

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

ミトコンドリア病の診断と治療に関する調査研究

(H23-難治-一般-016)

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 後 藤 雄 一

国立精神・神経医療研究センター

平成 26 (2013) 年 5 月

目 次

I . 総括研究報告

- ミトコンドリア病の診断と治療に関する調査研究 ----- 1
研究代表者 後藤雄一

II . 分担研究報告（研究協力者報告も含む）

- 1 . ミトコンドリア病の治療研究 ----- 7
太田成男 日本医科大学大学院医学研究科
- 2 . 次世代シーケンス法を用いたミトコンドリア呼吸鎖異常症の
解析についての研究 ----- 10
大竹 明 埼玉医科大学医学部小児科
- 3 . ミトコンドリア病の病態に關与する新規因子の検索 ----- 13
北風政史 国立循環器病研究センター
- 4 . ミトコンドリア病の実態調査 ----- 15
古賀靖敏 久留米大学大学院医学研究科小児科学
- 5 . 卵子におけるミトコンドリア DNA の解析とミトコンドリア病に
対する生殖医療サポート ----- 21
未岡 浩 慶應義塾大学医学部産婦人科
- 6 . ミトコンドリア病の治療研究 ----- 25
田中雅嗣 東京都健康長寿医療センター研究所
- 7 . モデルマウスを用いた変異型ミトコンドリアゲノムの病原性
発揮に関する研究 ----- 27
中田和人 筑波大学大学院生命環境科学研究科

8 . 62 -Cu-ATSM PET による過還元状態（酸化ストレス）の生体機能 イメージングの基礎研究	----- 29
米田 誠 福井大学医学部病態制御医学内科学 2	
9 . 精神神経症状を呈したミトコンドリア病の 5 症例	----- 32
佐野 輝 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 精神機能病学分野教授	
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 35
IV . 遺伝カウンセリングセミナー、市民公開講座	----- 39

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
総括研究報告書

ミトコンドリア病の診断と治療に関する調査研究

研究代表者 後藤 雄一 国立精神・神経医療研究センター神経研究所

研究要旨 ミトコンドリア病の診断と治療に関する本研究班の活動の3年目にあたる今年度は、ミトコンドリア病の診断に必要な検査体制の整備、重症度スケール案の策定、全国的な相談を受ける体制や情報提供体制の整備、疾患 iPS 細胞を用いた研究の支援、医師主導型治験への協力を行った。ミトコンドリア病の診断プロセスの標準化が未決であり、疫学調査と患者レジストリーの開始が、平成 25 年度中に完了しなかった。一方、「ミトコンドリア病ハンドブック」などを含め、医療従事者、一般市民に対する病気に関する情報提供は着実に進めた。ピルビン酸ナトリウム、タウリン、EPI-743 などの新たな薬剤による臨床試験の準備が着実に進められた。

分担研究者

- (1) 太田成男 日本医科大学大学院医学研究科
- (2) 大竹 明 埼玉医科大学小児科
- (3) 北風政史 国立循環器病研究センター病院・研究開発基盤センター
- (4) 古賀靖敏 久留米大学小児科
- (5) 小牧宏文 国立精神・神経医療研究センター
- (6) 作田亮一 獨協医科大学越谷病院小児科
- (7) 末岡 浩 慶應義塾大学産婦人科
- (8) 須藤 章 北海道大学医学部小児科
- (9) 田中雅嗣 東京都健康長寿医療センター研究所
- (10) 中川正法 京都府立医科大学附属北部医療センター
- (11) 中田和人 筑波大学大学院生命環境科学研究科
- (12) 萩野谷和裕 東北大学小児科
- (13) 山岨達也 東京大学医学部耳鼻咽喉科
- (14) 米田 誠 県立福井大学看護福祉学部

研究協力者

- (1) 飯塚高浩 北里大学医学部神経内科
- (2) 大野耕策 鳥取大学医学部脳神経小児科
- (3) 岡崎康司 埼玉医科大学・ゲム医学研究センター
- (4) 金田大太 大阪赤十字病院神経内科
- (5) 佐藤有希子 国立精神・神経医療研究センター
- (6) 佐野 輝 鹿児島大学医学部精神神経科

- (7) 砂田芳秀 川崎医科大学神経内科
- (8) 中野和俊 東京女子医科大学病院小児科
- (9) 西野一三 国立精神・神経医療研究センター
- (10) 埜中征哉 国立精神・神経医療研究センター
- (11) 村山 圭 千葉県こども病院代謝科
- (12) 森 雅人 自治医科大学小児科

A. 目的

ミトコンドリアはすべての細胞内にあって、エネルギーを産生する小器官である。ミトコンドリアに異常があると、大量のエネルギーを必要とする神経・筋、循環器、代謝系、腎泌尿器系、血液系、視覚系、内分泌系、消化器系などに障害が起こる。なかでも、中枢神経や筋の症状を主体とするミトコンドリア病が代表的な疾患である。

国内においてミトコンドリア病の患者数の厳密な実態調査は行われていない。その理由は患者が多くの診療科に分散していること、診断基準が明確ではなかったことなどが挙げられるが、そのもっとも大きな要因は確定診断に必要な病理、生化学、遺伝子検査の専門性が高いことにある。平成 21 年 10 月にミトコンドリア病が特定疾患に認定され、認定基準が制定された。これを機にミトコンドリア病の認知度が上がり、その診断・治療研究の推進が望まれている。また英国では、

ミトコンドリア病の一部の病型で、核移植を用いた生殖補助医療の適応が本格的に試みられようとしている（Nature 465: 82-85, 2010）。そのような世界的な研究や医療の流れに遅れないような本邦での調査研究が必要である。

本研究班では、ミトコンドリア病の検査手段（病理検査、生化学検査、DNA 検査）の標準化と集約的診断体制の確立、本疾患に関する情報提供手段の整備等を行い、臨床病型、重症度、合併症、主な治療の内容などの全国調査を行う。また、多臓器の症状を有するミトコンドリア病の研究をさらに推進させるために、疾患 iPS 細胞事業と連携して、研究利用できるミトコンドリア病 iPS 細胞の樹立と公共バンクへの提供を支援する。また、患者レジストリーを進め、具体的な治療に関する臨床研究や治験を進めることを目的とする。

B. 方法

1) 検査の標準化

ミトコンドリア病の診断には、多臓器に渡る臨床症状の把握と3種類の検査方法（病理検査、生化学検査、遺伝子検査）が必要で、それらの標準化と集約的な診断体制を構築する準備をした。

筋病理検査の標準化

国立精神・神経医療研究センターの西野、後藤を中心に標準化を行っている。骨格筋以外の罹患臓器（心、腎、肝など）の病理所見についても検討する。

生化学検査の標準化

国立精神・神経医療研究センターの後藤、埼玉医科大学の大竹で標準化を行う。

遺伝子検査の標準化

国立精神・神経医療研究センターの後藤を中心として、mtDNA 検査の標準化を行う。核 DNA 上の原因遺伝子について、後藤及び大竹が適切な診断手順に組みこめるようにする。

2) 診断基準、重症度スケールの作成

ミトコンドリア病には、多くの臨床病型が知られている。ミトコンドリア病をよく診ているのは小児科医と神経内科医であるが、ミトコンドリア脳筋症に比較的好く合併する臓器症状を診ている関連診療

科（循環器科：北風、耳鼻科：山嵜、精神神経科：佐野、など）の専門医が参加し、臨床的に有用な重症度スケールを作成する。

3) 情報提供体制の整備

患者・家族や本疾患を診ている医療従事者に対して、本疾患の医療情報をホームページ等で提供する。また保健所等でのセミナーも積極的に行う。全国を7つの地域に分け、それぞれの地域毎にミトコンドリア病をよく知る小児科、神経内科の専門医が担当し、医療情報の提供や実態調査の援助をする（須藤、萩野谷、作田、飯塚、米田、中川、大野、古賀）。

4) 疾患 iPS 細胞を活用した研究

平成 24 年度から開始された再生医療の実現化プロジェクト「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」の対象疾患として、ミトコンドリア病が採択されたことをうけて、iPS 細胞の樹立援助（患者由来細胞の拠点への供給）や樹立された iPS 細胞を用いた研究を行う（後藤、大竹）。

5) 治療に結びつく薬剤の検討

臨床研究や治験に結びつく薬物に関する研究（太田、古賀、田中）を行い、具体的な治療に関する臨床試験を実施、支援する。

6) ミトコンドリア病に関する生殖補助医療

ミトコンドリア病において、着床前診断を含む出生前診断や核移植治療についての情報収集や研究を行う（中田、末岡）。

C. 結果と考察

1) 検査の標準化

ミトコンドリア病の確定診断には、病理検査、生化学検査、遺伝子検査を行い、総合的な評価が必要である。

病理検査

骨格筋の病理検査は国立精神・神経医療研究センター（以下 NCNP）が中心となって実施しており、今後も継続する。

生化学検査

検体は線維芽細胞もしくは各臓器を用いている。NCNP では、新たに呼吸鎖酵素複合体 V（ATP 合成酵素

の逆反応)の活性を測定する系を立ち上げるとともに、患者で同定されたミトコンドリアDNAのATP 6及びATP 8領域に存在する変異の病因性に関する検討を加えた。その結果、新たに病因と考えられる複数の変異を同定し、報告した。〈後藤、大竹、村山〉

遺伝子検査

(拠点形成、検査会社の関与、集約化について)

本疾患は、遺伝型と表現型が一对一に対応しない、一部の検査をして変異が同定されない場合には有用な情報が得られない、という特徴があるため、可能であれば集約すべきである。

ミトコンドリアDNAの全周シーケンスを行える施設としてNCNPなどのいくつかの施設、検査会社があるが、その役割分担を費用の面を含めて検討し、検査依頼に際しての基準、検査体制の整備、啓発が必要である。

また分担研究者の大竹らは、埼玉医科大学を中心に、千葉こども病院、自治医科大学、東京都健康長寿医療センターと協力して、特に乳児期発症の重症ミトコンドリア病に関して、酵素診断から網羅的な遺伝子検査にいたる系統的病因検索システムを構築した。次世代シーケンサーを用いたエキソーム解析を104人の症例に行い、27例に病因となる遺伝子変異を同定した。〈大竹〉

2) 診断基準、重症度スケールの作成

2009年に制定した「ミトコンドリア病の認定基準」には、症状としての糖尿病と難聴の項目を入れていない。しかし、糖尿病単独の患者が認定されないというのは問題であり、糖尿病を症状の一項目に入れることについては異論がない。しかし、認定基準にそのままいれると患者数が5万人を超える可能性もあり、重症度で線引きをするという方法を採用する必要がある。

認定基準とは別に、ミトコンドリア病の日本版「診断基準」を定めることは今後の臨床研究や患者レジスティーを行うために必要である。その方策として、現在の認定基準をもとに糖尿病や難聴などの不足項目を追加する方法で診断基準を策定する案を検討した。ただし、一部の症状については、重症度を加味した基準

にすることが必要になる。

診断基準と平行して、重症度スケールが必要である。すでに、2008年の厚生労働科学研究費(古賀靖敏班長)において作成されたものを基盤にして、案を作成した。

一方で、国際治験などを施行するために難病研究のグローバル化が重要とされており、診断基準とレジスティーにおける登録項目のグローバル化が望まれる。そのために、この研究班で作成した日本案を諸外国に示して統一化を図ることが望ましい。

3) 情報提供体制の整備

平成24年度に医師が患者への説明を行う際に使用する「ミトコンドリア病ハンドブック」を作成した。冊子体を作成するとともに、全国遺伝子医療部門連絡会議に参加している施設を中心に幅広く医療機関に配布し、難病情報センターHPからダウンロードできるように配慮した。

(http://www.nanbyou.or.jp/upload_files/mt_handbook.pdf)

ミトコンドリア病の知識とその遺伝に関する啓発を目的として、平成24年6月30日、7月1日に「ミトコンドリア病の遺伝カウンセリングセミナー」を国立精神・神経医療研究センターで実施した。対象は、医師、認定遺伝カウンセラーなどであり、好評であったので、平成26年1月25、26日に2度目のセミナーを実施した。(遺伝カウンセリングセミナー資料参照)

患者向けのセミナーとしては、「ミトコンドリア病患者の会」主催の勉強会を、平成25年6月2日(川崎)と平成25年10月12日(大阪)に開催し、保健所主催の勉強会を平成25年7月6日(横浜市戸塚区役所)で開催した。

また、一般市民向けには、当研究班の主催する「市民公開講座」を福井市で実施した(9.16, 2013)

当初予定していた全国を7つの地域に分け、それぞれの地域毎にミトコンドリア病をよく知る小児科、神経内科の専門医が担当し、医療情報の提供や実態調査の援助をする計画は、まだ実現していない。この方式は医療イノベーションで計画されている都道府県単位の「新・難病医療拠点病院及び難病医療地域機関病院

構想」を先取りした医療体制整備と考えられ、平成 25 年度でも実施ができなかった。一方で、患者や担当医から問い合わせは、直接、研究代表者、研究分担者に行っていることが多く、日本ミトコンドリア学会 HP の「ドクター相談室」にも多数の相談が寄せられており、担当の医師（ほとんどが当研究班の研究分担者）が回答に対応した。

