

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業
(英語) Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases
- 研究開発課題名： (日本語) 創薬を見据えたミトコンドリア病の新規病因遺伝子の発見とその病態解明
(英語) Far seeing drug discovery, the research for identification of novel causative gene of mitochondrial disorders and investigation of molecular pathogenesis
- 研究開発担当者 (日本語) 千葉県こども病院 代謝科 部長/千葉県がんセンター 研究所 主任医長
村山 圭
- 所属 役職 氏名： (英語) Kei Murayama, Director, Department of Metabolism, Chiba Children's Hospital/ Chief doctor, Chiba Cancer Center , Research Institute
- 実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) PI ポリアミドの開発
開発課題名： (英語) Development of PI polyamide
- 研究開発分担者 (日本語) 千葉県がんセンター 研究所 所長 永瀬 浩喜
所属 役職 氏名： (英語) Hiroki Nagase, director of Chiba Cancer Center Research Institute

II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究では、既知の遺伝子変異が見つからなかったものに対して、効率的にエクソーム解析を行い様々な検証実験を行うことにより、日本発の新規病因遺伝子を発見しその病態解明に迫りつつ、創薬へとつなげていくことを目的とする。創薬研究については、遺伝子変異特異的に作用する PI ポリアミドの開発を行い、ミトコンドリア病治療の足掛かりとする。さらに診療の質を高める研究（村山班）で構築しているレジストリシステムを応用・発展させ、単なるデータプールにせず、臨床応用を前提とした創薬研究等に活用していく先駆けとなるような研究にする。

PI ポリアミドの開発

PI polyamide (PIP)は、ある種の微生物の産生する天然抗生物質から発想された小分子化合物で、核内 DNA の副溝に特別な送達システムを必要とせず結合する。そこで、細胞内の DNA を標的とする意味でミトコンドリア DNA (mtDNA) への応用が可能ではないかと考えた。

当該研究では、ミトコンドリア病の一種である MELAS の原因 mtDNA 変異として知られている mtDNA3243A>G を標的として PIP を合成し、その変異 mtDNA の発現の抑制を目的とした。合成した PIP (PIP2) に FITC を結合した化合物 PIP2-FITC を作製し、HeLa mt3243A>G 変異 mtDNA82%含有 cybrid に投与後、24 時間はミトコンドリアに滞留することを観察したが、48 時間後には排出された。そこで膜電位差から、ミトコンドリアの内膜へ物質を導入する tryphenylphosphonium (TPP) カチオンを PIP2 と結合し、この PIP2-TTP を、mt3243A>G55%含有 cybrid に濃度を変えて 40-60 日間、隔日に新鮮な PIP2-TTP を連続投与した結果、濃度依存的に変異 mtDNA の含有量が減少し、正常 mtDNA 量が増加する傾向が認められた。

現在、処理効果が出るまでの時間を短縮するため、北海道大学との共同研究による高濃度 PIP2 ミトコンドリア内導入実験を試行中である。また、mtDNA との結合頻度を高めるため、PIP と TPP 間のリンカーを伸張した化合物を作製中である。さらに、異なる配列の PIP を作製し、より結合率の高い PIP が作製できるかも検討中である。

新規遺伝子の同定・病態解明

エクソーム解析によるミトコンドリア病の原因遺伝子探索を進めていくため、新規ミトコンドリア病検体の収集および診断を進めた。また、診断済みの検体に関しても保存されていた組織検体から DNA の抽出を行った。最終的に 20 検体のエクソーム解析を外注した。候補となったバリエーションを対象に現在家族におけるハプロタイプ解析を進めている。

エクソーム解析によってミトコンドリア DNA 枯渇症の患者から MIC13 遺伝子のフレームシフトバリエーションを発見した。MIC13 はミトコンドリアのクリステ形成に関わる MICOS complex の一つである。患者由来の線維芽細胞の解析から MIC13 のタンパク質は消失していることが確認され、また透過型電子顕微鏡の観察によりクリステ構造異常が認められた。さらに、正常型の MIC13 を患者由来線維芽細胞に導入したところ、ミトコンドリア機能が改善したことから、この MIC13 のバリエーションが疾患の原因となることを明らかにした。また、本研究はアジアミトコンドリア学会等で発表し、現在論文投稿準備中である。これ以外にも PNPLA4 などの原因候補遺伝子の解析を進めた。

また、新規ミトコンドリア DNA バリエーションの疾患との関連を、患者由来ミトコンドリアゲノムと HeLa 細胞由来の核ゲノムを持つサイブリッド細胞を用い検討した。14597A>G (MTND6)は、新規バリエーション

として発見されたが、これが呼吸鎖 I の活性低下をもたらすものであることをサイブリッドの実験から証明した。また、Zebrafish のモデル細胞実験を進めるため、飼育施設等の環境整備を進めた。

遺伝子診断結果を検討するため、埼玉医科大学で月 2 回のペースで研究会議を実施した。臨床家と研究者を交えて、症例と原因遺伝子の関連を議論した。また、2017 年 1 月には研究班全体での進捗報告会を行い、それぞれの研究について議論を交わした。

本研究を進めて行くにあたり、より患者サンプリングを円滑に行うために、現在村山班で開発しているレジストリバンクを積極的に応用し、遺伝子診断がなされていない症例を確実に拾い上げて診断まで結びつけるような流れを確立する。生化学診断は酵素解析・細胞外フラックスアナライザーによる OCR 測定を行う一方で、これらの特殊検査は、新規遺伝子の評価実験や薬剤の効果判定にも重要となる。

In this research, we perform the PI polyamide based drug development to use maternal inherited mitochondrial disease and the identification of novel causative gene of all mitochondrial disease. Furthermore, we will develop the registry system of mitochondrial disease which leads to global mitochondrial registry.

