

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）  
分担研究報告書

ミトコンドリア脳筋症に合併する高乳酸血症のピルビン酸ナトリウム  
による治療薬開発についての研究

研究分担者 但馬 剛 広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学 講師

研究要旨

ミトコンドリア脳筋症患者に対し、ピルビン酸ナトリウム治療の臨床研究を行っていたが、現在中断中である。治療によるメリットを実感できるような適応症例（疾患）をどう選択するかが重要となる。また、剤形・量の改善によりアドヒアランスの向上が期待できると考えられる。

研究協力者

石川 暢恒（広島大学病院小児科 助教）

A. 研究目的

ミトコンドリア病においては、現在までのところ治療根拠に基づいた有効性の認められた治療法はない。しかし、近年ピルビン酸ナトリウムの有用性が示唆されており、臨床上的使用経験の報告もみられる。本研究ではミトコンドリア病の生命予後を改善するため、ピルビン酸ナトリウムによる治療の有用性を評価・確立する。

B. 研究方法

ミトコンドリア病患者に対し、ピルビン酸ナトリウムを経口投与する。効果について、血液ガスや乳酸・ピルビン酸値などの検体を用いた検査結果および脳波、心機能などの生理検査、NMDAS/NPMDSを用いた全般改善度のスコアリングにより評価する。

（倫理面への配慮）

本試験では、世界医師会による「ヘルシンキ宣言」及び厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」（平成20年7月31日全部改正）を遵守する。本試験で用いる薬物は試薬であり、薬剤として承認されたものではない。試験に参加することに、従来の治療と同等もしくはそれ以上の治療が受けられることが期待されるが、一方で薬物の副作用による健康被害が及ぶ可能性がある。その際は研究終了後でもすみやかに適切な処置と治療をもって対応する。試験の実施に際し、担当医師は倫理審査委員会で承認の得られた同意説明文書を被験者に渡し、文書及び口頭による十分な説明を行い、被験者の自由意思による試験への参加についての同意を文書で得る。

C. 研究結果

本年度は2例（CPE0、Leigh脳症）継続中でスタートしたが、臨床症状の改善に乏しく、内服負担感が増大したため、本人・家族の申し出により中断となった。

D. 考察

CPE0、Leigh脳症ともに微細な改善効果または症状進行抑制効果はあった可能性はあるが、本人・家族の内服負担感の方が大きかった。内服し易い剤形・量であれば、アドヒアランスの改善が期待でき、症状改善に繋がる可能性はある。

E. 結論

適応症例（疾患）の選択、剤形・量の改善が望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表  
無し
2. 学会発表  
無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無し

ミトコンドリア脳筋症の臨床的研究と評価尺度の開発に関する研究

研究分担者 藤井 達哉 滋賀県立小児保健医療センター 病院長

研究要旨

〔目的〕 Newcastle Pediatric Mitochondrial Disease Scale (NPMDS)では評価が困難な、寝たきりのミトコンドリア病患者の客観的臨床評価を行う目的で、昨年度は NPMDS と Gross Motor Function Measure (GMFM)を併用して、4名の寝たきりミトコンドリア病患者に対するピルビン酸ナトリウム治療の効果判定を行った。本年度はその結果を論文発表した。ピルビン酸治療の効果の評価する適切なバイオマーカーがない点が課題として残った。今回、4名のうち長期的にピルビン酸治療が有効であった1名で、新たなバイオマーカーである FGF-21 と GDF-15 の測定を行った。〔方法〕 12ヶ月以上 0.5 - 1.0 g/kg/day のピルビン酸ナトリウムを内服した4例の寝たきりのミトコンドリア病患者を、GMFM 評価の出来なかった1例を除き、全例 NPMDS と GMFM 両者で臨床効果の評価した。そのうち1例のピルビン酸治療が有効かつ持続しているリー脳症患者の血清中の FGF-21 と GDF-15 の測定を行った。〔結果〕 4例中3例で治療開始1-3ヶ月以内に運動機能の改善を認め、そのうち1名は2年以上改善を維持できた。しかし、改善した3例中2例は治療開始3-6ヶ月後から退行が始まった。ピルビン酸治療を続行し、効果も持続しているリー脳症候群患者の血清 FGF-21 は 117.5 pg/ml (< 281.0), GDF-15 は 645.9 pg/ml (< 707.4)であった。〔結論〕 NPMDS と GMFM の併用によって、寝たきり患者に於いても客観的に治療効果の評価することが可能であった。ピルビン酸ナトリウム治療が持続的に有効であった1例の FGF-21, GDF-15 は正常範囲であった。今後治療前後のデータの動きの解析も必要である。

A. 研究目的

ピルビン酸ナトリウム治療の臨床効果の評価するため昨年度の研究で、Gross Motor Function Measure (GMFM)とNewcastle Pediatric Mitochondrial Disease Scale (NPMDS)との併用で評価し、ピルビン酸治療の有用性を4例の寝たきりのミトコンドリア病患者で検討した。今回、この結果をさらに検討して論文化すると共に、ピルビン酸治療の有効性と持続性の高かった1例で新たなバイオマーカーである FGF-21 と GDF-15 の測定を行った。

B. 研究方法

酸化リン酸化異常によるミトコンドリア病の寝たきり患者のうち、12ヶ月以上ピルビン酸治療を継続できた4例を評価した。ピルビン酸ナトリウムは 0.5 - 1.0 g/kg/day を経口ないし経管投与した。GMFM 評価の機会がなかった1例を除き、全例で NPMDS と GMFM 両者を同時評価した。GMFM は 88 の評価項目のある GMFM-88 を使用した。NPMDS は評価スケールの数値が高いほど重症、GMFM では逆に高いほど運動機能は良好である。治療開始月齢は 8 - 100ヶ月（中央値 20ヶ月）で、治療継続期間は 17 - 66ヶ月（中央値 34ヶ月）であった。ピルビン酸治療の長期効果があった例の血清 FGF-21 と GDF-15 を測定した。

〔倫理面への配慮〕

本研究は、滋賀県立小児保健医療センター倫理委員会に於いて審査され、承認を受けた。全例、ピルビン酸ナトリウム治療についての文書での説明と承諾

を得た。

C. 研究結果

4例の治療効果は前回報告書通りであるが下記に再掲する。

① 症例1 (m.8993T>G Leigh脳症)

治療開始年齢は8歳4ヶ月であるが、治療開始前は寝返りが不能で、仰臥位で両下肢を45度以上挙上できなかったが、治療開始1ヶ月で寝返り可能となり、両下肢を90度挙上、四肢の動きも素早くなった。NPMDSは全体で3.7ポイント減少(改善)した。NPMDSの評価sectionのうち保護者の主観の影響を受けないSection I - IIIの合計は2ポイント改善していた。GMFMでは総合点(%表記)が3.1増加(改善)した。10歳7ヶ月での再評価でもGMFMの総合点は変化がなく、改善した運動機能が保たれていた。

② 症例2 (m.9176T>C Leigh症候群)

生後8ヶ月でピルビン酸ナトリウム治療を開始したが、数ヶ月の観察では変化なかったが、12ヶ月投与後の1歳8ヶ月で寝返り可能となった。しかし、これが治療効果か自然な発達によるものか区別が困難であった。3歳で急性脳症となって退行。5歳3ヶ月でピルビン酸治療の再評価のため、4週間のwashout期間を設けてから再治療をした。Washoutでも悪化はなく、治療再開2ヶ月でのNPMDS, GMFMは変化がなかった。治療再開11ヶ月では、NPMDSは19.5ポイント増加し、GMFMは0.4減少し、むしろ悪化した。

③ 症例3 (複合体I + IV欠損症)

非特異的な脳筋症。治療開始は1歳8ヶ月で、この時点では寝返りは1方向のみ可能で、軽度の嚥下障害があった。治療開始2ヶ月で寝返りが両方向可能となり、嚥下障害が消失した。NPMS Section I - IIIは3ポイント減少。NPMS Section IVは9.4ポイント減少。GMFMは2.4増加した。しかし、その後ゆっくり運動機能の退行が始まり、治療開始から12ヶ月でGMFMは3.2ポイント減少した。しかしGMFMで示される運動機能は悪化したのに、痙攣、消化器症状などの改善のため、NPMSではSection IIが4ポイント減少した。NPMSの他のSectionは変化なかった。

#### ④ 症例4 (mtDNA枯渴症候群)

治療開始は1歳7ヶ月。この症例はGMFM評価を受ける機会がなく、NPMSのみ。治療2ヶ月後でNPMSが4ポイント低下したが、低下はSection IVのみであった。NPMSで検出困難な改善として、腕の動き、顔面筋の動きの改善があったが、これらの変化は叙述的に記載するしかなかった。治療開始3ヶ月に痙攣重積。筋型から脳筋型に進展した。治療41ヶ月の時点ではNPMSは29.8ポイント増加していた。副作用は、1例に慢性の下痢があった以外、明確な副作用は認めなかった。

これら4例の患者でピルビン酸治療効果と血中乳酸値との間に明確な関連が示されず、乳酸以外のバイオマーカーの必要性が課題となった。そのため、preliminaryなデータとして、ピルビン酸治療に最も反応し、かつ持続の長かった症例1 (m. 8993 T>G, Leigh症候群) の血清FGF-21とGDF-15を測定した。その結果、FGF-21は117.5 pg/ml (< 281.0), GDF-15は645.9 pg/ml (< 707.4)といずれも低値であった。同時測定 of 血中乳酸、ピルビン酸はそれぞれ13.1 mg/dl、0.92 mg/dlでいずれも正常であった。ピルビン酸治療中のこの患者に於いては、乳酸値と同様にFGF-21もGDF-15も正常であった。

