

**厚生労働科学研究費補助金**

**難治性疾患等実用化研究事業  
(難治性疾患実用化研究事業)**

**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に関する研究  
試薬からの希少疾病治療薬開発の試み**

**平成 26 年度 総括・分担研究報告書**

**研究代表者 古賀 靖敏**

**平成 27 (2015) 年 3 月**

## 目 次

### ・総括研究報告

- 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  
試薬からの希少疾病治療薬開発の試み  
古賀 靖敏 ----- 1

### ・分担研究報告

1. ミトコンドリア脳筋症の生化学的スクリーニング法の開発に関する研究  
村山 圭 ----- 7
  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 ----- 12
  3. 難治性ミトコンドリア病患者 4 例へのピルビン酸ナトリウムによる治療経験と  
ミトコンドリア病に対する系統的病因探索システムについての研究  
大竹 明 ----- 14
  4. ミトコンドリア機能とヘッジホッグシグナルに関する研究  
藤井 克則 ----- 17
  5. ミトコンドリア脳筋症に合併する高乳酸血症のピルビン酸ナトリウムによる  
治療薬開発についての研究  
但馬 剛 ----- 18
  6. ミトコンドリア脳筋症の臨床的研究と評価尺度の開発に関する研究  
藤井 達哉 ----- 19
  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 ----- 21
  8. シトリン欠損症の病態解明  
佐伯 武頼 ----- 23
  9. バイオマーカー研究 TCA 回路と周辺の代謝機能解析に関する研究  
山口 清次 ----- 28
  10. ミトコンドリア病モデル細胞ならびにモデルマウスを駆使したピルビン酸  
ナトリウム療法に関する研究  
中田 和人 ----- 35
  11. ミトコンドリア脳筋症の臨床的研究と評価尺度の開発に関する研究  
石井 亜紀子 ----- 38
  12. ミトコンドリア病に対するピルビン酸ナトリウムの治療効果に関する研究  
酒井 規夫 ----- 40
- ・研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 42

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）  
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

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（PA）治療法の開発研究を目的として、PAの上市に必要な1）非臨床試験、2）GMP原薬の製造、3）治験薬概要書作成を完成した。被験薬がFirst in manの薬剤となるために、上市に必要な非臨床試験の申請データパッケージについては、PMDAの指導に従って実施し、安全性薬理試験、薬物動態試験、毒性試験を実施した。GMP原薬製造は、原材料を武蔵野化学から購入し、PMDAの指導に従って塩野フィネスで製造した。薬物安定性についても完了した。以上のデータをまとめて、治験薬概要書を作成した。本研究では、上記記載のごとく、ステップ1の評価必須事項をすべて達成した。また、平成26年3月には、Phase1試験を開始し、平成26年11月に完了した。この研究過程で、ミトコンドリア病の新規バイオマーカー（GDF15）を発見し平成26年1月15日に特許申請した。現在、Phase2/3試験もしくはPhase2試験のプロトコール作成のために薬事戦略相談事前面談を平成26年12月26日に実施し、さらには平成27年3月に本相談を申し込み、プロトコールを確定する予定である。同時に治験のための基盤整備を行い、ステップ2の採択後速やかに試験を実施する予定である。また、ミトコンドリア病の新規バイオマーカー（GDF15）の体外診断薬の開発を本研究のもとで行い、世界初の診断および重症度判定の体外診断薬として開発し、保険収載を目指す。この診断薬開発は、すでに戦略相談を終了し、今後国際展開も視野に開発中である。

平成26年度研究分担者

- |          |                                  |            |  |
|----------|----------------------------------|------------|--|
| 1. 村山 圭  | 千葉県こども病院代謝科・部長                   | 7. 田中 雅嗣   | 東京都健康長寿医療センター<br>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<br>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<br>ター山村プロジェクト研究室<br>・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<br>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  | 広島大学大学院医歯薬保健学研究<br>院小児科学・講師      | 11. 石井 亜紀子 | 筑波大学医学医療系神経内科<br>・講師                     |
| 6. 藤井 達哉 | 滋賀県立小児保健医療センター<br>・病院長           | 12. 酒井 規夫  | 大阪大学大学院医学系研究科小児<br>科学・准教授                |

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。PAは生体内物質であり、1990年代には体質改善のサプリメントとして使用されている（Am J C/In Nutr 1994;59:423-7）。また、心筋梗塞、脳梗塞などの急性期患者にカテーテル先端からの静注療法が臨床研究され、その有効性が報告された（Lancet. 1999;353(9161):1321-3）。PAは、体外循環の組成（Experimental Biology and Medicine 2005;230:435-4

43）や臓器移植の保存液にも広く使用されている。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。また、高乳酸血症を来すミトコンドリア病のモデル動物（ミトコンドリアDNAの欠失マウス）で、乳酸値を下げる治療をしたところ寿命が延長し運動能力も回復した（Human Molecular Ge

netics 2010;19:3179-3189)。我々は、PAによるミトコンドリア病の介入研究から、PAが高乳酸血症を軽減するのみでなく、臨床的重症度を軽くするという知見を得た(Mol Genet Metab. 2014;112(2):133-138、Brain & Development. 2012;34(2):87-91)。本研究は、先天性高乳酸血症の病態を踏まえた新規治療薬の開発を日本から世界に発信する事が目的である。また、申請者はミトコンドリア病の新規バイオマーカー(GDF15)を発見し平成26年1月15日に特許申請した(特願2014-005391、PCT/JP2015/50833)。この検査法を、診断ガイドラインのトップに据えるべく、体外診断薬の開発を同時に行い、PAの治療薬と合わせてグローバル展開を計画している。

## B. 研究方法

平成26年3月より、Phase1試験(PLA001)を開始し、平成26年11月に完了した。この研究過程で、ミトコンドリア病の新規バイオマーカー(GDF15)を発見し平成26年1月15日に特許申請した。Phase2前期試験のプロトコル作成のために薬事戦略相談事前面談を平成26年12月26日に実施し、さらには平成27年3月3日に本相談の申し込みを行った。平成27年5月までにプロトコルを確定する予定である。同時に治験のための基盤整備を行い、ステップ2の採択後速やかに試験を実施する予定である。また、ミトコンドリア病の新規バイオマーカー(GDF15)の体外診断薬の開発を本研究のもとで行い、世界初の診断および重症度判定の体外診断薬として開発し、保険収載を目指す。この診断薬開発は、すでに戦略相談を終了し、今後国際展開も視野に開発中である。

### ・創薬事業

Phase1試験(PLA001試験)健康成人男性を対象としたピルビン酸ナトリウムの臨床第 相試験

以下の3パートに分けて研究を行った。

1) 単回投与パート：ランダム化二重盲検並行群間比較試験

単回投与パート：被験薬又は対照薬を空腹時に投与

ステップ1：0.08g/kg

ステップ2：0.17g/kg

ステップ3：0.33g/kg

ステップ4：0.66g/kg

ピルビン酸及び乳酸の血漿中濃度測定目的に投与直前、投与後5分、10分、20分、30分、45分、1時間、1.5時間、2時間、4時間、8時間、24時間に、単回投与パートのみピルビン酸の尿中及び糞中濃度測定目的にステップ2に投与開始前24時間及び投与開始後24時間に採取した。

被験者数：単回投与パート32名(1ステップあたり被験薬群6名、対照薬群2名)

2) 食事の影響の評価パート：オープンラベルのクロスオーバー比較試験

食事の影響の評価パート：空腹時及び食後に0.17g/

kg投与

ピルビン酸及び乳酸の血漿中濃度測定目的に投与直前、投与後5分、10分、20分、30分、45分、1時間、1.5時間、2時間、4時間、8時間、24時間に、単回投与パートのみピルビン酸の尿中及び糞中濃度測定目的にステップ2に投与開始前24時間及び投与開始後24時間に採取した。

被験者数：食事の影響のパート6名(空腹時投与先行群3名、食後投与先行群3名)

3) 反復投与パート：ランダム化二重盲検並行群間比較試験

反復投与パート：被験薬又は対照薬を食後に投与  
ステップ1：対照薬，0.5/kg/day，1.0g/kg/day(1日3回投与)

ステップ2：2.0/kg/day(1日3回投与)

ピルビン酸及び乳酸の血漿中濃度測定目的に以下の時間に採取した。

Day1:朝(第一回目)投与直前、投与後5分、10分、20分、30分、45分、1時間、1.5時間、2時間、4時間、10時間

Day2～Day6：朝の投与直前

Day7:朝の投与直前、投与後5分、10分、20分、30分、45分、1時間、1.5時間、2時間、4時間、10時間、24時間(退院前)

安全性評価は、治験薬投与開始から有害事象及び副作用、臨床検査、バイタルサインにて評価した。

被験者数：反復投与パート21名(ステップ1 15名、ステップ2 6名)

組入れ基準：文書同意が得られ、症例登録時に以下の(1)の基準を満たし、(2)の基準に抵触しないことが確認された日本人健康成人男性

(1) 選択基準

1) 年齢が20歳以上45歳以下

2) BMIが18.5以上25.0未満

3) スクリーニング検査の結果、治験責任医師又は治験分担医師が適格と判断した者

4) 実施医療機関が定めた被験者に関する規定を遵守できる者

(2) 除外基準

1) 循環器・消化器・呼吸器・肝機能・腎機能・精神神経機能及び代謝系機能等に現病歴又は既往歴があり、治験責任医師又は治験分担医師が本試験の参加に支障があると判断した者

2) 被験薬の吸収に影響を及ぼすことが明らかな消化器の手術歴のある者

3) 薬物アレルギーの既往歴を有するか、薬物アレルギーが疑われる者

4) 薬物依存、アルコール依存の現病歴又は既往歴がある者

5) 治験薬投与前3日以内にセント・ジョーンズ・ワート(セイヨウオトギリソウ)を含有する飲食物など、薬物動態に影響を及ぼすことが知られている栄養補助食品を摂取した者

6) 治験薬投与開始前16週間以内に新有効成分医薬品の第 相試験に参加するか、12週間以内にその他の治験に参加し、プラセボを含む薬物の投与を受け

た者

- 7) 本試験に参加すると、年間総採血量が1200 mLを超える可能性のある者
- 8) 治験薬投与前4週以内に200 mL以上の全血採血、2週以内に成分採血（血漿又は血小板）、あるいは12週以内に400 mLを超える採血又は献血を行った者
- 9) HIV抗原・抗体、HBs抗原、HCV抗体又は梅毒血清反応が陽性であった者
- 10) その他、治験責任医師又は治験分担医師が対象として不適格と判断した者

治験薬、用量及び投与方法：

治験薬

被験薬：一般的名称：ピルビン酸ナトリウム

保存方法：室温保存

使用期限：ラベルに記載 使用期限：ラベルに記載

対照薬：単回投与及び反復投与パートでは、生理食塩水を1/2の濃度に希釈した水溶液（NaClを0.45%含有）を対照薬とする。単回投与及び反復投与パートでは、生理食塩水を1/2の濃度に希釈した水溶液（NaClを0.45%含有）を対照薬とする。

用量及び投与方法

単回投与パート：

ステップ1：0.08 g/kg

ステップ2：0.17 g/kg

ステップ3：0.33 g/kg

ステップ4：0.66 g/kg

食事の影響の評価パート：0.17g/kg単回投与

反復投与パート：1.0 g/kg/day（1回投与量0.33 g/kg，1日3回食後投与）

0.5 g/kg/day（1回投与量0.17 g/kg，1日3回食後投与）

ピルビン酸ナトリウムは投与直前に水に溶解し、100 mLの水溶液とした。投与直前に溶解する理由は、時間が経過すると、水溶液中のピルビン酸ナトリウムがパラピルビン酸ナトリウムに分解するためである。対照薬の溶液量も100 mLとし、容器も含めて、外観上はピルビン酸ナトリウムの水溶液と識別できないようにした。

評価基準：

(1) 薬物動態

1) 薬物動態評価項目

(A) 血漿中薬物濃度

血漿中薬物濃度測定値に基づいて薬物動態パラメータ(AUCO-t, AUCO-inf, AUCO-, Cmax, tmax, Kel, t1/2, MRT0-inf, Vz/F, Vdss/F, CL/F)の記述統計量を算出した。

(B) 尿中・糞中薬物濃度(単回投与パート)

尿中・糞中薬物濃度の測定値に基づいて、薬物動態パラメータ(Ae, Ae%, CLR, Af, Af%)の記述統計量を算出した。

(C) 薬物動態に及ぼす食事の影響の評価

食事の影響の評価パートで算出した血漿中ピルビン酸濃度の薬物動態パラメータについて、食事条件間（空腹時投与、食後投与）での平均値の比（又は差）とその両側90%信頼区間を算出した。

(D) 定常状態の評価と蓄積係数(反復投与パート)

反復投与時の血漿中ピルビン酸濃度のトラフ値について、被験者ごとにDay 7とDay 1~Day 6との比(Da y 7/Day 1, Day 7/Day 2 ... Day 7/Day 6)を算出し

た。

(2) 安全性

1) 安全性評価項目

(A) 有害事象及び副作用

(B) 臨床検査及びバイタルサイン

2) 有害事象及び副作用の定義

試験治療を受けた後に生じた好ましくない（又は意図しない）症状及び徴候を指し、試験治療との因果関係の有無は問わない。本試験では、治験薬投与開始後に新たに発現又は悪化した症状又は徴候、治験薬投与開始後に生じた臨床検査値等の好ましくない変化を有害事象として扱った。「有害事象」のうち、治験薬との関連性が「なし」と判定されたもの以外を「副作用」として扱った。

統計手法：

(1) 被験者背景

パートごとに、各投与群別の被験者背景(年齢, 身長, 投与開始前の体重)の記述統計量(被験者数, 平均値, 標準偏差, 中央値, 最小値, 最大値)を算出した。

(2) 薬物動態

1) 血漿中薬物濃度

単回投与及び反復投与のパートでは、各測定時点での血漿中ピルビン酸濃度の記述統計量を投与群別に算出し、推移図を作成した。食事の影響の評価パートでは、食事条件別（空腹時投与、食後投与）に各測定時点での血漿中ピルビン酸濃度の記述統計量を算出し、推移図を作成した。

あわせて、薬物動態パラメータの記述統計量（被験者数, 平均値, 標準偏差, 最小値, 中央値, 最大値, 幾何平均値, 幾何平均値の変動係数CV%）を算出した。算出する薬物動態パラメータは以下のものを予定しており、詳細は解析計画書に記載した。

AUCO-t, AUCO-inf, AUCO-, Cmax, tmax, Kel, t1/2, MRT0-inf, Vz/F, Vdss/F, CL/F

単回投与及び反復投与パートでは、投与群別に各測定時点での血漿中乳酸濃度及び乳酸/ピルビン酸の血漿中濃度比の記述統計量（被験者数, 平均値, 標準偏差, 中央値, 最小値, 最大値）を算出した。食事の影響の評価パートでは、食事条件別（空腹時投与、食後投与）にこれらの記述統計量を算出した。

さらに、単回投与及び反復投与パートでは、投与群別に各測定時点でのケトン体比（アセト酢酸/3-ヒドロキシ酪酸）、Na, K, Clの記述統計量に加えて、患者における病態研究目的でアラニン, Fibroblast growth factor 21, Growth differentiation factor 15の記述統計量、（被験者数, 平均値, 標準偏差, 中央値, 最小値, 最大値）を算出した。

血漿中ピルビン酸濃度と投与量との関係性を評価する目的で、AUCO-t, AUCO-inf, CmaxのそれぞれをY軸、投与量をX軸にプロットした両対数の散布図を作成するとともに、線形回帰分析を用いてパワーモデル（ $Y = X$ ）を当てはめ、及びの推定値とその両側90%信頼区間を算出した。

2) 尿中・糞中薬物濃度(単回投与パート)

尿中・糞中薬物濃度の測定値に基づいて、薬物動態パラメータの記述統計量（被験者数, 平均値, 標準偏差, 最小値, 中央値, 最大値, 幾何平均値, 幾何平均値の変動係数CV%）を算出した。算出する薬物動態パラメータは以下のものを予定しており詳細は解析計画書に記載した。

Ae, Ae%, CLR, Af, Af%

### (3) 薬物動態に及ぼす食事の影響の評価

食事の影響の評価パートで算出した血漿中ピルビン酸濃度の薬物動態パラメータについて、食事条件間（空腹時投与、食後投与）での平均値の比（又は差）とその両側90%信頼区間を算出した。平均値を算出する場合、Cmax, Kel, AUC0-inf, t1/2, MRT0-infの各パラメータは自然対数に変換して平均値の差とその信頼区間を算出した後、真数の比に戻すこととし、tmaxは測定値をそのまま用いて算術平均値の差とその両側90%信頼区間を算出した。また、Cmax及びAUC0-infをそれぞれ反応変数として、群（空腹時投与と先行群、食後投与と先行群）及び時期を要因としたクロスオーバー分散分析を実施した。

