

表 2 小児期, 思春期における抗不安薬の投与量

薬名	初期投与量 (mg)		最大投与量 (mg/kg/日)
	小児期	思春期	
アルプラゾラム	0.5~0.6 分2~3	0.5~0.8 分2~3	0.005~0.05
クロナゼパム	0.25 分1	1.5 分3	0.02~0.1
ロラゼパム	0.5~0.8 分2~3	1.0~1.5 分2~3	0.02~0.1

(McDermott ら<sup>12)</sup> 2001 より一部改変)

る患者は、とくに短時間作用型ベンゾジアゼピンによってもうろう状態、不眠をきたしやすい。なお、不眠に睡眠時無呼吸を伴う場合には禁忌である。

ベンゾジアゼピンの退薬症状として不安、不定愁訴、いらつき、頭痛、発汗、消化器症状、不眠、筋緊張亢進などがある。また、けいれんの既往のある児では、ベンゾジアゼピンの突然の中断によりけいれん発作が誘発される可能性がある。

### 2) 5HT1A 受容体作動薬

新しい抗不安薬としてセロトニン 5HT1A 受容体作動薬 (タンドスピロン) がある。セロトニン 5HT1A 受容体作動薬の抗不安効果の作用機序は明らかではない。即効性はなく、抗不安作用が現れるまで投与開始後 2 週間ほどを要する。

5HT1A 受容体作動薬の副作用はふらつき、軽度の眠気、脱力感、頭痛、胃部不快感などであるが、あっても軽度であることが多い。また耐性や依存を形成せず、退薬症状もない。これらの特徴から 5HT1A 受容体作動薬は小児でも広く使われているが、小児における臨床効果に関する研究は少なく、その有効性はまだ確立されていない。

### 3) その他

TCA や SSRI もさまざまな不安障害に対し効果があると考えられている。すでに鎮痛目的で TCA や SSRI が投与されている場合でも、抗うつ作用を期待できる投与量まで増量するとよい。

抗ヒスタミン薬は鎮静薬としてよく用いられるが、抗不安、催眠薬として使用されることもある。その安全性、適応についての見解は一定していない。身体依存を形成しないことから、ベンゾジアゼピンの代わりに利用できるとする意見から、適応を睡眠導入目的にとどめておいたほうがよいという意見までさまざまである。

抗不安作用を期待してエピネフリン  $\beta$  受容体阻害薬 (プロプラノロールなど) が投与されることがあるが、その有効性はまだ確立されていない。

### 文 献

- 1) Panksepp J: The source of fear and anxiety in the animal. In *Affective Neuroscience: the Foundations of Human and Animal Emotions*, Oxford University Press, pp 204-214, 1998
- 2) Allen RR, Casey KL: Pain: general recommendations. In Johnson RT, Riffin JW (eds): *Current Therapy in Neurologic Disease*, Mosby-Year Book, pp 70-78, 1993
- 3) Olsson GL: Neuropathic pain in children. In McGrath PJ, Finley GA (eds): *Chronic and Recurrent Pain in Children and Adolescents*, IASP Press, Seattle, pp 77-79, 1999
- 4) Hershey AD, Powers SW, Benti AL, Degrauw TJ: Effectiveness of amitriptyline in the prophylactic management of childhood headaches. *Headache* 40: 539-549, 2000
- 5) Saruhashi Y, Young W, Perkins R: The recovery of 5-HT immunoreactivity in lumbosacral spinal cord and locomotor function after thoracic hemisection. *Exp Neurol* 139: 203-213, 1996
- 6) Hains BC, Everhart AW, Hulsebosch CE: Changes in serotonin, serotonin transporter expression and serotonin denervation supersensitivity: involvement in chronic central pain after spinal hemisection in the rat. *Exp Neurol* 175: 347-362, 2002
- 7) Galenotti N, Ghelardini C, Bartolini A: Involvement of potassium channels in amitriptyline and clomipramine analgesia. *Neuropharmacology* 40: 75-84, 2001
- 8) Aronoff GM, Gallagher RM, Patel JG: Pharmacological management of chronic pain: Review. In Tollison CD, Satterthwaite JR, Tollison JW (eds): *Practical Pain Management*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p 262, 2002
- 9) McQuay H, Moore A: Antidepressants in neuropathic pain. In McQuay H, Moore A (eds): *An*

