

201128172A

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

ミトコンドリア病の診断と治療に関する調査研究

(H23-難治-一般-016)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 後 藤 雄 一

国立精神・神経医療研究センター

平成 24 (2012) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

ミトコンドリア病の診断と治療に関する調査研究

(H23-難治-一般-016)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 後 藤 雄 一

国立精神・神経医療研究センター

平成 24 (2012) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

- ミトコンドリア病の診断と治療に関する調査研究 ----- 1
研究代表者 後藤雄一

II. 分担研究報告

1. ミトコンドリア脳筋症における脳障害機序に関する研究 ----- 7
飯塚高浩 北里大学医学部神経内科学
2. 水素を発生する新素材投与の安全性と効果 ----- 9
太田成男 日本医科大学大学院医学研究科
3. ミトコンドリア呼吸鎖異常症の酵素診断から遺伝子解析に至る ----- 13
系統的病因探索システムの構築に関する研究
大竹 明 埼玉医科大学医学部小児科
4. ミトコンドリア病の病態に関与する ATP 代謝調節因子の検索 ----- 17
北風政史 国立循環器病研究センター 部長
5. MELAS に対する L-アルギニン療法 ----- 19
— 急性期治療の golden time と長期治療における限界
古賀靖敏 久留米大学大学院医学研究科小児科学
6. ミトコンドリア病の遺伝における健康児を得ることが困難な ----- 23
事例に関する対策
末岡 浩 慶應義塾大学医学部産婦人科 准教授
7. 頻回の卒中発作を呈した MELAS の一女兒例に対する ----- 25
L-アルギニン療法の効果
須藤 章 北海道大学病院小児科 客員研究員
8. ミトコンドリア病の遺伝子診断・代謝病態評価法・ ----- 27
薬物治療法の開発
田中雅嗣 東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長

9. 遅発性ミトコンドリアミオパチーの臨床的、病理学、 遺伝学的検討	-----	31
中川正法	京都府立医科大学大学院神経内科学	教授
10. Leigh 脳症に対する idebenone の治療効果についての研究	-----	33
萩野谷和裕	宮城県拓桃医療療育センター／東北大学小児科	
11. 成人ミトコンドリア病の患者支援を考える	-----	37
－ 大阪遺伝性神経難病相談会を通じて －		
金田大太	大阪赤十字病院神経内科	副部長（研究協力者）
12. 常染色体劣性進行性外眼筋麻痺のミトコンドリア遺伝子欠失と RRM2B 遺伝子異常	----	41
佐野 輝	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 精神機能病学分野教授	
13. MRI-ASL 法による MELAS 脳卒中用発作における発作前間歇期の 脳血流の評価	-----	43
米田 誠	福井大学医学部病態制御医学内科学 2	准教授
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	47
IV. 主な刊行物・別刷	-----	55
V. ミトコンドリア病ハンドブック	-----	101
VI. 研究班員名簿	-----	143

I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

ミトコンドリア病の診断と治療に関する調査研究

研究代表者 後藤 雄一（国立精神・神経医療研究センター神経研究所）

研究要旨 ミトコンドリア病班が心筋症班から独立し、ミトコンドリア病の診断と治療に関する研究班活動を開始した。本年度は、ミトコンドリア病の診断に必要な検査体制、診断基準や重症度スケール、全国的な相談を受ける体制や情報提供の仕方について、現状把握が主体となった。ミトコンドリア病の検査の専門性から診断拠点を作ること、診断や治療に関する情報提供における「ミトコンドリア病ハンドブック」の作成などを行った。また、ピルビン酸ナトリウムの臨床試験の準備が行われた。この成果は次年度の疫学調査と患者レジストリーの開始へと着実につながるものである。

分担研究者

- (1) 飯塚高浩 北里大学医学部神経内科
- (2) 太田成男 日本医科大学大学院医学研究科
- (3) 大竹 明 埼玉医科大学小児科
- (4) 北風政史 国立循環器病研究センター病院
- (5) 古賀靖敏 久留米大学小児科
- (6) 小牧宏文 国立精神・神経医療研究センター
- (7) 作田亮一 獨協医科大学越谷病院小児科
- (8) 末岡 浩 慶應義塾大学産婦人科
- (9) 須藤 章 北海道大学医学部小児科
- (10) 田中雅嗣 東京都健康長寿医療センター研究所
- (11) 中川正法 京都府立医科大学神経内科
- (12) 中田和人 筑波大学大学院生命環境科学研究科
- (13) 萩野谷和裕 東北大学小児科
- (14) 山嵜達也 東京大学医学部耳鼻咽喉科

研究協力者

- (1) 大野耕策 鳥取大学医学部脳神経小児科
- (2) 岡崎康司 埼玉医科大学・ゲノム医学研究センター
- (3) 金田大太 大阪赤十字病院神経内科
- (4) 佐藤有希子 国立精神・神経医療研究センター
- (5) 佐野 輝 鹿児島大学医学部精神神経科
- (6) 中野和俊 東京女子医科大学病院小児科
- (7) 西野一三 国立精神・神経医療研究センター
- (8) 埜中征哉 国立精神・神経医療研究センター
- (9) 松岡太郎 市立豊中病院小児科
- (10) 村山 圭 千葉県こども病院代謝科

(11) 米田 誠 福井大学医学部内科学2

1. 目的

ミトコンドリアはすべての細胞内において、エネルギーを産生する小器官である。ミトコンドリアに異常があると、大量のエネルギーを必要とする神経・筋、循環器、代謝系、腎泌尿器系、血液系、視覚系、内分泌系、消化器系などに障害が起こる。なかでも、中枢神経や筋の症状を主体とするミトコンドリア病が代表的な疾患である。

