

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)

ミトコンドリア病に合併する高乳酸血症に対する
ピルビン酸ナトリウム治療法の開発研究
試薬からの希少疾病治療薬開発の試み

平成 25 年度 総括・分担研究報告書
研究代表者 古賀 靖敏
平成 26 (2014) 年 3 月

目次

総括研究報告

1. ミトコンドリア病に合併する高乳酸血症に対するピルビン酸ナトリウム治療法の開発研究 試薬からの希少疾病治療薬開発の試み
古賀 靖敏・・・00
2. 別添資料
 - (1) 自主臨床研究データ
 - (2) 治験薬概要書（初版）
 - (3) 非臨床試験データセット
 - (4) 第1相試験実施計画書
 - (5) 治験薬 GMP 安定性に関する資料

分担研究報告

1. ミトコンドリア病に対するピルビン酸ナトリウム治療法に関する研究
村山 圭・・・00
2. ミトコンドリア病に対するピルビン酸ナトリウム治療法の検討
齋藤 伸治・・・00
3. 難治性ミトコンドリア病患者 3 例へのピルビン酸ナトリウムによる治療経験とミトコンドリア病に対する系統的病因探索システムについての研究
大竹 明・・・00
4. ミトコンドリア機能を制御する primary cilia に関する研究
藤井 克則・・・00
5. ミトコンドリア病に対するピルビン酸ナトリウム治療法に関する研究
但馬 剛・・・00
6. ミトコンドリア病治療における評価尺度の開発に関する研究
藤井 達哉・・・00
7. 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
田中 雅嗣・・・00

8. 肝型ミトコンドリア膜 aspartate glutamate carrier (シトリン) 欠損症モデルマウス
における血漿グリセロールの診断的価値

佐伯 武頼・・・00

9. TCA 回路と周辺の代謝機能解析に関する研究

山口 清治・・・00

10. 突然変異型ミトコンドリアゲノム分子の病原性発揮に関する研究

中田 和人・・・00

11. ピルビン酸ナトリウム投与対象となりうるミトコンドリア脳筋症患者選定に関する
研究

石井 亜希子・・・00

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

ミトコンドリア病に合併する高乳酸血症に対するピルビン酸ナトリウム治療法の開発研究
試薬からの希少疾病治療薬開発の試み

研究代表者 古賀 靖敏 久留米大学医学部小児科 教授

研究要旨

高乳酸血症は、種々の難治性神経・代謝疾患で観察される重要な病態であるが、この治療薬は今だ世界に存在せず、その病態を踏まえた新しい治療薬の開発が熱望されている。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事が目的である。平成 25 年度は、PA の医薬品としての開発を進めるために、PMDA への戦略薬事相談を行った。2 回の戦略相談において、1）非臨床試験の充足性、2）GMP 原薬製造、3）Phase1 試験のプロトコールについて相談を完了した。必須の非臨床試験データパッケージについては、（株）新日本科学と委託契約を行い、現在進行中の 2 試験（ラットにおける生殖細胞系列への影響、妊娠ラットにおける安全性）を除き、すべて終了し、その安全性、毒性になんら問題は見られていない。また、PA の GMP 原薬製造は、塩野香料（株）の系列会社である塩野フィネス（株）において、GMP 準拠した生産ラインにより 3 ロットの最終 GMP 製品の製造も完了し、4 か月における安定性試験も終了。その純度、安定性になんら問題ないことが示された。最終 3 ロットは、少なくとも 12 か月の消費期限を有しており、Phase1 試験の実施になんら問題は無い。Phase1 試験のプロトコールは、1）単回投与、2）反復投与、3）食事の影響の 3 試験を行う予定である。久留米臨床薬理クリニックにおいて、Phase1 試験を実施する委託契約を行った。同施設での IRB も 2 月 17 日に承認され、平成 26 年 2 月 20 日に PMDA への試験届を提出した。Phase1 試験提出後のレビュー期間において、治験の細部にわたり、疑義紹介についての回答も完了し、平成 26 年 3 月 20 日から Phase1 試験を実施する予定である。また、治験保険も加入し、治験薬搬入体制も完了した。Phase1 試験は、平成 26 年夏までに終了し、秋には報告書作成予定である。平成 26 年度は、Phase1 試験実施に加えて、Phase2/3 試験の実施計画書を確定する。ミトコンドリア病の新しいバイオマーカーである GDF-15 に対する用法特許を申請中である。また、GDF-15 と FGF-21 の 2 つのバイオマーカーを使用した、感度・特異度 98%を誇るミトコンドリア病特異的診断法の特許を申請予定である。

研究分担者

- | | | | |
|----------|----------------------------------|------------|----------------------------------|
| 1. 村山 圭 | 千葉県立こども病院代謝科・主任
医長 | 7. 田中 雅嗣 | 東京都健康長寿医療センター
臨床検査科・部長 |
| 2. 齋藤 伸治 | 名古屋市立大学大学院医学研究科
新生児・小児医学分野・教授 | 8. 佐伯 武頼 | 熊本大学生命資源研究支援セン
ター疾患モデル分野・特任教授 |
| 3. 大竹 明 | 埼玉医科大学小児科・教授 | 9. 山口 清次 | 島根大学医学部小児科・教授 |
| 4. 藤井 克則 | 千葉大学大学院医学研究院小児
病態学・講師 | 10. 中田 和人 | 筑波大学生命環境系・教授 |
| 5. 但馬 剛 | 広島大学医歯薬保健学研究院・
助教 | 11. 石井 亜紀子 | 筑波大学医学医療系神経
内科・講師 |
| 6. 藤井 達哉 | 滋賀県立小児保健医療センター
・病院長 | | |

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。このような世界情勢の中で、本研究は、先天性高乳酸血症の病態を踏まえた新しい治療薬の開発を目的としており、試薬からの医薬品開発研究として、日本から世界に発信できる独創的な開発研究を実施している。

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
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)。平成23年4月発足のミトコンドリア病の診断と治療に関する調査研究(後藤班)と連携し、MELASに対するアルギニンの医師主導試験の経験を踏まえ、医薬品開発研究に向けて、自主臨床研究として発表した。

(2) 治験薬概要書

Phase1を実施するために、承認申請までに必須の非臨床試験データセットにつき、戦略相談における対面助言を実施した。その結果、現在進行中の2試験(ラットにおける生殖細胞系列への影響、妊娠ラットにおける安全性)を除き、すべての非臨床試験を終了し、その安全性、毒性になんら問題は見られていない事を確認した。また、現在までの治験結果を集約し、治験薬概要書(初版)として纏めた。

(3) 非臨床試験の実施

「first in man」の医薬品を、試薬から開発するために、非臨床試験のデータセットの実施が必要である。このために、戦略薬事相談を行って、必須項目のデータセットについて、(株)新日本科学に委託し、実施した。

(4) 第1相試験計画(治験届提出)

将来の医師主導治験での第2/3相試験を実施する事を念頭に、第1相試験を計画した。これは、戦略薬事相談により指導を経て、プロトコルを確定した。

(5) 治験薬GMP製造・過酷試験結果

PAの製剤は、試験薬GMPにより製造され、CMOへの製造技術移転が完了するまでに原薬および最終製剤の暫定規格、規格設定のための試験方法の確立並びに安定性試験を行わねばならない。この基準をクリアするために、原薬製造メーカーである塩野フィネス(株)とGMP製造委託契約を行った。現在、第1

相試験の必須項目(原体の予備安定性試験、加速、過酷試験)を完了している。

(6) Phase1治験の体制整備

体制整備として、Phase1治験実施専門施設である久留米臨床薬理クリニック(伊藤実院長)と委託契約を結び、Phase1治験の体制整備を行った。同時に治験保険にも加入した。

(7) 医薬品・医療機器総合機能への戦略相談

戦P86相談

平成25年7月26日に事前面談を行い、平成25年11月1日に対面助言を行った。申請までに必要な非臨床試験のデータパッケージについて主に相談を行った。指導内容に従って、必須の非臨床検査を計画し実施している。

戦P103相談

平成25年11月1日に対面助言の日程調整を行い、平成26年1月27日に対面助言を行った。この相談では、Phase1試験の実施計画書について助言を頂いた。疑義照会と回答での指導の結果、実施計画書を確定した。

(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、承認を得る予定である。多施設共同研究の倫理審査会資料は、基本内容を一致させた上でそれぞれの研究参加施設の倫理委員会の承認を得る。この原案は、すでに国立精神神経医療センター、埼玉医科大学病院、久留米大学病院にてすでに承認されているが、それを基本とし、さらに修正し、新GCP準拠したものとする。また、第2相試験研究に関しては、「医薬品の臨床試験の実施の基準に対する省令」、新GCPに準拠し、患者の利益を最大限配慮しつつ、副作用に充分留意しながら、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)に基づき、ヘルシンキ宣言や、人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除や説明と同意に関して、十分な配慮のもとに行う。また、ビルビン酸ナトリウムの非臨床試験を行うに当たっては、動物を用いた短期、長期試験その他において、国が定めた「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)及び申請者が所属する久留米大学で定めた倫理規定等を遵守し、動物愛護上の配慮に充分留意した上で行う事とする。

C. 研究結果

(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)。平成23年4月発足のミトコンドリア病の診断と治療に関する調査研究 (後藤班) と連携し、MELAS に対するアルギニンの医師主導試験の経験を踏まえ、医薬品開発研究に向けて、自主臨床研究として発表した。また、本研究班として共同研究の一環で、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/day TID から 2.0g/kg/day TID まで幅広いが、ほとんどの症例で 0.5g/kg/day TID 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。

(2) 治験薬概要書 (初版)

非臨床試験データでの有用な情報をは、治験薬概要書 (初版) として作成した (**別添資料 2**)。現在までのデータでは、非臨床試験での毒性はほとんど診られず、対照である塩化ナトリウムの毒性がより強く診られた。PA は、元来、生体内物質であり、米国ではサプリメントとしての使用も長いため、その安全性も担保されていると考えられる。現在進行中の 2 試験 (ラットにおける生殖細胞系列への影響、妊娠ラットにおける安全性) が終了次第、治験薬概要書を版更新予定である。

(3) 非臨床試験の実施

「first in man」の医薬品を、試薬から開発するために、非臨床試験のデータセットの実施が必要であった。このために、戦略薬事相談を行って、必須項目のデータセットについて、(株)新日本科学に委託して、以下に示すような非臨床試験を実施した (**別添資料 3**)。

(4) 第 1 相試験実施計画書の確定

将来の医師主導治験での第 2/3 相試験を実施する事を念頭に、第 1 相試験を計画した。戦略薬事相談を重ねて、詳細な指導を経て、プロトコルを確定した。健康成人男性を対象とした第 1 相試験としては、単回投与試験、反復投与試験、食事の影響を評価する試験の 3 試験を実施する。これらの試験では、PA (原薬) を水に溶解して被験者に投与する。単回投与及び反復投与試験ではプラセボ群を設定するが、プラセボには薄い食塩水を用いる。第 1 相試験の投与量・投与回数はこれまでの臨床研究成績に基づいて設定した (**別添資料 4**)。

(1) 単回投与試験

本試験は、PA を単回投与したときの安全性及び薬物動態を評価する目的で実施する。1 ステップあたりの被験者数は 8 名 (実薬群 6 名、プラセボ群 2 名) とし、ステップごとにピルビン酸 Na として 0.08 g/kg (ステップ 1), 0.17 g/kg (ステップ 2), 0.33 g/

kg (ステップ 3) を単回投与する。この投与量は、それぞれ 0.25, 0.5, 1.0 g/kg/day という 1 日投与量を 3 分割したものである。

安全性の評価項目は有害事象、臨床検査値、血圧、駆出分画 (心エコーを実施して算出)、推算糸球体濾過量 (eGFR) とし、治験責任医師がこれら进行评估してから、次ステップに移行する。あわせて、試験中は血漿中のピルビン酸・乳酸・アラニン・fibroblast growth factor 21 (FGF-21) 濃度等を測定し、第 II/III 相試験の投与量を設定する際の参考データとする。

i) 投与量の設定根拠

上記の 3 用量のうち、これまでの臨床研究で主に使用されてきたのは、1 回投与量として 0.17 g/kg, 1 日投与量として 0.5 g/kg/day であり (4.6 項参照)、これを本試験の中心用量とした。次に、0.33 g/kg (1.0 g/kg/day を 3 分割したときの 1 回投与量) は経口投与可能な最大量として設定した。本薬はナトリウム塩であるため、この投与量を超えるとナトリウム負荷が大きくなり、長期間にわたって服用することは困難である。たとえば、体重 50 kg の患者に 1.0 g/kg/day を投与すると、ナトリウム負荷が 9.1 mEq/kg/day となる。日本人の平均塩分摂取量は 11.6 g/日であることから、平均的な塩分摂取に加えて本薬 1.0 g/kg/day を投与すると、通常のはぼ 3 倍のナトリウム負荷が生じることになる。

ii) 安全性評価項目の設定根拠

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。

(2) 反復投与試験

本試験は、PA を反復投与したときの忍容性、安全性及び薬物動態を評価する目的で実施する。被験者数は実薬群 6 名、プラセボ群 3 名とし、PA (1.0 g/kg/day) 又はプラセボを 1 日 3 回に分けて、7 日間反復投与する。なお、1.0 g/kg/day は現段階で想定する投与量であり、正式な投与量は単回投与試験成績を踏まえて決定する。

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 とする。あわせて、試験中は血漿中ピルビン酸・乳酸・アラニン濃度、FGF-21 などを測定し、第 2/3 相試験の投与量を設定する際の参考データとする。

i) 投与量の設定根拠

先に記載したように、これまでの臨床研究で主に使用されてきたのは 0.5 g/kg/day であり、第 2 相以降の臨床試験ではこれが推奨用量になると考えられる。ただし、第 1 相反復投与試験では忍容性評価を目的の一つとするため、単回投与試験の安全性データに問題がなければ、経口投与可能な最大量である 2.0 g/kg/day を使用し、健康成人男性での忍容性を確認したい。ただし、正式な投与量は単回投与試験成績を踏まえて決定する。

ii) 投与回数の設定根拠

1 日3 回という投与回数は、安定同位元素を用いたPAの薬物動態試験成績に基づいて設定した。この試験では¹³Cで標識したピルビン酸(PAとして100 mgを水50 mLに溶解して投与)を用いた結果、呼気中への排出は速やかで、絶食時投与の呼気への回収率は約20分、ブドウ糖摂取後投与の回収率は約60分でそれぞれピークに達した。本試験では投与後2時間までの回収量を測定したが、この試験成績から推定して、6時間以内には投与した薬物が体内から消失すると考えられる(治験薬概要書序文参照)。

一方、ミトコンドリア病患者のエネルギー産生を向上させる必要があるのは主に身体の活動中で、就寝中は向上させる必要性がそれほど高くない。このため、PAを1日3回投与すれば、身体活動に必要なエネルギー産生をもたらすことができると考え、第1相反復投与試験で1日3回投与の忍容性、安全性及び薬物動態を評価した後、第2/3相試験以降ではこの投与回数での有効性及び安全性を評価することとした。

(3) 薬物動態に及ぼす食事の影響を評価する試験被験者6名を対象とし、クロスオーバー法を用いて、空腹時及び食後にピルビン酸Naとして0.33 g/kgを単回投与し、薬物動態に及ぼす食事の影響を評価する。0.33 g/kgは単回投与試験の最大投与量で、空腹時と食後の生物学的利用能を比較するためには、可能な限り高用量を用いたほうがよいと判断した。ただし、これは現段階で想定している投与量であり、正式な投与量は単回及び反復投与試験成績を踏まえて決定する。

