

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
 分担研究報告書

次世代シーケンス法を用いたミトコンドリア呼吸鎖異常症の解析
 についての研究

研究分担者 大竹 明 埼玉医科大学小児科 教授

研究要旨 呼吸鎖酵素診断により全国からの依頼患者 314 家系 318 例をミトコンドリア呼吸鎖異常症（MRCD）と診断した。臨床診断では乳児ミトコンドリア病が最も多く 72 例、次いで Leigh 脳症、脳筋症、肝症、心筋症、神経変性疾患と続き、突然死が 28 例、その他が 15 例と極めて多岐にわたっていた。ミトコンドリア遺伝子解析では 160 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 50 例（31%）に同定した。150 例についてエキソーム解析が終了し、まず 33 例で既知の原因遺伝子における新規変異を同定した。これらの中には、いずれも日本人初例となる、BOLA3, ACAD9, EFTu 異常患者等が含まれる。次いで 13 例でミトコンドリア局在の未報告遺伝子における変異を同定した。最後に 62 例で上記に当てはまらない新規原因遺伝子候補を同定した。

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
 トランスレーショナルリサーチ部門）
 村山 圭（千葉県こども病院代謝科）

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。今回の研究は、私達の開発した、酵素診断に始まり次世代シーケンス法を用いたミトコンドリア遺伝子解析全エキソーム解析に至る系統的病因探索システムがうまく稼働するかどうかを検討することと、その結果を応用してMRCDの病態解明、さらに最終的には新薬の開発を目指すことである。

【考察】私達の開発した「酵素診断から遺伝子解析に至る系統的探索システム」は充分機能した。今後 iPS 細胞樹立を含めた機能解析方法を完成し、最終的にはこのシステムを応用して創薬に向けた検討を行いたい。（遺伝子解析部分は、主に文部科

学省「革新的細胞解析研究プログラム（セルイノベーション）補助金を用いて行われた。）

B．研究方法

【対象】941 家系 965 症例から得た 1605 検体（皮膚線維芽細胞 785 検体、肝臓 343 検体、筋肉 323 検体、心臓 108 検体、腎臓 30 検体、脳 7 検体など）

【方法】1) 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や次世代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: MTDPs) 疑い例については、定量的 PCR (qPCR) による診断確定後、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次世代シーケンス法を用いた全エキソーム解析。

（倫理面への配慮）

本研究は申請番号 482（現在更新されて 482-VI）

で埼玉医科大学倫理委員会における審査を受け承認を得て行った。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）に基づいて行い、さらにこれとは別に各研究機関の倫理審査委員会において承認を得て行った。

C．研究結果

1) 酵素診断の結果：現在までのところ、314家系318例をMRCDと診断した。臨床診断では乳児ミトコンドリア病が最も多く72例、次いでLeigh脳症、脳筋症、肝症、心筋症、神経変性疾患と続き、突然死が28例、その他が15例と極めて多岐にわたっていた。2) ミトコンドリア遺伝子解析：160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50例（31%）に同定した。つまり7割のMRCDは核遺伝子異常と考えられた。3) 150例についてエキソーム解析が終了し、まず33例で既知の原因遺伝子における新規変異を同定した。これらの中には、いずれも日本人初例となる、BOLA3, ACAD9, EFTu異常患者等が含まれる。次いで13例でミトコンドリア局在の未報告遺伝子における変異を同定した。最後に62例で上記に当てはまらない新規原因遺伝子候補を同定した。4) 5-アミノレブリン酸（5-ALA）は一部の患者細胞のATP合成能を回復し、その機序は主に呼吸鎖IIIとIVの活性回復であった。

D．考察

私達の開発した「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」はしっかりと機能した。今後iPS細胞樹立を含めた機能解析方法を完成し病態を詳しく解明すると共に、このシステムを応用して5-ALAを発端とする創薬に向けた検討も発展させたい。

E．結論

私達の開発した「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」はしっかりと機能した。今後iPS細胞樹立を含めた機能解析方法を完成し病態を詳しく解明すると共に、このシステムを応用して5-ALAを発端とする創薬に向けた検討も発展させたい。（遺伝子解析部分は、主に文部科学省「革新的細胞解析研究プログラム（セルイノベーション）補助金を用いて行われた。）

F．健康危険情報

特になし。

G．研究発表

1．論文発表

原著

- 1) Yamazaki T, Murayama K, Compton AG, Sugiana C, Harashima H, Amemiya S, Ajima M, Tsuruoka T, Fujinami A, Kawachi E, Kurashige Y, Matsushita K, Wakiguchi H, Mori M, Iwasa H, Okazaki Y, Thorburn DR, Ohtake A: Molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: Focusing on mitochondrial DNA depletion syndrome. *Pediatr Int* 56 (2): 180-187, 2014.
- 2) Ohtake A, Murayama, K, Mori M, Harashima H, Yamazaki T, Tamaru S, Yamashita I, Kishita Y, Kohda M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Okazaki Y: Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders: exome sequencing for disease gene identification. *Biochim Biophys Acta (General Subjects on Special Issue: Frontiers of Mitochondria.)*1840(4): 1355-1359, 2014.
- 3) Enkai S, Koinuma S, Ito R, Igaki J, Hasegawa Y, Murayama K, Ohtake A: Case of an infant with hepatic cirrhosis caused by mitochondrial respiratory chain disorder. *Pediatr Int* 55 (4): e103-6, 2013.
- 4) Kondo H, Tanda K, Tabata C, Hayashi K, Kihara M, Kizaki Z, Taniguchi-Ikeda M, Mori M, Murayama

K, Ohtake A: Leigh syndrome with Fukuyama congenital muscular dystrophy: A case report. *Brain Dev*, 2013 Oct 7. doi:pii: S0387-7604 (13) 00286-6. 10.1016/j.braindev.2013.09.005. [Epub ahead of print]

2 . 学会発表

(国際学会のみ)

1) Ohtake A: Diagnosis and treatment for mitochondrial disorders: an update. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD)/the 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). Educational lecture-7. November 27-29. Tokyo Bay Maihama Hotel Club Resort (Chiba, Japan), 2013

2) Ohtake A, Murayama K, Mori M, Okazaki Y: Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: exome sequencing for the disease gene identification. International Symposium on Mitochondria 2013/The 13th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-mit). Symposium 3: Next Generation Technologies for

Mitochondrial Disorders. November 6-7. Roppongi Academyhills 49 (Roppongi Hills Mori Tower 49F, Tokyo, Japan), 2013

3) Ohtake A: Diagnosis and treatment for mitochondrial disorders: an update. The 1st International ALA and Porphyrin Symposium (IAPS1). Invited lecture-2. October 28. King Hamad University Hospital (Kingdom of Bahrain), 2013

4) Ohtake A, Murayama K, Mori M, Harashima H, Yamazaki T, Tamaru S, Yamashita I, Kishita Y, Kohda M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Okazaki Y: Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: exome sequencing for disease gene identification. The 12th Annual Asian and Oceanian Myology Center (AOMC) Scientific Meeting. Invited lecture. June 6 - 8, Sofitel Xi ' an on Renmin Square (Xi ' an, China), 2013

H . 知的財産権の出願・登録状況
特になし。