ミトコンドリア病はこれまで「特発性心筋症」の原因疾患として難治性疾患克服研究事業（特定疾患調査研究分野）の対象疾患になっていた。しかしながら心筋症をもつ患者はミトコンドリア病の一部であり、ミトコンドリア病臨床調査研究班を組織し、本疾患患者数、合併症、現行の治療法などの実態調査を行うことが不可欠である。また、患者登録を行い、具体的な臨床研究・治験を進めることが必要である。

国内においてミトコンドリア病の患者数の厳密な実態調査は行われていない。その理由は患者が多くの診療科に分散していること、診断基準が明確ではなかったことなどが挙げられるが、そのもっとも大きな要因は確定診断に必要な病理、生化学、遺伝子検査の専門性が高いことにある。平成21年10月に

ミトコンドリア病が特定疾患に認定され、認定基準が制定された。これを機にミトコンドリア病の認知度が上がり、その診断・治療研究の推進が望まれている。また英国では、ミトコンドリア病の一部の病型で、核移植を用いた生殖補助医療の適応が本格的に試みられようとしている (Nature 465: 82-85, 2010)。そのような世界的な研究や医療の流れに遅れないような本邦での調査研究が必要である。

本研究では、ミトコンドリア病の検査手段 (病理検査、生化学検査、DNA 検査) の標準化と集約的診断体制の確立を行い、本疾患に関する情報提供手段の整備等を行い、臨床病型、重症度、合併症、主な治療の内容などの全国調査を行う。また、患者レジスターを進め、具体的な治療に関する臨床研究や治験を進めることを目的とする。

2. 方法

1) 検査の標準化

ミトコンドリア病の診断には、多臓器に渡る臨床症状の把握と3種類の検査方法 (病理検査、生化学検査、遺伝子検査) が必要で、それらの標準化と集約的な診断体制を構築する準備をした。

① 筋病理検査の標準化

国立精神・神経医療研究センターの西野、後藤を中心に標準化を行っている。骨格筋以外の罹患臓器 (心、腎、肝など) の病理所見についても検討する。

② 生化学検査の標準化

国立精神・神経医療研究センターの後藤、埼玉医科大学の大竹で標準化を行う。

③ 遺伝子検査の標準化

国立精神・神経医療研究センターの後藤を中心として、mtDNA 検査の標準化を行う。核 DNA 上の原因遺伝子について、後藤及び大竹が適切な診断手順に組みこめるようにする。

2) 診断基準、重症度スケールの作成

ミトコンドリア病には、多くの臨床病型が知られている。ミトコンドリア病をよく診ているのは小児科医と神経内科医であるが、ミトコンドリア

脳筋症に比較的好く合併する臓器症状を診ている関連診療科 (循環器科: 北風、耳鼻科: 山嵜、精神神経科: 佐野、など) の専門医が参加し、臨床的に有用な重症度スケールを作成する。

3) 情報提供体制の整備

患者・家族や本疾患を診ている医療従事者に対して、本疾患の医療情報をホームページ等で提供する。また保健所等でのセミナーも積極的に行う。全国を7つの地域に分け、それぞれの地域毎にミトコンドリア病をよく知る小児科、神経内科の専門医が担当し、医療情報の提供や実態調査の援助をする (須藤、萩野谷、作田、飯塚、米田、中川、大野、古賀)。

4) 治療に結びつく薬剤の検討

早期に臨床研究や治験に結びつく薬物に関する研究 (太田、古賀、田中)、を行い、具体的な治療に関する臨床試験を実施する。

5) ミトコンドリア病に関する生殖補助医療

ミトコンドリア病において、着床前診断を含む出生前診断や核移植治療についての情報収集や研究を行う (中田、末岡)。

3. 結果と考察

1) 検査の標準化

ミトコンドリア病の確定診断には、病理検査、生化学検査、遺伝子検査を行い、総合的な評価が必要である。

① 病理検査

骨格筋の病理検査は国立精神・神経医療研究センター (以下 NCNP) が中心となって実施しており、今後も継続していく。また各臓器の病理検査については各医療機関で実施できている。

② 生化学検査

検体は線維芽細胞もしくは各臓器を用いている。今後、全国から検体を受け付けていきたいと考えており、検体数が増加しても対応できる体制が整備されている。<大竹、村山>

心筋生検検体での活性測定にも取り組んでいきたいと考えている。これについては心筋症研究班に正式にアナウンスすることとする。ただし検査に際し

ではプラクティカルな問題がある。心筋検体は骨格筋検体に比べて小さく、限られた情報しか得られないことがあるため、可能であれば骨格筋の使用も併用する。循環器科では骨格筋生検ができない施設や、心筋凍結に対応できない施設があるため、検査可能な施設を紹介するような手順を整備する必要がある。また手技的な啓発も必要である。〈北風〉

班員の先生には、各地域の担当として、各医療機関からの問い合わせを受けたり、拠点病院として検査を実施したりする役割をお願いすることとした。

③ 遺伝子検査

(拠点形成、検査会社の関与、集約化について)

核 DNA 上の責任遺伝子が次々と同定されてきている。代表的な変異については検査会社で実施しているものがあるが、集約した方がよいのか、検査会社にある程度任せの方がよいのか、検討が必要である。

