

難治性ミトコンドリア病患者 4 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 4 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 NPMDS 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。

呼吸鎖酵素診断により全国からの依頼患者 399 家系 403 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 88 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 53 例、腸症、その他と極めて多岐にわたっていた。210 例についてミトコンドリア遺伝子解析を行い、既知・未知を合わせて病因と考えられる遺伝子変異を 59 例（28%）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。142 例についてエキソーム解析が終了し、まず 25 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 10 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 52 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4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。3歳時に言語発達遅滞を指摘され、6歳児にけいれん群発で発症した14453A>G変異を持つMELASの8歳の女児。

病因解析システムは、1,240 家系 1,270 症例から得た 2078 検体（皮膚線維芽細胞 977 検体、肝臓 426 検体、筋肉 418 検体、心臓 198 検体、腎臓 45 検体、脳 10 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）

本研究の患者解析の部分は申請番号 482（現在更新されて 482-IX）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NPMDS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。

現在までのところ、399 家系 403 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88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53例、腸症、その他と極めて多岐にわたっていた。

210例についてミトコンドリア遺伝子解析を行い、既知・未知を合わせて病因と考えられる遺伝子変異を59例(28%)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。

142例についてエキソーム解析が終了し、まず25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10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52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。

以上の結果を元に可能性のある薬物についても検討を行った。その結果、5-アミノレブリン酸(5-ALA)が一部の患者細胞のATP合成能を回復し、その機序は主に呼吸鎖IIIとIVの活性回復であることを確認した。

D. 考察

何れの症例も自発運動、筋力の改善を認め、治療による副作用は認めなかった。NPMSなどは現在集計中である。ピルビン酸ナトリウム投与は、ミトコンドリア病に対する有望な治療ではあるが、その評価法については検討の余地がある。

ミトコンドリア病に対する系統的病因探索システムについても、今後例数を増やして検討を重ね、日本と世界の症例の趨勢の比較等も行っていきたい。

E. 結論

呼吸鎖酵素診断により全国からの依頼患者につき、ミトコンドリア呼吸鎖異常症(MRCD)の系統的な診断解析を行い、核の新規遺伝子スクリーニングシステムを確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kondo H, Tanda K, Tabata C, Hayashi K, Kihera M, Kizaki Z, Taniguchi-Ikeda M, Mori M, Murayama K, Ohtake A: Leigh syndrome with Fukuyama congenital muscular dystrophy: A case report. *Brain Dev* 36(8): 730-3, 2014. doi: 10.1016/j.braindev.2013.09.005. Epub 2013 Oct 7.
- 2) 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. doi: 10.1111/ped.12249. Epub 2014 Mar 6.
- 3) Ohtake A, Murayama K, Mori M, Harashima H, Yamazaki T, Tamaru S, Yamashita Y, Kishita Y, Nakachi 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* 1840(4):1355-1359, 2014. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.01.025. Epub 2014 Jan 24.

- 4) Nagasaka H, Tsukahara H, Okano Y, Hirano K, Sakurai T, Hui S-P, Ohura T, Usui H, Yorifuji T, Hirayama S, Ohtake A, Miida T: Changes of lipoproteins in phenylalanine hydroxylase-deficient children during the first year of life. *Clin Chim Acta* 433:1-4, 2014. doi: 10.1016/j.cca.2014.02.020. Epub 2014 Mar 5.
- 5) Saitsu H, Tohyama J, Walsh T, Kato M, Kobayashi Y, Lee M, Tsurusaki Y, Miyake N, Goto Y, Nishino I, Ohtake A, King M-C, Matsumoto N: A girl with West syndrome and autistic features harboring a de novo TBL1XR1 mutation. *J Hum Genet* 59(10):581-3, 2014. doi: 10.1038/jhg.2014.71. Epub 2014 Aug 7.
- 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* 59(11): 609-14, 2014. doi: 10.1038/jhg.2014.79. Epub 2014 Sep 18.
- 7) Uehara N, Mori M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Tamaru S, Kohda M, Moriyama Y, Nakachi Y, Matoban 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* 1(5):361-9, 2014. doi: 10.1002/acn3.59. Epub 2014 Apr 28. PMID: 25356405 [PubMed]
- 8) Izumi Y, Musha I, Suzuki E, Iso M, Jinno T, Horikawa R, Amemiya S, Ogata T, Fukami M, Ohtake A: Hypogonadotropic Hypogonadism in a Female Patient Previously Diagnosed as Having Waardenburg Syndrome Due to a *SOX10* Mutation. *Endocrine*. 2014 Oct 2. [Epub ahead of print]
- 9) Kopajtich R, Nicholls TJ, Rorbach J, Metodiev MD, Freisinger P, Mandel H, Vanlander A, Ghezzi D, Carozzo R, Taylor RW, Marquard K, Murayama K, Wieland T, Schwarzmayr 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, de Camaret BM, 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* 95(6):708-20, 2014. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.10.017. Epub 2014 Nov 26.
- 10) 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: Myocerebrohepat

