

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の生化学的スクリーニング法の開発に関する研究

研究分担者 村山 圭 千葉県こども病院代謝科 部長

研究要旨

ミトコンドリア病は新生児期から成人まで幅広く発症するエネルギー産生異常に基づく遺伝性疾患であり、その頻度は 5000 人に 1 人ともいわれている。ピルビン酸ナトリウムはミトコンドリア病における高乳酸血症に基づく病態を改善させる生化学的合理性に基づいた数少ない薬剤である。本研究において、今年度も引き続き患者エントリー・患者サンプリングに関わった。全国から依頼のあったミトコンドリア病疑い症例に対して酵素診断を行うことで本症の診断を行った。また当院でミトコンドリア病と診断し外来フォローしている 6 症例（今年度は 1 人加わった）にピルビン酸ナトリウムの投与を行い、その効果をみた。体重増加や動きの増加に加え MELAS 症例は高乳酸血症が改善するなど投薬の効果が認められた。

A. 研究目的

ミトコンドリア病(MRCD)は少なくとも 5000 人に 1 人の割合で発症する、最も頻度の高い先天代謝異常症であり、その症状、臨床病型は多彩である。これまで有効な治療法がない小児難病である。本研究の目的は、MRCD の酵素診断を確実にし、新しい治療として出てきたピルビン酸ナトリウム（以下ピルビン酸 Na）治療へと結びつけて行くことである。

B. 研究対象と方法

診断について

本研究で対象とした症例は、Bernier らの MRCD 診断基準において“可能性例 (possible)”以上を満たした症例である。平成 27 年 12 月末現在、日本全国の臨床医(主に小児科医)の協力により、合計 1268 症例から 1964 検体(皮膚線維芽細胞 968 検体、肝臓 409 検体、筋肉 404 検体、心臓 183 検体)の

提供を頂いた。臨床症状は、新生児致死性高乳酸血症から Leigh 脳症、慢性肝不全を呈する肝型ミトコンドリア DNA 枯渇症候群など多岐にわたる。試料は、組織については - 80 にて保存された肝や筋肉の一片をホモジナイズし、600G にて遠心後の上清を用いた。また皮膚線維芽細胞については、ミトコンドリア分画を単離したあと、界面活性剤であるドデシルマルトシドまたは Triton X によって可溶化し行った。酵素活性は分光光度計を用い、光化学的に呼吸鎖 I, II, III, IV 及び対象としてクエン酸合成酵素(Citrate Synthase; CS)を測定した。呼吸鎖酵素活性は CS 及び Complex II との相対比で表し、対照 12 人の平均に対する % で示した。

Blue-native PAGE 解析は 4 ~ 13% 濃度勾配ゲルを用いて展開し、イムノプロット法を用いて呼吸鎖複合体の量と大きさを解析した。呼吸鎖複合体に対する各種モノクロ

ーナル抗体を用いて行った。

ピルビン酸 Na について

前述の診断法にて診断された 6 症例について、ピルビン酸 Na の投与を行った。本年度は 1 人新規症例として加わった。投与量は 0.25 0.5kg/kg/day で行い、体重増加に伴い量の調整を行った。

倫理面への配慮

検体検査にあたっては、患者さんご家族に十分説明した上で、千葉県こども病院倫理委員会において承認された検査同意書・承諾書を頂いた後に行った。

C. 研究結果

診断数

今年度は全国の小児科医から 261 例の検査依頼を受け付けた(断った症例は一例もない)。受け付けた検体は、皮膚線維芽細胞 197 例、筋肉 73 例、肝臓 106 例、心筋 73 例であった。そのうち MRCD と診断した症例は 66 例であった。診断された 66 例のうち、神経筋疾患及び突然死症例がそれぞれ 21 例、乳児ミトコンドリア病が 7 例、肝症 11 例、心筋症が 6 例、突然死症例が 21 例であった。酵素診断では Complex I 欠損症 36 例、Complex II 欠損症 2 例、Complex IV 欠損症 6 例、複合型酵素欠損症 19 例であり、mtDNA 解析のみで診断に至ったものは 3 例であった。

これまでにサンプルを提供して頂いた 1268 症例のうち、402 症例(33%)を、MRCD と診断した。各年度別の診断数を図 1 に示したが、年々増加の一途を辿っている。また各臨床診断を図 2 に示す。この中で、神経疾患(Leigh 脳症、MELAS などのサイトパチー、神経変性疾患)は全体の 41%を占めた。

