

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

ミトコンドリア病に合併する高乳酸血症に対するピルビン酸ナトリウム治療法の開発研究  
試薬からの希少疾病治療薬開発の試み

研究代表者 古賀 靖敏 久留米大学医学部小児科 教授

研究要旨

高乳酸血症は、種々の難治性神経・代謝疾患で観察される重要な病態であるが、この治療薬は今だ世界に存在せず、その病態を踏まえた新しい治療薬の開発が熱望されている。ピルビン酸ナトリウム（PA）治療（Mitochondrion 2007;7:399-403）は、ミトコンドリア脳筋症の細胞モデルで細胞死を防ぐ効果があり、臨床研究でもジクロロ酢酸に勝る乳酸の軽減効果と臨床的有効性がある事を報告した。現在は、工業用試薬であるが、医薬品として上市するのに必要な非臨床試験、GMP 原薬製造、および第 1、第 2/3 相試験を行い、世界初の高乳酸血症治療薬を開発する事が目的である。平成 25 年度は、PA の医薬品としての開発を進めるために、PMDA への戦略薬事相談を行った。2 回の戦略相談において、1）非臨床試験の充足性、2）GMP 原薬製造、3）Phase1 試験のプロトコールについて相談を完了した。必須の非臨床試験データパッケージについては、（株）新日本科学と委託契約を行い、現在進行中の 2 試験（ラットにおける生殖細胞系列への影響、妊娠ラットにおける安全性）を除き、すべて終了し、その安全性、毒性になんら問題は見られていない。また、PA の GMP 原薬製造は、塩野香料（株）の系列会社である塩野フィネス（株）において、GMP 準拠した生産ラインにより 3 ロットの最終 GMP 製品の製造も完了し、4 か月における安定性試験も終了。その純度、安定性になんら問題ないことが示された。最終 3 ロットは、少なくとも 12 か月の消費期限を有しており、Phase1 試験の実施になんら問題は無い。Phase1 試験のプロトコールは、1）単回投与、2）反復投与、3）食事の影響の 3 試験を行う予定である。久留米臨床薬理クリニックにおいて、Phase1 試験を実施する委託契約を行った。同施設での IRB も 2 月 17 日に承認され、平成 26 年 2 月 20 日に PMDA への試験届を提出した。Phase1 試験提出後のレビュー期間において、治験の細部にわたり、疑義紹介についての回答も完了し、平成 26 年 3 月 20 日から Phase1 試験を実施する予定である。また、治験保険も加入し、治験薬搬入体制も完了した。Phase1 試験は、平成 26 年夏までに終了し、秋には報告書作成予定である。平成 26 年度は、Phase1 試験実施に加えて、Phase2/3 試験の実施計画書を確定する。ミトコンドリア病の新しいバイオマーカーである GDF-15 に対する用法特許を申請中である。また、GDF-15 と FGF-21 の 2 つのバイオマーカーを使用した、感度・特異度 98%を誇るミトコンドリア病特異的診断法の特許を申請予定である。

研究分担者

- |          |                                  |            |                                  |
|----------|----------------------------------|------------|----------------------------------|
| 1. 村山 圭  | 千葉県立こども病院代謝科・主任<br>医長            | 7. 田中 雅嗣   | 東京都健康長寿医療センター<br>臨床検査科・部長        |
| 2. 齋藤 伸治 | 名古屋市立大学大学院医学研究科<br>新生児・小児医学分野・教授 | 8. 佐伯 武頼   | 熊本大学生命資源研究支援セン<br>ター疾患モデル分野・特任教授 |
| 3. 大竹 明  | 埼玉医科大学小児科・教授                     | 9. 山口 清次   | 島根大学医学部小児科・教授                    |
| 4. 藤井 克則 | 千葉大学大学院医学研究院小児<br>病態学・講師         | 10. 中田 和人  | 筑波大学生命環境系・教授                     |
| 5. 但馬 剛  | 広島大学医歯薬保健学研究院・<br>助教             | 11. 石井 亜紀子 | 筑波大学医学医療系神経<br>内科・講師             |
| 6. 藤井 達哉 | 滋賀県立小児保健医療センター<br>・病院長           |            |                                  |

A. 研究目的

高乳酸血症の病態を踏まえた治療薬は今だ世界に存在しない。ミトコンドリア病では、高乳酸血症の

程度が高度であるほど臨床的に重症で死亡率も高くなる事が示され(Neurology 2011;77:1965-1971)、高乳酸血症を治療することがミトコンドリア病の重症度を軽減できると考えられるようになった。しかし、従来、ジクロロ酢酸(DCA)が高乳酸血症に使用されていたが、その肝・腎・神経毒性が明らかになり、DCAにかわる薬剤の開発が急務となった。我々は、ミトコンドリア病での臨床研究から、PAが高乳酸血症を軽減するのみでなく、臨床的にもその重症度を軽くするという知見を得た。このような世界情勢の中で、本研究は、先天性高乳酸血症の病態を踏まえた新しい治療薬の開発を目的としており、試薬からの医薬品開発研究として、日本から世界に発信できる独創的な開発研究を実施している。