実態調査については、ミトコンドリア病の 1 病型である MELAS に関して、「ミトコンドリア脳筋症 MELAS の脳卒中用発作に対するタウリン療法の開発」研究班(研究代表者：砂田芳秀、川崎医科大学)で行った、日本小児神経学会及び日本神経学の会員に対するアンケート調査に協力した。

患者レジストリーについては、平成 25 年度に実施するように計画を変更したが、これも平成 25 年度に実施することが叶わなかった。認定基準案作成の遅れと調査項目のグローバルな調整に手間取った。患者レジストリーは、国立精神・神経医療研究センタートランスレーショナル・メディカルセンターが実施している筋ジストロフィーの登録事業を敷衍する形態での実施を計画していたが、成育医療センターが実施した主に先天代謝異常症としてのミトコンドリア病の登録事業と重なるところがあり、再計画が必要となり、次期の研究班の活動計画に組み込まれた。

4) 疾患 iPS 細胞を活用した研究

2012 年度のノーベル医学生理学賞を受賞した山中伸也教授の iPS 細胞を活用した難病研究が始動した。ミトコンドリア病は、循環器系疾患及び筋骨格系疾患の 2 つの領域に關与し、患者由来細胞の提供を行って疾患 iPS 細胞を樹立する事業に参画した。本研究班でも iPS 細胞を活用した研究を推進させる予定であったが、予算立てが明確でなく、研究代表者の施設で各種ミトコンドリア DNA 変異を持つ iPS 細胞の樹立に関する研究を行ったのみである。

5) 治療に結びつく薬剤の検討

分担研究者の太田らが還元剤として水素水をミトコンドリア病の治療に用いようとする研究や、分担研究

者の田中、古賀、らがピルビン酸ナトリウムを、大竹らが -アミノレブリン酸を治療に用いようとする研究が進んでいる。また、MELAS に対するタウリンの大量治療試験を行う研究班（主任研究者：川崎医科大学神経内科砂田芳秀教授）や国立精神・神経医療研究センター病院の後藤は MELAS に対する EPI-743 の臨床研究を行っており、これらの臨床試験、臨床研究がスムーズに進むように、研究班では必要に応じて調整を行っている。

6) ミトコンドリア病に関する生殖補助医療

ミトコンドリア病の臨床のなかで、生殖補助医療をどのように応用するかも重要な課題である。今年度は、分担研究者の末岡らが Leigh 脳症の 2 例で着床前遺伝子診断を試みたことが報告された。しかし、実施した一例で移植可能胚が得られず、胚移植には至らなかったことが報告された。〈末岡〉

また、着床前遺伝子診断以外では、卵細胞移植と核移植が考えられ、英国では具体的な核移植の是非が問われている。提供卵子の取り扱い、安全性を含め倫理的議論および法の解釈について検討する必要がある。

D. 結論

今年度は、ミトコンドリア病班として研究班が設立されて 3 年めであった。過去 2 年間で比較し、ミトコンドリア病に関する、診断、治療、予防などに関する研究が格段に進んだとは言えないが、新しい薬剤を用いた臨床試験、臨床研究が着実に進んだ。一方で iPS 細胞を用いた研究への連携など、新たな研究内容の萌芽があり、さらに研究班の活動を多様化させる必要がある。全国レベルの診断体制の整備、診断基準や重症度スケールの作成などを終え、患者レジストリーと具体的な臨床試験の実施などを進めて行くことが次年度以降の課題である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表（主なもの）

1. 著書、総説
 - 1) 後藤雄一：ミトコンドリア病, pp95-111 (遺伝医学やさしい系統講義 18 講、メディカル・サイエンス・インターナショナル、東京) 2013
 - 2) 後藤雄一：ミトコンドリア病, pp2339-2342 (内科学、第 10 版、朝倉書店、東京) 2013
 - 3) 後藤雄一：ミトコンドリア病の診断と治療．内分泌・糖尿病・代謝 37: 481-486, 2013
2. 原著論文
 - 1) Ishiyama A, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Itagaki Y, Matsuzaki K, Nakura M, Nishino I, Goto Y, Sasaki M. Unusual exocrine complication of pancreatitis in mitochondrial disease. *Brain Dev* 35:654-659, 2013
 - 2) Goto M, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Nishino I, Goto Y. MELAS phenotype associated with m.3302A>G mutation in mitochondrial tRNA-Leu(UUR) gene. *Brain Dev* 36: 180-182, 2014
 - 3) Yamazaki T, Murayama K, Compton AG, Sugiana C, Harashima H, Anemiya 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.
 - 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: exome sequencing for disease gene identification. *Biochim Biophys Acta* (General Subjects on Special Issue: Frontiers of Mitochondria) 1840(4): 1355-1359, 2014
 - 5) Murakoshi Y, Sueoka K, Takahashi K, Sato S, Sakurai T, Tajima T, Yoshimura Y. Embryo developmental capability and pregnancy outcome are related to the mitochondrial DNA copy number and ooplasmic volume. *J Assist Reprod Genet* 30: 1367-1375, 2013
 - 6) 須藤章、佐野仁美、川村信明. 頻回の卒中様発作を呈した MELAS に対する L-arginine 静注療法. 脳と発達, 46: 39-43, 2014
 - 7) Katada S, Mito T, Ogasawara E, Hayashi J-I, Nakada K. Mitochondrial DNA with a large-scale deletion causes two distinct mitochondrial disease phenotypes in mice. *G3* 3: 1545-1552, 2013
 - 8) Ikawa M, Yoneda M, Muramatsu T, Matsunaga A, Tsujikawa T, Yamamoto T, Kosaka N, Kinoshita K, Yamamura O, Hamano T, Nakamoto Y, Kimura H. Detection of preclinically latent hyperfusion due to stroke-like episodes by arterial spin-labeling perfusion MRI in MELAS patients. *Mitochondrion* 13: 676-680, 2013
2. 学会発表
 1. 国際学会
 - 1) Takeshita E, Mimaki M, Ishii T, Awazu M, Shinjoh M, Hasegawa T, Miki J, Hidaka Y, Motobayashi M, Kumagai E, Goto Y. Novel mitochondrial point mutation (m.9155A>G) in two patients with chronic renal failure caused by focal glomerular sclerosis. International Congress of Pediatrics 2013, the 27th Congress of the International Pediatric Association, Melbourne, Australia, 8.24-29, 2013
 - 2) Ito S, Hirano Y, Nakano K, Goto Y, Ohtani Y, Shimada S, Ishigaki K, Funatsuka M, Oguni H, Osawa M, Nahgata S: The first case of infantile-onset spinocerebellar ataxia in Japan caused by novel autosomal recessive Twinkle/C12orf2 mutations. International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, Japan,

11.6-11.7, 2013

- 3) Matsushima Y, Hatakeyama H, Takeshita E, Kitamura T, Kobayashi K, Yoshinaga H, Goto Y: Leigh-like syndrome associated with calcification of the bilateral basal ganglia caused by mutations in mitochondrial poly(A) polymerase. International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, Japan, 11.6-11.7, 2013
- 4) Yokota M, Hatakeyama H, Okabe S, Ono Y, Goto Y. Mitochondrial dysfunction is the barrier against cellular reprogramming, but not the maintenance of pluripotency. International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, Japan, 11.6-11.7, 2013
- 5) Hatakeyama H, Yokota M, Okabe S, Ono Y, Goto Y. *in vitro* neural modeling of various mitochondrial disorders using patient-derived iPS cells. International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, Japan, 11.6-11.7, 2013
- 6) Hatakeyama H, Yokota M, Okabe S, Ono Y, Goto Y. Molecular pathogenesis and iPS-cell-based disease modeling of MELAS caused by a mutation in anticodon-stem of *MTTV* gene. International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, Japan, 11.6-11.7, 2013
- 7) Fujita Y, Ito M, Kojima T, Koga Y, Tanaka M. Identification of potential biomarkers for mitochondrial diseases by global gene expression analysis. International Symposium on Mitochondria 2013. Tokyo November 7, 2013
- 8) Tanaka M. Metabolomic and Transcriptomic analyses of MELAS hybrids for validation of pyruvate therapy and for discovery of new biomarkers. 10th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine. Seoul November 4, 2013

2. 国内学会

- 1) 竹下絵里, 石井智弘, 粟津緑, 新庄正宜, 長谷川奉延, 三木純, 日高義彦, 本林光雄, 熊谷悦子, 後藤雄一: 巣状系球体硬化症による慢性腎不全を呈したミトコンドリア DNA9155A>G 変異の 2 例. 第 116

回日本小児科学会総会, 広島, 4.20, 2013

- 2) 竹下絵里, 三牧正和, 西野一三, 埜中征哉, 後藤雄一: ミトコンドリア病の遺伝子診断には、long PCR 法、サザンプロット法、全周シーケンス法を用いた解析と総合的な判断が必要である. 第 55 回日本小児神経学会総会, 大分, 6.1, 2013
- 3) 後藤雄一. 難病に対する生殖医療の近未来—新たな対策の方向性を求めて—. ART FORUM 2013, 大分, 8.8, 2013
- 4) 太田成男: ミトコンドリア機能と老化・疾患制御 第 13 回抗加齢医学会総会, 横浜, 6.28, 2013.

3. その他

患者会等でのセミナー

- 1) ミトコンドリア病患者家族の会—東京勉強会
後藤雄一「ミトコンドリア病研究班の活動と治療研究の現況」日本医科大学武蔵小杉病院、川崎、6.2, 2013
- 2) ミトコンドリア病患者家族の会—大阪勉強会
後藤雄一「ミトコンドリア病研究班の活動と治療研究の現況」大阪市港区弁天学習センター、大阪、10.12, 2013
- 3) H25年度戸塚区特定疾患講演会
後藤雄一「ミトコンドリア病の診断と治療 —キーワードは多様性—」戸塚区役所、横浜市、7.6, 2013

市民公開講座

- 1) 「ミトコンドリア — 健康長寿から病気まで —」
福井市地域交流プラザ、9.16, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
「ミトコンドリア病診断用バイオマーカーとしての GDF15」特願2014-5391 (平成26年1月15日出願)
(分担研究者: 田中雅嗣)
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
 分担研究報告書

ミトコンドリア病の治療研究

分担研究者 太田 成男 日本医科大学大学院医学研究科教授

研究要旨 水素分子(H₂)は、生体内で抗酸化作用・抗炎症作用とエネルギー代謝促進を示す。予備的な臨床試験では、H₂を水に溶かした水素水がミトコンドリア病の病態を改善したことが報告され、パーキンソン病患者への有効性も示された。その水素が効果を発揮するための分子機構の解明に努めた。水素は脂質の酸化を抑制し、フリーラジカルによる連鎖反応を低下させることが判明した。水素水と水素ガスの投与は、将来的にミトコンドリア病の改善に有効であることが推察された。

A．研究目的

水素分子(H₂)に生体内抗酸化作用があることを2007年に私たちが発表して以来、水素に関する医学論文は300報以上にも及ぶ。これらの発表には、水素による抗酸化作用だけでなく、抗炎症作用、脂質代謝亢進作用など多種多様の効果が含まれる。また、動物実験だけでなく、次第に臨床試験の研究が増え、その効果が報告されている。

すでに、ミトコンドリア病に対する水素水の効果が報告されている。また、ミトコンドリア異常と病態の関係が指摘されているパーキンソン病患者にも水素水が自由摂取させ、改善することが報告されている。

当初は、水素とヒドロキシルラジカルの反応によって酸化ストレスが低下することを提唱したが、それだけでは、説明しきれないことが多く、水素がエネルギー代謝を改善するメカニズムの解明が必要である。

分担研究者らは、低濃度の水素ガスの吸引、水素水の飲用によって、水素の効果を発揮するメカニズムとして、細胞膜のフリーラジカル連鎖反応に注目した。

B．研究方法

水素はガスクロマトによって定量した。1,2,3,4-tetrahydro-*fl*-carboline (THBC) や 2,2'-Azobis(2-methylpropionamide)

dihydrochloride (AAPH)のようなラジカル反応誘発剤を使って、ラジカル反応を誘因し、細胞死とミトコンドリア活性と脂質の過酸化を調べた。細胞死は、LDH の漏れ、ミトコンドリア活性はAlamaBlue の変化、過酸化脂質は、特異的蛍光色素によって定量した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、「動物の愛護及び管理に関する法律」で明文化された3Rを遵守し、「日本医科大学動物実験指針」に従って日本医科大学動物実験委員会に「動物実験計画書」を提出し、承認を受けて行う。

C．研究結果

本研究において、水素は脂質部分に水溶液よりも2倍蓄積すること、5倍も保持されることを明らかにしたので、水素は細胞膜上でより効果を発揮することが示唆された。さらに、1,2,3,4-tetrahydro-*fl*-carboline (THBC) や 2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH)のようなラジカル反応誘発剤による細胞障害も抑制したので、水素は少量でも脂質ラジカルを抑制することにより連鎖反応を抑制して細胞を保護することを明らかにした。さらに、低い水素濃度でも、細胞膜の脂質過酸化を抑制することを明らかにした。

D . 考察

パーキンソン病は、ミトコンドリアの品質管理の破綻が原因のひとつと考えられており、酸化ストレス亢進によって黒質細胞の障害が原因と考えられるようになっている。そのため、パーキンソン病に水素が有効であることは、ミトコンドリア病への有効性も強く示唆する。