本疾患は、遺伝型と表現型が一對一に対応しない、一部の検査をして変異が同定されない場合には有用な情報が得られない、という特徴があるため、可能であれば集約した方が望ましい。

ミトコンドリア DNA の全周シーケンスを行える施設として NCNP などのいくつかの施設、検査会社があるが、その役割分担を費用の面を含めて検討し、検査依頼に際しての基準、検査体制の整備、啓発が必要である。

また分担研究者の大竹らは、埼玉医科大学を中心に、千葉こども病院、自治医科大学と協力して、特に乳児期発症の重症ミトコンドリア病に関して、酵素診断と遺伝子検査を駆使した系統的病院検索システムの構築をした。

尚、診断結果の不確実性を考慮し、患者に正しく説明することが重要である。そのためには担当医が正しい知識をもっている必要があり、後述の広報活動や情報提供が重要である。

2) 診断基準、重症度スケールの作成

2009年に制定した「ミトコンドリア病の認定基準」には、症状としての糖尿病と難聴の項目を入れていない。その理由は、この2つの臨床症状をもつ患者

は優に5万人を超える可能性があり、稀少疾患の定義から逸脱する可能性が高いからであった。

一方で、糖尿病の管理は難しいので、糖尿病単独の患者が認定されないというのは問題ではないかという意見もある。ミトコンドリア異常による糖尿病患者数を over estimate している可能性も指摘された。その改善策として、糖尿病を症状の一項目に入れて重症度で線引きをするという方法もある。しかし、特定疾患の条件には、有効な治療法がないという項目もあるのでインシュリンという有効な治療法がある糖尿病を認定条件に単純に含めるのは難しい点もある。

認定基準とは別に、ミトコンドリア病の日本版診断基準を定めることが今後の臨床研究や患者レジストリーを行うために必要である。その方策として、現在の認定基準をもとに糖尿病や難聴などの不足項目を追加する方法で診断基準を策定することとする。ただし、一部の症状については、重症度を加味した基準にすることが必要になる。

診断基準と平行して、重症度スケールが必要である。すでに、2008年の厚生労働科学研究費(古賀靖班長)において作成されたもの、国際的に用いられている、Newcastle Rating Scale (0-2歳、2-11歳、12-18歳、成人)が存在する。これらにはミトコンドリア病で比較的好く見られる精神症状については触れられていないので、研究協力者の鹿児島大学精神神経科の佐野先生と相談して重症度スケールに精神症状の項目を加えていくこととする。また、MRIなどの画像所見も重要である。現在、NCNP脳画像イメージセンター(IBIC)において、ミトコンドリア病の画像収集が始まっており、その成果を踏まえて重症度スケールに含められるかどうか検討する。

3) 情報提供体制の整備

難病情報センターHPにアップする情報を更新する。その情報を送付した。

医師が患者への説明を行う際に使用する「ミトコンドリア病ハンドブック」を作成した(本研究報告書に資料として掲載)。冊子体を作成するとともに、

難病情報センターHP からダウンロードできるようにする。

ミトコンドリア病の患者を診ている医師でも、他の診療科に関する情報（たとえば人工内耳についての相談先など）は少ない。また地域差もあるため、特定の地域での情報を求められても答えられない場合がある。その意味でも保健所の活用が望ましい。具体的には、患者の診察や相談を受け入れられる医師の名簿を保健所に配布しておき、必要な人には保健所から紹介していただくという方式にすべきである。ただし、最終的な受け皿としての役割はNCNPが受けるのがよいという意見が大多数であった。

4) 治療に結びつく薬剤の検討

分担研究者の太田らが還元剤として水素をミトコンドリア病の治療に用いようとする研究や、分担研究者の田中、古賀らがピルビン酸ナトリウムを治療に用いようとする研究がある。これらの新たな薬剤の効果判定や保険認定を受けるためには、通常の臨床試験に沿った道筋で行うこととした。まずはピルビン酸ナトリウムを重点的に進めることとした。

また、海外で行われている臨床試験に遅れをとらないように世界的なミトコンドリア病治療のコンソーシアムに参加した<古賀>。

5) ミトコンドリア病に関する生殖補助医療

ミトコンドリア病の臨床のなかで、生殖補助医療をどのように応用するかも重要な課題の1つである。英国では核移植の是非が問われており、ひとたび英国でこの方法が認可された場合には、技術的に優れた我が国の医師や技師によって水面下で行われる危険がある。その意味でも、この核移植治療の適切な評価と社会的な啓発活動が本研究班にとっても重要であると認識している。

4. 結論

今年度は、ミトコンドリア病班として研究班が設立された最初の1年であった。現在の、ミトコンドリア病に関する、診断、治療、予防などに関する現

状把握が大半の成果であった。全国レベルの診断体制の整備、診断基準や重症度スケールの作成などを次年度の早期に終了し、患者レジストリーと具体的な臨床試験の実施などを進めて行くことが本研究班の課題である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表（研究代表者）

論文発表

1) 後藤雄一. MELAS 症候群. 症候群ハンドブック (井村裕夫総編集)、中山書店、東京、pp73-74、2011

2) 後藤雄一. ミトコンドリア病. 小児科診療ガイドライン (五十嵐隆編集)、総合医学社、東京、pp250-251、2011

3) 後藤雄一. ミトコンドリア病. 標準神経学 (水野美邦監修)、医学書院、東京、pp46-52、2012

学会発表

1) 後藤雄一. 精神遅滞の遺伝学的研究の現状と課題. 第53回日本小児神経学会 モーニングセミナー3, 横浜. 5.27、2011

2) 白幡恵美、伊東愛子、清和ちづる、加藤光広、後藤雄一、早坂清. ミトコンドリア DNAG14459A 変異を有する Leigh 脳症の 2 家系 3 症例の臨床像. 第53回日本小児神経学会, 横浜. 5.26、2011

