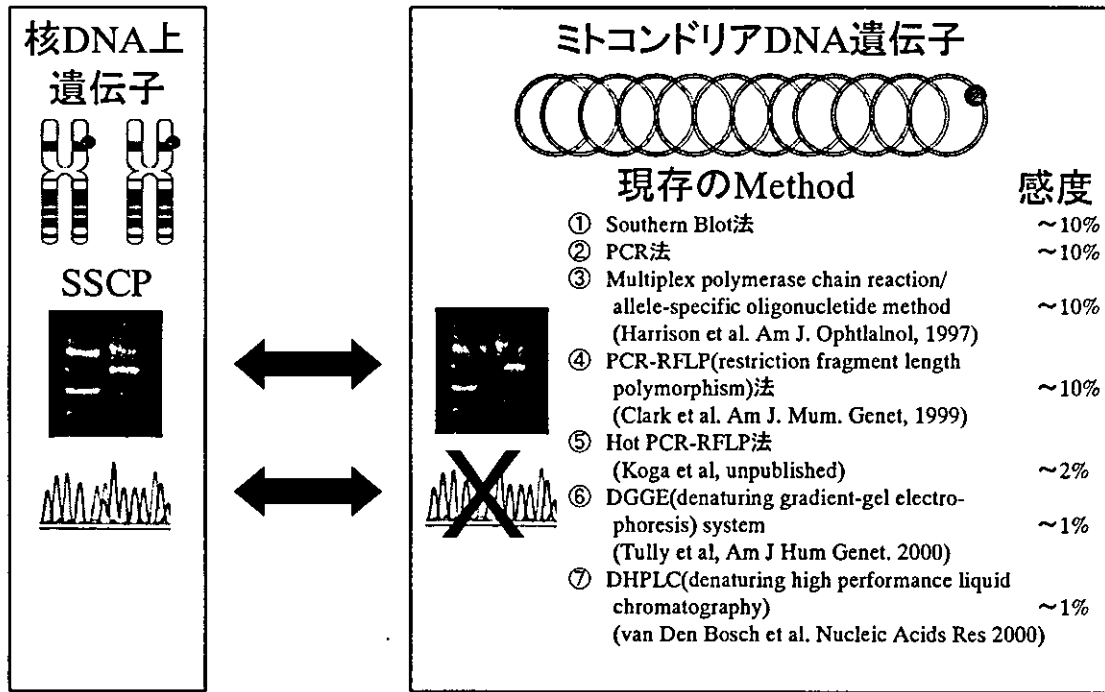


図1 ミトコンドリアDNA高感度検出の必要性



DNA SNPs (Mutation)高感度検出法の新規開発(0.1%までの検出)