## B. 研究方法

(1) 当該研究計画に関して現在までに行った研究  
高乳酸血症に対するPA治療(Mitochondrion 2007;7:399-403)は、ミトコンドリア病の細胞モデルでも細胞死を防ぐ効果がある事が最近のメタボローム解析で証明された(Mitochondrion 2012;12:644-665)。また、臨床研究では、DCAに勝る高乳酸の軽減効果と臨床的有効性が示された(BBA 2010;1800(3):313-5, Brain & Dev 2012;34(2)87-91, BBA 2012;1820:632-636)。平成23年4月発足のミトコンドリア病の診断と治療に関する調査研究(後藤班)と連携し、MELASに対するアルギニンの医師主導試験の経験を踏まえ、医薬品開発研究に向けて、自主臨床研究として発表した。

### (2) 治験薬概要書

Phase1を実施するために、承認申請までに必須の非臨床試験データセットにつき、戦略相談における対面助言を実施した。その結果、現在進行中の2試験(ラットにおける生殖細胞系列への影響、妊娠ラットにおける安全性)を除き、すべての非臨床試験を終了し、その安全性、毒性になんら問題は見られていない事を確認した。また、現在までの治験結果を集約し、治験薬概要書(初版)として纏めた。

### (3) 非臨床試験の実施

「first in man」の医薬品を、試薬から開発するために、非臨床試験のデータセットの実施が必要である。このために、戦略薬事相談を行って、必須項目のデータセットについて、(株)新日本科学に委託し、実施した。

### (4) 第1相試験計画(治験届提出)

将来の医師主導治験での第2/3相試験を実施する事を念頭に、第1相試験を計画した。これは、戦略薬事相談により指導を経て、プロトコルを確定した。

### (5) 治験薬GMP製造・過酷試験結果

PAの製剤は、試験薬GMPにより製造され、CMOへの製造技術移転が完了するまでに原薬および最終製剤の暫定規格、規格設定のための試験方法の確立並びに安定性試験を行わねばならない。この基準をクリアするために、原薬製造メーカーである塩野フィネス(株)とGMP製造委託契約を行った。現在、第1

相試験の必須項目(原体の予備安定性試験、加速、過酷試験)を完了している。

### (6) Phase1治験の体制整備

体制整備として、Phase1治験実施専用施設である久留米臨床薬理クリニック(伊藤実院長)と委託契約を結び、Phase1治験の体制整備を行った。同時に治験保険にも加入した。

### (7) 医薬品・医療機器総合機能への戦略相談

#### 戦P86相談

平成25年7月26日に事前面談を行い、平成25年11月1日に対面助言を行った。申請までに必要な非臨床試験のデータパッケージについて主に相談を行った。指導内容に従って、必須の非臨床検査を計画し実施している。

#### 戦P103相談

平成25年11月1日に対面助言の日程調整を行い、平成26年1月27日に対面助言を行った。この相談では、Phase1試験の実施計画書について助言を頂いた。疑義照会と回答での指導の結果、実施計画書を確定した。

### (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、不利益・危険性の排除や説明と同意(インフォームド・コンセント)を十分に説明し、同意が得られた場合のみ研究を実施する。疫学調査に関しては、国が定めた「疫学研究に関する倫理指針」(平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号)、遺伝子治療臨床研究に関する指針(平成16年文部科学省・厚生労働省告示第2号)、臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)に準拠して行う。また、本研究の計画調書は、すべての協力研究施設の倫理審査会に提出し、承認を得る予定である。多施設共同研究の倫理審査会資料は、基本内容を一致させた上でそれぞれの研究参加施設の倫理委員会の承認を得る。この原案は、すでに国立精神神経医療センター、埼玉医科大学病院、久留米大学病院にてすでに承認されているが、それを基本とし、さらに修正し、新GCP準拠したものとする。また、第2相試験研究に関しては、「医薬品の臨床試験の実施の基準に対する省令」、新GCPに準拠し、患者の利益を最大限配慮しつつ、副作用に充分留意しながら、臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)に基づき、ヘルシンキ宣言や、人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除や説明と同意に関して、十分な配慮のもとに行う。また、ビルビン酸ナトリウムの非臨床試験を行うに当たっては、動物を用いた短期、長期試験その他において、国が定めた「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)及び申請者が所属する久留米大学で定めた倫理規定等を遵守し、動物愛護上の配慮に充分留意した上で行う事とする。

## C. 研究結果

(1) 当該研究計画に関して現在までに行った研究等

高乳酸血症に対するPA治療(Mitochondrion 2007;7:399-403)は、ミトコンドリア病の細胞モデルでも細胞死を防ぐ効果がある事が最近のメタボロー

ム解析で証明された (Mitochondrion 2012;12:644-665)。また、臨床研究では、DCA に勝る高乳酸の軽減効果と臨床的有効性が示された ( BBA 2010;1800 (3): 313-5, Brain & Dev 2012;34(2)87-91, BBA 2012;1820:632-636)。平成23年4月発足のミトコンドリア病の診断と治療に関する調査研究(後藤班)と連携し、MELAS に対するアルギニンの医師主導試験の経験を踏まえ、医薬品開発研究に向けて、自主臨床研究として発表した。また、本研究班として共同研究の一環で、同じIRB資料を提供し、日本国内30施設でもPAの自主臨床研究を行った。対象患者は、臨床的にほとんどの患者が Leigh脳症の病型であったが、中にはMELAS、MELAの症例もあった。投与量は0.25g/kg/dayTIDから2.0g/kg/dayTIDまで幅広いが、ほとんどの症例で0.5g/kg/dayTIDの投与量を使用していた。治療効果は、ほとんどの症例で有効であり、臨床的な改善、生活がしやすくなった、けいれんが止まったなどの報告が多かった。また、主治医の判断でほとんどの症例で有効であった。また、乳酸の低下、アラニン値の改善がみられたが、治療効果のない症例も報告された。副作用としては、用量が多くなるに従い、浮腫や下痢の有害事象が診られたが、医療的治療対象となる投薬は必要なかった。全国の自主臨床研究データを別添資料1に示す。