Development of PI polyamide

PI polyamide (PIP) is a small molecule compound conceived from natural antibiotics produced by certain bacteria and binds to the minor groove of DNA without specific delivery systems. Therefore, we thought that mitochondrial DNA (mtDNA) is possible target from the viewpoint of intracellular DNA. In this study, PIP was synthesized against mtDNA 3243 A> G, which is known as causative mtDNA mutation of MELAS, and aimed at suppressing the replication of the mutant mtDNA. PIP2-FITC, fluorescent labeled PIP (PIP2) was prepared and the fluorescence was observed in mitochondria for 24 hours after administration to cybrid containing mt3243A>G mutant mtDNA, but was not observed after 48 hours. For sustained drug delivery to mitochondria, a triphenylphosphonium (TPP) cation was bound with PIP2 (PIP2-TPP). The PIP2-TPP was administrated to cybrid containing mt3243A>G (55%) for 40-60 days. There was a tendency that PIP2-TPP treatment reduced the amount of the mutant mtDNA and increased the normal mtDNA amount in a concentration-dependent manner. We also initiated introduction of high concentration of PIP2 into mitochondria by means of a newly developed delivery system of the Mito-porter collaborating with Hokkaido University, and introduction of PIP-TPP linker for increasing the chance to bind mtDNA. We believe these improvements should overcome problems of short retention in mitochondria and less chance to bind mitochondrial DNA and subsequently introduce the efficient suppressive effect of mutant mitochondrial DNA replication.

Furthermore, challenging trials to improve the target mutant sequence recognition by structural modifications of the PIP is underway.

Identification of novel causative gene of mitochondrial disorders & investigation of molecular pathogenesis

In order to advance the genetic diagnosis of mitochondrial disorders using whole exome sequencing,

we worked hard to biochemically and clinically diagnose new patients as mitochondrial disorders. We isolated DNA from old stored tissue samples. Finally, we perform whole exome sequencing of samples from 20 individuals with mitochondrial defects. Compound heterozygosity is now ascertaining by haplotype phasing.

The whole exome sequencing of one MTDPS patient identified homozygous frameshift mutation in MIC13. MIC13 (also known as QIL1 or C19orf70) is a component of the MICOS complex which plays crucial roles in the maintenance of cristae junctions at the mitochondrial inner membrane. In the present study, we found apparent loss of protein probably due to the non-sense mediated decay. The reduced cristae structures in mitochondria of the patient-derived fibroblasts were observed by transmission electron microscope. The wild type cDNA of MIC13 was introduced into fibroblast cells from the patient by lentivirus systems. Stable expression of MIC13 in fibroblasts restored mitochondrial respiratory chain complex deficiencies. Our findings indicate that mutation in MIC13 causes mitochondrial respiratory chain complex deficiency, MTDPS and defects in cristae organization. We presented these results at several conference. We are preparing for the submission of the article.

For evaluating the biochemical and molecular pathogenicity of novel mtDNA variants, we generated cybrid cell lines that carried the mtDNA of a patient with mitochondrial disorders. 14597A>G (MTND6) was identified as novel mtDNA variant and experiments using cybrid cells confirmed the pathogenicity of this variant. To introduce the zebrafish model system, a Zebrafish facility suitable for breeding and in vivo research was built.

To interpret the results of a genetic test, we held a meeting twice a month at Saitama Medical University. Clinicians and researchers debated about the relationship between a case and candidate gene. Furthermore, we opened progress meeting in the whole study group and exchanged opinions about our research.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 11件、国際誌 10件）

1. Zaha K, Matsumoto H, Itoh M, Saitsu H, Kato K, Kato M, Ogata S, Murayama K, Kishita Y, Mizuno Y, Kohda M, Nishino I, Ohtake A, Okazaki Y, Matsumoto N, Nonoyama S. DNMT1L-related encephalopathy in infancy with Leigh syndrome-like phenotype and suppression-burst. Clin Genet. 2016 Nov;90(5):472-474.
2. Imai A, Kohda M, Nakaya A, Sakata Y, Murayama K, Ohtake A, Lathrop M, Okazaki Y, Ott J. HDR: a statistical two-step approach successfully identifies disease genes in autosomal recessive families. J Hum Genet. 2016 Nov;61(11):959-963.
3. Imai A, Kishita Y, Nakayama Y, Fujita S, Futatani T, Kohda M, Yatsuka Y, Nakaya A, Sakata Y, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. Dried blood spots for newborn screening allows easy determination of a high heteroplasmy rate in severe infantile cardiomyopathy. Int J Cardiol. 2016 Oct 15;221:446-9.