- Evidence Based Resource for Pain Relief, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, pp 231-241, 1998
- 10) Kutcher SP, Reiter S, Gardner DM, et al : The pharmacotherapy of anxiety disorders in children and adolescents. *Psychiatr Clin North Am* 15 : 41-67, 1992
  - 11) Kutcher SP, MacKenzie S : Successful clonazepam treatment of adolescents with panic disorder. *J Clin Psychopharmacol* 8 : 299-301, 1988
  - 12) McDermott JF, Weller EB : Anxiety disorders in children and adolescents. In Gabbard GO, et al (eds) : *Treatments of Psychiatric Disorders*, 3rd ed, American Psychiatric Press, Washington DC, p 234, 2001

# 研 究 臨 床

## 第64回学術講演会

### 3) 大脳の発生から考える小児神経疾患

慶應義塾大学医学部小児科 高橋 孝雄

小児科医が日常診療においてあつかう神経疾患の大半は、発達障害か痙攣性疾患である。大脳機能である知能は、胎内で緻密な発生メカニズムに基づいて周到に準備され、生後の数年間で急速に育まれるものである。また、てんかんなどの痙攣性疾患の一部は大脳皮質の構造異常が原因である。したがって、大脳の発生・成熟過程を理解することは小児神経疾患の診療において特に重要である。胎内で起こる大脳皮質発生の概略、生後12ヶ月間に起こる大掛かりな大脳皮質の構造変化を、大脳機能発達のメカニズムとその障害に関連させてご紹介する。

#### 知能発達とは

知能とは、日常生活を送るうえで必須の神経機能である。何をもって知能とするかは難しいが、ここでは以下のように考えてみる。まず、視覚、聴覚、触覚などから情報を得ること（入力系）が重要である。時々刻々と変化する外界の情報をリアルタイムに収集するためには“注意力”が必要である。注意力とは、今必要なことに意識を集中し、必要のないことを無視し、その状態を一定時間維持することである。得られた情報は一時的な記憶、すなわちワーキングメモリーとして前頭連合野などの大脳皮質に蓄えられる。さらに、情報を処理して計画を立て、言語や行動として出力す

る（出力系）。われわれは、以上の過程を繰り返すことによって日常生活を送っている。また、一度経験したことを長期記憶として大脳の別の場所に蓄え、同じ状況では以前よりもずっとすばやく、正しい行動が起こせるようになる。これを学習と呼ぶ。知能発達を定義することは知能を定義することよりも更に難しいが、乳幼児が“情報処理能力”を獲得する過程であるとも言える。

#### 大脳皮質の縦軸と横軸

大脳表面には機能別に地図が描かれており、これを横軸とする。すなわち、大脳皮質は前頭葉、頭頂葉、後頭葉、側頭葉に分かれ、さらに各々は機能的に細分化されている。一方、大脳の横軸に沿ってどこを選んだとしても、大脳皮質は表面から深層に向けて6層構造である。これを大脳皮質の縦軸とする。

大脳皮質の縦軸すなわち6層構造は3段階の過程を経て作られる（図1A）。第1段階は、神経前駆細胞の細胞分裂によって神経細胞が産生される過程である。大脳皮質の神経細胞の大半は、側脳室壁を取り囲む特殊な神経上皮である神経前駆細胞から産生される。神経細胞の産生は、胎児期の限られた期間にのみ起こる。ヒトの場合、妊娠6週頃から約3ヶ月間、マウスの場合、胎生10日頃から約6日間に起こると考えられている。第2