- ① wild, variant PCR法
- ② 分子間結合検出法

図2 現在までのDNA突然変異高感度検出法

### C.研究結果

#### DNA 突然変異高感度検出法の確立

図3に突然変異検出結果を示す。本方法では、突然変異を0.1%まで検出可能となった。これは今まで報告された突然変異率(図2)の1/10

以下まで検出可能となった事を意味する。しかも、標準曲線の作成により、再原性、精度、及び感度に優れた突然変異率検出法を確立することができた。

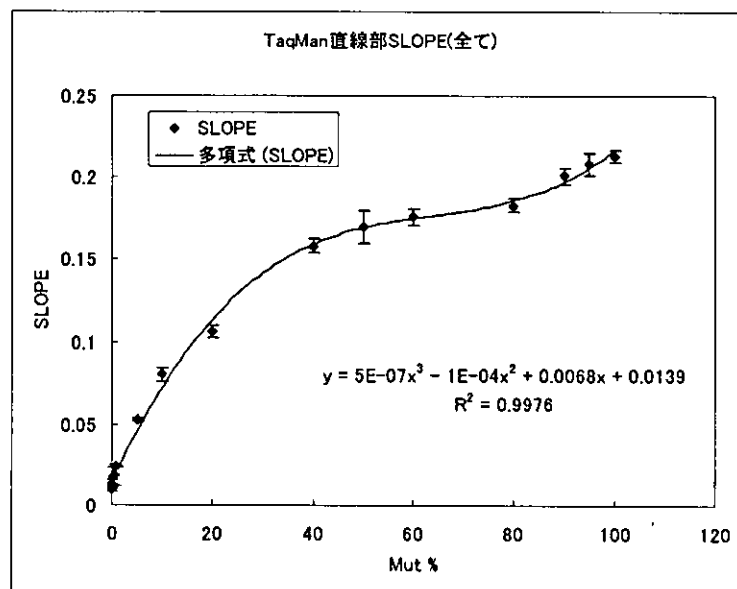


図3 突然変異検出結果

#### D. 考察

ミトコンドリアに存在するミトコンドリア DNA には 13 の遺伝子が存在し、これはミトコンドリア内膜にある電子伝達系の一部のタンパク質を産生する遺伝子である。ミトコンドリア DNA が損傷を受けると、電子伝達系が損傷し、結果として電子がよりそこからもれることが予想される。そうするとより多くの活性酸素が産生されることになる。ミトコンドリアはエネルギーを産生すると同時に、活性酸素という毒も生じさせている。ミトコンドリア脳筋症では、ミトコンドリア DNA の突然変異がその原因となっている。ミトコンドリア脳筋症によるミトコンドリア DNA の突然変異率が增大すれば、より活性酸素が生ずる結果となる。ミトコンドリア DNA は 16,569 bp であり、ミトコンドリアに存在し、酸化リン酸化により ATP 産生を行っている電子伝達系では、完全な機械ではなく、電子のもれを生じこれは酸素が捕獲し、スーパーオキシドという活性酸素を生み出す。これが前述の病気の原因となると考える。

#### E. 結論

本研究では、1細胞内に1,000ものミトコンドリア DNA を持つ事に注目し、このミトコンドリア DNA の突然変異率を高感度に検出する方法の確立を試み、今までの方法よりおよそ10倍高い感度の突然変異検出法を確立した。また、標準曲線の作成により、再現性、精度の高い突然変異率検定法の確立を行うことができた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hirai F, Motoori S, Kakinuma S, Tomita K, Indo HP, Kato H, Yamaguchi T, Yen H-C, St.Clair DK, Nagano T, Ozawa T, Saisho H and Majima HJ:

Mitochondrial Signal Lacking Manganese Superoxide Dismutase Failed to Prevent Cell Death by Reoxygenation following Hypoxia in a Human Pancreatic Cancer Cell Line, KP4. *Antioxidant & Redox Signaling*, 6(3): 523-535, 2004.

- 2) Kariyazono H, Nakamura K, Arima J, Ayukawa O, Onimaru S, Masuda H, Iguro Y, Majima HJ, Sakata R, Yamada K: Evaluation of anti-platelet aggregatory effects of aspirin, cilostazol and ramatroban on platelet-rich plasma and whole blood. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 15(2): 157-167, 2004.
- 3) Ijiri K, Tsuruga H, Sakakima H, Tomita K, Taniguchi N, Shimo-Onoda K, Komiya S, Goldring MB, Majima HJ, Matsuyama T: Increased expression of humanin peptide in diffuse type pigmented villonodular synovitis: implication of its mitochondrial abnormality. *Ann Rheum Dis*. 2004 (in press).
- 4) Kakinuma S, Nishimura M, Kubo A, Nagai J, Amasaki Y, Majima HJ, Sado T, Shimada Y: Frequent retention of heterozygosity for point mutations in p53 and Ikaros in N-ethyl-N-nitrosourea-induced mouse thymic lymphomas, *Mutation Research*, 2005 (in press).

##### 2. 学会発表

(国内学会)

- 1) 犬童寛子、富田和男、小澤俊彦、長野哲雄、馬嶋秀行: MnSOD が放射線抵抗性を引き起こす、第8回がん分子標的治療研究会総会、鹿児島、平成16年5月13-14日
- 2) 犬童寛子、富田和男、岩下洋一郎、浦野泰照、長野哲雄、小澤俊彦、馬嶋秀行: ミトコンドリア移行シグナル欠損 MnSOD は放射線誘導細胞死を抑制しない、第26回日本フリーラジカル学会学術集会、山形、平成16年6月24-25日
- 3) 末永重明、馬嶋秀行: リウマチ性関節炎にお



けるエストロゲンによる NO 産生とアポトーシスの抑制、第 17 回日本顎関節学会総会、新潟、平成 16 年 7 月 4、5 日

- 4) 犬童寛子、富田和男、末永重明、佐藤強志、岡田淳徳、馬嶋秀行、X 線照射によるアポトーシスには照射後にミトコンドリアから生ずる活性酸素が重要な役割を果たす、第 45 回日本歯科放射線学会総会、広島、平成 16 年 9 月 16-18 日