## (2) 治験薬概要書(初版)

非臨床試験データでの有用な情報をは、治験薬概要書(初版)として作成した(別添資料2)。現在までのデータでは、非臨床試験での毒性はほとんど診られず、対照である塩化ナトリウムの毒性がより強く診られた。PAは、元来、生体内物質であり、米国ではサプリメントとしての使用も長いため、その安全性も担保されていると考えられる。現在進行中の2試験(ラットにおける生殖細胞系列への影響、妊娠ラットにおける安全性)が終了次第、治験薬概要書を版更新予定である。

## (3) 非臨床試験の実施

「first in man」の医薬品を、試薬から開発するために、非臨床試験のデータセットの実施が必要であった。このために、戦略薬事相談を行って、必須項目のデータセットについて、(株)新日本科学に委託して、以下に示すような非臨床試験を実施した(別添資料3)。

## (4) 第1相試験実施計画書の確定

将来の医師主導治験での第2/3相試験を実施する事を念頭に、第1相試験を計画した。戦略薬事相談を重ねて、詳細な指導を経て、プロトコルを確定した。健康成人男性を対象とした第1相試験としては、単回投与試験、反復投与試験、食事の影響を評価する試験の3試験を実施する。これらの試験では、PA(原薬)を水に溶解して被験者に投与する。単回投与及び反復投与試験ではプラセボ群を設定するが、プラセボには薄い食塩水を用いる。第1相試験の投与量・投回数はいくつかの臨床研究成績に基づいて設定した(別添資料4)。

### (1) 単回投与試験

本試験は、PAを単回投与したときの安全性及び薬物動態を評価する目的で実施する。1ステップあたりの被験者数は8名(実薬群6名、プラセボ群2名)とし、ステップごとにピルビン酸Naとして0.08g/kg(ステップ1)、0.17g/kg(ステップ2)、0.33g/kg(ステップ3)を単回投与する。この投与量は、それぞれ0.25、0.5、1.0g/kg/dayという1日投与量を3分割したものである。

kg(ステップ3)を単回投与する。この投与量は、それぞれ0.25、0.5、1.0g/kg/dayという1日投与量を3分割したものである。

安全性の評価項目は有害事象、臨床検査値、血圧、駆出分画(心エコーを実施して算出)、推算糸球体濾過量(eGFR)とし、治験責任医師がこれらを実施してから、次ステップに移行する。あわせて、試験中は血漿中のピルビン酸・乳酸・アラニン・fibroblast growth factor 21(FGF-21)濃度等を測定し、第II/III相試験の投与量を設定する際の参考データとする。

### i) 投与量の設定根拠

上記の3用量のうち、これまでの臨床研究で主に使用されてきたのは、1回投与量として0.17g/kg、1日投与量として0.5g/kg/dayであり(4.6項参照)、これを本試験の中心用量とした。次に、0.33g/kg(1.0g/kg/dayを3分割したときの1回投与量)は経口投与可能な最大量として設定した。本薬はナトリウム塩であるため、この投与量を超えるとナトリウム負荷が大きくなり、長期間にわたって服用することは困難である。たとえば、体重50kgの患者に1.0g/kg/dayを投与すると、ナトリウム負荷が9.1mEq/kg/dayとなる。日本人の平均塩分摂取量は11.6g/日で、この摂取量でのナトリウム負荷は約4mEq/dayであることから、平均的な塩分摂取に加えて本薬1.0g/kg/dayを投与すると、通常のはぼ3倍のナトリウム負荷が生じることになる。

### ii) 安全性評価項目の設定根拠

これまでの臨床研究で認められたPAの主な有害事象は下痢、嘔気・嘔吐といった消化器症状である。また、水溶液に溶解する量によっては、浸透圧性の下痢が生じる可能性も考えられる。したがって、こうした消化器症状の有無を問診することによって、ピルビン酸Naの安全性を評価する。さらに、高用量を投与するとナトリウム負荷が大きくなり、血圧や腎機能、心機能に影響を及ぼす可能性が考えられる。このため、血圧・駆出分画・eGFRを測定し、有害事象の有無とこれらの測定値の変化を総合的に考慮し、次ステップに移行するかどうかを決定する。

### (2) 反復投与試験

本試験は、PAを反復投与したときの忍容性、安全性及び薬物動態を評価する目的で実施する。被験者数は実薬群6名、プラセボ群3名とし、PA(1.0g/kg/day)又はプラセボを1日3回に分けて、7日間反復投与する。なお、1.0g/kg/dayは現段階で想定する投与量であり、正式な投与量は単回投与試験成績を踏まえて決定する。

安全性の評価項目は有害事象、臨床検査値、血圧、駆出分画、eGFRとする。あわせて、試験中は血漿中ピルビン酸・乳酸・アラニン濃度、FGF-21などを測定し、第2/3相試験の投与量を設定する際の参考データとする。