(4) 第1相試験(3試験)の治験薬の投与方法被験者には、服用直前にPA(原薬)を水に溶解して投与する。服用直前に溶解する理由は、水溶液中のPAの安定性が悪く、時間が経過すると、パラピルビン酸Naに分解するためである。また、粉末だとかさばるといった問題も生じる。たとえば、体重60 kgの被験者に0.17 g/kgのピルビン酸Naを投与する場合、投与量は10 gとなり、これを粉末として服用するのは困難である。

(5) 単回投与試験及び反復投与試験のプラセボ単回投与試験及び反復投与試験では対照としてプラセボ群を設定し、プラセボには薄い食塩水を用いる予定である。ピルビン酸Naは水に溶解することができ、高用量を投与する場合でも、50~100 mLの水に溶かせば無色透明の液体となる。このため、1回投与分の水溶液はコップに入れて被験者に提供することができ、外観が識別可能な場合でも、外側を紙で覆ったコップ(又は不透明なコップ)に水溶液を入れれば、両試験を単盲検デザインで実施することが可能である。ただし、コップの中身は被験者間で比べ合わないようにする。また、PAには特有の塩辛さがあり、同様の塩辛さをもつ不活性粉末は存在しないが、服用時の味覚を被験者間で話し合わないようすれば、薄い食塩水をプラセボとして単盲検試験を実施することは可能と考える。

(6) 単回投与試験の初回投与量単回投与試験の初回投与量は0.08 g/kgと設定した。この投与量は、これまでに実施した臨床研究成績に基づいて設定したものである。この臨床研究では、主として0.5 g/kg/dayという投与量が採用され、これを1日3回に分けて被験者に経口投与した。この場合、1回あたりの投与量は0.17 g/kgとなり、この用量は小児でも忍容可能であった。単回投与試験では、この半量である0.08 g/kgから投与を開始し

たいと考える。

参考までに、この臨床研究ではミトコンドリアDNAの変異(A3243G変異)を有するミトコンドリア病患者8名にピルビン酸Naを投与した結果、有害事象は3名に認められ、その内訳は嘔気(1名)、下痢(2名)であった。嘔気は軽度で、ピルビン酸Na開始時に発現したものの、その後は発現していない。下痢の内容は、水様便又は軽度の軟便(便性がやや柔らかくなった程度)で、いずれも投与継続中に消失した。すべての患者は現在でもPAの服薬を継続しており、重篤な有害事象や投与中止を必要とする有害事象は認められていない。

(5) 治験薬GMP製造した製剤の確保・製造工程記録一式

PAの製剤は、試験薬GMPにより製造され、CMOへの製造技術移転が完了するまでに原薬および最終製剤の暫定規格、規格設定のための試験方法の確立並びに安定性試験を行わねばならない。この基準をクリアするために、原薬製造メーカーの塩野フィネス(株)とのGMP製造委託契約を行った。現在、原体の予備安定性試験、加速、過酷試験に関し、塩野フィネス(株)、ノーベルファーマ(株)と共同し進め、6か月までの安定性に問題ないことを確認している(別添資料5)。

(6) 第1相試験実施体制の構築

体制整備として、Phase1治験実施専門施設である久留米臨床薬理クリニック(伊藤実院長)と委託契約を結び、Phase1治験の体制整備を行った。同時に治験保険にも加入した。

D. 考察

世界初の高乳酸血症治療薬を開発する目的で、試験特級品であるPAを出発点として、ステップ1の研究を行っている。上市に必要な非臨床試験のデータセットについては、すべての試験を(株)新日本科学に委託し、PMDAに相談の上で、必要十分な項目の研究が進んでおり、現在進行中の2試験(ラットにおける生殖細胞系列への影響、妊娠ラットにおける安全性)を除き、すべて終了し、その安全性、毒性になら問題は見られていない。GMP原薬の製造は、塩野フィネス(株)が製造し、純度及び安定性に関し、問題なく、Phase1試験の被験薬として準備できている。安定性についても過酷試験のデータが終了し、3ロットすべてが、Phase1試験の全期間をカバーしている。自主臨床研究として、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、プロトコール作成時に考慮する。Phase1試験の申請は平成26年2月20日に提出しており、疑義照会も終了している。平成26年3月20日から実施予定である。

E. 結論

平成25年度で、上市に必須の非臨床試験データパッケージをほぼ完了した。また、GMP原薬製造も終了し、その品質・過酷試験における安定性も問題なく完了した。Phase1試験のプロトコールも対面助言も終了し、平成26年2月20日に治験届けを提出、3月20日から実施している。本研究は予定のロード

マップに沿って、順調に進んでいる。

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。これは、本研究班としての共同研究の一環で、難治性で治療が待てない最重症病型であるLeigh脳症が主な治療対象である。同じIRB資料を提供し、日本国内30施設で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。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

古賀靖敏. ミトコンドリア脳筋症. 今日の神経疾患治療指針第2版. 791-797. 2013.

古賀靖敏. L-アルギニン (MELAS). 引ける 先天代謝異常症 (in press)

古賀靖敏. ミトコンドリア脳筋症治療の現状と展望. 日本臨床 72巻1号. 175-184. 2013

古賀靖敏. 希少難病：ミトコンドリア病の治療が可能となる時代に巡り合って（アルギニン療法、ピルビン酸ナトリウム療法の開発）：福岡県小児科医報 第51号. 91-98. 2013

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*. 2013 Nov [Epub ahead of print]

Ohtake A, Murayama K, Mori M, Harashima H, Yamazaki T, Tamaru S, Yamashita I, Kishita Y, Kohda, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Okazaki Y: Diagnostics for disease gene identification. *Biochim Biophys Acta (General Subjects on Special Issue: Frontiers of Mitochondria.)* in press, 2014.

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. doi:pii: S0387-7604(13) [E

pub ahead of print]

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*. 2013 Aug; 55(4):e103-6.

齋藤朋子、大山牧子、川滝元良、猪谷泰史、**村山 圭**：出生直後から代謝性アシドーシス、肝機能障害をきたした新生児期発症のミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症の1例. *日未熟児新生児会誌* 2014 (26) 131-137

森 雅人、**村山 圭**、大竹 明：特集 実地臨床に役立つ先天代謝異常症の知識 1. 専門医に確定診断を依頼するポイント ミトコンドリア病. *小児科診療* 76 (1): 11-19, 2013

川内恵美、**村山 圭**、伏見拓矢、市本景子、鶴岡智子、高柳正樹、大竹 明：ミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症における消化器症状についての検討. *日本小児栄養消化器肝臓学会雑誌* 27 (2) 148 - 154, 2013

村山 圭：新しい子どもの病気 先天代謝異常症 ミトコンドリア異常症のビタミンカクテル、食事療法 *小児内科*, 45 : 1072 - 1074, 2013

Ueda H, et al. Combination of Miller-Dieker syndrome and VACTERL association causes extremely severe clinical presentation. *Eur J Pediatr* (in press)

Suzumori N, et al. Prenatal diagnosis of X-linked recessive Lenz microphthalmia syndrome. *J Obstet Gynaecol Res* 2013;39:1545-7.

Hamajima N, et al. Increased protein stability of CDKN1C causes a gain-of-function phenotype in patients with IMAGE syndrome. *PLoS One* 2013;8:e75137.

Yoneda Y, et al. Phenotypic spectrum of COL4A1 mutations: porencephaly to schizencephaly. *Ann Neurol* 2013;73:48-57.

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): in press, 2014

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: ex

- ome sequencing for disease gene identification. *Biochim Biophys Acta (General Subjects on Special Issue: Frontiers of Mitochondria.)* 1840 (4): 1355-1359, 2014.
- 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.
- 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]
- Fujii K, Ohashi H, Hatsuse H, Uchikawa H, Miyashita T. Frameshift mutation in the *PTCH2* gene can cause nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Fam Cancer* 2013;12:611-4.
- Saito K, Kimura N, Oda N, Shimomura H, Kumada T, Miyajima T, Murayama K, Tanaka M, Fujii, T. Pyruvate therapy for mitochondrial DNA depletion syndrome. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:632-636
- Du J, Cleghorn W, Contreras L, Linton JD, Chan GC, Chertov AO, Saheki T, Govindaraju V, Sadiq M, Satrústegui J, Hurley JB. Cytosolic reducing power preserves glutamate in retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Nov 12;110(46):18501-6.
- Song YZ, Zhang ZH, Lin WX, Zhao XJ, Deng M, Ma YL, Guo L, Chen FP, Long XL, He XL, Sunada Y, Soneda S, Nakatomi A, Dateki S, Ngu LH, Kobayashi K, Saheki T. LC25A13 gene analysis in citrin deficiency: sixteen novel mutations in East Asian patients, and the mutation distribution in a large pediatric cohort in China. *PLoS One*. 2013;8(9):e74544.
- Llorente-Folch I, Rueda CB, Amigo I, del Arco A, Saheki T, Pardo B, Satrústegui J. Calcium-regulation of mitochondrial respiration maintains ATP homeostasis and requires ARALAR/AGC1-malate aspartate shuttle in intact cortical neurons. *J Neurosci*. 2013;33(35):13957-71.
- Chen R, Wang XH, Fu HY, Zhang SR, Abudouxikuer K, Saheki T, Wang JS. Different regional distribution of SLC25A13 mutations in Chinese patients with neonatal intrahepatic cholestasis. *World J Gastroenterol*. 2013;19: 4545-51.
- Llorente-Folch I, Sahún I, Contreras L, Casarejos MJ, Grau JM, Saheki T, Mena MA, Satrústegui J, Dierssen M, Pardo B. AGC1-malate aspartate shuttle activity is critical for dopamine handling in the nigrostriatal pathway. *J Neurochem*. 2013;124:347-62.
- Saheki T. "Animal models of enhanced oxidative stress" (especially murine model of human citrin deficiency), Eds. Tsukahara H & Kaneko K, "Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice - Pediatric Disorders" in press
- Ihara K, Yoshino M, Hoshina T, Harada N, Kojima-Ishii K, Makimura M, Hasegawa Y, Watanabe Y, Yamaguchi S, Hara T: Coagulopathy in patients with late-onset ornithine transcarbamylase deficiency in remission state: A previously unrecognized complication. *Pediatrics* 131(1): e327-30, 2013 (January)
- Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Takayanagi M, Fukao T, Fukuda S, Yamaguchi S: Intracellular in vitro probe acylcarnitine assay for identifying deficiencies of carnitine transporter and carnitine palmitoyltransferase-1. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405(4): 1345-1351, 2013 (February)
- Yamaguchi S, Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furuichi M, Taketani T, Fukuda S, Fukao T, Shigematsu Y: Expanded newborn mass screening with MS/MS and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in Japan. *日本マススクリーニング学会誌* 23(3): 270-276, 2013 (12月)
- 山口清次: MS解析による代謝障害の診断. *分子消化器病* 10(1): 72-78, 2013 (1月)
- 山口清次: 新生児スクリーニングの新時代 ; タンデムマス法の導入. *日本周産期・新生児医学会雑誌* 48(4): 827-829, 2013 (1月)
- 山田健治, 長谷川有紀, 吉川陽子, 高橋知男, 小林弘典, 虫本雄一, Jamiyan Purevsuren, 山口清次: 成人後に診断された有機酸・脂肪酸代謝異常症の臨床的検討. *臨床神経学* 53(3): 191-195, 2013 (3月)
- 山口清次: タンデムマスを用いた新生児マススクリーニングによる先天代謝異常症の早期診断. *小児科臨床* 66(2): 193-198, 2013 (2月)
- 高橋知男, 山田健治, 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, ジャミヤン・プレブスレン, 坂本修, 大浦敏博, 山口清次: 新生児マススクリーニングで発見された軽症型プロピオン酸血症: 有機酸とアシルカルニチンの推移. *日本マス・スクリーニング学会誌* 23(1): 49-53, 2013
- 山口清次: 小児科領域におけるタンデムマスとGC/MSの臨床応用: 最近の進歩. *臨床病理* 61(9): 817-824, 2013 (9月)

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 Mice Expressing Mitochondrial Respiratory Defects. *Exp Anim.* 2014; 63 (1): 21-30.

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.

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.

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.

Mito T, Kikkawa Y, Shimizu A, Hashizume O, Katada S, Imanishi H, Ota A, Kato Y, Nakada K, Hayashi JI. Mitochondrial DNA mutations in mutant mice confer respiratory defects and B-cell lymphoma development. *PLoS One.* 2013; 8 (2): e55789.

2. 学会発表

Yatsuga S, Koga Y. Fibroblast growth factor 21: a biomarker of mitochondrial diseases is increased in congenital hyperthyroidism and Hashimoto disease between endocrine diseases. 9th Joint Meeting of Paediatric Endocrinology. 2013.9.19 (Italy)

Koga Y. The development of two therapeutic drugs for mitochondrial disorders, L-arginine for MELAS, and sodium pyruvate for lactic acidosis. The 10th Conference of the Asian Society of Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM). 2013.11.4 (Korea)

Yatsuga S, Koga Y. Follow-up study: FGF21 is a new biomarker to diagnose muscle-related mitochondrial diseases in Japanese patients. International Symposium on Mitochondrial 2013. 2013.11.7 (東京)

Koga Y, Nakamura H, MELAS study group in Japan. Open labeled phase clinical trial of L-arginine on MELAS. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD)/The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). 2013.11.29 (Chiba)

古賀靖敏、中村秀文、医師主導治験グループMELAS. MELAS脳卒中様発作急性期に対するアルギニン治療の第3相オープン試験. 第116回日本小児科学会学術集会. 2013.4.20 (広島)

古賀靖敏. MELAS脳卒中様発作急性期に対するアルギニン治療の第3相オープン試験結果. 第54回日本神経学会学術大会. 2013.5.31 (東京)

古賀靖敏. NOを介したミトコンドリア脳筋症に対する世界初の治験薬開発. 第13回日本NO学会学術集会シンポジウム. 2013.6.29 (沖縄)

古賀靖敏. 希少疾病:ミトコンドリア病の治療法開発 アルギニンおよびピルビン酸ナトリウム. 第24回日本小児神経学会中国・四国地方会 特別講演. 2013.7.20 (岡山)

Fushimi T, Murayama K et al. : Diagnosis and Molecular Bases Of Mitochondrial Respiratory Chain Disorders In Japan. 12th International Congress of Inborn Error of Metabolism, Barcelona, Spain, 3rd-6th Sep

Kawachi E, Murayama K, et al. : Gastroenterological symptoms of mitochondrial respiratory chain complex deficiency. 12th International Congress of Inborn Error of Metabolism, Barcelona, Spain, 3rd-6th Sep

Togawa T, et al. Comprehensive mutation analysis by next generation sequencing in patients with neonatal intrahepatic cholestasis. 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Boston, USA, 10/22-26/2013

Hosoki K, Saitoh S. Molecular and clinical study of 30 Angelman syndrome patients with *UBE3A* mutations. 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Boston, USA, 10/22-26/2013

Negishi Y, et al. Homoplasmy of a mitochondrial 3697G>A mutation causes Leigh syndrome. 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Boston, USA, 10/22-26/2013

青山幸平ら. Greig cephalopolysyndactyly 症候群とMODY2を伴う隣接遺伝子症候群の1例. 第36回日本小児遺伝学会学術集会 平成25年4月18日

根岸豊ら. ミトコンドリア DNA 3697G>A ホモプラスミー変異はLeigh脳症の原因となる. 第58回日本人類遺伝学会 平成25年11月20-23日(仙台)

Ohtake A: Diagnosis and treatment for mitochon

drial 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

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 Academy hills 49 (Roppongi Hills Mori Tower 49F, Tokyo, Japan), 2013

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

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

Ikehara H, Fujii K et al. Hedgehog signaling is enhanced by nutritional deprivation in human fibroblasts of Gorlin syndrome. Keystone symposium of cilia, development, and human diseases (2014.3.2-7, CA, USA)

Fujii T, Nozaki F, Hayashi A, Kumada T, Hiejima I, Mori M, Miyajima M, Kusunoki T. Efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. International Symposium on Mitochondria 2013. Tokyo

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

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

佐伯武頼：成人発症II型シトルリン血症（CTLN2）の診断、病因・病態解析と治療法の開発 - 患者さんもモデルマウスも甘いものとアルコールが苦手です - . 川崎医科大学神経カンファレンス，倉敷，1月21日，2013年 .

