

疑い例 (1)①～⑤のうち1項目以上あり、かつ(2)①～⑥のうち、1項目以上を満たすもの(計2項目必要)

<重症度分類>

中等症以上を対象とする。

評価法

1) セクション1～3について

点数の平均をとり、

軽症: 平均が2以下

中等症: 平均2以上

重症: 平均3以上

尚、小児(6歳以上)で評価が困難な場合は、評価できた項目の平均点を用いる。

2) セクション4～9について

点数3以上のセクションが2つ以上、点数4以上のセクションが1つ以上ある場合は、重症とする。また、点数2以上のセクションが2つ以上、点数3位以上のセクションが1つ以上ある場合は中等症とする。それ以外の場合で、何らかのセクションに点数がある場合を軽症とする。すべてのセクションに点数がない場合を正常とする。

3) 総合評価

セクション1～3とセクション4～9の評価のうち、重症度が高い方を総合的な重症度とする。但し、共に中等度の場合は、少なくとも二つ以上の臓器に中等度障害があると判定できるので、総合的な評価を重症とする。

セクション1: 日常生活動作(ADL)

A. 会話

0 正常

1 軽度障害 会話は理解できる

2 中等度障害 聴きなおされる事がある

3 重度障害 しばしば聴きなおされる

4 最重度障害 ほとんど内容が聞き取れない

B. 嚥下

0 正常

1 まれにむせる

2 時にむせる

3 刻み食あるいはペースト食

4 経管栄養または胃瘻

C. 書字

0 正常

- 1 軽度障害 わずかに小字あるいはゆっくり書字
- 2 中等度障害 小さいが判読可能
- 3 重度障害 すべてではないが大半が判読不能
- 4 最重度障害 ほとんど判読不能

D. 食事

- 0 正常
- 1 やや緩慢で不器用だが介助不要
- 2 自分で一口サイズにすることができるが、一部介助は必要
- 3 一口サイズにすると、自分で食べることはできる
- 4 全介助

E. 更衣

- 0 正常
- 1 やや緩慢で不器用だが介助不要
- 2 時にボタンや着衣に介助が必要
- 3 多くの介助を要するが自分でできることもある
- 4 全介助

F. 洗面・入浴

- 0 正常
- 1 やや緩慢で不器用だが介助不要
- 2 入浴介助が必要あるいは非常に緩慢で時間を要す
- 3 洗顔、歯磨き、風呂場に行くのに介助を要す
- 4 全介助

G. 発作症状(片頭痛、けいれんなど)

- 0 なし
- 1 1回/月未満
- 2 1回/月～1回/週
- 3 1回/週～1回/日
- 4 1回/日以上、痙攣重積

セクション2: 高次脳機能

A. 記銘力、見当識

- 0 正常
- 1 軽度障害 (日常的に問題にならない程度だが、一部に健忘がある)
- 2 中等度障害 (見当識障害はあるが、簡単な対応はできる)
- 3 重度障害 (時間や場所の見当識障害があり、日常生活が著しく困難)
- 4 最重度障害 (人に対する見当識はあるが、日常生活上の対応能力は皆無)

B. 動機付けと意欲

- 0 正常

- 1 何となく気力がない
- 2 気力がなく、限定した興味
- 3 気力がなく、日常生活が制限される
- 4 どんな作業でも遂行することができない

### セクション3: 運動

#### A. 近位筋の筋力(修正 MRC: modified Medical Research Council scale)

- 0 正常
- 1 軽度筋力低下(MRC4)
- 2 中等度筋力低下、抗重力運動可能(MRC3)
- 3 重度筋力低下、抗重力運動不能(MRC2)
- 4 最重度筋力低下(MRC0~1)

#### B. 上肢の協調運動(修正 ICARS: International Cooperative Ataxia Scale)

- 0 正常
- 1 軽度協調障害
- 2 中等度協調障害、書字に影響はあるものの日常生活動作に問題なし
- 3 重度協調障害、書字不能
- 4 最重度協調障害、食事摂取不能

#### C. 歩行

- 0 全く問題なし
- 1 軽度障害、1~2km 歩行で疲労
- 2 中等度障害、健常人について歩くのが困難
- 3 重度障害、100~400mで休息が必要
- 4 最重度障害、10m以上歩けない

#### D. 中等度の運動・活動(階段昇降、トイレに行くなど)

- 0 制限なし
- 1 わずかに制限あり
- 2 中等度に制限あり
- 3 高度に制限あり
- 4 不可能

### セクション4: 視覚

- 0 正常
- 1 普通の大きさの活字が読めない
- 2 標準拡大の活字が読めない(眼鏡が必要)
- 3 TV をみることができない
- 4 ADL に著しく影響し、視力がほとんどない

#### セクション5:聴覚

- 0 25dBHL 以下(正常)
- 1 25~40dBHL(軽度難聴)
- 2 40~70dBHL(中等度難聴)
- 3 70~90dBHL(高度難聴)
- 4 90dBHL 以上(重度難聴)

※500、1000、2000Hz の平均値で、聞こえが良い耳(良聴耳)の値で判断

#### セクション6:心合併症

- 0 正常心電図、心エコー
- 1 不整脈、軽度左室機能低下(EF>60%)、無症候性心肥大所見
- 2 心エコーで心筋症所見があつてEF<60%、またはペースメーカー装着
- 3 中等度心筋症(EF<40~60%)
- 4 重度心筋症

#### セクション7:腎機能

- 0 正常
- 1 クレアチンクリアランス <50-90%
- 2 クレアチンクリアランス 30-50%
- 3 クレアチンクリアランス 10-30%
- 4 クレアチンクリアランス <10%、または透析が必要