### (4) 定常状態の評価と蓄積係数(反復投与パート)

反復投与時の血漿中ピルビン酸濃度のトラフ値について、被験者ごとにDay 7とDay 1~Day 6との比(Day 7/Day 1, Day 7/Day 2 ... Day 7/Day 6)を算出し、記述統計量(被験者数, 平均値, 標準偏差, 最小値, 中央値, 最大値, 幾何平均値, 幾何平均値の変動係数CV%)を求めた。

反復投与時の血漿中ピルビン酸濃度のCmax及びAUC0-infについて、被験者ごとにDay7とDay1との比(Day7/Day1)を算出し、記述統計量(被験者数, 平均値, 標準偏差, 最小値, 中央値, 最大値, 幾何平均値, 幾何平均値の変動係数CV%)を算出した。

### (5) 安全性

単回投与及び反復投与パートでは、以下の解析を投与群別に実施した。食事の影響の評価パートでは、食事条件別(空腹時投与、食後投与)に以下の解析を実施した。

#### 1) 有害事象

MedDRAを用いて有害事象を基本語に読み替え、以下を集計した。

・有害事象が少なくとも1件発現した被験者数及び発現割合

・器官別大分類の有害事象の発現者数及び発現割合

・基本語及び程度別の有害事象の発現者数及び発現割合

あわせて、有害事象が発現した被験者の一覧表を作成した。一覧表に記載する項目は、「被験者番号、年齢、治験薬の投与量、有害事象の名称、程度、発現日、処置の有無、転帰、治験薬との因果関係」とした。

#### 2) 臨床検査及びバイタルサイン

検査項目ごとに、各測定時点での記述統計量(被験者数, 平均値, 標準偏差, 最小値, 25%点, 中央値, 75%点, 最大値, 歪度, 尖度)を算出した。検査項目ごとに、個々の被験者の投与開始前値をX軸、投与終了翌日の値をY軸にプロットした散布図を作成した。投与前と投与後の各測定時点で12誘導心電図の正異判定のシフトテーブルを作成した。

#### (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、本研究に先立つ自主臨床研究の計画調書は、すべての協力研究施設の倫理審査会に提出し、承認を得ている。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、久留米大学病院などすべての研究協力施設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、ピ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った。

### C. 研究結果

#### (1) 薬物動態

現在解析中である。

#### (2) 安全性

##### 1) 有害事象

治験薬投与により有害事象は、ピルビン酸ナトリウム群で24例中10例、対照群で6例中0例に認められた。重篤・重要な有害事象は認められなかった。0.33g/kg/日投与例で、服薬時の嘔気、軽度の下痢が診られた。重症度別では、中等度の有害事象が、ピルビン酸ナトリウム群で3例であった。2.0g/kg/日投与例で、全例、水様性の下痢、むくみが診られ、服薬初日に全例治験中止となった。有害事象は、医療行為の必要はなく、いずれも自然に回復した。臨床的忍容性としては、1.0g/kg/日投与例では、半数に薬物を継続できず、0.75g/kg/日投与と考えられた。

##### 2) 臨床検査、バイタルサイン

臨床検査、バイタルサインにおいて、治験薬投与による臨床問題となる変動は認められなかった。異常変動と判定された項目は、ピルビン酸ナトリウム群で2例であり、水様性下痢が有害事象として扱われた。

以上より、0.75g/kg/日の反復投与の安全性に特に問題は認められなかった。

### D. 考察

最終的なPhase1試験結果は、現在解析中である。

## F . 健康危険情報

ナトリウム負荷以外は、特に大きな問題は診られなかった。

## G . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1.Fujii T, Nozaki F, Saito K, Hayashi A, Nishigaki Y, Murayama K, Tanaka M, Koga Y, Hiejima I, Kumada T. Efficacy of pyruvate therapy in patients with mitochondrial disease: A semi-quantitative clinical evaluation study *Mol Genet Metab* 112(2) 133-8, 2014
2. Fujita Y, Ito M, Kojima T, Yatsuga S, Koga Y, Tanaka M. GDF15 is a novel biomarker to evaluate efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. *Mitochondrion* 2034-42, 2015
3. Katayama K, Povalko N, Yatsuga S, Nishioka J, Kakuma T, Matsuishi T, Koga Y. New TRPM6 mutation and management of hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia. *Brain Dev.* 2015. (in press) doi:10.1016/j.braindev.2014.06.006
4. Wei F-Y, Zhou B, Suzuki T, Miyata K, Ujihara Y, Horiguchi H, Takahashi N, Xie P, Michiue H, Fujimura A, Kaitsuka T, Matsui H, Koga Y, Mohri S, Suzuki T, Oike Y, Tomizawa K. Cdk5rap 1 mediated 2-methylthio modification of mitochondrial tRNAs governs protein translation and contributes to myopathy in mice and humans. *Cell Metabolism* (in press) 2015, cmet.2015.01.019
5. 古賀靖敏、ミトコンドリア機能の臨床生化学的評価。代謝性ミオパチー Basic mechanism, Diagnosis and Practical Approach。診断と治療社。東京。2014 p 22-27.
6. 古賀靖敏、ミトコンドリア代謝異常症のトピックス。代謝性ミオパチー Basic mechanism, Diagnosis and Practical Approach。診断と治療社。東京。2014 p 142-152.
7. 古賀靖敏、ミトコンドリアにおける代謝。代謝性ミオパチー Basic mechanism, Diagnosis and Practical Approach。診断と治療社。東京。2014 p 153-159.
8. 古賀靖敏、ミトコンドリア病の診断の進め方。代謝性ミオパチー Basic mechanism, Diagnosis and Practical Approach。診断と治療社。東京。2014 p 160-167.
9. 古賀靖敏、ミトコンドリア代謝異常症の臨床的病型による分類 MELAS。代謝性ミオパチー Basic mechanism, Diagnosis and Practical Approach。診断と治療社。東京。2014 p 168-174.
10. 古賀靖敏、ミトコンドリア代謝異常症の臨床的

病型による分類 Leber 病。代謝性ミオパチー

Basic mechanism, Diagnosis and Practical Approach。診断と治療社。東京。2014 p 181-184.

11. 古賀靖敏、L-アルギニン (MELAS)。引いて調べる先天代謝異常症。診断と治療社。東京。2014 p 136-137.

12. 古賀靖敏、ミトコンドリア心筋症・心合併症。心エコーハンドブック 心筋・心膜疾患。金芳堂。京都。2014 p 100-105.

13. 古賀靖敏、特集：ミトコンドリア病 小児科におけるミトコンドリア病。神経眼科。31(4) 457-463、2015.

### 2. 学会発表

1. Koga Y. Pharmacologic therapy for mitochondrial myopathies. The Joint 13th AOMC Annual Scientific Meeting and 20th PNA Midyear Convention. 2014.5.14-17 (Manila, Philippines)
2. Koga Y, Nakamura H, Yatsuga S, Tanaka M. Development of therapeutic drug of Sodium Pyruvate (SP) for lactic acidosis associated with mitochondrial disorders. *Mitochondrial Medicine* 2014 –Pittsburgh. 2014.6.4-7 (Pittsburgh, USA)
3. Yatsuga S, Koga Y. Growth differentiation factor 15 and fibroblast growth factor 21: novel biomarkers for mitochondrial diseases. *Mitochondrial Medicine* 2014 –Pittsburgh. 2014.6.4-7 (Pittsburgh, USA)
4. Yatsuga S, Koga Y. Growth differentiation factor 15 and fibroblast growth factor 21: novel biomarkers for mitochondrial diseases. *International Meeting on Mitochondrial Pathology* 2014. 2014.6.15-19 (Tampere, Finland)
5. Yatsuga S, Koga Y. Growth differentiation factor 15 and fibroblast growth factor 21: novel biomarkers for mitochondrial diseases. 53rd Annual European Society for Paediatric Endocrinology Meeting. 2014.9.18-20 (Dublin, Ireland)
6. Sasaki T, Izumi Y, Fukami M, Yatsuga S, Koga Y. A case of 46,Y,dup(x)(p21.2p22.2) DSD caused by overexpressed DAX1. 53rd Annual European Society for Paediatric Endocrinology Meeting. 2014.9.18-20 (Dublin, Ireland)

7. Koga Y. Development of therapeutic drug of sodium pyruvate (SP) for lactic acidosis associated with mitochondrial disorders. 11th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research & Medicine. 2014.11.13-16 (Taipei, Taiwan)
  8. 八ツ賀秀一、牛島高介、古賀靖敏. Prader-Willi 症候群：双子の思春期早発例. 第 37 回日本小児遺伝学会学術集会. 2014.4.10 (名古屋)
  9. 古賀 靖敏、ピルビン酸ナトリウム治療法開発チーム. ミトコンドリア脳筋症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. 第 117 回日本小児科学会学術集会. 2014.4.11-13 (名古屋)
  10. 佐々木孝子、泉陽子、深見真紀、八ツ賀秀一、片山幸樹、西岡淳子、古賀靖敏. DSD の原因が DAX1 過剰であった 46,Y,add(X)(p22.1) の一例. 第 117 回日本小児科学会学術集会. 2014.4.11-13 (名古屋)
  11. 西岡淳子、阿部清美、鳴海覚志、長谷川奉延、八ツ賀秀一、古賀靖敏. 4 世代・世界最大の PAX8 変異陽性家系からみえた甲状腺表現型の多様性：高齢 PAX8 変異保有者の臨床像. 第 87 回日本内分泌学会学術総会. 2014.4.24-26 (福岡)
  12. 金城さおり、豊浦麻記子、吉年俊文、喜久山至、小濱守安、閑野将行、源川隆一、八ツ賀秀一、古賀靖敏. ピルビン酸ナトリウムを開始したミトコンドリア呼吸鎖異常症の 6 か月男児. 第 87 回日本内分泌学会学術総会. 2014.4.24-26 (福岡)
  13. 八ツ賀秀一、古賀靖敏. 血漿 FGF21 は筋症状を伴うミトコンドリア病のバイオマーカーになる. 第 56 回日本小児神経学会学術集会. 2014.5.29-31 (浜松)
  14. 八ツ賀秀一、佐々木孝子、古賀靖敏. 健康日本人の血漿 FGF21 値の検討. 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会. 2014.9.25-27 (浜松)
  15. 佐々木孝子、八ツ賀秀一、西岡淳子、古賀靖敏. 神経性食思不振症に甲状腺機能亢進を合併した 1 例. 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会. 2014.9.25-27 (浜松)
  16. Yatsuga S, Koga Y. Growth differentiation factor-15 (GDF-15): a most reliable biomarker for mitochondrial disorders. 第 56 回日本先天代謝異常学会. 2014.11.13-15
  17. 八ツ賀秀一、石井亜紀子、藤田泰典、小島俊男、伊藤雅史、田中雅嗣、角間辰之、古賀靖敏. GDF-15&FGF-21: ミトコンドリア病の新規バイオマーカー. 第 14 回日本ミトコンドリア学会年会. 2014.12.3-5 (福岡)
  18. 佐々木孝子、八ツ賀秀一、片山幸樹、西岡淳子、古賀靖敏、松石豊次郎. 低身長患者の受診動機のアンケート調査. 第 478 回日本小児科学会福岡地方会例会. 2014.02.08 (福岡)
  19. 佐々木孝子、八ツ賀秀一、古賀靖敏. 低 Mg 血症、低 Cu 血症を認めた Fontan 術後タンパク漏出性胃腸症. 第 11 回九州小児内分泌若手セミナー. 2014.5.31 (福岡)
- 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 GDF-15  
国内特許：特願2014-005391、  
国際特許：PCT/JP2015/50833
  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  
難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）  
分担研究報告書

ミトコンドリア脳筋症の生化学的スクリーニング法の開発に関する研究

研究分担者 村山 圭 千葉県こども病院代謝科 部長

研究要旨

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

**A. 研究目的**

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

**B. 研究対象と方法**

**診断について**

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

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

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

ーナル抗体を用いて行った。

### ピルビン酸 Na について

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

### 倫理面への配慮

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

## C. 研究結果

### 診断数

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

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

図 1. 年度別 MRCD 診断数

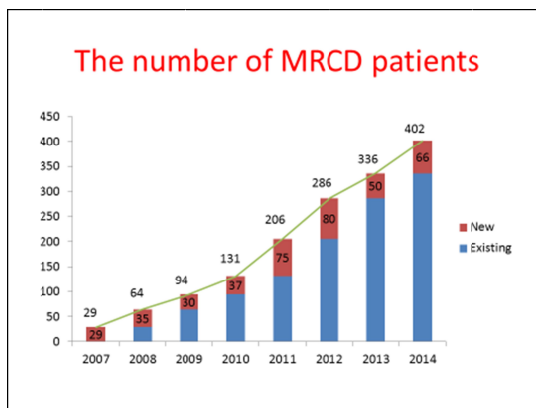
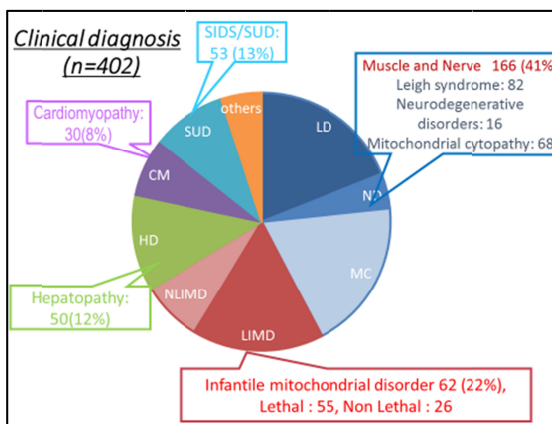


図 2 MRCD の臨床分類別の症例数



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

図3 ビルビン酸Na投与の患者概要

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

図4 ビルビン酸Na投与6症例のまとめ

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

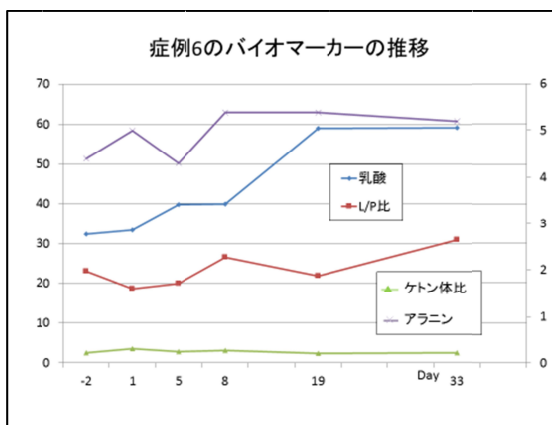
新規症例に関して患者プロフィールおよび経過を図5・6に示す。本症例は典型的なMELASであり、投与後に症状は改善しているものの、を乳酸値やLP比、AKBR、血中アラニンなどのバイオマーカーの改善は認めなかった(図7)。

図5・6 新規患者(MELAS症例)のプロフィール・経過

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

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

図7 バイオマーカーの推移



#### D. 考察

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

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

## E. 結論

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

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

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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

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

#### 邦文

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

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

#### 2. 学会発表

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

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 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、長期経過を検討した。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。4 名が中止となった。理由は、効果不十分が 2 名、下痢の副作用と効果不十分が 1 例、本人が内服を嫌がる 1 例であった。それ以外の副作用として特別なものはなかった。MELAS の 1 例では、活動性は改善したが、心筋症の悪化が見れた。

### 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、すべてのミトコンドリア病が対象とはならない。また、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開始した。第 1 例の開始から 2 年が経過したので、長期経過について報告する。

### 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、最大 1g/kg まで増量可とした。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 1 2 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

治療継続期間は平均 17 か月である。現在 4 例が中止となった。中止例について記す。1 例目は Leigh 脳症の 6 歳女児である。明らかな副作用はなかったが、効果の実感が得られず、親の希望にて 1 年で中止となった。2 例目は MELAS の 17 歳男性である。本例では下痢の副作用を認め、明確な効果もみられなかったために、8 か月で中止となった。3 例目は PDHC 欠損症の 5 か月女児である。本例では内服開始後活動性が改善する印象をご家族がもたれたが、本人が内服を嫌がるようになり、10 か月で中止となった。4 例目は MELAS の 7 歳男児である。重症度スコア、MRI 病変ともに悪化があり、11 か月で中止となった。

4 例では現在も継続している。その中で、MELAS の 7 歳女児は活動性の改善により、ご家族が継続を希望されているが、心筋症による心機能は次第に悪化しており、心機能の改善効果はみられていない。

長期継続例では活動性の改善をご家族が評価する場合が多く、また、副作用はみられていない。

### 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。開始から2年経過した所で、8名中4名が中止を希望された。服薬中止の理由は明確な効果がみられなかったことである。副作用が問題となったのは下痢の1例のみであった。この例においても下痢の程度は強くなかったものの、明らかな効果がなかったこともあり、中止となった。また、PDHC欠損例では乳児が服薬を嫌がることで継続が困難になった。このように、少ないとはいえ、下痢の副作用と飲みづらさについては改善が求められる。しかし、それ以上に家族が服薬の継続を実感できるほどの効果が得られなかったことが主要な中止要因であった。

継続を続けている4例においては、ご家族は活動性の改善を評価して、服薬継続を希望されている。臨床スコアに反映されるような程度の改善はみられていないが、活動性の改善は多くのかたが述べられており、共通した効果である可能性がある。継続の1例では、しかし、活動性は改善したが、心機能は持続的に低下し、改善効果はみられていない。ピルビン酸の副作用とは考えづらいが、改善効果は認められなかった。

治療中止例の4例はいずれも治療開始前の血中乳酸値がそれ程たかくなかった。また、臨床的重症度は高めであった。明確な効果が得られなかった理由のひとつとして、血中乳酸値があまり高くなかったことが考えられる。乳酸値が高い例のほうが、乳酸低下が得られ、その結果としての臨床効果が実感されるのかもしれない。一方、多少の副作用はあったものの、著明な悪化や退行はみられず、長期投与においてもピルビン酸療法自体の安全性は高いと考えられた。

## E. 結論

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、長期経過を検討した。この経験は、来るべき医師主導治験でのプロトコールに反映される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Goto M, Saito Y, Honda R, Saito T, Sugai K, Matsuda Y, Miyatake C, Takeshita E, Ishiyama A, Komaki H, Nakagawa E, Sasaki M, Uto C, Kikuchi K, Motoki T, Saitoh S. Episodic tremors representing cortical myoclonus are characteristic in Angelman syndrome due to UBE3A mutations. *Brain Dev* 37:216-222, 2015.
- 3) Negishi Y, Hattori A, Takeshita E, Sakai C, Ando N, Ito T, Goto Y-I, Saitoh S. Homoplasmy of a mitochondrial 3697G>A mutation causes Leigh syndrome. *J Hum Genet* 59: 405-407, 2014.
- 4) Okamoto N, Miya F, Tsunoda T, Yanagihara K,

Kato M, Saitoh S, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K. KIF1A mutation in a patient with progressive neurodegeneration. *J Hum Genet* 59:639-641, 2014.