Saheki T.: Studies on Citrin Deficiency and Carnitine Deficiency using Animal Models. Conference on Genetic and Metabolic Disease in Fujian, Fujian China, June 8, 2013.

佐伯武頼：シトルリン欠損症における糖とアミノ酸の代謝異常相関 . JSAAS2013 日本アミノ酸学会第7回学術大会，熊本，11月2日，2013年 .

佐伯武頼，藤本侑希，古家澄江，山村研一：モデルマウスを用いるシトルリン欠損症患者の糖質忌避の機構解析 . 日本人類遺伝学会第58回大会，仙台，11月23日，2013年 .

Saheki T: Citrin Deficiency: Discovery of the causative gene, analysis of pathophysiology and its clinical aspects. 3rd ACIMD/55th JSIMD, Educational Lecture, Maihama, Japan, November 27, 2013.

Saheki T, Fujimoto Y, Yamamura K: Plasma glycerol was increased parallel to blood ammonia in citrin deficiency model in response to administration of sugars, 3rd ACIMD/55th JSIMD, Maihama, Japan, November 27, 2013.

Fujimoto Y, Yano K, Yamashita K, Rikimaru S, Inoue K, Yamamura K, Saheki T: A possible diagnostic for citrin deficiency; high plasma and urinary glycerol detected in the model, Citrin / mGPD double-KO mouse, 3rd ACIMD/55th JSIMD, Maihama, Japan, November 27, 2013.

佐伯 武頼，藤本 侑希，山村 研一，井上 加奈子，小野 裕美：モデルマウスを用いたシトルリン欠損症における糖質毒性の解析 . 第17回日本病態栄養学会年次学術集会，大阪，1月11日 - 12日，2014年 .

Yamaguchi S: GC-MS for diagnosis of Organic Acidurias. International Conference on Inborn Errors of Metabolism 2013 講演. New Delhi, India, April 2013

Yamaguchi S: Fatty acid oxidation defects. International Conference on Inborn Errors of Metabolism 2013 講演. New Delhi, India, April 2013

Yamaguchi S, Purevsuren J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furuichi M, Fukao T, Shigematsu Y, Fukuda S: Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency and newborn screening in Japan. 2013 Joint Meeting of the Newborn Screening and Genetic Testing Symposium (NBS>S) and the International Society for Neonatal Screening (ISNS). Atlanta, USA, May 2013

Yamaguchi S: A new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation defects: Bezafibrate, a PPAR agonist. 12th Asian Oceanian Congress on Child Neurology. Riyadh, Saudi Arabia, September 2013

Yamaguchi S: Beriberi (Vitamin B1 deficiency) of young children lurking in modern life: A new approach for biochemical detection. 2013 Joint Meeting of 13th Asian Pan-Pacific Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition and 40th Japanese Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition シンポジウム. 東京, October 2013

Hasegawa Y, Kobayashi H, Yamada K, Takahashi T, Yamaguchi S: Selective screening for organic acidemias by urinary organic acids analysis using GC/MS in Asian countries. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD), The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). Chiba, November 2013

Yamaguchi S: Organic Acidemias and emergency treatments. 1st Asia Pacific Inborn Errors of Metabolism Course 講演. Tokyo, January 2014

高橋知男, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: サリチル酸の酸化に及ぼす影響: in vitro probe assay による評価. 第38回日本医用マスペクトル学会年会. 神戸, 2013年9月

Nakada K. Reverse genetic studies on mutant mitochondrial genomes in mice. The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria (Dyna mito 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
ミトコンドリア病診断用バイオマーカーとしてのGDF-15: 特許申請日2013年10月25日
申請番号: P13027TAN
国際特許分類: C12N 15/09
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

ミトコンドリア病に対するピルビン酸ナトリウム治療法に関する研究

研究分担者 村山 圭 千葉県こども病院代謝科 主任医長

研究要旨

ミトコンドリア病は新生児期から成人まで幅広く発症するエネルギー産生異常に基づく遺伝性疾患であり、その頻度は5000人に1人ともいわれている。本疾患の効果的治療法は未だ確立されておらず、新しい治療薬が待たれる現状である。本研究において、主に患者エントリー・患者サンプリングに関わった。全国から依頼のあったミトコンドリア病疑い症例に対して酵素診断を行うことで本症の診断を行った。また当院でミトコンドリア病と診断し外来フォローしている5症例にピルビン酸ナトリウムの投与を行い、その効果をみた。体重増加や動きの増加など投薬の効果と思われる減少が認められた。

A．研究目的

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

B．研究方法

診断について

本研究で我々が対象とした症例は、Bernierらのミトコンドリア呼吸鎖異常症の診断基準において“可能性例（possible）”以上の基準を満たした、本邦の症例である。平成26年12月末現在、日本全国の臨床医（主に小児科医）のご協力により、合計988症例から1573検体（皮膚線維芽細胞765検体、肝臓313検体、筋肉315検体、心臓119検体、その他腎臓・脾臓など61検体）のご提供を頂いた。臨床症状は、新生児期致死性高乳酸血症から急性脳症、思春期の軽い筋緊張低下や食欲不振までにわたり非常に幅広い。大部分が原因不明の高乳酸血症症例であるが、一部は高乳酸血症を呈さずに多臓器にまたがる症状を呈したことからミトコンドリア呼吸鎖異常症（MRCD）を疑われた症例も含む。

試料は、組織については-80℃にて保存された肝臓や筋肉の一片をホモジナイズし、600Gにて遠心後の上清を用いた。また皮膚線維芽細胞については、ミトコンドリア分画を単離したあと、界面活性剤であるドデシルマルトシドまたはTriton Xによって可溶化を行った。酵素活性は分光光度計を用い、光化学的に呼吸鎖I、II、III、IV及び対象としてクエン酸合成酵素（Citrate Synthase; CS）を測定した。呼吸鎖酵素活性はCS及びComplex IIとの相対比で表し、対照12人の平均に対する%で示した。

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

ピルビン酸Naについて

前述の診断法にて診断された当院でフォローしている5症例について、ピルビン酸Naの投与を行った。投与量は0.5kg/kg/dayで行い、体重増加に伴い量の調整を行った。

（倫理面への配慮）

検体検査に当たっては、患者さんご家族に十分説明した上で、倫理委員会において認可された検査同意書・承諾書を頂いた後に行った。

C．研究結果

これまでにサンプルを提供して頂いた988症例のうち、322症例（33%）を、MRCDと診断した。各年度別の診断数を図1に示したが、年々増加の一途を辿っている。また各臨床診断を図2に示す。この中で、神経疾患（Leigh脳症、MELASなどのサイトパチー、神経変性疾患）は全体の42%を占めた。図3に診断した患者分布を示す。多くの都道府県で診断されている一方で、依然として診断されていない県も存在する。

ピルビン酸Naが投与された5例の患者概要を図4に示す。平均年齢が7.4歳で投与期間は約197日だった。診断の内訳はLeigh脳症が3例、MELAS、PDHC欠損症が各1例である。多くの症例でけいれんや呼吸のコントロールがしやすくなり、身体を動かしやすくなるなどの機能改善も認められた。一方、副作用として下痢が認められた症例があった。乳酸値やLP比、AKBR、血中アラニンなどのバイオマーカーは有意な変化を示さなかった（図6）。

図1. 年度別 MRCD 診断数

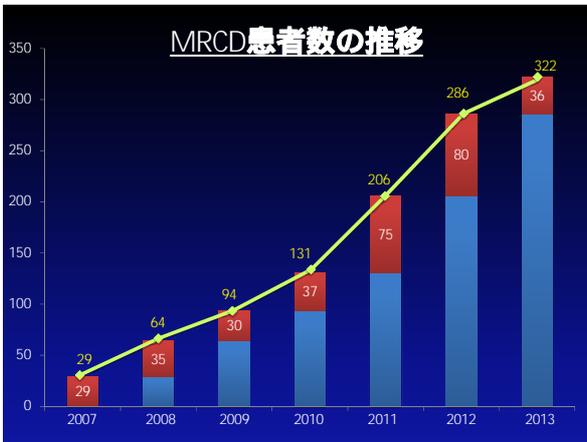


図2 MRCD の臨床分類別の症例数

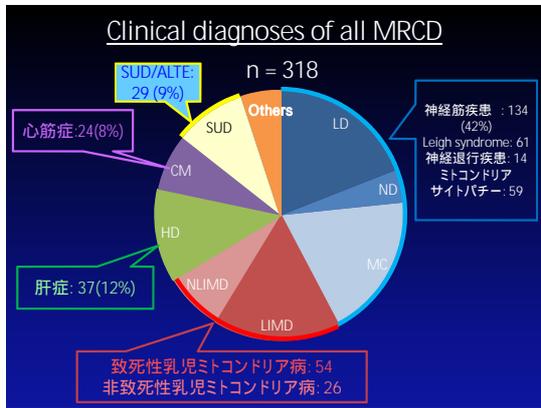


図3 MRCD の都道府県別診断数

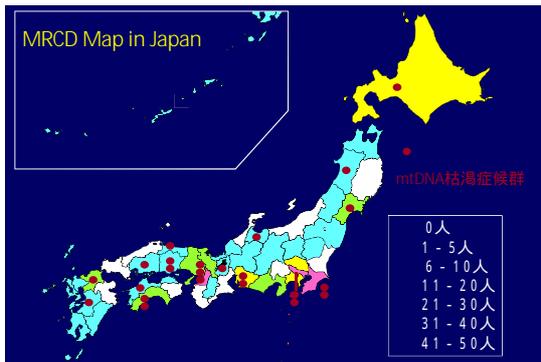


図4 ビルビン酸Na投与の患者概要



図5 ビルビン酸Na 投与5症例のまとめ

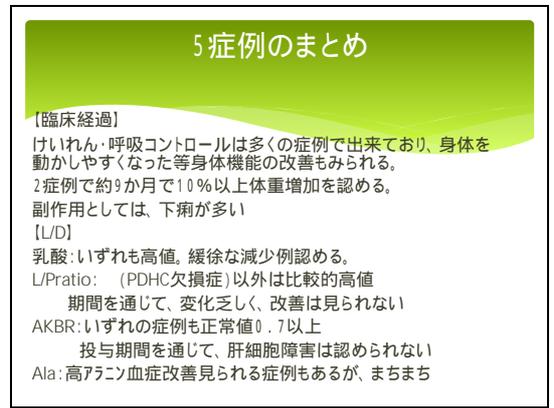
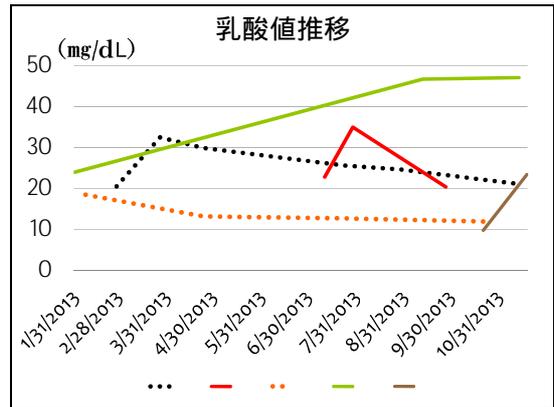
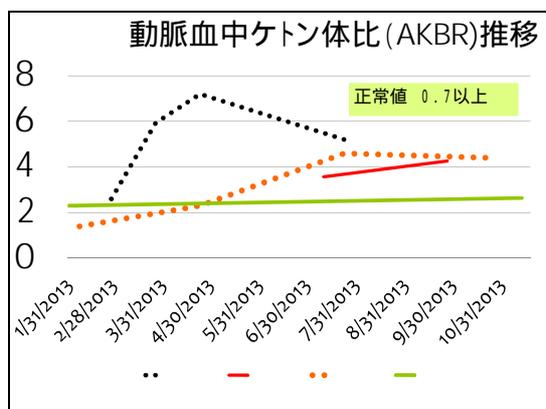
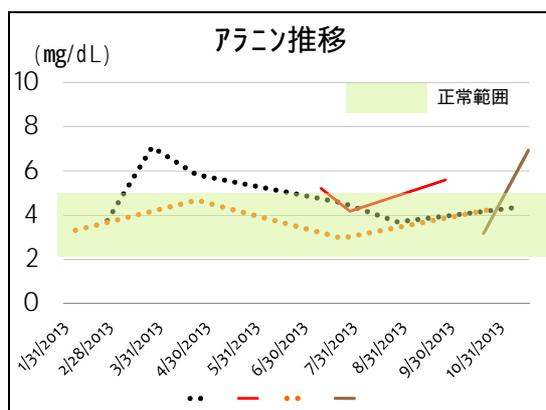
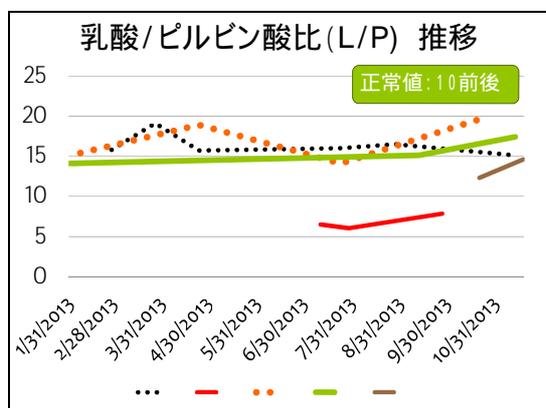


図6 各バイオマーカーの推移(4枚)





D. 考察

MRCDCは、非常に多い先天代謝異常症であり、発症年齢も様々である。酵素診断から包括的遺伝子診断といった診断システムの確立は、早期治療にも結びつくことになり、非常に重要である。特に日本を挙げた診断システムの確立とそれに先立つ診断基準の作成や、診療ガイドラインの作成が待たれるところである。また、ピルビン酸Naを投与したケースは大きな副作用なく投与できている。有意なバイオマーカーの改善はみられなかったが、ご両親の主観的な要因による肯定的な評価もみられた。特に呼吸サポートやけいれんコントロールの改善は客観的な評価であり、それなりの効果が認められたといえる。新しいバイオマーカーの開発とともに、本剤の早期の実用化が求められる。