#### セクション8:血液機能

- 0 正常
- 1 軽度の貧血
- 2 中等度の貧血
- 3 高度な貧血、または汎血球減少症
- 4 交換輸血、頻回の輸血が必要な貧血

#### セクション9:肝機能

- 0 正常
- 1 AST、ALT の軽度上昇
- 2 AST、ALT の中等度上昇
- 3 AST、ALT の高度上昇、高アンモニア血症または黄疸

※なお、症状の程度が上記の重症度分類等で一定以上に該当しない者であるが、高額な医療を継続することが必要な者については、医療費助成の対象とする。

# 臨床調査個人票 021. ミトコンドリア病 (新規)

## ■基本情報

<b>氏名</b>			
姓(漢字)	名(漢字)	姓(かな)	名(かな)
<b>住所</b>			
郵便番号		住所	
<b>生年月日等</b>			
生年月日	西暦	年	月 日
出生市区町村	性別		1. 男 2. 女
出生時氏名 (変更のある場合)	姓(漢字)	名(漢字)	姓(かな) 名(かな)
<b>家族歴</b>			
近親者の発症者の有無	1. あり 2. なし 3. 不明 発症者続柄 1. 父 2. 母 3. 子 4. 同胞 (男性) 5. 同胞 (女性) 6. 祖父 (父方) 7. 祖母 (父方) 8. 祖父 (母方) 9. 祖母 (母方) 10. いとこ 11. その他 続柄		
両親の近親結婚	1. あり 2. なし 3. 不明 詳細:		
<b>発病時の状況</b>			
発症年月	西暦	年	月
<b>社会保障</b>			
介護認定	1. 要介護 2. 要支援 3. なし		要介護度 1 2 3 4 5
<b>生活状況</b>			
移動の程度	1. 歩き回るのに問題はない 2. いくらか問題がある 3. 寝たきりである		
身の回りの管理	1. 洗面や着替えに問題はない 2. いくらか問題がある 3. 自分でできない		
ふだんの活動	1. 問題はない 2. いくらか問題がある 3. 行うことができない		
痛み/不快感	1. ない 2. 中程度ある 3. ひどい		
不安/ふさぎ込み	1. 問題はない 2. 中程度 3. ひどく不安あるいはふさぎ込んでいる		
<b>連絡事項</b>			
<b>■診断</b>			
<b>病型</b>			
病型	1. 慢性進行性外眼筋麻痺症候群(OPEO) (Kearns-Sayre症候群を含む) 2. Leigh脳症 3. MELAS 4. ミトコンドリア異常を伴うミオクローヌステんかん (MERRF) 5. レーバー病 6. 生化学的異常が明らかになったミトコンドリア病 (複合体 I、複合体 II 欠損症等) 7. 原因不明な高乳酸血症 8. その他 病型分類 (その他)		

■臨床所見

<b>筋症状</b>	
筋症状の種類	1. 進行性の全身性筋力低下 2. 横紋筋融解症 3. 外眼筋麻痺 4. その他 その他の内容
<b>中枢神経症状</b>	
中枢神経症状の種類	1. 知的退行 2. 記憶力低下 3. 痙攣 4. 精神症状 5. 一過性麻痺 6. 半盲 7. 皮質盲 8. ミオクローヌス 9. ジストニア 10. 小脳失調 11. その他 その他の内容
<b>心症状</b>	
心症状の種類	1. 心伝導障害 2. 拡張型心筋症 3. 肥大型心筋症 4. 肺高血圧症 5. その他 その他の内容
<b>腎症状</b>	
腎症状の種類	1. 糸球体硬化 2. 腎尿細管障害 3. その他 その他の内容
<b>血液症状</b>	
血液症状の種類	1. 貧血 2. その他 貧血の内容 その他の内容
<b>肝症状</b>	
肝症状の種類	1. 肝機能障害 2. 高アンモニア血症 3. その他 肝機能障害の内容 その他の内容
<b>眼症状</b>	
眼症状の種類	1. 強度視力低下 2. 網膜色素変性 3. その他 その他の内容
<b>内耳症状</b>	
感音性難聴の内容	感音性難聴の初発年齢 歳
<b>糖尿病・内分泌異常</b>	
糖尿病・内分泌異常の種類	1. 糖尿病 2. 低身長 3. その他 その他の内容
<b>その他の臓器症状</b>	
その他の臓器症状の内容	

■検査所見

<b>検査年月日</b>			
検査年月日	西暦	年	月 日
<b>血液生化学所見</b>			
赤血球	$\times 10^4 / \mu\text{L}$	Hb	g/dL
白血球	$/ \mu\text{L}$	血小板	$\times 10^4 / \mu\text{L}$
血糖値	空腹時 mg/dL 随時 mg/dL	OGTT (2時間値)	mg/dL
AST	IU/L	ALT	IU/L
血中アンモニア値	$\mu\text{g/dL}$ 基準値 $\mu\text{g/dL}$	クレアチニンクリアランス	%
血清乳酸値	基準値	血清ビルビン酸値	基準値
髄液乳酸値	基準値	髄液ビルビン酸値	基準値
MRスペクトロスコピーによる病変部の乳酸ピーク 1. あり 2. なし 3. 不明			
<b>脳CT (MRI) 所見</b>			
両側対称性の脳病変所見	1. あり 2. なし	部位1. 大脳基底核 2. 脳幹 3. その他	その他の内容
<b>筋生検所見</b>			
ミトコンドリアの病理異常所見	1. あり 2. なし 3. 不明		
<b>生化学所見</b>			
検査材料	1. 骨格筋2. 線維芽細胞3. その他		
<b>ミトコンドリアDNA検査</b>			
変異の種類	1. 点変異 (ヘテロプラスミー) 2. 点変異 (ホモプラスミー) 3. 単一欠失 4. 多重欠失 5. 枯渇 (欠乏) 変異の内容		
変異率 (核DNAに対する比率)	ヘテロプラスミー %	ホモプラスミー %	
<b>核DNA検査</b>			
<b>眼底検査所見</b>			
急性期 (認められるものをチェック)	1. 蛍光漏出を伴わない視神経乳頭の発赤・腫脹 2. 視神経乳頭近傍毛細血管蛇行 3. 網膜神経線維腫大 4. 視神経乳頭近傍の出血		
慢性期 (視力低下の発症から通常6か月以降)	両眼の視神経萎縮所見 1. あり 2. なし		