- 5) Okamoto N, Miya F, Tsunoda T, Kato M, Saitoh S, Yamasaki M, Shimizu A, Torii C, Kanemura Y, Kosaki K. Targeted next-generation sequencing in the diagnosis of neurodevelopmental disorders. *Clin Genet* [Epub ahead of print]
- 6) Negishi Y, Miya F, Hattori A, Mizuno K, Hori I, Ando N, Okamoto N, Kato M, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Saitoh S. Truncating mutation in *NFIA* causes brain malformation and urinary tract defects. *Hum Genome Var* 2:15007, 2015.

## 2. 学会発表

- 1) Yutaka Negishi, Ayako Hattori, Ikumi Hori, Naoki Ando, Fuyuki Miya, Tsunoda Tatsuhiko, Nobuhiko Okamoto, Mitsuhiro Kato, Mami Yamasaki, Yonehiro Kanemura, Kenjiro Kozaki, Shinji Saitoh. Truncating mutation of *NFIA* causes a brain malformation and urinary tract defect. 64th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, San Diego, USA, 10/18-21/20
- 2) 根岸豊、堀いくみ、服部文子、安藤直樹、齋藤伸治、水野健太郎、宮冬樹、角田達彦、岡本伸彦、加藤光広、山崎麻美、金村米博、小崎健次郎 *NFIA* 遺伝子変異は1p32-p31欠失症候群の中核症状を規定する 第59回日本人類遺伝学会 平成26年11月20-22日(東京)
- 3) 横井摂理、石原尚子、夏目淳、堤真紀子、大江瑞恵、加藤武馬、稲垣秀人、柳原格、齋藤伸治、倉橋浩樹 水無脳症を呈した *TUBA1A* 遺伝子異常の一例 第59回日本人類遺伝学会 平成26年11月20-22日(東京)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



難治性ミトコンドリア病患者 4 例へのピルビン酸ナトリウムによる治療経験と  
ミトコンドリア病に対する系統的病因探索システムについての研究

研究分担者 大竹 明 埼玉医科大学小児科 教授

研究要旨

難治性ミトコンドリア病 4 症例にピルビン酸ナトリウムを投与した。筋力を中心に病像改善の印象は強く、症状・検査結果に副作用と考えられるものはない。今後 NPMDS など種々の臨床評価スケールによる評価を継続し、バイオマーカー等を含めた客観的評価も行って行きたい。

呼吸鎖酵素診断により全国からの依頼患者 399 家系 403 例をミトコンドリア呼吸鎖異常症（MRCD）と診断した。臨床診断では乳児ミトコンドリア病が最も多く 88 例、次いで Leigh 脳症、脳筋症、肝症、心筋症、神経変性疾患と続き、突然死が 53 例、腸症、その他と極めて多岐にわたっていた。210 例についてミトコンドリア遺伝子解析を行い、既知・未知を合わせて病因と考えられる遺伝子変異を 59 例（28%）に同定した。つまり 7 割の MRCD は核遺伝子異常と考えられた。142 例についてエキソーム解析が終了し、まず 25 例で既知の原因遺伝子における新規変異を同定した。これらの中には、いずれも日本人初例となる、*BOLA3*, *ACAD9*, *EFTu* 異常患者等が含まれる。次いで 10 例でミトコンドリア局在の未報告遺伝子における変異を同定した。最後に 52 例で上記に当てはまらない新規原因遺伝子候補を同定した。

研究協力者

荒尾 正人（埼玉医科大学小児科）

A．研究目的

前段ではピルビン酸ナトリウムを投与した難治性ミトコンドリア病4症例の経過を報告する。次いで後段ではミトコンドリア病に対する酵素診断に始まる系統的病因探索システムの構築について報告する。

B．研究方法

【対象】ピルビン酸ナトリウムは以下の3症例に投与した。易感染性と発達遅滞を主訴に1歳前に発病した、3243A>G変異を持つMELAS/Leighオーバーラップ症候群男児、1歳前に退行で発病しG14439A（ND 6:P to S）変異を持つLeigh脳症の女児。胎児期から脳質拡大を指摘されていたPDHCE1 遺伝子に8塩基挿入変異を持つLeigh脳症の女児。3歳時に言語発達遅滞を指摘され、6歳児にけいれん群発で発症した14453A>G変異を持つMELASの8歳の女児。

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

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

系統的病因解析システムは以下の項目から成る。  
1) Blue Native 電気泳動を用いたWestern Blotとin gel enzyme stain、およびin vitro酵素アッセイ

を用いた呼吸鎖酵素複合体蛋白レベルの解析。2) サンガーシーケンス法や次世代シーケンス法によるミトコンドリアDNA全周塩基配列の解析。3) ミトコンドリアDNA枯渇症候群（mitochondrial DNA depletion syndrome: MTDPS）疑い例については、定量的PCR（qPCR）による診断確定後、サンガーシーケンス法による頻度の高い11種類の原因遺伝子解析。4) 以上で病因が判明しない症例に対する次世代シーケンス法を用いた全エキソーム解析。  
（倫理面への配慮）

本研究の患者解析の部分は申請番号 482（現在更新されて 482-IX）で埼玉医科大学倫理委員会における審査を受け承認を得て行った。遺伝子解析研究についてはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）および、医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン（日本医学会 2011 年 2 月）に基づいて行い、さらにこれとは別に各研究機関の倫理審査委員会において承認を得て行った。

C．研究結果

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

現在までのところ、399 家系 403 例を MRCD と診断した。臨床診断では乳児ミトコンドリア病が最も多



く88例、次いでLeigh脳症、脳筋症、肝症、心筋症、神経変性疾患と続き、突然死が53例、腸症、その他と極めて多岐にわたっていた。

210例についてミトコンドリア遺伝子解析を行い、既知・未知を合わせて病因と考えられる遺伝子変異を59例(28%)に同定した。つまり7割のMRCDは核遺伝子異常と考えられた。

142例についてエキソーム解析が終了し、まず25例で既知の原因遺伝子における新規変異を同定した。これらの中には、いずれも日本人初例となる、*BOLA3*, *ACAD9*, *EFTu*異常患者等が含まれる。次いで10例でミトコンドリア局在の未報告遺伝子における変異を同定した。最後に52例で上記に当てはまらない新規原因遺伝子候補を同定した。

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

#### D. 考察

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

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

#### E. 結論

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

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kondo H, Tanda K, Tabata C, Hayashi K, Kihsara M, Kizaki Z, Taniguchi-Ikeda M, Mori M, Murayama K, Ohtake A: Leigh syndrome with Fukuyama congenital muscular dystrophy: A case report. *Brain Dev* 36(8): 730-3, 2014. doi: 10.1016/j.braindev.2013.09.005. Epub 2013 Oct 7.
- 2) Yamazaki T, Murayama K, Compton AG, Sugiana C, Harashima H, Amemiya S, Ajima M, Tsuruoka T, Fujinami A, Kawachi E, Kurashige Y, Matsushita K, Wakiguchi H, Mori M, Iwasa H, Okazaki Y, Thorburn DR, Ohtake A: Molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: Focusing on mitochondrial DNA depletion syndrome. *Pediatr Int* 56(2):180-187, 2014. doi: 10.1111/ped.12249. Epub 2014 Mar 6.
- 3) Ohtake A, Murayama K, Mori M, Harashima H, Yamazaki T, Tamaru S, Yamashita Y, Kishita Y, Nakachi Y, Kohda M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Okazaki Y: Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders: exome sequencing for disease gene identification. *Biochim Biophys Acta* 1840(4):1355-1359, 2014. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.01.025. Epub 2014 Jan 24.

- 4) Nagasaka H, Tsukahara H, Okano Y, Hirano K, Sakurai T, Hui S-P, Ohura T, Usui H, Yorifuji T, Hirayama S, Ohtake A, Miida T: Changes of lipoproteins in phenylalanine hydroxylase-deficient children during the first year of life. *Clin Chim Acta* 433:1-4, 2014. doi: 10.1016/j.cca.2014.02.020. Epub 2014 Mar 5.
- 5) Saitsu H, Tohyama J, Walsh T, Kato M, Kobayashi Y, Lee M, Tsurusaki Y, Miyake N, Goto Y, Nishino I, Ohtake A, King M-C, Matsumoto N: A girl with West syndrome and autistic features harboring a de novo TBL1XR1 mutation. *J Hum Genet* 59(10):581-3, 2014. doi: 10.1038/jhg.2014.71. Epub 2014 Aug 7.
- 6) Fukao T, Akiba K, Goto M, Kuwayama N, Morita M, Hori T, Aoyama Y, Venkatesan R, Wierenga R, Moriyama Y, Hashimoto T, Usuda N, Murayama K, Ohtake A, Hasegawa Y, Shigematsu Y, Hasegawa Y: The first case in Asia of 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency (HSD10 disease) with atypical presentation. *J Hum Genet* 59(11): 609-14, 2014. doi: 10.1038/jhg.2014.79. Epub 2014 Sep 18.
- 7) Uehara N, Mori M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Tamaru S, Kohda M, Moriyama Y, Nakachi Y, Matoban N, Sakai T, Yamazaki T, Harashima H, Murayama K, Hattori K, Hayashi J, Yamagata T, Fujita Y, Ito M, Tanaka M, Nibu K, Ohtake A, Okazaki Y: New *MT-ND6* and *NDUFA1* mutations in mitochondrial respiratory chain disorders. *Ann Clin Transl Neurol* 1(5):361-9, 2014. doi: 10.1002/acn3.59. Epub 2014 Apr 28. PMID: 25356405 [PubMed]
- 8) Izumi Y, Musha I, Suzuki E, Iso M, Jinno T, Horikawa R, Amemiya S, Ogata T, Fukami M, Ohtake A: Hypogonadotropic Hypogonadism in a Female Patient Previously Diagnosed as Having Waardenburg Syndrome Due to a *SOX10* Mutation. *Endocrine*. 2014 Oct 2. [Epub ahead of print]
- 9) Kopajtich R, Nicholls TJ, Rorbach J, Metodiev M D, Freisinger P, Mandel H, Vanlander A, Ghezzi D, Carozzo R, Taylor RW, Marquard K, Murayama K, Wieland T, Schwarzmayr T, Mayr JA, Pearce SF, Powell CA, Saada A, Ohtake A, Invernizzi F, Lamantea E, Sommerville EW, Pyle A, Chinnery PF, Crushell E, Okazaki Y, Kohda M, Kishita Y, Tokuzawa Y, Assouline Z, Rio M, Feillet F, de Camaret BM, Chretien D, Munnich A, Menten B, Sante T, Smet J, Régal L, Lorber A, Khoury A, Zeviani M, Strom TM, Meitinger T, Bertini ES, Van Coster R, Klopstock T, Rötig A, Haack TB, Minczuk M, Prokisch H: Mutations in *GTPBP3* cause a mitochondrial translation defect associated with hypertrophic cardiomyopathy, lactic acidosis and encephalopathy. *Am J Hum Genet* 95(6):708-20, 2014. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.10.017. Epub 2014 Nov 26.
- 10) Montassir H, Maegaki Y, Murayama K, Yamazaki T, Kohda M, Ohtake A, Iwasa H, Yatsuka Y, Okazaki Y, Sugiura C, Nagata I, Toyoshima M, Saito Y, Itoh M, Nishino I, Ohno K: Myocerebrohepat

- opathy spectrum disorder due to *POLG* mutations: A clinicopathological report. *Brain Dev.* 2014 Nov 18. pii: S0387-7604(14)00261-7. doi: 10.1016/j.braindev.2014.10.013. [Epub ahead of print]
- 11) Akatsuka J, Mochizuki M, Musha I, Ohtake A, Kobayashi K, Kikuchi T, Kikuchi N, Kawamura T, Urakami T, Sugihara S, Hoshino T, Amemiya S: The Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes: The ratio of glycated albumin to hemoglobin A1c measured in IFCC units accurately represents the glycation gap. *Endocr J* 62(2): 161-172, 2015. 2014 Nov 2. [Epub ahead of print]
- 12) Nozaki F, Kumada T, Kusunoki T, Fujii T, Murayama K, Ohtake A: Fever of Unknown Origin as the Initial Manifestation of Valproate-Induced Fanconi Syndrome. *Pediatr Neurol* 51(6): 846-849, 2014. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2014.09.007. Epub 2014 Sep 21.
- 13) Brea-Calvo G, Tobias B Haack, Karall D, Ohtake A, Invernizzi F, Carozzo R, Kremer L, Dusi S, Fauth C, Scholl-Bürgi S, Graf E, Ahting U, Resta N, Laforgia N, Verrigni D, Okazaki Y, Kohda M, Martinelli D, Freisinger P, Strom TM, Meitinger T, Lamperti C, Lacson A, Navas P, Mayr JA, Bertini E, Murayama K, Zeviani M, Prokisch H, Ghezzi D: COQ4 mutations cause a broad spectrum of mitochondrial disorders associated with CoQ10 deficiency. *Am J Hum Genet* 96: 309-317, 2015. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.12.023. Epub 2014 Dec.
- 14) Shimbo H, Takagi, M, Okuda M, Tsuyusaki Y, Takano K, Iai M, Yamashita S, Murayama K, Ohtake A, Goto Y, Aida N, Osaka H: A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome. *Mol Genet Metab* in press, 2015.
- 15) Haack T, Jackson C, Murayama K, Kremer L, Schaller A, Kotzaeridou U, de Vries M, Schottmann G, Santra S, Büchner B, Wieland T, Graf E, Freisinger P, Eggimann S, Ohtake A, Okazaki Y, Kohda M, Kishita Y, Tokuzawa Y, Sauer S, Memari Y, Kolb-Kokocinski A, Durbin R, Hasselmann O, Cremer K, Albrecht B, Wieczorek D, Engels H, Hahn D, Zink A, Alston C, Taylor R, Rodenburg R, Trollmann R, Sperl W, Strom T, Hoffmann G, Mayr J, Meitinger T, Bolognini R, Schuelke M, Nuffer J-M, Kölker S, Prokisch H, Klopstock T: Deficiency of multifunctional ECHS1 causes mitochondrial encephalomyopathy. *Ann Clin Transl Neurol*, in press, 2015.
- 16) Abe Y, Terashima H, Hoshino H, Sassa K, Sakai T, Ohtake A, Kubota M, Yamanouchi H: Characteristic MRI features of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Brain Dev.* 2015 Feb 13. pii: S0387-7604(15)00022-4. doi: 10.1016/j.braindev.2015.01.006. [Epub ahead of print]

## 2.学会発表

以下の患者会フォーラムの実施

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

G . 知的財産権の出願・登録状況

特になし

ミトコンドリア機能とヘッジホッグシグナルに関する研究

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。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、細胞エネルギーを用いて細胞を増殖に導く。ミトコンドリアによるエネルギー産生が潤滑に行われるためのヘッジホッグシグナルが正しく機能することが必要だが、その機序はまだ不明な点が多い。我々は線維芽細胞を用いた実験において、血清飢餓時にリガンドを添加することで最もシグナルが増強されることを見出した。これらは根本的治療のないミトコンドリア病における病態機序を明らかにするとともに治療開発を目指すものである。

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、ミトコンドリアによるエネルギー供給を必要とする。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の有無およびligandであるヘッジホッグ刺激の有無で、下流のGLI 1の発現量の変化をRT-PCRで定量化した。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