E. 結論

MRCDCの診断数は着実に増加しており、見過ごせない先天代謝異常症である。酵素解析を中心に、確実に診断をしていくことが重要である。ピルビン酸Na

はMRCDCにおいて臨床的効果を認めている。本剤を含めた新しい治療薬の開発が待たれる。

F. 研究発表

以上に関連した論文として、2014年3月までに文献1-9)を発表した。

1. 論文発表

- 1) Yamazaki T, **Murayama K**, Compton AG, Sugiana C, Harashima H, Amemiya S, Ajima M, Tsuruoka T, Fujinami A, Kawachi E, Kurahige 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.* 2013 Nov [Epub ahead of print]
- 2) Ohtake A, **Murayama K**, Mori M, Harashima H, Yamazaki T, Tamaru S, Yamashita I, Kishita Y, Kohda, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Okazaki Y: Diagnostics disorders: exome sequencing for disease gene identification. *Biochim Biophys Acta (General Subjects on Special Issue: Frontiers of Mitochondria.)* in press, 2014.
- 3) 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. doi:p11: S0387-7604(13) [Epub ahead of print]
- 4) 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.* 2013 Aug;55(4):e103-6.
- 5) 齋藤朋子、大山牧子、川滝元良、猪谷泰史、**村山 圭**: 出生直後から代謝性アシドーシス、肝機能障害をきたした新生児期発症のミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症の1例. *日未熟児新生児会誌* 2014 (26) 131-137
- 6) 森 雅人、**村山 圭**、大竹 明: 特集 実地臨床に役立つ先天代謝異常症の知識 1. 専門医に確定診断を依頼するポイント ミトコンドリア病. *小児科診療* 76(1): 11-19, 2013
- 7) 川内恵美、**村山 圭**、伏見拓矢、市本景子、鶴岡智子、高柳正樹、大竹 明: ミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症における消化器症状についての検討. *日本小児栄養消化器肝臓学会雑誌* 27(2) 148 - 154, 2013
- 8) **村山 圭**: 新しい子どもの病気 先天代謝異常症 ミトコンドリア異常症のビタミンカクテル、食事療法 *小児内科*, 45: 1072 - 1074, 2013

2. 学会発表

- 1) Fushimi T, Murayama K et al.: Diagnosis and Molecular Bases Of Mitochondrial Respiratory Chain Disorders In Japan. 12th

International Congress of Inborn Error of Metabolism, Barcelona, Spain, 3rd-6th Sep

- 2) Kawachi E, Murayama K, et al. : Gastroenterological symptoms of mitochondrial respiratory chain complex deficiency. 12th International Congress of Inborn Error of Metabolism, Barcelona, Spain, 3rd-6th Sep

G . 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（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ミトコンドリア病に対するピルビン酸ナトリウム治療法の検討

研究分担者 齋藤 伸治 名古屋市立大学大学院医学研究科新生児・小児医学分野 教授

研究要旨

ミトコンドリア病に対するピルビン酸ナトリウム治療法の有効性と安全性を評価することを目的としてピルビン酸ナトリウム治療法を8名のミトコンドリア病患者に実施した。対象はMELAS症候群4例、Leigh症候群2例、複合体I, , 欠損症1例、PDHC欠損症1例である。年齢は1歳から21歳であり、性別は男2名、女6名である。高乳酸血症（20mg/dl以上）は5例であった。ピルビン酸療法は投与量0.5g/kgにて開始した。2名が中止となった。理由は、1名は1年の治療で効果がみられなかったことであり、もう1名は下痢の副作用と効果不十分であった。それ以外の副作用として特別なものはなかった。血中乳酸値は2例で低下した。臨床症状については明らかな改善は認めていないが、進行を抑制している可能性が示唆された。

A. 研究目的

ミトコンドリア病に対する保険収載された薬物は未だに存在しない。ピルビン酸ナトリウムはミトコンドリア病の細胞モデルにおいて細胞死を防ぐ効果があることが示され、先行する臨床研究において、乳酸の軽減効果と臨床的有效性が報告されている。現在、ピルビン酸ナトリウムを用いた医師主導治験が企画されているが、未だ実現していない。ミトコンドリア病は進行性の疾患であり、治験開始まで待てない患者様が存在する。そこで、今回私たちは、ミトコンドリア病8例を対象として、ピルビン酸ナトリウム治療法の有効性と安全性を評価する臨床研究を行うこととした。

B. 研究方法

対象とした患者は、MELAS 4名(m.3243A>G変異3例、不明1例)、Leigh症候群2名(m.3687G>A変異1名、不明1名)、複合体I, III, IV欠損症1例、ピルビン酸脱水素酵素(PDHC)欠損症である。年齢は1歳~21歳、男2名、女6名である。

ピルビン酸ナトリウムは一日量0.5g/kgを毎食後に内服とした。下痢の副作用を防ぐために、ピルビン酸ナトリウム3.3gに対して200ml程度の水で薄めて内服するように指導した。

評価については、ミトコンドリア病の重症度スコアおよびNPMDS(The Newcastle Pediatric Mitochondrial Disease Scale)を利用して判定した。開始前、投与開始1, 2, 3, 6, 12か月後に臨床症状と血液ガス、血中乳酸、ピルビン酸、血漿アミノ酸の評価を行う予定とした。副作用チェックとしてNa, K, Cl, Ca, ALT, AST, BUN, Cre, ALP, LDH, CK, TP, Glu, 血算ならびにアンモニアを測定する。

心臓エコー検査、心電図は開始前と3-6か月ごとに評価、脳MRI、脳波は開始前と開始後12か月に評価する予定とした。

(倫理面への配慮)

本研究は名古屋市立大学大学院医学研究科倫理審査委員会の承認を受け、解析にあたっては、ご家族から書面による同意を得た。

C. 研究結果

現在、6例が開始後1年を経過し、2例はそれぞれ10か月、7か月経過している。1年の評価で1例は効果を認めず、研究終了となった。残り5例は明らかな改善とは言えないが、落ち着いた状態であったために、ご家族は継続を希望された。服薬に関しては、経口での服薬は5名、経管による服薬を3名に行っているが、所定の服薬が持続できている。副作用としては、1例で下痢が出現し、効果をはっきりしなかったこともあり、ご家族が研究の中断を希望された。それ以外の患者では問題となる下痢は診られなかった。検査データについては、乳酸の値が低下したと考えられたのは2例であった。その他の検査上の副作用は認めていない。乳酸値の低下と症状との関連はなかった。

D. 考察

倫理審査委員会の審査と承認を受けて、平成24年9月からピルビン酸ナトリウム治療研究を開始した。これまでに6名に対して1年以上の服薬を行うことができた。1年の段階で、ご家族と服薬の継続を協議したところ、1例では期待された症状の改善がみられなかったために、服薬の中止を希望された。残り、5例では継続を希望された。今回の評価では、

明らかな症状の改善と考えられる例はみられなかったが、服薬を開始してから表情が良くなった、通院の回数が減ったなどの印象が述べられ、症状の進行を抑制している可能性が唆された。もともと、ミトコンドリア病は進行性疾患であり、症状の進行がみられないことが治療効果を示している可能性がある。しかし、この状態で改善と評価することは困難であり、長期にわたる経過観察が唯一の評価方法となると考えられた。

副作用に関しては、大きな問題はなかった。しかし、1例で服薬開始8か月の時点で下痢がめだつことを理由に服薬の中止を希望された。下痢の程度自体はあまり強いものではなかったが、服薬開始前よりは便性が悪化し、排便回数も増えた。体重減少などはみられなかった。中止を希望された理由は下痢に加えて、効果がみられなかったことが大きい。もし、明らかな効果がみられれば、継続されていた可能性が高いと考えられた。それ以外には採血上も明らかな副作用はなく、ピルビン酸ナトリウム治療の安全性については、これまでの報告と同じように、大きな問題がないと言えるが、やはり、下痢の合併には注意が必要である。

治療判定として分かりやすい指標である血中乳酸値については、2例で低下したと考えられる。しかし、乳酸の値は3か月ごとの評価でもかなり上下するために、本当に低下したかどうかには慎重な判断が求められる。乳酸値は患者の状態により変動が大きいこともあり、評価が難しい。髄液の乳酸の方が、状態をより良く反映している可能性があるものの、現実的には定期的な測定は困難である。

臨床症状の評価は、更に困難である。これまでの経過では、NPMDsに変化が現れるような大きな変化は認めていない。また、本来進行性の疾患であることを考えると、現状維持自体に意味がある可能性がある。MELASでは梗塞様発作の回数により評価ができるかもしれないが、そのためにはより長期の観察が必要になると思われる。

E. 結論

8名のミトコンドリア病患者に対して、ピルビン酸ナトリウム治療を実施した。安全性には大きな問題はないと言えるが、下痢の合併には配慮が望まれる。臨床的に改善した例はなかったが、症状の安定が得られた可能性が考えられた。効果判定には長期的な検討が望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ueda H, et al. Combination of Miller-Dieker syndrome and VACTERL association causes extremely severe clinical presentation. *Eur J Pediatr* (in press)

- 2) Suzumori N, et al. Prenatal diagnosis of X-linked recessive Lenz microphthalmia syndrome. *J Obstet Gynaecol Res* 2013;39:1545-7.
- 3) Hamajima N, et al. Increased protein stability of CDKN1C causes a gain-of-function phenotype in patients with IMAGE syndrome. *PLoS One* 2013;8:e75137.
- 4) Yoneda Y, et al. Phenotypic spectrum of COL4A1 mutations: porencephaly to schizencephaly. *Ann Neurol* 2013;73:48-57.

2. 学会発表

- 1) Togawa T, et al. Comprehensive mutation analysis by next generation sequencing in patients with neonatal intrahepatic cholestasis. 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Boston, USA, 10/22-26/2013
- 2) Hosoki K, Saitoh S. Molecular and clinical study of 30 Angelman syndrome patients with UBE3A mutations. 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Boston, USA, 10/22-26/2013
- 3) Negishi Y, et al. Homoplasmy of a mitochondrial 3697G>A mutation causes Leigh syndrome. 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Boston, USA, 10/22-26/2013
- 4) 青山幸平ら. Greig cephalopolysyndactyly 症候群と MODY2 を伴う隣接遺伝子症候群の1例. 第36回日本小児遺伝学会学術集会 平成25年4月18日
- 5) 根岸豊ら. ミトコンドリア DNA 3697G>A ホモプラスミー変異は Leigh 脳症の原因となる. 第58回日本人類遺伝学会 平成25年11月20-23日 (仙台)

G. 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（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

難治性ミトコンドリア病患者3例へのピルビン酸ナトリウムによる治療経験と
ミトコンドリア病に対する系統的病因探索システムについての研究

研究分担者 大竹 明 埼玉医科大学小児科 教授

研究要旨

難治性ミトコンドリア病3症例にピルビン酸ナトリウムを投与した。筋力を中心に病像改善の印象は強く、症状・検査結果に副作用と考えられるものはない。今後NPMSなど種々の臨床評価スケールによる評価を継続し、バイオマーカー等を含めた客観的評価も行って行きたい。

呼吸鎖酵素診断により全国からの依頼患者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

荒尾正人（埼玉医科大学小児科）

A. 研究目的

前段ではピルビン酸ナトリウムを投与した難治性ミトコンドリア病3症例の経過を報告する。次いで後段ではミトコンドリア病に対する酵素診断に始まる系統的病因探索システムの構築について報告する。

B. 研究方法

【対象】ピルビン酸ナトリウムは以下の3症例に投与した。易感染性と発達遅滞を主訴に1歳前に発病した、3243A>G変異を持つMELAS/Leighオーバーラップ症候群男児、1歳前に退行で発病しG14439A (ND 6:P to S)変異を持つLeigh脳症の女児。胎児期から脳質拡大を指摘されていたPDHCE1 遺伝子に8塩基挿入変異を持つLeigh脳症の女児。

病因解析システムは、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）を対象とした。

【方法】ピルビン酸ナトリウムは病院倫理委員会の承認の下、保護者より文書での同意をいただき、0.5mg/kg/日で経口投与する。

系統的病因解析システムは以下の項目から成る。
1) Blue Native 電気泳動を用いたWestern Blotとin gel enzyme stain、およびin vitro酵素アッセイを用いた呼吸鎖酵素複合体蛋白レベルの解析。
2) サンガーシーケンス法や次世代シーケンス法によるミトコンドリアDNA全周塩基配列の解析。
3) ミトコンドリアDNA枯渇症候群 (mitochondrial DNA depletion syndrome: MTDPS) 疑い例については、定量的P

CR (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

ピルビン酸ナトリウム投与により筋力を中心に病像改善の印象は強く、症状・検査結果に副作用と考えられるものはない。今後NPMSなど種々の臨床評価スケールによる評価を継続し、バイオマーカー等を含めた客観的評価も行って行きたい。

系統的病因解析システムの結果は以下の通りである。
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。(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。)

D. 考察

難治性ミトコンドリア病3症例にピルビン酸ナトリウムを投与し、筋力を中心に病像改善の印象は強かった。また、症状・検査結果に副作用と考えられるものはない。ミトコンドリア病に対する系統的病因探索システムについては、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。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。

E. 結論

ピルビン酸ナトリウムの自主臨床研究により、その有効性が期待されるが、今後詳細な検討が必要である。ミトコンドリア病に対する系統的病因探索システムは有用であり、新規変異の同定が進み、新しい治療法の開発の端緒となると考えられる。

F. 研究発表

- 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): in press, 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:p

ii: S0387-7604 (13) 00286-6. 10.1016/j.braidev.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

G. 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
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ミトコンドリア機能を制御する primary cilia に関する研究

研究分担者 藤井 克則 千葉大学大学院医学研究院小児病態学 講師

研究要旨

ミトコンドリアがエネルギー産生をするためには、外部からの増殖刺激によりシグナル伝達が適切に行われる必要がある。中でもヘッジホッグシグナリングは高度に保存されたシグナル伝達経路であり、細胞の増殖に深く関与している。近年、このヘッジホッグシグナリングが primary cilia を介して伝達されることが明らかになり、分子標的薬の開発が進むようになった。ミトコンドリアによるエネルギー産生が行われるための増殖経路であるヘッジホッグシグナルの意義を検証し、primary cilia のヒト細胞における役割をヒト線維芽細胞を用いて解析した。

A. 研究目的

ミトコンドリアは細胞内におけるエネルギー産生を司る細胞内小器官である。細胞が恒常性を保つためには、外部からの増殖シグナルに応じて適切にエネルギー産生が行われる必要がある。ヘッジホッグシグナリングは細胞増殖において重要なシグナル伝達経路であり、primary ciliaを介することが判明している。本研究ではヒト線維芽細胞を用いてヘッジホッグシグナリングの伝達経路を検証し、ミトコンドリアエネルギー産生能にどのような影響を与えているかを明らかにすることとした。

B. 研究方法

正常ヒト線維芽細胞とヘッジホッグ経路の構成分子であるPTCH1に遺伝子変異をもつ線維芽細胞を用いて血清飢餓およびligandであるヘッジホッグ刺激を加え、下流のGLI 1の発現量の変化をRT-PCRで定量化し、primary ciliaの形成を免疫染色で確認した。血清飢餓およびヘッジホッグ刺激によって生じるmRNA変化をパスウェイキットで解析し、ヘッジホッグシグナリングと相互作用をもつ分子群を同定した。ミトコンドリア電位変化をこれらヘッジホッグシグナリングに対する刺激で観察し、外的刺激によるエネルギー産生能の変化を解析した。

（倫理面への配慮）

一連の研究計画およびPTCH1変異細胞は千葉大学医学部生命倫理委員会の承認を得て実行した。正常コントロール線維芽細胞はATCCより購入し使用した。本研究では遺伝子導入は行わず、内因性分子の解析のみを行っている。

C. 研究結果

ヒト線維芽細胞において、コントロールと比較してヘッジホッグ受容体であるPTCH1変異をもつヒト線維芽細胞ではその最下流であるGliならびにSmo mRNAが増加していた。このGli mRNAはヘッジホッグ添加により増加し、加えて栄養枯渇状態にするとさらに増加した。これらの反応は3種類のPTCH1変異細胞で同様に確認された。栄養飢餓状態の細胞において、アセチル化tubulin抗体により細胞表面上のprimary ciliaが確認されたが、これはコントロール線維芽細胞とPTCH1変異細胞で同様に観察され有意差は

認めなかった。mRNAを用いたパスウェイ解析ではPTCH1変異細胞において有意にGli, FGF4, Zic1, Zic2の発現亢進が認められた。

D. 考察

細胞におけるエネルギー産生が適切に行われるためには、細胞自体の増殖シグナルが正しく核に伝達される必要がある。ヘッジホッグシグナルはそのため必須な経路であり、細胞が栄養枯渇状態になるとその下流シグナルが増大してミトコンドリアに恒常性変化を伝えることが示唆された。Primary ciliaは細胞膜表面上のアンテナとして近年明らかになった小器官であるが、今回の私たちの検討ではその数の変動は認めなかった。今後ミトコンドリア形態異常を検査することでその意義を確かめてゆきたい。

E. 結論

ヒト細胞におけるミトコンドリアエネルギー産生には細胞増殖シグナルが正しく核に伝達される必要がありヘッジホッグシグナルはその中核に存在する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Fujii K, Ohashi H, Hatsuse H, Uchikawa H, Miyashita T. Frameshift mutation in the *PTCH* 2 gene can cause nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Fam Cancer* 2013;12:611-4.