■重症度

セクション1 :

日常生活動作 (ADL)

A. 会話	1. 正常 (0点) 2. 軽度障害 会話は理解できる (1点) 3. 中等度障害 聴きなおされる事がある (2点) 4. 重度障害 しばしば聴きなおされる (3点) 5. 最重度障害 ほとんど内容が聞き取れない (4点)
B. 嚥下	1. 正常 (0点) 2. まれにむせる (1点) 3. 時にむせる (2点) 4. 刻み食あるいはペースト食 (3点) 5. 経管栄養または胃瘻 (4点)
C. 書字	1. 正常 (0点) 2. 軽度障害 わずかに小字あるいはゆっくり書字 (1点) 3. 中等度障害 小さいが判読可能 (2点) 4. 重度障害 すべてではないが大半が判読不能 (3点) 5. 最重度障害 ほとんど判読不能 (4点)
D. 食事	1. 正常 (0点) 2. やや緩慢で不器用だが介助不要 (1点) 3. 自分で一口サイズにすることができるが、一部介助は必要 (2点) 4. 一口サイズにすると、自分で食べることはできる (3点) 5. 全介助 (4点)
E. 更衣	1. 正常 (0点) 2. やや緩慢で不器用だが介助不要 (1点) 3. 時にボタンや着衣に介助が必要 (2点) 4. 多くの介助を要するが自分でできることもある (3点) 5. 全介助 (4点)
F. 洗面・入浴	1. 正常 (0点) 2. やや緩慢で不器用だが介助不要 (1点) 3. 入浴介助が必要あるいは非常に緩慢で時間を要す (2点) 4. 洗顔、歯磨き、風呂場に行くのに介助を要す (3点) 5. 全介助 (4点)
G. 発作症状 (片頭痛、けいれんなど)	1. なし (0点) 2. 1回/月未満 (1点) 3. 1回/月~1回/週 (2点) 4. 1回/週~1回/日 (3点) 5. 1回/日以上、痙攣重積 (4点)
セクション1 平均	点

セクション2 :

高次脳機能

A. 記銘力、見当識	1. 正常 (0点) 2. 軽度障害 (日常的に問題にならない程度だが、一部に健忘がある) (1点) 3. 中等度障害 (見当識障害はあるが、簡単な対応はできる) (2点) 4. 重度障害 (時間や場所の見当識障害があり、日常生活が著しく困難) (3点) 5. 最重度障害 (人に対する見当識はあるが、日常生活上の対応能力は皆無) (4点)
B. 動機付けと意欲	1. 正常 (0点) 2. 何となく気力がない (1点) 3. 気力がなく、限定した興味 (2点) 4. 気力がなく、日常生活が制限される (3点) 5. どんな作業でも遂行することができない (4点)
セクション2 平均	点

セクション3 :

運動



A. 近位筋の筋力 (修正MRC: modified Medical Research Council scale)	1. 正常 (0点) 2. 軽度筋力低下 (MRC4) (1点) 3. 中等度筋力低下、抗重力運動可能 (MRC3) (2点) 4. 重度筋力低下、抗重力運動不能 (MRC2) (3点) 5. 最重度筋力低下 (MRC0~1) (4点)
B. 上肢の協調運動 (修正ICARS: International Cooperative Ataxia Scale)	1. 正常 (0点) 2. 軽度協調障害 (1点) 3. 中等度協調障害、書字に影響はあるものの日常生活動作に問題なし (2点) 4. 重度協調障害、書字不能 (3点) 5. 最重度協調障害、食事摂取不能 (4点)
C. 歩行	1. 全く問題なし (0点) 2. 1~2km歩行で疲労 (1点) 3. 健常人について歩くのが困難 (2点) 4. 100~400mで休息が必要 (3点) 5. 10m以上歩けない (4点)
D. 中等度の運動・活動 (階段昇降、トイレに行くなど)	1. 制限なし (0点) 2. わずかに制限あり (1点) 3. 中等度に制限あり (2点) 4. 高度に制限あり (3点) 5. 不可能 (4点)
セクション3 平均	点

**セクション4:**  
**視覚**

1. 正常 (0点) 2. 普通の大きさの活字が読めない (1点) 3. 標準拡大の活字が読めない (眼鏡が必要) (2点) 4. TVをみることができない (3点) 5. ADLに著しく影響し、視力がほとんどない (4点)
--

**セクション5:**  
**聴覚**

1. 25dBHL 以下 (正常) (0点) 2. 25~40dBHL (軽度難聴) (1点) 3. 40~70dBHL (中等度難聴) (2点) 4. 70~90dBHL (高度難聴) (3点) 5. 90dBHL 以上 (重度難聴) (4点) ※500、1000、2000Hz の平均値で、聞こえが良い耳 (良聴耳) の値で判断
--

**セクション6:**  
**心合併症**

1. 正常心電図、心エコー (0点) 2. 不整脈、軽度左室機能低下 (EF>60%)、無症候性心肥大所見 (1点) 3. 心エコーで心筋症所見があつてEF<60%、またはペースメーカー装着 (2点) 4. 中等度心筋症 (EF<40-60%) (3点) 5. 重度心筋症 (4点)
---

**セクション7:**  
**腎機能**

1. 正常 (0点) 2. クレアチンクリアランス <50-90% (1点) 3. クレアチンクリアランス 30-50% (2点) 4. クレアチンクリアランス 10-30% (3点) 5. クレアチンクリアランス <10%、または透析が必要 (4点)
--