#### D. 考察

寝たきり患者では、治療による大きな改善が期待しがたく、従って客観的に治療効果を判定するのが困難である。昨年度の研究で、NPMSに加えて、GMFM-88による評価をすることにより、客観的にピルビン酸治療による運動機能改善が少なくとも短期的には4例中3例にあることが示された。1例は、NPMSのみでしか評価出来なかったが、治療2ヶ月での有効性は、叙述的にしか評価できない運動機能改善に加えて、NPMSでも改善が確認できた。

寝たきりミトコンドリア病患者へのピルビン酸治療は、短期的には有効性が確認できたが、長期的にも有効であったのは1例のみであった。この1例に於いて、乳酸より感度、特異度ともに高いとされるバイオマーカー、FGF-21とGDF-15を測定したところ、いずれも正常範囲であった。このことが、ピルビン酸治療効果をこれらのマーカーが示している可能性はあるが、この1例だけ、しかも治療中のデータだけでは結論づけることは不能である。今後、より多くの患者のピルビン酸治療の長期臨床効果を検討するとともに、治療前後の新たなバイオマーカーの動きを検討することにより、生化学的にも効果判定をすることは重要な課題である。

#### E. 結論

NPMSに加えて、GMFM-88も同時評価することにより、寝たきり患者に於いても、客観的に治療効果を評価することが可能であった。ピルビン酸ナトリウ

ム治療は、安全で、寝たきり患者に於いても有効性が認められたが、効果は短期的であった。長期効果についてはより多くの治療成績の集積が必要である。また、長期的効果があった症例と短期的に終わった症例で、バイオマーカーの動きにどのような違いがあるかの検討が今後の課題である。少なくとも長期的に有効であった1例ではFGF-21、GDF-15は両者とも正常であった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Fujii T., Nozaki F, Saito K et al. Efficacy of pyruvate therapy in patients with mitochondrial disease: A semi-quantitative clinical evaluation study. *Molec Genet Metabol* 2014;112:133-138.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

FGF-21およびGDF-15は久留米大学小児科の八ッ賀秀一先生に測定を依頼した

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）  
分担研究報告書

ミトコンドリア病の診断と重症度評価に有用なバイオマーカーの探索

分担研究者 田中 雅嗣 東京都健康長寿医療センター臨床検査科部長  
研究協力者 藤田 泰典 東京都健康長寿医療センター研究所・研究員  
伊藤 雅史 東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長  
古賀 靖敏 久留米大学医学部小児科学教授

研究要旨

ミトコンドリア病モデル細胞を用いて、乳酸存在下とピルビン酸存在下における網羅的遺伝子発現を比較し、乳酸存在下で発現が顕著に上昇する遺伝子群を同定し、その中から、細胞外に分泌される蛋白質を選択した。その結果 growth differentiation factor 15 (GDF15)がミトコンドリア病の診断と重症度評価に有用なバイオマーカーであることが明らかになった。既存の抗体を用いて Parkin-Elmer 社の $\alpha$ LISA 法を約 1000 人の高齢者の血清中の GDF15 濃度を測定した。さらに、新たに GDF15 に対するモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を製造し、ELISA 法に基づいた体外診断薬キットを試作した。

A. 研究目的

ミトコンドリア病の診断と重症度評価に有用なバイオマーカーの探索を目的として、以下の通り、ミトコンドリア病モデル細胞を用いた実験系の確立、網羅的遺伝子発現解析による候補バイオマーカーの同定、臨床検体による検証を実施した。

B. 研究方法

1. ミトコンドリア病モデル細胞を用いた実験系の確立

① 本研究では、ミトコンドリア病の中でも比較的発症頻度の高い MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) 患者の筋芽細胞とヒト骨肉腫由来 143B 細胞から樹立したサイブリッドをモデル細胞として使用した。具体的に、MELAS の原因変異である A3243G 変異を 90%以上有する細胞株をミトコンドリア病モデル細胞 (2SD)、A3243G 変異が検出されない細胞株をコントロール細胞 (2SA) とした。

② これまでに、2SD 細胞と 2SA 細胞のメタボローム解析を行い、細胞内のエネルギー代謝に対するピルビン酸の効果を明らかにしてきた。その中で、2SD 細胞に高濃度 (10 mM) の乳酸を投与すると 4 時間後にはエネルギー代謝障害が促進していること、高濃度 (10 mM) のピルビン酸ではそれらが認められないことを示した。また、2SA 細胞では高濃度の乳酸やピルビン酸を投与してもエネルギー代謝に大きな影響は認められなかった。これらの結果をもとに、2SD 細胞において高濃度の乳酸で発現誘導される分泌タンパクが、細胞内のエネルギー代謝障害を反映し、ミトコンドリア病の診断と重症度評価に有用な新規バイオマーカーになる可能性を着想した。そこで、

10 mM 乳酸あるいは 10 mM ピルビン酸を投与した 2SA 細胞と 2SD 細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、バイオマーカーの候補となる分泌タンパクの探索を実施した。

2. 網羅的遺伝子発現解析による候補バイオマーカーの同定

① 10 mM 乳酸または 10 mM ピルビン酸を投与後 0・4・8 時間の 2SD 細胞と 2SA 細胞を回収した。これらの RNA を抽出した後、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を実施した。データ解析の結果、2SD 細胞に 10 mM 乳酸を投与した場合に発現が誘導される遺伝子を 313 個同定した。

② 血中バイオマーカーを探索するために、313 個の遺伝子の中から分泌タンパクをコードするものを選抜し、23 個の遺伝子を同定した。

③ これらの遺伝子に関する文献を精査し、23 個の遺伝子の中から 3 個の遺伝子を選抜した。

④ これら 3 遺伝子の定量 RT-PCR を行い、網羅的遺伝子発現解析の再現性を検証した。その結果、いずれの遺伝子についても再現性が確認されたため、これら 3 種類の分泌タンパクを候補バイオマーカーとして同定した。

⑤ 候補バイオマーカーとして同定した分泌タンパクの細胞培養上清中の濃度を、ELISA とマルチプレックスサスペンションアレイで測定した。その結果、growth differentiation factor 15 (GDF15)の濃度は 2SA 細胞と比較して 2SD 細胞で高値を示した。また、2SD 細胞では、10 mM 乳酸の投与によって GDF15 の濃度がさらに増加していた。他の分泌タンパクについては、検出限界以下で測定できなかった。

(倫理面への配慮)

ミトコンドリア病患者血清の採取と分析については久留米大学医学部倫理委員会の承認を得て実施した。

### C. 研究結果

ミトコンドリア病の診断に有用な新規バイオマーカーとしてGDF15を同定した。既存の抗体を用いてParkin-Elmer社の $\alpha$ LISA法を約1000人の高齢者の血清中のGDF15濃度を測定した。さらに、新たにGDF15に対するモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を製造し、ELISA法に基づいた体外診断薬キットを試作した。

### D. 考察

ミトコンドリア病のバイオマーカーとしてフィンランドの研究グループはFGF21を報告していた。FGF21とGDF15を同時に測定したところ、FGF21と比較してGDF15の方が感度・特異度ともに高いことが判明した。

#### 1) 達成度について

ミトコンドリア病の早期診断を可能にする新規バイオマーカーを同定したことは大きな進歩である。

#### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

これまでミトコンドリア病の診断には、血中の乳酸・ピルビン酸比(L/P比)、筋組織・培養線維芽細胞におけるミトコンドリア電子伝達系酵素活性の測定、ミトコンドリアDNAおよび核DNAの遺伝子検査などが用いられてきた。GDF15の血中レベルを測定することにより迅速にミトコンドリア病の診断が可能になる。ピルビン酸ナトリウム療法などの適切な治療法を早期に開始することができれば、症状の進行を遅らせることが可能になる。

#### 3) 今後の展望について

血清中のGDF15を測定する体外診断薬キットを開発し、性能試験を実施している。ピルビン酸投与開始後3ヶ月で、ミトコンドリア病重症度スコア(JMDRS, NMDAS)の改善とともにGDF15レベルの低下が観察されている。ピルビン酸ナトリウムの第IIa相臨床試験において、症状の改善と同時にGDF15値の低下が観察されるかどうかを検証する。

#### 4) 研究内容の効率性について

培養細胞における遺伝子発現解析の研究から、臨床の場で使用できる診断システムの開発に発展させたものであり、信頼性と実用性が確保されている。

### E. 結論

以上の結果からGDF15がミトコンドリア病の診断と重症度評価に有用なサロゲートマーカーになる可能性が示唆された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Yasunori Fujita, Masafumi Ito, Toshio Kojima, Shuichi Yatsuga, Yasutoshi Koga, Masashi Tanaka: GDF15 is a novel biomarker to evaluate efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. *Mitochondrion* 20:34-42, 2015.