2. 学会発表

Ikehara H, Fujii K et al. Hedgehog signaling is enhanced by nutritional deprivation in human fibroblasts of Gorlin syndrome. *Keystone symposium of cilia, development, and human diseases* (2014.3.2-7, CA, USA)

G. 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（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ミトコンドリア病に対するピルビン酸ナトリウム治療法に関する研究

研究分担者 但馬 剛 広島大学医歯薬保健学研究院 助教

研究要旨

ミトコンドリア脳筋症患者 3 例に対し、ピルビン酸ナトリウム治療の臨床研究を継続中である。KSS の 1 例は心機能悪化のため中止となった。現在 CPE0 と Leigh 脳症症例で研究進行中である。

A．研究目的

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

B．研究方法

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

（倫理面への配慮）

本試験では、世界医師会による「ヘルシンキ宣言」及び厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」（平成20年7月31日全部改正）を遵守する。

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

C．研究結果

現在研究遂行中である。本年度は昨年度から継続中の2例に加え、Leigh脳症の1例が新規に参加した。昨年度から継続中のKSS1例が心機能低下のため中断した。CPE01例、Leigh脳症1例で研究続行中である。CPE0症例に関しては、脳症様エピソードが3 - 4回/年から1回/年への減少が認められた。

D．考察

CPE0の1例で脳症様エピソードの回数に減少を認めたことが有意な事項かどうか今後さらに検討を進めていきたい。心機能低下のため中断例が存在することから特に心負荷に対しては考慮する必要がある。

E．結論

ミトコンドリア病に対するピルビン酸ナトリウム療法の効果については、さらに症例を集積し包括的に評価する必要がある。心機能を維持していく方法についても検討を要する。

F．研究発表

1. 論文発表
無し
2. 学会発表
無し

G．知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

ミトコンドリア病治療における評価尺度の開発に関する研究

研究分担者 藤井 達哉 滋賀県立小児保健医療センター 病院長

研究要旨

[目的] ミトコンドリア病の臨床評価スケールである Newcastle Pediatric Mitochondrial Disease Scale (NPMDS)では評価が困難な、寝たきりのミトコンドリア病患者の客観的臨床評価を行う目的で、昨年度は種々の評価バッテリーの有用性を検討し、Gross Motor Function Measure (GMFM)の精度が高いことを報告した。今回、NPMDSとGMFMを併用して、4名の寝たきりのミトコンドリア病患者に対するピルビン酸ナトリウム治療の効果判定を行った。[方法] GMFM評価の出来なかった1例を除き、全例NPMDSとGMFM両方で臨床効果を評価した。12ヶ月以上0.5 - 1.0 g/kg/dayのピルビン酸ナトリウムを内服した4例を評価した。[結果] 4例中3例で治療開始1 - 3ヶ月以内に運動機能の改善を認め、そのうち1名は2年以上改善を維持できた。しかし、改善した3例中2例は治療開始3 - 6ヶ月後から退行が始まった。[結論] NPMDSとGMFMの併用によって、寝たきり患者に於いても客観的に治療効果を評価することが可能であった。ピルビン酸ナトリウム治療は、寝たきりの患者でも、少なくとも短期的には運動機能改善に関して有効であることが客観的に示された。

A. 研究目的

ピルビン酸ナトリウム治療の臨床効果を評価するためには、客観的な評価スケールが必要である。ミトコンドリア病の臨床評価スケールとして国際的に認知されているスケールはNewcastle Pediatric Mitochondrial Disease Scale (NPMDS)である。しかしこの評価スケールでは、運動機能の詳細な変化を捉えることができない。そのため、治療のアウトカムとして大きな変化が期待しがたい寝たきりのミトコンドリア病患者では、NPMDSのみでは臨床効果の客観的評価が困難である。昨年度の研究で、Gross Motor Function Measure (GMFM)がこのような症例に於いても運動機能の改善を検出可能なバッテリーであることが示された。そこで、今回の研究では、4例の寝たきりのミトコンドリア病患者にピルビン酸治療を行い、その臨床効果を、NPMDSとGMFMの併用で評価し、ピルビン酸治療の有用性を検討した。

B. 研究方法

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

[倫理面への配慮]

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

C. 研究結果

4例の治療効果を表2にまとめた。

1 症例1 (m.8993T>G Leigh脳症)

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

2 症例2 (m.9176T>C Leigh症候群)

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

3 症例3 (複合体I + IV欠損症)

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

4 症例4 (mtDNA枯渇症候群)

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

副作用は、1例に慢性の下痢があった以外、明確な副作用は認めなかった。

D. 考察

寝たきり患者では、治療による大きな改善が期待しがたく、従って客観的に治療効果を判定するのが困難である。今回、NPMDSに加えて、GMFM-88による評価をすることにより、客観的にピルビン酸治療による運動機能改善が少なくとも短期的には4例中3例にあることが示された。1例は、NPMDSのみでしか評価出来なかったが、治療2ヶ月での有効性は、叙述的にしか評価できない運動機能改善に加えて、NPMDSでも改善が確認できた。しかしこの例ではNPMDSのSection IVでしか改善が見られておらず、保護者の主観的評価も考慮されるSection IVの改善だけでは客観性にやや欠ける問題があった。その後の病状の悪化はNPMDSの全てのSectionで悪化が検知できていた。

寝たきりミトコンドリア病患者へのピルビン酸治療は、短期的には有効性が確認できたが、長期的にも有効であったのは1例のみであった。今後、より多くの患者に長期治療を行うことにより、長期効果の評価を行うことが課題である。

12ヶ月以上の投与に於いても、1例に下痢があった以外に副作用がなく、ピルビン酸ナトリウム治療は安全な治療法と考えられた。

E. 結論

NPMDSに加えて、GMFM-88も同時評価することにより、寝たきり患者に於いても、客観的に治療効果を評価することが可能であった。ピルビン酸ナトリウム治療は、安全で、寝たきり患者に於いても有効性が認められたが、効果は短期的であった。長期効果についてはより多くの治療成績の集積が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Saito K, Kimura N, Oda N, Shimomura H, Kumada T, Miyajima T, Murayama K, Tanaka M, Fujii, T. Pyruvate therapy for mitochondrial DNA depletion syndrome. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:632-636

2. 学会発表

1. Fujii T, Nozaki F, Hayashi A, Kumada T, Hiejima I, Mori M, Miyajima M, Kusunoki T. Efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. *International Symposium on Mitochondria* 2013. Tokyo

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1.患者プロフィール

患者	臨床診断	生化学・遺伝子診断	治療開始年齢	治療開始時 ADL	ビルビン酸ナトリウム 投与量 (g/kg/day)	治療期間
症例 1	Leigh 症候群	m.8993 T>G	8 y 4 m	寝たきり 寝返り不能 経管栄養	0.5	27 m
症例 2	Leigh 症候群	m.9176 T>C	8 m	寝たきり 寝返り不能 経管栄養	0.5	66 m
症例 3	非特異的脳筋症	Complex I+IV deficiency	1 y 8 m	1方向のみ寝返り ずり這い不能 経口栄養	0.5 その後 1.0	17 m
症例 4	ミトコンドリア DNA 枯渇症候群(筋型)	mtDNA depletion	1 y 7 m	寝たきり 寝返り不能 経管栄養 気切・人工呼吸	0.5	41 m

表2 治療効果

症例 1, Leigh 症候群 m.8993T>G				
		治療開始時 (年齢 8 y 4 M)	治療1ヶ月時 (年齢 8 y 5 m)	治療 26 ヶ月時 (年齢 10 y 7 m)
ADL		寝返り不能 仰臥位で 45 度以上下肢 拳上不能	寝返り可能 下肢拳上 90 度可能 上肢の動き活発	8y5m 時と同じ
NPMDS	I	18	18	ND
	II	2	1	ND
	III	11	10	ND
	IV	11.3	9.6	ND
	Overall	42.3	38.6	ND
GMFM	A	31.4%	47.1%	47.1%
	Total	6.3%	9.4%	9.4%
症例 2, Leigh 症候群 m.9176 T>C. 1回目の治療				
		治療開始時 (月齢 8 m)	治療1ヶ月時 (月齢 9 m)	治療 12 ヶ月時 (月齢 20 m)
ADL		寝返り不能 一部経管栄養	寝返り不能 一部経管栄養	寝返り可能 経口栄養
症例 2. Washout 後の2回目の治療				
		4週間 washout 終了時 (年齢 5 y 3 m)	治療再開後2ヶ月時 (年齢 5 y 5 m)	治療再開後 11 ヶ月 (年齢 6 y 5 m)
ADL		寝返り不能 経管栄養	寝返り不能 経管栄養	寝返り不能 経管栄養
NPMDS	I	13	13	15
	II	3	3	5
	III	14	14	17
	IV	4.2	4.2	16.7
	Overall	34.2	34.2	53.7
GMFM	A	5.9%	5.9%	3.9%
	Total	1.2%	1.2%	0.8%
症例 3, 複合体 I + IV 欠損症				

		治療開始時 (年齢 1 y 8 m)	治療2ヶ月時 (1 y 10 m)	治療 12ヶ月時 (2 y 8 m)
ADL		1方向に寝返り 頸定不完全 軽度嚔下障害	寝返り両方向 頸定不完全 嚔下障害なし	寝返り両方向 頸定不完全
NPMDS	I	7	6	6
	II	6	6	2
	III	15	13	13
	IV	16.7	7.3	7.3
	Overall	44.7	32.3	28.3
GMFM	A	54.9%	66.7%	60.8%
	B	13.3%	13.3%	3.3%
	Total	13.6%	16.0%	12.8%

症例 4, ミトコンドリア DNA 枯渴症候群

		治療開始時 (年齢 1 y 7 m)	治療2ヶ月時 (年齢 1 y 9 m)	治療 41ヶ月時 (年齢 5 y 0 m)
ADL		人工呼吸器 仰臥位で前腕挙上不能 筋症のみ	人工呼吸器 前腕 90 度挙上可能 筋症のみ	人工呼吸器 前腕挙上不能 脳筋症
NPMDS	I	7	7	15
	II	6	6	15
	III	5	5	24
	IV	17	13	10.8
	Overall	35	31	64.8

ADL, Activities of daily living; NPMDS, Newcastle Pediatric Mitochondrial Disease Scale; GMFM, Gross Motor Function Measure; I - IV, Sections I - IV of NPMDS; A and B, Dimensions A and B of GMFM.



厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（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

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. 研究発表

1. 論文発表
投稿準備中
2. 学会発表

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

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

G. 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（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

肝型ミトコンドリア膜 aspartate glutamate carrier (シトリン) 欠損症モデルマウスにおける
血漿グリセロールの診断的価値

研究分担者 佐伯 武頼 熊本大学生命資源研究支援センター疾患モデル分野 特任教授

研究要旨

肝型 aspartate glutamate carrier であるシトリンの欠損に基づくシトリン欠損症モデルマウスではショ糖などの糖質投与によって高アンモニア血症を呈する。そのとき肝内 glycerol 3-phosphate (G3P)が著しく増加し、その診断的価値が高いと報告してきた。しかし、肝内代謝物濃度を簡単には測定できない。そこで、尿中、および血中で肝 G3P 上昇を診断できるマーカーはないかを検討した。その結果、尿中にグリセロールおよび G3P が増加することを見出した。しかし、ショ糖など細胞質 NADH 上昇をもたらす物質の投与によって血漿グリセロールが上昇することから、より診断的価値は、血漿グリセロール測定によってもたらされることを見出した。

A. 研究目的

われわれは1999年に成人発症II型シトルリン血症 (CTLN2) がSLC25A13欠損によることを報告し、その遺伝子産物をシトリンと名づけた。その後、シトリンがMalate aspartate シャトルの一員であるミトコンドリア膜局在の肝型aspartate glutamate carrierであることを明らかにした。さらに同じ遺伝子変異が新生児の肝内胆汁うっ滞症 (NICCD, neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency)の原因遺伝子であることを明らかにし、シトリン欠損症という疾患概念を打ち立てた。マウスモデルはSlc25a13のみの欠損では症状を呈しないが、もうひとつのNADH シャトルであるグリセロリン酸シャトルに關与するmitochondria glycerol 3-phosphate (mGPD)をも欠失させることによって作成したCitrin/mGPD double-KOマウスがヒトシトルリン欠損症の症状を呈し、マウスモデルを打ち立てることができた。本モデルマウスを用い、肝臓における代謝異常解析の結果、細胞質NADHを増加させる糖質の毒性(糖質投与で高アンモニア血症を起こすなど)の機構解明を行ってきた。その結果、ショ糖などの糖質投与後には肝内のG3Pが著しく増加することを報告し、その診断的意義を述べてきた。しかし、肝臓内の代謝物変動を臨床的には容易には用いることができない。そこで、G3P、またはその代謝物を尿や血中で検出できれば、診断的意義は高まるとともに、治療薬の開発にも有用と考え、本研究を行った。

B. 研究方法

4種のマウス (13-24週齢)、野生型 (wt; Ctrn^{+/+}/mGPD^{+/+})、Ctrn-KO (Ctrn^{-/-}/mGPD^{+/+})、Ctrn/mGPD double-KO (Ctrn^{-/-}/mGPD^{-/-})マウスを実験に使用した。採尿はマウスを代謝ケージに入れることで行った。餌を投与している摂食時と1晩絶食後、餌の入っていない代謝ケージで飼育した絶食時、いずれも8:00から17:00までの間、尿を採取した。採血は、ソムノペンチル (10倍希釈液を10ml/kg量) 投与し、心臓からヘパリン採血し、直ちに遠心し血漿を得た。マウスに、胃管を通じて強制的にショ糖 (25%; 5g

/kg)、エタノール (9%V/V; 1.4g/kg)、ピルビン酸ナトリウム (Na-Pyr; 1M; 20mmol/kg)、トリプトン (25%; 5g/kg)、アラニン (1M; 20mmol/kg)、medium-chain triglyceride (MCT; 5%; 1g/kg) を単独、または合わせて投与し、1時間後に麻酔下採血、または頸椎脱臼し、肝臓をfreeze-clamp法で採取した。

尿中のG3Pとglycerol、および肝中G3Pは酵素法によって定量した³⁾。血漿グリセロールは市販のキット (RANDOX) で測定した。血中アンモニアはアンモニアテストワコー (和光純薬) を用いて定量した。なお、尿中濃度は、クレアチンをクレアチニンキット (カイノス) で定量し、クレアチニン比で表した。