(国際学会)

- 1) Majima HJ: Mitochondria are the major source to produce intracellular ROS. 12th Biennial Meeting of SFRR-International, Buenos Aires, Argentina, May 5-9, 2004.
- 2) Suenaga S, Kawatoko S, Tomita K, Indo H, Nagano T, Ozawa T, Matsuyama T, Majima HJ: Prevention of nitric oxide formation and cell deaths by estrogen in estrogen receptor expressed rheumatoid arthritis fibroblasts, 3rd International Conference on Nitric Oxide Society, Nara, Japan, May 24-28, 2004.
- 3) Majima HJ, Iwashita Y, Komiya S, Maruyama I, Higashibata A, Ishioka N, Ohira Y: Recovery of Bone Mineral and Morphology in Growing Rat Leg Bone after Hindlimb Unloading, 24th International Symposium on Space Technology and Science (ISTS), Miyazaki, Japan, May 30-June 6, 2004.
- 4) Ohira Y, Kawano F, Wang XD, Lan YB, Ishihara A, Iwashita Y, Majima HJ, Nonaka I: Load-dependent growth of rat tibia, 35th Committee on Space Research (COSPAR), Paris, France, July 18-25, 2004.
- 5) Majima HJ: New Types of Fluorescent

Probes for Intracellular ROS Detection. What do They Tell Us ? The Conference of "Oxidative Damage Marker and Antioxidant Intervention in Health and Diseases", Chang Gung University, Tao-Yuan, Taiwan, October 29th and 30th, 2004

- 6) Indo H, Tomita K, Yen H-C, Ozawa T, Majima HJ: Mitochondrial Signal Lacking Manganese Superoxide Dismutase Failed to Prevent Cell Death by X-irradiation in a Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line, HLE SFRBM'S 11th Annual Meeting, St. Thomas, US Virgin Islands, November 17-21, 2004
- 7) Majima HJ, Indo HP, Tomita K and Ozawa T: Vitamin E protects against intracellular oxidative stress induced by X-irradiation. International Conference on "Antioxidants & Free Radicals in Health -Nutrition & radioprotectors" and IV Annual Conference of Society for Free Radical Research in India (SFRR), Bangalore-India. January 10-12, 2005

#### H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
- 1) 馬嶋秀行、ミトコンドリアから発生する活性酸素の検出方法、特願 2004-124869、出願中。
- 2) 馬嶋秀行、突然変異率計測方法及び装置、特願 2004-268440、出願中。
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

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

分担研究者 石井 正浩 北里大学医学部小児科教授

**研究要旨**

MELAS患児と川崎病既往児に対して血管内皮機能の非観血的評価法による検討を行った。また、ビタミンCが血管内皮機能に与える効果を検討した。MELAS患児と川崎病既往児では血管内皮機能の著明な低下が認められた。ビタミンCを投与することにより、血管内皮機能の改善が認められた。今後、ビタミンCはMELAS患児や川崎病既往児の治療戦略において重要なものになりうる可能性が示唆された。

**A.研究目的**

MELAS 患児と川崎病既往児に対して血管内皮依存性の血管拡張をみる非観血的検査法である Flow Mediated Dilatation (FMD)を用いて血管内皮機能の検討を行った。また、ビタミンCが血管内皮機能に与える効果を検討した。

**B.研究方法**

MELAS 罹患児 14 名を対象とした。性別は男 9 名、女 5 名であり、検査時年齢は 8-45 歳 (12.5±3.1 歳) である。対照(cont)群は年齢・性別を一致させた健康人 13 名とした。川崎病既往児の検討は重症の冠状動脈障害をきたした川崎病罹患児 13 名を対象とした。性別は男 9 名、女 4 名で、検査時年齢は 9-23 歳 (15.8±1.4 歳)であり、川崎病発症年齢は 6ヶ月-8 歳 (3.5±2.6 歳) である。川崎病発症からの観察期は 5-21 年 (12.3±1.6 年) であった。高周波超音波装置を用いて血管内皮依存性の拡張である%FMD を求めた。その後、ビタミンC2000mg を経口もしくは静脈内投与し、%FMD を計測した。ニトロールを舌下させ、血管内皮非依存性の拡張である%NTG-D を計測した。