E . 結論

ミトコンドリア病の病態改善に、水素水または水素ガスの吸引による改善効果が示唆された。

F .健康危険情報

無し

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wolf AM, Nishimaki K, Kamimura N, Ohta S.: Real-Time Monitoring of Oxidative Stress in Live Mouse Skin. J Invest Dermatol. 2013 in press.
 - 2) Lee H, Ohno M, Ohta S, Mikami T.: Regular Moderate or Intense Exercise Prevents Depression-Like Behavior without Change of Hippocampal Tryptophan Content in Chronically Tryptophan-Deficient and Stressed Mice. PLoS One. 2013;8(7):e66996 .
 - 3) Takahashi M, Wolf AM, Watari E, Norose Y, Ohta S, Takahashi H.: Increased mitochondrial functions in human glioblastoma cells persistently infected with measles virus. Antiviral Res. 2013;99(3):238-244.
 - 4) Yoritaka A, Takanashi M, Hirayama M, Nakahara T, Ohta S, Hattori N.: Pilot study of H₂ therapy in Parkinson's disease: A randomized double-blind placebo-controlled trial. Mov Disord. 2013;28(6):836-9.
 - 5) Nojima A, Yamashita M, Yoshida Y, Shimizu I, Ichimiya H, Kamimura N, Kobayashi Y, Ohta S, Ishii N, Minamino T.: Haploinsufficiency of akt1 prolongs the lifespan of mice. PLoS One. 2013;8(7):e69178
 - 6) Lee H, Kiuchi T, Muto J, Ohta S., Mikami T.: Intense exercise enhances the hippocampal proliferation of progenitor cells via activating the Flk1 signaling cascade in mice. GAZZETA MEDICA ITALIANA ARCHIVIO PER LE SCIENZE MEDICHE A J. Intl. Med. Pharmacol. 2013 in press.
 - 7) 太田成男 : 酸化ストレス仮説に基づいたアンチエイジング Geriat.Med. 2013;51(7):659-63
 - 8) 鈴木吉彦、島田朗、佐野元昭、太田成男 : 3271 番位 tRNA^{Lue(UUR)}変異を有するミトコンドリア糖尿病の 15 年を超えた追跡経過観察 糖尿病学会誌 2013;56(3)173-8.
 - 9) 太田成男 : 水素医学の現状 : 基礎医学から臨床医学へ ファルマシア 2012;48(8) 767-771.
- ### 2. 学会発表
- 1) 太田成男 : ミトコンドリア最新データにみる老化との関係 抗加齢医学会 大阪 千里ライフサイエンスセンター 2013.4.21.
 - 2) 太田成男 : ミトコンドリア機能と老化・疾患制御 第 13 回抗加齢医学会総会 横浜 パシフィコ横浜 2013.6.28.
 - 3) 太田成男 : 細胞は若返るー 人体の不思議をミトコンドリアが解き明かすー JASIS2013 幕張メッセ 2013.9.5.
 - 4) Ohta Shigeo: Multi functional molecular hydrogen acting as an anti oxidant, anti inflammation and energy metabolism-Stimulator. The International Conference and Exhibition on Biochemical & Molecular Engineering Texas USA 2013.10.7-9
 - 5) 太田成男 : 水素医学の展開 : 基礎医学から臨床実施へ 第 41 回日本救急医学会総会 東京国際フォーラム 2013.10.21.
 - 6) Ohta Shigeo: Molecular Hydrogen has Potential for Preventive and Therapeutic Applications for Neurological Diseases. International Drug Discovery Science & Technology, Therapy and EXPO Hainan International Convention and Exhibition Center, MolMed Part of WGC China 2013.11.15.
 - 7) Ohta Shigeo: Molecular Hydrogen is an Efficient Antioxidant Accompanied with Anti-inflammatory and Energy Metabolism-enhancing Roles. International Drug Discovery Science & Technology, Therapy and EXPO Hainan International Convention and Exhibition Center, IDDST Part of WGC China 2013.11.15.
 - 8) 太田成男 : 水素療法の神経系疾患に対する効果 : 基礎医学から治療および予防への臨床適用へ向かって 第 31 回日本神経治療学会総会 東京 2013.11.22.
 - 9) 太田成男 : 老化と若返りにおけるミトコンドリアの役割 : アンチエイジングに必要な体内エネルギー 日本運動指導士会岡山支部 岡山国際交流センター 2013.11.23.
 - 10) 太田成男 : ミトコンドリアの基礎と臨床 老化と若返りにミトコンドリアはどこまで関与しているか? 第 9 回キレーションセミナー 東京

2013.11.24.

- 11) 太田成男: 抗酸化予防・治療としての水素の働き: 基礎医学から臨床へ 第9回キレーションセミナー 東京 2013.11.24.
- 12) 太田成男: ミトコンドリアと生物活性物質との相互作用 京都-NPO 法人国際医科学研究会第7回フォーラム 京都 2013.12.1.
- 13) 太田成男: 医療への水素利用 第33回水素エネルギー協会大会 東京 2013.12.13.
- 14) 太田成男: 生活習慣病とミトコンドリア: 酸化ストレスの抑制 ハートリスク研究会 千葉 2014.2.4.
- 15) 太田成男: 水素医学研究 update:2013 第4回分子状水素医学シンポジウム 東京 2014.2.1.
- 16) 太田成男: ミトコンドリアと新しい話題 HOKKAIDO ANTI AGING CLUB2014 北海道講演日 2014.3.8.
- 17) Ohta Shigeo: Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: Initiation, development and potential of hydrogen medicine. The first academic exchange and inaugural meeting on Hydrogen Molecule Biomedicine of the Hydrogen Molecular Biomedicine Professional Committee of Chinese Healthcare International Exchange Promotion Association. Chinese Beijing 2014.3.19.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
 分担研究報告書

次世代シーケンス法を用いたミトコンドリア呼吸鎖異常症の解析
 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 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

岡崎康司（埼玉医科大学ゲノム医学研究センター
 トランスレーショナルリサーチ部門）
 村山 圭（千葉県こども病院代謝科）

A．研究目的

ミトコンドリア呼吸鎖異常症(MRCD)は最も高頻度(1/5,000)なエネルギー産生系の先天代謝異常症であり、症状・罹患臓器・遺伝形式は極めて多岐にわたる。今回の研究は、私達の開発した、酵素診断に始まり次世代シーケンス法を用いたミトコンドリア遺伝子解析全エキソーム解析に至る系統的病因探索システムがうまく稼働するかどうかを検討することと、その結果を応用してMRCDの病態解明、さらに最終的には新薬の開発を目指すことである。

【考察】私達の開発した「酵素診断から遺伝子解析に至る系統的探索システム」は充分機能した。今後iPS細胞樹立を含めた機能解析方法を完成し、最終的にはこのシステムを応用して創薬に向けた検討を行いたい。(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。)

B．研究方法

【対象】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)。

【方法】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

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。

D．考察

私達の開発した「酵素診断から遺伝子解析に至る系統的病因探索システム」はしっかりと機能した。今後iPS細胞樹立を含めた機能解析方法を完成し病態を詳しく解明すると共に、このシステムを応用して5-ALAを発端とする創薬に向けた検討も発展させたい。

E．結論

私達の開発した「酵素診断から遺伝子解析に至る系統的病因探索システム」はしっかりと機能した。今後iPS細胞樹立を含めた機能解析方法を完成し病態を詳しく解明すると共に、このシステムを応用して5-ALAを発端とする創薬に向けた検討も発展させたい。（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。）

F．健康危険情報

特になし。

G．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): 180-187, 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:pii: S0387-7604 (13) 00286-6. 10.1016/j.braindev.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

H . 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
 分担研究報告書

ミトコンドリア病の病態に關与する新規因子の検索

研究分担者 北風政史 国立循環器病研究センター 部長

研究要旨 研究分担者は、脳死心臓移植を我が国で最も多く行う施設に所属し、重症心不全の病態解明、治療への応用を目的として研究を行っている。臓器の中で最もミトコンドリアが多く存在する心臓においては、ミトコンドリア病の病態が心機能不全として特異的に表れることが知られている。しかし、ミトコンドリア機能の心不全における具体的な重要性についてはまだほとんど解明されていない。本研究では心臓におけるミトコンドリア機能の解析を中心に、病態特異的に変化する新しい遺伝子の機能解析を行い、ミトコンドリア機能が関与する心疾患およびミトコンドリア病の病態解明、治療への応用をめざす。

A . 研究目的

ミトコンドリア病は主にミトコンドリアを構成するタンパク質、特に酸化リン酸化にかかわるタンパク質の異常によって発症することが知られている。酸化リン酸化を担うタンパク質群は数十からなる複合体を形成しており、酸素を消費して体内で消費される大部分のATPを産生する。

本研究ではATP代謝とくにその調節にかかわる分子の新たな同定をすすめることにより、ミトコンドリア病を含めたエネルギー代謝心疾患の病態の解明・治療への応用を図ることを目的とする。

B . 研究方法

心臓は体内で最も多くのミトコンドリアを含有する臓器であり、酸化リン酸化を担うタンパク質およびその調節蛋白質が最も多く存在する。我々はエネルギー枯渇状態に敏速に対応する調節因子を同定するため、心筋細胞を低酸素ストレスに暴露した時に一過性に誘導される因子に注目しその生化学的解析を行った。

（倫理面への配慮）

本年度は年度の最後において、研究代表者よりミトコンドリア病患者から採取した初代培養細胞を譲り受け実験を行うため、双方の臨床研究の倫理委員会に実験計画を申請、承諾のもと細胞の譲渡を行った。

C . 研究結果

24年度までの研究において、ミトコンドリアATP濃度を上昇させるタンパク質G0s2を同定した。G0s2は低酸素により発現誘導され、直接ミトコンドリアFoF1-ATPsynthaseに結合することが示された。さらに、G0s2を強制発現させた細胞はATP産生速度が上昇することが明らかとなった。培養心筋細胞により増大するATP産生速度の上昇のほぼ8割がG0s2の発現上昇により担われることが明らかになり、低酸素ストレス化におけるG0s2発現誘導の重要性が示された。G0s2を強制発現させた細胞においては低酸素にしたときにATP産生能の低下が抑制され、細胞保護的な作用が観察された。これらの成果は、25年度中に下記した論文にて発表した。

D . 考察

G0S2は生体内で最も多くのATPを産生するFoF1-ATPsynthaseの活性化タンパク質として初めて同定された分子である。G0s2の発現上昇はATP産生速度を、ミトコンドリア内膜の表裏でのプロトン濃度勾配が同じ条件で増加させた。この事実は、低酸素によりプロトン濃度勾配が低下した状態でもG0s2はFoF1-ATPsynthaseのATP産生効率を上昇させうることを示唆する。G0s2の発現を上昇させ

るような薬剤はミトコンドリア病を含めATP代謝がかかわる多くの疾患の治療薬となることが期待される。

E . 結論

ミトコンドリアFoF1-ATPsynthaseに直接結合してATP産生速度を上昇させるタンパク質G0s2を同定し、ミトコンドリア病の創薬標的としての可能性を示した。

F . 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

1)Kioka H, Kato H, Fujikawa M, Tsukamoto O, Suzuki T, Imamura H, Nakano A, Higo S, Yamazaki S, Matsuzaki T, Takafuji K, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Shintani Y, Yoshida M, Noji H, Kitakaze M, Komuro I, Asano Y, Takashima S. Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 111(1): 273-8. (2014)

2 . 学会発表

該当なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1 . 特許取得

発明名称 G 0 s 2 タンパク質を含有してなるATP産生促進剤

出願国・種類 日本・公開特許

出願番号(出願年月日) 特願 2012-119937 (2012-5-25)

発明者 高島成二、北風政史、朝野仁裕、小野薬品工業株式会社

出願人 高島成二、北風政史、小野薬品工業株式会社

2 . 実用新案登録

現在のところなし

3 . その他

特記すべき事項

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）

ミトコンドリア病の実態調査

分担研究者 古賀 靖敏 久留米大学医学部小児科 教授

研究要旨：ピルビン酸ナトリウム（PA）治療（Mitochondrion 2007;7:399 - 403）は、ミトコンドリア脳筋症の細胞モデルで細胞死を防ぐ効果があり、臨床研究でもジクロロ酢酸に勝る乳酸の軽減効果と臨床的有効性がある事を報告した。現在は、工業用試薬であるが、医薬品として上市するのに必要な非臨床試験、GMP 原薬製造、および第 1、第 2/3 相試験を行い、世界初の高乳酸血症治療薬を開発する必要がある。PA の有効性を検証するために、現在有効な治療法のない Leigh 脳症を中心に使用し、臨床的に評価した。対象患者は、臨床、病理学的、生化学的に診断の確定した Leigh 脳症及び MELAS、MELA の 54 症例であり、遺伝子異常では、ピルビン酸脱水素酵素欠損症、ミトコンドリア A3243G 変異、ATPase 6/8 変異、チトクローム C 酸化酵素欠損症、ミトコンドリア DNA 枯渇症などであった。臨床的には、活動性、乳酸、ピルビン酸、アラニン、L/P 比、その他のバイオマーカーを用いた。安全性の評価項目は有害事象、臨床検査値、血圧、駆出分画、eGFR とした。治療効果は、ほとんどの症例で有効と報告された。有効の内容としては、臨床的な改善、生活がしやすくなった、けいれんが止まったなどの報告が多かった。また、乳酸の低下、アラニン値の改善がみられたが、治療効果のない症例も報告された。副作用としては、用量が多くなるに従い、浮腫や下痢の有害事象が診られたが、医療的治療対象となる投薬は必要なかった。この全国調査のデータは、Phase2/3 試験プロトコルに反映する予定である。