4. Kopajtich R, Murayama K, Janecke AR, Haack TB, Breuer M, Knisely AS, Harting I, Ohashi T, Okazaki Y, Watanabe D, Tokuzawa Y, Kotzaeridou U, Kölker S, Sauer S, Carl M, Straub S, Entenmann A, Gizewski E, Feichtinger RG, Mayr JA, Lackner K, Strom TM, Meitinger T, Müller T, Ohtake A, Hoffmann GF, Prokisch H, Stauffer C. Biallelic IARS Mutations Cause Growth Retardation with Prenatal Onset, Intellectual Disability, Muscular Hypotonia, and Infantile Hepatopathy. *Am J Hum Genet.* 2016 Aug 4;99(2):414-22.
5. Hashimura Y, Murayama K, Ohtake A, et al. Mitochondrial respiratory chain complex IV deficiency complicated with chronic intestinal pseudo-obstruction in a neonate. *Pediatr Int.* 2016 Jul;58(7):651-5.
6. Kim J, Kang E, Kim Y, Kim JM, Lee BH, Murayama K, Kim GH, Choi IH, Kim KM, Yoo HW. MPV17 mutations in patients with hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome. *Mol Genet Metab Rep.* 2016 Aug 4;8:74-6.
7. J. Lin, K. Hiraoka, T. Watanabe, T. Kuo, Y. Shinozaki, A. Takatori, N. Koshikawa, A. Chandran, J. Otsuki, H. Sugiyama, P. Horton, H. Nagase: Identification of Binding Targets of a Pyrrole-Imidazole Polyamide KR12 in the LS180 Colorectal Cancer Genome. *PLoS ONE* 11(10): e0165581, 2016.
8. T. Watanabe, K. Shinohara, Y. Shinozaki, S. Uekusa, X. Wang, N. Koshikawa, K. Hiraoka, T. Inoue, J. Lin, T. Bando, H. Sugiyama, H. Nagase: Double beta-alanine substitutions incorporated in 12-ring pyrrole-Imidazole Polyamides for lengthened DNA minor groove recognition. *Adv. Tech. Biol. Med.* 4(2), 2016.
9. ミトコンドリア呼吸鎖異常症のゲノム解析, 神田将和, 岡崎康司, バイオインダストリー(B&I), 2016, 74(4),321-323 頁
10. 村山 圭, 伏見拓矢, 松永綾子: ミトコンドリア呼吸鎖異常症 小児疾患診療のための病態生理 3-改訂第5版 東京医学社 小児内科 48 巻増刊号 84-90, 2016
11. 村山 圭: 第4章 代謝異常による急性脳症 小児急性脳症診療ガイドライン 2016 診断と治療社 57-76, 2016
12. 村山 圭, 伏見拓矢, 松永綾子: ミトコンドリア病 特集小児の筋疾患 小児内科 48 巻 12 号 1966-1971, 2016
13. 村山 圭, 鶴岡智子: 高アンモニア血症 周産期医学必修知識第 8 版 周産期医学 東京医学社 Vol. 46 増刊号 825-828, 2016
14. 村山 圭, 鶴岡智子: 先天代謝異常症 ガイドラインと最新文献による小児科学レビュー2016-17 総合医学社 109-116, 2016
15. 武田充人: 「ミトコンドリア心筋症」. 診断モダリティとしての心筋病理 2016 (in press)
16. 大竹 明, 村山 圭, 岡崎康司: 先天代謝異常症-エキスパートによる最新情報 各疾患の進歩 ミトコンドリア病の診断. 小児科診療 2016
17. 村山 圭: 小児の症候群 代謝 Pearson(marrow-pancreas)症候群. 小児科診療 2016
18. 村山 圭, 志村 優: これって肝臓病? 知っておきたい遺伝性疾患 ミトコンドリア病. 小児内科 2016

19. 村山 圭、大竹 明、岡崎康司ほか ミトコンドリア病診療マニュアル 2017 日本ミトコンドリア学会編集 2016.12

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ミトコンドリア呼吸鎖異常症の包括的ゲノム解析, (口頭), 岡崎康司, 村山 圭, 大竹 明, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/2, 国内.
2. ミトコンドリア病を疑う集団における遺伝的背景, ポスター, 神田将和、木下善仁、水野洋介、今井敦子、中谷明弘、平田智子、八塚由紀子、Nurun N. Borna、原嶋宏子、村山 圭、大竹 明、岡崎康司, (口頭) 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/2, 国内.
3. ミトコンドリア病の遺伝子診断 (口頭) 岡崎康司 ゲノム創薬・医療フォーラム第 5 回談話会, 東京都港区 2016.4. 国内
4. ミトコンドリア病の治験を中心とする最新治療 (口頭) 大竹 明 ゲノム創薬・医療フォーラム第 5 回談話会, 東京都港区 2016.4. 国内
5. ミトコンドリア病の臨床的診断; 多彩な臨床像と現在の診断法・治療法 (口頭) 村山 圭 ゲノム創薬・医療フォーラム第 5 回談話会, 東京都港区 2016.4. 国内
6. ミトコンドリア遺伝子の翻訳異常による重症乳児ミトコンドリア病 (口頭) 志村 優, 村山 圭, 大竹 明, 他 第 119 回日本小児科学会学術集会 2016.5.13-15 国内
7. ミトコンドリア病の診療ネットワーク (口頭) 村山 圭 日本小児科学会総会 分野別シンポジウム 2016.5.13 国内
8. Mitochondrial DNA depletion syndrome caused by homozygous mutation in MIC13, (口頭・ポスター), Kishita Y, Kohda M, Akita M, Mizuno Y, Yatsuka Y, Hirata T, Harashima H, Yamazaki T, Shimura M, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, 第 14 回 RCGM フロンティア国際シンポジウム, 2016/11/11, 国内.
9. Leukodystrophy associated with NDUFV1 mutations, (ポスター), Borna NN, Kishita Y, Kohda M, Murayama K, Ohtake A & Okazaki Y, 第 14 回 RCGM フロンティア国際シンポジウム, 2016/11/11, 国内.
10. Genetic analysis of mitochondrial disorder in Japanese patients, (口頭・ポスター), Kohda M, Kishita Y, Mizuno Y, Imai A, Nakaya A, Hirata T, Yatsuka Y, Borna NN, Harashima H, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, 第 14 回 RCGM フロンティア国際シンポジウム, 2016/11/11, 国内.
11. Comprehensive genomic analyses of mitochondrial respiratory chain disorders and development of in-house diagnostic panel, (口頭), Okazaki Y, 13th the Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM), 2016/10/30, 国内.
12. Biochemical and molecular analysis of Leigh's syndrome patients in Japan, (ポスター), Ogawa E, Fushimi T, Shimura M, Tajika M, Ichimoto K, Tsuruoka T, Yamazaki T, Mori M, Kohda M, Okazaki Y, Ohtake A, Murayama K, 13th ASMRM, 2016/10/30, 国内.
13. A novel mutation in TAZ causes mitochondrial respiratory chain disorder without cardiomyopathy, (ポスター), Borna NN, Kishita Y, Ishikawa K, Nakada K, Hayashi J, Tokuzawa Y, Kohda M, Nyuzuki H, Yamashita-Sugahara Y, Nasu T, Takeda A, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, 13th ASMRM, 2016/10/30, 国内.