**C.研究結果**

MELAS 患児において%FMD は対照群に比して

有意に低下していた (3.8% vs. 14.2%,  $p<0.05$ )。%NTG-D は MELAS 患児と対照群間で有意な差を認めなかった。このことより MELAS 患児での血管内皮機能低下が示唆された。川崎病既往群においても同様に%FMD のみ低下していた (4.2%)。この事より、血管内皮機能の低下が示唆された。ビタミンC投与後、MELAS 患児の%FMD は改善した(8.1%)。川崎病既往児においても同様に%FMD は改善した(10.3%)。また、%NTG-D はビタミンCの影響は受けなかった。この事よりビタミンC投与が血管内皮機能を改善させることが示唆された。

**D.考察**

MELAS 患児と川崎病既往児において血管内皮機能が低下していることが考えられた。この事が、種々の病態と関連していると考えられる。また、ビタミンCが血管内皮機能を改善させ、今後の治療戦略に役立つことが考えられた。

**E.結論**

MELAS 患児と川崎病既往児では血管内皮機能の著明な低下が認められた。ビタミンCを投与することにより、血管内皮機能の改善が認められた。

## F.健康危険情報

MELAS 患児と川崎病既往児では血管内皮機能の著明な低下が認められた。

## G.研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Muta H, Ishii M, MD, Egami K, Furui J, Sugahara Y, Akagi T, Nakamura Y, Yanagawa H, Matsuishi T, Early Intravenous Gamma-globulin Treatment for Kawasaki Disease: From the 15 and 16 Nationwide Surveys in Japan. J Pediatr, 2004;144:496-499
- 2) Muta H, Ishii M, Sakaue T, Egami K, Furui J, Sugahara Y, Akagi T, Nakamura Y, Yanagawa H, Matsuishi T, Older age is a risk factors for the development of cardiac sequelae in Kawasaki disease. Pediatrics, 2004;114:751-754

### 2. 学会発表

- 1) Ishii M, Furui J, Sugahara Y, Muta H, Egami K,

Matsuishi T. Endothelial dysfunction and therapeutic strategy for long term after Kawasaki disease: assessment of invasive and noninvasive study. 77th Scientific Sessions, American Heart Association, 2004, New Orleans

- 2) 石井正浩 川崎病の遠隔期の血管内皮機能および治療戦略 シンポジウム 1 血管内皮障害のエビデンスとその長期予後 第 24 回日本川崎病研究会

## 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

## 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
後藤雄一	ミトコンドリア脳筋症	山口徹、北原光夫（総編集）	今日の治療指針	医学書院	東京	2004	657
杉江秀夫	発達障害と遺伝—最近の知見—	原仁、編	発達障害医学の進歩. 16巻	診断と治療社	東京	2004	37-44

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
古賀靖敏	MELAS and L-arginine therapy.	Brain Dev.	26(7)	480	2004
	Noonan syndrome, moyamoya-like vascular changes, and antiphospholipid syndrome.	Pediatr Neurol.	31(5)	364-366	2004
	L-arginine improves the symptoms of stroke-like episodes in MELAS.	Neurology	64(4)	710-712	2005
	A new sequence variant in mitochondrial DNA associated with high penetrance of Russian Leber hereditary optic neuropathy.	Mitochondrion	In Press		2005
	A novel MYC-Target gene, <i>MIMITIN</i> , that is involved in cell proliferation of esophageal squamous cell carcinoma.	JBC	In Press		2005
	MELASの新しい治療法—L-アルギニン	臨床検査	49(1)	83-88	2005
後藤雄一	Audiological features and mitochondrial DAN sequence in a large family carrying mitochondrial A1555G mutation without use of aminoglycoside.	Ann Otol Rhinol Laryngol	114(2)	153-160	2005
	ミトコンドリア機能異常と変性性痴呆との関係	日本臨床	62 増刊号4	220-223	2004