**セクション8:**  
**血液機能**

1. 正常 (0点) 2. 軽度の貧血 (1点) 3. 中等度の貧血 (2点) 4. 高度な貧血、または汎血球減少症 (3点) 5. 交換輸血、頻回の輸血が必要な貧血 (4点)
--

**セクション9:**  
**肝機能**

1. 正常 (0点) 2. AST、ALT の軽度上昇 (1点) 3. AST、ALT の中等度上昇 (2点) 4. AST、ALT の高度上昇、高アンモニア血症または黄疸 (3点)
--

**評価**

セクション1~3について	セクション1~3 平均	点	評価1. 軽症	2. 中等症	3. 重症	
セクション4~9について	セクション4	点	セクション5	点	セクション6	点
	セクション7	点	セクション8	点	セクション9	点
総合評価	評価1. 正常	2. 軽症	3. 中等症	4. 重症		

■治療その他

人工呼吸器（使用者のみ詳細記入）			
使用の有無	1. あり 2. なし		
以下 有の場合 開始時期	西暦 年 月	離脱の見込み	1. あり 2. なし
種類	1. 気管切開口を介した人工呼吸器 2. 鼻マスク又は顔マスクを介した人工呼吸器		
施行状況	1. 間欠的施行 2. 夜間に継続的に施行 3. 一日中施行 4. 現在は未施行		
生活状況	食事1. 自立 2. 部分介助 3. 全介助 椅子とベッド間の移動1. 自立 2. 軽度の介助 3. 部分介助 4. 全介助 整容1. 自立 2. 部分介助 3. 全介助 トイレ動作1. 自立 2. 部分介助 3. 全介助 入浴1. 自立 2. 部分介助 3. 全介助 移動1. 自立 2. 軽度の介助 3. 部分介助 4. 全介助 階段昇降1. 自立 2. 部分介助 3. 全介助 更衣1. 自立 2. 部分介助 3. 全介助 排便コントロール1. 自立 2. 部分介助 3. 全介助 排尿コントロール1. 自立 2. 部分介助 3. 全介助		

医療機関名	指定医番号
医療機関所在地	電話番号 ( )
医師の氏名	記載年月日：平成 年 月 日
	印

- 診断書には過去6か月間で一番悪い状態の内容を記載してください。 ※自筆または押印のこと  
ただし、診断に関わる項目については、いつの時点のものでも構いません。
- 診断基準、重症度分類については、「難病に係る診断基準及び重症度分類等について」（平成26年11月12日健発1112第1号健康局長通知）を参照の上、ご記入ください。
- 審査のため、検査結果等について別途提出をお願いすることがあります。 Ver. 141107

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
後藤雄一	ミトコンドリア病		小児の治療指針	診断と治療社	東京	2014	831-833
後藤雄一	ミトコンドリア病	一瀬泊帝、鈴木宏治	図説分子病態学	中外医学社	東京	2014	267-271
後藤雄一	DNAポリメラーゼ $\gamma$ 異常症	杉江秀夫	代謝性ミオパチー	診断と治療社	東京	2014	221-224
後藤雄一	ANT1などの遺伝子異常症	杉江秀夫	代謝性ミオパチー	診断と治療社	東京	2014	225-227
後藤雄一	ミトコンドリア病	水澤英洋	新領域別症候群シリーズNo. 29 神経症候群 (第2版)	日本臨床社	大阪	2014	817-822
後藤雄一	ミトコンドリア病	小林祥泰、水澤英洋、山口修平	2015-2017 神経疾患最新の治療	南江堂	東京	2014	251-252
後藤雄一	ミトコンドリアDNAの遺伝学	種元智洋、佐村修、岡本愛光	産婦人科医必読-臨床遺伝学の最新知識	金原出版	東京	2015	285-290
小坂 仁	大脳萎縮症	水澤英洋	新領域別症候群シリーズNo. 29 「神経症候群 (第2版) IV」	日本臨床社	大阪	2014	319-324
小坂 仁	小脳萎縮症	水澤英洋	新領域別症候群シリーズNo. 29 「神経症候群 (第2版) IV」	日本臨床社	大阪	2014	325-328
竹下絵里、小牧宏文	ミトコンドリア病	水澤英洋	新領域別症候群シリーズNo. 29 「神経症候群 (第2版) IV」	日本臨床社	大阪	2014	223-227
竹下絵里、小牧宏文	MNGIE	杉江秀夫	代謝性ミオパチー	診断と治療社	東京	2014	185-187
三牧正和	ミトコンドリア異常症	五十嵐 隆 総編集, 岡明 専門編集	小児科臨床ピクシス 3 小児てんかんの最新医療	中山書店	東京	2014	50-51

米田誠, 井川正道, 岡沢秀彦	パーキンソン病および関連神経変性疾患のPET酸化ストレスイメージング.	高橋良輔, 山洪谷真, 山中宏二, 樋口真人	脳内環境-恒常性維持機構の破綻と病気のメカニズム	メディカルドー社	大坂	2014	212-215
井川正道, 米田誠	MERRF	杉江秀夫, 福田冬季子, 西野一三, 古賀靖敏	代謝性ミオパチー	診断と治療社	東京	2014	175-177
西野一三	ミトコンドリア脳筋症.	総監修: 永井良三, 責任編集: 鈴木則宏, 編集: 荒木信夫, 神田隆, 吉良潤一, 塩川芳昭, 西野一三, 水澤英洋	神経内科研修ノート	診断と治療社	東京	2015	522-526
西村洋昭, 西野一三	組織化学染色 (SDH と COX).	編集: 遠藤文夫, 井田博幸, 山口清次, 高柳正樹, 深尾敏幸	引いて調べる先天代謝異常症	診断と治療社	東京	2014	114