3) 後藤雄一. ミトコンドリア病. 第2回遺伝カウンセリング研究会、相模原、7.17、2011

4) 後藤雄一. ミトコンドリア病の基礎と臨床. 第114回日本小児科学会、東京、8.13、2011

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

ミトコンドリア脳筋症における脳障害機序に関する研究

分担研究者 飯塚高浩 北里大学医学部神経内科学講師

研究要旨 MELAS 患者 8 例にみられた計 30 回の脳卒中様発作を検討した結果、脳卒中様発作は、neuron の興奮性の亢進、局所脳血流増加、脳表血管拡張、嫌氣的解糖亢進、血管性浮腫、neuron の脆弱性を特徴とするてんかん重積発作に類似した病態であることが明らかになった。

A. 研究目的

MELAS における脳卒中様発作(SE)の発症機序と急性期の病態を明らかにする。

謝(嫌氣的解糖)は亢進しているという両者の協調関係が崩れた状態 (neuron-astrocyte uncoupling)が生じていると推測する。

B. 研究方法

北里大学神経内科に SE を繰り返し入院した MELAS 患者 8 例を対象に、発作急性期の臨床データを詳細に検討した。

E. 結論

SE 急性期にはシナプス活動は亢進し、astrocyte も活性化し、主病巣の局所脳血流も増加し、脳表血管も拡張する。頭痛やてんかん発作はこれらを反映した神経症候と考えられる。局所のエネルギー需要の急速な増大に見合った ATP が、MELAS では十分に産生されないため、エネルギー不均衡状態が惹起され、てんかん活動の持続とともに周辺皮質に代謝障害が進展していくのが SE と推測する。しかし、SE の発症機序は不明である。

(倫理面への配慮)

本研究は、通常の診療範囲内で得られた検査記録を利用する観察研究である。各検査は文書で同意取得後に実施し、臨床情報は臨床研究で使用することも同意を得ている。

C. 研究結果

SE 急性期には、局所脳血流増加、血管拡張、焦点性周期性放電を高率に伴い、血管支配域を超えて浮腫性病巣が周辺皮質に進展していた。亜急性期には層状皮質壊死を伴っていた。

F. 研究発表

1. 論文発表
 2. 学会発表
- 1) Iizuka T. et al.: Pathophysiology of stroke-like episodes in MELAS: A possible role of neuron-astrocyte uncoupling in cellular damage during synaptic activation under primary oxidative phosphorylation defect. 2012年4月23日第64回米国アカデミー総会で発表 (Neurology. 2012. abstr)

D. 考察

SE は、虚血性障害では説明困難な現象である。何らかの要因によりシナプス制御機構が破綻し、neuron の興奮性が亢進する。酸化的磷酸化障害に加え、エネルギー需要の増大が脳障害の主な病態と推測する。SE 急性期には、neuron の酸素代謝(酸化的磷酸化)は低下しているが、astrocyte の糖代

F. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
 分担研究報告書

水素を発生する新素材投与の安全性と効果

研究分担者 太田 成男 日本医科大学大学院教授

研究要旨 水素分子(H₂)は、生体内で抗酸化作用・抗炎症作用を示す。予備的な臨床試験では、H₂を水に溶かした水素水がミトコンドリア病の病態を改善した。H₂を水素吸蔵マグネシウム(MgH₂)を経口投与する方法が患者の負担なく H₂を摂取できる。そこで、マウスを用いて、MgH₂の経口投与による H₂の発生、水素水の経口摂取と比較して MgH₂ 経口摂取の効果、および体内の動態を調べた。さらに、MgH₂の毒性試験と催奇形成試験による安全性の確認をした。MgH₂は、安全で効果的であったので、将来的にミトコンドリア病の改善に有効であることが推察された。

A. 研究目的

水素分子(H₂)に生体内抗酸化作用があることを2007年に私たちが発表して以来、水素に関する医学論文は200報にも及ぶ。これらの発表には、水素による抗酸化作用だけでなく、抗炎症作用、抗アレルギー作用、脂質代謝亢進作用など多種多様な効果が含まれる。また、動物実験だけでなく、次第に臨床試験の研究が増え、その効果が報告されている。

すでに、名古屋大学らの大野欽司教授らのグループによる臨床試験により、ミトコンドリア病に対する水素水の効果が報告されている。UMINに登録されている臨床試験だけでも、筑波大学（軽度認知症＝水素水の飲用投与）、順天堂大学（パーキンソン病＝水素水の飲用投与）、防衛医科大学（脳梗塞＝水素点滴液の点滴）、慶応義塾大学（心筋梗塞＝水素ガスの吸引）などが進行中である。

水素を投与するには、水素水の飲用投与、水素点滴液の点滴または腹腔注射、水素ガスの吸引などがあるが、いずれにも欠点がある。水素水を飲むことは比較的簡便ではあるが、患者に1リットルもの水を飲ませるのは、苦痛を与えることになる。

分担研究者らは、最も簡便で有効な水素の摂取

法を開発することを目的として、水素吸蔵マグネシウムに注目した。水素吸蔵マグネシウム(MgH₂)は水と穏やかに反応して、水素を発生する。そのため、水素吸蔵マグネシウムを経口摂取することによって、負担が少なく大量の水素を摂取可能にする。