#### 2. 学会発表

M. Tanaka, Y Fujita, M Ito, T Kojima, S Yatsuga, Y Koga: GDF15 is a novel biomarker to evaluate efficacy

of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. Mitochondrial and Fetal Medicine 9th International Symposium of Genomic Medicine 2014, Changhua Christian Hospital, Taiwan, November 15-16, 2014

### G. 知的財産権の出願・登録状況

#### 1. 特許取得

田中雅嗣、伊藤雅史、藤田泰典、古賀靖敏：ミトコンドリア病診断用バイオマーカーとしてのGDF15 1. 国際特許出願 (PCT)

出願番号 PCT/JP2015/050833

発明の名称 ミトコンドリア病診断用バイオマーカーとしてのGDF15

出願日 2015年(平成27年)1月15日

国内移行期限 2016年(平成28年)7月15日

[優先権情報]

(1) P14019TAN, JP2014-223500, 2014.10.31

(2) P13027TAN, JP2014-005391, 2014.01.15

#### 2. 日本国特許出願

出願番号 特願2014-223500

発明の名称 ミトコンドリア病診断用バイオマーカーとしてのGDF15

出願日 2014年(平成26年)10月31日

[優先権情報]

P13027TAN, JP2014-005391, 2014.01.15

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし

## シトリン欠損症の病態解明

1. シトリン欠損症患者の血漿グリセロール
2. モデルマウスの病態における肝 glycerol 3-phosphate と ATP の重要性

研究分担者 佐伯 武頼 熊本大学生命資源研究・支援センター山村プロジェクト研究室・特任教授  
共同研究者 藤本侑希、古家澄江、山村研一  
熊本大学生命資源研究・支援センター山村プロジェクト研究室

### 研究要旨

若干のシトリン欠損症患者の尿中グリセロールと glycerol 3-phosphate (G3P)濃度を測定した結果、1歳から9歳までの患者で対照者に比し、有意に高値を示す結果を得た。

また、モデルマウスを用い、成人発症II型シトルリン血症(CTLN2)の発症誘因である糖質(ショ糖)、エタノール、およびグリセロールの自由摂取による忌避現象の解析とそれに伴う肝内代謝物の解析を行い、忌避行動には肝内 G3P 上昇と ATP 低下の二つの代謝変動が同時に観察されることを見出した。

### A. 研究目的

本研究の目的は、ミトコンドリア膜輸送体である肝型 aspartate glutamate carrier (シトリン citrin) の欠損によって生じる、成人発症II型シトルリン血症 (CTLN2)、新生児肝内胆汁うっ滞症 (NICCD)、およびその他のシトリン欠損による多様な病態を明らかにし、新たな診断法を開発し、ピルビン酸ナトリウムなどの治療薬の効果を簡便に判断できるようにすること、および新たな治療薬の開発のシーズを見出すことである。

### B. 研究方法

以上の目的に従い、本年度は次の2つの研究テーマを実行した。

#### 1. シトリン欠損症患者尿中のグリセロールとG3Pの定量

昨年度モデルマウスを用い明らかにした尿中へのグリセロールおよびG3Pの排泄の増加を若干のシトリン欠損症患者において検討した。日本国内および中国において遺伝子解析によって、シトリン欠損症 (CTLN2、NICCD) と診断された患者およびほぼ同年齢の対照者から尿を採取し、酵素法を用いてグリセロールとG3P濃度を定量<sup>1)</sup>し、クレアチニン (酵素法によるキット使用) 比で表記し、比較検討した。また年齢による差が大きいことから9ヶ月まで、1歳から9歳まで、10歳以上の3群に分け、対照群と比較検討した。尿の採取については以下の主治医・研究者に研究協力を得た (敬称略)。  
矢崎正英 (信州大学)、岡野善行 (おかのこどもクリニック)、坂本修 (東北大学)、張春花 (MILS インターナショナル)、Song, Yuan-Zong (中国 Jinan University)、三淵浩 (熊本大学)。

#### 2. モデルマウスの糖質などの忌避行動と肝中代謝物変動との関連性

CTLN2の発症誘引となる糖 (本実験ではショ糖を使用)、エタノール、グリセロールの自由摂取による忌避行動の解析とそれに伴う肝内代謝物の変動から忌避行動に関連して変動すると考えられる物質を明らかにすることを試みた。

飲用実験は、2本のボトルに水と各種濃度の試験溶液を入れ、どちらでも自由に摂取できるようにして、2日間テストし、1日の摂取量を重量 (g/25g体重) で表し、また水と試験溶液摂取量中における試験溶液摂取量の比率から preference を計算した。また、胃管を通じて各種濃度の溶液を強制的に投与し、1時間後に freeze-3%過塩素酸抽出液作成・中和し、肝代謝物の解析を行った。G3P、クエン酸は酵素法<sup>2,3)</sup>、アミノ酸は EZfaast・LC/MS を用いる方法 (Phenomenex Ltd., Los Angeles, USA)、ATP は LC法<sup>4)</sup> で定量した。

### (倫理面への配慮)

尿の解析に関しては熊本大学大学院生命科学研究部長に、「シトリン欠損症の新しい化学診断法の確立：尿中グリセロールの診断的価値」の題で臨床研究・医療技術承認申請を行い、また、多施設共同研究実施計画書を提出し、承認 (先進第1652号) を得た。マウスの研究に関しては熊本大学長に動物実験計画書を提出し、承認 (B25-147) を得た。

### C. 研究結果

#### 1. シトリン欠損症患者尿中のグリセロールとG3Pの定量

昨年度報告のようにシトリン欠損症モデルマウスにおいては尿中にグリセロールおよびG3Pが他の遺伝子型マウスに比し、有意に増加することから、若干のシトリン欠損症患者群と対照群で比較した。年齢によって尿グリセロールとG3Pの値が大きく変動することから年齢から3群に分け、比較検討した。結果は、Fig. 1に示す。値のばらつきが大きいことか

ら箱ひげ図で示し、Mann-Whitney U testで有意差検定を行った。1歳から9歳のグループで尿グリセロールおよびG3Pともに患者グループで有意に高値を示したが、その他の群では有意差は得られなかった。

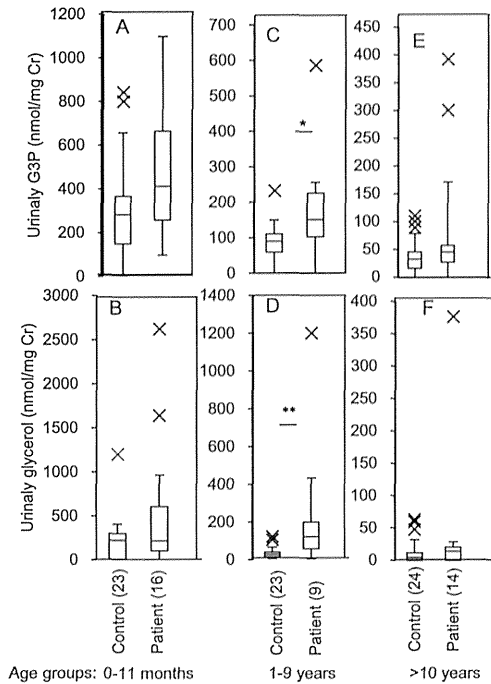


Fig. 1. Urine G3P (A, C and E) and glycerol (B, D and F) levels in controls versus patients with citrin deficiency by age. All subjects were divided into three age categories: 0-11 months (A and B), 1-9 years (C and D) and greater than 10 years (E and F). The data for control subjects and citrin deficient patients are shown as box-and-whisker plots (outlier values are shown as an 'X'), with the number of samples examined per age category being shown in parentheses. Significant differences between controls and patients within each age category were evaluated by the Mann-Whitney U test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

## 2. モデルマウスの糖質などの忌避行動と肝中代謝物変動との関連性

糖質、アルコールおよびグリセロールはCTLN2の発症誘因である。そこで、4種のモデルマウス、野生型 (wt)、シトリン欠損 (Citrn-KO)、 mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase欠損 (mGPD-KO)、およびCitrn/mGPD double-KOマウスを用い、各種濃度の糖 (ショ糖)、エタノール、グリセロール溶液の自由摂取量と preference を計算した。Fig. 2 にショ糖摂取、Fig. 3 にエタノールとグリセロール摂取に関する結果を示す。ショ糖はエネルギー源で甘みを持つことからマウスにおいても嗜好性は高く、wt、Citrn-KO および mGPD-KO マウスにおいて高濃度のショ糖摂取を好み、摂取量も多く、preference もほぼ100%を示す。しかし、double-KO マウスにおいては低濃度からの摂取量は増えず、20%濃度ではむしろ5%濃度よりも摂取量も、preference も低下し摂取忌避を起こしていると考えられる。一方、エタノール

とグリセロールに関しては、Fig. 3に示すように、double-KOのみならずmGPD-KOマウスも低濃度から摂取量が低下したが、Citrn-KOマウスも高濃度では摂取量低下を示した。Preferenceについてもほぼ同様の結果となった。ここで他のマウスより有意に摂取量、preferenceが低い場合、および最少濃度の摂取量、preferenceが有意に低下した場合を忌避度それぞれ1として得点2以上 (最大4点) を忌避行動があると定義した。

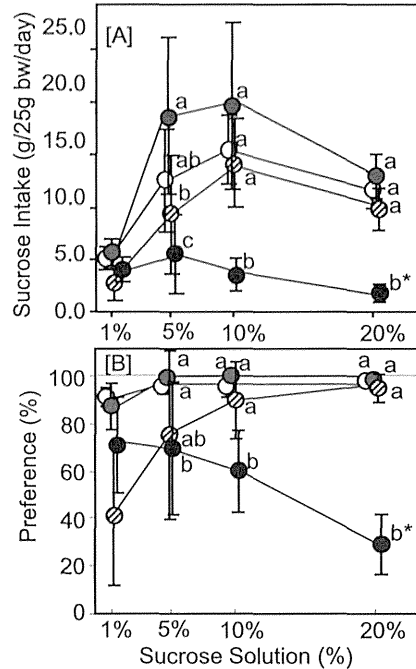


Fig. 2. Intake [A] of and preference [B] for varied concentrations of a sucrose solution.

Mice were provided two bottles, one containing water, and the other containing either a 1, 5, 10 or 20% sucrose solution. [A] Intake of each mouse was determined by weighing the bottles each day and averaged over a two-day period. [B] Preference (%) was calculated as  $100 \times (\text{g of test solution}) / [(\text{g of test solution}) + (\text{g of water})]$ . White circles denote wt mice; grey, Citrn-KO mice; striped circles, mGPD-KO mice; black circle, Citrn/mGPD double-KO mice. Data on each group of mice are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 6-8$ ). Differences among the mice were evaluated by ANOVA followed by the Tukey-Kramer test. Mean values with the same character are not different at  $p < 0.05$ .