14. Rapidly progressive infantile cardiomyopathy with mitochondrial respiratory chain complex V deficiency, (ポスター) , Imai A, Kishita Y, Nakayama Y, Fujita S, Futatani T, Kohda M, Yatsuka Y, Nakaya A, Sakata Y, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, 13th ASMRM, 2016/10/30, 国内.
15. Genetic analysis of mitochondrial disorder in Japanese patients, (ポスター) , Kohda M, Kishita Y, Mizuno Y, Imai A, Nakaya A, Hirata T, Yatsuka Y, Borna NN, Harashima H, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, 13th ASMRM, 2016/10/30, 国内.
16. Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan, (ポスター) , Matsunaga A, Murayama K, Fushimi T, Tajika M, Shimura M, Ichimoto K, Tsuruoka T, Yamazaki T, Kishita Y, Kohda M, Okazaki Y, Ohtake A, 13th ASMRM, 2016/10/30, 国内.
17. Mitochondrial DNA depletion syndrome caused by homozygous mutation in MIC13, (ポスター) , Kishita Y, Kohda M, Akita M, Mizuno Y, Yatsuka Y, Hirata T, Harashima H, Yamazaki T, Shimura M, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, 13th ASMRM, 2016/10/30, 国内.
18. Prenatal diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders caused by nuclear gene mutations, (ポスター) , Akiyama N, Murayama K, Yamazaki T, Harashima H, Shimura M, Fushimi T, Ichimoto K, Matsunaga A, Yatsuka Y, Kishita Y, Hirata T, Kohda M, Okazaki Y, Ohtake A, 13th ASMRM, 2016/10/30, 国内.
19. Genetic analysis of mitochondrial disorder in Japanese population, Kohda M , Kishita Y , Mizuno Y, Imai A, Nakaya A, Hirata T, Yatsuka Y, Borna N, Harashima H, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, American Society of Human Genetics 66th Annual Meeting, 2016/10/19, 国外.
20. Genetic analysis of mitochondrial disorder, (ポスター) , Kohda M, Kishita Y, Mizuno Y, Imai A, Nakaya A, Hirata T, Yatsuka Y, Borna N, Harashima H, Murayama K, Ohtake A and Okazaki Y, 第5回生命医薬情報学連合大会 (IIBMP 2016) , 2016/9/29, 国内.
21. Rapidly progressive infantile cardiomyopathy with mitochondrial respiratory chain complex V deficiency due to loss of ATP synthesis, (口頭) , 今井敦子, 藤田修平, 中山祐子, 武田充人, 坂田泰史, 大竹 明, 岡崎康司, 第52回日本小児循環器学会総会・学術集会, 2016/7/7, 国内.
22. 本邦におけるミトコンドリア肝症の臨床的・遺伝学的検討, (口頭) , 志村 優, 村山 圭, 伏見拓矢, 市本景子, 松永綾子, 森 雅人, 木下善仁, 徳澤佳美, 神田 将和, 岡崎康司, 大竹 明, (口頭) 第33回日本小児肝臓研究会, 2017/7/3, 国内.
23. Comprehensive genomic analysis identified mutations in nuclear-encoded mitochondria-related gene impairing mitochondrial fission and fusion balance, (ポスター) , Kishita Y, Suzuki S, Tokuzawa Y, Nyuzuki H, Kohda M, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, Keystone Symposia -Mitochondrial Dynamics (D2), 2016/4/5, 国外.
24. A mitochondrial tRNA modopathy due to QRSL1 mutations causes infantile mitochondrial disease, (口頭) , Akiyama N, Murayama K, Shimura M, Fushimi T, Ichimoto K, Mori M, Kishita Y, Tokuzawa Y, Kohda M, Suzuki T, Okazaki Y, Ohtake A, The 13th International Congress of Human Genetics (ICHG2016), 2016/4/4, 国内.

25. A comprehensive genomic analysis reveals the genetic landscape of mitochondrial respiratory chain complex deficiencies, (口頭) , Kohda M, Tokuzawa Y, Kishita Y, Moriyama Y, Mizuno Y, Hirata T, Yatsuka Y, Yamashita Y, Nakachiy Y, Kato H, Tamaru S, Nyuzuki H, Borna NN, Harashima H, Yamazaki T, Mori M, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, ICHG2016, 2016/4/4, 国内.
26. Clinical, Molecular basis and Genetics of Hepatocerebral Mitochondrial DNA Depletion Syndrome in Japanm, (口頭) , Shimura M, Murayama K, Fushimi T, Tajika M, Ichimoto K, Mori M, Kishita Y, Tokuzawa Y, Kohda M, Okazaki Y, Ohtake A, ICHG2016, 2016/4/4, 国内.
27. Whole exome analysis of mitochondrial respiratory chain disorders: Prenatal genetic diagnosis, (口頭) , Yamazaki T, Harashima H, Abe Y, Taniguchi M, Fushimi T, Ichimoto K, Yatsuka Y, Kishita Y, Tokuzawa Y, Hirata T, Kohda M, Okazaki Y, Murayama K, Ohtake A, ICHG2016, 2016/4/4, 国内.
28. PNPLA4 is a novel causative gene for mitochondrial respiratory chain disorder presenting with apparent life-threatening event, ポスター, Nyuzuki H, Kishita Y, Tokuzawa Y, Kohda M, Murayama K, Saitoh A, Ohtake A, Okazaki Y, ICHG2016, 2016/4/4, 国内.
29. A novel causative gene of mitochondrial respiratory chain disorders in an apparent life-threatening event (ALTE). (口頭) Matsunaga A, Murayama K, Okazaki Y, Ohtake A, et al. Society for the study of inborn errors of metabolism annual symposium (SSIEM) 2016.9.6-9 国外
30. 小児ミトコンドリア肝症の新規病因遺伝子(IARS)の発見～黒毛和種牛における虚弱子牛症候群との関連～ 志村 優, 村山 圭, 大竹 明, 他 (口頭) 第 43 回日本小児栄養消化器肝臓学会 2016. 9. 16-18 国内
31. Clinical, molecular and genetic characteristics of mitochondrial hepatopathy in Japan. (ベストポスター賞) 志村 優, 村山 圭, 岡崎康司, 大竹 明, 他 WCPGHAN 2016 2016.10.5-8 国外
32. QRSL1 遺伝子変異により肥大型心筋症を呈した乳児期ミトコンドリア病 (口頭) 福岡将治, 村山 圭, 大竹 明, 岡崎康司 第 25 回 日本小児心筋疾患学会学術集会 2016. 10. 8 国内
33. 進行性の乳児心筋症におけるミトコンドリア DNA 変異同定および ATP 合成酵素欠損の証明(口頭) 今井 敦子, 岡崎康司, 他 第 25 回 日本小児心筋疾患学会学術集会 2016. 10. 8 国内
34. 代謝疾患と心筋症 (特別講演) 大竹 明 第 25 回 日本小児心筋疾患学会学術集会 2016. 10. 8 国内
35. 脂肪酸代謝異常症におけるミトコンドリア呼吸機能への関与(ポスター) 田鹿牧子, 村山 圭, 大竹 明, 他 第 58 回日本先天代謝異常学会総会 2016. 10. 27-29 国内
36. 乳児・小児突然死におけるミトコンドリア呼吸鎖異常症—法医学教室との連携の利点と課題(口頭) 松永綾子, 村山 圭, 岡崎康司, 大竹 明, 他 第 58 回日本先天代謝異常学会総会 2016. 10. 27-29 国内
37. 乳児ミトコンドリア肝症の新規病因遺伝子(IARS)の発見、黒毛和種牛における虚弱子牛症候群との関連(口頭)(若手優秀演題賞) 志村 優, 村山 圭, 岡崎康司, 大竹 明, 他 第 58 回日本先天代謝異常学会総会 2016. 10. 27-29 国内