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sakai C, Yamaguchi S, Sasaki M, Miyamoto Y, Matsushima Y, <u>Goto Y.</u>	<i>ECHS1</i> mutations cause combined respiratory chain deficiency resulting in Leigh syndrome.	Hum Mut	36	232-239	2015
Ohnuki Y, Takahashi K, Iijima E, Takahashi W, Suzuki S, Ozaki Y, Kitao R, Mihara M, Ishihara T, Nakamura M, Sawano Y, <u>Goto Y.</u> , Izumi S, Kulski J-K, Shiina T, Takizawa S.	Multiple deletions in mitochondrial DNA in a patient with progressive external ophthalmoplegia, leukoencephalopathy and hypogonadism.	Inter Med	53	1365-1369	2014
宮脇統子、古東秀介、石原広之、 <u>後藤雄一</u> 、西野一三、荻田典生、戸田達史.	ミトコンドリア DNA 8729G>A 変異を認めた neurogenic muscle weakness, ataxia, and retinitis pigmentosa (NARP) の1例.	臨床神経学	22	91-95	2015
Imagawa E, <u>Osaka H.</u> , Yamashita A, Shiina M, Takahashi E, Sugie H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Ogata K, Matsumoto N, Miyake N.	A hemizygous GYG2 mutation and Leigh syndrome: a possible link?	Hum Genet	133	225-234	2014
Akiyama T, <u>Osaka H.</u> , Shimbo H, Nakajiri T, Kobayashi K, Oka M, Endoh F, Yoshinaga H.	A Japanese Adult Case of Guanidinoacetate Methyltransferase Deficiency.	JIMD Rep.	12	65-69	2014
Hayashi T, Asano Y, Shintani Y, Kioka H, Tsukamoto O, Higo S, Kato H, Hikita M, Shinzawa-Ito K, Yamazaki S, Takafuji K, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, <u>Goto Y.</u> , <u>Kitakaze M.</u> , Komuro I, Sakata Y, Ogura T, Aoyama H, Tsukihara T, Yoshikawa S, Takashima S	Higdla is a positive regulator of cytochrome oxidase.	Proc Natl Acad Sci U S A	112(5)	1553-1558	2015

Tanisawa K, Ito T, Sun X, Ise R, Oshima S, Cao Z-B, Sakamoto S, <u>Tanaka M</u> , Higuchi M	High cardiorespiratory fitness can reduce glycated hemoglobin levels regardless of polygenic risk for type 2 diabetes mellitus in non-diabetic Japanese men.	Physiological Genomics	46	497-504	2014
Kitazoe Y, <u>Tanaka M</u> .	Evolution of mitochondrial power in vertebrate metazoans.	PLoS One	9(6)	e98188	2014
Fujii T, Nozaki F, Saito K, Hayashi A, Nishigaki Y, Murayama K, <u>Tanaka M</u> , <u>Koga Y</u> , Hiejima I, Kumada T.	Efficacy of pyruvate therapy in patients with mitochondrial disease: A semi-quantitative clinical evaluation study.	Mol Genet Metab	112(2)	133-138	2014
Imasawa T, <u>Tanaka M</u> , Maruyama N, Kawaguchi T, Yamaguchi Y, Rossignol R, Kitamura H, Nishimura M.	Pathological similarities between low birth weight-related nephropathy and nephropathy associated with mitochondrial	Diagnostic Pathology	9	181	2014
Imasawa T, <u>Tanaka M</u> , Yamaguchi Y, Nakazato T, Kitamura H, Nishimura M.	7501 T> A mitochondrial DNA variant in a patient with glomerulosclerosis.	Renal Failure	36(9)	1461-1465	2014
Tanisawa K, Ito T, Sun X, Ise R, Oshima S, Cao Z-B, Sakamoto S, <u>Tanaka M</u> , Higuchi M.	Strong influence of dietary intake and physical activity on body fatness in elderly Japanese men: age-associated loss of polygenic resistance against obesity.	Genes & Nutrition	9	416	2014
Fujita Y, Ito M, Kojima T, Yatsuga S, Koga Y, <u>Tanaka M</u> .	GDF15 is a novel biomarker to evaluate efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial diseases.	Mitochondrion	20	34-42	2014

Yamada M, Sato N, Ikeda N, Arai, T, Sawabe M, Mori S, Yamada Y, Muramatsu M, <u>Tanaka M.</u>	Association of the chromodatin helicase DNA-binding protein 4 (CHD4) missense variation p.D140E with cancer: potential interaction with smoking.	Genes Chromosomes Cancer	54	122-128	2014
<u>山唄達也</u> 、越智 篤	聴覚に関わる社会医学的諸問題「加齢に伴う聴覚障害」	Audiology Japan	57(1)	52-62	2014
<u>山唄達也.</u>	耳鼻咽喉科のアンチエイジング. 老人性難聴の予防.	Therapeutic Research	35	808-810	2014
<u>山唄達也.</u>	難聴の基礎と臨床	Anti-aging medicine	10	916-924	2014
M. Ikawa, H. Okazawa, T. Tsujikawa, A. Matsunaga, O. Yamamura, T. Mori, T. Hamano, Y. Kiyono, Y. Nakamoto, M. Yoneda.	Increased oxidative stress is related to disease severity in the ALS motor cortex: A PET study.	Neurology	In press		2015
H. Okazawa, M. Ikawa, T. Tsujikawa, Y. Kiyono, M. Yoneda	Brain imaging for oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases.	Q J Nucl Med Mol Imaging	58	387-97	2014
荒川健一郎, 米田誠	ミトコンドリア心筋症に対する代謝治療	細胞	46	21-24	2014



主な刊行物・別刷

# ECHS1 Mutations Cause Combined Respiratory Chain Deficiency Resulting in Leigh Syndrome



Chika Sakai,<sup>1</sup> Seiji Yamaguchi,<sup>2</sup> Masayuki Sasaki,<sup>3</sup> Yusaku Miyamoto,<sup>4</sup> Yuichi Matsushima,<sup>1,5\*</sup> and Yu-ichi Goto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Mental Retardation and Birth Defect Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo, Japan; <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Shimane University, Izumo, Shimane, Japan; <sup>3</sup>Department of Child Neurology, National Center Hospital, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo, Japan; <sup>4</sup>Department of Pediatrics, St. Marianna University School of Medicine, Kawasaki, Kanagawa, Japan; <sup>5</sup>Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Communicated by David Rosenblatt

Received 4 September 2014; accepted revised manuscript 5 November 2014.