続いて、以上のような忌避行動がどのような機序によって生じるかのヒントを得るため、忌避が起こる濃度溶液の強制的な投与による肝内代謝物の変動を検討した。すでに高濃度 (50%) ショ糖の強制投与によって変動する肝内代謝物は、報告した<sup>5)</sup>ように、G3P、TCAサイクル中間体、シトルリン、グルタミン酸、リジンがある。そこで、各種濃度の溶液の強制投与による代謝物の変動と忌避行動の関連性を検討した。Fig. 4にはG3PとTCAサイクルの代表として測定したクエン酸のデータを示す。肝内G3Pは忌避行動を起こすような溶液濃度においていずれも大きく上昇したが、wtマウスで忌避行動を起こさない高濃度



エタノール投与においても肝内G3P濃度は上昇していた。忌避が起こる条件の溶液濃度で、クエン酸は低下したが、忌避行動が起こらない濃度でも wtマウスやCtrn-KOマウスなどで低下を示し、忌避行動との関連性は見られなかった。

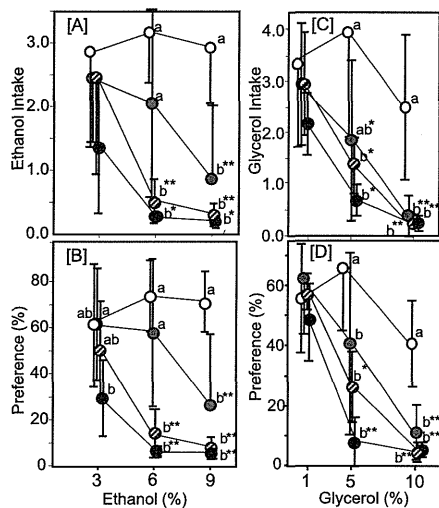


Fig. 3. Intake ([A] and [C]) of and preferences ([B] and [D]) for varied concentrations of glycerol ([A] and [B]) and ethanol ([C] and [D]).

Oral intake and preference of the mice were determined as indicated for Fig. 1. Concentrations of the test solutions are shown. The symbols for each group of mice are as indicated in Fig. 1. Data on each group of mice are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 6-9). Differences among the mice were evaluated by ANOVA followed by the Tukey-Kramer test. Mean values with the same character are not different at  $p < 0.05$ .

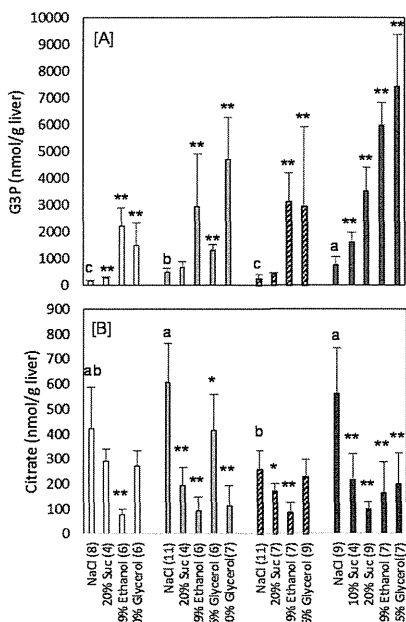


Fig. 4. Changes in the hepatic G3P [A] and citrate [B] levels following oral administration of various

concentrations of sucrose, ethanol or glycerol solutions. One hour after an enteral administration of a test solution (either 0.9 % saline, 20 % or 10% sucrose, 9 % ethanol, or 5% or 10% glycerol) at a standard dose of 20 ml/kg by gastric tube to the fed mice, mice were sacrificed, a neutralized, perchloric acid-extracted liver homogenate was prepared and analyzed as described in Materials and Methods. White column denotes wt mice; grey column, Ctrn-KO mice; striped column, mGPD-KO mice; black column, Ctrn/mGPD double-KO mice. Mean values with the same character are not different at  $p < 0.05$ . \* and \*\* denote  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively, from the basal levels of each genotype.

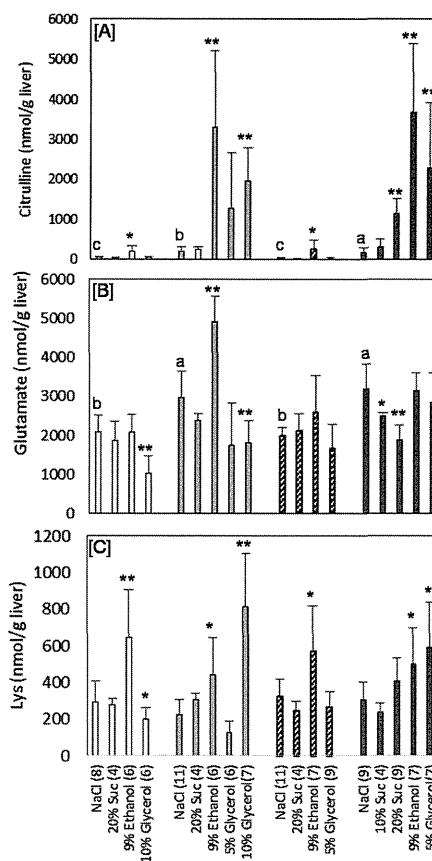


Fig. 5. Changes in the hepatic citrulline, glutamate and lysine (Lys) levels following the oral administration of various concentrations of sucrose, ethanol or glycerol solutions.

The experimental procedures are described in the legend of Fig. 4. The hepatic amino acid levels were determined by liquid chromatography/mass spectrometry, as described in Materials and Methods. Mean values with the same character are not different at  $p < 0.05$ . \* and \*\* denote  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively, from the basal levels of each genotype.

同様にアミノ酸についても、Fig. 5に示すように必ずしも忌避行動との相関では見られなかった。たとえば、シトルリンの上昇は高アンモニア血症との関連性があるが、mGPD-KOマウスでは忌避行動は見られてもシトルリンの上昇はない。



以上から、忌避行動はG3Pレベルとはほぼ一致の傾向が見られたので、複数因子が関与する可能性を考えた。肝ATP低下はショ糖投与下のmGPD-KOマウスでも見られることから当初は本忌避行動との関連性を考えなかったが、複合で関わる可能性を考慮してATPについても検討した。その結果はFig. 6に示すとおりであり、忌避行動を示さないmGPD-KOマウスへのショ糖投与を除いては忌避行動と肝ATP低下はよく相関している。

そこで、G3Pのデータと照らし合わせるとG3Pの上昇とATPの低下が同時に起こる条件と忌避行動が観察される条件は一致した (Table 1)。

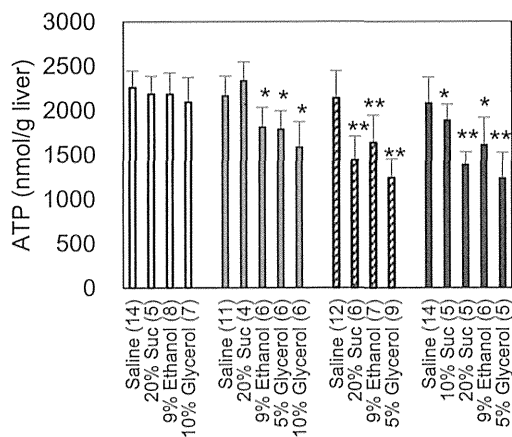


Fig. 6. Changes in the hepatic ATP levels following the oral administration of various concentrations of sucrose, ethanol or glycerol solutions.

The experimental procedures are described in the legend of Fig. 4. \* and \*\* denote  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively, from the basal levels of each genotype.

Table 1. Relation between aversion and metabolite changes in the liver of mice

Treatment	Mouse	Aversion	G3P	ATP
20% Sucrose (4g/kg)	Wt	no	Inc	nc
	Ctrn-KO	no	nc	nc
	mGPD-KO	no	nc	Dec
	Double-KO	Yes	Inc	Dec
9% Ethanol (1.4g/kg)	Wt	no	Inc	nc
	Ctrn-KO	Yes	Inc	Dec
	mGPD-KO	Yes	Inc	Dec
	Double-KO	Yes	Inc	Dec
5% Glycerol (1g/kg)	Wt	no	nc	nc
	Ctrn-KO	Yes	Inc	Dec
	mGPD-KO	Yes	Inc	Dec
	Double-KO	Yes	Inc	Dec
10% Glycerol (2g/kg)	Wt	no	Inc	nc
	Ctrn-KO	Yes	Inc	Dec
	mGPD-KO	Yes	Inc	Dec
	Double-KO	Yes	nt	nt

Dec, decreased; Inc, increased; yes and no, presence (score > 2) and absence (score < 1) of aversion; nc, not changed; nt, not tested. Grey highlights indicate coincidence of aversion and the

two metabolic changes, and yellow, metabolic changes without aversion.