38. 新生児・小児ミトコンドリア病臨床情報バンク (MO Bank) の構築の意義 (講演) 村山 圭 第 58 回日本先天代謝異常学会総会 2016. 10. 27-29 国内
39. Clinical, molecular and genetic characteristics of mitochondrial hepatopathy in Japan. 志村 優、村山 圭 (口頭) 第 13 回アジアミトコンドリア学会・第 16 回日本ミトコンドリア学会 2016.10.30-11.1 国内
40. The diversity of mitochondria diseases: An overview. 村山 圭 (口頭) 第 13 回アジアミトコンドリア学会・第 16 回日本ミトコンドリア学会 2016. 10. 30-11. 1 国内
41. 小児科医・小児神経科医に必要な代謝性疾患～基礎と最新の知見～ (口頭) 村山 圭 第 6 回茨城小児神経懇話会 2017. 1. 22 国内
42. Mitochondria: Diversity of mitochondrial diseases Murayama K (口頭) 2017 Educational Seminar of Genetic & Metabolic diseases for Young Pediatricians 22.January.2017 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. ミトコンドリア病 治療に光 村山 圭 日本経済新聞 朝刊 2016.7.10 国内
2. 小児ミトコンドリア病の新規病因遺伝子の発見について－黒毛和種牛における虚弱子牛症候群との関連－ 村山 圭、岡崎康司、大竹 明 国立研究開発法人日本医療研究開発機構HP、千葉県病院局HP (プレスリリース) 2016.7.15 国内
3. 遺伝子診断システムの現状, 岡崎 康司, [ミトコンドリア病研究]第 2 回 患者公開フォーラム, 2017/2/25, 国内.
4. ミトコンドリア病診療システム; レジストリの意義, 大竹 明, [ミトコンドリア病研究]第 2 回 患者公開フォーラム, 2017/2/25, 国内.

(4) 特許出願

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業
(英語) Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases
- 研究開発課題名： (日本語) 創薬を見据えたミトコンドリア病の新規病因遺伝子の発見とその病態解明
(英語) Far seeing drug discovery, the research for identification of novel causative gene of mitochondrial disorders and investigation of molecular pathogenesis
- 研究開発担当者 (日本語) 千葉県こども病院 代謝科 部長/千葉県がんセンター 研究所 主任医長
村山 圭
- 所属 役職 氏名： (英語) Kei Murayama, Director, Department of Metabolism, Chiba Children's Hospital/ Chief doctor, Chiba Cancer Center , Research Institute
- 実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究
開発課題名： (日本語) 新規遺伝子の同定・病態解明
(英語) Identification of novel causative gene of mitochondrial disorders and investigation of molecular pathogenesis
- 研究開発分担者 (日本語) 学校法人埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター 教授・所長 岡崎 康司
所属 役職 氏名： (英語) Research Center for Genomic Medicine, Saitama Medical University, Professor/Director, Yasushi Okazaki
- 分担研究 (日本語) 検体サンプリング、研究・診療基盤 (診断システム・レジストリシステム) の応用と発展
開発課題名： (英語) Sampling and clinical application & development for diagnostic system and patient registry
- 研究開発分担者 (日本語) 埼玉医科大学 小児科 大竹 明
所属 役職 氏名： (英語) Department of Pediatrics, Saitama Medical University
Akira Ohtake

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：千葉県がんセンター・研究所・主任医長・村山圭 総括研究報告を参照。

エクソーム解析によるミトコンドリア病の原因遺伝子探索を実施するため、新規ミトコンドリア病検体の収集を進めた。また、診断済みの検体についても保存されていた組織検体から DNA の抽出を行った。最終的に 20 のエクソーム解析を実施した。候補となったバリエントを対象に現在家族におけるハプロタイプ解析を進めている。

エクソーム解析によってミトコンドリア DNA 枯渇症の患者から *MIC13* 遺伝子のフレームシフトバリエントを発見した。*MIC13* はミトコンドリアのクリステ形成に関わる MICOS complex の一つである。患者由来の線維芽細胞の解析から *MIC13* のタンパク質が消失しているのを確認し、また透過型電子顕微鏡の観察によりクリステ構造異常が認められた。さらに、正常型の *MIC13* を患者由来線維芽細胞に導入したところ、ミトコンドリア機能が改善したことから、この *MIC13* のバリエントが疾患の原因となることを明らかにした。また、本研究は現在論文投稿準備中である。これ以外にも *PNPLA4* などの原因候補遺伝子の解析を進めた。

また、新規ミトコンドリア DNA バリエントと疾患との関連を、患者由来のミトコンドリアゲノムと HeLa 細胞由来の核ゲノムを持つサイブリッド細胞を用い検証した。14597A>G (*MTND6*) は、新規の病因候補バリエントとして発見されたが、これがミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の活性低下をもたらすことをサイブリッド細胞の実験から明らかにした。また、ゼブラフィッシュの疾患モデル実験を導入するため、飼育施設等の環境整備を進め、ゼブラフィッシュの飼育を開始した。

遺伝子診断結果を検討するため、埼玉医科大学で月 2 回のペースで研究会議を実施した。臨床家と研究者を交えて、症例と原因遺伝子の関連を議論した。また、2017 年 1 月には研究班全体での進捗報告会を行い、それぞれの研究について議論を交わした。

In order to advance the genetic diagnosis of mitochondrial disorders using whole exome sequencing, we worked hard to biochemically and clinically diagnose new patients as mitochondrial disorders. We isolated DNA from old stored tissue samples. Finally, we perform whole exome sequencing of samples from 20 individuals with mitochondrial defects. We are validating prioritized variants detected in patients by Sanger sequencing and phasing compound heterozygous variants through Sanger sequencing of family DNA samples.