尿中のG3Pとグリセロール濃度は、エクセルにてQUARTILEを用いて四分位数を求め、箱ひげ図 (box plot) を作成した。尿中代謝物のデータの2群間の有意差検定についてはJMPソフトウェアを用いノンパラメトリック検定 (Mann-Whitney U test) で検定した。血漿中グリセロール濃度のデータはすべて平均 ± SDで表し、2群間の有意差検定はStudent's t-Testで行い、3群間以上はone-way ANOVAで分散分析後、Tukey-Kramer testで検定した。2群間の相関係数はCORRELで検定した。

(倫理面への配慮)

本研究に実施に関しては熊本大学動物実験委員会の承認を得た (承認番号: B25-147)。動物愛護の観点から、苦痛を軽減し、使用するマウスの数は最小限とした。

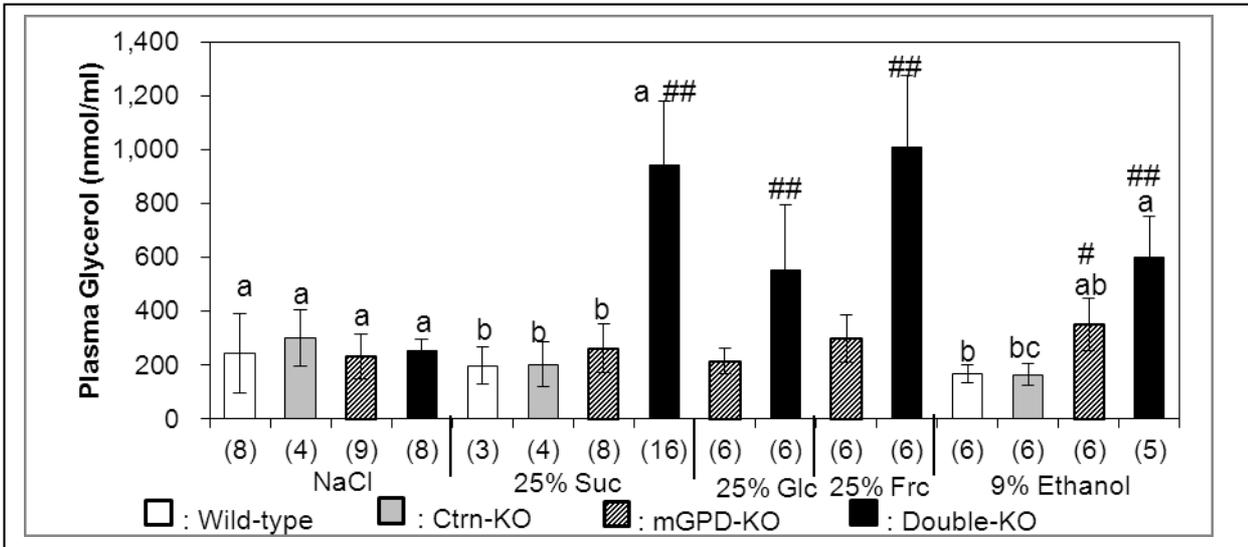


図1. ショ糖 (25% Suc; 5g/kg)、グルコース (25% Glc; 5g/kg)、フルクトース (25% Frc; 5g/kg) およびエタノール (9%; 1.4g/kg) 経口投与1時間後の血漿グリセロール濃度の比較

同一条件4群間の比較 (a,b,c) はANOVA解析。
p<0.05; ##p<0.01 vs NaCl

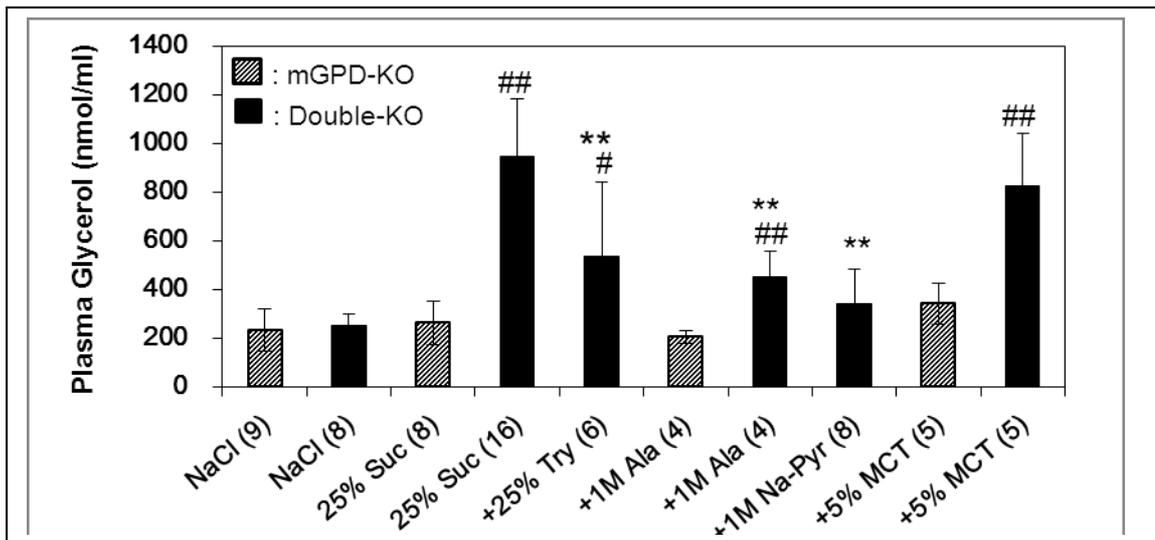


図2. 血漿グリセロール濃度へのショ糖効果に対するトリプトン (25% Try; 5g/kg)、アラニン (1 M Ala; 20mmol/kg)、ピルピン酸ナトリウム (1M Na-Pyr; 20mmol/kg)、MCT (5%; 1g/kg) 添加 (+) の効果

#p<0.05 and ##p<0.01 vs NaCl;
**p<0.01 vs 25% Suc.

C. 研究結果

C.1. 尿G3Pおよびグリセロールの定量

尿中にはG3Pおよびグリセロールともに検出された。値はクレアチニン比で表したが、摂食時にはG3Pおよびグリセロールともにdouble-KOマウスにおいて有意に高いレベルにあった。絶食時にはグリセロールは有意にdouble-KOマウスで高かったが、G3Pレベルにはマウスグループ間に有意差がなかった。

血漿中にはG3Pは検出限界以下しか検出できなかったが、グリセロールは容易に検出された。摂食時には4種のgenotypeマウス間に差はなかったが、絶食時にはdouble-KOマウスで有意に高い値を示した。

以下は摂食マウスを用いて行った。細胞質にNADHを生じる糖質(ショ糖、グルコース、フルクトース)またはエタノールを胃管を通じて投与し1時間後に血漿グリセロールを定量した。図1に示すようにショ糖投与によって、double-KOマウスにおいてグリセロール濃度が上昇した。同様にグルコースおよびフルクトース投与によってdouble-KOマウスの血漿グリセロールが増加したが、フルクトースのほうがより高いレベルに上昇した。エタノール投与はdouble-KOマウスにもならずmGPD-KOマウスにおいても有意に血漿グリセロール濃度を上昇させた。

続いて、ショ糖による肝内G3P濃度の上昇に対し、これを低下させる物質としてすでにトリプトン(カゼインの胨酵素分解物)、アラニン、ピルビン酸ナトリウム、MCT (medium-chain triglyceride)が有効であることを報告している⁴⁾。そこで、これら物質の血漿グリセロール濃度への効果を検討した(図2)。MCTを除いては、いずれの添加物もショ糖投与による血漿グリセロール濃度を有意に低下させた。なお、Na-Pyrは生食(NaCl)投与群のレベルにまで低下させることが示された。

それぞれ別のマウスで測定された結果であるが、ショ糖、グルコース、フルクトースなどの糖質を投与したdouble-KOマウス、およびショ糖にトリプトン、アラニン、Na-Pyr、MCTなどの治療効果を示した物質を添加したマウスの肝内G3Pと血漿グリセロールとの相関性を検討した。結果を図3に示す。 $R = 0.941$, $p > 0.001$ と非常に高い相関性を示し、血漿グリセロールが肝G3P由来であることを強く示唆している。さらに、血漿グリセロールは血液アンモニア濃度とそれほど強くはないが、有意な相関性($R = 0.340$; $p < 0.05$)を示した。

D. 考察

シトリン欠損症における肝内G3P濃度は糖質など細胞質NADH上昇をきたすような条件で増加し、それに伴って血中アンモニアが上昇し、高アンモニア血症を呈する。これがシトリン欠損症の病因に直結する最大の特徴である。これはシトリンが、ミトコンドリアからのアスパラギン酸の細胞質の供給だけでなく、リンゴ酸アスパラギン酸シャトルの一員として、細胞質NADHの処理に関わるため、細胞質NADHの上昇は、尿素サイクルへのアスパラギン酸の供給低下をきたし尿素サイクル不全、ひいては高アンモニア血症を引き起こすからである。即ち、肝内G3Pの上昇は細胞質NADH上昇のマーカーであり、シトリン欠損症の病態発症、悪化のマーカーである。しかし肝内G3Pは容易には測定可能ではない。そこで、尿、血液でのマーカーを探索することにした。本研究の結果、尿または血漿グリセロールの測定で肝内G3P濃度

の推定が可能であることが判明した。今後は重症化の診断や、新規治療薬の開発などに有用に利用できるものとする。人への応用に関してはマウスモデルでは、mGPDが全身で欠損しているため、肝臓でのみ低活性の人で同じように応用できるかどうかの判断は今後の研究に待ちたい。

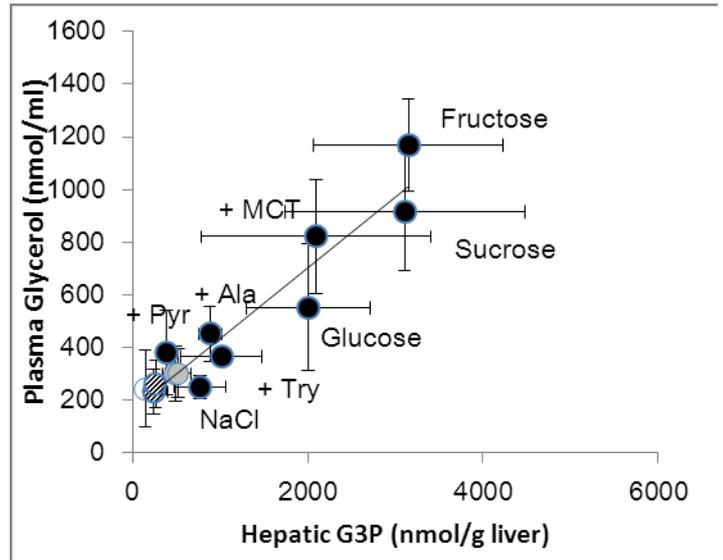


図3. 肝内G3Pと血漿グリセロールの相関性

ショ糖など糖質投与およびトリプトンなどを追加投与されたマウスの肝内G3P濃度と血漿グリセロールの相関性。肝内G3Pと血漿グリセロールはそれぞれ別のマウスで測定された。投与された物質は図内に示した。+はショ糖との同時投与を示す。縦と横のバーはそれぞれのS.D.を示す。

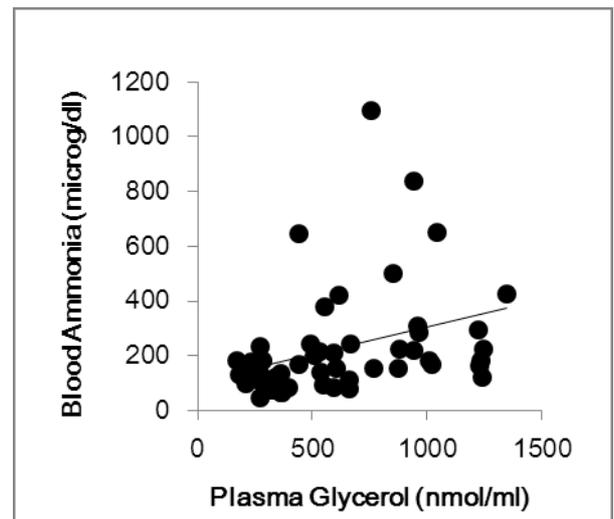


図4. Double-KOマウスの血漿グリセロール濃度と血中アンモニア濃度の関係
全てのdouble-KOマウスのデータをプロットした。

E . 結論

ミトコンドリア膜局在のaspartate glutamate carrierであるシトリンの欠損に伴い、糖質投与がもたらす肝内G3P濃度の変動を血漿グリセロールを測定することによって推定できることが判明した。本方法は、重症度の診断や治療薬の効果判定などに有用と考えられる。

F . 研究発表

1. 論文発表

1) Du J, Cleghorn W, Contreras L, Linton JD, Chan GC, Chertov AO, Saheki T, Govindaraju V, Sadilek M, Satrústegui J, Hurley JB. Cytosolic reducing power preserves glutamate in retina. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Nov 12;110(46):18501-6.

2) Song YZ, Zhang ZH, Lin WX, Zhao XJ, Deng M, Ma YL, Guo L, Chen FP, Long XL, He XL, Sunada Y, Soneda S, Nakatomi A, Dateki S, Ngu LH, Kobayashi K, Saheki T. LC25A13 gene analysis in citrin deficiency: sixteen novel mutations in East Asian patients, and the mutation distribution in a large pediatric cohort in China. PLoS One. 2013;8(9):e74544.

3) Llorente-Folch I, Rueda CB, Amigo I, del Arco A, Saheki T, Pardo B, Satrústegui J. Calcium-regulation of mitochondrial respiration maintains ATP homeostasis and requires ARALAR/AGC1-malate aspartate shuttle in intact cortical neurons. J Neurosci. 2013;33(35):13957-71.

4) Chen R, Wang XH, Fu HY, Zhang SR, Abudouxiker K, Saheki T, Wang JS. Different regional distribution of SLC25A13 mutations in Chinese patients with neonatal intrahepatic cholestasis. World J Gastroenterol. 2013;19: 4545-51.

5) Llorente-Folch I, Sahún I, Contreras L, Casarejos MJ, Grau JM, Saheki T, Mena MA, Satrústegui J, Dierssen M, Pardo B. AGC1-malate aspartate shuttle activity is critical for dopamine handling in the nigrostriatal pathway. J Neurochem. 2013;124:347-62.

6) Saheki T. "Animal models of enhanced oxidative stress" (especially murine model of human citrin deficiency), Eds. Tsukahara H & Kaneko K, "Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice - Pediatric Disorders" in press

2. 学会発表

1) 佐伯武頼：成人発症II型シトルリン血症（CTLN2）の診断、病因・病態解析と治療法の開発 - 患者さんもモデルマウスも甘いものとアルコールが苦手です - 川崎医科大学神経カンファレンス，倉敷，1月21日，2013年。

2) Saheki T.: Studies on Citrin Deficiency and Carnitine Deficiency using Animal Models. Conference on Genetic and Metabolic Disease in Fu

jian, Fujian China, June 8, 2013.

3) 佐伯武頼：シトリン欠損症における糖とアミノ酸の代謝異常相関． JSAAS2013 日本アミノ酸学会第7回学術大会，熊本，11月2日，2013年．

4) 佐伯武頼，藤本侑希，古家澄江，山村研一：モデルマウスを用いるシトリン欠損症患者の糖質忌避の機構解析．日本人類遺伝学会第58回大会，仙台，11月23日，2013年．

5) Saheki T: Citrin Deficiency: Discovery of the causative gene, analysis of pathophysiology and its clinical aspects. 3rd ACIMD/55th JSIMD, Educational Lecture, Maihama, Japan, November 27, 2013.