段階は、若い神経細胞が大腦表層へ移動する過程、第3段階は、大腦皮質においてシナプス形成、ミエリン形成などの成熟が進む過程である。

皮質発生異常の多くは縦軸の発生異常として理解されている

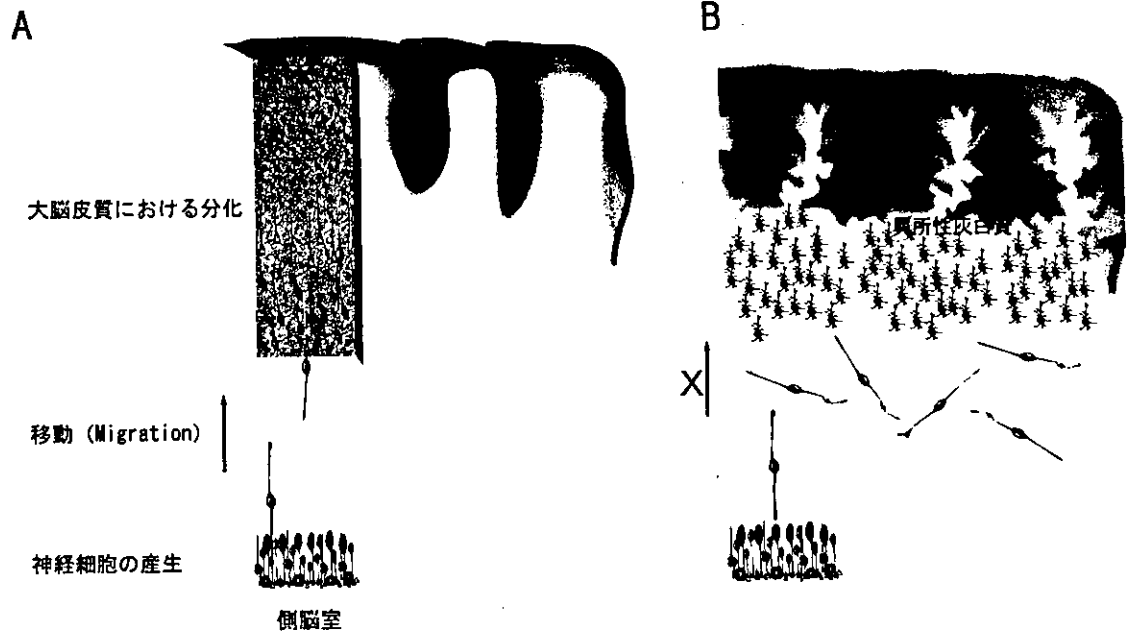
発達遅滞や難治性てんかんの原因として、皮質発生異常は決して希なものではない。特にMRIの普及によりその診断率は飛躍的に向上した。皮質形成異常の定義、分類、発生機序について一定の見解はないが、多くは神経細胞の移動障害 (Migration Disorder)、すなわち縦軸発生第2段階に起こった異常とされている(図1 B)。例えば、滑脳症、結節性硬化症における大腦皮質形成異常

である。これらの疾患では、発達遅滞やてんかんが主要症状である。

子宮内でダイオキシンの曝露することによって大腦皮質の発生異常をきたす可能性がある

大腦皮質の形成過程が障害される結果、知能発達に障害をきたしうる例として、ダイオキシンの胎内曝露について紹介する。ダイオキシンは環境汚染物質のひとつであり、精子数の減少、男性の女性化、甲状腺機能をはじめとするホルモン異常の原因 (内分泌かく乱物質) として知られている。さらに、動物実験から、細胞分裂を障害すること、ラットの空間学習能力を障害することなどが分かってきた。マウスの妊娠期間は18日で、前述のよ

図1



A 大腦皮質発生の3段階

側脳室に沿った特殊神経上皮で神経前駆細胞が分裂増殖し、神経細胞が産生される。分裂を終えた幼若な神経細胞は大腦表層へと移動する(上向き矢印)。大腦皮質ではシナプス形成、ミエリン形成、細胞死などの成熟過程が起こる。

B Migration Disorder

神経細胞の移動が障害されると(X)異所性に灰白質が形成される。異常な神経細胞は、てんかん発作の原因となり、また、皮質の正常6層構造の乱れから、知能発達も障害される場合がある。

うに、神経前駆細胞から神経細胞が作られるのは、胎生10日目頃から約6日間である。妊娠初期（妊娠7日目）にダイオキシンを1回だけ経口投与し、その1週間後に子宮内のマウス胎仔の脳を調べたところ、縦軸発生の第1段階、すなわち神経前駆細胞から神経細胞が作られる過程がおおよそ1日分、遅滞していることが分かった。以上の結果は、極めて大量のダイオキシンを用いた動物実験の結果である。したがって、実際の環境中に存在するダイオキシンが、子どもたちの知能発達に悪影響を及ぼすか否かについては、さらに多くの研究が必要である。