#### D. 考察

シトリン欠損症モデルマウスで観察された尿グリセロールおよびG3Pの排泄増加は、シトリン欠損症患者では1歳から9歳のグループにおいて対照群に比し、有意に上昇していた。しかしその他の年齢では対照群との間に有意な差は得られなかった。この理由は、1歳以下のNICCD患者および成人のCTLN2患者では症状があり、治療を受けているが、1歳以上のNICCD経験者ではほとんど治療を必要とするような症状が見られないことから治療を受けていないことに起因するのかもしれない。また、マウスでは糖質やエタノール投与で血漿グリセロールが上昇した。シトリン欠損症患者に糖質やエタノールなどのCTLN2発症誘因となる物質の投与は不可能であるが、安全な負荷テスト可能な物質が見いだせれば、有効なシトリン欠損症診断法になる可能性がある。

マウスにおいてもCTLN2発症誘因となる物質が高濃度の場合、その摂取を忌避することが明らかになった。その機構にはこれら忌避物質の代謝が関与する。ショ糖による忌避行動はショ糖が甘いという味の問題ではないことはサッカリンでは忌避行動が見られない(結果省略)ことからうかがえる。さらには糖質、エタノールおよびグリセロールはいずれも細胞質にNADHを産生する物質であり、シトリンの代謝上の役割が細胞質NADH還元当量のミトコンドリアへの輸送にあることからもうなずける。忌避行動が起こる機構について肝内の代謝変動を検討した。その結果、G3P上昇と高い相関性が見られたが、必ずしもその関係は完全には一致しなかった。そこで肝内ATPレベルについても検討した結果、G3Pの上昇とATPの低下が同時に起こる条件では忌避行動が観察されることが明らかになった。これらの代謝変動がどのように忌避行動につながるのかは今後の問題であるが、これらの代謝変動が何らかの経路を経て脳神経系に伝えられるのであろうと想像される。また、このような代謝変動は肝臓ではなく腸管組織内での現象である可能性もある。一方、もし、G3P上昇またはATP低下を防ぐことができるならば、忌避行動を起こさなくすることが考えられる。実際に我々は、ピルビン酸ナトリウムやアラニン、グルタミン酸ナトリウムなどのアミノ酸、またはMCT (中鎖脂肪酸からなるトリグリセリド)が、高糖質食であるAIN-93Mの摂取低下から生じる体重減少を防ぎ、摂取量を増やすこと、ならびに初頭の強制投与による肝内G3Pの上昇を抑制することを観察している。すなわち、以上の2つの代謝変動はシトリン欠損症悪化状態のマーカーと考えられる。今後はATPレベルへの効果を示す物質の検討・検索が重要と考えている。

#### 文献

- O.H. Wieland, Methods of Enzymatic Analysis, vol. VI, Varlag Chemie, Weinheim, 1984, pp. 504-510.
- G. Lang, Methods of Enzymatic Analysis, vol. VI, Varlag Chemie, Weinheim, 1984, pp. 525-531.
- H. Möllerring, Citrate, Methods of Enzymatic Analysis, vol. VII, Varlag Chemie, Weinheim,

- 1985, pp. 2-12.
4. L.I. Zhou, et al, J Agric Food Chem. 60 (2012) 8994-8999.
  5. T. Saheki, et al, Mol. Genet. Metab. 104 (2011) 492-500.
  6. T. Saheki, et al, Mol. Genet. Metab. 107 (2012) 322-329.

#### E. 結論

シトリン欠損症患者では、尿中グリセロールと glycerol 3-phosphate (G3P)は、有意に高値を示し、バイオマーカーとして有用と考えられた。

#### F. 研究発表

1. 論文発表
  - 1) Zhang ZH, Yang ZG, Chen FP, Kikuchi A, Liu ZH, Kuang LZ, Li WM, Song YZ, Kure S, Saheki T, Screening for five prevalent mutations of SLC25A13 gene in Guangdong, China: a molecular epidemiologic survey of citrin deficiency. Tohoku J Exp Med. 2014;233(4):275-281.
2. 学会発表
  - 1) Saheki T, Prenary session, History and fundamental basis of the pathophysiology, International Symposium on Citrin Deficiency, Guanzhou, China
  - 2) 佐伯武頼 特別講演「シトリン欠損症における特異な食癖とその病因・病態・治療との関連」日本栄養改善学会四国支部学術総会 平成 26 年 5 月 17 日、徳島
  - 3) 藤本侑希、矢崎正英、岡野善行、張春花、坂本修、Yuan-Song Song、三淵浩、遠藤文夫、山村研一、佐伯武頼、シトリン欠損症新規病態マーカーの探索、第 56 回日本先天代謝異常学会・第 12 回アジア先天代謝異常症シンポジウム、平成 26 年 11 月 13 日—15 日、仙台
  - 4) 森山光章、藤本侑希、牛飼美晴、堀内正久、高野 桂、中村洋一、佐伯武頼、シトリン欠損症モデルマウス灌流肝アミノ酸および TCA サイクル中間体代謝に対する糖質負荷の効果、第 56 回日本先天代謝異常学会・第 12 回アジア先天代謝異常症シンポジウム、平成 26 年 11 月 13 日—15 日、仙台
  - 5) 佐伯武頼、藤本侑希、古家澄江、山村研一、シトリン欠損症の病態解析と治療法の開発：現在の課題、第 56 回日本先天代謝異常学会・第 12 回アジア先天代謝異常症シンポジウム、平成 26 年 11 月 13 日—15 日、仙台
  - 6) Saheki T, Fujimoto Y, Furuie S, Yamamura K, Metabolic basis of carbohydrate toxicity in citrin, liver-type mitochondrial aspartate glutamate carrier, deficiency, Asia Europe Workshop on Inborn Error of Metabolism (AEWIEM) 2015, January 18-19, 2015, Cairo, Egypt.

- #### G. 知的財産権の出願・登録状況
- なし
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

分担研究課題：バイオマーカー研究

TCA 回路と周辺の代謝機能解析に関する研究

研究分担者 山口 清次 島根大学医学部小児科 教授

研究要旨

ミトコンドリアの呼吸鎖機能のバイオマーカーとなる代謝産物を尿中・血中に発見できないか、質量分析を用いて検討する。今回、gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) を用いて、ミトコンドリア脳筋症 (MELAS) を中心にシトリン欠損症などミトコンドリア機能障害を疑われる患者の尿中有機酸分析を行い、TCA 回路関連代謝産物の排泄について検討した。

患者の尿では正常コントロールに比べて、特に 4-ヒドロキシフェニル乳酸 (PHPLA) の排泄増加が明らかであった。継時的に分析を行った症例では持続的に排泄増加を認めており、ミトコンドリア機能障害のマーカーになりうるかもしれない。グリセロール 3 リン酸 (G3P) も検討したが、昨年の検討と同様、MELAS 患者での上昇はほとんど認められなかった。

また、尿中有機酸分析の異常代謝産物の排泄パターンからからビタミン B1 欠乏と考えられた 3 か月女児で、母体もビタミン B1 欠乏が明らかだったにもかかわらず、ビタミン B1 投与で児の代謝プロファイルに変化がなく、後に家族内に 2 人の MELAS 患者が発見された症例を経験した。ビタミン B1 が補酵素として働く酵素は TCA 回路に関わる酵素でもあり、尿中有機酸分析の代謝プロファイルから MELAS の診断につながる可能性が示唆された。

研究協力者

長谷川(小村)有紀 (島根大学小児科助教)

A. 研究目的

ミトコンドリアの呼吸鎖では、 $\beta$ 酸化系や解糖系・TCA 回路から供給される  $\text{NADH}_2^+$  や  $\text{FADH}_2$  が酸化される際に放出する電子を伝達している。ミトコンドリア機能低下により高乳酸血症になると、これらの回路に供給される  $\text{NAD}^+$  が枯渇し、最終的に  $\text{NADH}_2^+$  や  $\text{FADH}_2$  の供給が障害される。主に MELAS 患者の尿を用いてこれら  $\text{NADH}_2^+$  や  $\text{FADH}_2$  の酸化還元反応の場である TCA 回路の代謝産物を測定し、動態を検討するために質量分析を行った。

B. 研究方法

尿中有機酸分析による TCA 回路関連成分の測定  
ミトコンドリア脳筋症 (MELAS) 患者などミトコンドリア機能低下を疑われた患者について、GC/MS を用いた尿中有機酸分析から TCA 回路関連成分の排泄量を測定した。尿中有機酸分析は TCA 回路関連成分である乳酸、ピルビン酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、アコニット酸、クエン酸、イソクエン酸などをいずれも検出・同定できる。特に  $\text{NADH}_2^+$  や  $\text{FADH}_2$  を生成する過程の前後にあるイソクエン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸(2KG)、コハク酸、リンゴ酸の値に注目した (図 1)。またミトコンドリア機能低下と関連するとされるチロシン代謝産物

の 4-ヒドロキシフェニル乳酸 (PHPLA) についても検討した。また健常コントロールと比較し、どんな代謝産物の排泄が高いかも検討した。

(倫理面への配慮)

島根大学は分析施設であり、分析依頼はすべて家族の同意の下に行われている。当施設で疾患を集計する際には、年齢や初発症状の検討を行う際に個人が特定できないよう、個人情報保護に十分に配慮した。

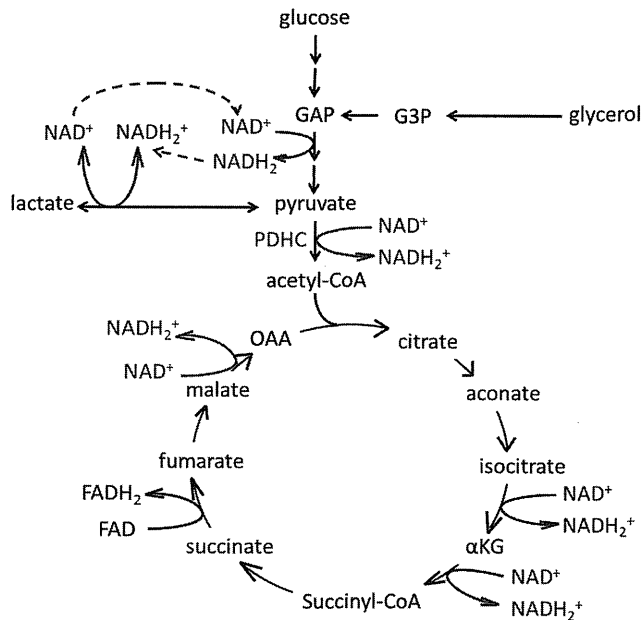


図 1 : 解糖系・TCA 回路と NADH<sub>2</sub><sup>+</sup>、FADH<sub>2</sub> 産生

### C. 研究結果

1) 尿中有機酸分析による TCA 回路関連成分の測定 (図 2)