A．研究目的

高乳酸血症の病態を踏まえた治療薬は今だ世界に存在しない。ミトコンドリア病では、高乳酸血症の程度が高度であるほど臨床的に重症で死亡率も高くなる事が示され（Neurology 2011;77:1965-1971）、高乳酸血症を治療することがミトコンドリア病の重症度を軽減できると考えられるようになった。しかし、従来、ジクロロ酢酸（DCA）が高乳酸血症に使用されていたが、その肝・腎・神経毒性が明らかになり、DCA にかわる薬剤の開発が急務となった。我々は、ミトコンドリア病での臨床研究から、PA が高乳酸血症を軽減するのみでなく、臨床的にもその重症度を軽くするという知見を得た。今回、確定した Leigh 脳症に対して、PA を使用し、その有効性につき検

討した。

B．研究方法

（1）当該研究計画に関して現在までに行った研究等 高乳酸血症に対するPA 治療（Mitochondrion 2007;7:399- 403）は、ミトコンドリア病の細胞モデルでも細胞死を防ぐ効果がある事が最近のメタボローム解析で証明された（Mitochondrion 2012;12:644-665）。また、臨床研究では、DCA に勝る高乳酸の軽減効果と臨床的有効性が示された（BBA 2010;1800(3): 313-5、Brain & Dev 2012;34(2)87-91、BBA 2012;1820:632-636）。

（2）対象としたLeigh脳症

臨床、病理学的、生化学的に診断の確定したLeigh 脳症54症例であり、遺伝子異常では、ピルビン酸脱

水素酵素欠損症、ミトコンドリアA3243G変異、ATPase 6/8変異、チトクロームC酸化酵素欠損症、ミトコンドリアDNA枯渇症などであった。

(3) 投与量

投与量は0.25g/kg/dayTIDから2.0g/kg/dayTIDまで幅広いが、ほとんどの症例で0.5g/kg/dayTIDの投与量を使用していた。

(4) 評価方法

これまでの臨床研究で認められたPAの主な有害事象は下痢、嘔気・嘔吐といった消化器症状である。また、水溶液に溶解する量によっては、浸透圧性の下痢が生じる可能性も考えられる。したがって、こうした消化器症状の有無を問診することによって、ピルビン酸Naの安全性を評価する。さらに、高用量を投与するとナトリウム負荷が大きくなり、血圧や腎機能、心機能に影響を及ぼす可能性が考えられる。このため、血圧・駆出分画・eGFRを測定し、有害事象の有無とこれらの測定値の変化を総合的に考慮し、次ステップに移行するかどうかを決定する。

(倫理面への配慮)

研究に先立ち、患者には研究の目的および、主旨、不利益・危険性の排除や説明と同意（インフォームド・コンセント）を十分に説明し、同意が得られた場合のみ研究を実施する。疫学調査に関しては、国が定めた「疫学研究に関する倫理指針」（平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号）、遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成16年文部科学省・厚生労働省告示第2号）、臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）に準拠して行う。また、本研究の計画調書は、すべての協力研究施設の倫理審査会に提出し、承認を得た。

C. 研究結果

共同研究の一環で、同じIRB資料を提供し、日本国内30施設でもPAの自主臨床研究を行った。対象患者は、臨床的にほとんどの患者がLeigh脳症の病型であったが、中にはMELAS、MELAの症例もあった。投与量は0.25g/kg/dayTIDから2.0g/kg/dayTIDまで幅広いが、ほとんどの症例で0.5g/kg/dayTIDの投与量を使用していた。治療効果は、ほとんどの症例で有効であり、臨床的な改善、生活がしやすくなった、

けいれんが止まったなどの報告が多かった。また、主治医の判断では、ほとんどの症例で有効であった。また、乳酸の低下、アラニン値の改善がみられたが、治療効果のない症例も報告された。副作用としては、用量が多くなるに従い、浮腫や下痢の有害事象が診られたが、医療的治療対象となる投薬は必要なかった。全国の自主臨床研究データを別添資料1に示す。

D. 考察

世界初の高乳酸血症治療薬を開発する目的で、試薬特級品であるPAを使用して、自主臨床研究による有効性を評価した。全国の実態調査を行ったが、主な対象疾患がLeigh脳症であったが、主治医の印象はほとんどが有効という判断であった。用法用量のまとめと有害事象については、今後のPhase2/3の試験に反映する必要があり、治験実施計画書（プロトコール）作成時に有用な情報となる。

F. 健康危険情報

PA使用実態確認のために、全国のPA使用実態調査を行った。投与量は0.25g/kg/dayTIDから2.0g/kg/dayTIDまで幅広いが、ほとんどの症例で0.5g/kg/dayTIDの投与量を使用していた。用量が1.0g/kg/dayTIDの高用量になると、服薬時の嘔吐や浮腫、下痢などが頻度が高く確認されるようになった。これらの有害事象は、用量を0.5g/kg/dayTIDに落とすと速やかに消失した。また、医療的治療の対象となる重篤な有害事象は無かった。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ピルビン酸ナトリウム アンケート集計

施設	患者	イニシャル	誕生日	臨床診断	酵素診断	pyruvate			有害事象	効果	使用前				使用后			
						用量	用法	経路			乳酸	PA	L/P	Ala	乳酸	PA	L/P	Ala
施設A	1			Leigh	PDHC E1a	0.25~1.0g/kg/day	3回/day	経口	下痢	乳酸値が低下するとともに安定化した。アラニンも減少した。乳酸値が正常後も、アラニンは低下を続した。現在も経口でき、自分で座れる。	8.6	0.61	21.2	1100	5.3	0.42	20.1	770
	2			Cardiomyopathy	A3243G (74%)	0.25~1.0g/kg/day	3回/day	経口	下痢、むくみ	乳酸値が低下するとともに安定化した。アラニンも減少した。	8.5	0.3	28.3	681.4	3.6	0.16	22.5	516
	3			MELAS/cardiomyopathy	A3243G (80%)	0.25~1.0g/kg/day	3回/day	経口	下痢、むくみ	乳酸値が低下するとともに安定化した。アラニンも減少した。	5.3	0.25	21.2	524.6	3.8	0.18	21.1	482
	4			myopathy	A3243G (35%)	0.25~1.0g/kg/day	3回/day	経口	軟便	乳酸値が低下するとともに安定化した。アラニンも減少した。	3.4	0.2	17	551.4	2.6	0.16	16.3	516
	5			myopathy	A3243G (32%)	0.25~1.0g/kg/day	3回/day	経口	軟便	乳酸値が低下するとともに安定化した。アラニンも減少した。	4.3	0.25	17.2	564.6	3.8	0.18	21.1	482
	6			MELAS/terminal	A3243G (65%)	0.25~1.0g/kg/day	3回/day	経口	吐き気	明らかな効果は不明。	5.2	0.27	19.3	651.4	5.2	0.24	21.7	586
	7			MELAS/terminal	A3243G (54%)	0.25~1.0g/kg/day	3回/day	経口	吐き気	乳酸値がやや低下するとともに安定化した。アラニンも減少した。	6.3	0.25	25.2	687.6	5.8	0.22	26.4	582
	8			MELAS/Leigh	G13513A (85%)	0.25~1.0g/kg/day	3回/day	経口	吐き気	乳酸値が低下するとともに安定化した。アラニンは不変。	3.4	0.15	22.7	536.2	2.1	0.15	14	544
施設B	9			Leigh?	PDHC	0.5g/kg/day	TID	経腸栄養	特になし	乳酸値が低下するとともに安定化した。アラニンも減少した。乳酸値が正常後も、アラニンは低下を続した。	43.8 mg/dl	5.0 mg/dl	8.76	1348.8 (2012.3.19)	18.2	2.4	7.6	610

施設	患者	イニシャル	誕生日	臨床診断	酵素診断	pyruvate			有害事象	効果	使用前				使用后			
						用量	用法	経路			乳酸	PA	L/P	Ala	乳酸	PA	L/P	Ala
施設C	10			ミトコンドリア肝症(ミトコンドリアDNA枯渇症候群)	複合体I+3+4欠損	0.5g/kg/day	3回/day	経腸栄養	吐き気	胆汁うっ滞が徐々に改善したが、10月下旬より急速に肝不全が悪化したため11月10日肝移植となった。	15.2mM	0.44 mM	34.5	587.4	5.02 mM	0.22 mM	22.8	
施設D	11			MELAS	A3243G	0.5g/kg/day	3回/day	経口	下痢	効果については判定不能、主治医の印象では効果はないか？	30.1mg/dl	1.35 mg/dl	22.3		23.9	0.99	24.1	
施設E	12				PDHC	0.45g/kg/d		3経口	下痢	下痢の様子をみながら増量している	20.5	2.38	8.6	660.2	24	2.65	9	550
	13				PDHC	0.52g/kg/d		3経口	下痢	下痢の様子をみながら増量している	23.5	2.75	8.5	561.3	27.4	3.13	8.75	607
	14				呼吸鎖複合体IV欠損	0.78g/kg/d		3経口	下痢	下痢なく順調に増量でき安定	30.5	1.63	18.7		32.8	1.17	28	
施設F	15			MRCO	複合体I+3+4欠損	0.67g/kg/day	3回/日	経管注入	吐き気	0.5g/kg/dayでは、乳酸が下がらなかつたので増量した。乳酸値ならびに乳酸/ピルビン酸比、肝機能異常値が低下した。身がしまり、体重増加を僅かに得ている。	87.2	3	29.2		38.8	1.8	21.5	
施設G	16			Leigh	?	0.5g/kg/d	TID	経口	下痢	2013年10月18日～開始にて効果不明	11.1	1.1	10	426	9.5	0.9	10	410
	17			MELAS	A3243G	0.5g/kg/day	TID	経口	下痢	2013年9月13日～開始したが苦いため拒薬。9月26日卒中様発作あり、ピルビン酸ナトリウムに戻す。	47.6	1.8	26.4	466	79.7	2.5	31.8	911

施設	患者	イニシャル	誕生日	臨床診断	酵素診断	pyruvate			有害事象	効果	使用前				使用后			
						用量	用法	経路			乳酸	PA	L/P	Ala	乳酸	PA	L/P	Ala
施設H	18			Leigh脳症		0.8g/kg/day	TID	経腸栄養	下痢	体重も増加し、状態が悪化し乳酸値が増加したため増量。乳酸値は低下した。内服開始後より痙攣が出現したが、ビルビンの影響か自然歴かは不明。ビルビン酸内服にて生きなが	53.3mg/dl	1.62mg/dl	32.9	343.8nmol/ml	44.8mg/dl	2.26mg/dl	19.8	
施設I	19			Leigh脳症	T893G	0.5g/kg/day	1日4回	胃ろう		投与前から血中乳酸値は低下している。また気管切開、在宅呼吸器の超重症児であり、有効性の評価は困難。	8.6mg/dl	0.41mg/dl			10.6mg/dl	0.65mg/dl		
施設J	20			Leigh脳症	T9185C	0.5g/kg/day	TID	経口	下痢	乳酸、ビルビン酸低下した。持久走大会で今までで一番早く走れた。	49.6	2.13	23.3	487.5	36.6	1.67	22	474
	21			Leigh脳症	mtDNA totalシーケンス異常なし	0.5g/kg/day	TID	経口	下痢		34.8	2.02	17.2	546.4	25.1	1.65	15.2	
	22			Leigh脳症	複合体V欠損、T8993G	0.5g/kg/day	TID	経口	下痢									
施設K	23			MELAS	A3243G	0.5g/kg/day	分3	経口	下痢	頭痛の回数が少なくなり、また、日常の疲れも軽くなった。	4.38mM	0.16mM	27.3	520.9nmol/ml	5.39mM	0.17mM	31.7	445
	24				複合体1+3+4欠損症	0.5g/kg/day	分3	経口	下痢		2.63mM	0.11mM	23.9	339.4nmol/ml	3.74mM	0.11	34	399
	25			MELAS		0.5g/kg/day	分3	経口		朝起きる時間が早くなった。	2.93mM	0.16mM	18.3	346	1.58mM	0.09mM	17.5	363