コントロールと比較してヘッジホッグ受容体であるPTCH1変異をもつ線維芽細胞ではその最下流であるGli1ならびにSmo mRNAが亢進していた。このGli mRNAはヘッジホッグリガンド添加により増加し、加えて血清飢餓状態にすると相乗的に増加した。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を用いたバ

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。これらは小脳および骨でシグナル亢進に参与していると考えられた。

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に必須な経路であり、細胞が血清飢餓状態になり、さらにリガンドが加わった時に相乗的に増大することが示された。これらはエネルギー産生には複数の条件が必要であることを示唆しており、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  
なし

2. 学会発表

Mizuochi H, Fujii K et al. Hedgehog signaling is enhanced by nutritional deprivation in human fibroblasts of Gorlin syndrome. Hedgehog Meeting (2015.8.5-7, Ann Arbor, US A)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）  
分担研究報告書

ミトコンドリア脳筋症に合併する高乳酸血症のピルビン酸ナトリウム  
による治療薬開発についての研究

研究分担者 但馬 剛 広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学 講師

研究要旨

ミトコンドリア脳筋症患者に対し、ピルビン酸ナトリウム治療の臨床研究を行っていたが、現在中断中である。治療によるメリットを実感できるような適応症例（疾患）をどう選択するかが重要となる。また、剤形・量の改善によりアドヒアランスの向上が期待できると考えられる。

研究協力者

石川 暢恒（広島大学病院小児科 助教）

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、临床上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

本年度は2例（CPEO、Leigh脳症）継続中でスタートしたが、臨床症状の改善に乏しく、内服負担感が増大したため、本人・家族の申し出により中断となった。

D．考察

CPEO、Leigh脳症ともに微細な改善効果または症状進行抑制効果はあった可能性はあるが、本人・家族の内服負担感の方が大きかった。内服し易い剤形・量であれば、アドヒアランスの改善が期待でき、症状改善に繋がる可能性はある。

E．結論

適応症例（疾患）の選択、剤形・量の改善が望まれる。

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

1. 特許取得  
無し  
2. 実用新案登録  
無し  
3. その他  
無し

ミトコンドリア脳筋症の臨床的研究と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 ] 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 NPMDS と Gross Motor Function Measure (GMFM)を併用して、4名の寝たきり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。本年度はその結果を論文発表した。ピルビン酸治療の効果の評価する適切なバイオマーカーがない点が課題として残った。今回、4名のうち長期的にピルビン酸治療が有効であった1名で、新たなバイオマーカーである FGF-21 と GDF-15 の測定を行った。[ 方法 ] 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例の寝たきりのミトコンドリア病患者を、GMFM 評価の出来なかった1例を除き、全例 NPMDS と GMFM 両者で臨床効果の評価した。そのうち1例のピルビン酸治療が有効かつ持続しているリー脳症患者の血清中の FGF-21 と GDF-15 の測定を行った。[ 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。ピルビン酸治療を続行し、効果も持続しているリー脳症候群患者の血清 FGF-21 は 117.5 pg/ml (< 281.0), GDF-15 は 645.9 pg/ml (< 707.4)であった。[ 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の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が持続的に有効であった1例の FGF-21, GDF-15 は正常範囲であった。今後治療前後のデータの動きの解析も必要である。

A. 研究目的

ピルビン酸ナトリウム治療の臨床効果の評価するため昨年度の研究で、Gross Motor Function Measure (GMFM)とNewcastle Pediatric Mitochondrial Disease Scale (NPMDS)との併用で評価し、ピルビン酸治療の有用性を4例の寝たきりのミトコンドリア病患者で検討した。今回、この結果をさらに検討して論文化すると共に、ピルビン酸治療の有効性と持続性の高かった1例で新たなバイオマーカーである FGF-21 と GDF-15 の測定を行った。

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。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。ピルビン酸治療の長期効果があった例の血清 FGF-21 と GDF-15 を測定した。

[ 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、ピルビン酸ナトリウム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例の治療効果は前回報告書通りであるが下記に再掲する。

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ヶ月でピルビン酸ナトリウム治療を開始したが、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例に慢性的下痢があった以外，明確な副作用は認めなかった．

これら4例の患者でピルビン酸治療効果と血中乳酸値との間に明確な関連が示されず，乳酸以外のバイオマーカーの必要性が課題となった．そのため，preliminaryなデータとして，ピルビン酸治療に最も反応し，かつ持続の長かった症例1 (m.8993 T>G, Leigh症候群)の血清FGF-21とGDF-15を測定した．その結果，FGF-21は117.5 pg/ml (< 281.0)，GDF-15は645.9 pg/ml (< 707.4)といずれも低値であった．同時測定した血中乳酸，ピルビン酸はそれぞれ13.1 mg/dl，0.92 mg/dlでいずれも正常であった．ピルビン酸治療中のこの患者に於いては，乳酸値と同様にFGF-21もGDF-15も正常であった．

#### 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．昨年度の研究で，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．

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．この1例に於いて，乳酸より感度，特異度ともに高いとされるバイオマーカー，FGF-21とGDF-15を測定したところ，いずれも正常範囲であった．このことが，ピルビン酸治療効果をこれらのマーカーが示している可能性はあるが，この1例だけ，しかも治療中のデータだけでは結論づけることは不能である．今後，より多くの患者のピルビン酸治療の長期臨床効果を検討するとともに，治療前後の新たなバイオマーカーの動きを検討することにより，生化学的にも効果判定をすることは重要な課題である．

#### 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．また，長期的効果があった症例と短期的に終わった症例で，バイオマーカーの動きにどのような違いがあるかの検討が今後の課題である．少なくとも長期的に有効であった1例ではFGF-21，GDF-15は両者とも正常であった．

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Fujii T., Nozaki F, Saito K et al. Efficacy of pyruvate therapy in patients with mitochondrial disease: A semi-quantitative clinical evaluation study. *Molec Genet Metabol* 2014;112:133-138.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

FGF-21およびGDF-15は久留米大学小児科の八ッ賀秀一先生に測定を依頼した

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

ミトコンドリア病モデル細胞を用いて、乳酸存在下とピルビン酸存在下における網羅的遺伝子発現を比較し、乳酸存在下で発現が顕著に上昇する遺伝子群を同定し、その中から、細胞外に分泌される蛋白質を選択した。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であることが明らかになった。既存の抗体を用いて Parkin-Elmer 社の $\alpha$ LISA 法を約 1000 人の高齢者の血清中の GDF15 濃度を測定した。さらに、新たに GDF15 に対するモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を製造し、ELISA 法に基づいた体外診断薬キットを試作した。

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。既存の抗体を用いてP arklin-Elmer社の $\alpha$ LISA法を約1000人の高齢者の血清中のGDF15濃度を測定した。さらに、新たにGDF15に対するモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を製造し、ELISA法に基づいた体外診断薬キットを試作した。

## 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

血清中のGDF15を測定する体外診断薬キットを開発し、性能試験を実施している。ピルビン酸投与開始後3ヶ月で、ミトコンドリア病重症度スコア(JMDRS, NMDAS)の改善とともにGDF15レベルの低下が観察されている。ピルビン酸ナトリウムの第a相臨床試験において、症状の改善と同時にGDF15値の低下が観察されるかどうかを検証する。

### 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GDF15がミトコンドリア病の診断と重症度評価に有用なサロゲート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

Yasunori Fujita, Masafumi Ito, Toshio Kojima, Shuichi Yatsuga, Yasutoshi Koga, Masashi Tanaka: GDF15 is a novel biomarker to evaluate efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial

diseases. *Mitochondrion* 20:34-42,2015.

### 2. 学会発表

M. Tanaka, Y Fujita, M Ito, T Kojima, S Yatsuga, Y Koga: GDF15 is a novel biomarker to evaluate efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. Mitochondrial and Fetal Medicine 9th International Symposium of Genomic Medicine 2014, Changhua Christian Hospital, Taiwan, November 15-16, 2014

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

田中雅嗣、伊藤雅史、藤田泰典、古賀靖敏：ミトコンドリア病診断用バイオマーカーとしてのGDF15 国際特許出願 (PCT)

出願番号 PCT/JP2015/050833

発明の名称 ミトコンドリア病診断用バイオマーカーとしてのGDF15

出願日 2015年(平成27年)1月15日

国内移行期限 2016年(平成28年)7月15日

[優先権情報]

(1) P14019TAN, JP2014-223500, 2014.10.31

(2) P13027TAN, JP2014-005391, 2014.01.15

### 2. 日本国特許出願

出願番号 特願2014-223500

発明の名称 ミトコンドリア病診断用バイオマーカーとしてのGDF15

出願日 2014年(平成26年)10月31日

[優先権情報]

P13027TAN, JP2014-005391, 2014.01.15

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



シトリン欠損症の病態解明

1. シトリン欠損症患者の血漿グリセロール
2. モデルマウスの病態における肝 glycerol 3-phosphate と ATP の重要性

研究分担者 佐伯 武頼 熊本大学生命資源研究・支援センター山村プロジェクト研究室・特任教授  
共同研究者 藤本侑希、古家澄江、山村研一  
熊本大学生命資源研究・支援センター山村プロジェクト研究室

研究要旨

若干のシトリン欠損症患者の尿中グリセロールと glycerol 3-phosphate (G3P)濃度を測定した結果、1歳から9歳までの患者で対照者に比し、有意に高値を示す結果を得た。

また、モデルマウスを用い、成人発症II型シトリン血症(CTLN2)の発症誘因である糖質(ショ糖)、エタノール、およびグリセロールの自由摂取による忌避現象の解析とそれに伴う肝内代謝物の解析を行い、忌避行動には肝内 G3P 上昇と ATP 低下の二つの代謝変動が同時に観察されることを見出した。

A. 研究目的

本研究の目的は、ミトコンドリア膜輸送体である肝型aspartate glutamate carrier(シトリンcitrin)の欠損によって生じる、成人発症II型シトリン血症(CTLN2)、新生児肝内胆汁うっ滞症(NICCD)、およびその他のシトリン欠損による多様な病態を明らかにし、新たな診断法を開発し、ピルビン酸ナトリウムなどの治療薬の効果を簡便に判断できるようにすること、および新たな治療薬の開発のシーズを見出すことである。

B. 研究方法

以上の目的に従い、本年度は次の2つの研究テーマを実行した。

1. シトリン欠損症患者尿中のグリセロールとG3Pの定量

昨年度モデルマウスを用い明らかにした尿中へのグリセロールおよびG3Pの排泄の増加を若干のシトリン欠損症患者において検討した。日本国内および中国において遺伝子解析によって、シトリン欠損症(CTLN2、NICCD)と診断された患者およびほぼ同年齢の対照者から尿を採取し、酵素法を用いてグリセロールとG3P濃度を定量<sup>1)</sup>し、クレアチニン(酵素法によるキット使用)比で表記し、比較検討した。また年齢による差が大きいことから9ヶ月まで、1歳から9歳まで、10歳以上の3群に分け、対照群と比較検討した。尿の採取については以下の主治医・研究者に研究協力を得た(敬称略)。矢崎正英(信州大学)、岡野善行(おかのこどもクリニック)、坂本修(東北大学)、張春花(MILSインターナショナル)、Song, Yuan-Zong(中国 Jinan University)、三淵浩(熊本大学)。

2. モデルマウスの糖質などの忌避行動と肝中代謝物変動との関連性

CTLN2の発症誘引となる糖(本実験ではショ糖を使用)、エタノール、グリセロールの自由摂取による忌避行動の解析とそれに伴う肝内代謝物の変動から忌避行動に関連して変動すると考えられる物質を明らかにすることを試みた。

飲用実験は、2本のボトルに水と各種濃度の試験溶液を入れ、どちらでも自由に摂取できるようにして、2日間テストし、1日の摂取量を重量(g/25g体重)で表し、また水と試験溶液摂取量中における試験溶液摂取量の比率からpreferenceを計算した。また、胃管を通じて各種濃度の溶液を強制的に投与し、1時間後にfreeze-3%過塩素酸抽出液作成・中和し、肝代謝物の解析を行った。G3P、クエン酸は酵素法<sup>2,3)</sup>、アミノ酸はEZfaast・LC/MSを用いる方法(Phenomenex Ltd., Los Angeles, USA)、ATPはLC法<sup>4)</sup>で定量した。

(倫理面への配慮)

尿の解析に関しては熊本大学大学院生命科学研究部長に、「シトリン欠損症の新しい化学診断法の確立：尿中グリセロールの診断的価値」の題で臨床研究・医療技術承認申請を行い、また、多施設共同研究実施計画書を提出し、承認(先進第1652号)を得た。マウスの研究に関しては熊本大学長に動物実験計画書を提出し、承認(B25-147)を得た。

C. 研究結果

1. シトリン欠損症患者尿中のグリセロールとG3Pの定量

昨年度報告のようにシトリン欠損症モデルマウスにおいては尿中にグリセロールおよびG3Pが他の遺伝子型マウスに比し、有意に増加することから、若干のシトリン欠損症患者群と対照群で比較した。年齢によって尿グリセロールとG3Pの値が大きく変動することから年齢から3群に分け、比較検討した。結果は、Fig. 1に示す。値のばらつきが大きいことか

ら箱ひげ図で示し、Mann-Whitney U testで有意差検定を行った。1歳から9歳のグループで尿グリセロールおよびG3Pともに患者グループで有意に高値を示したが、その他の群では有意差は得られなかった。

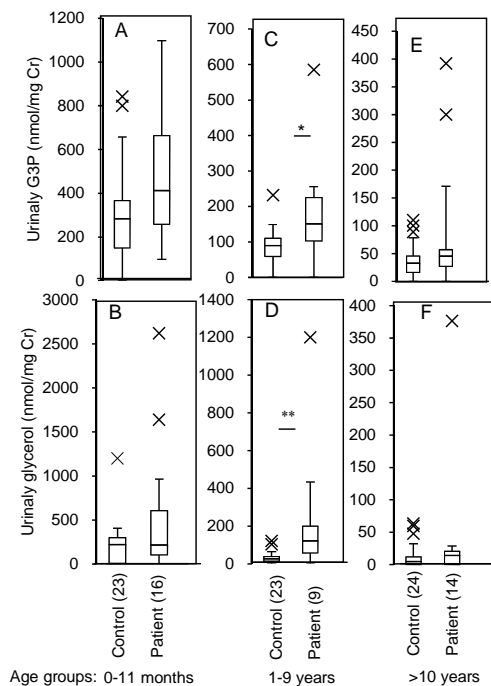


Fig. 1. Urine G3P (A, C and E) and glycerol (B, D and F) levels in controls versus patients with citrin deficiency by age. All subjects were divided into three age categories: 0-11 months (A and B), 1-9 years (C and D) and greater than 10 years (E and F). The data for control subjects and citrin deficient patients are shown as box-and-whisker plots (outlier values are shown as an 'X'), with the number of samples examined per age category being shown in parentheses. Significant differences between controls and patients within each age category were evaluated by the Mann-Whitney U test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

## 2. モデルマウスの糖質などの忌避行動と肝中代謝物変動との関連性

糖質、アルコールおよびグリセロールはCTLN2の発症誘因である。そこで、4種のモデルマウス、野生型 (wt)、シトリン欠損 (Ctrn-KO)、mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase欠損 (mGPD-KO)、およびCtrn/mGPD double-KOマウスを用い、各種濃度の糖 (ショ糖)、エタノール、グリセロール溶液の自由摂取量とpreferenceを計算した。Fig. 2にショ糖摂取、Fig. 3にエタノールとグリセロール摂取に関する結果を示す。ショ糖はエネルギー源で甘みを持つことからマウスにおいても嗜好性は高く、wt、Ctrn-KOおよびmGPD-KOマウスにおいて高濃度のショ糖摂取を好み、摂取量も多く、preferenceもほぼ100%を示す。しかし、double-KOマウスにおいては低濃度からの摂取量は増えず、20%濃度ではむしろ5%濃度よりも摂取量も、preferenceも低下し摂取忌避を起こしていると考えられる。一方、エタノール

とグリセロールに関しては、Fig. 3に示すように、double-KOのみならずmGPD-KOマウスも低濃度から摂取量が低下したが、Ctrn-KOマウスも高濃度では摂取量低下を示した。Preferenceについてもほぼ同様の結果となった。ここで他のマウスより有意に摂取量、preferenceが低い場合、および最少濃度の摂取量、preferenceが有意に低下した場合を忌避度それぞれ1として得点2以上 (最大4点) を忌避行動があると定義した。

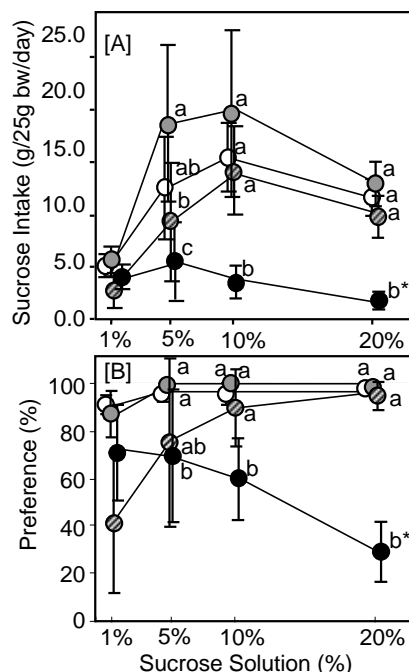


Fig. 2. Intake [A] and preference [B] for varied concentrations of a sucrose solution.