### i) 投与量の設定根拠

先に記載したように、これまでの臨床研究で主に使用されてきたのは0.5g/kg/dayであり、第2相以降の臨床試験ではこれが推奨用量になると考えられる。ただし、第1相反復投与試験では忍容性評価を目的の一つとするため、単回投与試験の安全性データに問題がなければ、経口投与可能な最大量である2.0g/kg/dayを使用し、健康成人男性での忍容性を確認したい。ただし、正式な投与量は単回投与試験成績を踏まえて決定する。

### ii) 投与回数の設定根拠

1 日3 回という投与回数は、安定同位元素を用いたPAの薬物動態試験成績に基づいて設定した。この試験では<sup>13</sup>Cで標識したピルビン酸(PAとして100 mgを水50 mLに溶解して投与)を用いた結果、呼気中への排出は速やかで、絶食時投与の呼気への回収率は約20分、ブドウ糖摂取後投与の回収率は約60分でそれぞれピークに達した。本試験では投与後2時間までの回収量を測定したが、この試験成績から推定して、6時間以内には投与した薬物が体内から消失すると考えられる(治験薬概要書序文参照)。

一方、ミトコンドリア病患者のエネルギー産生を向上させる必要があるのは主に身体の活動中で、就寝中は向上させる必要性がそれほど高くない。このため、PAを1日3回投与すれば、身体活動に必要なエネルギー産生をもたらすことができると考え、第1相反復投与試験で1日3回投与の忍容性、安全性及び薬物動態を評価した後、第2/3相試験以降ではこの投与回数での有効性及び安全性を評価することとした。

(3) 薬物動態に及ぼす食事の影響を評価する試験被験者6名を対象とし、クロスオーバー法を用いて、空腹時及び食後にピルビン酸Naとして0.33 g/kgを単回投与し、薬物動態に及ぼす食事の影響を評価する。0.33 g/kgは単回投与試験の最大投与量で、空腹時と食後の生物学的利用能を比較するためには、可能な限り高用量を用いたほうがよいと判断した。ただし、これは現段階で想定している投与量であり、正式な投与量は単回及び反復投与試験成績を踏まえて決定する。

(4) 第1相試験(3試験)の治験薬の投与方法被験者には、服用直前にPA(原薬)を水に溶解して投与する。服用直前に溶解する理由は、水溶液中のPAの安定性が悪く、時間が経過すると、パラピルビン酸Naに分解するためである。また、粉末だとかさばるといった問題も生じる。たとえば、体重60 kgの被験者に0.17 g/kgのピルビン酸Naを投与する場合、投与量は10 gとなり、これを粉末として服用するのは困難である。

(5) 単回投与試験及び反復投与試験のプラセボ単回投与試験及び反復投与試験では対照としてプラセボ群を設定し、プラセボには薄い食塩水を用いる予定である。ピルビン酸Naは水に溶解することができ、高用量を投与する場合でも、50~100 mLの水に溶かせば無色透明の液体となる。このため、1回投与分の水溶液はコップに入れて被験者に提供することができ、外観が識別可能な場合でも、外側を紙で覆ったコップ(又は不透明なコップ)に水溶液を入れれば、両試験を単盲検デザインで実施することが可能である。ただし、コップの中身は被験者間で比べ合わないようにする。また、PAには特有の塩辛さがあり、同様の塩辛さをもつ不活性粉末は存在しないが、服用時の味覚を被験者間で話し合わないようすれば、薄い食塩水をプラセボとして単盲検試験を実施することは可能と考える。

(6) 単回投与試験の初回投与量単回投与試験の初回投与量は0.08 g/kgと設定した。この投与量は、これまでに実施した臨床研究成績に基づいて設定したものである。この臨床研究では、主として0.5 g/kg/dayという投与量が採用され、これを1日3回に分けて被験者に経口投与した。この場合、1回あたりの投与量は0.17 g/kgとなり、この用量は小児でも忍容可能であった。単回投与試験では、この半量である0.08 g/kgから投与を開始し

たいと考える。

参考までに、この臨床研究ではミトコンドリアDNAの変異(A3243G変異)を有するミトコンドリア病患者8名にピルビン酸Naを投与した結果、有害事象は3名に認められ、その内訳は嘔気(1名)、下痢(2名)であった。嘔気は軽度で、ピルビン酸Na開始時に発現したものの、その後は発現していない。下痢の内容は、水様便又は軽度の軟便(便性がやや柔らかくなった程度)で、いずれも投与継続中に消失した。すべての患者は現在でもPAの服薬を継続しており、重篤な有害事象や投与中止を必要とする有害事象は認められていない。

(5) 治験薬GMP製造した製剤の確保・製造工程記録一式

PAの製剤は、試験薬GMPにより製造され、CMOへの製造技術移転が完了するまでに原薬および最終製剤の暫定規格、規格設定のための試験方法の確立並びに安定性試験を行わねばならない。この基準をクリアするために、原薬製造メーカーの塩野フィネス(株)とのGMP製造委託契約を行った。現在、原体の予備安定性試験、加速、過酷試験に関し、塩野フィネス(株)、ノーベルファーマ(株)と共同し進め、6か月までの安定性に問題ないことを確認している(別添資料5)。