施設	患者	イニシャル	誕生日	臨床診断	酵素診断	pyruvate			有害事象	効果	使用前				使用后			
						用量	用法	経路			乳酸	PA	L/P	Ala	乳酸	PA	L/P	Ala
施設L	26			Leigh脳症		0.4g/kg/day (6.0g)	1日3回	経管		0.5g/kg/dを目標に増量した(現在は15kgとなり、0.4g/kg/dayになっている)乳酸値の低下を認めた。心不全が改善した印象。見た目の呼吸状態も多少は改善した印象。	47.2mg/dL	2.12mg/dL	22.3	867.5nmol/mL	9.8mg/dL	0.6mg/dL	16.3	787.5nmol/mL
	27			MELAS		0.45g/kg/day (25g)	1日3回	胃瘻		特に明らかな効果は確認していない。	18.5	0.52	35.5	235.1	14	0.42	33.3	
	28			Leigh脳症		0.6g/kg/day (8g)	1日3回	経口で初めて今は胃瘻		0.5g/kg/dを目標に増量した。明らかな効果は確認していない。	21.4	1.14	18.8		34.8	1.42	24.5	
施設M	29			Leigh脳症	複合体I、IV欠損	1g/kg/day	TID	胃管	高Na血症、死亡	乳酸値は上昇したが、L/P比改善を期待し増量した。病状は進行し、現在は1名は敗血症で死亡	21.5	1.38	15.6	414.6	71.2	3.64	19.5	569
	30			Leigh脳症	複合体I、IV欠損	1g/kg/day	TID	胃管	高Na血症	乳酸値も高いままだが酸血症には至らず重症心身障害児として在宅管理中	24.3	1.51	16	371.3	51.4	2.64	19.4	475
施設N	31			ミトコンドリア脳筋症	G3946A (MTND1)	0.4g/kg/day	TID	経口		乳酸値は変化なし。								
施設O	32			PDHC欠損症	E1α p.R263G変異	0.5g/kg/day		経口	軟便	発語は増えてきた印象あり、夕方に足がつる？こと増えた。	51.8	4.15	12.5	6.8	27.2	2.19	12.4	2.92

施設	患者	イニシャル	誕生日	臨床診断	酵素診断	pyruvate				有害事象	効果	使用前				使用后			
						用量	用法	経路				乳酸	PA	L/P	Ala	乳酸	PA	L/P	Ala
施設P	33			PDHCD	PDHA1	0.5g/kg/day	TID	腸瘻	下痢	家族の人を区別できるようになった。	30	3.1	10	872.8	16	1.1	1.4	323	
	34			PDHCD	PDHA1	1.8g/kg/day	TID	胃瘻	下痢	四肢の動き、笑顔などの表情が表出	79	8.7	9	1634	25	3.2	8	343	
	35			PDHCD	PDHA1	1g/kg/day	TID	経口	下痢	自閉傾向で動きもあまりなかったが、一緒に遊べるようになり、動き回れるようになった	20	2.3	9	405	18	1.9	9	540	
	36			PDHCD	PDHA1	1g/kg/day	TID	経口	下痢	乳児のため、不明	39	4.6	9	724	20	2.4	8	426	
	37			NICCD		0.25g/kg/day	TID	経口	下痢	不明	10	0.4	25	254	12	0.5	24	203	
	38			Leigh	9176T>C	0.5g/kg/day	TID	経口 or 経管	下痢	感冒時の一過性の退行がやや改善傾向	13	0.8	16.2	211.3	24	1.3	18.4	619	
施設Q	39			Leigh	NDUFAF6 (確定作業中)	0.5g/kg/day		胃瘻		体重が増えてきた	20.5	1.3	15.8	3.76	24.7	1.5	16.5	3.7	
	40			PDHC欠損症	E1 α p. A160V	0.5g/kg/day		ED		いまのところ変化なし	22.8	3.5	6.51	5.21	20.4	2.6	7.85	5.6	
	41			MELAS	Complex	0.5g/kg/day		経口		痙攣頻度が減って、はじめて無事に元気まで山形まで帰省できた。	18.5	1.2	15.4	3.32	11.9	0.6	19.8	4.24	
	42			Leigh	Complex I+IV	0.5g/kg/day		胃瘻		体重が16-7kgが20kgになった。	24	1.7	14.1		46.7	3.1	15.1		

施設	患者	イニシャル	誕生日	臨床診断	酵素診断	pyruvate				有害事象	効果	使用前				使用后			
						用量	用法	経路				乳酸	PA	L/P	Ala	乳酸	PA	L/P	Ala
施設R	43			CPEO	ミトコンドリアDNA欠失	0.5g/kg/day	TID	経口	吐き気・嘔吐、腹痛		3.0(mm ol/)	0.13(mmo l)	23						
	44			KSS	ミトコンドリアDNA欠失	0.5g/kg/day	TID	経口	下痢、四肢のむくみ、心不全	心不全のために中止	32.7	0.96	34		36.6	0.99	40		
	45			MERRF	A8344G	0.5g/kg/day	TID	経口	下痢、四肢のむくみ、心不全	心不全のために中止	55.6	1.68	33		67.5	1.44	46.9		
	46			MELAS	A3243G	0.5g/kg/day	TID	経口	吐き気・嘔吐、下痢	内服が負担になり本人希望で中止	25.1	1.05	23.9		32.4	1.35	24		
施設S	47			Leigh	ATPase6	0.5g/kg/day	分2	胃瘻	なし	投与開始数週間以内に四肢の動きが活発となり寝返りが可能となり、覚醒レベルの上があった。									
	48			Leigh	ATPase6	0.5g/kg/day	分2	経鼻	なし	投与開始前にCoQ投与で軽度ADL改善。その後ピルビン酸開始したが変化なし。	15.1	0.65	23.1		9.4	0.35	26.8		
	49			非特異的脳筋症	複合体 I+IV	0.5g/kg/day	分2	経口	なし	眼振の改善、寝返り能力の向上、四肢動作の俊敏性が見られた。	42.3	1.17	36.5		33.3	1.84	18.1		
	50			ミトコンドリアDNA枯渇	複合体 I,III,IV	0.5g/kg/day	分2	経鼻	なし	軽度の筋力改善									

施設	患者	イニシャル	誕生日	臨床診断	酵素診断	pyruvate			有害事象	効果	使用前				使用后			
						用量	用法	経路			乳酸	PA	L/P	Ala	乳酸	PA	L/P	Ala
施設T	51			MELAS	tRNA3243変異+(皮膚・筋)	0.5g/kg/day	TID	胃瘻	なし		26.9	0.61	44.1		23.7	0.74	32	
	52			Leigh脳症	G14439A	0.5g/kg/day	TID	内服	なし		35.4	1.45	24.4		36.8	1.94	19	
	53			PDHC欠損症	E1 α (I8塩基挿入)	0.5g/kg/day	DID	内服	なし		26.1	2.19	11.9	4209	26.8	3.79	7.1	
施設U	54			Leigh脳症	?	0.5g/kg/day	TID	経口 or 経管		活気良好になり、乳酸値も低下したが、経過中に気管喉頭分離術を行っている為、その影響の可能性もあろう	59.8	1.42	42.1	350.1	35.8	0.98	36.5	463
	55			Leigh脳症	複合体1欠損、G3697A	0.5g/kg/day	TID	胃瘻		副作用はなかったが、効果も認めず、開始後1年で中止	12.4	0.67	18.5	336.2	10.5	0.52	20.1	281
	56			MELAS	A3243G (血液で85%)	0.5g/kg/day	TID	経口		乳酸値低下し、母親の話では見違えるように元気になったと。走ることも可能になった。心機能改善は認めていない。	93.4	2.69	34.7		57.9	1.63	35.5	
	57			ミトコンドリア呼吸鎖異常	複合体1,3,4欠損	0.5g/kg/day	TID	経口	嘔気	吐き気は自然に改善 効果に関して、母親は良い印象を持たれている	38.1	1.64	23.2	252.6	14.4	0.56	25.7	253
	58			MELAS	A3243G (詳細不明)	0.5g/kg/day	TID	経口	下痢	下痢の副作用強く、開始後8か月で中止	23.2	1	23.2	406	28	1.19	23.5	
	59			MELAS	複合体1欠損	0.5g/kg/day	TID	経口	腹痛	腹痛は自然に改善 明らかな効果はいまのところ認めていない	15.6	0.84	18.6	354.2	13.4	0.6	22.3	
	60			MELAS	A3243G (詳細不明)	0.5g/kg/day	TID	経口		開始したばかりであり、効果判定不能	24	1.35	17.8		22.4	1.12	20	
	61			PDHC欠損症	E1 α exon10 c.936_939del TAAG	0.5g/kg/day	TID	経口		開始したばかりであるが、母親の話では活動量が増えたよう	18.8	1.78	10.6	442.8	24	2.18	11	630

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

卵子におけるミトコンドリア DNA の解析とミトコンドリア病に対する生殖医療サポート

分担研究者 末岡 浩 慶應義塾大学医学部産婦人科学 准教授

研究要旨 ミトコンドリア病の遺伝的伝搬による発生に関し、生殖医療における予防的医療の方法論の確立を目標に技術的検討を行った。ミトコンドリア病に対する着床前遺伝子診断 (preimplantation genetic diagnosis: PGD) を Leigh 脳症に対して、倫理承認を得て実施した。安全な変異比率を有する卵子を得る効率が課題と考えられた。PGD の他の方法として卵細胞質移植と核移植の方法が考えられ、提供卵子の取り扱い、安全性を含め倫理的議論および法の解釈について検討が求められる。また、ヒト卵子におけるミトコンドリア遺伝子の基礎的評価を行った。ヒト卵子には約 6×10^5 copy の mtDNA が存在し、mtDNA copy と細胞質体積は正の相関性があり、加齢群で mtDNA copy 数の減少を認めた。生殖医療面からミトコンドリア病の遺伝に関する疾患予防と卵子の妊孕性機能の双方から卵子 mtDNA の評価を行う意義が示唆された。

A. 研究目的

ミトコンドリア病が、卵子を介して遺伝的に伝搬し、発生する機構に対して生殖医療における予防的医療の方法論の確立のために技術的検討を行った。

B. 研究方法

1. 着床前遺伝子診断 (preimplantation genetic diagnosis: PGD) の技術開発

わが国においてミトコンドリア病に対する PGD は、重篤な遺伝性疾患に関する PGD が対象となる倫理上の基準から、これまでに 3 例の Leigh 脳症 (8993 T>G) の倫理申請を行った。ミトコンドリア病に対する PGD の対象、診断技術、効果について検討し、課題を抽出した。

2. 他の生殖医療によるミトコンドリア病の遺伝的発症予防の技術的・倫理的検討の調査

PGD 以外の生殖補助医療を用いた発症予防に関する

方法論として考えられる技術とその応用に関する倫理的背景について調査検討した。

倫理面への配慮：PGD に関しては、日本産科婦人科学会 “着床前診断に関する見解” に基づき実施することが定められている。十分な遺伝カウンセリング（第三者機関を含む）のうえで、実施施設の倫理委員会の審議のうえ、日本産科婦人科学会倫理委員会の審議を経て、実施承認を得た事例について対象とした。

3. 卵子機能としてのミトコンドリア遺伝子の基礎的評価

加齢などの要因により、胚発生・妊娠率低下の原因として、卵子のミトコンドリア (mt) DNA の質的・量的変化の示唆がなされているが、多くは解明されていない。疾患発生に関わる mtDNA の変化と胚発生に必要な mtDNA の質的・量的条件について解明が必要であり、ヒト廃棄卵子、胚における mtDNA を解析し、ミトコンドリア病に対する生殖

医療サポートの基礎データとして検討を行った。

C. 研究結果

1. PGD の技術開発と効果

新たな mtDNA 変異によって生じるミトコンドリア病に対する PGD の最適な適応として、ホモプラスミーで発症する Leigh 脳症 (8993T>G) が考えられ、我々は、日本産科婦人科学会の倫理承認を得たうえで実施に至った。生検については顕微授精後の初期胚から胚細胞および検体を吸引採取し、mtDNA のヘテロプラスミー変異率を測定し、疾患が発症するヘテロプラスミーの threshold 以下である胚を選択して胚移植に供した。実施事例は、45%の変異比率を有する女性保因者に対し実施し、生検胚のなかで低い変異比率を示す移植可能胚が存在せず、さらにその前後に成立した 3 回の妊娠においても変異比率は、全て 95%以上を示した。従って、PGD の根拠となるボトルネック効果によって分配される重篤なミトコンドリア遺伝子病を発症しない変異遺伝子の比率を有する卵子を得る効率面での課題が示された。

PGD の技術開発に関して、新たな手法のアプローチとして、これまでに開発した蛍光プローブを用いた定量 multiplex PCR に基づく比較定量分析法をさらに簡便化、共有化することをめざして、新たに multiple displacement amplification (MDA) による全ゲノム増幅法と RFLP 法を用いて、幅広いミトコンドリア病に適応できる汎用性診断技術の検討を行った。mtDNA の 8993T>G 変異型 Leigh 脳症保因者のリンパ球単一細胞を MDA で遺伝子増幅後、PCR 増幅を行い 169bp の増幅産物を得た。PCR 産物が制限酵素により、正常コントロール由来では 2 断片 (163, 6bp)、保因者由来では 3 断片 (93, 70, 6bp) に分離切断した。電気泳動の各バンドとして算出した。従来法に比較し、低いヘテロプラ

スミー比率を示したが、従来法と同等の診断効率を示し、更に低コストの利点も得られた。個々の変異遺伝子型によらず、多様なミトコンドリア病に対応することが可能な汎用性のある新たな方法となることが示唆された。