6) Saheki T, Fujimoto Y, Yamamura K: Plasma glycerol was increased parallel to blood ammonia in citrin deficiency model in response to administration of sugars, 3rd ACIMD/55th JSIMD, Maihama, Japan, November 27, 2013.

7) Fujimoto Y, Yano K, Yamashita K, Rikimaru S, Inoue K, Yamamura K, Saheki T: A possible diagnostic for citrin deficiency; high plasma and urinary glycerol detected in the model, Citrin/ mGPD double-KO mouse, 3rd ACIMD/55th JSIMD, Maihama, Japan, November 27, 2013.

8) 佐伯 武頼，藤本 侑希，山村 研一，井上 加奈子，小野 裕美：モデルマウスを用いたシトリン欠損症における糖質毒性の解析．第17回日本病態栄養学会年次学術集会，大阪，1月11日-12日，2014年．

G . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
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（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

TCA 回路と周辺の代謝機能解析に関する研究

研究分担者 山口 清次 島根大学医学部小児科 教授

研究要旨

ミトコンドリアの呼吸鎖の基質として、脂質代謝系、解糖系・TCA 回路から NADH や FADH₂ が供給される。呼吸鎖異常症では、NADH、FADH₂ の酸化障害によりエネルギー産生障害をきたす。今回、TCA 回路と関連代謝産物の分析を通じて、ミトコンドリア呼吸鎖機能のバイオマーカーを GC/MS を用いた尿中有機酸分析で検討した。また解糖系の障害であるシトリン欠損症も NADH 過剰のために肝臓内グリセロール-3-リン酸（G3P）の増加が動物実験で報告されている。そこで G3P も別の方法で測定し検討した。以下の結果を得た。

シトリン欠損症では、肝機能障害を反映して、チロシン代謝産物 4-OH-フェニル乳酸の増加がみられた。シトリン欠損症では、G3P がピルビン酸 Na 投与後に減少傾向がみられた。ピルビン酸 Na 投与すると、ケトグルタル酸が投与後 2 時間をピークに増加した。しかし、明らかに特異的な診断マーカーは特定できなかった。年齢マッチコントロール、および患者数を増やして検討する必要がある。マーカーは現時点では確定できなかったものの、G3P や TCA 回路成分は何らかのマーカーになりうる。また今後は、GC/MS のみならず LC/MS/MS（タンデムマス）等による解糖系成分の一斉分析法を確立して、呼吸鎖異常症の評価法、診断マーカーの探索を進めたい。

研究協力者

長谷川(小村)有紀（島根大学小児科助教）
高橋知男（島根大学小児科大学院生）

A．研究目的

ミトコンドリアの呼吸鎖では、酸化系、解糖系、およびTCA回路から供給されるNADHやFADH₂を酸化してATPを産生している。しかし、ミトコンドリア機能の低下する疾患では、これらの回路からのNADHやFADH₂の供給不足、または呼吸鎖による酸化障害が起こることが推測される。ミトコンドリア呼吸鎖機能のバイオマーカーを探索することを目的として、尿中有機酸分析により、TCA回路成分、および関連代謝産物量を検討した。またシトリン欠損症ではTCA回路のオキサロ酢酸から生成されるアスパラギン酸の転送障害、および細胞質内のNADHの過剰蓄積をきたす。この病態からモデルマウスで肝臓組織内のグリセロール3リン酸（G3P）の上昇がみられることが報告されている。そこで、シトリン欠損症患者の尿中G3P量についても検討した。

B．研究方法

1) 尿中有機酸分析によるTCA回路関連成分の評価
ミトコンドリアの障害による疾患のうち、Leigh脳症（5歳女兒）とミトコンドリア枯渇症候群（3カ月乳児）、シトリン欠損症（14歳女兒）を対象にGC/MSによる尿中有機酸分析を行った。すなわち、TCA回路関連成分である乳酸、ピルビン酸、コハク酸、フ

マル酸、リンゴ酸、ケトグルタル酸、アコニット酸、クエン酸、イソクエン酸を検討した。また乳児肝炎様症状をきたし肝障害をきたす可能性の高いシトリン欠損症については、チロシン代謝産物である4-OH-フェニル乳酸（PHPLA）についても検討した。

また、ピルビン酸Na内服前後のTCA回路関連成分の尿中排泄量を、尿中有機酸分析によって検討した。

2) 尿中G3Pの評価

シトリン欠損症患者の尿を定期的に採取し、ウレアーゼ法によるGC/MS分析でglycerolとG3Pを検出し、排泄量の変化について検討した。また高乳酸血症やミトコンドリア枯渇症候群、短腸症候群などの疾患でも尿中G3Pを測定し、排泄量を検討した。

（倫理面への配慮）

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

C．研究結果

1) 尿中有機酸分析によるTCA回路関連成分の評価（図1）

Leigh脳症とミトコンドリア枯渇症候群（5y）の患者では、ピルビン酸Na内服前と内服後4時間までの尿を1時間毎に検討した。

Leigh脳症（3m）：内服後2時間をピークに、クエン酸とケトグルタル酸、フマル酸、アコニット

酸の排泄が上昇したが、PHPLA、PHPPAの排泄は最初から認められなかった。

ミトコンドリア枯渇症候群(5y)：内服前後におけるTCA回路関連代謝産物の変化は認められなかったが、PHPLAは内服後より上昇し、4時間後にも継続して排泄が認められた。

シトリン欠損症(14y)：ピルビン酸Na内服前の尿と、内服後の尿を数か月ごとに検討した。TCA回路関連代謝産物の変化は内服前後での変化は明らかでなかった。PHPLAは他の疾患と異なり内服前から高値を示し、シトリン欠損症の診断マーカーの一つとなる可能性が示唆された。しかしピルビン酸Na内服前後での有意な変化は認められなかった。

2) 尿中G3Pの評価(図2)

シトリン欠損症患者(14y)：ピルビン酸Na内服前と内服後の尿中glycerolとG3Pを測定した。G3Pの尿中排泄量は内服前でも3.3 mmol/mol Creaと排泄増加は認められなかった。しかしピルビン酸Na内服後には排泄はさらに低下傾向を示した。Glycerolも内服後に低下したが、Gly/G3P比を確認すると内服後の比は増加傾向であり、ピルビン酸NaによってG3Pの低下がより有意であったと考えられる。

その他：先天性高乳酸血症やMELAS、ミトコンドリア枯渇症候群、短腸症候群、眼球運動失調の患者でG3Pを測定した。先天性高乳酸血症患者では、glycerolが高値であったが、G3Pの増加は認められなかった。またMELASやミトコンドリア枯渇症候群ではglycerolもG3Pも増加していなかったが、短腸症候群の患者では先天性高乳酸血症の患者と同様にglycerolの排泄増加があり、G3Pは正常であった。この2疾患ではGly/G3P比が高かった。

D. 考察

MELASなどのミトコンドリア異常症では、NADHの酸化障害があり、エネルギー産生低下をきたす。より簡便な生化学診断確立と、ピルビン酸Na投与によるミトコンドリア脳筋症の治療効果の判定を目的として、呼吸鎖に関わる解糖系やTCA回路を中心に診断マーカーを探索した。同時に細胞質内のNADH蓄積、NAD欠乏の病態を示すシトリン欠損症患者1名についても比較のため検討した。

尿中有機酸分析によるTCA回路関連成分、およびチロシン代謝産物の評価を行ったところ、ピルビン酸Na投与によって代謝産物の排泄パターンが変化することが示唆された。特に ケトグルタル酸やコハク酸、PHPLAの排泄量は3疾患の間で大きく異なっており、これらが疾患特異的なパターンを示す可能性がある。またシトリン欠損症では14歳の年齢にしては明らかにチロシン代謝産物のPHPLAの増加が観察された。シトリン欠損症の一つの特徴であり、診断マーカーの一つになりうる。患者数が十分でないので、さらに増やして検討する必要がある。

またグリセロールと解糖系をつなぐ代謝産物としてグリセロール3リン酸(G3P)は、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ(FBPase)欠損症で増加することが報告されている。FBPaseは、糖新生の律速酵素である。またシトリン欠損症マウスモデルでもNADH過剰によってG3Pが増加するという報告がある。しかし今回検討した患者では、G3Pの尿中排泄量は増加していなかった。しかしピルビン酸投与後のG3P尿中排泄量は投与前に比較して減少させる可能性が推測された。シトリン欠損症と年齢をマッチさせた正常

コントロールの数を増やして検討する価値があると思われる。

また先天性高乳酸血症や短腸症候群でG3Pの増加はないもののGlycerolが高い症例がある一方、ミトコンドリア枯渇症候群やMELASではいずれも上昇しないなど、疾患によってGlycerolやG3Pの値が異なる可能性がある。

今後は、タンデムマス等のGC/MS以外の手法を応用して、解糖系、脂質代謝等の代謝産物を測定し、ピルビン酸Naなどの治療効果判定のための特異的マーカーを探索してゆきたい。

E. 結論

TCA回路関連成分、グリセロール代謝のG3Pなどは、呼吸鎖異常症の診断マーカーとなりうる。ミトコンドリアに関連する疾患や症例数を増やし、ピルビン酸Naの治療効果判定に有用なマーカーをさらに探索してゆきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ihara K, Yoshino M, Hoshina T, Harada N, Kojima-Ishii K, Makimura M, Hasegawa Y, Watanabe Y, Yamaguchi S, Hara T: Coagulopathy in patients with late-onset ornithine transcarbamylase deficiency in remission state: A previously unrecognized complication. *Pediatrics* 131(1): e327-30, 2013 (January)
- 2) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Takayanagi M, Fukao T, Fukuda S, Yamaguchi S: Intracellular in vitro probe acylcarnitine assay for identifying deficiencies of carnitine transporter and carnitine palmitoyltransferase-1. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405(4): 1345-1351, 2013 (February)
- 3) Yamaguchi S, Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furui M, Taketani T, Fukuda S, Fukao T, Shigematsu Y: Expanded newborn mass screening with MS/MS and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in Japan. *日本マススクリーニング学会誌* 23(3): 270-276, 2013 (12月)
- 4) 山口清次: MS解析による代謝障害の診断. *分子消化器病* 10(1): 72-78, 2013 (1月)
- 5) 山口清次: 新生児スクリーニングの新時代; タンデムマス法の導入. *日本周産期・新生児医学会雑誌* 48(4): 827-829, 2013 (1月)
- 6) 山田健治, 長谷川有紀, 吉川陽子, 高橋知男, 小林弘典, 虫本雄一, Jamiyan Purevsuren, 山口清次: 成人後に診断された有機酸・脂肪酸代謝異常症の臨床的検討. *臨床神経学* 53(3): 191-195, 2013 (3月)
- 7) 山口清次: タンデムマスを用いた新生児マススクリーニングによる先天代謝異常症の早期診断. *小児科臨床* 66(2): 193-198, 2013 (2月)
- 8) 高橋知男, 山田健治, 虫本雄一, 小林弘典, 長谷川有紀, ジャミヤン・プレブスレン, 坂本修, 大浦敏博, 山口清次: 新生児マススク

リーニングで発見された軽症型プロピオン酸血症：有機酸とアシルカルニチンの推移．日本マス・スクリーニング学会誌 23(1)：49-53, 2013

- 9) 山口清次：小児科領域におけるタンデムマスとGC/MSの臨床応用：最近の進歩．臨床病理 61(9)：817-824, 2013 (9月)

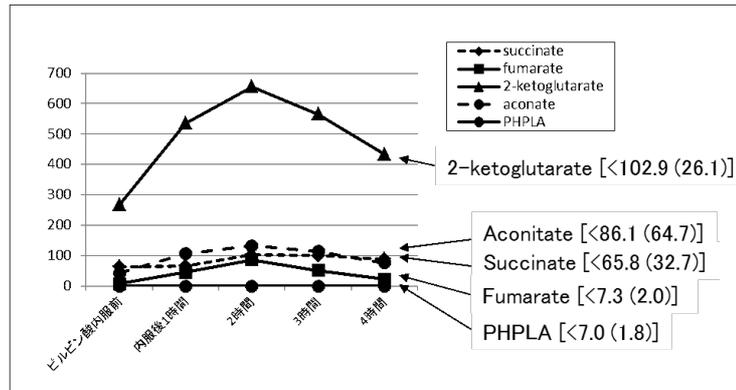
2. 学会発表

- 1) Yamaguchi S: GC-MS for diagnosis of Organic Acidurias. International Conference on Inborn Errors of Metabolism 2013 講演. New Delhi, India, April 2013
- 2) Yamaguchi S: Fatty acid oxidation defects. International Conference on Inborn Errors of Metabolism 2013 講演. New Delhi, India, April 2013
- 3) Yamaguchi S, Purevsuren J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furui M, Fukao T, Shigematsu Y, Fukuda S: Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency and newborn screening in Japan. 2013 Joint Meeting of the Newborn Screening and Genetic Testing Symposium (NBS>S) and the International Society for Neonatal Screening (ISNS). Atlanta, USA, May 2013
- 4) Yamaguchi S: A new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation defects: Bezafibrate, a PPAR agonist. 12th Asian Oceanian Congress on Child Neurology. Riyadh, Saudi Arabia, September 2013
- 5) Yamaguchi S: Beriberi (Vitamin B1 deficiency) of young children lurking in modern life: A new approach for biochemical detection. 2013 Joint Meeting of 13th Asian Pan-Pacific Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition and 40th Japanese Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition シンポジウム. 東京, October 2013
- 6) Hasegawa Y, Kobayashi H, Yamada K, Takahashi T, Yamaguchi S: Selective screening for organic acidemias by urinary organic acids analysis using GC/MS in Asian countries. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD), The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). Chiba, November 2013
- 7) Yamaguchi S: Organic Acidemias and emergency treatments. 1st Asia Pacific Inborn Errors of Metabolism Course 講演. Tokyo, January 2014
- 8) 高橋知男, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: サリチル酸の酸化に及ぼす影響: in vitro probe assay による評価. 第38回日本医用マススペクトル学会年会. 神戸, 2013年9月

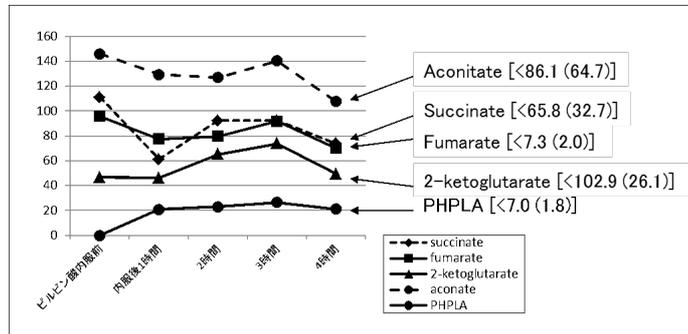
G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

図 1 : ピルビン酸 Na 内服前後の TCA 回路成分の変化

1) Leigh 脳症 (3 m)



2) ミトコンドリア枯渇症候群 (5y11m)



3) シトリン欠損症 (14y)