Published online 13 November 2014 in Wiley Online Library (www.wiley.com/humanmutation). DOI: 10.1002/humu.22730

**ABSTRACT:** The human *ECHS1* gene encodes the short-chain enoyl coenzyme A hydratase, the enzyme that catalyzes the second step of  $\beta$ -oxidation of fatty acids in the mitochondrial matrix. We report on a boy with *ECHS1* deficiency who was diagnosed with Leigh syndrome at 21 months of age. The patient presented with hypotonia, metabolic acidosis, and developmental delay. A combined respiratory chain deficiency was also observed. Targeted exome sequencing of 776 mitochondria-associated genes encoded by nuclear DNA identified compound heterozygous mutations in *ECHS1*. *ECHS1* protein expression was severely depleted in the patient's skeletal muscle and patient-derived myoblasts; a marked decrease in enzyme activity was also evident in patient-derived myoblasts. Immortalized patient-derived myoblasts that expressed exogenous wild-type *ECHS1* exhibited the recovery of the *ECHS1* activity, indicating that the gene defect was pathogenic. Mitochondrial respiratory complex activity was also mostly restored in these cells, suggesting that there was an unidentified link between deficiency of *ECHS1* and respiratory chain. Here, we describe the patient with *ECHS1* deficiency; these findings will advance our understanding not only the pathology of mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation disorders, but also the regulation of mitochondrial metabolism.

Hum Mutat 36:232–239, 2015. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

**KEY WORDS:** combined respiratory chain deficiency; Leigh syndrome; *ECHS1*; fatty acid  $\beta$ -oxidation disorder

## Introduction

Mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation provides carbon substrates for gluconeogenesis during the fasting state and contributes electrons to the respiratory chain for energy production. Once a fatty acid is activated to the acyl-coenzyme A (CoA) form and enters the mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation pathway, it undergoes the four following enzymatically catalyzed reaction steps during each  $\beta$ -oxidation cycle (Supp. Table S1): (1) dehydrogenation, (2) hydration, (3) a second dehydrogenation step, and finally (4) a thiolytic cleavage that generates one acetyl-CoA or, in certain cases, one propionyl-CoA and an acyl-CoA that is two carbons shorter than the acyl-CoA precursor. Each individual step involves specific enzymes encoded by different genes with different substrate preferences (Supp. Table S1). The first dehydrogenation reaction is catalyzed mainly by four enzymes—short-, medium-, long-, and very long chain acyl-CoA dehydrogenases (SCAD, MCAD, LCAD, and VLCAD)—with substrate optima of C4, C8, C12, and C16 acyl-CoA esters, respectively, still each dehydrogenase can utilize other suboptimal substrates [Ikeda et al., 1983, 1985a, 1985b; Enseauer et al., 2005]. The short-chain enoyl-CoA hydratase (*ECHS1*) catalyzes the next step and has substrate optima of C4 2-trans-enoyl-CoA, also called crotonyl-CoA. Although *ECHS1* also catalyzes hydration of medium chain substrates, longer acyl chains (e.g., C16-intermediates) are hydrated by mitochondrial trifunctional protein (MTP) [Uchida et al., 1992; Kamijo et al., 1993]. MTP consists of an alpha-subunit with long-chain enoyl-CoA hydratase and long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) activities and a beta-subunit with long-chain 3-ketothiolase activity.

Mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation disorders generally cause impaired energy production and accumulation of partially oxidized fatty acid metabolites. They are clinically characterized by hypoglycemic seizures, hypotonia, cardiomyopathy, metabolic acidosis, and liver dysfunction [Kompore and Rizzo, 2008]. The most common genetic defect in MTP is LCHAD deficiency [MIM #609016]; deficiency involving reduced activity of all three MTP enzymes [MIM #609015] is reported much less frequently and is often associated with infantile mortality secondary to severe cardiomyopathy [Spiekerkoetter et al., 2004]. Deficiency of SCAD [MIM #201470], which catalyzes the first dehydrogenation reaction and has similar substrate optima with regard to carbon chain as *ECHS1*, have been studied for years, and the range of associated phenotypes includes failure to thrive, metabolic acidosis, ketotic hypoglycemia, developmental delay, seizures, and neuromuscular symptoms such as myopathy and hypotonia [Jethva et al., 2008].

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

\*Correspondence to: Yu-ichi Goto, Department of Mental Retardation and Birth Defect Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo, 187-8502, Japan. E-mail: goto@ncnp.go.jp; Yuichi Matsushima, Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Fukuoka, 812-8582, Japan. E-mail: matsush5@cclm.med.kyushu-u.ac.jp

Contract grant sponsor(s): Grants-in-Aid for Research on Intractable Diseases (Mitochondrial Disease) from the Ministry of Health, Labor and welfare of Japan; Research Grant for Nervous and Mental Disorders from the National Center of Neurology and Psychiatry (21A-6, 24-8) and JSPS KAKENHI (25670275).