学童から成人の MELAS 患者 4 名 (患者 A~D)、シトリン欠損症 1 名 (患者 E)、家族内に MELAS 患者のいる高乳酸血症を示す女兒 (患者 F) で尿中有機酸分析を行った。TCA サイクル代謝産物は健常コントロールと比べ、MELAS 患者と患者 F でイソクエン酸、2KG、コハク酸の排泄が多く、シトリン欠損症はコントロールとほぼ変わらなかった。患者 F についてはさらにフマル酸とリンゴ酸の排泄増加が明らかであった。

PHPLA の排泄は、患者 C を除く全員で健常コントロールに比べて強い上昇を示していた。特に

継時的な分析が行えた患者 E と F では、持続的な排泄増加を認め、これはピルビン酸の内服前後で変化しなかった。

グリセロール、グリセロール-3-リン酸 (G3P) についても検討したが、排泄が認められたのは MELAS 患者 1 名とシトリン欠損症患者のみであり、今回も G3P の排泄増加は認められなかった。

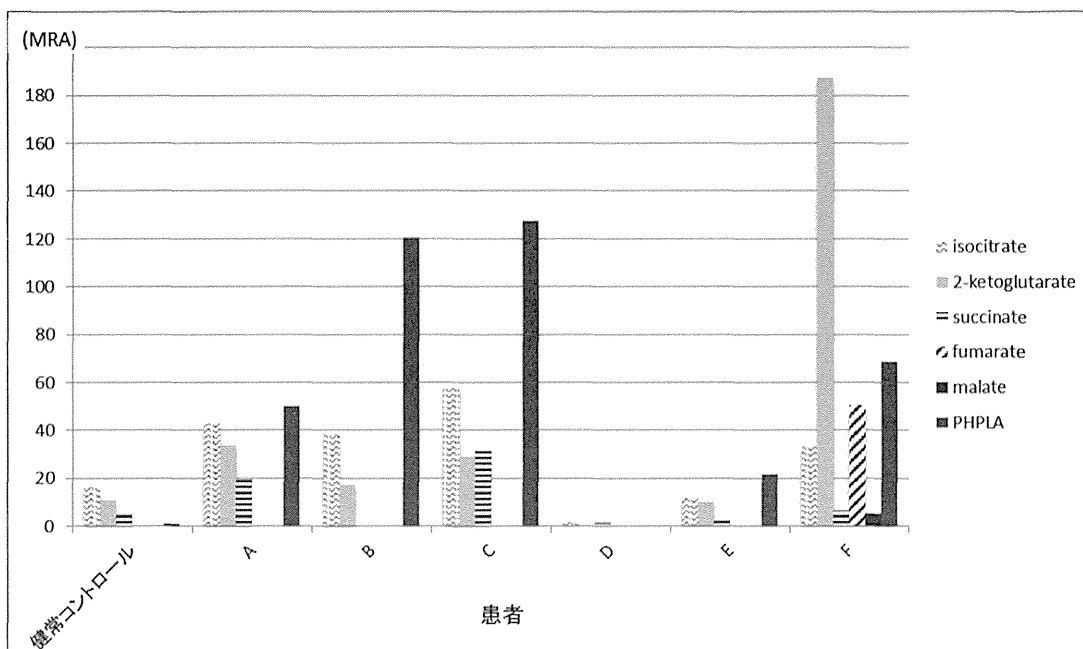


図2：MELAS 患者（A～D）、シトリン欠損症患者（E）、高乳酸血症を示す乳児（F）と、TCA 回路関連成分・PHPLA の排泄量

## 2) 家族内に 2 人の MELAS 患者が発見された 3 か月女児例

今回の研究中に、高乳酸血症を示す 3 か月女児（患者 F）を経験した。女児の代謝プロファイルは、乳酸、ピルビン酸の排泄増加とともに、分枝鎖アミノ酸代謝産物である  $\alpha$ -ケト酸（2-ケトイソカプロン酸、2-ケト-3-メチル吉草酸）や 2-ケトグルタル酸、2-ヒドロキシグルタル酸、2-ケトアジピン酸、2-ヒドロキシアジピン酸などの排泄増加が認められた。これらの排泄は①ピルビン酸脱水素酵素複合体、② $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素複合体、③分枝鎖アミノ酸脱水素酵素複合体が同時に障害される場合、すなわちビタミン B1 欠乏や E3 欠損症例でみられるプロファイルを示していた（図 3、4）。母が出産前に悪阻が強く食事

がほとんど食べられなかったことや、母体血中のビタミン B1 が著明に低下をしめしており、これらの状況や血中ビタミン B1 値からもビタミン B1 欠乏と判断した。しかし、ビタミン B1 (25mg/日) を投与後も児の代謝プロファイルに変化はなかった。ビタミン B1 付加酵素の欠損症も疑い、酵素活性も検討したがこれにも異常はなかった。

女児に心不全などの脚気症状は認められなかったが、生後 8 か月で体重 4.9kg と著明な体重増加不良を呈していた。後に家系内に 2 人の MELAS 患者が発見された。今回の経過から、女児の代謝プロファイルが MELAS 発症前の病態と関連している可能性が示唆された。

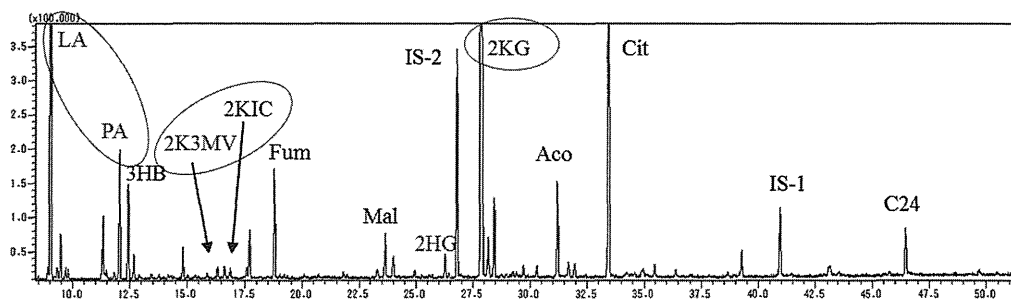


図3：患者Fの尿中有機酸所見

- 1) ピルビン酸脱水素酵素複合体障害：LA:乳酸、PA:ピルビン酸
- 2) 分枝鎖アミノ酸脱水素酵素複合体障害：2K3MV:2-ケト-3-メチル吉草酸、2KIC:2-ケトイソカプロン酸、
- 3) 2-ケトグルタル酸脱水素酵素複合体障害：2KG:2-ケトグルタル酸、2HG:2-ヒドロキシグルタル酸

略称：3HB:3-ヒドロキシ酪酸、Fum:フマル酸、Mal:リンゴ酸、Aco:アコニット酸、Cit:クエン酸、IS:内部標準物質

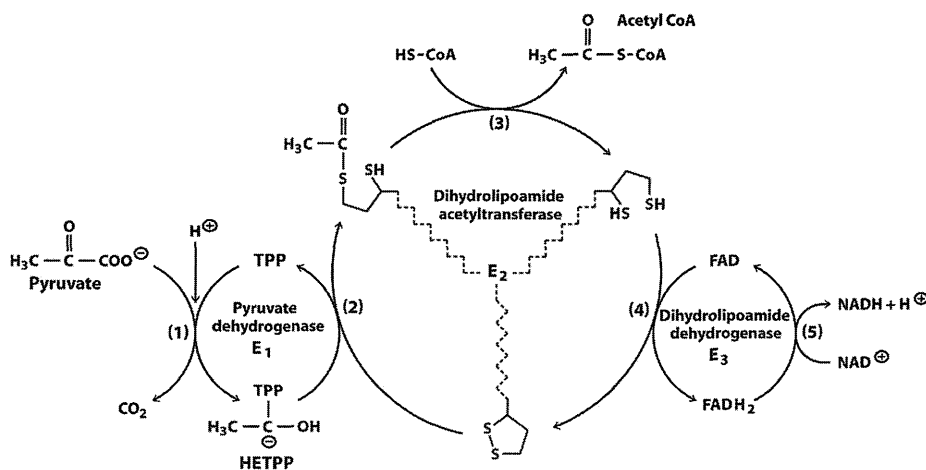


Figure 13-1 Principles of Biochemistry, 4/e © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

図4：脱水素複合体におけるビタミンB1 (TPP) の作用：3つの脱水素酵素複合体に共通に作用

#### D. 考察

ミトコンドリア呼吸鎖における電子伝達系の働きはミトコンドリア機能に直結する。呼吸鎖への電子伝達を担うTCA回路や解糖系の代謝プロファイルはこの機能を示していると考えられる。今回、MELAS患者を中心に解析し、MELAS患者では健常者に比較してTCAサイクルの代謝産物が増加していることが示唆された。一方、シト

リン欠損症ではTCAサイクルの代謝産物の増加は認められなかった。これはMELASのミトコンドリア機能障害は直接的にTCAサイクルの代謝障害に影響するが、シトリン欠損症は肝型アスパラギン酸・グルタミン酸膜輸送体蛋白の障害であり、TCAサイクル代謝に通常の状態では大きく作用しない、ということを示すものかもしれない。シトリン欠損症で肝炎など何らかの症状がある場合に分析すれば、また違う結果が得られた可能

性は残る。

一方、PHPLA は MELAS 患者のうち 1 名を除き、全員で強い排泄増加を認めた。この排泄増加はいずれも健常コントロールの 10SD を超えるものであった。継続的に検査できた症例では持続的な排泄増加を認めており、昨年の解析でミトコンドリア枯渇症候群でも同様の所見が得られていることから、ミトコンドリア機能障害の鋭敏なマーカーとなりうる可能性がある。ただし、昨年の検討ではピルビン酸内服による排泄量の変化は認めていないことから、治療評価マーカーとしては現時点では適切とは言えなかった。