(6) 第1相試験実施体制の構築

体制整備として、Phase1治験実施専門施設である久留米臨床薬理クリニック(伊藤実院長)と委託契約を結び、Phase1治験の体制整備を行った。同時に治験保険にも加入した。

D. 考察

世界初の高乳酸血症治療薬を開発する目的で、試験特級品であるPAを出発点として、ステップ1の研究を行っている。上市に必要な非臨床試験のデータセットについては、すべての試験を(株)新日本科学に委託し、PMDAに相談の上で、必要十分な項目の研究が進んでおり、現在進行中の2試験(ラットにおける生殖細胞系列への影響、妊娠ラットにおける安全性)を除き、すべて終了し、その安全性、毒性になら問題は見られていない。GMP原薬の製造は、塩野フィネス(株)が製造し、純度及び安定性に関し、問題なく、Phase1試験の被験薬として準備できている。安定性についても過酷試験のデータが終了し、3ロットすべてが、Phase1試験の全期間をカバーしている。自主臨床研究として、全国の実態調査を行ったが、主な対象疾患がLeigh脳症であったが、主治医の印象はほとんどが有効という判断であった。用法用量のまとめと有害事象については、今後のPhase2/3の試験に反映する必要があり、プロトコール作成時に考慮する。Phase1試験の申請は平成26年2月20日に提出しており、疑義照会も終了している。平成26年3月20日から実施予定である。

E. 結論

平成25年度で、上市に必須の非臨床試験データパッケージをほぼ完了した。また、GMP原薬製造も終了し、その品質・過酷試験における安定性も問題なく完了した。Phase1試験のプロトコールも対面助言も終了し、平成26年2月20日に治験届けを提出、3月20日から実施している。本研究は予定のロード

マップに沿って、順調に進んでいる。

#### F. 健康危険情報

PA使用実態確認のために、全国のPA使用実態調査を行った。これは、本研究班としての共同研究の一環で、難治性で治療が待てない最重症病型であるLeigh脳症が主な治療対象である。同じIRB資料を提供し、日本国内30施設でPAの自主臨床研究を行った。対象患者は、臨床的にほとんどの患者がLeigh脳症の病型であったが、中にはMELAS、MELAの症例もあった。投与量は0.25g/kg/dayTIDから2.0g/kg/dayTIDまで幅広いが、ほとんどの症例で0.5g/kg/dayTIDの投与量を使用していた。治療効果は、ほとんどの症例で有効であり、臨床的な改善、生活がしやすくなった、けいれんが止まったなどの報告が多かった。また、主治医の判断では、ほとんどの症例で有効であった。また、乳酸の低下、アラニン値の改善がみられたが、治療効果のない症例も報告された。用量が1.0g/kg/dayTIDの高用量になると、服薬時の嘔吐や浮腫、下痢などが頻度が高く確認されるようになった。これらの有害事象は、用量を0.5g/kg/dayTIDに落とすと速やかに消失した。また、医療的治療の対象となる重篤な有害事象は無かった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

古賀靖敏. ミトコンドリア脳筋症. 今日の神経疾患治療指針第2版. 791-797. 2013.

古賀靖敏. L-アルギニン (MELAS). 引ける 先天代謝異常症 (in press)

古賀靖敏. ミトコンドリア脳筋症治療の現状と展望. 日本臨床 72巻1号. 175-184. 2013

古賀靖敏. 希少難病：ミトコンドリア病の治療が可能となる時代に巡り合って（アルギニン療法、ピルビン酸ナトリウム療法の開発）：福岡県小児科医報 第51号. 91-98. 2013

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, Thornburn DR, Ohtake A. Molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: Focusing on mitochondrial DNA depletion syndrome. *Pediatr Int*. 2013 Nov [Epub ahead of print]

Ohtake A, **Murayama K**, Mori M, Harashima H, Yamazaki T, Tamaru S, Yamashita I, Kishita Y, Kohda, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Okazaki Y: Diagnostics for disease gene identification. *Biochim Biophys Acta (General Subjects on Special Issue: Frontiers of Mitochondria.)* in press, 2014.

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. doi:pii: S0387-7604(13) [E

pub ahead of print]

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*. 2013 Aug; 55(4):e103-6.

齋藤朋子、大山牧子、川滝元良、猪谷泰史、**村山 圭**：出生直後から代謝性アシドーシス、肝機能障害をきたした新生児期発症のミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症の1例. *日未熟児新生児会誌* 2014 (26) 131-137

森 雅人、**村山 圭**、大竹 明：特集 実地臨床に役立つ先天代謝異常症の知識 1. 専門医に確定診断を依頼するポイント ミトコンドリア病. *小児科診療* 76 (1): 11-19, 2013

川内恵美、**村山 圭**、伏見拓矢、市本景子、鶴岡智子、高柳正樹、大竹 明：ミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症における消化器症状についての検討. *日本小児栄養消化器肝臓学会雑誌* 27 (2) 148 - 154, 2013

**村山 圭**：新しい子どもの病気 先天代謝異常症 ミトコンドリア異常症のビタミンカクテル、食事療法 *小児内科*, 45 : 1072 - 1074, 2013

Ueda H, et al. Combination of Miller-Dieker syndrome and VACTERL association causes extremely severe clinical presentation. *Eur J Pediatr* (in press)

Suzumori N, et al. Prenatal diagnosis of X-linked recessive Lenz microphthalmia syndrome. *J Obstet Gynaecol Res* 2013;39:1545-7.