ここでは、MgH₂の安全性と MgH₂の効果について報告する。

B. 研究方法

MgH₂の投与方法

安全性を確認するために、MgH₂のマウスへの経口投与による安全性、効果と適量を調べた。MgH₂をグリセロールに懸濁して、経口カテーテルにより投与した。

MgH₂投与の効果

水素水は II 型糖尿病モデルマウス db/db マウスの血中の中性脂肪を低下させることが明らかになっているので、MgH₂を dbd/db マウスに投与した。MgH₂を7日投与した後、血中の中性脂肪を測定した。

血中の水素濃度の測定

MgH₂を経口投与した後、一定時間毎に採血し、血中の水素を気相に移動させ、ガスクロマトグラ

フィーにて測定した。

毒性試験

マウスに連続 14 日間あるいは 28 日間、水素水の摂取 600 倍を経口投与し、体重、活動度、立毛・起毛、下痢、失神、痙攣などの観察、生化学検査、臓器萎縮、組織染色により、MgH₂ 過剰投与の結果を観察した。

催奇形性試験

妊娠マウスに前項のように MgH₂ を過剰投与し、母マウス、胎仔、出生仔を観察した。

C. 研究結果

MgH₂ 投与により、水素水自由摂取よりも中性脂肪が低下し、同じ効果が認められた。

MgH₂ を経口投与することによって、水素が発生し肝臓と血液に検出された。

水素水の 600 倍の量を長期投与しても異常は検出されなかった。

妊娠マウスに水素水の 600 倍の量を長期投与しても生まれた仔に異常は検出されなかった。

D. 考察

MgH₂ を経口投与することによって、水素水を飲ませた時よりも効果的であり、過剰投与の毒性も認められなかった。以上のことより、水素を摂取するためには、MgH₂ を経口投与することが有効であると考えられた。

E. 結論

ミトコンドリア病の病態改善に MgH₂ の経口投与の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sakurazawa, M., Katsura, K., Saito, M.,

Asoh, S., Ohta, S., Katayama, Y.: Mild hypothermia enhanced the protective effect of protein therapy with transductive anti-death FNK protein using a rat focal transient cerebral ischemia model. *Brain Res.* 2012;1430:86-92.

2) Kashio, A., Sakamoto, T., Kakigi, A., Suzuki, M., Suzukawa, K., Kondo, K., Sato, Y., Asoh, S., Ohta, S., Yamasoba, T.: Topical application of the antiapoptotic TAT-FNK protein prevents aminoglycoside-induced ototoxicity. *Gene Ther.* 2011 Dec 22. [Epub ahead of print].

3) Kamimura, N., Nishimaki, K., Ohsawa, I., Ohta, S.: Molecular Hydrogen Improves Obesity and Diabetes by Inducing Hepatic FGF21 and Stimulating Energy Metabolism in db/db Mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(7):1396-1403.

4) Terasaki, Y., Ohsawa, I., Terasaki, M., Takahashi, M., Kunugi, S., Dedong, K., Urushiyama, H., Amenomori, S., Kaneko-Togashi, M., Kuwahara, N., Ishikawa, A., Kamimura, N., Ohta, S., Fukuda, Y.: Hydrogen Therapy Attenuates Irradiation-induced Lung Damage by Reducing Oxidative Stress. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2011;301(4):L415-L426.

5) Shinmura, K., Tamaki, K., Sano, M., Nakashima-Kamimura, N., Wolf, AM., Amo, T., Ohta, S., Katsumata, Y., Fukuda, K., Ishiwata, K., Suematsu, M., Adachi, T.: Caloric restriction primes mitochondria for ischemic stress by deacetylating specific mitochondrial proteins of the electron

transport chain. *Circ Res.* 2011;109(4): 396-406.

6) Hanaoka, T., Kamimura, N., Yokota, T., Takai, S., Ohta, S.: Molecular hydrogen protects chondrocytes from oxidative stress and indirectly alters gene expressions through reducing peroxynitrite derived from nitric oxide. *Med. Gas Res.* 2011;1(1):18.

7) Nagare T., Sakaue H., Matsumoto M., Cao Y., Inagaki K., Sakai M., Takashima Y., Nakamura K., Mori T., Okada Y., Matsuki Y., Watanabe E., Ikeda K., Taguchi R., Kamimura N, Ohta S, Hiramatsu R., Kasuga M.: Overexpression of KLF15 transcription factor in adipocytes of mice results in down-regulation of SCD1 protein expression in adipocytes and consequent enhancement of glucose-induced insulin secretion. *J Biol Chem.* 2011;286(43):37458-37469.

8) Amo T, Sato S., Saiki S., Wolf AM, Toyomizu M., Gautier CA., Shen J., Ohta, S, Hattori N.: Mitochondrial membrane potential decrease caused by loss of PINK1 is not due to proton leak, but to respiratory chain defects. *Neurobiol. Dis.* 2011;41(1):111-118.

9) Chihara, N., Amo, T., Tokunaga, A., Yuzuriha, R., Wolf, AM., Asoh, S., Suzuki, H., Uchida, E., Ohta, S.: Mitochondrial DNA alterations in colorectal cancer cell lines. *J Nihon Med. Sch.* 2011;78(1):13-21.

10) Ohta S, Nakao A, and Ohno K. The 2011 Medical Molecular Hydrogen Symposium: An Inaugural Symposium of the Journal Medical Gas Research. *Med. Gas Res.* 2011; 1(1):10.