The whole exome sequencing of one MTDPS patient identified homozygous frameshift mutation in *MIC13*. *MIC13* (also known as *QIL1* or *C19orf70*) is a component of the MICOS complex which plays crucial roles in the maintenance of cristae junctions at the mitochondrial inner membrane. In the present study, we found apparent loss of protein probably due to the non-sense mediated decay. The reduced cristae structures in mitochondria of the patient-derived fibroblasts were observed by transmission electron microscope. The wild type cDNA of *MIC13* was introduced into fibroblast cells from the patient by lentivirus systems. Stable expression of *MIC13* in fibroblasts

restored mitochondrial respiratory chain complex deficiencies. Our findings indicate that mutation in *MIC13* causes mitochondrial respiratory chain complex deficiency, MTDPS and defects in cristae organization. We are preparing for the submission of the article.

For evaluating the biochemical and molecular pathogenicity of novel mtDNA variants, we generated cybrid cell lines that carried the mtDNA of a patient with mitochondrial disorders. 14597A>G (*MTND6*) was identified as novel mtDNA variant in a case with Leigh syndrome and experiments using cybrid cells confirmed the pathogenicity of this variant. To introduce the Zebrafish model system, a Zebrafish facility suitable for breeding and in vivo research was built. To interpret the results of a genetic test, we held a meeting twice a month at Saitama Medical University. Clinicians and researchers debated about the relationship between a case and a candidate gene. Furthermore, we opened progress meeting in the whole study group and exchanged opinions about our research.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1件、国際誌 6件）

1. Zaha K, Matsumoto H, Itoh M, Saito H, Kato K, Kato M, Ogata S, Murayama K, Kishita Y, Mizuno Y, Kohda M, Nishino I, Ohtake A, Okazaki Y, Matsumoto N, Nonoyama S. DNMI1L-related encephalopathy in infancy with Leigh syndrome-like phenotype and suppression-burst. *Clin Genet*. 2016 Nov;90(5):472-474.
2. Imai A, Kohda M, Nakaya A, Sakata Y, Murayama K, Ohtake A, Lathrop M, Okazaki Y, Ott J. HDR: a statistical two-step approach successfully identifies disease genes in autosomal recessive families. *J Hum Genet*. 2016 Nov;61(11):959-963.
3. Imai A, Kishita Y, Nakayama Y, Fujita S, Futatani T, Kohda M, Yatsuka Y, Nakaya A, Sakata Y, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. Dried blood spots for newborn screening allows easy determination of a high heteroplasmy rate in severe infantile cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 2016 Oct 15;221:446-9.
4. Kopajtich R, Murayama K, Janecke AR, Haack TB, Breuer M, Knisely AS, Harting I, Ohashi T, Okazaki Y, Watanabe D, Tokuzawa Y, Kotzaeridou U, Kölker S, Sauer S, Carl M, Straub S, Entenmann A, Gizewski E, Feichtinger RG, Mayr JA, Lackner K, Strom TM, Meitinger T, Müller T, Ohtake A, Hoffmann GF, Prokisch H, Stauffer C. Biallelic IARS Mutations Cause Growth Retardation with Prenatal Onset, Intellectual Disability, Muscular Hypotonia, and Infantile Hepatopathy. *Am J Hum Genet*. 2016 Aug 4;99(2):414-22.
5. ミトコンドリア呼吸鎖異常症のゲノム解析, 神田将和, 岡崎康司, バイオインダストリー(B&I), 2016, 74(4),321-323 頁
6. 武者育麻、味原さや香、荒尾正人、菊池 透、大竹 明：カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 2 欠損症の臨床的多様性：幼児突然死例と 63 歳で診断された例. 特殊ミルク情報 2016, 52: 27-31.