乳児期に起こる急速な知能発達は横軸の発達（大脳各領域の連携確立）である

前頭葉、後頭葉、頭頂葉、側頭葉が有機的に関連付けられること（ネットワーク形成）によって情報処理能力が獲得されてゆく過程が知能発達のプロセスである、と考えることが可能である。すなわち、知能発達とは、大脳皮質の横軸に沿った連携を作り上げることであると言える。知能発達のためのネットワーク形成（横軸の連携）には、大脳皮質と大脳基底核・視床などの深部灰白質、更には脳幹部などとの連携強化が重要である。そのためには、シナプス形成、ミエリン形成といった神経細胞レベルでの成熟が必要不可欠である。乳児の知能発達に関する詳しい研究の結果、ワーキングメモリーは生後8ヶ月から12ヶ月にかけて急速に発達することが分かってきた。これは、前頭連合野のシナプス形成、ミエリン形成（髄鞘化）が急速に進行する時期と一致している（図2）。

大脳皮質が作られる過程で、いつ、どのようにして横軸が決められるのか、すなわち、どのようにして前頭葉や後頭葉といった特徴付け（specification）がなされるのかは、神経科学の重要な研究課題となっている。神経前駆細胞が盛んに分裂増殖して神経細胞を産生している段階（大脳皮質発生の第1段階）において既に基本的specificationが行われる、とする研究者も多い。筆者もその一人であり、今後も知能発達のメカニズム解明のために研究を進めていきたいと考えている。



図2

生後3ヶ月と12ヶ月の正常MRI（T1強調画像）  
生後12ヶ月間で、大脳容積が増大すると同時に、白質におけるミエリン形成過程が進行する。大脳皮質各領域（前頭葉、後頭葉など）の連携、大脳皮質と深部灰白質、脳幹部などとの連携、すなわち横軸の連携が急速に形成される。

#### まとめ

大脳皮質には縦軸と横軸があること、大脳皮質縦軸の発生には3段階あること、縦軸発生の第1段階（神経細胞の産生）がダイオキシンによって障害される可能性があること、縦軸発生の第2段階（神経細胞の移動）の異常が皮質形成異常の原因として重要であること、横軸の連携確立が乳幼児の知能発達と密接に関連していることを述べた。

## 細胞周期と大脳皮質発生

高橋 孝雄 慶應義塾大学教授  
小児科  
たかはし たか お

高次脳機能の中核である大脳新皮質は、胎児期に神経細胞産生 neuronogenesis, 神経細胞の大脳表層への移動, シナプス形成などの成熟過程, の3段階を経て形成される<sup>1)</sup>(図). Neuronogenesis の過程で, 大脳新皮質の神経細胞は神経前駆細胞 neuronal progenitor cells(NPC)が分裂増殖, 分化誘導されることにより産生される<sup>2,3)</sup>(図). Neuronogenesis には以下の特徴がある. (1)胎生期の限られた期間(ヒトでは妊娠6週頃から約3ヵ月間, マウスでは胎生10日頃から約6日間)にのみおこる, (2)NPCの細胞分裂動態は各種成長因子など外的因子により緻密な制御を受けている, (3)放射線, 薬物等に対する感受性が高い. したがって, 妊娠中の種々の環境因子(母体に対する外部からの有害作用, 薬物投与, 環境ホルモンなど)は neuronogenesis に影響を及ぼし, 大脳皮質の発生, ひいては出生後の高次脳機能の獲得に重大な影響を及ぼす可能性がある<sup>4)</sup>.

大脳皮質発生における細胞周期を制御する因子は, NPCの分裂回数, 分化開始の確率, G1期の長さ, である.