2. 他の生殖医療によるミトコンドリア病の遺伝的発症予防の技術的・倫理的検討の調査

生殖過程に伝播するミトコンドリア遺伝病の予防対策として考えられる生殖医療からの手法には、出生前診断、PGD、卵細胞質移植、核移植、健全な第三者からの卵子提供、の 5 種に分類され、各法についても倫理的、法的な観点からの課題について議論がなされてきた。PGD の効率面での課題から諸外国では、より確実に効率のよい、児の発症を防ぐ具体的な方法として、健全な第三者の提供卵子を用いることが考えられている。また、提供卵子そのものを用いる方法以外に卵細胞質移植と核移植の方法が考えられている。いずれも mtDNA の変異比率の高い保因者の女性の卵子に存在するヘテロプラスミー比率を低下させることを目的としている。これらの第三者の卵子またはその一部を用いる生殖補助医療に関して、英国の Human Fertilization and Embryology Authority (HFEA) による前核を用いた核移植についての研究が承認に至っている。しかし、わが国では、なお、現実的な議論が行われていない。

3. 卵子機能としてのミトコンドリア遺伝子の基礎的評価

卵子の細胞質体積は年齢、胚発生速度、形態学的評価の各々と関連することが示され、また、妊娠成立効果に関連していることが示唆された。ヒト卵子には約 6×10^5 copy の mtDNA が存在し、mtDNA copy と細胞質体積は正の相関性があり、加齢群で mtDNA copy 数の減少を認めることから、妊孕能は

胚の mtDNA copy 数の量的減少が影響していることが示唆された。

卵子・胚の定性的・定量的 mtDNA 解析によってミトコンドリア病保因者に対して疾患の発生を予測する可能性につながる意義が示され、疾患発症と卵子の妊孕性機能の双方から卵子 mtDNA の評価を行う意義が示された。

D. 考察

ミトコンドリア病の遺伝的発症を生殖医療技術を用いる予防法のなかで PGD は、法的・倫理的には最も合理的と考えられる手法である。しかし、比較定量化による診断技術は煩雑であり、mutant load の cut off の設定に議論があること、さらに発症を防止できる移植可能胚が得られる効率が不明であることなどが課題として挙げられる。これに対して、卵子提供、卵細胞質移植、核移植などの他の選択肢は、安定的な成果が期待できる効率的な方法である。その一方で、共に第三者の卵細胞を使用する点で議論がある。医学的なミトコンドリア遺伝病の伝搬を防止する効果とそのリスクについて解明されていない点が多く、また、倫理のおよび法的な視点で明確でない面を多く含んでいる。わが国においては卵子提供が制度化されておらず、匿名の卵子提供者を見つけることは非常に困難である。また、ミトコンドリア病の場合に第一度近親者間での提供を受ける場合にはクライアント妻の姉妹は疾患遺伝子の保因者である可能性があり、一方、クライアント夫の姉妹から提供を受けると血族間の生殖となり、実施が不適である。わが国において研究を前提としたトライアルを検討する可能性を含め、ミトコンドリア遺伝病の発症を防止する目的での生殖補助技術について、法律・倫理・医学の各局面から十分な議論のうえ研究が進められることが求められる。

E. 結論

生殖過程に伝播するミトコンドリア遺伝病の予防対策の観点から PGD および細胞質移植、核移植など他の生殖補助医療技術の選択肢について、生殖医療技術を用いる治療法の検討が必要である。また、効果と安全性の技術的検証や倫理的・法的な観点からの現実的な議論が求められる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yukitaka Murakoshi, Kou Sueoka, Kaori Takahashi, Suguru Sato, Tomoyoshi Sakurai, Hiroto Tajima, Yasunori Yoshimura: Embryo developmental capability and pregnancy outcome are related to the mitochondrial DNA copy number and ooplasmic volume. J Assist Reprod Genet 30:1367-1375, 2013

2. 学会発表

1) 水口雄貴, 末岡 浩, 泉 陽子, 五十畑 葵, 高橋香織, 佐藤 卓, 櫻井友義, 村越行高, 佐藤健二, 中林 章, 青木大輔, 吉村泰典: ミトコンドリア遺伝子のヘテロプラスミーに対する新たな着床前遺伝子診断法の構築 (高得点演題). “公益社団法人日本産科婦人科学会 第 65 回学術講演会”. (2013.5.10-12)

2) 水口雄貴, 末岡 浩, 佐藤 卓, 泉 陽子, 五十畑 葵, 高橋香織, 櫻井友義, 村越行高, 佐藤健二, 中林 章, 谷垣礼子, 大澤淑子, 吉村泰典: ミトコンドリア遺伝病に対する全ゲノム増幅 RFLP を原理とした新たな汎用性着床前 遺伝子診断法の基礎的検討 (世界体外受精会議記念賞候補). “第 31 回日本受精着床学

会学術講演会”。（2013 . 8.8 - 9）

3)村越行高， **末岡 浩**， 五十畑 葵，
泉 陽子， 高橋香織， 佐藤 卓， 櫻井友義，
佐藤健二， 中林 章， 吉村泰典:卵子容積とミ
トコンドリア遺伝子の加齢による変化. “第31回
日本受精着床学会学術講演会”。（2013 .8.8 - 9）

4)**末岡 浩**: ミトコンドリアと女性の病気.
“厚生労働科学研究費難治性疾患等克服研究事業
市民公開講座 ミトコンドリア 健康長寿から病
気まで”. 福井市地域交流プラザ AOSSA (福井
県福井市) (2013年9月16日)

5)村越行高， **末岡 浩**， 五十畑 葵，
泉 陽子， 高橋香織， 佐藤 卓， 櫻井友義，
佐藤健二， 中林 章， 吉村泰典:ミトコンドリ
ア DNA copy 数と卵子容積が胚発達へ及ぼす影響.
“第58回日本生殖医学会”。（2013 .11.15 - 16）

ポスター

6)水口雄貴， **末岡 浩**， 佐藤 卓，
泉 陽子， 高橋香織， 櫻井友義，
村越行高， 佐藤健二， 中林 章， 吉村泰典:
Multiple displacement amplification (MDA) を
用いたミトコンドリア病に対する新たな汎用性着
床前遺伝子診断法の確立. “第58回日本生殖医
学会”。（2013 . 11.15 - 16）ポスター

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1 . 特許取得
なし

2 . 実用新案登録
なし

3 . その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
 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、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。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になる可能性が示された。

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

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。

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

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。

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。

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。

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。

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。

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

GDF15の測定系をキット化し、ミトコンドリア病の重症度分類ならびに治療効果判定に利用する予定である。

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 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になる可能性が示唆された。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表 投稿準備中

2. 学会発表

1)Yasunori Fujita, Masafumi Ito, Toshio Kojima, Yasutoshi Koga, Masashi Tanaka. Identification of potential biomarkers for mitochondrial diseases by global gene expression analysis. International Symposium on Mitochondria 2013. Tokyo November 7, 2013

2)Tanaka, M. Metabolomic and Transcriptomic analyses of MELAS cybrids for validation of pyruvate therapy and for discovery of new biomarkers. 10th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine. Seoul November 4, 2013

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「ミトコンドリア病診断用バイオマーカーとしてのGDF15」特願2014-5391(平成26年1月15日出願)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
 分担研究報告書

モデルマウスを用いた変異型ミトコンドリアゲノムの病原性発揮に関する研究

分担研究者 中田 和人 筑波大学生命環境系教授

研究要旨 ミトコンドリア病では、病原性突然変異型ミトコンドリアゲノム(変異型mtDNA)が優位に蓄積した臓器にのみミトコンドリア ATP 合成不全とそれによる病態が誘導される。この閾値効果は個々のミトコンドリアの分裂と融合による遺伝子産物の交換(ミトコンドリア間相互作用)によって形成されると考えられている。本研究では、この閾値効果の分子機構の一端を解明するため、病原性欠失突然変異型(欠失型)mtDNA を導入したモデルマウスの組織におけるミトコンドリアの分裂と融合に関わる因子群の発現と局在を詳細に調べた。その結果、欠失型 mtDNA の蓄積に応じてミトコンドリアの分裂が増強する可能性を見出した。

A . 研究目的

哺乳類の mtDNA には酸化的リン酸化に關与する 13 種の呼吸酵素複合体遺伝子とそれらを翻訳するための 22 種の tRNA と 2 種の rRNA がコードされているため、変異型 mtDNA の病原性はミトコンドリアのエネルギー産生不全に歸結される。しかし、この病原性の発揮には閾値効果が働くことが知られている。例えば、欠失型 mtDNA は細胞または組織に 80%以上蓄積した時にのみ、病原性を発揮する。分担研究者らは、細胞内の個々のミトコンドリアは分裂と融合を介して遺伝子産物の交換(ミトコンドリア間相互作用)が可能で、例えば、1)欠失型 mtDNA の蓄積が 80%以下であれば、変異によって失われた遺伝子産物を野生型 mtDNA が相補できること、逆に 2)欠失型 mtDNA が 80%以上蓄積した場合は野生型 mtDNA からの遺伝子産物を競合することで細胞内の全てのミトコンドリアが異常になってしまうという 2 つの相反する表現型(閾値効果)を形成する可能性を見出している。現在までに、このミトコンドリア間相互作用を担保する分裂・融合因子群(分裂は Mff, Drp1、融合は Mfn1, Mfn2, OPA1)が相次いで報告され、変異型 mtDNA の病原性発揮の分子基盤を解析できる状況がようやく整ってきた。

このような状況の中、欠失型 mtDNA を導入したモデルマウスの解析から(G3, 2013) 1)50%程度の欠失型 mtDNA を蓄積する後期胚や出生後早期の個体の肝臓では正常なミトコンドリアと異常なミトコンドリアがモザイクに存在しており(ミトコンドリア間相互作用が不完全)結果的にエネルギー

産生異常が誘導される(既知の病原性閾値以下で病態が発症してしまう) 2)一方、50%程度の欠失型 mtDNA を蓄積する成体の肝臓では正常なミトコンドリアのみが存在していることを見出した。両者において欠失型 mtDNA の含有率は同程度であるため、2つの表現型の差異は閾値効果の制御の違い(ミトコンドリアの分裂と融合による相互作用の違い)に由来すると考えられた。そこで、肝臓をモデル臓器として、欠失型 mtDNA の蓄積によるミトコンドリアの分裂・融合に關与する因子群の変化を探索した。

B . 研究方法

欠失型 mtDNA を 0-60%程度含有するマウス群(生後 4-6 ヶ月齡)から肝臓を単離し、タンパク質を抽出した。これらのタンパク質サンプルを電気泳動後、ミトコンドリアの分裂と融合に寄与する因子群に対する特異抗体を用いてウェスタンブロッティング法を行った。特に、ミトコンドリア分裂に寄与する Drp1 は分裂制御のためミトコンドリア外膜に局在することが知られているため、提出した肝臓サンプルの一部からミトコンドリアを分画し、サンプルとして用いた。

(倫理面への配慮)

本研究で実施した動物実験は、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、施行したものである。

C . 研究結果

欠失型 mtDNA を含有するマウスから抽出した肝臓のミトコンドリアの分裂・融合に関与する因子群の発現変化を探索すると、欠失型 mtDNA の蓄積に関わらず、分裂因子の Drp1 と融合因子の Mfn1, Mfn2, OPA1 の発現量は変化していなかった。しかし、分裂因子の Mff の発現量は欠失型 mtDNA の蓄積に依存して増加していた。Mff はミトコンドリア外膜に局在し、Drp1 のアクセプターとして分裂面を決定するため、肝臓組織からミトコンドリア画分を調整し、Drp1 の局在量を解析したところ(Drp1 は外膜に輸送後、分裂を惹起する) 欠失型 mtDNA の蓄積に依存して Drp1 のミトコンドリアへの局在が増加していることが分かった。

D . 考察

成体の肝臓では、ミトコンドリアの融合に関与する因子群の発現量は欠失型 mtDNA の蓄積に関わらず一定であった。一方、欠失型 mtDNA の蓄積と相関して、Mff の発現増強、ならびに、Drp1 のミトコンドリア外膜への局在が増強されていた。Mff は Drp1 のアクセプターであり、Drp1 はミトコンドリア外膜に局在することでミトコンドリアの分裂を誘導するため、欠失型 mtDNA の蓄積による病原性制御にミトコンドリアの分裂が根源的な役割を果たしている可能性が想定できる。

そこで、現在、欠失型 mtDNA を含有するマウスの肝臓特異的に Drp1 を欠損させたマウスを作製し、その解析に着手している。このマウスを解析することで、閾値効果の形成におけるミトコンドリア分裂の生物学的重要性を解明できると考えている。

E . 結論

成体の肝臓では欠失型 mtDNA の蓄積と相関して、ミトコンドリア分裂が増強されることが分かった。この結果は、変異型 mtDNA 分子種の病原性発揮(閾値制御) にミトコンドリアの分裂が重要であることを示唆している。

F . 健康危険情報

なし。

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Enoki S, Shimizu A, Hayashi C, Imanishi H, Hashizume O, Mekada K, Suzuki H, Hashimoto T, Nakada K, Hayashi JI. Selection of Rodent Species Appropriate for mtDNA Transfer to Generate Transgenic Mitochondrial Mice Expressing Mitochondrial Respiration Defects. *Exp Anim.* 2014; 63(1): 21-30.
- 2) Shimizu A, Mito T, Hayashi C, Ogasawara E, Kobayashi R, Negishi I, Takenaga K, Nakada K, Hayashi JI. Transgenic mice as models for primary prevention of diseases caused by mutation in the *tRNA^{Lys}* gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111(8): 3104-9.
- 3) Takibuchi G, Imanishi H, Morimoto M, Ishikawa K, Nakada K, Toyama-Sorimachi N, Kikkawa Y, Takenaga K, Hayashi JI. Polymorphic mutations in mouse mitochondrial DNA regulate a tumor phenotype. *Mitochondrion.* 2013; pii: S1567-7249 (13) 00216-X.
- 4) Katada S, Mito T, Ogasawara E, Hayashi J, Nakada K. Mitochondrial DNA with a large-scale deletion causes two distinct mitochondrial disease phenotypes in mice. *G3 (Bethesda).* 2013 Sep 4;3(9):1545-52.
- 5) Mito T, Kikkawa Y, Shimizu A, Hashizume O, Katada S, Imanishi H, Ota A, Kato Y, Nakada K, Hayashi JI. Mitochondrial DNA mutations in mutator mice confer respiration defects and B-cell lymphoma development. *PLoS One.* 2013; 8 (2): e55789.