Hamajima N, et al. Increased protein stability of CDKN1C causes a gain-of-function phenotype in patients with IMAGE syndrome. *PLoS One* 2013;8:e75137.

Yoneda Y, et al. Phenotypic spectrum of COL4A1 mutations: porencephaly to schizencephaly. *Ann Neurol* 2013;73:48-57.

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, Thornburn DR, **Ohtake A**: Molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: Focusing on mitochondrial DNA depletion syndrome. *Pediatr Int* 56 (2): in press, 2014

**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: ex

- ome sequencing for disease gene identification. *Biochim Biophys Acta (General Subjects on Special Issue: Frontiers of Mitochondria.)* 1840 (4): 1355-1359, 2014.
- 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.
- 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]
- Fujii K, Ohashi H, Hatsuse H, Uchikawa H, Miyashita T. Frameshift mutation in the *PTCH2* gene can cause nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Fam Cancer* 2013;12:611-4.
- Saito K, Kimura N, Oda N, Shimomura H, Kumada T, Miyajima T, Murayama K, Tanaka M, Fujii, T. Pyruvate therapy for mitochondrial DNA depletion syndrome. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:632-636
- Du J, Cleghorn W, Contreras L, Linton JD, Chan GC, Chertov AO, Saheki T, Govindaraju V, Sadiq M, Satrústegui J, Hurley JB. Cytosolic reducing power preserves glutamate in retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Nov 12;110(46):18501-6.
- Song YZ, Zhang ZH, Lin WX, Zhao XJ, Deng M, Ma YL, Guo L, Chen FP, Long XL, He XL, Sunada Y, Soneda S, Nakatomi A, Dateki S, Ngu LH, Kobayashi K, Saheki T. LC25A13 gene analysis in citrin deficiency: sixteen novel mutations in East Asian patients, and the mutation distribution in a large pediatric cohort in China. *PLoS One*. 2013;8(9):e74544.
- Llorente-Folch I, Rueda CB, Amigo I, del Arco A, Saheki T, Pardo B, Satrústegui J. Calcium regulation of mitochondrial respiration maintains ATP homeostasis and requires ARALAR/AGC1-malate aspartate shuttle in intact cortical neurons. *J Neurosci*. 2013;33(35):13957-71.
- Chen R, Wang XH, Fu HY, Zhang SR, Abudouxikuer K, Saheki T, Wang JS. Different regional distribution of SLC25A13 mutations in Chinese patients with neonatal intrahepatic cholestasis. *World J Gastroenterol*. 2013;19: 4545-51.
- Llorente-Folch I, Sahún I, Contreras L, Casarejos MJ, Grau JM, Saheki T, Mena MA, Satrústegui J, Dierssen M, Pardo B. AGC1-malate aspartate shuttle activity is critical for dopamine handling in the nigrostriatal pathway. *J Neurochem*. 2013;124:347-62.
- Saheki T. "Animal models of enhanced oxidative stress" (especially murine model of human citrin deficiency), Eds. Tsukahara H & Kaneko K, "Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice - Pediatric Disorders" in press
- Ihara K, Yoshino M, Hoshina T, Harada N, Kojima-Ishii K, Makimura M, Hasegawa Y, Watanabe Y, Yamaguchi S, Hara T: Coagulopathy in patients with late-onset ornithine transcarbamylase deficiency in remission state: A previously unrecognized complication. *Pediatrics* 131(1): e327-30, 2013 (January)
- Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Takayanagi M, Fukao T, Fukuda S, Yamaguchi S: Intracellular in vitro probe a cylcarnitine assay for identifying deficiencies of carnitine transporter and carnitine palmitoyltransferase-1. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405(4): 1345-1351, 2013 (February)
- Yamaguchi S, Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furuichi M, Taketani T, Fukuda S, Fukao T, Shigematsu Y: Expanded newborn mass screening with MS/MS and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in Japan. *日本マススクリーニング学会誌* 23(3): 270-276, 2013 (12月)
- 山口清次: MS解析による代謝障害の診断. *分子消化器病* 10(1): 72-78, 2013 (1月)
- 山口清次: 新生児スクリーニングの新時代 ; タンデムマス法の導入. *日本周産期・新生児医学会雑誌* 48(4): 827-829, 2013 (1月)
- 山田健治, 長谷川有紀, 吉川陽子, 高橋知男, 小林弘典, 虫本雄一, Jamiyan Purevsuren, 山口清次: 成人後に診断された有機酸・脂肪酸代謝異常症の臨床的検討. *臨床神経学* 53(3): 191-195, 2013 (3月)
- 山口清次: タンデムマスを用いた新生児マススクリーニングによる先天代謝異常症の早期診断. *小児科臨床* 66(2): 193-198, 2013 (2月)
- 高橋知男, 山田健治, 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, ジャミヤン・プレブスレン, 坂本修, 大浦敏博, 山口清次: 新生児マススクリーニングで発見された軽症型プロピオン酸血症: 有機酸とアシルカルニチンの推移. *日本マス・スクリーニング学会誌* 23(1): 49-53, 2013
- 山口清次: 小児科領域におけるタンデムマスとGC/MSの臨床応用: 最近の進歩. *臨床病理* 61(9): 817-824, 2013 (9月)

Enoki S, Shimizu A, Hayashi C, Imanishi H, Hashizume O, Mekada K, Suzuki H, Hashimoto T, Nakada K, Hayashi JI. Selection of Rodent Species Appropriate for mtDNA Transfer to Generate Transgenic Mice Expressing Mitochondrial Respiratory Defects. *Exp Anim.* 2014; 63 (1): 21-30.