図 1. 年度別 MRCD 診断数

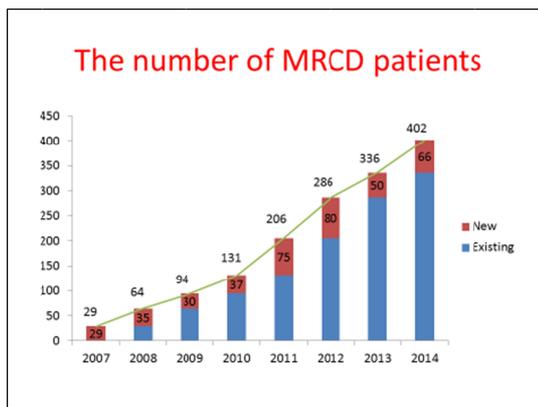
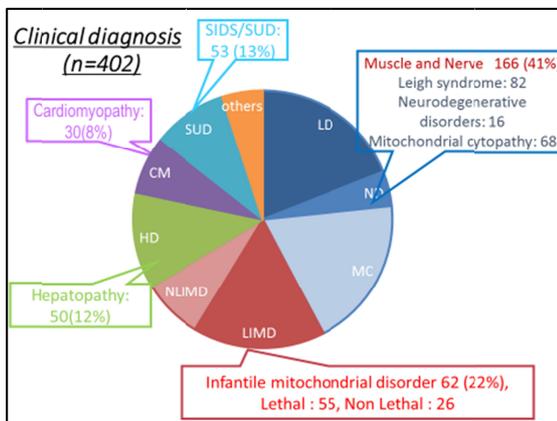


図 2 MRCD の臨床分類別の症例数



ピルビン酸 Na が投与された 6 例の患者概要を図 3 に示す。平均年齢が 8.3 歳で投与期間は約 197 日だった。診断の内訳は Leigh 脳症が 3 例、MELAS が 2 例、PDHC 欠損症が 1 例である。多くの症例でけいれんや呼吸のコントロールがしやすくなり、身体を動かしやすくなるなどの機能改善も認めた(図 4)。一方、副作用として下痢が認められた症例があったが増悪せず投薬を続行できた。

図3 ビルビン酸Na投与の患者概要

患者概要	
【症例数】	6【今回の対象期間】
	2013/2/4 ~ 2015/3/20
【患児平均年齢】	8.3才 (1Y11M ~ 18Y7M)
【平均投与期間】	479 日 (min65 ~ max659)
【ビルビン酸Na投与量】	0.5 g/kg/日 分3

図4 ビルビン酸Na投与6症例のまとめ

6症例のまとめ
【臨床経過】
けいれん・呼吸コントロールは多くの症例で出来ており、身体を動かしやすい等身体機能の改善もみられる。
2症例で約9か月で10%以上体重増加を認める。
乳酸値の改善は認めないが、臨床症状の改善がみられる症例があった。
副作用としては、下痢が多い
【L/D】
乳酸: いずれも高値。緩徐な減少例認める。
L/Pratio: (PDHC欠損症) 以外は比較的高値
期間を通じて、変化乏しく、改善は見られない
AKBR: いずれの症例も正常値0.7以上
投与期間を通じて、肝細胞障害は認められない
Ala: 高アラニン血症改善見られる症例もあるが、まちまち

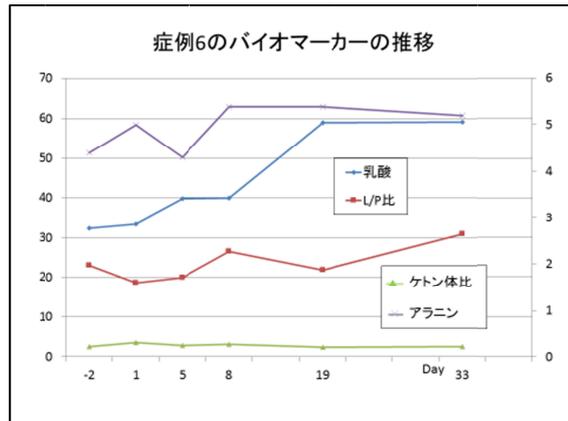
新規症例に関して患者プロフィールおよび経過を図5・6に示す。本症例は典型的なMELASであり、投与後に症状は改善しているものの、を乳酸値やLP比、AKBR、血中アラニンなどのバイオマーカーの改善は認めなかった(図7)。

図5・6 新規患者(MELAS症例)のプロフィール・経過

症例 男児 13Y2M
【診断】 MELAS
5歳より嘔吐発作みられ、10歳時に脳卒中様発作で診断にいたった。血液にてA3243G遺伝子変異あり
【患者背景】
父:日本人、母:中国人。父の仕事のため中国に長期滞在。一部介助を要するが自力歩行可能。
併存症: てんかん、糖尿病、難聴、皮質盲、知的退行
【ビルビン酸Na治療開始前の処方】
アルギニン、イーケブラ、ミトコンドリアカクテル(VitB1,VitC,VitH, VitE,CoQ,カルニチン)⇒ビルビン酸Na 9g分3 毎食後追加
【治療開始年齢】 13Y1M