- opathy spectrum disorder due to *POLG* mutations: A clinicopathological report. *Brain Dev.* 2014 Nov 18. pii: S0387-7604(14)00261-7. doi: 10.1016/j.braindev.2014.10.013. [Epub ahead of print]
- 11) Akatsuka J, Mochizuki M, Musha I, Ohtake A, Kobayashi K, Kikuchi T, Kikuchi N, Kawamura T, Urakami T, Sugihara S, Hoshino T, Amemiya S: The Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes: The ratio of glycated albumin to hemoglobin A1c measured in IFCC units accurately represents the glycation gap. *Endocr J* 62(2): 161-172, 2015. 2014 Nov 2. [Epub ahead of print]
- 12) Nozaki F, Kumada T, Kusunoki T, Fujii T, Murayama K, Ohtake A: Fever of Unknown Origin as the Initial Manifestation of Valproate-Induced Fanconi Syndrome. *Pediatr Neurol* 51(6): 846-849, 2014. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2014.09.007. Epub 2014 Sep 21.
- 13) Brea-Calvo G, Tobias B Haack, 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* 96: 309-317, 2015. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.12.023. Epub 2014 Dec.
- 14) Shimbo H, Takagi, M, Okuda M, Tsuyusaki Y, Takano K, Iai M, Yamashita S, Murayama K, Ohtake A, Goto Y, Aida N, Osaka H: A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome. *Mol Genet Metab* in press, 2015.
- 15) Haack T, Jackson C, Murayama K, Kremer L, Schaller A, Kotzaeridou U, de Vries M, Schottmann G, Santra S, Büchner B, Wieland T, Graf E, Freisinger P, Eggimann S, Ohtake A, Okazaki Y, Kohda M, Kishita Y, Tokuzawa Y, Sauer S, Memari Y, Kolb-Kokocinski A, Durbin R, Hasselmann O, Cremer K, Albrecht B, Wieczorek D, Engels H, Hahn D, Zink A, Alston C, Taylor R, Rodenburg R, Trollmann R, Sperl W, Strom T, Hoffmann G, Mayr J, Meitinger T, Bolognini R, Schuelke M, Nuffer J-M, Kölker S, Prokisch H, Klopstock T: Deficiency of multifunctional ECHS1 causes mitochondrial encephalomyopathy. *Ann Clin Transl Neurol*, in press, 2015.
- 16) Abe Y, Terashima H, Hoshino H, Sassa K, Sakai T, Ohtake A, Kubota M, Yamanouchi H: Characteristic MRI features of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Brain Dev.* 2015 Feb 13. pii: S0387-7604(15)00022-4. doi: 10.1016/j.braindev.2015.01.006. [Epub ahead of print]

2.学会発表

以下の患者会フォーラムの実施

- 1) 第3回先天代謝異常症患者会フォーラム 2014.11.9 TKP ガーデンシティ品川
- 2) 第4回有機酸・脂肪酸代謝異常症 医師と患者のシンポジウム 2014.12.6 TKP 品川カンファレンスルーム

G . 知的財産権の出願・登録状況

特になし