11)Ohta S. Molecular hydrogen is a novel antioxidant to efficiently reduce oxidative stress with potential for the improvement of mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2012 ;1820(5): 586-594.

12) Ohta S.: Recent Progress Toward Hydrogen Medicine: Potential of Molecular Hydrogen for Preventive and Therapeutic Applications. *Curr. Pharm. Des.* 2011;17(22): 2241-2252

2. 学会発表

1) Shigeo Ohta : Recent development toward the hydrogen medicine:potential for preventive and therapeutic applications and possible mechanism to exhibit its benefits. 5th SFRR-Asia, 8th ASMRM, 11th J-mit, 2011 Symposium Kagoshima 2011.8.31-9.4

2) Shigeo Ohta : Recent progress toward hydrogen medicine: Potential of molecular hydrogen for preventive and therapeutic application and the improvement of mitochondrial disorders. The 5th symposium of Korean Society for mitochondrial Research and Medicine (KSMRM). Korea. 2011.6.18.

3) Shigeo Ohta: Molecular hydrogen is a novel antioxidant to efficiently reduce oxidative stress for the therapeutic and preventive potential in lifestyle-related and mitochondrial diseases. The eighth European Meeting on Mitochondrial Pathology (Euromit 8) Spain 2011.620-23.

4) 太田成男 : 活性酸素種と酸化還元状態の可視化によるリアルタイムでの観察 日本酸化ストレス連携研究会ミニシンポジウム 京都 2012.3.25.

5) 太田成男：ミトコンドリアに関する最近の TOPICS HOKKAIDO ANTI AGING CLUB 2012 北海道 2012. 3. 10

6) 太田成男：水素医学研究 update 分子状水素医学シンポジウム 東京 2012. 2. 11.

7) 太田成男：健康・老化へのミトコンドリアの関与 第 8 回日本加圧トレーニング学会 東京 2012. 1. 29.

8) 太田成男：ミトコンドリアが制御する健康・老化 第 153 回日本体力医学会関東地方会 川崎 2011. 12. 16.

9) 太田成男：ミトコンドリアに起因する酸化ストレス 第 39 回日本肝臓学会西部会 岡山 2011. 12. 10.

10) 太田成男：基礎データに基づくミトコンドリアとアンチエイジング医学 日本抗加齢医学会講習会 東京 2011. 11. 27.

11) 太田成男：ミトコンドリアと酸化ストレス 第 23 回分子糖尿病シンポジウム 熊本 2011. 11. 26.

12) 太田成男：ミトコンドリアと老化 日本抗加齢医学会エデュケーショナルセミナー 東京 2011. 10. 4.

13) 太田成男：水素医学の進展：酸化ストレス軽減によるアポトーシス抑制のメカニズム 第 20 回日本 Cell Death 学会シンポジウム 東京 2011. 7. 30.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 特許名称:細胞死抑制活性強化タンパク質 FNK を用いた脱毛の防止

特許番号: 4686780

特許登録日: 平成 23 年 2 月 25 日

発明人: 太田成男、上村尚美、麻生定光

出願番号: 2005-071501

出願日: 平成 17 年 3 月 14 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

ミトコンドリア呼吸鎖異常症の酵素診断から遺伝子解析に至る
系統的病因探索システムの構築に関する研究

研究分担者 大竹 明 埼玉医科大学医学部 小児科 教授
研究協力者 岡崎康司 埼玉医科大学ゲノム医学研究センター所長 教授
村山 圭 千葉県こども病院代謝科 医長
森 雅人 自治医科大学小児科 講師

研究要旨

平成 24 年 3 月末現在、全国の患者さん・臨床医のご協力で合計 675 家系 690 症例から 1081 検体（皮膚線維芽細胞 513 検体、肝臓 239 検体、筋肉 208 検体、心臓 84 検体、腎臓 25 検体、脳 7 検体など）の提供を頂いた。現在までのところ 645 家系 660 名において Blue Native 電気泳動を用いた Western Blot と *in gel* enzyme stain、および *in vitro* 酵素アッセイを用いた蛋白レベルの解析が終了し 228 家系 232 名をミトコンドリア呼吸鎖異常症と診断した（診断率 232/690=33.6%）。その内訳は、単独酵素異常症 146 例（特に呼吸鎖 I 異常症が 104 例）、複合型酵素異常症 82 例等である。診断のついた症例の一部について新世代シーケンス法を用いた病因となる核遺伝子異常の解析が終了し、5 症例で既知遺伝子（*SURF1*、*NDUFA10*、*ACAD9*、*ABCB7*、*RARS2*）内の新規変異を、5 症例で新規候補遺伝子の遺伝子異常を同定できている。Blue Native 電気泳動と *in vitro* 酵素アッセイの組み合わせはミトコンドリア病の診断に大変有用であり、新世代シーケンス法も非常に有効な病因遺伝子解析法となることが証明された。

A. 研究目的

ミトコンドリア呼吸鎖異常症(MRCD)は最も高頻度(1/5,000)なエネルギー産生系の先天代謝異常症であり、症状・罹患臓器・遺伝形式は極めて多岐にわたる。今回私達は日本全国から依頼された症例を対象とし、酵素診断に始まりミトコンドリア遺伝子解析、新世代シーケンス法を用いたエキソーム解析に至る系統的病因探索システムを構築したので、本システムを用いた現在までの解析結果を報告する。