	ミトコンドリア病の分子メカニズム	Molecular Medicine	41	299-305	2004
	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(5)	521-528	2004
	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(1)	45-49	2005
岡 明	Altered expression of ARPP protein in skeletal muscles of patients with muscular dystrophy, congenital myopathy and spinal muscular atrophy.	Pathobiology.	71(1)	43-51	2004
	Girl with monosomy 1p36 and Angelman syndrome due to unbalanced der(1) transmission of a maternal translocation t (1;15) (p36.3;q13.1).	Am J Med Genet A.	131(1)	94-98	2004
	A non-NF2 case of schwannomas of vestibular and trigeminal nerves with different genetic alterations of NF2 gene: case report.	Surg Neurol.	63(1)	62-64	2005
森 雅人	Dichloroacetate treatment for mitochondrial cytopathy: long-term effects in MELAS.	Brain Dev.	26(7)	453-458	2004
杉江秀夫	Congenital form of glycogen storage disease type IV: a case report and a review of the literature..	Pediatr Int.	46(4)	474-477	2004
	Intermittent and recurrent hepatomegaly due to glycogen storage in a patient with type 1 diabetes: genetic analysis of the liver glycogen phosphorylase gene (PYGL).	Diabetes Res Clin Pract.	65(2)	175-182	2004
	Relationship between Pervasive Developmental Disorders (PDDs) and Neonatal Factors: Comparison with Normal Subjects.	Autism	in press		2005
	Clinical efficacy of fluvoxamine and functional polymorphism in a serotonin transporter gene on childhood autism.	J Autism Dev Disorder	in press		2005
	軽度発達障害児への援助と対応：医療と学校保健の連携のあり方。	学校保健研究	46(5)	472-477	2004

内藤悦雄	Pyruvate dehydrogenase E1alpha subunit deficiency in a female patient: evidence of antenatal origin of brain damage and possible etiology of infantile spasms.	Brain Dev.	26(1)	57-60	2004
	Genetic background markedly influences vulnerability of the hippocampal neuronal organization in the "twitcher" mouse model of globoid cell leukodystrophy.	J Neurosci Res.	77(4)	507-516	2004
	Plasma adiponectin levels in newborns are higher than those in adults and positively correlated with birth weight.	Clin Endocrinol (Oxf)	61(4)	418-423	2004
	臨床的 Leigh 脳症を呈したメチルマロン酸血症の 1 例	脳と発達	36(4)	324-329	2004
萩野谷和裕	Acute dysautonomia: complete recovery after two courses of IVIg.	Brain Dev.	26(8)	542-544	2004
	Dynamic cortical activity during spasms in three patients with West syndrome: a multichannel near-infrared spectroscopic topography study.	Epilepsia.	45(10)	1248-1257	2004
	Clinical efficacy of zonisamide in childhood epilepsy after long-term treatment: a postmarketing, multi-institutional survey.	Seizure.	13 Suppl 1	S34-39	2004
田辺雄三	CSF hypocretin-1 (orexin-A) levels in childhood narcolepsy and neurologic disorders.	Neurology.	63(12)	2440-2442	2004
	筋疾患	クリニカ	31(3)	182-185	2004
馬嶋秀行	Mitochondrial signal lacking manganese superoxide dismutase failed to prevent cell death by reoxygenation following hypoxia in a human pancreatic cancer cell line, KP4.	Antioxidants & redox signaling	6(3)	523-535	2004
	Evaluation of anti-platelet aggregatory effects of aspirin, cilostazol and ramatroban on platelet-rich plasma and whole blood.	Blood Coagulation and fibrinolysis	15	157-167	2004
	Increased expression of humanin peptide in diffuse type pigmented villonodular synovitis. Implication of its mitochondrial abnormality.	Ann. Rheum. Dis	Epub ahead of print		2004

石井正浩	Early Intravenous Gamma-globulin Treatment for Kawasaki Disease: From the 15 and 16 Nationwide Surveys in Japan.	J Pediatr.	144	496-499	2004
	Older age is a risk factors for the development of cardiac sequelae in Kawasaki disease.	Pediatrics	114	751-754	2004



## 研究成果の刊行物・別刷

Discussion

## MELAS and L-arginine therapy

Yasutoshi Koga\*

*Department of Pediatrics and Child Health, Kurume University School of Medicine, 67 Asahi-Machi, Kurume, Fukuoka 830-0011, Japan*

Received 30 January 2004; received in revised form 22 February 2004; accepted 23 February 2004

Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) is a maternally inherited multisystem mitochondrial disorder characterized by stroke-like episodes before 20 years of age [1]. Mitochondrial angiopathy, with degenerative changes in small arteries and arterioles, has been reported in many MELAS patients [2]; these blood vessels have been designated as strongly succinate dehydrogenase-reactive vessels (SSVs) [3]. However, the primary cause for stroke-like episodes in young MELAS patients—whether mitochondrial cytopathy, angiopathy, or both—remains controversial. Many therapeutic trials have been undertaken to cure mitochondrial disorders, but not for the acute stroke phase of MELAS. Based on a hypothesis that stroke-like episodes in MELAS are caused by segmental impairment of vasodilation in intracerebral arteries, L-arginine has been used for therapeutic trials in MELAS patients during the acute phase of stroke. We found that L-arginine therapy quickly decreased severity of stroke-like symptoms in MELAS, enhanced dynamics of microcirculation, and also reduced tissue injury from ischemia [4]. L-arginine is a potent vasodilator via endothelial function through nitric oxide (NO) production [5]. Cardioprotective effects of L-arginine and NO are associated with endothelial cell preservation [6], decreased neutrophil activation [7], improved coronary blood flow, and reduced free radical-mediated injury [8]. Although the molecular mechanism of L-arginine therapy in MELAS is not known, it is a potential new therapy for use at the acute phase of stroke-like episodes in MELAS.

In this paper, Dr Kubota and colleagues have performed a therapeutic trial to a 16-year-old girl with an acute phase of MELAS, using L-arginine infusion in order to improve the symptoms from stroke-like episodes. Among one out of five severe stroke-like episodes, L-arginine was added on the conventional steroid and glycerol therapy at the fifth

episode. The authors described that L-arginine improved the symptoms much earlier than those without L-arginine infusion and shortened the duration of hospitalization. They measured the lactate level by MRS, which is a good indicator of the therapeutic effect. This is a case report describing a successful therapeutic result in MELAS. The finding will provide information about a new therapeutic approach to this currently incurable disease.

### References

- [1] Pavlakis SG, Phillips PC, DiMauro S, Rowland LP. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol* 1984;16:481–8.
- [2] Ohama E, Ohara S, Ikuta F, Tanaka K, Nishizawa M, Miyatake T. Mitochondrial angiopathy in cerebral blood vessels of mitochondrial encephalomyopathy. *Acta Neuropathol* 1987;74:226–33.
- [3] Hasegawa H, Matsuoka T, Goto Y, Nonaka I. Strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels in muscles from patients with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes. *Ann Neurol* 1991;13:1439–45.
- [4] Koga Y, Ishibashi M, Ueki I, Yatsuga S, Fukiyama R, Akita Y, Matsuishi T. Effects of L-arginine on the acute phase of strokes in three patients with MELAS. *Neurology* 2002;58:827–8.
- [5] Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med* 1996;2:41–5.
- [6] Shiono N, Rao V, Weisel RD, Kawasaki M, Li RK, Mickle DA, et al. L-Arginine protects human heart cells from low-volume anoxia and reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:805–15.
- [7] Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4651–5.
- [8] Radomski MW, Moncada S. The biological and pharmacological role of nitric oxide in platelet function. *Adv Exp Med Biol* 1993;344:251–64.

\* Tel.: +81-942-31-7565; fax: +81-942-38-1792.  
E-mail address: yasukoga@med.kurume-u.ac.jp (Y. Koga).



# Noonan Syndrome, Moyamoya-like Vascular Changes, and Antiphospholipid Syndrome

Yushiro Yamashita, MD,  
Akira Kusaga, MD,  
Yasutoshi Koga, MD,  
Shin-ichiro Nagamitsu, MD, and  
Toyojiro Matsuishi, MD

This report describes a 12-year-old Japanese female with Noonan syndrome who had antiphospholipid syndrome and moyamoya-like vascular changes. She presented choreic movements in her face and extremities. She manifested phenotypic features of Noonan syndrome with short stature, mental retardation, and a webbed neck. Magnetic resonance angiography revealed occlusion of bilateral internal carotid arteries and moyamoya-like vascular changes around the basal ganglion region. Pimozide completely resolved the patient's choreic movements. Tests for anticardiolipin antibody and lupus anticoagulant were positive. The patient has manifested no symptoms for 2 years with pimozide, aspirin, and growth hormone treatment, without further aggravation of moyamoya-like vascular changes. This article is the first report of Noonan syndrome with antiphospholipid syndrome and moyamoya-like vascular lesions. © 2004 by Elsevier Inc. All rights reserved.

Yamashita Y, Kusaga A, Koga Y, Nagamitsu S, Matsuishi T. Noonan syndrome, moyamoya-like vascular changes, and antiphospholipid syndrome. *Pediatr Neurol* 2004;31:364-366.

## Introduction

Noonan syndrome is characterized by a normal karyotype and clinical features that resemble Turner syndrome. An association between Noonan syndrome and moyamoya has been reported in only two cases [1,2]. In adults, the association between strokes and antiphospholipid antibodies has been established, but such an association with moyamoya disease has not been identified.