Shimizu A, Mito T, Hayashi C, Ogasawara E, Kobayashi R, Negishi I, Takenaga K, Nakada K, Hayashi JI. Transgenic mice as models for primary prevention of diseases caused by mutation in the *tRNA<sup>Lys</sup>* gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111(8): 3104-9.

Takibuchi G, Imanishi H, Morimoto M, Ishikawa K, Nakada K, Toyama-Sorimachi N, Kikkawa Y, Takenaga K, Hayashi JI. Polymorphic mutations in mouse mitochondrial DNA regulate a tumor phenotype. *Mitochondrion.* 2013; pii: S1567-7249 (13) 00216-X.

Katada S, Mito T, Ogasawara E, Hayashi J, Nakada K. Mitochondrial DNA with a large-scale deletion causes two distinct mitochondrial disease phenotypes in mice. *G3 (Bethesda).* 2013 Sep 4;3(9):1545-52.

Mito T, Kikkawa Y, Shimizu A, Hashizume O, Katada S, Imanishi H, Ota A, Kato Y, Nakada K, Hayashi JI. Mitochondrial DNA mutations in mutant mice confer respiratory defects and B-cell lymphoma development. *PLoS One.* 2013; 8 (2): e55789.

## 2. 学会発表

Yatsuga S, Koga Y. Fibroblast growth factor 21: a biomarker of mitochondrial diseases is increased in congenital hyperthyroidism and Hashimoto disease between endocrine diseases. 9th Joint Meeting of Paediatric Endocrinology. 2013.9.19 (Italy)

Koga Y. The development of two therapeutic drugs for mitochondrial disorders, L-arginine for MELAS, and sodium pyruvate for lactic acidosis. The 10th Conference of the Asian Society of Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM). 2013.11.4 (Korea)

Yatsuga S, Koga Y. Follow-up study: FGF21 is a new biomarker to diagnose muscle-related mitochondrial diseases in Japanese patients. International Symposium on Mitochondrial 2013. 2013.11.7 (東京)

Koga Y, Nakamura H, MELAS study group in Japan. Open labeled phase clinical trial of L-arginine on MELAS. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD)/The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). 2013.11.29 (Chiba)

古賀靖敏、中村秀文、医師主導治験グループMELAS. MELAS脳卒中様発作急性期に対するアルギニン治療の第3相オープン試験. 第116回日本小児科学会学術集会. 2013.4.20 (広島)

古賀靖敏. MELAS脳卒中様発作急性期に対するアルギニン治療の第3相オープン試験結果. 第54回日本神経学会学術大会. 2013.5.31 (東京)

古賀靖敏. NOを介したミトコンドリア脳筋症に対する世界初の治験薬開発. 第13回日本NO学会学術集会シンポジウム. 2013.6.29 (沖縄)

古賀靖敏. 希少疾病:ミトコンドリア病の治療法開発 アルギニンおよびピルビン酸ナトリウム. 第24回日本小児神経学会中国・四国地方会 特別講演. 2013.7.20 (岡山)

Fushimi T, Murayama K et al. : Diagnosis and Molecular Bases Of Mitochondrial Respiratory Chain Disorders In Japan. 12th International Congress of Inborn Error of Metabolism, Barcelona, Spain, 3rd-6th Sep

Kawachi E, Murayama K, et al. : Gastroenterological symptoms of mitochondrial respiratory chain complex deficiency. 12th International Congress of Inborn Error of Metabolism, Barcelona, Spain, 3rd-6th Sep

Togawa T, et al. Comprehensive mutation analysis by next generation sequencing in patients with neonatal intrahepatic cholestasis. 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Boston, USA, 10/22-26/2013

Hosoki K, Saitoh S. Molecular and clinical study of 30 Angelman syndrome patients with *UBE3A* mutations. 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Boston, USA, 10/22-26/2013

Negishi Y, et al. Homoplasmy of a mitochondrial 3697G>A mutation causes Leigh syndrome. 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Boston, USA, 10/22-26/2013

青山幸平ら. Greig cephalopolysyndactyly 症候群と MODY2 を伴う隣接遺伝子症候群の1例. 第36回日本小児遺伝学会学術集会 平成25年4月18日

根岸豊ら. ミトコンドリア DNA 3697G>A ホモプラスミー変異は Leigh 脳症の原因となる. 第58回日本人類遺伝学会 平成25年11月20-23日 (仙台)

Ohtake A: Diagnosis and treatment for mitochon

drial disorders: an update. The 3<sup>rd</sup> Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD)/the 55<sup>th</sup> 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

**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 13<sup>th</sup> Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-mit). Symposium 3: Next Generation Technologies for Mitochondrial Disorders. November 6-7. Roppongi Academy hills 49 (Roppongi Hills Mori Tower 49F, Tokyo, Japan), 2013