**NPC細胞の分裂回数:** Neuronogenesis は前述のように胎生期の限定された期間におこるが, マウスの場合 NPCは合計11回の細胞分裂を通じて神経細胞を産生する<sup>5)</sup>. Neuronogenesis の早期に産生された神経細胞は皮質深層に, 後期に産生された神経細胞は浅層に分布する. マウスにおいては, 細胞周期番号(1~11番)と, 各々の細胞周期から産生された神経細胞の大脳皮質内分布パターンの密接な相関関係が定量的に立証されている<sup>6)</sup>. 投射ニューロンの形態および機能は, 大脳皮質内層分布と密接に関連していることから, 細胞周期番号と神経細胞の表現型もまた密接に関連していると予想

される.

**分化開始の確率:** G2期にあるNPCは, M期(細胞分裂)を経て2つの娘細胞となりG1期に入る. G1期の娘細胞は, ①S期に進みNPCとしての分裂能を保持する(proliferative fateすなわちP fate), ②細胞周期を離れ神経細胞として分化を開始する(quiescent fateすなわちQ fate), のいずれかを選択する(図). G1期に入ったNPCのうち, P fateを選択する細胞の割合をP値, Q fateを選択する細胞の割合をQ値と定義する<sup>7,8)</sup>. NPCのアポトーシスを無視した場合, 常に $P+Q=1.0$ となる.  $Q=0, P=1.0$ であれば, NPC数は指数関数的に増加し, 神経細胞として分化を開始する細胞はない, すなわち neuronogenesis は始まっていない. 一部のNPCが細胞周期から離脱し, 分化を開始する時点で,  $Q>0, P<1.0$ となり, neuronogenesis が始まる. すべてのNPCが細胞周期から離脱し分化を開始した時点で $Q=1.0, P=0$ となり, neuronogenesis は終了する.

**G1期の長さ:** neuronogenesis が進行するのに従い, NPCの細胞周期長は約8時間から徐々に延長し, 最終的に約20時間に達する<sup>9,10)</sup>. この細胞周期長の延長は, G1期の長さが約4倍に延長する結果であり, S, G2, M期の長さはほぼ一定に保たれる. すなわち, G1期の長さが, neuronogenesis の過程で緻密に制御されている可能性がある.

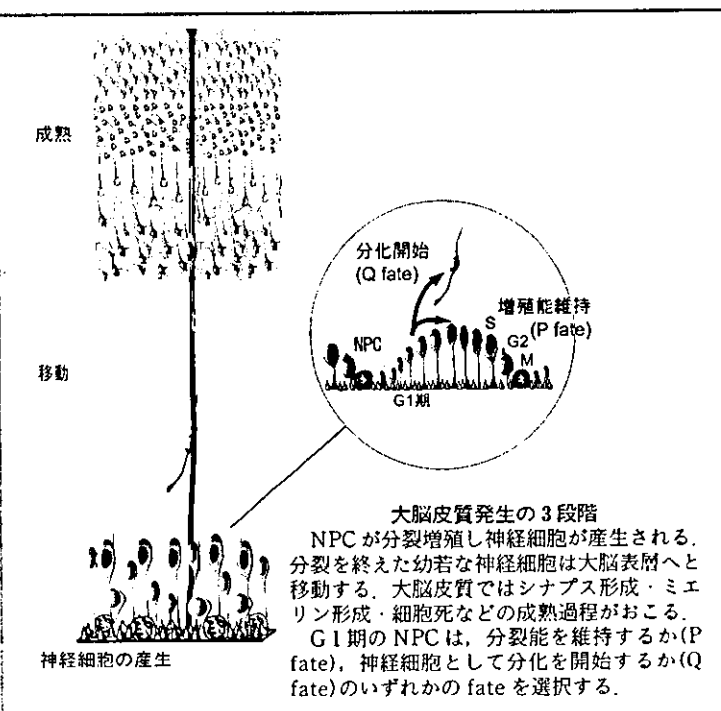
## ■ G1期の分子調節機構

細胞周期の進行は, cyclin分子, cyclin依存性キナーゼ cyclin dependent kinase(CDK), CDK抑制因子 cyclin dependent kinase inhibitor(CDKI)の相互作用により制御される<sup>11)</sup>. G1期の細胞がP fateを選択し次のS期に入るためには, 以下のような一連の分子機構を通過する必要がある. Cyclinの一つである cyclin Dは, 成長因子などの細胞外シグナルに対するセンサーの役割を果たしていると考えられ, CDK4/6と複合体を形成, Rb蛋白をリン酸化する. 引き続きおこる cyclin E-CDK2複合体の活性化により, Rb蛋白は更にリン酸化される. その結果Rb蛋白から転写因子E2Fが放出され, 細胞がS期へ進行するのに必要な遺伝子の転写が開始される. 例えば, 細胞周期調節蛋白であるp27は cyclin E-CDK2複合体に対する抑制因子であり, G1期の進行を抑制する.