Mice were provided two bottles, one containing water, and the other containing either a 1, 5, 10 or 20% sucrose solution. [A] Intake of each mouse was determined by weighing the bottles each day and averaged over a two-day period. [B] Preference (%) was calculated as  $100 \times (\text{g of test solution}) / [(\text{g of test solution}) + (\text{g of water})]$ . White circles denote wt mice; grey, Ctrn-KO mice; striped circles, mGPD-KO mice; black circle, Ctrn/mGPD double-KO mice. Data on each group of mice are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 6-8$ ). Differences among the mice were evaluated by ANOVA followed by the Tukey-Kramer test. Mean values with the same character are not different at  $p < 0.05$ .

続いて、以上のような忌避行動がどのような機序によって生じるかのヒントを得るため、忌避が起こる濃度溶液の強制的な投与による肝内代謝物の変動を検討した。すでに高濃度 (50%) ショ糖の強制投与によって変動する肝内代謝物は、報告した<sup>5)</sup>ように、G3P、TCAサイクル中間体、シトルリン、グルタミン酸、リジンがある。そこで、各種濃度の溶液の強制投与による代謝物の変動と忌避行動の関連性を検討した。Fig. 4にはG3PとTCAサイクルの代表として測定したクエン酸のデータを示す。肝内G3Pは忌避行動を起こすような溶液濃度においていずれも大きく上

昇したが、wtマウスで忌避行動を起こさない高濃度エタノール投与においても肝内G3P濃度は上昇していた。忌避が起こる条件の溶液濃度で、クエン酸は低下したが、忌避行動が起こらない濃度でも wtマウスやCtn-KOマウスなどで低下を示し、忌避行動との関連性は見られなかった。

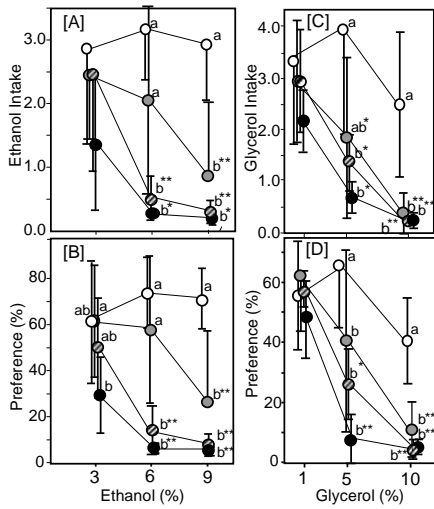


Fig. 3. Intake ([A] and [C]) of and preferences ([B] and [D]) for varied concentrations of glycerol ([A] and [B]) and ethanol ([C] and [D]).

Oral intake and preference of the mice were determined as indicated for Fig. 1. Concentrations of the test solutions are shown. The symbols for each group of mice are as indicated in Fig. 1. Data on each group of mice are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 6-9). Differences among the mice were evaluated by ANOVA followed by the Tukey-Kramer test. Mean values with the same character are not different at  $p < 0.05$ .

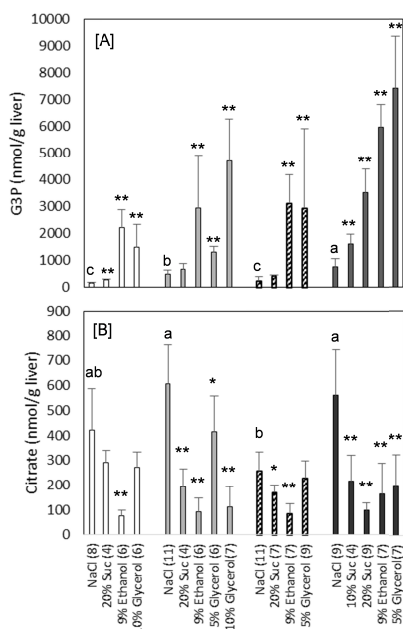


Fig. 4. Changes in the hepatic G3P [A] and citrate [B]

levels following oral administration of various concentrations of sucrose, ethanol or glycerol solutions. One hour after an enteral administration of a test solution (either 0.9 % saline, 20 % or 10% sucrose, 9 % ethanol, or 5% or 10% glycerol) at a standard dose of 20 ml/kg by gastric tube to the fed mice, mice were sacrificed, a neutralized, perchloric acid-extracted liver homogenate was prepared and analyzed as described in Materials and Methods. White column denotes wt mice; grey column, Ctn-KO mice; striped column, mGPD-KO mice; black column, Ctn/mGPD double-KO mice. Mean values with the same character are not different at  $p < 0.05$ . \* and \*\* denote  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively, from the basal levels of each genotype.

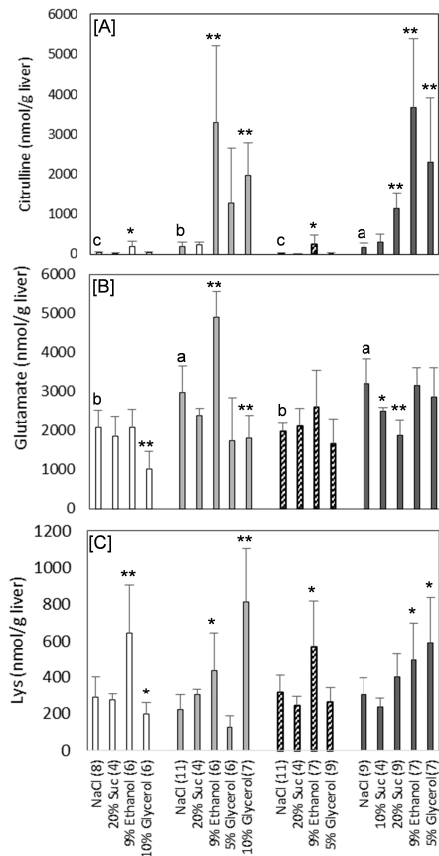


Fig. 5. Changes in the hepatic citrulline, glutamate and lysine (Lys) levels following the oral administration of various concentrations of sucrose, ethanol or glycerol solutions.

The experimental procedures are described in the legend of Fig. 4. The hepatic amino acid levels were determined by liquid chromatography/mass spectrometry, as described in Materials and Methods. Mean values with the same character are not different at  $p < 0.05$ . \* and \*\* denote  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively, from the basal levels of each genotype.

同様にアミノ酸についても、Fig. 5に示すように必ずしも忌避行動との相関では見られなかった。たとえば、シトルリンの上昇は高アンモニア血症との関連性があるが、mGPD-KOマウスでは忌避行動は見ら

れてもシトルリンの上昇はない。

以上から、忌避行動はG3Pレベルとはほぼ一致の傾向が見られたので、複数因子が関与する可能性を考えた。肝ATP低下はショ糖投与下のmGPD-KOマウスでも見られることから当初は本忌避行動との関連性を考えなかったが、複合で関わる可能性を考慮してATPについても検討した。その結果はFig. 6に示すとおりであり、忌避行動を示さないmGPD-KOマウスへのショ糖投与を除いては忌避行動と肝ATP低下はよく相関している。そこで、G3Pのデータと照らし合わせるとG3Pの上昇とATPの低下が同時に起こる条件と忌避行動が観察される条件は一致した (Table 1)。

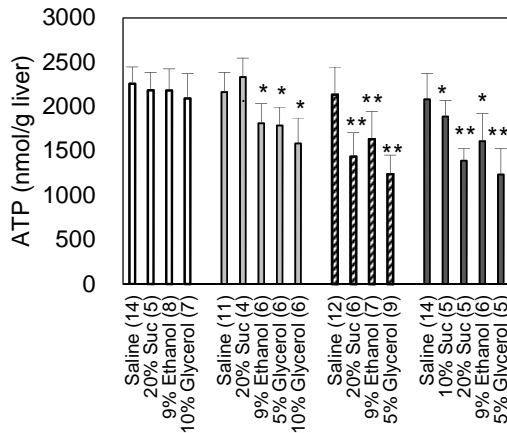


Fig. 6. Changes in the hepatic ATP levels following the oral administration of various concentrations of sucrose, ethanol or glycerol solutions.

The experimental procedures are described in the legend of Fig. 4.. \* and \*\* denote  $p<0.05$  and  $p<0.01$ , respectively, from the basal levels of each genotype.

Table 1. Relation between aversion and metabolite changes in the liver of mice

Treatment	Mouse	Aversion	G3P	ATP
20% Sucrose (4g/kg)	Wt	no	Inc	nc
	Ctrn-KO	no	nc	nc
	mGPD-KO	no	nc	Dec
	Double-KO	Yes	Inc	Dec
9% Ethanol (1.4g/kg)	Wt	no	Inc	nc
	Ctrn-KO	Yes	Inc	Dec
	mGPD-KO	Yes	Inc	Dec
	Double-KO	Yes	Inc	Dec
5% Glycerol (1g/kg)	Wt	no	nc	nc
	Ctrn-KO	Yes	Inc	Dec
	mGPD-KO	Yes	Inc	Dec
	Double-KO	Yes	Inc	Dec
10% Glycerol (2g/kg)	Wt	no	Inc	nc
	Ctrn-KO	Yes	Inc	Dec
	mGPD-KO	Yes	Inc	Dec
	Double-KO	Yes	nt	nt

Dec, decreased; Inc, increased; yes and no, presence (score>2) and absence (score<1) of aversion; nc, not changed; nt, not

tested. Grey highlights indicate coincidence of aversion and the two metabolic changes, and yellow, metabolic changes without aversion.

#### D. 考察

シトルリン欠損症モデルマウスで観察された尿グリセロールおよびG3Pの排泄増加は、シトルリン欠損症患者では1歳から9歳のグループにおいて対照群に比し、有意に上昇していた。しかしその他の年齢では対照群との間に有意な差は得られなかった。この理由は、1歳以下のNICCD患者および成人のCTLN2患者では症状があり、治療を受けているが、1歳以上のNICCD経験者ではほとんど治療を必要とするような症状が見られないことから治療を受けていないことに起因するのかもしれない。また、マウスでは糖質やエタノール投与で血漿グリセロールが上昇した。シトルリン欠損症患者に糖質やエタノールなどのCTLN2発症誘因となる物質の投与は不可能であるが、安全な負荷テスト可能な物質が見いだせれば、有効なシトルリン欠損症診断法になる可能性がある。

マウスにおいてもCTLN2発症誘因となる物質が高濃度の場合、その摂取を忌避することが明らかになった。その機構にはこれら忌避物質の代謝が関与する。ショ糖による忌避行動はショ糖が甘いという味の問題ではないことはサッカリンでは忌避行動が見られない(結果省略)ことからもうかがえる。さらには糖質、エタノールおよびグリセロールはいずれも細胞質にNADHを産生する物質であり、シトルリンの代謝上の役割が細胞質NADH還元当量のミトコンドリアへの輸送にあることからもうなずける。忌避行動が起こる機構について肝内の代謝変動を検討した。その結果、G3P上昇と高い相関性が見られたが、必ずしもその関係は完全には一致しなかった。そこで肝内ATPレベルについても検討した結果、G3Pの上昇とATPの低下が同時に起こる条件では忌避行動が観察されることが明らかになった。これらの代謝変動がどのように忌避行動につながるのかは今後の問題であるが、これらの代謝変動が何らかの経路を経て脳神経系に伝えられるのであろうと想像される。また、このような代謝変動は肝臓ではなく腸管組織内での現象である可能性もある。一方、もし、G3P上昇またはATP低下を防ぐことができるならば、忌避行動を起こさなくすることが考えられる。実際に我々は、ピルビン酸ナトリウムやアラニン、グルタミン酸ナトリウムなどのアミノ酸、またはMCT (中鎖脂肪酸からなるトリグリセリド)が、高糖質食であるAIN-93Mの摂取低下から生じる体重減少を防ぎ、摂取量を増やすこと、ならびに初頭の強制投与による肝内G3Pの上昇を抑制することを観察している。すなわち、以上の2つの代謝変動はシトルリン欠損症悪化状態のマーカーと考えられる。今後はATPレベルへの効果を示す物質の検討・検索が重要と考えている。

#### 文献

- O.H. Wieland, Methods of Enzymatic Analysis, vol. VI, Varlag Chemie, Weinheim, 1984, pp. 504-510.
- G. Lang, Methods of Enzymatic Analysis, vol. VI, Varlag Chemie, Weinheim, 1984, pp. 525-531.
- H. Möllerring, Citrate, Methods of Enzymatic

- Analysis, vol. VII, Verlag Chemie, Weinheim, 1985, pp. 2-12.
4. L.I. Zhou, et al, J Agric Food Chem. 60 (2012) 8994-8999.
  5. T. Saheki, et al, Mol. Genet. Metab. 104 (2011) 492-500.
  6. T. Saheki, et al, Mol. Genet. Metab. 107 (2012) 322-329.

#### E . 結論

シトリン欠損症患者では、尿中グリセロールと glycerol 3-phosphate (G3P)は、有意に高値を示し、バイオマーカーとして有用と考えられた。

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Zhang ZH, Yang ZG, Chen FP, Kikuchi A, Liu ZH, Kuang LZ, Li WM, Song YZ, Kure S, Saheki T, Screening for five prevalent mutations of SLC25A13 gene in Guangdong, China: a molecular epidemiologic survey of citrin deficiency. Tohoku J Exp Med. 2014;233(4):275-281.

##### 2. 学会発表

- 1) Saheki T, Prenary session, History and fundamental basis of the pathophysiology, International Symposium on Citrin Deficiency, Guanzhou, China
- 2) 佐伯武頼 特別講演「シトリン欠損症における特異な食癖とその病因・病態・治療との関連」日本栄養改善学会四国支部学術総会 平成 26 年 5 月 17 日、徳島
- 3) 藤本侑希、矢崎正英、岡野善行、張春花、坂本修、Yuan-Song Song、三淵浩、遠藤文夫、山村研一、佐伯武頼、シトリン欠損症新規病態マーカーの探索、第 56 回日本先天代謝異常学会・第 12 回アジア先天代謝異常症シンポジウム、平成 26 年 11 月 13 日 15 日、仙台
- 4) 森山光章、藤本侑希、牛飼美晴、堀内正久、高野 桂、中村洋一、佐伯武頼、シトリン欠損症モデルマウス灌流肝アミノ酸および TCA サイクル中間体代謝に対する糖質負荷の効果、第 56 回日本先天代謝異常学会・第 12 回アジア先天代謝異常症シンポジウム、平成 26 年 11 月 13 日 15 日、仙台
- 5) 佐伯武頼、藤本侑希、古家澄江、山村研一、シトリン欠損症の病態解析と治療法の開発：現在の課題、第 56 回日本先天代謝異常学会・第 12 回アジア先天代謝異常症シンポジウム、平成 26 年 11 月 13 日 15 日、仙台
- 6) Saheki T, Fujimoto Y, Furuie S, Yamamura K, Metabolic basis of carbohydrate toxicity in citrin, liver-type mitochondrial aspartate glutamate carrier, deficiency, Asia Europe

Workshop on Inborn Error of Metabolism (AEWIEM) 2015, January 18-19, 2015, Cairo, Egypt.