2. 学会発表

- 1) Nakada K. Reverse genetic studies on mutant mitochondrial genomes in mice. The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria (Dynamito 2013). Oct 28-Nov 1, 2013, Okinawa, Japan.

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。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
 分担研究報告書

MELAS A3243G 変異を有する患者における血中の酸化ストレスおよび抗酸化力の検討

分担研究者 米田 誠 福井県立大学 看護福祉学部 教授

研究要旨 脳卒中様発作を呈する MELAS 患者において、発作間欠期においても全身の酸化ストレスが亢進していることが、FRAS4 による血液中の d-ROMs および BAP の測定で明らかとなった。ミトコンドリア病患者において、酸化ストレスおよび抗酸化力の良い指標となることが示され、抗酸化療法の効果のモニタリングにも利用できると思われる。

A. 研究目的

Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) は、繰り返す脳卒中様発作を特徴とし、その発作はしばしば重篤な神経学的症状を引き起こし予後を規定する。既に、この脳卒中様発作病巣において、酸化ストレスが亢進していることが PET を用いた我々の研究で明らかにされている (Ikawa, Yoneda et al. Mitochondrion 2009)。一方、A3243G 変異を有しても、脳卒中様発作をきたさない患者もいる。

今回、我々は、A3243G 変異を有する患者において、脳卒中様発作を呈する患者と非発作の患者において、血液中の酸化ストレスおよび抗酸化力を比較検討した。

B. 研究方法

ミトコンドリア遺伝子 A3243G 変異を有する患者 14 名 (男性 7 名, 女性 7 名, 平均 32.1 歳) と正常対照者 34 名 (男性 20 名, 女性 14 名, 平均 34.6 歳) (対照群) における、血液中の酸化ストレスマーカー (d-ROMs) と抗酸化力マーカー (BAP) を FRAS4R を用いて測定し、各群で比較検討した。患者群はさらに、脳卒中様発作の既往があり発作間欠期にある MELAS 患者 10 名 (男性 5 名, 女性 5 名, 平均 27.8 歳) (以下、発作群) と、同変異は有するが糖尿病、心筋症のみを呈し発作の既往のない患者 4 名 (男性 2 名, 女性 2 名, 平

均 42.8 歳) (非発作群) に分け検討した。

(倫理面への配慮) この研究は、福井大学医学部倫理委員会の承認のもとに行い、患者あるいは家族には十分な説明を行った上、文書による同意を得た。

C. 研究結果

A3243G 変異を有する患者全体では、d-ROMs は対照群に比べ有意に上昇しており ($p < 0.005$), BAP/d-ROMs 比は有意に低下していた ($p < 0.02$)。発作群では、d-ROMs, BAP とともに対照群に比べ有意に上昇していた ($p < 0.01$)。一方、非発作群では対照群より BAP が有意に低下していた ($P < 0.001$)。

D. 考察

脳卒中様発作を呈する MELAS 患者においては、発作間欠期においても全身の酸化ストレスが亢進していることが明らかとなった。血液中の d-ROMs および BAP の測定は、ミトコンドリア病患者において、酸化ストレスおよび抗酸化力の良い指標となることが示され、抗酸化療法の効果のモニタリングにも利用できると思われる。

E. 結論

血液中の d-ROMs および BAP の測定は、ミトコンドリア病患者において、酸化ストレスおよび抗酸化力の良い指標となる。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉井幸恵, 米田誠, 井川正道, 古川高子, 清野泰, 森哲也, 吉井裕, 大山伸幸, 岡沢秀彦, 佐賀恒夫, 藤林靖久. ミトコンドリア病 MELAS 患者由来サイブリッドを用いた細胞内還元状態と放射性 Cu-ATSM 集積に関する検討. 日本イメージング学会誌, 第5巻, 2012.
- 2) 井川正道, 米田誠. ミトコンドリア病. PHARMSTAGE. 2012; 12, 48-52.
- 3) Yoshii Y, Yoneda M, Ikawa M, Furukawa T, Kiyono Y, Mori T, Yoshii H, Oyama N, Okazawa H, Saga T, Fujibayashi Y. Radiolabeled Cu-ATSM as a novel indicator of overreduced intracellular state due to mitochondrial dysfunction: studies with mitochondrial DNA-less 0 cells and cybrids carrying MELAS mitochondrial DNA mutation. Nucl Med Biol. 39:177-85, 2012
- 4) Tsujikawa T, Yamamoto T, Ikawa M, Yoneda M, Kimura H. Crossed cerebellar hyperperfusion after MELAS attack followed up by whole brain continuous arterial spin labeling perfusion imaging. Acta Radiol. 53:220-2, 2012
- 5) Ikawa, M., Arakawa, K., Hamano, T., Nagata, M., Nakamoto, Y., Kuriyama, M., Koga, Y. Yoneda, M. Evaluation of Systemic Redox States in Patients Carrying MELAS A3243G Mutation in Mitochondrial DNA. Eur Neurol 67:232-7, 2012.
- 6) 井川正道, 岡沢秀彦, 米田誠. 62Cu-ATSM PET-. Modern physician 2013;33, 577-579
- 7) 井川正道, 米田誠, 田中雅嗣. ミトコンドリア心筋症. 循環器内科 2013; 72, 592-598.

- 8) Masamichi Ikawa, Makoto Yoneda, Tomoko Muramatsu, Akiko Matsunaga, Tetsuya Tsujikawa, Tatsuya Yamamoto, Nobuyuki Kosaka, Kazuyuki Kinoshita, Osamu Yamamura, Tadanori Hamano, Yasunari Nakamoto, Hirohiko Kimura. Detection of preclinically latent hyperperfusion due to stroke-like episodes by arterial spin-labeling perfusion MRI in MELAS patients. Mitochondrion 13:676-680, 2013.
- 9) 井川正道, 米田誠. MERRF 代謝性ミオパチー, 2014 (印刷中)

2) 学会発表

- 1) Makoto Yoneda. PET Imaging of oxidative stress in neurodegenerative diseases using 62Cu-ATSM. International Symposium of Asian Association of Aging Research 2012, Fukuoka, Japan, 8.24-26, 2012
- 2) Makoto Yoneda, Masamichi Ikawa, Yukie Yoshii, Yasunari Nakamoto, Yasuhisa Fujibayashi, Hidehiko Okazawa. In Vitro and in vivo imaging of over-reduction states (oxidative stress) in MELAS using PET Radiopharmaceutical Cu-ATSM, The 64th Annual Meeting of American Academy of Neurology, New Orleans, LA, USA, 2012.
- 3) Masamichi Ikawa, Hidehiko Okazawa, Takashi Kudo, Yasunari Nakamoto, Yasuhisa Fujibayashi, Makoto Yoneda. PET Imaging of striatal oxidative stress in patients with Parkinson's disease using 62Cu-ATSM, The 64th Annual Meeting of American Academy of Neurology, New Orleans, LA, USA, 2012.
- 4) Makoto Yoneda, PET imaging of oxidative stress in neurodegenerative disorder. International Symposium on Mitochondria 2013. Tokyo, November 6 to 7, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

精神神経症状を呈したミトコンドリア病の 5 症例

研究協力者 佐野 輝

鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 精神機能病学分野 教授

研究要旨 ミトコンドリア病の精神神経症状は極めて多彩であり、病型依存性の一対一対応するようなものではない。精神症状は難病を抱えてのうつ病・うつ状態が多いが、精神疾患が多発する傾向も明らかである。今回、ミトコンドリア遺伝子変異を伴い、ミトコンドリア機能障害に依存する器質性病変に伴って発生したと考えられる気分障害や統合失調症様の精神病状態、認知症や人格変化などの多彩な精神症状を呈した 5 症例について、それぞれの遺伝子変異と精神症状について報告する。

A．研究目的

ミトコンドリア病の中には神経筋症状に加えて統合失調症やうつ病などの精神症状を呈する例がある。ミトコンドリア病にみられる神経筋症状に加え、うつ、統合失調症、認知症、人格変改などの精神症状やを呈し、ミトコンドリア DNA (mtDNA) 変異を有する 5 症例について遺伝子解析結果と、それぞれの精神症状について報告する。

B．研究方法

症例

症例 1 は 69 歳男性。両親はいとこ婚。統合失調症の診断で精神科病院に入退院を繰り返し、経過中認知症を呈し、CK 値上昇を伴う筋力低下を認めた。筋生検で筋線維の大小不同、RRFs や COX 部分欠損を認めた。頭部 MRI ではびまん性大脳皮質の萎縮、両側側脳室下角の開大と左尾状核頭部に点状に T1 強調画像で低信号、T2 強調画像で高信号領域を認めた。

症例 2 は 76 歳男性。74 歳時にうつ病で精神科病院に入院した。血清乳酸・ピルビン酸値の上昇を伴う眼瞼下垂や外眼筋麻痺を認めた。筋生検で筋線維の大小不同を認めたが、RRFs は認

めなかった。頭部 MRI では右側脳室のくも膜嚢胞と前頭葉の軽度萎縮を認めた。

症例 3 は 43 歳男性。両親はいとこ婚。16 歳から進行性の難聴を認めた。抑うつ気分や心身的訴えが強まり、血清乳酸・ピルビン酸高値となり、眼瞼下垂、外眼筋麻痺、筋力低下、網膜色素変性、両側性腺萎縮などを呈した。筋生検で筋線維の大小不同、RRFs や COX 部分欠損を認めた。頭部 MRI T2 強調画像で大脳白質にびまん性に高信号域を認めた。

症例 4 は、36 歳男性。25 歳時に、せん妄による精神運動興奮を伴う一過性の意識障害を呈し入院加療となった。脳脊髄液では乳酸、ピルビン酸の上昇を繰り返し認めたが、筋生検で筋線維の大小不同を認めたが、RRFs や COX 部分欠損は認めなかった。頭部 MRI T2 強調画像で右尾状核頭部、両側被殻に高信号域を認めた。

症例 5 は症例 4 の母親。37 歳時より一過性の意識障害を繰り返した。頭部 CT 上に一過性に出現する低吸収域を繰り返し認めた。

遺伝子解析 患者白血球もしくは患者筋肉が

ら常法を用いて DNA を抽出した。患者白血球、患者筋肉、患者母親白血球の mtDNA の配列解析とサザンブロットを行った。mtDNA 多重欠失を認めた症例 1～3 は mtDNA 変異をもたらす核性遺伝子群 (*POLG*, *POLG2*, *C10orf2*, *SLC25A4*, *ECGF1*, *OPA1*, *WFS1*) の変異検索にサンガー法による配列解析と real-time PCR 法による CNV 解析を行った。また、症例 1 と 3 についてはエクソーム解析を行なった。

(倫理面への配慮)

本症例の報告に当たっては、個人が特定されないよう十分に配慮した。また、本研究は鹿児島大学医学部生命倫理・遺伝子解析研究倫理委員会、遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を得た上で文章によるインフォームドコンセントを得た後に実施した。

C . 研究結果

症例 1

遺伝子変異：筋由来 mtDNA において多重欠失を認めた。今回検索した核性遺伝子群の配列解析やエクソーム解析では変異を認めなかった。

精神症状：22 歳時に幻聴、被害関係妄想などで発症し、以後単科精神病院への入退院を繰り返した。症候は DSM-IV-TR における統合失調症の t 診断基準を満たした。経過中 69 歳時に見当識障害、近時記憶障害、計算障害、構成失行などアルツハイマー型認知症類似の認知症症状を呈した。

症例 2

遺伝子変異：筋由来 mtDNA において多重欠失を認めた。今回検索した核性遺伝子群にはへに認めなかった。

精神症状：21 歳時に不眠、易疲労感を呈した。74 歳時に抑うつ気分、不眠、易疲労感などを呈し、DSM-IV-TR における大うつ病性障害の診断基準を満たした。眼瞼下垂とうつ症状の出現が相関していた。

症例 3

遺伝子変異：筋由来 mtDNA において多重欠失を認め、エクソーム解析において *RRM2B* 遺伝子の exon3 上にホモ接合性に点変異を認めた。

精神症状：16 歳時から進行性両側性難聴が出現し、抑うつ気分や不安、心氣的訴えが増加し、DSM-IV-TR における大うつ病性障害の診断基準を満たすに至った。徐々に人格変化を来し、こだわりが強まり、知的レベルは低下した。