さらに G3P について今回も検討したが、排泄増加がみられた症例はなく、やはりヒトではシトリン欠損症における G3P 脱水素酵素の代償機能が低いため指標となりにくいのではないかと考えられた。

一方、家系内に MELAS 患者のいる高乳酸血症を示す乳児症例では、今回検討した MELAS 患者とはやや異なり、2KG が著明に高値で、フマル酸、リンゴ酸の排泄増加を示す有機酸分析所見であった。これはビタミン B1 欠乏でみられる 3 種類の脱水素酵素複合体障害を示すものであったが、患者ではビタミン B1 投与後も異常なプロファイルが続いている。ビタミン B1 不足は脚気衝心や末梢神経障害、Wernicke 脳症など多彩な症状をもたらすが、本患者の発達は現時点では正常である。しかし著明な発育障害が認められており、ビタミン B1 が細胞内に本当に取り込まれ、機能しているのかどうかは不明で、今後代謝プロファイルの変化と症状に関連がみられていくかどうか、今後も継続して検討したい。

## E. 結論

TCA 回路関連成分などの中間代謝産物は、MELAS 患者では上昇している一方、シトリン欠損症では健常コントロールと同程度であった。しかし両者ともに PHPLA の排泄増加がみられており、これをマーカーとして呼吸鎖障害を早期に発見できる可能性がある。しかし、治療評価につ

いてはまだマーカーとして適切なものはなく、今後も解析が必要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Naiki M, Ochi N, Kato YS, Purevsuren J, Yamada K, Kimura R, Fukushi D, Hara S, Yamada Y, Kumagai T, Yamaguchi S, Wakamatsu N: Mutations in HADHB, which encodes the  $\beta$ -subunit of mitochondrial trifunctional protein, cause infantile onset hypoparathyroidism and peripheral polyneuropathy. *American Journal of Medical Genetics A* 164(5): 1180-1187, 2014 (May)
- 2) Yasuno T, Osafune K, Sakurai H, Asaka I, Tanaka A, Yamaguchi S, Yamada K, Hitomi H, Arai S, Kurose Y, Higaki Y, Sudo M, Ando S, Nakashima H, Saito T, Kaneoka H: Functional analysis of iPSC-derived myocytes from a patient with carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 448(2): 175-181, 2014 (May)
- 3) Shioya A, Takuma H, Yamaguchi S, Ishii A, Hiroki M, Fukuda T, Sugiee H, Shigematsu Y, Tamaoka A: Amelioration of acylcarnitine profile using bezafibrate and riboflavin in a case of adult-onset glutaric acidemia type 2 with novel mutations of the electron transfer flavoprotein dehydrogenase (ETFDH) gene. *Journal of The Neurological Sciences* 346(1-2): 350-352, 2014 (November)
- 4) Vatanavicharn N, Yamada K, Aoyama Y, Fukao T, Densupsoontorn N, Jirapinyoe P, Sathienkijkanchai A, Yamaguchi S, Wasant P: Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: two neonatal cases



- with common splicing mutation and in vitro bezafibrate response. *Brain and Development*, inpress
- 5) Sakai C, Yamaguchi S, Sasaki M, Miyamoto Y, Matsushima Y, Goto YI: ECHS1 mutations cause combined respiratory chain deficiency resulting in Leigh syndrome. *Human Mutation*, inpress
  - 6) 山口清次: タンデムマスを導入した新生児マススクリーニングの社会的意義と課題. *公衆衛生情報* 44(3): 5-8, 2014 (6月)
  - 7) Mine J, Taketani T, Yoshida K, Yokochi F, Kobayashi J, Maruyama K, Nanishi E, Ono M, Yokoyama A, Arai H, Tamaura S, Suzuki Y, Otsubo S, Hayashi T, Kimura M, Kishi K, Yamaguchi S: Clinical and genetic investigation of 17 Japanese patients with hyperekplexia. *Developmental Medicine & Child Neurology: Online*, 2014 (OCT)
  - 8) Tomatsu S, Shimada T, Mason RW, Kelly J, LaMarr WA, Yasuda E, Shibata Y, Futatsumori H, Montano AM, Yamaguchi S, Suzuki Y, Orii T: Assay for glycosaminoglycans by tandem mass spectrometry and its applications. *Journal of Analytical Bioanalytical Techniques Special Issue 2: Online*, 2014 (February)
  - 9) 坊岡美奈, 比嘉明日美, 津野嘉伸, 熊谷健, 奥谷貴弘, 吉川徳茂, 城道久, 太田菜美, 八木重孝, 南佐和子, 井篁一彦, 山田健治, 山口清次: 胎児心不全で発症したミトコンドリア三頭酵素欠損症の1例. *日本周産期・新生児医学学会雑誌* 50(3): 1015-1021, 2014 (9月)
  - 10) 山本幹枝, 安井建一, 渡辺保裕, 古和久典, 山口清次, 中嶋健二: ホモシスチン尿症をともなったメチルマロン酸尿症の1例. *臨床神経学* 55(1): 23-28, 2015 (1月)
  - 11) 山口清次: ミトコンドリア脂肪酸 $\beta$ 酸化異常症. 編: 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.29 神経症候群 (第2版) III - その他の神経疾患を含めて - VII 先天代謝異常 -, 日本臨床社, 大阪, p627-631, 2014 (6月, 883)
  - 12) 山口清次: 有機酸代謝異常. 編: 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.29 神経症候群 (第2版) III - その他の神経疾患を含めて - VII 先天代謝異常 -, 日本臨床社, 大阪, p622-626, 2014 (6月, 883)
  - 13) 山口清次: 有機酸・脂肪酸代謝異常症. 編: 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.31 神経症候群 (第2版) VI - その他の神経疾患を含めて - XIV てんかん症候群全般 てんかんおよび症候群 症候性 特異症候群 先天代謝異常 -, 日本臨床社, 大阪, p205-211, 2014 (12月)
- ## 2. 学会発表
- 1) Yamaguchi S: Organic Acidaemias and emergency treatments. 1st Asia Pacific Inborn Errors of Metabolism Course 講演. Tokyo, January 2014
  - 2) Yamaguchi S: Pediatric emergency and inborn metabolic disease. Seminar: Updates on Inborn Errors of Metabolism セミナー. Kubang Kerian Kelantan, Malaysia, April 2014
  - 3) Vatanavicharn N, Taketani T, Nabangchang C, Yamaguchi S: Isolated sulfite oxidase deficiency: A rare metabolic disorder with neuroimaging mimicking perinatal asphyxia. 第56回日本先天代謝異常学会. 仙台, 11 2014
  - 4) 小林弘典, 山田健治, 高橋知男, 坊亮輔, 長谷川有紀, 山口清次: 脂肪酸代謝異常症の診断におけるろ紙血および血清アシルカルニチンプロファイルの差異に関する検討. 第56回日本先天代謝異常学会. 仙台, 2014年11月

- 5) 深澤元晶, 臼田信光, 厚沢季美江, 古居みどり, 橋本隆, 山口清次: ラット初代培養線維芽細胞におけるミトコンドリア脂肪酸 $\beta$ 酸化系酵素の局在と $\beta$ 酸化能の評価. 第 56 回日本先天代謝異常学会. 仙台, 2014 年 11 月
- 6) 山田憲一郎, 内木美紗子, 星野伸, 北浦靖之, 近藤雄介, 下澤伸行, 山口清次, 下村吉治,

三浦清邦, 若松延昭: HIBCH 欠損症の同定と変異タンパク質の生化学的解析. 第 56 回日本先天代謝異常学会. 仙台, 2014 年 11 月

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

特になし。

ミトコンドリア病モデル細胞ならびにモデルマウスを駆使したピルビン酸ナトリウム療法に関する研究

研究分担者 中田 和人 筑波大学生命環境系 教授

#### 研究要旨

本研究では、変異型ミトコンドリアゲノム (mtDNA) を導入したミトコンドリア病モデル細胞ならびにモデルマウス群を活用し、ピルビン酸ナトリウム療法の有効性を検討することを最終目的としている。今年度は、ミトコンドリア病状態にある細胞において投与したピルビン酸がミトコンドリアマトリクスに取り込まれ、TCA サイクルの基質として利用される可能性を考察するために、欠失型 mtDNA を含有したマウス培養細胞ならびにマウスの臓器におけるピルビン酸輸送体の発現変化を解析した (実験1)。さらに、欠失型 mtDNA を含有したモデルマウスにピルビン酸ナトリウムを経口投与し、血中乳酸値の変化をモニターした (実験2)。実験1の結果として、変異型 mtDNA の蓄積とともにピルビン酸輸送体の発現が上昇することが分かった。これは、投与されたピルビン酸が、特にミトコンドリア病状態の細胞では、ミトコンドリアマトリクスに運ばれ、エネルギー産生に利用される可能性を強く示唆している。また、実験2から、ピルビン酸ナトリウムの投与によってモデルマウスの高乳酸血症が改善する可能性を見出すことができた。

#### A. 研究目的

ミトコンドリアゲノム(mtDNA)に生じた欠失突然変異や点突然変異が、ミトコンドリア病のみならず、糖尿病や神経変性疾患、さらにはがんや老化など、多様な疾患の原因になる可能性が示唆されている現在、変異型mtDNA分子種を起点とした多様な病態発症機構の解明とそれらの有効な治療法の探索は急務である。本研究では、変異型mtDNAを導入したモデルマウス群の作製とその活用から、変異型mtDNAの病原性発症機構の分子基盤とその病理の解明を目指すとともに、これらのモデルマウスを活用したピルビン酸ナトリウム療法の有用性を検討することを目的としている。