This report describes for the first time a first patient with a rare combination of Noonan syndrome, moyamoya-like vascular changes, and antiphospholipid syndrome.

## Case Report

In June 2001, a 12-year-old female experienced difficulty in walking because of involuntary movement in the left upper and lower limbs. She was observed at Saga University Hospital. Cranial magnetic resonance imaging was normal. By the end of June, her symptoms improved. She was diagnosed as having antiphospholipid syndrome because of thrombocytopenia and positive anticardiolipin antibody. None of her family members had similar problems. The family did not return to the hospital because the patient was completely well. In February 2002, however, she had chorea again starting from the right hand and extending to the right foot. In April, her chorea extended to the left side and she began to speak less. The family saw a neurosurgeon, and cranial magnetic resonance angiography revealed moyamoya-like vascular changes. The patient was then referred to Kurume University Hospital for further evaluation and treatment.

On admission, her height was 120.8 cm ( $-5$  SD) and her weight was 27 kg ( $-2$  SD). She had multiple purpura lesions in her extremities. She manifested phenotypic features of Noonan syndrome, including a webbed and short neck, low posterior hair lines, low-set and abnormal auricles, and hypertrichosis. She manifested no signs of lupus or secondary sexual development. The patient had no history of seizures, and no cardiac lesions were evident. There was no family history of thrombosis.

Neurologically, she was alert, but had dysarthria caused by facial chorea. Her chorea was more prominent in the right side upper and lower limbs with hypotonia. Her deep tendon reflexes were elevated, and the Babinski reflex was positive on the right side. Her full intelligence quotient (Wechsler Intelligence Scale for Children—third version [WISC-III]) was 53; verbal intelligence quotient 60, performance intelligence quotient 55. Her social performance was relatively good, and she was in a mainstream classroom.

Complete blood count revealed low platelets (90,000). Prothrombin time and activated partial thromboplastin time were mildly prolonged, and lupus anticoagulant 1.76 (normal  $<1.3$ ), anticardiolipin antibody 100 (normal  $<10$ ), anti-b2 glycoprotein, and antinuclear antibody were positive. Anti-Sm, anti-RNA, anti-SS-A/Ro, and anti-SS-B/La antibodies were negative. Protein C and S were normal. Her bone age was delayed, and growth hormone secretion was abnormal by both an L-arginine and glucagon loading test. Auditory brainstem response and electroencephalogram were normal. The cranial computed tomography revealed mild

From the Department of Pediatrics and Child Health, Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan.

Communications should be addressed to:  
Dr. Yamashita; Department of Pediatrics and Child Health;  
Kurume University School of Medicine; 67 Asahi-machi;  
Kurume 830-0011, Japan.  
Received February 2, 2004; accepted May 3, 2004.

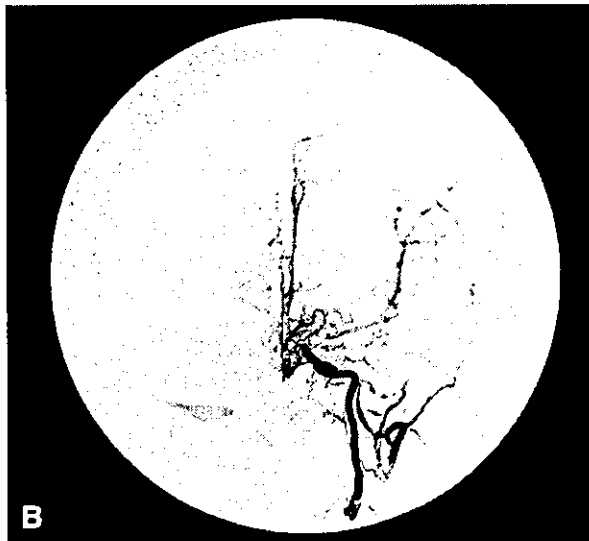
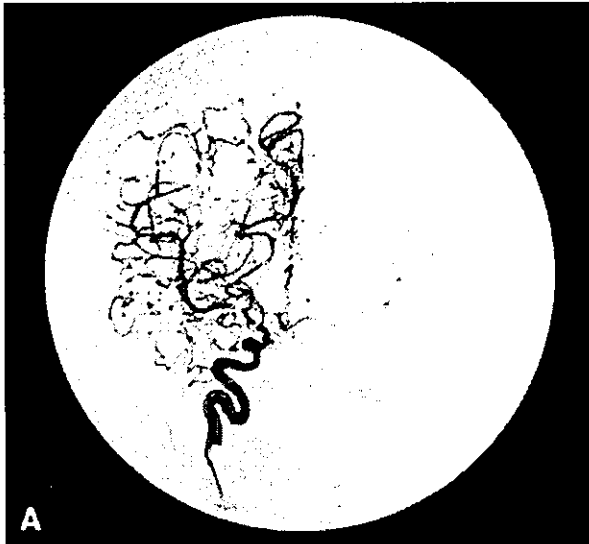