B. 研究対象と方法

【対象】675 家系 690 症例から得た 1081 検体（皮膚線維芽細胞 513 検体、肝臓 239 検体、筋肉 208

検体、心臓 84 検体、腎臓 25 検体、脳 7 検体など）を対象とした。

【方法】1) *in vitro* 酵素アッセイおよび Blue Native 電気泳動(BN-PAGE)を用いた Western Blot を用いた呼吸鎖酵素複合体蛋白レベルの解析。2) サンガーシーケンス法によるミトコンドリア DNA 全周塩基配列の解析。3) ミトコンドリア DNA 枯渇症候群 (mitochondrial DNA depletion syndrome: MDS) 疑い例については、qPCR による MDS の診断確定後、サンガーシーケンス法による頻度の高い 11 種類の原因遺伝子解析。4) 以上で病因が判明しない症例に対する新世代シーケンス法を用いたエキソーム解析。

(倫理面への配慮)

以上の研究は埼玉医科大学倫理審査委員会の承認(第482-IV号)を得て行った。遺伝子解析研究についてはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)および、医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン(日本医学会2011年2月)に基づいて行った。

C. 研究結果

1) 酵素診断の結果: 現在までのところ、645家系660症例に対する蛋白レベルの解析

が終了し、228家系232名をMRCDと診断した(診断率232/690=33.6%)。臨床診断では乳児ミトコンドリア病が最も多く、次いでLeigh症候群、ミトコンドリア脳筋症、症、心筋症、原因不明神経変性疾患の順であり、肝臓、心臓などの単独臓器異常からも数多くのミトコンドリア病を診断できた。酵素診断ではComplex I欠損症が最も多く、次いで複数の呼吸鎖複合体欠損症、Complex IV欠損症、Complex III欠損症の順であり、Complex II欠損症は一例も診断できていない。

2) ミトコンドリア遺伝子解析: 119例について解析を行い、既知・未知を合わせて病因と考えられる遺伝子変異を34例に同定した。MDSは核遺伝子異常と考えられるので、これも分母に加えると、MRCDにおいてミトコンドリア遺伝子異常が病因となる率は24%(34/140)と考えられた。3) 21家系23症例をMDSと確定し、このうち4家系6症例で既知11遺伝子(4遺伝子、重複ありMPV17, POLG, DGUOK, SUCLG1)における変異を特定した。4) 22検体についてエキソーム解析が終了した。うち5検体について、既知の原因遺伝子として報告がなくミトコンドリア局在タンパク質をコードしている遺伝子に劣性遺伝形式での変異が、別の5検体で既知の原因遺伝子(SURF1, NDUFA10, ACAD9, ABCB7, RARS2)における新規変異が同定された。

D. 考察

ミトコンドリア病は最も頻度の高いエネルギー産生系の先天代謝異常症であるが、従来は迅速かつ正確な診断法がなかった。今回の検討で、*in vitro*酵素アッセイとBN-PAGEを用いた蛋白レベルの迅速診断に引き続く新世代シーケンス法を用いた病因核遺伝子の解析方法が非常に有効な診断法であることが確認できた。今後他施設とも共同し、日本の伝統である組織診断等も組み合わせたミトコンドリア病の診断システムの完成を目指す。

E. 結論

*in vitro*酵素アッセイとBN-PAGEを組み合わせた蛋白レベルの迅速診断とそれに引き続く新世代シーケンス法を用いた病因核遺伝子の解析が、ミトコンドリア病の診断と病因解明に極めて有効であることが証明できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sakamoto O, Ohura T, Murayama K, Ohtake A, Harashima H, Abukawa D, Takeyama J, Haginoya K, Miyabayashi S, Kure S: Neonatal lactic acidosis with methylmalonic aciduria by novel mutations in the SUCLG1 gene. *Pediatr Int* 53(6): 921-925, 2011

2) Niihori T, Aoki Y, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Kawame H, Inazawa J, Ohura T, Arai H, Nabatame S, Kikuchi K, Kuroki Y, Miura M, Tanaka T, Ohtake A, Omori I, Ihara K, Mabe H, Watanabe K, Niijima S, Okano E, Numabe H, Matsubara Y: HRAS mutants identified in Costello syndrome patients can induce cellular senescence: possible implications for the

pathogenesis of Costello syndrome. *J Hum Genet*, 56(10): 707-15, 2011.

3) Akamizu T, Sakura N, Shigematsu Y, Tajima G, Ohtake A, Hosoda H, Iwakura S, Ariyasu H, Kangawa K: Analysis of plasma ghrelin in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency and glutaric aciduria type II. *Eur J Endocrinol* 166(2): 235-240, 2012

4) 菅沼広樹、鈴木光幸、吉川尚美、原 聡、染谷朋之介、李 翼、久田 研、東海林宏道、村山圭、高柳正樹、大竹 明、清水俊明：劇症肝不全として発症したミトコンドリア DNA 枯渇症候群の新生児例. *日本小児科学会雑誌* 115: 1067-1072, 2011

5) Tanigawa J, Kaneko K, Honda M, Harashima H, Murayama K, Wada T, Takano K, Iai M, Yamashita S, Shimbo H, Aida N, Ohtake A, Osaka H: Two Japanese patients with Leigh syndrome caused by novel SURF1 mutations. *Brain Dev* 2012 Mar 10. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1) 大竹 明：教育講演 何か迷うミトコンドリア病. 第7回日本先天代謝異常学会セミナー 7月23日～24日(横浜市・パシフィコ横浜), 2011

2) 大竹 明：救急医療の現場における先天性代謝異常症の診断と治療. 第114回日本小児科学会学術集会 教育講演11 8月12-14日 グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール(東京都港区), 2011

3) Ohtake A, Murayama K, Mori M, Okazaki Y: Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: the use

of next generation sequencing technology. The 5th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia), the 8th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM) and the 11th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-mit). Invited lecture. August 31 - September 4, Kagoshima Citizen's Culture Hall (Kagoshima, Japan), 2011.