ミトコンドリア病に対するピルビン酸ナトリウム療法の効果は、1) 細胞内のピルビン酸を増加させることで解糖系の駆動に必須であるNAD<sup>+</sup>量を増加させ、結果として解糖系によるATP産生をさらに惹起させる、2) 細胞内の乳酸/ピルビン酸比を低下させることで高乳酸状態を改善させる、3) 細胞内のピルビン酸を増加させることで、TCAサイクルの基質であるピルビン酸を増加させることで、結果としてTCAサイクル～電子伝達系を活性化し、ATP産生を増強させる、4) 細胞内外での抗酸化作用が期待できる、などが想定されている。特に、TCAサイクル以降の代謝経路に異常を来しているミトコンドリア病では、前述の3)の効果による病態改善は極めて重要かつ独創的な代謝療法となる。

そこで今年度は、ミトコンドリア病状態のモデル細胞やマウスの臓器を活用して、これらにおけるピルビン酸輸送体の発現変化を調べた。この発現変化から、投与されたピルビン酸がミトコンドリアマト

リクスに運搬されるための生体環境が、実際のミトコンドリア病状態の細胞にあるのか、否かを考察しようと考えた (実験1)。また、欠失型mtDNAを導入したモデルマウスにピルビン酸ナトリウム療法を実施し、高乳酸血症の改善効果についても解析した (実験2)。

#### B. 研究方法

##### 実験1：

前述のように、ピルビン酸ナトリウム療法ではTCAサイクルの基質であるピルビン酸の細胞内濃度が上昇するため、TCAサイクル～電子伝達系によるミトコンドリアエネルギー産生が増強される可能性がある。しかしこのような反応には、細胞質のピルビン酸をミトコンドリアマトリクスにリクルートするピルビン酸輸送体 (Mitochondrial Pyruvate Carrier: MPC1とMPC2) の発現が律速となる。そこで、欠失型mtDNAを含有したマウス培養細胞 (欠失型mtDNAを0%～91%含有) ならびに既に採取済みの欠失型mtDNAを含有した心筋組織 (欠失型mtDNAを0%～86%含有) におけるMPC1とMPC2のmRNA量とタンパク質量をReal-time PCR法とウェスタンブロッティング法にてそれぞれ解析した。

##### 実験2：

欠失型mtDNAを導入したモデルマウスに対するピルビン酸ナトリウム療法の効果を検証するために、12個体のモデルマウス (欠失型mtDNAを33%～71%含有) ならびにコントロールとして欠失型mtDNAを含有しない3個体のマウスに体重 1kg 当たり0.25gのピルビン酸濃度になるようにピルビン酸ナトリウムを経口投与 (1回/1日:投与継続中) した。投

与後の血中乳酸値の変化を測定し、高乳酸血症に対するピルビン酸ナトリウム療法の有効性について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、筑波大学動物実験委員会から承認された実験計画書をもとに、「動物の愛護及び管理に関する法律」「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減等に関する基準」及び「文部科学省基本指針（研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針）」等の関連規則に沿って、実験動物マウスの飼育、麻酔、処置、安楽死、さらには実験従事者の健康維持にも配慮した実験体制を実現し、実施された。

## C. 研究結果

実験 1 :

欠失型mtDNAを含有したマウス培養細胞（欠失型mtDNAを0%~91%含有）におけるMPC1とMPC2のmRNAとタンパク質の量は、含有される欠失型mtDNAがおおよそ80%を超えると顕著に増加することが分かった。一方、欠失型mtDNAを含有した心筋組織（欠失型mtDNAを0%~86%含有）では、含有される欠失型mtDNAが60%を超えるとMPC1のmRNAとタンパク質の量が増加することが分かった。しかし、MPC2のそれらには大きな変化が見られなかった。

実験 2 :

欠失型mtDNAを0%~71%含有するマウスにピルビン酸ナトリウムを投与すると、投与後10分では、含有する欠失型mtDNAの割合に関係なく一過的に血中乳酸値の上昇を見た。しかし、興味深いことに、投与後4時間以降では、欠失型mtDNAの含有率がおおよそ40%を超える個体群の血中乳酸値が投与前のそれより低値になることが分かった。

## D. 考察

実験 1 :

欠失型mtDNAを含有するマウス培養細胞ならびに心筋組織では、含有される欠失型mtDNAの割合が高い状態ではMPCの発現が増加していた（培養細胞ではMPC1とMPC2の両方、心筋組織ではMPC1のみ）。このような結果は、欠失型mtDNAの蓄積をみる細胞では、細胞内のピルビン酸を積極的にミトコンドリアマトリクスにリクルートし、TCAサイクルから電子伝達系へのフラックスを強化していることを示唆している。ピルビン酸ナトリウム療法では、このような代謝適応状態にある細胞にさらにピルビン酸を負荷するため、ミトコンドリアエネルギー産生をさらに惹起できると思われる。この可能性を検証するため、高ピルビン酸状態で欠失型mtDNAを含有するマウス培養細胞を培養し、ATP産生の増加ならびに酸素消費量の増加を検討する予定である。

実験 2 :

欠失型mtDNAを含有するマウスにピルビン酸ナトリウムを投与すると、投与後4時間以降の血中乳酸値は投与前のそれより低値になることが分かった。これは、ピルビン酸ナトリウム療法によって高乳酸血症をコントロールできる可能性を示唆している。特に、生体内の慢性的な高乳酸状態はミトコンドリアエネルギー代謝を負に調節することが分かっているため、慢性的な高乳酸状態を打開できるピルビン酸ナトリウム療法はミトコンドリア病の治療戦略として有効である可能性が高い。現在、欠失型mtDNA

を含有するマウスに対するピルビン酸ナトリウム療法を継続しているため、これらのマウス群の血中乳酸値だけでなく、体重変化、ミトコンドリア病の発症遅延または抑制効果、寿命、組織病理解析などを随時、実施する予定である。これらの解析を総合し、ミトコンドリア病におけるピルビン酸ナトリウム療法の有効性を詳細に評価したい。

## E. 結論

変異型mtDNAの蓄積とともにピルビン酸輸送体の発現が上昇することが示され、投与されたピルビン酸が、特にミトコンドリア病状態の細胞では、ミトコンドリアマトリクスに運ばれ、エネルギー産生に利用される可能性を示唆された。

## F. 健康危険情報

本研究では人に関する健康危険情報は存在しない。また、現状、マウスにピルビン酸ナトリウムを投与してもマウスの飼育・維持・健康に顕著な異常は見られていない。マウスへの経口投与も熟練者が実施しているため、経口投与による死亡例は見られていない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Haruka Yamanashi, Osamu Hashizume, Hiromichi Yonekawa, Kazuto Nakada, and Jun-Ichi Hayashi. Administration of an Antioxidant Prevents Lymphoma Development in Transmitochondrial Mice Overproducing Reactive Oxygen Species. *Exp. Anim.*, 63: 459-466, 2014 (査読あり)
- 2) Takehiro Takahashi, Masashi Yamamoto, Kazutoshi Amikura, Kozue Kato, Takashi Serizawa, Kanako Serizawa, Daisuke Akazawa, Takumi Aoki, Koji Kawai, Emi Ogasawara, Jun-Ichi Hayashi, Kazuto Nakada, and Mie Kainoh. A Novel MitoNEET Ligand, TT01001, Improves Diabetes and Ameliorates Mitochondrial Function in db/db Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 352: 338-345, 2015 (査読あり)
- 3) Takayuki Mito, Hikari Ishizaki, Michiko Suzuki, Hitomi Morishima, Azusa Ota, Kaori Ishikawa, Kazuto Nakada, Akiteru Maeno, Toshihiko Shiroyoshi, and Jun-Ichi Hayashi. Transmitochondrial mito-mice and mtDNA mutator mice, but not aged mice, share the same spectrum of musculoskeletal disorders. *BBRC*, 456: 933-973, 2015 (査読あり)
- 4) Akinori Shimizu, Takayuki Mito, Osamu Hashizume, Hiromichi Yonekawa, Kaori Ishikawa, Kazuto Nakada, and Jun-Ichi Hayashi. G7731A mutation in mouse mitochondrial tRNA(Lys) regulates late-onset disorders in transmitochondrial mice. *BBRC*, 459: 66-70, 2015.
- 5) Osamu Hashizume, Haruka Yamanashi, Makoto M. Taketo, Kazuto Nakada, and Jun-Ichi Hayashi. A Specific Nuclear DNA Background Is Required for High Frequency Lymphoma Development in Transmitochondrial Mice with G13997A mtDNA. *PLoS ONE* 10: e0118561. doi:10.1371/journal.pone.0118561, 2015 (査読あり)

## 2. 学会発表

- 1) Kazuto Nakada “Model mouse studies: Regulation of threshold effects on pathogenesis of mitochondrial DNA-based diseases” Euromit 2014, Tampere, Finland, 15<sup>th</sup> June, 2014 (招待講演)
- 2) 中田和人「ミトコンドリア遺伝子疾患の病態発現機構」アディポ・サイエンスシンポジウム、千里ライフサイエンスセンター、2014年8月23日 (招待講演)
- 3) 中田和人、石原直忠、林純一「突然変異型ミトコンドリアゲノムの病原性制御～ミトコンドリア・ダイナミクスの関与～」第87回日本生化学会大会、4S04a-5 細胞と個体におけるミトコンドリアの形成と機能維持、国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都、2014年10月18日 (招待講演)
- 4) 中田和人「ミトコンドリアセントラルドグマの破綻病理に関する基礎研究」国立遺伝学研究所研究集会～オルガネラゲノムに支配される生命現象～、国立遺伝学研究所、2014年11月7日 (招待講演)

## 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