#### G . 知的財産権の出願・登録状況

- なし
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  
難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）  
分担研究報告書

分担研究課題：バイオマーカー研究

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機能のバイオマーカーとなる代謝産物を尿中・血中に発見できないか、質量分析を用いて検討する。今回、gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) を用いて、ミトコンドリア脳筋症 (MELAS) を中心にシトリン欠損症などミトコンドリア機能障害を疑われる患者の尿中有機酸分析を行い、TCA 回路関連代謝産物の排泄について検討した。

患者の尿では正常コントロールに比べて、特に 4-ヒドロキシフェニル乳酸 (PHPLA) の排泄増加が明らかであった。継時的に分析を行った症例では持続的に排泄増加を認めており、ミトコンドリア機能障害のマーカーになりうるかもしれない。グリセロール 3 リン酸 (G3P) も検討したが、昨年と同様、MELAS 患者での上昇はほとんど認められなかった。

また、尿中有機酸分析の異常代謝産物の排泄パターンからビタミン B1 欠乏と考えられた 3 か月女児で、母体もビタミン B1 欠乏が明らかだったにもかかわらず、ビタミン B1 投与で児の代謝プロファイルに変化がなく、後に家族内に 2 人の MELAS 患者が発見された症例を経験した。ビタミン B1 が補酵素として働く酵素は TCA 回路に関わる酵素でもあり、尿中有機酸分析の代謝プロファイルから MELAS の診断につながる可能性が示唆された。

研究協力者

長谷川(小村)有紀 (島根大学小児科助教)

A. 研究目的

ミトコンドリアの呼吸鎖では、β 酸化系や解糖系・TCA 回路から供給される  $\text{NADH}_2^+$  や  $\text{FADH}_2$  が酸化される際に放出する電子を伝達している。ミトコンドリア機能低下により高乳酸血症になると、これらの回路に供給される  $\text{NAD}^+$  が枯渇し、最終的に  $\text{NADH}_2^+$  や  $\text{FADH}_2$  の供給が障害される。主に MELAS 患者の尿を用いてこれら  $\text{NADH}_2^+$  や  $\text{FADH}_2$  の酸化還元反応の場である TCA 回路の代謝産物を測定し、動態を検討するために質量

分析を行った。

B. 研究方法

尿中有機酸分析による TCA 回路関連成分の測定  
ミトコンドリア脳筋症 (MELAS) 患者などミトコンドリア機能低下を疑われた患者について、GC/MS を用いた尿中有機酸分析から TCA 回路関連成分の排泄量を測定した。尿中有機酸分析は 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、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、アコニット酸、クエン酸、イソクエン酸などをいずれも検出・同定できる。特に  $\text{NADH}_2^+$  や  $\text{FADH}_2$  を生成する過程の前後にあるイソクエン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸(2KG)、コハク酸、リンゴ



酸の値に注目した（図 1）。またミトコンドリア機能低下と関連するとされるチロシン代謝産物の 4-ヒドロキシフェニル乳酸（PHPLA）についても検討した。また健常コントロールと比較し、どんな代謝産物の排泄が高いかも検討した。

（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。

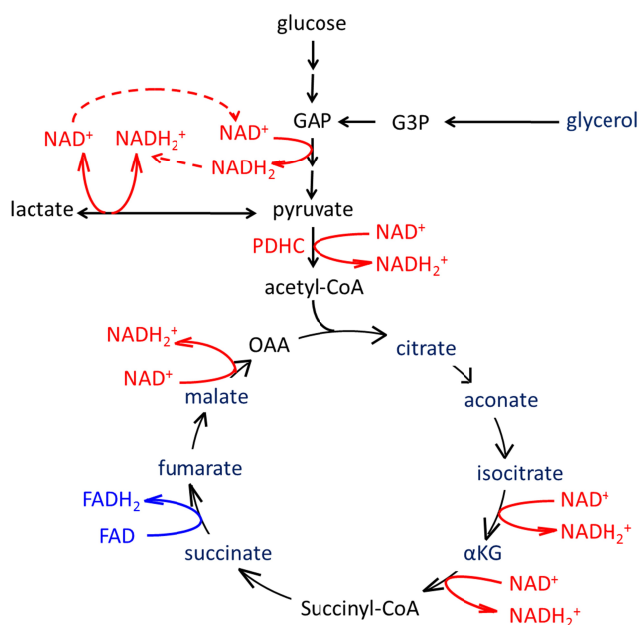


図 1：解糖系・TCA 回路と NADH<sub>2</sub><sup>+</sup>、FADH<sub>2</sub> 産生

### C. 研究結果

1) 尿中有機酸分析による TCA 回路関連成分の測定（図 2）

学童から成人の MELAS 患者 4 名（患者 A～D）、シトリン欠損症 1 名（患者 E）、家族内に MELAS 患者のいる高乳酸血症を示す女兒（患者 F）で尿中有機酸分析を行った。TCA サイクル代謝産物は健常コントロールと比べ、MELAS 患者と患者 F でイソクエン酸、2KG、コハク酸の排泄が多く、シトリン欠損症はコントロールとほぼ変わらなかった。患者 F についてはさらにフマル酸とリンゴ酸の排泄増加が明らかであった。

PHPLA の排泄は、患者 C を除く全員で健常コントロールに比べて強い上昇を示していた。特に

継続的な分析が行えた患者 E と F では、持続的な排泄増加を認め、これはピルビン酸の内服前後で変化しなかった。

グリセロール、グリセロール-3-リン酸（G3P）についても検討したが、排泄が認められたのは MELAS 患者 1 名とシトリン欠損症患者のみであり、今回も G3P の排泄増加は認められなかった。

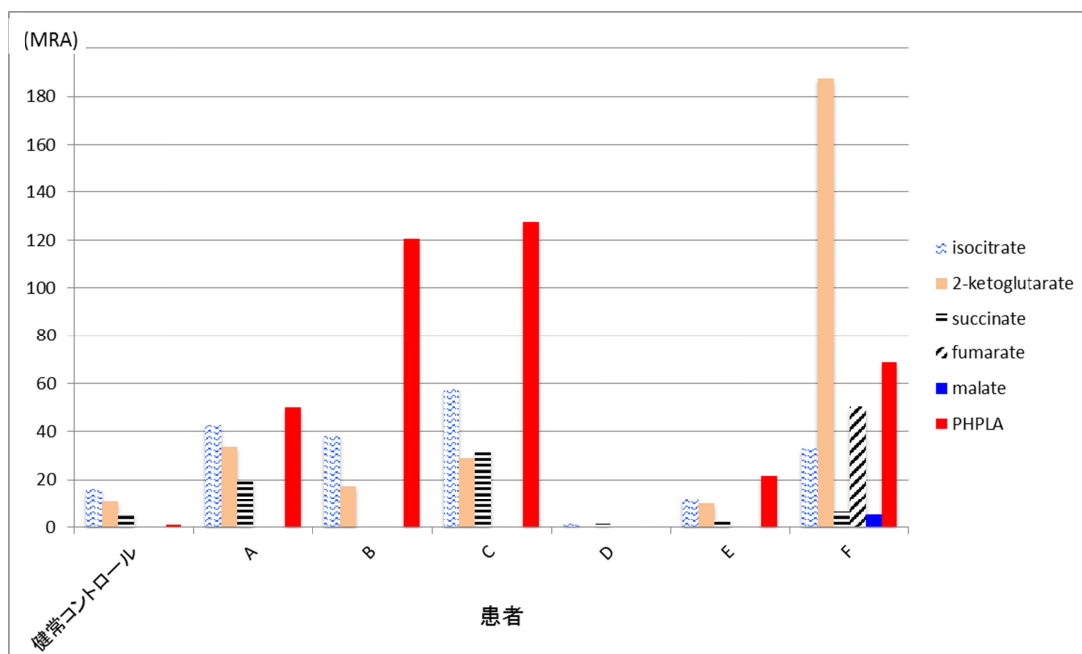


図 2 : MELAS 患者 (A~D)、シトリン欠損症患者 (E)、高乳酸血症を示す乳児 (F) と、TCA 回路関連成分・PHPLA の排泄量

## 2) 家族内に 2 人の MELAS 患者が発見された 3 か月女児例

今回の研究中に、高乳酸血症を示す 3 か月女児 (患者 F) を経験した。女児の代謝プロファイルは、乳酸、ピルビン酸の排泄増加とともに、分枝鎖アミノ酸代謝産物である  $\alpha$ -ケト酸 (2-ケトイソカプロン酸、2-ケト-3-メチル吉草酸) や 2-ケトグルタル酸、2-ヒドロキシグルタル酸、2-ケトアジピン酸、2-ヒドロキシアジピン酸などの排泄増加が認められた。これらの排泄は ピルビン酸脱水素酵素複合体、 $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素複合体、分枝鎖アミノ酸脱水素酵素複合体が同時に障害される場合、すなわちビタミン B1 欠乏や E3 欠損症例でみられるプロファイルを示していた (図 3、4)。母が出産前に悪阻が強く食事

がほとんど食べられなかったことや、母体血中のビタミン B1 が著明に低下を認められており、これらの状況や血中ビタミン B1 値からもビタミン B1 欠乏と判断した。しかし、ビタミン B1 (25mg/日) を投与後も児の代謝プロファイルに変化はなかった。ビタミン B1 付加酵素の欠損症も疑い、酵素活性も検討したがこれにも異常はなかった。

女児に心不全などの脚気症状は認められなかったが、生後 8 か月で体重 4.9kg と著明な体重増加不良を呈していた。後に家系内に 2 人の MELAS 患者が発見された。今回の経過から、女児の代謝プロファイルが MELAS 発症前の病態と関連している可能性が示唆された。



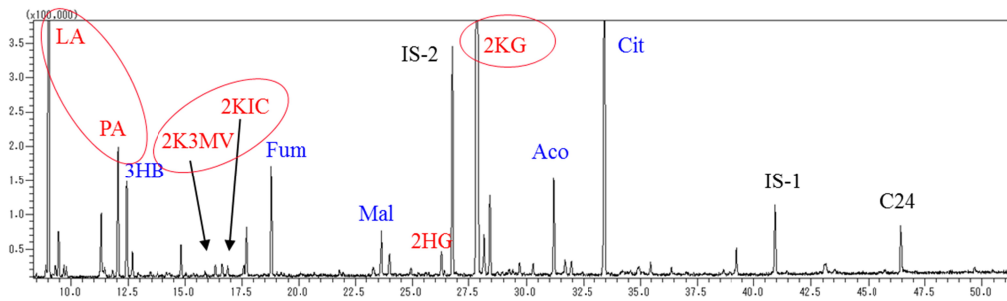


図3：患者Fの尿中有機酸所見

- 1) ピルビン酸脱水素酵素複合体障害：LA:乳酸、PA:ピルビン酸
  - 2) 分枝鎖アミノ酸脱水素酵素複合体障害：2K3MV:2-ケト-3-メチル吉草酸、2KIC:2-ケトイソカプロン酸、
  - 3) 2-ケトグルタル酸脱水素酵素複合体障害：2KG:2-ケトグルタル酸、2HG:2-ヒドロキシグルタル酸
- 略称：3HB:3-ヒドロキシ酪酸、Fum:フマル酸、Mal:リンゴ酸、Aco:アコニット酸、Cit:クエン酸、IS:内部標準物質

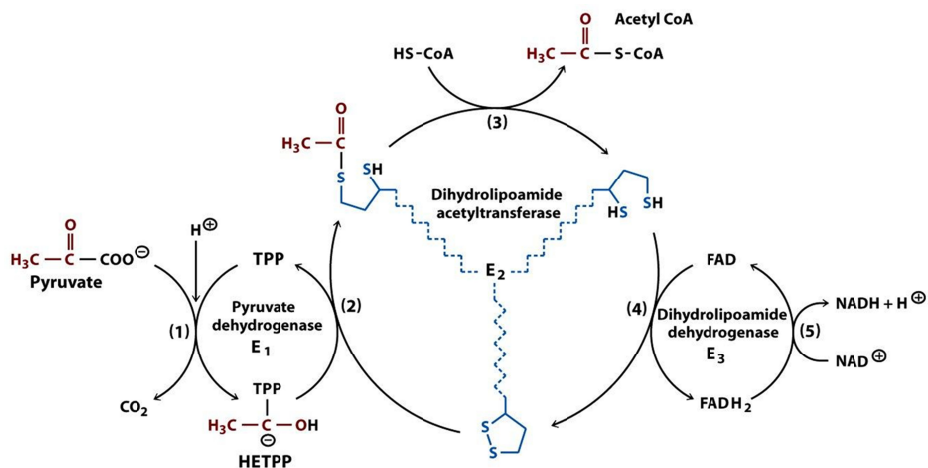


Figure 13-1 Principles of Biochemistry, 4/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

図4：脱水素複合体におけるビタミンB1 (TPP) の作用：3つの脱水素酵素複合体に共通に作用

#### D. 考察

ミトコンドリア呼吸鎖における電子伝達系の働きはミトコンドリア機能に直結する。呼吸鎖への電子伝達を担う TCA 回路や解糖系の代謝プロ

ファイルはこの機能を示していると考えられる。今回、MELAS 患者を中心に解析し、MELAS 患者では健常者に比較して TCA サイクルの代謝産物が増加していることが示唆された。一方、シトリン欠損症では TCA サイクルの代謝産物の増加

は認められなかった。これは MELAS のミトコンドリア機能障害は直接的に TCA サイクルの代謝障害に影響するが、シトリン欠損症は肝型アスパラギン酸・グルタミン酸膜輸送体蛋白の障害であり、TCA サイクル代謝に通常の状態では大きく作用しない、ということを示すものかもしれない。シトリン欠損症で肝炎など何らかの症状がある場合に分析すれば、また違う結果が得られた可能性は残る。

一方、PHPLA は MELAS 患者のうち 1 名を除き、全員で強い排泄増加を認めた。この排泄増加はいずれも健常コントロールの 10SD を超えるものであった。継続的に検査できた症例では持続的な排泄増加を認めており、昨年解析でミトコンドリア枯渇症候群でも同様の所見が得られていることから、ミトコンドリア機能障害の鋭敏なマーカーとなりうる可能性がある。ただし、昨年の検討ではピルビン酸内服による排泄量の変化は認めていないことから、治療評価マーカーとしては現時点では適切とは言えなかった。

さらに G3P について今回も検討したが、排泄増加がみられた症例はなく、やはりヒトではシトリン欠損症における G3P 脱水素酵素の代償機能が低い指標となりにくいのではないかと考えられた。

一方、家系内に MELAS 患者のいる高乳酸血症を示す乳児症例では、今回検討した MELAS 患者とはやや異なり、2KG が著明に高値で、フマル酸、リンゴ酸の排泄増加を示す有機酸分析所見であった。これはビタミン B1 欠乏でみられる 3 種類の脱水素酵素複合体障害を示すものであったが、患者ではビタミン B1 投与後も異常なプロファイルが続いている。ビタミン B1 不足は脚気衝心や末梢神経障害、Wernicke 脳症など多彩な症状をもたらすが、本患者の発達は現時点では正常である。しかし著明な発育障害が認められており、ビタミン B1 が細胞内に本当に取り込まれ、機能しているのかどうかは不明で、今後代謝プロファイルの変化と症状に関連がみられていくかどうか

か、今後も継続して検討したい。

## E. 結論

TCA 回路関連成分などの中間代謝産物は、MELAS 患者では上昇している一方、シトリン欠損症では健常コントロールと同程度であった。しかし両者ともに PHPLA の排泄増加がみられており、これをマーカーとして呼吸鎖障害を早期に発見できる可能性がある。しかし、治療評価についてはまだマーカーとして適切なものはなく、今後も解析が必要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Naiki M, Ochi N, Kato YS, Purevsuren J, Yamada K, Kimura R, Fukushi D, Hara S, Yamada Y, Kumagai T, Yamaguchi S, Wakamatsu N: Mutations in HADHB, which encodes the  $\beta$ -subunit of mitochondrial trifunctional protein, cause infantile onset hypoparathyroidism and peripheral polyneuropathy. *American Journal of Medical Genetics A* 164(5): 1180-1187, 2014 (May)
- 2) Yasuno T, Osafune K, Sakurai H, Asaka I, Tanaka A, Yamaguchi S, Yamada K, Hitomi H, Arai S, Kurose Y, Higaki Y, Sudo M, Ando S, Nakashima H, Saito T, Kaneoka H: Functional analysis of iPSC-derived myocytes from a patient with carnitine palmitoyltransferase deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 448(2): 175-181, 2014 (May)
- 3) Shioya A, Takuma H, Yamaguchi S, Ishii A, Hiroki M, Fukuda T, Sugiee H, Shigematsu Y, Tamaoka A: Amelioration of acylcarnitine profile using bezafibrate and riboflavin in a case of adult-onset glutaric

acidemia type 2 with novel mutations of the electron transfer flavoprotein dehydrogenase (ETFHDH) gene. *Journal of The Neurological Sciences* 346(1-2): 350-352, 2014 (November)

- 4) Vatanavicharn N, Yamada K, Aoyama Y, Fukao T, Densupsoontorn N, Jirapinyoe P, Sathienkijkanchai A, Yamaguchi S, Wasant P: Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: two neonatal cases with common splicing mutation and in vitro bezafibrate response. *Brain and Development*, inpress
- 5) Sakai C, Yamaguchi S, Sasaki M, Miyamoto Y, Matsushima Y, Goto YI: ECHS1 mutations cause combined respiratory chain deficiency resulting in Leigh syndrome. *Human Mutation*, inpress
- 6) 山口清次: タンデムマスを導入した新生児マススクリーニングの社会的意義と課題. *公衆衛生情報* 44(3): 5-8, 2014 (6月)
- 7) Mine J, Taketani T, Yoshida K, Yokochi F, Kobayashi J, Maruyama K, Nanishi E, Ono M, Yokoyama A, Arai H, Tamaura S, Suzuki Y, Otsubo S, Hayashi T, Kimura M, Kishi K, Yamaguchi S: Clinical and genetic investigation of 17 Japanese patients with hyperekplexia. *Developmental Medicine & Child Neurology: Online*, 2014 (OCT)
- 8) Tomatsu S, Shimada T, Mason RW, Kelly J, LaMarr WA, Yasuda E, Shibata Y, Futatsumori H, Montano AM, Yamaguchi S, Suzuki Y, Orii T: Assay for glycosaminoglycans by tandem mass spectrometry and its applications. *Journal of Analytical Bioanalytical Techniques Special Issue 2: Online*, 2014 (February)
- 9) 坊岡美奈, 比嘉明日美, 津野嘉伸, 熊谷健, 奥谷貴弘, 吉川徳茂, 城道久, 太田菜美, 八木重孝, 南佐和子, 井篁一彦, 山田健治, 山口清次: 胎児心不全で発症したミトコンドリア三頭酵素欠損症の1例. *日本周産期・新生児医学学会雑誌* 50(3): 1015-1021, 2014 (9月)
- 10) 山本幹枝, 安井建一, 渡辺保裕, 古和久典, 山口清次, 中嶋健二: ホモシスチン尿症をともなったメチルマロン酸尿症の1例. *臨床神経学* 55(1): 23-28, 2015 (1月)
- 11) 山口清次: ミトコンドリア脂肪酸酸化異常症. 編: 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.29 神経症候群(第2版) - その他の神経疾患を含めて - 先天代謝異常 -, 日本臨床社, 大阪, p627-631, 2014 (6月, 883)
- 12) 山口清次: 有機酸代謝異常. 編: 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.29 神経症候群(第2版) - その他の神経疾患を含めて - 先天代謝異常 -, 日本臨床社, 大阪, p622-626, 2014 (6月, 883)
- 13) 山口清次: 有機酸・脂肪酸代謝異常症. 編: 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.31 神経症候群(第2版) - その他の神経疾患を含めて - てんかん症候群全般てんかんおよび症候群 症候性 特異症候群 先天代謝異常 -, 日本臨床社, 大阪, p205-211, 2014 (12月)