7. Kohda M, Tokuzawa Y, Kishita Y, Nyuzuki H, Moriyama Y, Mizuno Y, Hirata T, Yatsuka Y, Yamashita-Sugahara Y, Nakachi Y, Kato H, Okuda A, Tamaru S, Borna NN, Banshoya K, Aigaki T, Sato-Miyata Y, Ohnuma K, Suzuki T, Nagao A, Maehata H, Matsuda F, Higasa K, Nagasaki M, Yasuda J, Yamamoto M, Fushimi T, Shimura M, Kaiho-Ichimoto K, Harashima H, Yamazaki T, Mori M, Murayama K, [Ohtake A](#), Okazaki Y: Comprehensive Genomic Analysis Reveals the Genetic Landscape of Mitochondrial Respiratory Chain Complex Deficiencies. *PLoS Genet* 2016, 12(1): e1005679.
8. Imai A, Fujita S, Kishita Y, Kohda M, Tokuzawa Y, Hirata T, Mizuno Y, Harashima H, Nakaya A, Sakata Y, Takeda A, Mori M, Murayama K, [Ohtake A](#), Okazaki Y: Rapidly progressive infantile cardiomyopathy with mitochondrial respiratory chain complex V deficiency due to loss of ATPase 6 and 8 protein. *Int J Cardiol* 2016, 207: 203-205.
9. Higuchi T, Kobayashi M, Ogata J, Kaneshiro E, Shimada Y, Kobayashi H, Eto Y, Maeda S, [Ohtake A](#), Ida H, Ohashi T: Identification of Cryptic Novel α -Galactosidase A Gene Mutations: Abnormal mRNA Splicing and Large Deletions. *JIMD Rep* 2016, 30: 63-72.
10. Hashimura Y, Morioka I, Hisamatsu C, Yokoyama N, Taniguchi-Ikeda M, Yokozaki H, Murayama K, [Ohtake A](#), Itoh K, Takeshima Y, Iijima K: A neonate with mitochondrial respiratory chain complex IV deficiency complicated with chronic intestinal pseudo-obstruction. *Pediatr Int* 2016, 58 (7): 651-655.
11. Suzuki S, Kotani T, Mori K, Kawamura K, [Ohtake A](#): Analysis of Preoperative Urinary Tract Obstruction in Patients with Scoliosis. *Pediatr Int* 2017, 59 (1): 48-52.
12. Yamazaki T, Shibuya A, Ishii S, Miura N, [Ohtake A](#), Sasaki N, Araki R, Ota Y, Fujiwara M, Miyajima Y, Uetake K, Hamahata K, Kato K, Kawakami K, Toyoda H, Moriguchi N, Okada M, Nishi M, Ogata Y, Takimoto T, Ohga S, Ohta S, Amemiya S: High-dose cepharanthin therapy for pediatric patients with chronic immune thrombocytopenia in Japan. *Pediatr Int* 2016, 59(3): 303-308.
13. Borna NN, Kishita Y, Ishikawa K, Nakada K, Hayashi JI, Tokuzawa Y, Kohda M, Nyuzuki H, Yamashita-Sugahara Y, Nasu T, Takeda A, Murayama K, [Ohtake A](#), Okazaki Y: A novel mutation in TAZ causes mitochondrial respiratory chain disorder without cardiomyopathy. *J Hum Genet* 2017, 62(5):539-547.
14. Miyatake S, Okamoto N, Stark Z, Nabetani M, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Mizuguchi T, [Ohtake A](#), Saitsu H, Matsumoto N: ANKRD11 variants cause variable clinical features associated with KBG syndrome and Coffin-Siris-like syndrome. *J Hum Genet* 2017 Mar 2. doi: 10.1038/jhg.2017.24. [Epub ahead of print]
15. Ogawa E, Shimura M, Fushimi T, Tajika M, Ichimoto K, Matsunaga A, Tsuruoka T, Ishige M, Fuchigami T, Yamazaki T, Mori M, Kohda M, Kishita Y, Okazaki Y, Takahashi S, [Ohtake A](#), Murayama K: Clinical validity of biochemical and molecular analysis in diagnosing Leigh syndrome: a study of 106 Japanese patients. *J Inherit Metab Dis* 2017 Apr 20. doi: 10.1007/s10545-017-0042-6. [Epub ahead of print]

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ミトコンドリア呼吸鎖異常症の包括的ゲノム解析, 口頭, 岡崎 康司, 村山 圭, 大竹 明, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/2, 国内.
2. ミトコンドリア病を疑う集団における遺伝的背景, ポスター, 神田 将和、木下 善仁、水野 洋介、今井 敦子、中谷 明弘、平田 智子、八塚 由紀子、Nurun N. Borna、原嶋 宏子、村山 圭、大竹 明、岡崎 康司, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/2, 国内.
3. Mitochondrial DNA depletion syndrome caused by homozygous mutation in MIC13, 口頭・ポスター, Kishita Y, Kohda M, Akita M, Mizuno Y, Yatsuka Y, Hirata T, Harashima H, Yamazaki T, Shimura M, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, 第 14 回 RCGM フロンティア国際シンポジウム, 2016/11/11, 国内.
4. Leukodystrophy associated with NDUFV1 mutations, ポスター, Borna NN, Kishita Y, Kohda M, Murayama K, Ohtake A & Okazaki Y, 第 14 回 RCGM フロンティア国際シンポジウム, 2016/11/11, 国内.
5. Genetic analysis of mitochondrial disorder in Japanese patients, 口頭・ポスター, Kohda M, Kishita Y, Mizuno Y, Imai A, Nakaya A, Hirata T, Yatsuka Y, Borna NN, Harashima H, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, 第 14 回 RCGM フロンティア国際シンポジウム, 2016/11/11, 国内.
6. Comprehensive genomic analyses of mitochondrial respiratory chain disorders and development of in-house diagnostic panel, 口頭, Okazaki Y, 13th the Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM), 2016/10/30, 国内.
7. Biochemical and molecular analysis of Leigh's syndrome patients in Japan, ポスター, Ogawa E, Fushimi T, Shimura M, Tajika M, Ichimoto K, Tsuruoka T, Yamazaki T, Mori M, Kohda M, Okazaki Y, Ohtake A, Murayama K, 13th ASMRM, 2016/10/30, 国内.
8. A novel mutation in TAZ causes mitochondrial respiratory chain disorder without cardiomyopathy, ポスター, Borna NN, Kishita Y, Ishikawa K, Nakada K, Hayashi J, Tokuzawa Y, Kohda M, Nyuzuki H, Yamashita-Sugahara Y, Nasu T, Takeda A, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, 13th ASMRM, 2016/10/30, 国内.
9. Rapidly progressive infantile cardiomyopathy with mitochondrial respiratory chain complex V deficiency, ポスター, Imai A, Kishita Y, Nakayama Y, Fujita S, Futatani T, Kohda M, Yatsuka Y, Nakaya A, Sakata Y, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, 13th ASMRM, 2016/10/30, 国内.
10. Genetic analysis of mitochondrial disorder in Japanese patients, ポスター, Kohda M, Kishita Y, Mizuno Y, Imai A, Nakaya A, Hirata T, Yatsuka Y, Borna NN, Harashima H, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, 13th ASMRM, 2016/10/30, 国内.
11. Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan, ポスター, Matsunaga A, Murayama K, Fushimi T, Tajika M, Shimura M, Ichimoto K, Tsuruoka T, Yamazaki T, Kishita Y, Kohda M, Okazaki Y, Ohtake A, 13th ASMRM, 2016/10/30, 国内.