症例 4

遺伝子変異：筋由来および白血球由来 mtDNA 上に m.1624C>T 変異をヘテロプラスミックに認めた。Real-time PCR を利用した ARMS 法による変異定量の結果、筋肉 由来 mtDNA 88.8%(29 歳時)、59.7%(36 歳時)白血球由来 mtDNA 47.8%(29 歳) 34%(36 歳)であった。

精神症状：25 歳時に意識障害と興奮状態を呈し、総合病院精神科に入院した。易怒性、興奮、見当識障害を動揺性に呈し、意識レベルは変動した。29 歳時に施行した WAIS-R では全 IQ69、36 歳時に施行した WAIS-III では全 IQ63 であり緩徐進行性の知的機能低下傾向が示された。

症例 5

遺伝子変異：白血球由来 mtDNA 上に m.1624C>T 変異をヘテロプラスミックに認めた。Real-time PCR を利用した ARMS 法による変異定量の結果、変異率は 17.4%であった。

精神症状：36 歳時に出現した一過性意識障害は精神運動興奮、幻視、幻聴やてんかん発作を伴うものであった。

D . 考察

多くのミトコンドリア病が精神症状や神経心理学的異常を来す。それらは意識障害、注意集中障害、気分障害、幻覚、人格変化など多彩である。呈示した症例はミトコンドリア病を呈する mtDNA 多重欠失や点変異を有していた事から、これら症例が呈した精神症状はミトコンドリア機能異常と深く関わる事が示唆された。全症例が変異をヘテロプラスミックに有しており、多彩な精神症状は脳におけるヘテロプラスミーと関連する可能性が示唆された。

E . 結論

ミトコンドリア病の精神症状は多彩であり、病型や遺伝子変異によって規定されるものではない。mtDNA 変異にはヘテロプラスミーがあり、

変異の比率や組織分布の多様性により臨床表現型が複雑化しているものと考えられる。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

1) 中村雅之、佐野 輝:ミトコンドリア病と精神疾患、*九州神経精神医学* 58:77-81、2012。

2) 中村雅之、佐野 輝:特集 精神疾患と神経疾患の境界領域 ミトコンドリア病、*分子精神医学* 13:35-42、2013

3) Sangatsuda Y, Nakamura M, Tomiyasu A, Deguchi A, Toyota Y, Goto Y, Nishino I, Ueno S, Sano A: Heteroplasmic m.1624C>T mutation of the mitochondrial tRNA^{Val} gene in a proband and his mother with repeated consciousness disturbances, *Mitochondrion.*, 12: 617-622, 2012

2.学会発表

1) Sangathuda Y, Nakamura M, Takatori Y, Sameshima T, Nakayama R, Sakaguchi N, Sameshima M, Watanabe O, Takashima H, Douchi T, Takahashi Y, Tanaka K, Sano A: Six cases of autoantibody-mediated limbic encephalitis with psychiatric symptoms, 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, 2013

H.知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

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	福嶋義光	遺伝医学やさしい系統講義18講	メディカル・サイエンス・インターナショナル	東京	2013	95-111
後藤雄一	ミトコンドリア病	永井良三、 太田健 総編集	内科学	朝倉書店	東京	2013	2339-2342

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
Ishiyama A, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Itagaki Y, Matsuzaki K, Nakura M, Nishino I, <u>Goto Y</u> , Sasaki M	Unusual exocrine complication of pancreatitis in mitochondrial disease.	<i>Brain Dev</i>	35	654-659	2013
Goto M, Komaki H, Saito T, Saito T, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Nishino I, <u>Goto Y</u> .	MELAS phenotype associated with m.3302A>G mutation in mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene.	<i>Brain Dev</i>	36	180-182	2014
<u>後藤雄一</u>	ミトコンドリア病の診断と治療	内分泌・糖尿病・代謝内科	37	481-486	2013
Enkai S, Koinuma S, Ito R, Igaki J, Hasegawa Y, Murayama K, <u>Ohtake A</u>	Case of an infant with hepatic cirrhosis caused by mitochondrial respiratory chain disorder.	<i>Pediatr Int</i>	55(4)	e103-6	2013
<u>Ohtake A</u> , 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.	<i>Biochim Biophys Acta (General Subjects)</i>	1840(4)	1355-1359	2014
Kondo H, Tanda K, Tabata C, Hayashi K, Kihara M, Kizaki Z, Taniguchi-Ikeda M, Mori M, Murayama K, <u>Ohtake A</u>	Leigh syndrome with Fukuyama congenital muscular dystrophy: A case report.	<i>Brain dev</i>	In press		2014
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, <u>Ohtake A</u>	Molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: Focusing on mitochondrial DNA depletion syndrome.	<i>Pediatr Int</i>	56(2)	180-187	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shimbo H, Takagi, M, Okuda M, Tsuyusaki Y, Takano K, Iai M, Yamashita S, Murayama K, <u>Ohtake A</u> , Goto Y, Aida N, Osaka H	A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome.	<i>Mol Genet Metab</i>	1	133-138	2014
Nagasaka H, Tsukahara H, Okano Y, Hirano K, Sakurai T, Hui S-P, Ohura T, Usui H, Yorifuji T, Hirayama S, <u>Ohtake A</u> , Miida T	Changes of lipoproteins in phenylalanine hydroxylase-deficient children during the first year of life.	<i>Clin Chim Acta</i>	In press		2014
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, <u>Ohtake A</u> , Okazaki Y	New MT-ND6 and NDUFA1 mutations in mitochondrial respiratory chain disorders.	<i>Ann Clin Transl Neurol</i>	In press		2014
Murakoshi, Y., <u>Sueoka K.</u> , Takahashi, K., Sato, S., Sakurai, T., Tajima, H., Yoshimura, Y	Embryo developmental capability and pregnancy outcome are related to the mitochondrial DNA copy number and ooplasmic volume.	<i>J Assist Reprod Genet</i>	30	1367–1375	2013
須藤章、佐野仁美、川村信明	頻回の卒中様発作を呈したMELASに対するL-arginine静注療法	脳と発達	46	39-43	2014
Enoki S, Shimizu A, Hayashi C, Imanishi H, Hashizume O, Mekada K, Suzuki H, Hashimoto T, <u>Nakada K</u> , Hayashi JI.	Selection of Rodent Species Appropriate for mtDNA Transfer to Generate Transmitochondrial Mito-Mice Expressing Mitochondrial Respiration Defects.	<i>Exp Anim</i>	63(1)	21-30	2014
Shimizu A, Mito T, Hayashi C, Ogasawara E, Koba R, Negishi I, Takenaga K, <u>Nakada K</u> , Hayashi JI.	Transmitochondrial mice as models for primary prevention of diseases caused by mutation in the <i>tRNA^{Lys}</i> gene.	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i> .	111(8)	3104-9	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takibuchi G, Imanishi H, Morimoto M, Ishikawa K, Nakada K, Toyama-Sorimachi N, Kikkawa Y, Takenaga K, Hayashi JI.	Polymorphic mutations in mouse mitochondrial DNA regulate a tumor phenotype.	<i>Mitochondria</i>	13	881-887	2013
Katada S, Mito T, Ogasawara E, Hayashi J, Nakada K.	Mitochondrial DNA with a large-scale deletion causes two distinct mitochondrial disease phenotypes in mice	<i>G3 (Bethesda)</i>	3(9)	1545-52	2013
Mito T, Kikkawa Y, Shimizu A, Hashizume O, Katada S, Imanishi H, Ota A, Kato Y, Nakada K, Hayashi JI	Mitochondrial DNA mutations in mutator mice confer respiratory defects and B-cell lymphoma development.	<i>PLoS One</i>	8(2)	e55789	2013
Ikawa M, Yoneda M, Muramatsu T, Matsunaga A, Tsujikawa T, Yamamoto T, Kosaka N, Kinoshita K, Yamamura O, Hamano T, Nakamoto Y, Kimura H.	Detection of preclinically latent hyperperfusion due to stroke-like episodes by arterial spin-labeling perfusion MRI in MELAS patients.	<i>Mitochondria</i>	13	676-680	2013
Yamasoba T, Lin FR, Someya S, Kashio A, Sakamoto T, Kondo K	Current concepts in age-related hearing loss: epidemiology and mechanistic pathways	<i>Hear Res</i>	303	30-38	2013
Kioka H, Kato H, Fujikawa M, Tsukamoto O, Suzuki T, Imamura H, Nakano A, Higo S, Yamazaki S, Matsuzaki T, Takafuji K, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Shintani Y, Yoshida M, Noji H, Kitakaze M, Komuro I, Asano Y, Takashima S.	Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation.	<i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i>	111(1)	273-8	2014
中村雅之、佐野 輝	特集 精神疾患と神経疾患の境界領域 ミトコンドリア病	分子精神医学	13	35-42	2013

第4回 国立精神・神経医療研究センター 遺伝カウンセリングセミナー

～ ミトコンドリア病 ～

【日時】2014年1月25・26日(土・日)

【会場】国立精神・神経医療研究センター(東京都小平市小川東町4-1-1)

【対象】臨床遺伝専門医、認定遺伝カウンセラー、遺伝医療専門職を目指す医師・学生、
遺伝性疾患を扱う機会のある医師・コメディカルなど

【定員】35名程度

【費用】5,000円(懇親会費および昼食費を含む)

【単位】臨床遺伝専門医3単位、認定遺伝カウンセラー5単位(ロールプレイ参加必須)

プログラム

1月25日 (土)	13:20 - 13:50	受付
	13:50 - 14:00	イントロダクション
	14:00 - 15:30	ミトコンドリア病 総論
	15:45 - 16:45	遺伝カウンセリングに必要な情報のまとめ
	17:00 - 18:00	遺伝カウンセリングの実際
	18:00 - 18:30	ロールプレイ説明
	18:30 - 20:30	懇親会
1月26日 (日)	9:00 - 12:00	グループ討論・ロールプレイ
	12:00 - 13:00	昼食
	13:00 - 14:00	全体討論

講師：後藤 雄一、林 由起子、小牧 宏文、石山 昭彦、清水 玲子、竹下 絵里、遠藤 ゆかり、
佐藤 有希子

【申込】参加希望の方は、申込書に記入し、下記にメール送付してください。(先着優先)

Mail: iden@ncnp.go.jp 申込書がない場合は、必要事項をメールでお送りください。

【受付】2013年10月1日～12月20日定員に達し次第、終了します。

【主催】国立精神・神経医療研究センター病院/トランスレーショナルメディカルセンター

【共催】厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業

「ミトコンドリア病の診断と治療に関する調査研究」班(班長：後藤雄一)

国立精神・神経医療研究センター筋疾患センター

《連絡先》

国立精神・神経医療研究センター病院 遺伝カウンセリング室

東京都小平市小川東町4-1-1 TEL: 042-341-2711 (内5824) Mail: iden@ncnp.go.jp

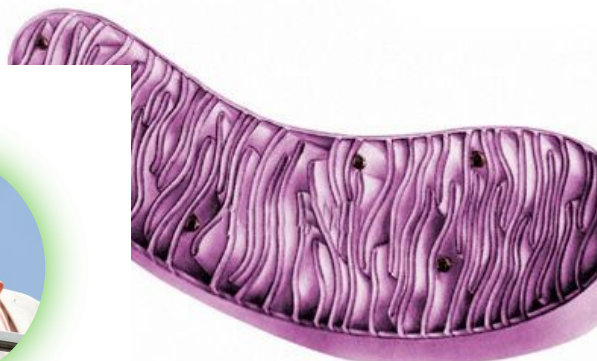
ミトコンドリア 健康長寿から病気まで

2013年9月16日 月祝 10:00▶12:30

会場 **AOSSA 6階 福井市地域交流プラザ**
[R 福井駅東口]

参加費
無料

事前申込み
不要



..... **米田 誠** [福井県立大学]

2 ミトコンドリアと健康長寿 **田中 雅嗣** [東京都健康長寿医療センター]

3 ミトコンドリアと子供の病気 **大竹 明** [埼玉医科大学小児科]

4 ミトコンドリアと大人の病気 **井川 正道** [福井大学神経内科]

5 ミトコンドリアと女性の病気 **末岡 浩** [慶應義塾大学産婦人科]

6 ミトコンドリア病の診断・治療体制の現状 ... **後藤 雄一** [国立精神・神経医療研究センター]

お問合せ

米田 誠 [福井県立大学看護福祉学部]
〒910-1195 福井県吉田郡永平寺町松岡兼定島 4-1-1
TEL 0776-61-6000(内線 4412)

会場案内

アオッサ
AOSSA 福井県福井市手寄1丁目4-1
電車でお越しの方：JR福井駅(東口)より徒歩1分
お車でお越しの方：福井市地域交流プラザの地下有料駐車場をご利用ください。
P アオッサ地下駐車場：最初の1時間200円 以降30分100円
他に、福井駅東口駐車場・福井駅東パーキングなど周辺に多数ございます。



主催：厚生労働科学研究費難治性疾患等克服研究事業「ミトコンドリア病の診断と治療に関する調査研究」班
研究代表者：後藤 雄一 [国立精神・神経医療研究センター]

後援：福井県、福井県立大学、福井大学、一般社団法人 福井県医師会、中日新聞・日刊県民福井、NHK 福井放送局、FBC 福井放送、福井テレビ、FM福井