Here, we describe a patient with ECHS1 deficiency who presented with Leigh syndrome [MIM #256000] accompanied by hypotonia, metabolic acidosis, and developmental delay. Additionally, the patient presented with combined respiratory chain deficiency, which is not commonly described in most clinical reports of mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation disorders. Finally, we discuss the pathology of ECHS1 deficiency and possible interactions between mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation and the respiratory chain, which are two important pathways in mitochondrial energy metabolism.

## Materials and Methods

This study was approved by the ethical committee of National Center of Neurology and Psychiatry. All the samples in this study were taken and used with informed consent from the family.

### Whole-mtDNA Genome Sequence Analysis

Long and accurate PCR amplification of mtDNA followed by direct sequencing was performed according to the previous publication with a slight modification [Matsunaga et al., 2005].

### Targeted Exome Sequencing

Almost all exonic regions of 776 nuclear genes (Supp. Table S2), in total 7,368 regions, were sequenced using the Target Enrichment System for next-generation sequencing (HaloPlex; Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) and MiSeq platform (Illumina, San Diego, California, USA). Sequence read alignment was performed with a Burrows–Wheeler Aligner (version 0.6.1) to the human reference genome (version hg19). Realignment and recalibration of base quality scores was performed with the Genome Analysis Toolkit (version 1.6.13). Variants were detected and annotated against dbSNP 135 and 1000 Genomes data (February 2012 release) by Quickannotator.

### Sanger Sequencing

Sanger sequencing of candidate genes was performed with the BigDye Terminators v1.1 Cycle Sequencing kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) as per manufacturer's protocol. Details of primers and conditions are available upon request. DNA sequences from the patients were compared against the RefSeq sequence and the sequences of a healthy control or parents those were sequenced in parallel.

### Cell Culture

The patient-derived primary myoblasts were established from the biopsy of patient's skeletal muscle and cultured in DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 20% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific). DLD-1 (human colon carcinoma) cells were provided by Taiho pharmaceutical company (Tokyo, Japan) and cells were cultured in RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FBS (Thermo Fisher Scientific). All cells were cultured in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

### Preparation of Mitochondrial Fraction

Mitochondrial fractions from patient's skeletal muscle and patient-derived myoblasts were prepared according to the literature with a slight modification [Frezza et al., 2007].

### Immunoblotting

Mitochondrial fraction and protein lysates were prepared from patient's skeletal muscle and patient-derived Myoblasts. Thirty micrograms of protein of mitochondrial fraction or 50 micrograms of protein lysate was separated on 4%–12% Bis-Tris gradient gels (Thermo Fisher Scientific) and transferred to polyvinylidene fluoride membranes. Primary antibodies used were against ECHS1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), complex II 70 kDa subunit (Abcam, Cambridge, England),  $\beta$ -actin (Santa Cruz, Biotechnology, Dallas, Texas, USA), HA (Wako, Tokyo, Japan), and AcGFP (Thermo Fisher Scientific).

### Enzyme Assays

Enzyme activities of mitochondrial respiratory complexes I–V and citrate synthase (CS) were measured in mitochondrial fraction prepared from patient's specimens. The assays for complexes I–IV and CS were performed as described previously [Shimazaki et al., 2012]. The assay for complex V was carried out following the method by Morava and his colleagues with modifications [Morava et al., 2006]. The enoyl-CoA hydratase activity was assayed by the hydration of crotonyl-CoA by a slight modification of the procedure described earlier [Steinman and Hill, 1975]. Five micrograms of protein of the mitochondrial fraction prepared from patient-derived myoblasts was added to 0.3 M Tris–HCl, pH 7.4, containing 5 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid). The reaction was started by the addition of 200  $\mu$ M crotonyl-CoA and the decrease in absorbance at 280 nm was monitored at 30°C.

### Construction of the Immortalized Patient-Derived Myoblasts

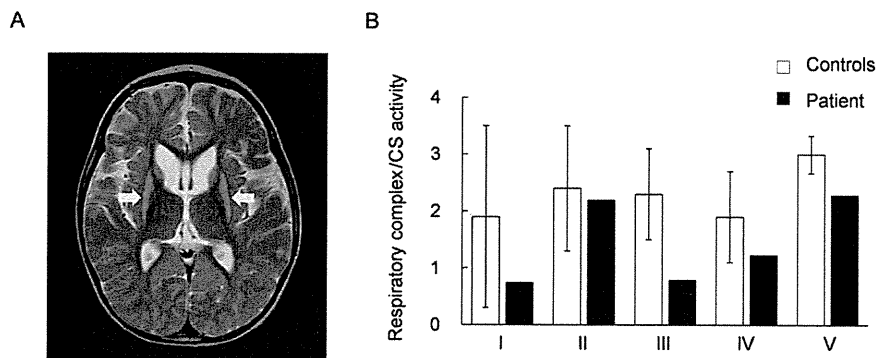
The patient-derived myoblasts and control myoblasts were transfected with pEF321-T vector (A kind gift from Dr. Sumio Sugano, University of Tokyo) and the cells were cultured serially for more than ten population doublings until the morphological alteration was observed [Kim et al., 1990].

### Expression Vector Preparation and Transfection

For construction of a mammalian expression vector, full-length *ECHS1* (GenBank accession number NM\_004092.3) was amplified from a cDNA prepared from control subject using PrimeSTAR GXL DNA polymerase (TaKaRa, Tokyo, Japan). The PCR product was cloned into pEBMulti-Pur (Wako) and the clone was verified by Sanger sequencing. The empty expression vector or an *ECHS1* expression vector was transfected into immortalized patient-derived myoblasts using Lipofectamine LTX Reagent (Thermo Fisher Scientific). Each of the two missense variants, c.2T>G; p.M1R and c.5C>T; p.A2V, was independently introduced into the clone by PCR-based site-directed mutagenesis. Each insert with C-terminal HA tag was cloned into pIRES2-AcGFP1 (Clontech Laboratories, Mountain View, California, USA) and the clones were verified by Sanger sequencing. WT and mutant *ECHS1* expression vector were transfected into DLD-1 cells using Lipofectamine LTX Reagent (Thermo Fisher Scientific). Twenty-four hours later, the cell lysate was subjected to immunoblotting.