Figure 1. Cerebral angiogram: Right carotid angiogram indicated severe stenosis of internal carotid artery terminal lesion (A), and left carotid angiogram (B) demonstrated severe stenosis in the supraclinoid segment and collateral moyamoya-like vascular changes distal to the stenosis. The left internal carotid artery was narrower than the left side.

atrophy of the parietal lobe in the right hemisphere. The cranial magnetic resonance imaging revealed low-intensity areas in the basal ganglia on the right side. The cranial magnetic resonance angiography documented bilateral stenosis of the internal carotid arteries, which was more prominent on the right side, and moyamoya-like vascular changes in the bilateral basal ganglia and thalamic region (Fig 1). Her chromosome count was normal (46 XX).

The patient was treated with a D2 antagonist, pimozide (1.5 mg/day), and her chorea completely resolved by the end of May. She has manifested no symptoms for 2 years with pimozide, aspirin (100 mg/day), and growth hormone treatment, with no further aggravation of moyamoya-like vascular changes.

## Discussion

This patient was diagnosed with antiphospholipid syndrome because she had thrombocytopenia, positive anti-

cardiolipin antibody, and lupus anticoagulant. These findings were repeatedly demonstrated at 10-month intervals. Furthermore, the patient manifested characteristic features of Noonan syndrome, including short stature, facial and neck abnormalities, mild mental retardation, and a normal karyotype. On magnetic resonance angiography, she also manifested moyamoya-like vascular changes in bilateral carotid arteries and basal ganglia. She was diagnosed with moyamoya disease because she had underlying Noonan syndrome and antiphospholipid syndrome.

Booth et al. have reported a 7-year-old female with an ischemic event in association with repeated elevation of anticardiolipin antibody [3]. They demonstrated bilateral moyamoya-like vascular changes. The patient was treated with warfarin for 5 months, followed by aspirin. Eleven months after the treatment, a marked improvement in blood flow with decreased stenosis of the left internal carotid was observed. They speculated that the development of moyamoya-like vascular changes might be secondary to initial thrombosis and stenosis of the basal cerebral vasculature with subsequent formation of collateral vessels. Takahashi et al. reported eight children with acute hemiplegia, with three being diagnosed as having infarctions due to moyamoya [4]. Anticardiolipin immunoglobulin G antibody was positive in three of the five with idiopathic infarction, but none with moyamoya disease, suggesting that the etiology of the infarct might be distinct from that in the patients with idiopathic infarction. In contrast, Bonduel et al. reported detecting prothrombotic disorders in 4 of 10 patients with moyamoya disease, suggesting its role in the pathogenesis of moyamoya [5]. Shoning et al. reported eight children who suffered from cerebrovascular ischemia or stroke in which antiphospholipid antibodies were detected. In two patients, stenoses of the basal cerebral arteries were present; a 5-year-old female with moyamoya-like vascular changes manifested improved circulation after treatment with aspirin and intravenous immunoglobulin, whereas a male patient required surgery for encephalo-duro-arterio-synangiosis [6].

There have been only two case reports of Noonan syndrome and moyamoya [1,2]. One of these patients had activated protein C resistance, which was thought to be coincidental. Antiphospholipid antibodies were not measured in these cases. Both patients were treated with aspirin and were responsive to nonsurgical therapy.

Encephalo-duro-arterio-synangiosis surgery was also considered for the patient in the present report; we decided not to pursue this route, however, because pimozide dramatically improved her symptoms and no further recurrence or progression of moyamoya-like vascular change occurred. In patients with moyamoya disease or moyamoya-like vascular changes, the possibility of antiphospholipid syndrome should be considered.

---

The authors gratefully acknowledge the assistance of Dr. Muneyuki Matsuo at the University of Saga, Department of Pediatrics.

---