## 2. 学会発表

- 1) Yamaguchi S: Organic Acidaemias and emergency treatments. 1st Asia Pacific Inborn Errors of Metabolism Course 講演. Tokyo, January 2014
- 2) Yamaguchi S: Pediatric emergency and inborn metabolic disease. Seminar: Updates on Inborn Errors of Metabolism セミナー. Kubang Kerian Kelantan, Malaysia, April 2014

- 3) Vatanavicharn N, Taketani T, Nabangchang C, Yamaguchi S: Isolated sulfite oxidase deficiency: A rare metabolic disorder with neuroimaging mimicking perinatal asphyxia. 第56回日本先天代謝異常学会. 仙台, 11 2014
- 4) 小林弘典, 山田健治, 高橋知男, 坊亮輔, 長谷川有紀, 山口清次: 脂肪酸代謝異常症の診断におけるろ紙血および血清アシルカルニチンプロファイルの差異に関する検討. 第56回日本先天代謝異常学会. 仙台, 2014年11月
- 5) 深澤元晶, 白田信光, 厚沢季美江, 古居みどり, 橋本隆, 山口清次: ラット初代培養線維芽細胞におけるミトコンドリア脂肪酸酸化系酵素の局在と酸化能の評価. 第56回日本先天代謝異常学会. 仙台, 2014年11月
- 6) 山田憲一郎, 内木美紗子, 星野伸, 北浦靖之, 近藤雄介, 下澤伸行, 山口清次, 下村吉治, 三浦清邦, 若松延昭: HIBCH 欠損症の同定と変異タンパク質の生化学的解析. 第56回日本先天代謝異常学会. 仙台, 2014年11月

G . 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

ミトコンドリア病モデル細胞ならびにモデルマウスを駆使したピルビン酸ナトリウム療法に関する研究

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) を導入したミトコンドリア病モデル細胞ならびにモデルマウス群を活用し、ピルビン酸ナトリウム療法の有効性を検討することを最終目的としている。今年度は、ミトコンドリア病状態にある細胞において投与したピルビン酸がミトコンドリアマトリクスに取り込まれ、TCA サイクルの基質として利用される可能性を考察するために、欠失型 mtDNA を含有したマウス培養細胞ならびにマウスの臓器におけるピルビン酸輸送体の発現変化を解析した (実験 1)。さらに、欠失型 mtDNA を含有したモデルマウスにピルビン酸ナトリウムを経口投与し、血中乳酸値の変化をモニターした (実験 2)。実験 1 の結果として、変異型 mtDNA の蓄積とともにピルビン酸輸送体の発現が上昇することが分かった。これは、投与されたピルビン酸が、特にミトコンドリア病状態の細胞では、ミトコンドリアマトリクスに運ばれ、エネルギー産生に利用される可能性を強く示唆している。また、実験 2 から、ピルビン酸ナトリウムの投与によってモデルマウスの高乳酸血症が改善する可能性を見出すことができた。

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、多様な疾患の原因になる可能性が示唆されている現在、変異型mtDNA分子種を起点とした多様な病態発症機構の解明とそれらの有効な治療法の探索は急務である。本研究では、変異型mtDNAを導入したモデルマウス群の作製とその活用から、変異型mtDNAの病原性発症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。

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は、1)細胞内のピルビン酸を増加させることで解糖系の駆動に必須であるNAD<sup>+</sup>量を増加させ、結果として解糖系によるATP産生をさらに惹起させる、2)細胞内の乳酸/ピルビン酸比を低下させることで高乳酸状態を改善させる、3)細胞内のピルビン酸を増加させることで、TCAサイクルの基質であるピルビン酸を増加させることで、結果としてTCAサイクル～電子伝達系を活性化し、ATP産生を増強させる、4)細胞内外での抗酸化作用が期待できる、などが想定されている。特に、TCAサイクル以降の代謝経路に異常を来しているミトコンドリア病では、前述の3)の効果による病態改善は極めて重要かつ独創的な代謝療法となる。

そこで今年度は、ミトコンドリア病状態のモデル細胞やマウスの臓器を活用して、これらにおけるピルビン酸輸送体の発現変化を調べた。この発現変化から、投与されたピルビン酸がミトコンドリアマト

リクスに運搬されるための生体環境が、実際のミトコンドリア病状態の細胞にあるのか、否かを考察しようと考えた(実験1)。また、欠失型mtDNAを導入したモデルマウスにピルビン酸ナトリウム療法を実施し、高乳酸血症の改善効果についても解析した(実験2)。

B. 研究方法

実験 1:

前述のように、ピルビン酸ナトリウム療法ではTCAサイクルの基質であるピルビン酸の細胞内濃度が上昇するため、TCAサイクル～電子伝達系によるミトコンドリアエネルギー産生が増強される可能性がある。しかしこのような反応には、細胞質のピルビン酸をミトコンドリアマトリクスにリクルートするピルビン酸輸送体 (Mitochondrial Pyruvate Carrier: MPC1とMPC2) の発現が律速となる。そこで、欠失型mtDNAを含有したマウス培養細胞(欠失型mtDNAを0%～91%含有)ならびに既に採取済みの欠失型mtDNAを含有した心筋組織(欠失型mtDNAを0%～86%含有)におけるMPC1とMPC2のmRNA量とタンパク質量をReal-time PCR法とウェスタンブロッティング法にてそれぞれ解析した。

実験 2:

欠失型mtDNAを導入したモデルマウスに対するピルビン酸ナトリウム療法の効果を検証するために、12個体のモデルマウス(欠失型mtDNAを33%～71%含有)ならびにコントロールとして欠失型mtDNAを含有しない3個体のマウスに体重 1kg 当たり0.25gのピルビン酸濃度になるようにピルビン酸ナトリウムを経口投与(1回/1日:投与継続中)した。投

与後の血中乳酸値の変化を測定し、高乳酸血症に対するピルビン酸ナトリウム療法の有効性について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、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、実施された。

## C. 研究結果

### 実験 1:

欠失型mtDNAを含有したマウス培養細胞(欠失型mtDNAを0%~91%含有)におけるMPC1とMPC2のmRNAとタンパク質の量は、含有される欠失型mtDNAがおおよそ80%を超えると顕著に増加することが分かった。一方、欠失型mtDNAを含有した心筋組織(欠失型mtDNAを0%~86%含有)では、含有される欠失型mtDNAが60%を超えるとMPC1のmRNAとタンパク質の量が増加することが分かった。しかし、MPC2のそれらには大きな変化が見られなかった。

### 実験 2:

欠失型mtDNAを0%~71%含有するマウスにピルビン酸ナトリウムを投与すると、投与後10分では、含有する欠失型mtDNAの割合に関係なく一過的に血中乳酸値の上昇を見た。しかし、興味深いことに、投与後4時間以降では、欠失型mtDNAの含有率がおおよそ40%を超える個体群の血中乳酸値が投与前のそれより低値になることが分かった。

## D. 考察

### 実験 1:

欠失型mtDNAを含有するマウス培養細胞ならびに心筋組織では、含有される欠失型mtDNAの割合が高い状態ではMPCの発現が増加していた(培養細胞ではMPC1とMPC2の両方、心筋組織ではMPC1のみ)。このような結果は、欠失型mtDNAの蓄積をみる細胞では、細胞内のピルビン酸を積極的にミトコンドリアマトリクスにリクルートし、TCAサイクルから電子伝達系へのフラックスを強化していることを示唆している。ピルビン酸ナトリウム療法では、このような代謝適応状態にある細胞にさらにピルビン酸を負荷するため、ミトコンドリアエネルギー産生をさらに惹起できると思われる。この可能性を検証するため、高ピルビン酸状態で欠失型mtDNAを含有するマウス培養細胞を培養し、ATP産生の増加ならびに酸素消費量の増加を検討する予定である。

### 実験 2:

欠失型mtDNAを含有するマウスにピルビン酸ナトリウムを投与すると、投与後4時間以降の血中乳酸値は投与前のそれより低値になることが分かった。これは、ピルビン酸ナトリウム療法によって高乳酸血症をコントロールできる可能性を示唆している。特に、生体内の慢性的な高乳酸状態はミトコンドリアエネルギー代謝を負に調節することが分かっているため、慢性的な高乳酸状態を打開できるピルビン酸ナトリウム療法はミトコンドリア病の治療戦略として有効である可能性が高い。現在、欠失型mtDNA

を含有するマウスに対するピルビン酸ナトリウム療法を継続しているため、これらのマウス群の血中乳酸値だけでなく、体重変化、ミトコンドリア病の発症遅延または抑制効果、寿命、組織病理解析などを随時、実施する予定である。これらの解析を総合し、ミトコンドリア病におけるピルビン酸ナトリウム療法の有効性を詳細に評価したい。

## E. 結論

変異型mtDNAの蓄積とともにピルビン酸輸送体の発現が上昇することが示され、投与されたピルビン酸が、特にミトコンドリア病状態の細胞では、ミトコンドリアマトリクスに運ばれ、エネルギー産生に利用される可能性を示唆された。

## F. 健康危険情報

本研究では人に関する健康危険情報は存在しない。また、現状、マウスにピルビン酸ナトリウムを投与してもマウスの飼育・維持・健康に顕著な異常は見られていない。マウスへの経口投与も熟練者が実施しているため、経口投与による死亡例は見られていない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Haruka Yamanashi, Osamu Hashizume, Hiromichi Yonekawa, Kazuto Nakada, and Jun-Ichi Hayashi. Administration of an Antioxidant Prevents Lymphoma Development in Transmitochondrial Mice Overproducing Reactive Oxygen Species. *Exp. Anim.*, 63: 459-466, 2014 (査読あり)
- 2) Takehiro Takahashi, Masashi Yamamoto, Kazutoshi Amikura, Kozue Kato, Takashi Serizawa, Kanako Serizawa, Daisuke Akazawa, Takumi Aoki, Koji Kawai, Emi Ogasawara, Jun-Ichi Hayashi, Kazuto Nakada, and Mie Kainoh. A Novel MitoNEET Ligand, TT01001, Improves Diabetes and Ameliorates Mitochondrial Function in db/db Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 352: 338-345, 2015 (査読あり)
- 3) Takayuki Mito, Hikari Ishizaki, Michiko Suzuki, Hitomi Morishima, Azusa Ota, Kaori Ishikawa, Kazuto Nakada, Akiteru Maeno, Toshihiko Shiroyoshi, and Jun-Ichi Hayashi. Transmitochondrial mito-mice $\Delta$  and mtDNA mutator mice, but not aged mice, share the same spectrum of muscular skeletal disorders. *BBRC*, 456: 933-973, 2015 (査読あり)
- 4) Akinori Shimizu, Takayuki Mito, Osamu Hashizume, Hiromichi Yonekawa, Kaori Ishikawa, Kazuto Nakada, and Jun-Ichi Hayashi. G7731A mutation in mouse mitochondrial tRNA(Lys) regulates late-onset disorders in transmitochondrial mice. *BBRC*, 459: 66-70, 2015.
- 5) Osamu Hashizume, Haruka Yamanashi, Makoto M. Taketo, Kazuto Nakada, and Jun-Ichi Hayashi. A Specific Nuclear DNA Background Is Required for High Frequency Lymphoma Development in Transmitochondrial Mice with G13997 A mtDNA. *PLoS ONE* 10: e0118561. doi:10.1371/journal.pone.0118561, 2015 (査読あり)

## 2. 学会発表

- 1) Kazuto Nakada “Model mouse studies: Regulation of threshold effects on pathogenesis of mitochondrial DNA-based diseases” Euromit 2014, Tampere, Finland, 15<sup>th</sup> June, 2014(招待講演)
- 2) 中田和人「ミトコンドリア遺伝子疾患の病態発現機構」アディポ・サイエンスシンポジウム、千里ライフサイエンスセンター、2014年8月23日(招待講演)
- 3) 中田和人、石原直忠、林純一「突然変異型ミトコンドリアゲノムの病原性制御～ミトコンドリア・ダイナミクスの関与～」第87回日本生化学会大会、4S04a-5 細胞と個体におけるミトコンドリアの形成と機能維持、国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都、2014年10月18日(招待講演)
- 4) 中田和人「ミトコンドリアセントラルドグマの破綻病理に関する基礎研究」国立遺伝学研究所研究集会～オルガネラゲノムに支配される生命現象～、国立遺伝学研究所、2014年11月7日(招待講演)

## 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

ミトコンドリア脳筋症の臨床的研究と評価尺度の開発に関する研究

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。今年度は第2相試験、第3相試験に向けて、対象患者の背景調査を行った。

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、背景調査を行い、主要および副次項目とすべきパラメーターの調査を行った(表1)。

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6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、 $26.0 \pm 16.0$  (10.2~64.8) 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

医師主導治験による治療薬としての開発を目指し、エントリー患者の背景調査を続けており、治験での薬効評価に有用な情報を収集している。

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

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



	表1 ミトコンドリア病患者背景									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Age onset/current	15/24	12/27	36/52	26/42	11/33	56/66	11/33	63/77	63/69	26/33
Age at study	24	27	52	42	33	66	33	77	69	33
Sex	M	M	M	M	M	F	F	M	F	M
Inheritance	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+
Clinical diagnosis	MELAS	MELAS	MELAS	MELA	MELAS	PEO/KSS	MELAS	PEO/KSS	MELA	MELAS
Epilepsy	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
Ataxia	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
Stroke	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
Developmental delay	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+
Dementia	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Myopathy	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Cardiomyopathy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WPW syndrome	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gastroenteropathy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diabetes	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Renal failure	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-
Hearing loss	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-
Dwarfism	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
MRI & CT abnormality	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
Lactic acidosis	19.6	64.8	22.4	22.1	31.2	10.2	23.6	14.7	13.2	38.4
Genetic abnormality	A3243G	A3243G	A3243G	A3243G	A3243G	unknown	A3243G	unknown	A3243G	A3243G

ミトコンドリア病に対するピルビン酸ナトリウムの治療効果に関する研究

研究分担者 酒井 規夫 大阪大学大学院医学系研究科小児科学 准教授

**研究要旨**  
ミトコンドリア病は多くの原因があり、それぞれ異なる病態があり、根本的な治療法が存在しない。我々はPDHC(pyruvate dehydrogenase complex deficiency)を中心として、様々なミトコンドリア病に対して、ピルビン酸ナトリウムを投与し、その臨床的效果について解析したので報告する。

**A．研究目的**

ミトコンドリア病はその根本的な治療法がなく、予後不良な疾患であるため、症例レベルで有効性の報告のあるピルビン酸ナトリウムの投与例における有効性を解析し、その対象疾患や投与量に関するデータを収集する。

**B．研究方法**

臨床的、生化学的、そして可能なら遺伝学的に診断のついたミトコンドリア病患者に対し、ピルビン酸ナトリウムを投与し、その副作用、有効性について解析する。

症例は6例でPDHC；4例、NICCD；1例、Leigh脳症；1例である。これら症例はすべて遺伝子診断によって確定診断されている。

投与量；ピルビン酸ナトリウムは0.25g/kg/dで開始し、3ヶ月ごとに0.25g/kg/dずつ増量し、最大1.8g/kg/dまで増量した症例あり。

投与期間；6ヶ月から4年間（平均19ヶ月）

評価方法；血中乳酸、ピルビン酸、アミノ酸分析、MRI/MRS、神経学的評価、EEGなど

副作用チェック

	1	2	3	4	5	6
診断	PDHA	PDHA	PDHA	PDHA	NICCD	Leigh ATP6
性別	男児	女児	女児	女児	男児	女児
現年齢	4	15	5	5	14	5
発症時期	新生児期	乳児期	乳児期	新生児期	乳児期	乳児期
診断時年齢	1ヶ月	1	3	2ヶ月	2	2
神経学的症状	重度	重度	重度	重度	なし	重度
投与開始時年齢	8ヶ月	11	4	6ヶ月	14	4
投与量 (g/kg/day)	1.5	0.5~0.8	1	1	0.25	0.5
投与期間	4年	4年	8ヶ月	10ヶ月	10ヶ月	6ヶ月