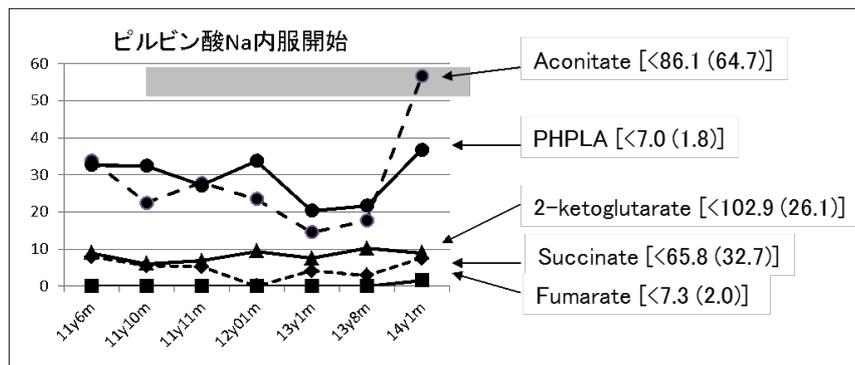
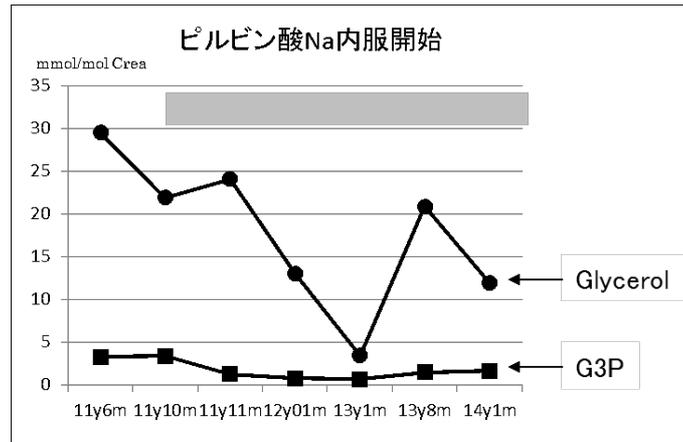
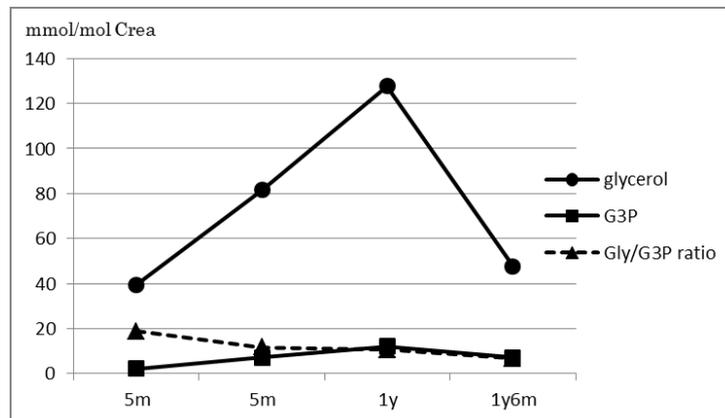


図 2 : 尿中 G3P の評価

1) シトリン欠損症 (14y)



2) 高乳酸血症 (先天性 CMV 感染、ビタミン B1 代謝異常の疑い) ピルビン酸投与なし



3) その他の疾患

	MELAS 症候群	Mit dep 症候群	短腸症候群	眼球運動失調	コントロール
Glycerol	6.5	7.8	127.1	51	3.7
G3P	5.9	2.8	9.4	12	35.4
Glycerol/G3P 比	1.1	2.8	13.5	4.3	0.1

略字 : G3P=glycerol-3-phosphate ; Mit dep=ミトコンドリア枯渇症候群

突然変異型ミトコンドリアゲノム分子の病原性発揮に関する研究

研究分担者 中田 和人 筑波大学 生命環境系 教授

研究要旨

本研究では、変異型ミトコンドリアゲノム(mtDNA)を導入したマウス群の作製と活用から、変異型 mtDNA の病原性発揮機構の理解、ならびにこれらのモデルマウスを活用したピルビン酸ナトリウム療法の有用性を検討することを目的としている。今年度は、ヒトのミトコンドリア病である MERRF の症例から検出される mtDNA の tRNA-Lys に点突然変異を有するモデルマウスの作出に成功した。既に研究分担者はヒトのミトコンドリア病の KSS のモデルマウスを作製しているため、この2種のモデルマウスの保有によって、ミトコンドリア病の複数病型の形成機構の理解、ならびにピルビン酸ナトリウム療法の効果を広く検証できる研究環境がようやく整った。

A. 研究目的

ミトコンドリアゲノム(mtDNA)に生じた欠失突然変異や点突然変異が、ミトコンドリア病のみならず、糖尿病や神経変性疾患、さらにはがんや老化など、多様な疾患の遺伝的原因になる可能性が示唆され、変異型mtDNA分子種を起点とした多様な病態発症機構の存在が注目を集めている。このようなmtDNAの突然変異を起点とした病態発症機構の詳細理解、さらにはミトコンドリア病を主体とする疾患群の効果的かつ実践的な治療法の探索には、変異型mtDNA分子種を含有するモデル動物の作製が必須となる。しかし、このようなモデル動物の作製には技術的な限界があるため、変異型mtDNA分子種間の病原性比較はもとより、多様な病型形成に至る分子病理の解明は遅れている。

本研究では、変異型mtDNAを導入したマウス(ミトマウス)群の作製とその解析から、変異型mtDNAの病原性発揮機構の分子基盤とその病理の解明を目指すとともに、これらのモデルマウスを活用したピルビン酸ナトリウム療法の有用性を検討することを目的としている。

B. 研究方法

本研究の実施には、変異型mtDNA分子種を導入したモデルマウスの作出が必須である。しかし、mtDNAは外膜と内膜に閉ざされたマトリクス内に複数コピー存在するため、mtDNAにコードされた遺伝子の機能喪失や減弱は技術的に不可能であった。このようなことから、変異型mtDNAの逆遺伝学を基盤とした研究は展開できない状況が続いていた。このような状況の中、申請者らはマウス培養細胞に体細胞突然変異によって生じていた変異型mtDNAを含有するミトコンドリアを細胞質移植法によりマウス初期胚に導入するという新規視点を駆使して、欠失型mtDNAを含有するマウス(欠失型ミトマウス)の作製に成功している。この方法を応用し、点突然変異型mtDNAを含有するマウス(点変異型ミトマウス)の作製を試みた。(倫理面への配慮)

本研究全般は、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、施行するものである。また、本研究の一部は、筑波大学遺伝子実験委員会から承認された実験計画書もとに実施されるものである。

C. 研究結果

前述のように、ミトマウスの作製には体細胞突然変異によって生じた変異型mtDNA分子種を含有するマウス培養細胞の検索と確保が必須となる。そこで、マウス培養細胞のmtDNA分子種のスクリーニングを行った結果、mtDNAのtRNA-Lys遺伝子に点突然変異を有する培養細胞を見出すことに成功した。この点突然変異の病原性を検証した結果、培養細胞のミトコンドリア呼吸機能を低下させることが分かった。そこで、この細胞の核を脱核し、マウスES細胞に融合させ、mtDNAのtRNA^{Lys}遺伝子に点突然変異を有するマウスES細胞を樹立した。このES細胞からキメラマウスを作製し、さらに交配を重ね、全身の細胞にmtDNAのtRNA-Lys遺伝子に点突然変異を有するマウス(点変異型ミトマウス)の作製に成功した。

現状、点変異型ミトマウスの病態解析では、点変異型mtDNAの含有率がおおよそ70%を超えると握力低下所見と軽度ミトコンドリア呼吸機能異常が観察されている。

D. 考察

今回作製に成功した点変異型ミトマウスには、tRNA-Lys遺伝子に点突然変異が生じた病原性mtDNA分子種が導入されている。この点突然変異型mtDNAはヒトのミトコンドリア病の3大病型の1つであるMERRFの症例から検出される変異型mtDNA分子と類似しているため、点変異型ミトマウスはMERRFのモデルとなる可能性が高いと考えられる。現状、点変異型ミト

マウスに導入されている変異型mtDNA分子の個体濃縮率(含有率)が70%程度と比較的低いため、引き続き、交配を重ねることで、変異型mtDNA分子種をさらに濃縮させるとともに、老化によるMERRF様症状の発症を検討する必要がある。

前述のように、分担研究者は既にヒトのミトコンドリア病の3大病型の1つであるKSSのモデルマウスである欠失型ミトマウスを保持している。このため、今回作製に成功した点変異型ミトマウスとこの欠失型ミトマウスを駆使することで、ミトコンドリア病の少なくとも2つの病型の形成機構の詳細理解に向かえる研究環境がようやく整ったと言える。また、この2種のモデルマウスを用いてビルビン酸ナトリウム療法を検討することで、広くミトコンドリア病の治療法としての効果を検証できると考えている。

E. 結論

ヒトのミトコンドリア病であるMERRFの症例から検出されるmtDNAのtRNA-Lysに点突然変異を有するモデルマウスの作製に着手し、その作出に成功した。

現状、典型的なMERRF様の症状の発症には至っていないが、導入した点変異型mtDNAの交配による濃縮、ならびに老化による影響等を総合的に追跡観察することで、モデルマウスとして価値を明確にしていきたいと考えている。

F. 研究発表

- 論文発表
 - 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 Transmitochondrial Mito-Mice Expressing Mitochondrial Respiration Defects. *Exp Anim.* 2014; 63(1): 21-30.
 - Shimizu A, Mito T, Hayashi C, Ogasawara E, Koba R, Negishi I, Takenaga K, Nakada K, Hayashi JI. Transmitochondrial 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.
 - 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.
 - 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.
 - 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

- 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

- 特許取得
なし
- 実用新案登録
なし
- 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（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ピルビン酸ナトリウム投与対象となりうるミトコンドリア脳筋症患者選定に関する研究

研究分担者 石井 亜紀子 筑波大学医学医療系神経内科 講師

研究要旨

ミトコンドリア脳筋症（MELAS）は、痙攣、意識障害、高乳酸血症、脳卒中様発作を呈し、コントロール不良の場合は数ヶ月～数年で命を落とすことがある非常に稀な重篤な疾患である。痙攣、脳卒中様発作の原因である高乳酸血症の治療に対して、ピルビン酸ナトリウムが有効と考え、医師主導治験による治療薬としての開発を目指している。今年度はすでに投与されている患者情報の収集と、第2相試験、第3相試験に向けての、対象患者のリストアップを行った。

A．研究目的

ミトコンドリア脳筋症（MELAS）は、痙攣、意識障害、高乳酸血症、脳卒中様発作を呈し、コントロール不良の場合は数ヶ月～数年で命を落とすことがある非常に稀な重篤な疾患であり、治療法の開発が急務である。近年、痙攣、脳卒中様発作の原因である高乳酸血症に対するピルビン酸ナトリウムの有効性が報告されており、本疾患の治療薬として有力と考えられる。今年度は、実際にピルビン酸ナトリウムを投与されているLeigh脳症患者の情報を収集し、将来的に第2,3相試験に向けて、対象となり得る患者のリストアップを行った。また、ミトコンドリア脳筋症のスクリーニングに使用可能と考えられるマーカーについて測定を行った。

B．研究方法

ミトコンドリア脳筋症（MELAS/MELA）の診断で筑波大学医学医療系神経内科でフォローされている患者20例について、インフォームドコンセントのもとに採血し、乳酸値を検査した。また、久留米大学小児科学教室にミトコンドリア病マーカーの測定を依頼した。

倫理面への配慮）

筑波大学倫理委員会の承認を得て、連結可能匿名化し行った。（承認番号H25-083）

C．研究結果

ミトコンドリア脳筋症（MELAS）でA3243G変異を持つ7例では、ミトコンドリア病マーカーはいずれも高値であった。乳酸値は、運動量などに影響され、 23.9 ± 12.0 (7.0~56.9) mg/dlとばらつきが大きかった。

D．考察

ミトコンドリア脳筋症（MELAS/MELA）の診断で筑波大学医学医療系神経内科でフォローされている患者10例が治験に参加可能であると考えられる。また、乳酸値は運動などによる影響が出やすいため、治験時の採血方法、時間などを考慮する必要があることが明らかになった。FGF21をはじめとするミトコンドリア病マーカーは、ミトコンドリア病のスクリーニングに有用と考えられた。

E．結論

ピルビン酸ナトリウム治験に参加可能と考えられるミトコンドリア脳筋症の対象者を選定した。FGF21をはじめとするミトコンドリア脳筋症スクリーニング検査法の有用性を確認した。

F．研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G．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
古賀靖敏	ミトコンドリア脳筋症	水澤英洋、 梶龍兒、 吉良潤一、 齊藤延人、 神田隆、 鈴木則宏	今日の神経疾患治療指針第2版	医学書院	東京	2013	791-797
Saheki T	“Animal models of enhanced oxidative stress” (especially murine model of human citrin deficiency)	Tsukahara H & Kaneko K	Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice - Pediatric Disorders	Springer Science and Business Media	New York	in press	

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
古賀靖敏	希少難病：ミトコンドリア病の治療が可能となる時代に巡り合っ て（アルギニン療法、ピルビン酸ナトリウム療法の開発）	福岡県小児科医報	2013 年版	91-98	2013
古賀靖敏	ミトコンドリア脳筋症治療の現状と展望	日本臨床	第72 巻 第1号	175-184	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, Ohtake A	Molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: Focusing on mitochondrial DNA depletion syndrome	Pediatr Int.		in press	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohtake A, Murayama K , Mori M, Harashima H, Yamazaki T, Tamaru S, Yamashita I, Kishita Y, Kohda, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Okazaki Y	Diagnochain disorders: exome sequencing for disease gene identification	Biochim Biophys Acta (General Subjects on Special Issue: Frontiers of Mitochondria.)		in press	2014
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.		in press	2013
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
斎藤朋子、大山牧子、川滝元良、猪谷泰史、 村山 圭	出生直後から代謝性アシドーシス、肝機能障害をきたした新生児期発症のミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症の1例	日未熟児新生児会誌	2014 (26)	131-137	2014
森 雅人、 村山 圭 、大竹 明	ミトコンドリア病	小児科診療	76(1)	11-19	2013
川内恵美、 村山 圭 、伏見拓矢、市本景子、鶴岡智子、高柳正樹、大竹 明	ミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症における消化器症状についての検討	日本小児栄養消化器肝臓学会雑誌	27(2)	148-154	2013
村山 圭	ミトコンドリア異常症のビタミンカクテル、食事療法	小児内科	45	1072-1074	2013
Ueda H, et al.	Combination of Miller-Dieker syndrome and VACTERL association causes extremely severe clinical presentation	Eur J Pediatr		in press	2013
Suzumori N, et al.	Prenatal diagnosis of X-linked recessive Lenz microphthalmia syndrome	J Obstet Gynaecol Res	39	1545-7	2013
Hamajima N, et al.	Increased protein stability of CDKN1C causes a gain-of-function phenotype in patients with IMAGE syndrome	PLoS One	8	e75137.	2013
Yoneda Y, et al.	Phenotypic spectrum of COL4A1 mutations: porencephaly to schizencephaly	Ann Neurol	73	48-57.	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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		in press	2014
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
Ohtake A , Murayama, K, Mori M, Harashima H, Yamazaki T, Tamaru S, Yamashita I, Kishita Y, Nakachi Y, Kohda M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Okazaki Y	Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders: exome sequencing for disease gene identification	Biochim Biophys Acta (General Subjects)	1840(4)	1355-1359	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, Ohtake A	Molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: Focusing on mitochondrial DNA depletion syndrome	Pediatr Int	56(2)	in press	2014
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 Transmitochondrial Mito-Mice Expressing Mitochondrial Respiration Defects	Exp Anim	63(1)	21-30	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
Shimizu A, Mito T, Hayashi C, Ogasawara E, Koba R, Negishi I, Takenaga K, Nakada K, Hayashi JI.	Transmitochondrial mice as models for primary prevention of diseases caused by mutation in the <i>tRNA^{Lys}</i> gene	Proc Natl Acad Sci USA.	111(8)	3104-9	2014
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	S1567-7249(13)	00216-X	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	G3 (Bethesda)	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 respiration defects and B-cell lymphoma development	PLoS One	8(2)	e55789	2013