4) 大竹 明：ミトコンドリア病の新しい展開—組織特異性と核遺伝子異常ミトコンドリア病—. 日本小児科学会沖縄地方会第73回例会 特別講演 9月11日 沖縄県医師会館(沖縄県南風原町), 2011

5) 大竹 明：小児内分泌医が知っておくべき先天代謝異常症の基礎知識. 第45回日本小児内分泌学会学術集会 教育セミナー1 10月6-8日 大宮ソニックシティ(さいたま市), 2011

6) 大竹 明：シンポジウム2: ミトコンドリア病 Up to Date—ミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症 (MRCO) としての理解—. 企画意図の提示と座長 第53回日本先天代謝異常学会 11月24-26日 ホテルニューオータニ幕張(千葉市), 2011

7) Ohtake A, Murayama K, Mori M, Ichimoto K, Takayanagi M: Tissue specificity of mitochondrial respiratory chain disorders with neurological symptoms. 第53回日本小児神経学会総会 5月26-28日 パシフィコ横浜(横浜市), 2011

8) Kawachi E, Murayama K, Fushimi T, Ichimoto K, Tsuruoka T, Fujinami A, Ajima M, Harashima H, Okazaki Y, Takayanagi M, Mori M, Ohtake A: Tissue-specificity of respiratory chain

disorders in Japanese experience. SSIEM (Society for the Study Group of Inborn Errors of Metabolism) Annual Symposium 2011 August 30 - September 2 (Geneva, Switzerland), 2011

9) Sanayama Y, Nagasaka H, Takayanagi M, Ohura T, Sakamoto O, Ito T, Ishige-Wada M, Usui Y, Yoshino M, Ohtake A, Yorifuji T, Tsukahara H, Hirayama S, Miida T, Fukui M, Okano Y:
Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria. SSIEM (Society for the Study Group of Inborn Errors of Metabolism) Annual Symposium 2011 August 30 - September 2, (Geneva, Switzerland), 2011

10) Okazaki Y, Kohda M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Mori M, Murayama K, Ohtake A: Systematic search for mutations in mitochondrial respiratory chain disorders and functional analysis focusing on neural cells. The 5th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia), the 8th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM) and the 11th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-mit). August 31 - September 4, Kagoshima Citizen's Culture Hall (Kagoshima, Japan), 2011.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
 分担研究報告書

ミトコンドリア病の病態に關与する ATP 代謝調節因子の検索

分担研究者 北風政史 国立循環器病研究センター 部長

研究要旨 研究分担者は、脳死心臓移植を我が国で最も多く行う施設に所属し、重症心不全の病態解明、治療への応用を目的として研究を行っている。臓器の中で最もミトコンドリアが多く存在する心臓においては、ミトコンドリア病の病態が心機能不全として特異的に表れることが知られている。しかし、ミトコンドリア機能の心不全における具体的な重要性についてはまだほとんど解明されていない。本研究では心臓におけるミトコンドリア機能の解析を中心に、病態特異的に変化する新しい遺伝子の機能解析を行い、ミトコンドリア機能が関与する心疾患およびミトコンドリア病の病態解明、治療への応用めざす。

A. 研究目的

ミトコンドリア病は主にミトコンドリアを構成するタンパク質、特に酸化リン酸化にかかわるタンパク質の異常によって発症することが知られている。酸化リン酸化を担うタンパク質群は数十からなる複合体を形成しており、酸素を消費して体内で消費される大部分の ATP を産生する。本研究では ATP 代謝とくにその調節にかかわる分子の新たな同定をすすめることにより、ミトコンドリア病を含めたエネルギー代謝心疾患の病態の解明・治療への応用を図ることを目的とする。

B. 研究方法

心臓は体内で最も多くのミトコンドリアを含有する臓器であり、酸化リン酸化を担うタンパク質およびその調節蛋白質が最も多く存在する。我々はエネルギー枯渇状態に敏速に対応する調節因子を同定するため、心筋細胞を低酸素ストレスに暴露した時に一過性に誘導される因子に注目しその生化学的解析を行った。

(倫理面への配慮)

将来的には、当該因子のヒト心不全およびミトコンドリア病における遺伝子検索を行う予定であるが、現在当施設では行っていない。

C. 研究結果

培養心筋細胞を使用 1% O₂ 刺激により 2 時間で上昇し、1 2 時間で低下する遺伝子を網羅的に検索し、その中から 3 種の遺伝子を同定した。これらの蛋白質は従来の低酸素反応性遺伝子とことなり、その特異的な発現様式から異なるエネルギー代謝経路にかかわることが示唆された。この中から機能未知の遺伝子を選択し解析をすすめた。本遺伝子産物は、一回膜貫通型のタンパク質で全身に発現するが特に骨格筋、脳、脂肪組織などで強い発現がみられるとともに、ミトコンドリアでの特異的な発現も確認された。また本遺伝子産物の低酸素での顕著なタンパク質発現上昇も確認され ATP 代謝調節における役割が強く示唆された。

D. 考察

ミトコンドリア機能を動的に制御する遺伝子を機能解析し、発現を制御することができれば、エネ