【経過】
12Y11M(開始前2か月)より間代性けいれんが頻発
Day0 脳卒中発作あり、ビルビン酸Na開始。
Day1 部分発作にミダゾラム持続投与
Day4 下痢の出現ないことを確認しビルビン酸Naを9⇒18gに増量
Day5 ミダゾラムよりマイスタンに変更
治療開始時体重33kg、開始後1か月で1kgの体重増加あり。
Day63現在 発作なく全身状態安定している。
ビルビン酸使用開始後、血液データの改善はみられなかった。部分発作はみられるものの、頻発していた間代性けいれんはみられなくなった。

図7 バイオマーカーの推移



D. 考察

MRCNDは、非常に多い先天代謝異常症であり、発症年齢も様々である。酵素診断から包括的遺伝子診断といった診断システムの確立は、早期治療にも結びつくことになり、非常に重要である。今年度から厚生労働科

学研究委託費(難治性疾患実用化研究事業)の「ミトコンドリア病診療の質を高める、レジストリシステムの構築、診断基準・診療ガイドラインの策定および診断システムの整備を行う臨床研究」班(主任研究者:村山)が立ち上がり、診療指針の策定、レジストリ策定、特殊診断システムの確立を柱にしている。このシステムからピルビン酸ナトリウムなどの新しい知見への組み込みは、非常に重要なことである。また、ピルビン酸 Na を投与したケースは大きな副作用なく投与できている。有意なバイオマーカーの改善はみられなかったが、ご両親の主観的な要因による肯定的な評価もみられた。特に呼吸サポートやけいれんコントロールの改善は客観的な評価であり、それなりの効果が認められたといえる。FGF21 や GDF15 などの有用なバイオマーカーの普及が待たれる。

E. 結論

本年も引き続きミトコンドリア病の生化学診断を行い、ピルビン酸ナトリウム投与へのエントリーを行った。ピルビン酸 Na は MRCD において明らかな臨床的効果を認めており、本剤を含めた新しい治療薬の開発が待たれる。効果を明らかにさせるためには新しいバイオマーカーによる評価が必要である。

以上に関連した論文として、2015 年 3 月までに文献 1-9)を公表した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Brea-Calvo G, Haack TB, Karall D, Ohtake A, Invernizzi F, Carozzo R, Kremer L, Dusi S, Fauth C, Scholl-Bürgi S, Graf E, Ahting U, Resta N, Laforgia N, Verrigni D, Okazaki Y, Kohda M, Martinelli D, Freisinger P, Strom TM, Meitinger T, Lamperti C, Lacson A, Navas P, Mayr JA, Bertini E, Murayama K, Zeviani M, Prokisch H, Ghezzi D. COQ4 Mutations Cause a Broad Spectrum of Mitochondrial Disorders Associated with CoQ10 Deficiency. *Am J Hum Genet.* 2015 Feb 5;96(2):309-17. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.12.023.
2. Kopajtich R, Nicholls TJ, Rorbach J, Metodiev MD, Freisinger P, Mandel H, Vanders A, Ghezzi D, Carozzo R, Taylor RW, Marquard K, Murayama K, Wieland T, Schwarzmayer T, Mayr JA, Pearce SF, Powell CA, Saada A, Ohtake A, Invernizzi F, Lamantea E, Sommerville EW, Pyle A, Chinnery PF, Crushell E, Okazaki Y, Kohda M, Kishita Y, Tokuzawa Y, Assouline Z, Rio M, Feillet F, Mousson de Camaret B, Chretien D, Munnich A, Menten B, Sante T, Smet J, Régal L, Lorber A, Khoury A, Zeviani M, Strom TM, Meitinger T, Bertini ES, Van Coster R, Klopstock T, Rötig A, Haack TB, Minczuk M, Prokisch H. Mutations in GTPBP3 Cause a Mitochondrial Translation Defect Associated with Hypertrophic Cardiomyopathy, Lactic Acidosis, and Encephalopathy. *Am J Hum Genet.* 2014 Dec 4;95(6):708-20. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.10.017. *Epub* 2014 Nov 26.
3. Kunii M, Doi H, Higashiyama Y, Kugimoto C, Ueda N, Hirata J, Tomita-Katsumoto A, Kashikura-Kojima M, Kubota S, Taniuchi M, Murayama K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Matsumoto N, Tanaka F. A Japanese case of cerebellar ataxia, spastic paraparesis and deep sensory impairment associated with a novel homozygous TTC19 mutation. *J Hum Genet.* 2015 Feb 5. doi: 10.1038/jhg.2015.7. [Epub ahead of print]
4. Montassir H, Maegaki Y, Murayama K, Yamazaki T, Kohda M, Ohtake A, Iwasa H, Yatsuka Y, Okazaki Y, Sugiura C, Nagata I, Toyoshima M, Saito Y, Itoh M, Nishino I, Ohno K. Myocerebrohepatopathy spectrum disorder due to POLG mutations: A clinicopathological report. *Brain Dev.* doi: 10.1016/j.braindev.2014.10.013. [Epub ahead of print]
5. Uehara N, Mori M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Tamaru S, Kohda M, Moriyama Y, Nakachi Y, Matoba N, Sakai T, Yamazaki