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

**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 12<sup>th</sup> Annual Asian and Oceanian Myology Center (AOMC) Scientific Meeting. Invited lecture. June 6 - 8, Sofitel Xi'an on Renmin Square (Xi'an, China), 2013

Ikehara H, Fujii K et al. Hedgehog signaling is enhanced by nutritional deprivation in human fibroblasts of Gorlin syndrome. Keystone symposium of cilia, development, and human diseases (2014.3.2-7, CA, USA)

Fujii T, Nozaki F, Hayashi A, Kumada T, Hiejima I, Mori M, Miyajima M, Kusunoki T. Efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. International Symposium on Mitochondria 2013. Tokyo

Yasunori Fujita, Masafumi Ito, Toshio Kojima, Yasutoshi Koga, Masashi Tanaka. Identification of potential biomarkers for mitochondrial diseases by global gene expression analysis. International Symposium on Mitochondria 2013. Tokyo November 7, 2013

Tanaka, M. Metabolomic and Transcriptomic analyses of MELAS cybrids for validation of pyruvate therapy and for discovery of new biomarkers. 10<sup>th</sup> Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine. Seoul November 4, 2013

佐伯武頼：成人発症II型シトルリン血症（CTLN2）の診断、病因・病態解析と治療法の開発 - 患者さんもモデルマウスも甘いものとアルコールが苦手です - . 川崎医科大学神経カンファレンス，倉敷，1月21日，2013年 .

Saheki T.: Studies on Citrin Deficiency and Carnitine Deficiency using Animal Models. Conference on Genetic and Metabolic Disease in Fujian, Fujian China, June 8, 2013.

佐伯武頼：シトルリン欠損症における糖とアミノ酸の代謝異常相関 . JSAAS2013 日本アミノ酸学会第7回学術大会，熊本，11月2日，2013年 .

佐伯武頼，藤本侑希，古家澄江，山村研一：モデルマウスを用いるシトルリン欠損症患者の糖質忌避の機構解析 . 日本人類遺伝学会第58回大会，仙台，11月23日，2013年 .

Saheki T: Citrin Deficiency: Discovery of the causative gene, analysis of pathophysiology and its clinical aspects. 3<sup>rd</sup> ACIMD/55<sup>th</sup> JSIMD, Educational Lecture, Maihama, Japan, November 27, 2013.

Saheki T, Fujimoto Y, Yamamura K: Plasma glycerol was increased parallel to blood ammonia in citrin deficiency model in response to administration of sugars, 3<sup>rd</sup> ACIMD/55<sup>th</sup> JSIMD, Maihama, Japan, November 27, 2013.

Fujimoto Y, Yano K, Yamashita K, Rikimaru S, Inoue K, Yamamura K, Saheki T: A possible diagnostic for citrin deficiency; high plasma and urinary glycerol detected in the model, Citrin / mGPD double-KO mouse, 3<sup>rd</sup> ACIMD/55<sup>th</sup> JSIMD, Maihama, Japan, November 27, 2013.

佐伯 武頼，藤本 侑希，山村 研一，井上 加奈子，小野 裕美：モデルマウスを用いたシトルリン欠損症における糖質毒性の解析 . 第17回日本病態栄養学会年次学術集会，大阪，1月11日 - 12日，2014年 .

Yamaguchi S: GC-MS for diagnosis of Organic Acidurias. International Conference on Inborn Errors of Metabolism 2013 講演. New Delhi, India, April 2013

Yamaguchi S: Fatty acid oxidation defects. International Conference on Inborn Errors of Metabolism 2013 講演. New Delhi, India, April 2013

Yamaguchi S, Purevsuren J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furuichi M, Fukao T, Shigematsu Y, Fukuda S: Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency and newborn screening in Japan. 2013 Joint Meeting of the Newborn Screening and Genetic Testing Symposium (NBS&GTS) and the International Society for Neonatal Screening (ISNS). Atlanta, USA, May 2013

Yamaguchi S: A new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation defects: Bezafibrate, a PPAR agonist. 12th Asian Oceanian Congress on Child Neurology. Riyadh, Saudi Arabia, September 2013

Yamaguchi S: Beriberi (Vitamin B1 deficiency) of young children lurking in modern life: A new approach for biochemical detection. 2013 Joint Meeting of 13th Asian Pan-Pacific Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition and 40th Japanese Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition シンポジウム. 東京, October 2013

Hasegawa Y, Kobayashi H, Yamada K, Takahashi T, Yamaguchi S: Selective screening for organic acidemias by urinary organic acids analysis using GC/MS in Asian countries. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD), The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). Chiba, November 2013

Yamaguchi S: Organic Acidemias and emergency treatments. 1st Asia Pacific Inborn Errors of Metabolism Course 講演. Tokyo, January 2014

高橋知男, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: サリチル酸の酸化に及ぼす影響: in vitro probe assay による評価. 第38回日本医用マスペクトル学会年会. 神戸, 2013年9月

Nakada K. Reverse genetic studies on mutant mitochondrial genomes in mice. The 4<sup>th</sup> International Symposium on Dynamics of Mitochondria (Dyna mito 2013). Oct 28-Nov 1, 2013, Okinawa, Japan.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
ミトコンドリア病診断用バイオマーカーとしてのGDF-15: 特許申請日2013年10月25日  
申請番号: P13027TAN  
国際特許分類: C12N 15/09
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