## Results

The patient reported here was a boy born to unrelated, healthy parents after a 40-week pregnancy (weight 3,300 g, length 52 cm,



**Figure 1.** T2-weighted magnetic resonance scan image and enzyme activities of mitochondrial respiratory complexes. **A:** T2-weighted magnetic resonance scan image (MRI) shows bilaterally symmetrical hyperintensities in the putamen (arrows in the image); these are characteristic of Leigh syndrome. **B:** Enzymatic activities of five mitochondrial respiratory complexes (I, II, III, IV, and V) were measured in mitochondrial fractions prepared from the patient's skeletal muscle. Respiratory complexes activities were normalized to citrate synthase activity. Black bars show patient values and white bars show control values. Control values were mean values obtained from five healthy individuals. Patient activity values for complexes I, III, and IV were 39%, 34%, and 64% of the control values, respectively. Error bars represent standard deviations.

**Table 1. Urinary Organic Acid Profiling**

	Patient RPA (%)	Controls RPA (%)
TCA cycle intermediates		
$\alpha$ -Ketoglutarate	4.52	3.00–102.90
Aconitate	20.37	15.10–86.10
Isocitrate	8.98	8.30–29.00
Other metabolites		
Lactate	11.83 <sup>a</sup>	<4.70
Pyruvate	3.18	<24.10
3-Hydroxyisobutyric acid	1.95	<9.00
Methylcitric acid	0.14 <sup>a</sup>	Less than trace amount
p-Hydroxy-phenyllactic acid	40.05 <sup>a</sup>	<7.00
Glyoxylate	37.71 <sup>a</sup>	<6.10

<sup>a</sup>Values outside the normal range.

RPA(%), relative peak area to the area of internal standard (heptadecanoic acid, HDA).

occipitofrontal circumference (OFC) 34.5 cm). Auditory screening test at 2 months of age revealed hearing impairment, and he began to use a hearing aid at 6 months of age. Psychomotor developmental delay was noted at 5 months of age; he could not sit alone, or speak a meaningful word as of 4 years of age. Nystagmus was noted at 10 months of age. Muscle hypotonia, spasticity, and athetotic trunk movement became prominent after 1 year of age. His plasma (20.2 mg/dl) and a cerebrospinal fluid lactate were elevated (25.3 mg/dl, control below 15 mg/dl). Urinary organic acid profiling reveals significantly elevated excretion of glyoxylate (Table 1). Analysis of blood acylcarnitines showed no abnormalities. Brain magnetic resonance scan image showed bilateral T2 hyperintensity of the putamen, typical for Leigh syndrome (Fig. 1A). Because Leigh syndrome is generally caused by defects in the mitochondrial respiratory chain or the pyruvate dehydrogenase complex, we performed a muscle biopsy to measure enzyme activities of mitochondrial respiratory complexes in the patient. Mitochondrial fractions prepared from patient or control specimens were used for all activity measurements. Activity of each respiratory complex was normalized relative to CS activity; normalized values for complexes I, III, and IV activity were decreased to 39%, 34%, and 64% of control values, respectively (Fig. 1B). Moreover, we performed blue native PAGE (BN-PAGE) to examine if the assembly of respiratory complexes were altered in the patient. As a result, there were no clear difference between the patient and the control (Supp. Fig. S1).

Mitochondrial respiratory chain defects can be due to pathogenic mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) or nuclear DNA (nDNA) coding for mitochondrial components. Initially, long and accurate PCR amplification of mtDNA followed by direct sequencing was performed and no mutations known to be associated with Leigh syndrome were identified, but previously reported polymorphisms were found (Supp. Table S3). Therefore, to identify the responsible mutations in nDNA, targeted exome sequencing was performed. Coverage was at least 10 $\times$  for 86.2% of the target regions, and 30 $\times$  or more for 73.4%. In all, 5,640 potential variants were identified; these included 811 splice-site or nonsynonymous variants. Among those 811 variants, 562 were on the mismatching reads that contained multiple apparent mismatches to the reference DNA sequence. Of the remaining 249 variants, nine that were on target regions with less than 10 $\times$  coverage were eliminated because data reliability was low. Filtering against dbSNP 135 and 1000 Genomes data, this number was reduced to 13 including compound heterozygous variants in the *ECHS1* [MIM #602292] and 11 heterozygous variants in 11 separate genes (Supp. Table S4). Those variants have been submitted to dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). Because most mitochondrial diseases caused by known nDNA mutations are inherited in an autosomal recessive manner, we focused on the compound heterozygous variants in *ECHS1*—c.2T>G; p.M1R and c.5C>T; p.A2V—as primary candidates.

To confirm the targeted exome sequencing results, we performed Sanger sequencing of genomic *ECHS1* DNA and *ECHS1* cDNA from the patient and his parents. We identified both variants, c.2T>G and c.5C>T, and the respective normal alleles in genomic DNA and cDNA from the patient (Fig. 2A and B) and no other *ECHS1* variants were detected except for common SNPs in the open reading frame. Analysis of genomic DNA from the patient's parents showed that patient's father was heterozygous for only one variant, c.2T>G, and the patient's mother for only the other variant, c.5C>T (Fig. 2A). These results indicated that the patient inherited each variant separately and that both mutant alleles were expressed in the patient (Fig. 2B). Each variant was nonsynonymous and in the region encoding the mitochondrial transit peptide (1–27 amino acids) of *ECHS1* [Hochstrasser et al., 1992]; moreover, c.2T>G; p.M1R was a start codon variant (Fig. 2C).

Next, immunoblotting with primary antibodies against *ECHS1* was performed to assess protein expression. Mitochondrial