12. Mitochondrial DNA depletion syndrome caused by homozygous mutation in MIC13, ポスター, Kishita Y, Kohda M, Akita M, Mizuno Y, Yatsuka Y, Hirata T, Harashima H, Yamazaki T, Shimura M, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, 13th ASMRM, 2016/10/30, 国内.
13. Prenatal diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders caused by nuclear gene mutations, ポスター, Akiyama N, Murayama K, Yamazaki T, Harashima H, Shimura M, Fushimi T, Ichimoto K, Matsunaga A, Yatsuka Y, Kishita Y, Hirata T, Kohda M, Okazaki Y, Ohtake A, 13th ASMRM, 2016/10/30, 国内.
14. Genetic analysis of mitochondrial disorder in Japanese population, Kohda M, Kishita Y, Mizuno Y, Imai A, Nakaya A, Hirata T, Yatsuka Y, Borna N, Harashima H, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, American Society of Human Genetics 66th Annual Meeting, 2016/10/19, 国外.
15. Genetic analysis of mitochondrial disorder, ポスター, Kohda M, Kishita Y, Mizuno Y, Imai A, Nakaya A, Hirata T, Yatsuka Y, Borna N, Harashima H, Murayama K, Ohtake A and Okazaki Y, 第5回生命医薬情報学連合大会 (IIBMP 2016), 2016/9/29, 国内.
16. Rapidly progressive infantile cardiomyopathy with mitochondrial respiratory chain complex V deficiency due to loss of ATP synthesis, 口頭, 今井 敦子, 藤田 修平, 中山 祐子, 武田 充人, 坂田 泰史, 大竹 明, 岡崎 康司, 第52回日本小児循環器学会総会・学術集会, 2016/7/7, 国内.
17. 本邦におけるミトコンドリア肝症の臨床的・遺伝学的検討, 口頭, 志村 優, 村山 圭, 伏見 拓矢, 市本 景子, 松永 綾子, 森 雅人, 木下 善仁, 徳澤 佳美, 神田 将和, 岡崎 康司, 大竹 明, 第33回日本小児肝臓研究会, 2017/7/3, 国内.
18. Comprehensive genomic analysis identified mutations in nuclear-encoded mitochondria-related gene impairing mitochondrial fission and fusion balance, ポスター, Kishita Y, Suzuki S, Tokuzawa Y, Nyuzuki H, Kohda M, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, Keystone Symposia -Mitochondrial Dynamics (D2), 2016/4/5, 国外.
19. A mitochondrial tRNA modopathy due to QRSL1 mutations causes infantile mitochondrial disease, 口頭, Akiyama N, Murayama K, Shimura M, Fushimi T, Ichimoto K, Mori M, Kishita Y, Tokuzawa Y, Kohda M, Suzuki T, Okazaki Y, Ohtake A, The 13th International Congress of Human Genetics (ICHG2016), 2016/4/4, 国内.
20. A comprehensive genomic analysis reveals the genetic landscape of mitochondrial respiratory chain complex deficiencies, 口頭, Kohda M, Tokuzawa Y, Kishita Y, Moriyama Y, Mizuno Y, Hirata T, Yatsuka Y, Yamashita Y, Nakachiy Y, Kato H, Tamaru S, Nyuzuki H, Borna NN, Harashima H, Yamazaki T, Mori M, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, ICHG2016, 2016/4/4, 国内.
21. Clinical, Molecular basis and Genetics of Hepatocerebral Mitochondrial DNA Depletion Syndrome in Japan, 口頭, Shimura M, Murayama K, Fushimi T, Tajika M, Ichimoto K, Mori M, Kishita Y, Tokuzawa Y, Kohda M, Okazaki Y, Ohtake A, ICHG2016, 2016/4/4, 国内.
22. Whole exome analysis of mitochondrial respiratory chain disorders: Prenatal genetic diagnosis, 口頭, Yamazaki T, Harashima H, Abe Y, Taniguchi M, Fushimi T, Ichimoto K, Yatsuka Y, Kishita Y, Tokuzawa Y, Hirata T, Kohda M, Okazaki Y, Murayama K, Ohtake A, ICHG2016, 2016/4/4, 国内.

23. PNPLA4 is a novel causative gene for mitochondrial respiratory chain disorder presenting with apparent life-threatening event, ポスター, Nyuzuki H, Kishita Y, Tokuzawa Y, Kohda M, Murayama K, Saitoh A, Ohtake A, Okazaki Y, ICHG2016, 2016/4/4, 国内.
24. 大竹 明 : 指定難病に含まれる先天代謝異常症—治療できる病気もいっぱいあります. 先天代謝異常症医療講演会 東京都難病相談・支援センター (渋谷区広尾), 2016/6/25, 国内
25. 大竹 明 : 代謝救急ガイドライン-critical sample の採取と救命に向けた輸液法. 2106 Renal Weekend 研修医のための輸液セミナー 大村進・美枝子記念聖路加臨床学術センター (東京都中央区), 2016/8/28, 国内
26. 大竹 明 : 代謝疾患と心筋症. 第 25 回日本小児心筋疾患学会学術集会 特別講演 1 東京都医師会館 (千代田区神田駿河台), 2016/10/8, 国内
27. Ohtake A: Shifts in the diagnostic paradigm of mitochondrial disease: From 'one gene-one enzyme' to 'too many genes-diverse phenomena'. Key Note Lecture. The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine [ASMRM] and the 16th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine [J-mit], TKP Garden City Shinagawa (Tokyo, Japan), 2016/9/30-10/1, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 遺伝子診断システムの現状, 岡崎 康司, [ミトコンドリア病研究]第 2 回 患者公開フォーラム, 2017/2/25, 国内.
2. 小児ミトコンドリア病の新規病因遺伝子の発見について—黒毛和種牛における虚弱子牛症候群との関連— 村山 圭, 岡崎康司, 大竹 明 国立研究開発法人日本医療研究開発機構HP、千葉県病院局HP (プレスリリース) 2016.7.15 国内
3. ミトコンドリア病診療システム; レジストリの意義, 大竹 明, [ミトコンドリア病研究]第 2 回 患者公開フォーラム, 2017/2/25, 国内.

(4) 特許出願

特になし