**(倫理面への配慮)**

本研究は、大阪大学倫理委員会に於いて審査され、承認を受けた。全例、ピルビン酸ナトリウム治療についての文書での説明と承諾を得た。

**C．研究結果**

PDHC 4例は2例が新生児期発症、2例が乳児期発症の比較的重症例であったが、嚥下機能の改善、活動性の上昇、けいれん頻度の低下などがみられ、家族の満足度もまあまあであった。

NICCDの1例は14歳男児で、それまで安定していたが、交通事故後に肺炎を合併し肝性脳症をきたすが、食事療法、ピルビン酸療法を開始し、徐々に回復している。

Leigh脳症の2歳女児は、発熱により失調の出現、退行を認めていたが、診断後ピルビン酸を開始し、活動性が上がり不随意運動がやや軽減している。

副作用に関しては、開始時、および増量時に軽度の下痢を伴う症例があったが、いずれも整腸剤の使用などで対応可能なレベルであった。

**D．考察**

ミトコンドリア病に対するピルビン酸ナトリウムはさまざまな効果があるとされているが、実際の臨床応用はまだまだ十分ではない。しかしながら今回投与を行ったPDHC 4例においては、程度の差はあるが有効性が認められ、大きな副作用を認めなかった。また、Leigh脳症、NICCDの症例においても症状の安定が認められた。今後、有効な評価項目を用いた長期成績法を用いた成績調査が望ましいと考える。

**E．結論**

ミトコンドリア病にたいする治療法の一つとして、ピルビン酸ナトリウムは有効性が認められた。

**F．研究発表**

1. 論文発表

- Hossain MA, Otomo T, Saito S, Ohno K, Sakuraba H, Hamada Y, Ozono K, Sakai N., Late-onset Krabbe disease is predominant in Japan and its mutant precursor protein undergoes more effective processing than the infantile-onset form., Gene. 534(2):144-54, 2014
- Kimura Y, Mihara M, Kawarai T, Kishima H, Sakai N, Takahashi M and Mochizuki H, Efficacy of deep brain stimulation in an adolescent patient with DYT11 myoclonus-dystonia, Neurology and Clinical

cal Neuroscience, 2:57-59, 2014

- 3) Narita A, Shirai K, Kubota N, Takayama N, Takahashi Y, Onuki T, Numakura C, Kato, M, Hamada Y, Sakai N, Ohno A, Asami M, Matsushita S, Hayashi A, Kumada T, Fujii T, Horino A, Inoue T, Kuki I, Asakawa K, Ishikawa H, Ohno K, Nishimura Y, Tamasaki A, Maegaki Y and Ohno K, A normal pupillary light reflex with chromatic pupillometry in Gaucher disease, *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 1(2): 135-140, 2014

## 2. 学会発表

- 1) Norio Sakai, Risk benefit analysis for newborn screening for Krabbe disease in Japan, The 2nd Asian Congress for Lysosomal Storage Disease Screening, 6.9.2014
- 2) Norio Sakai. Molecular analysis and treatment for lysosomal diseases., III Scientific and practical conference with international participation, 6.10-11, 2014
- 3) 濱田悠介、和田芳朗、近藤秀仁、山崎早苗、中野さやか、苛原 香、富永康仁、青天目信、下野九里子、酒井規夫、住田裕、大園恵一、異なる臨床経過を辿っているプロピオン酸血症兄弟例の検討、第十回 近畿先天代謝異常症研究会、7.13.2014
- 4) 尾形侑香、村西加奈子、近藤秀仁、山崎早苗、中野さやか、濱田悠介、苛原 香、富永康仁、青天目信、下野九里子、酒井規夫、大園恵一、当科における小児型ポンペ病4症例への酵素補充療法の経過、第十回 近畿先天代謝異常症研究会、7.13.2014
- 5) M A Hossain, K Higaki, M Shinpo, E Nanba, Y Suzuki, M Alfadhel, K Ozono, N Sakai, Chemical chaperone treatment for galactosialidosis: chaperone effect of NOE Von -galactosidase activities in galactosialidosis fibroblasts, SSIEM2014, 9.3.2014
- 6) 苛原香、ゴーシェ病2型、第2回ゴーシェ病フォーラム、9.20.2014
- 7) 酒井規夫、異染性白質ジストロフィーの診断と治療戦略、米子セミナー、10.12.2014
- 8) 近藤秀仁、新實理子、濱田悠介、苛原香、酒井規夫、大園恵一、異なる臨床経過を呈したゴーシェ病の兄弟例、第19回日本ライソゾーム病研究会、10.3.2014
- 9) 衛藤義勝、岩本武雄、藤崎美和、高村歩美、梅田稔子、辻嘉代子、大橋十也、井田博幸、衛藤薫、濱田悠介、新實理子、近藤秀仁、苛原香、酒井規夫、Niemann Pick C(NPC)患者での血清オキシステロール測定の診断への有用性に関して、第56回日本先天代謝異常学会、11.13-15.2014
- 10) 田中あけみ、濱崎考史、門野千穂、工藤聡志、奥山虎之、酒井規夫、小須賀基道、加藤剛二、小林良二、加藤俊一、ムコ多糖症II型重症型の造血幹細胞移植の脳に対する効果とIDS遺伝子変異について、第56回日本先天代謝異常学会、11.13-15.2014
- 11) Hideto Kondo, Michiko Shimpo, Yusuke Hamada, Kaori Irahara, Koji Tominaga, Shin Nabatame, Norio Sakai, Keiichi Ozono, The investing of pyruvate therapy for patients with mitochondrial disorders, 第56回日本先天代謝異常学会、11.13-15.2014
- 12) Kaori Irahara, Yusuke Hamada, Sanae Yamazaki, Sayaka Nakano, Hideto Kondo, Michiko Shimpo,

Norio Sakai, Keiichi Ozono, The study of developmental profile in patients with mucopolysaccharidosis type 2, 第56回日本先天代謝異常学会、11.13-15.2014

- 13) Yoichi Wada, Norio Sakai, Kunihiko Aya, Shinsuke Ninomiya, Kenji Waki, Yoshio Arakaki, The late infantile form of metachromatic leukodystrophy with intrathecal enzyme replacement therapy, 第56回日本先天代謝異常学会、11.13-15.2014
- 14) Michiko Simpo, Hideto Kondo, Yusuke Hamada, Kaori Irahara, Norio Sakai, Keiichi Ozono, Six cases of metachromatic leukodystrophy, 第56回日本先天代謝異常学会、11.13-15.2014
- 15) 酒井規夫、ホセイン モハマッド・A、クラッペ病に対するケミカルシャペロン、シンポジウム遺伝疾患に対する低分子シャペロン療法、第59回日本人類遺伝学会、11.19-22.2014、舟掘
- 16) 田中あけみ、濱崎考史、門野千穂、工藤聡志、奥山虎之、酒井規夫、小須賀基道、新實理子、加藤剛二、小林良二、澤田智、鈴木康之、石毛美香、麦島秀雄、矢部晋正、加藤俊一、ムコ多糖症II型重症型の造血幹細胞移植の脳に対する効果とIDS遺伝子変異について、第59回日本人類遺伝学会、11.19-22.2014、舟掘
- 17) Norio Sakai, Lysosomal diseases; Basic pathology and treatment strategy、リエゾンラボ研究会、12.17.2014、熊本
- 18) 酒井規夫、先天型、古典型筋強直性ジストロフィーの小児期における診療のポイント 第6回遺伝カウンセリングアドバンスセミナー、1.10.2015、大阪

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Fujita Y, Ito M, Kojima T, Yatsuga S, <u>Koga Y</u> , <u>Tanaka M</u>	GDF15 is a novel biomarker to evaluate efficacy of pyruvate therapy for mitochondrial diseases	Mitochondrion	20	34-42	2015
<u>Fujii T</u> , Nozaki F, Saito K, Hayashi A, Nishigaki Y, <u>Murayama K</u> , <u>Tanaka M</u> , <u>Koga Y</u> , Hiejima I, Kumada T.	Efficacy of pyruvate therapy in patients with mitochondrial disease: a semi-quantitative clinical evaluation study.	Mol Genet Metab.	112(2)	133-8	2014
Wei FY, Zhou B, Suzuki T, Miyata K, Ujihara Y, Horiguchi H, Takahashi N, Xie P, Michiue H, Fujimura A, Kaitsuka T, Matsui H, <u>Koga Y</u> , Mohri S, Suzuki T, Oike Y, Tomizawa K.	Cdk5rap1-Mediated 2-Methylthio Modification of Mitochondrial tRNAs Governs Protein Translation and Contributes to Myopathy in Mice and Humans	Cell Metab	21(3)	428-42	2015
Montassir H, Maegaki Y, <u>Murayama K</u> , Yamazaki T, Kohda M, <u>Ohtake A</u> , Iwasa H, Yatsuka Y, Okazaki Y, Sugiura C, Nagata I, Toyoshima M, Saito Y, Itoh M, Nishino I, Ohno K.	Myocerebrohepatopathy spectrum disorder due to <i>POLG</i> mutations: A clinicopathological report.	Brain Dev.		Epub ahead of print	2015
Brea-Calvo G, Haack TB, Karall D, <u>Ohtake A</u> , Invernizzi F, Carrozzo R, Kremer L, Dusi S, Fauth C, Scholl-Bürgi S, Graf E, Ahting U, Resta N, Laforgia N, Verrigni D, Okazaki Y, Kohda M, Martinelli D, Freisinger P, Strom TM, Meitinger T, Lamperti C, Lacson A, Navas P, Mayr JA, Bertini E, <u>Murayama K</u> , Zeviani M, Prokisch H, Ghezzi D.	COQ4 Mutations Cause a Broad Spectrum of Mitochondrial Disorders Associated with CoQ10 Deficiency.	Am J Hum Genet.	96(2)	309-17	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
Kopajtich R, Nicholls TJ, Rorbach J, Metodiev MD, Freisinger P, Mandel H, Vanlander A, Ghezzi D, Carrozzo R, Taylor RW, Marquard K, <u>Murayama K</u> , Wieland T, Schwarzmayr T, Mayr JA, Pearce SF, Powell CA, Saada A, <u>Ohtake A</u> , Invernizzi F, Lamantea E, Sommerville EW, Pyle A, Chinnery PF, Crushell E, Okazaki Y, Kohda M, Kishita Y, Tokuzawa Y, Assouline Z, Rio M, Feillet F, Mousson de Camaret B, Chretien D, Munnich A, Menten B, Sante T, Smet J, Régal L, Lorber A, Khoury A, Zeviani M, Strom TM, Meitinger T, Bertini ES, Van Coster R, Klopstock T, Rötig A, Haack TB, Minczuk M, Prokisch H.	Mutations in <i>GTPBP3</i> Cause a Mitochondrial Translation Defect Associated with Hypertrophic Cardiomyopathy, Lactic Acidosis, and Encephalopathy.	Am J Hum Genet.	95(6)	708-20	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, <u>Murayama K</u> , Hattori K, Hayashi J, Yamagata T, Fujita Y, Ito M, <u>Tanaka M</u> , Nibu K, <u>Ohtake A</u> , Okazaki Y	New <i>MT-ND6</i> and <i>NDUFA1</i> mutations in mitochondrial respiratory chain disorders.	Ann Clin Transl Neurol.	1(5)	361-9	2014
<u>Ohtake A</u> , <u>Murayama K</u> , Mori M, Harashima H, Yamazaki T, Tamaru S, Yamashita I, Kishita Y, Kohda, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Okazaki Y:	Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders: exome sequencing for disease gene identification.	Biochim Biophys Acta.)	1840(4)	1355-9	2014
Negishi Y, Hattori A, Takeshita E, Sakai C, Ando N, Ito T, Goto T, <u>Saitoh S</u>	Homoplasmy of a mitochondrial 3697G>A mutation causes Leigh syndrome.	J Hum Genet	59	405-407	2014
Kondo H, Tanda K, Tabata C, Hayashi K, Kihara M, Kizaki Z, Taniguchi-Ikeda M, Mori M, <u>Murayama K</u> , <u>Ohtake A</u>	Leigh syndrome with Fukuyama congenital muscular dystrophy: A case report.	Brain Dev	36(8)	730-3	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
Yamazaki T, <u>Murayama K</u> , 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.	Pediatr Int	56(2)	180-187	2014
Shimbo H, Takagi, M, Okuda M, Tsuyusaki Y, Takano K, Iai M, Yamashita S, <u>Murayama K</u> , <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.	Mol Genet Metab		in press	2015
Haack T, Jackson C, <u>Murayama K</u> , Kremer L, Schaller A, Kotzaeridou U, de Vries M, Schottmann G, Santra S, Büchner B, Wieland T, Graf E, Freisinger P, Eggmann S, <u>Ohtake A</u> , Okazaki Y, Kohda M, Kishita Y, Tokuzawa Y, Sauer S, Memari Y, Kolb-Kokocinski A, Durbin R, Haselmann O, Cremer K, Albrecht B, Wiczorek D, Engels H, Hahn D, Zink A, Alston C, Taylor R, Rodenburg R, Trollmann R, Sperl W, Strom T, Hoffmann G, Mayr J, Meitinger T, Bolognini R, Schuelke M, Nuoffer J-M, Kölker S, Prokisch H, Klopstock T	Deficiency of ECHS1 causes mitochondrial encephalopathy with cardiac involvement	Ann Clin Transl Neurol		in press DOI: 10.1002/acn3.189	2015
Toshiyuki Imasawa, <u>Masashi Tanaka</u> , Yutaka Yamaguchi, Takashi Nakazato, Hiroshi Kitamura, Motonobu Nishimura	Pathological similarities between low birth weight-related nephropathy and nephropathy associated with mitochondrial cytopathy.	Diagnostic Pathology	9(1)	9	2014
Toshiyuki Imasawa, <u>Masashi Tanaka</u> , Yutaka Yamaguchi, Takashi Nakazato, Hiroshi Kitamura, Motonobu Nishimura	7501 T>A mitochondrial DNA variant in a patient with glomerulosclerosis	Renal Failure	36(9)	1461-1465	2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yasuhiro Kitazoe, <u>Masashi Tanaka</u>	Evolution of mitochondrial power in vertebrate metazoans.	PloS One	9(6)	e98188	2014
Shioya A, Takuma H, <u>Yamaguchi S</u> , Ishii A, Hiraki M, Fukuda T, Sugie H, Shigematsu Y, Tamaka A	Amelioration of acylcarnitine profile using bezafibrate and riboflavin in a case of adult-onset glutaric acidemia type 2 with novel mutations of the electron transfer flavoprotein dehydrogenase (ETFHDH) gene	Journal of The Neurological Sciences	346(1-2)	350-352	2014
Sakai C, <u>Yamaguchi S</u> , Sasaki M, Miyamoto Y, Matsushima Y, Goto Y	ECHS1 mutations cause combined respiratory chain deficiency resulting in Leigh syndrome	Human Mutation	36(2)	232-239	2015
Haruka Yamanashi, Osamu Hashizume, Hiromichi Yonekawa, <u>Kazuto Nakada</u> , and Jun-ichi Hayashi.	Administration of an Antioxidant Prevents Lymphoma Development in Transmitochondrial Mice Overproducing Reactive Oxygen Species.	Exp. Anim.	63	459-466	2014
Takehiro Takahashi, Masashi Yamamoto, Kazutoshi Amikura, Kozue Katano, Takashi Serizawa, Kanako Serizawa, Daisuke Akazawa, Takumi Aoki, Koji Kawai, Emi Ogawara, Jun-Ichi Hayashi, <u>Kazuto Nakada</u> , and Mie Kainoh.	A Novel MitoNEET Ligand, TTO1001, Improves Diabetes and Ameliorates Mitochondrial Function in db/db Mice.	J. Pharmacol. Exp. Ther.	352	338-345	2015
Takayuki Mito, Hikari Ishizaki, Michiko Suzuki, Hitomi Morishima, Azusa Ota, Kaori Ishikawa, <u>Kazuto Nakada</u> , Akiteru Maeno, Toshihiko Shiraoishi, and Jun-ichi Hayashi.	Transmitochondrial mito-mice $\Delta$ and mtDNA mutator mice, but not aged mice, share the same spectrum of musculoskeletal disorders.	BBRC	456	933-937	2015
Akinori Shimizu, Takayuki Mito, Osamu Hashizume, Hiromichi Yonekawa, Kaori Ishikawa, <u>Kazuto Nakada</u> , and Jun-ichi Hayashi.	G7731A mutation in mouse mitochondrial tRNA(Lys) regulates late-onset disorders in transmitochondrial mice.	BBRC	459	66-70	2015
Osamu Hashizume, Haruka Yamanashi, Makoto M. Taketo, <u>Kazuto Nakada</u> , and Jun-ichi Hayashi.	A Specific Nuclear DNA Background Is Required for High Frequency Lymphoma Development in Transmitochondrial Mice with G13997A mtDNA.	PLoS ONE	10	e0118561	2015