- T, Harashima H, Murayama K, Hattori K, Hayashi J, Yamagata T, Fujita Y, Ito M, Tanaka M, Nibu K, Ohtake A, Okazaki Y. New MT-ND6 and NDUFA1 mutations in mitochondrial respiratory chain disorders. *Ann Clin Transl Neurol.* 2014 May;1(5):361-9. doi: 10.1002/acn3.59. Epub 2014 Apr 28.
6. Fukao T, Akiba K, Goto M, Kuwayama N, Morita M, Hori T, Aoyama Y, Venkatesan R, Wierenga R, Moriyama Y, Hashimoto T, Usuda N, Murayama K, Ohtake A, Hasegawa Y, Shigematsu Y, Hasegawa Y. The first case in Asia of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) with atypical presentation. *J Hum Genet.* 2014 Sep 18. doi: 10.1038/jhg.2014.79. [Epub ahead of print]
7. Fujii T, Nozaki F, Saito K, Hayashi A, Nishigaki Y, Murayama K, Tanaka M, Koga Y, Hiejima I, Kumada T. Efficacy of pyruvate therapy in patients with mitochondrial disease: a semi-quantitative clinical evaluation study. *Mol Genet Metab.* 2014 Jun;112(2):133-8. doi: 10.1016/j.ymgme.2014.04.008. Epub 2014
8. 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: Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders: exome sequencing for disease gene identification. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Apr;1840(4):1355-9. doi:10.1016/j.bbagen. 2014.

邦文

- 1) 村山 圭 テーマ：IV消化器疾患 ミトコンドリア肝症 小児疾患診療のための病態生理 1改訂第5版 「小児内科」「小児外科」編集委員会共編 東京医学社 692 - 696
- 2) 村山 圭 各論：肝胆道疾患、II胆汁うっ滞 ミトコンドリア肝疾患 小児栄養消化器肝臓病学 日本小児栄養消化器肝臓学会編集 診断と治療社 432 - 434, 2014
- 3) 村山 圭 各論III ミトコンドリア代謝異常症・Mitochondrial Disease 4.各疾患について (2)ミトコンドリア呼吸鎖異常症 a) Complex I (ミトコンドリア呼吸鎖複合体I)欠損症 代謝性ミオパチー 診断と治療社 201-204, 2014
- 4) 村山 圭 各論III ミトコンドリア代謝異常症・Mitochondrial Disease 4.各疾患について (2)ミトコンドリア呼吸鎖異常症 b) Complex II(ミトコンドリア呼吸鎖複合体II)欠損症 代謝性ミオパチー 診断と治療社 205-208, 2014

- 5) 村山 圭 各論III ミトコンドリア代謝異常症・Mitochondrial Disease 4.各疾患について (2)ミトコンドリア呼吸鎖異常症 c) Complex III (ミトコンドリア呼吸鎖複合体III)欠損症 代謝性ミオパチー 診断と治療社 209-212, 2014
- 6) 村山 圭 各論III ミトコンドリア代謝異常症・Mitochondrial Disease 4.各疾患について (2)ミトコンドリア呼吸鎖異常症 d) Complex IV (ミトコンドリア呼吸鎖複合体IV)欠損症 代謝性ミオパチー 診断と治療社 213-216, 2014
- 7) 村山 圭 各論III ミトコンドリア代謝異常症・Mitochondrial Disease 4.各疾患について (2)ミトコンドリア呼吸鎖異常症 e) Complex V (ミトコンドリア呼吸鎖複合体V)欠損症 代謝性ミオパチー 診断と治療社 217-220, 2014

2. 学会発表

Murayama K et al. Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: Exome sequencing for disease genes identification 欧州先天代謝異常学会 2014.9.5 インスブルック

G. 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