

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）
分担研究報告書

難治性ミトコンドリア病患者3例へのピルビン酸ナトリウムによる治療経験と
ミトコンドリア病に対する系統的病因探索システムについての研究

研究分担者 大竹 明 埼玉医科大学小児科 教授

研究要旨

難治性ミトコンドリア病3症例にピルビン酸ナトリウムを投与した。筋力を中心に病像改善の印象は強く、症状・検査結果に副作用と考えられるものはない。今後NPMSなど種々の臨床評価スケールによる評価を継続し、バイオマーカー等を含めた客観的評価も行っていく。

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

荒尾正人 (埼玉医科大学小児科)

A. 研究目的

前段ではピルビン酸ナトリウムを投与した難治性ミトコンドリア病3症例の経過を報告する。次いで後段ではミトコンドリア病に対する酵素診断に始まる系統的病因探索システムの構築について報告する。

B. 研究方法

【対象】ピルビン酸ナトリウムは以下の3症例に投与した。易感染性と発達遅滞を主訴に1歳前に発病した、3243A>G変異を持つMELAS/Leighオーバーラップ症候群男児、1歳前に退行で発病しG14439A (ND 6:P to S)変異を持つLeigh脳症の女児。胎児期から脳質拡大を指摘されていたPDHCE1 遺伝子に8塩基挿入変異を持つLeigh脳症の女児。

病因解析システムは、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)を対象とした。

【方法】ピルビン酸ナトリウムは病院倫理委員会の承認の下、保護者より文書での同意をいただき、0.5mg/kg/日で経口投与する。

系統的病因解析システムは以下の項目から成る。
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P

CR (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

ピルビン酸ナトリウム投与により筋力を中心に病像改善の印象は強く、症状・検査結果に副作用と考えられるものはない。今後NPMSなど種々の臨床評価スケールによる評価を継続し、バイオマーカー等を含めた客観的評価も行って行きたい。

系統的病因解析システムの結果は以下の通りである。
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。(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。)

D. 考察

難治性ミトコンドリア病3症例にピルビン酸ナトリウムを投与し、筋力を中心に病像改善の印象は強かった。また、症状・検査結果に副作用と考えられるものはない。ミトコンドリア病に対する系統的病因探索システムについては、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。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。

E. 結論

ピルビン酸ナトリウムの自主臨床研究により、その有効性が期待されるが、今後詳細な検討が必要である。ミトコンドリア病に対する系統的病因探索システムは有用であり、新規変異の同定が進み、新しい治療法の開発の端緒となると考えられる。

F. 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): in press, 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:p

ii: S0387-7604 (13) 00286-6. 10.1016/j.braidev.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

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