以上, NPCのG1期制御機構が大脳皮質発生における細胞周期を緻密にコントロールしていると考えられる.

## 文 献

- 1) Boulder Committee. Anat Rec 1970; 166: 257-62.
- 2) McConnell SK. Neuron 1995; 15: 761-8.
- 3) Caviness VS Jr, Takahashi T. Brain Dev 1995; 17: 159-63.
- 4) 高橋孝雄, 後藤知英. 厚生省精神・神経疾患研究. 高次脳機能を担う神経回路網の発達及びその障害の成因・予防に関する研究. 平成11年度研究報告書. 2000, p.159-63.
- 5) Takahashi T, et al. J Neurosci 1993; 13: 820-33.
- 6) Takahashi T, et al. J Neurosci 1999; 19: 10357-71.
- 7) Takahashi T, et al. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 375-9.
- 8) Takahashi T, et al. J Neurosci 1996; 16: 6183-96.
- 9) Takahashi T, et al. J Neurosci 1995; 15: 6046-57.
- 10) Miyama S, et al. Cereb Cortex 1997; 7: 678-89.
- 11) Sherr CJ, Roberts JM. Genes Dev 1999; 13: 1501-12.



= 症 例 報 告 =

## Zonisamide により強制正常化をきたした小児 難治てんかんの幼児例

廣瀬三恵子 横山 浩之 萩野谷和裕 飯沼 一字

**要旨** 今回我々は West 症候群、結節性硬化症の既往をもつ難治てんかんの 5 歳女児に対して zonisamide (ZNS) を投与したところ、発作が消失すると同時に重度精神症状 (相互的コミュニケーション障害, 対人関係障害, こだわり行動) が出現した症例を経験した。ZNS 中止後も持続した精神症状は fluvoxamine 投与により軽快し, それと同時期にてんかん発作が再度出現した。強制正常化現象は成人で多く, 本例のような低年齢での発症はこれまでに報告がない。ZNS の精神症状として強制正常化現象にも留意する必要がある。またその治療に fluvoxamine 投与が有効な可能性がある。

見出し語 強制正常化, 小児難治てんかん, zonisamide, fluvoxamine, こだわり行動

### はじめに

強制正常化現象とは, てんかんの治療中に, 発作の消失と脳波の正常化に伴って精神症状が出現する現象で, 10 年以上のてんかんの既往がある成人にみられる比較的稀な症状である。これまでの報告では成人例が多いが, 小児でも年長児例が数件報告されている。しかし, 学童期以前の年少例は現在までに報告例がない。我々は難治てんかんの 5 歳女児に zonisamide (以下 ZNS) を投与し, 強制正常化現象と思われる症例を経験したので報告する。

### I 症 例

**症 例** 5 歳, 女児。

**家族歴, 妊娠歴, 出産歴** 特記すべきことなし。

**既往歴** 生後 3 カ月からシリーズ形成を伴った両上肢挙上, 點頭発作が出現した。脳波に hypsar-

rhythmia を認め, 頭部 CT では左前頭葉皮質下に石灰化があり, MRI では同部位に T<sub>2</sub> で高信号域を認めた。心エコーで心内腫瘍を認めた。これらの所見から結節性硬化症に伴う West 症候群と診断した。Vitamin B<sub>6</sub>, valproate 投与では脳波所見の改善が得られず, 合成 ACTH 療法を施行した。その後患児は発作抑制と脳波の正常化を得て, nitrazepam で経過観察されていた。

1 歳 3 カ月から複雑部分発作および 2 次性全般化発作が出現し, 各種抗てんかん薬による治療 (carbamazepine, ZNS, valproate, phenobarbital, clonazepam, phenytoin, potassium bromide, loflazepate, diazepam, dextromethorphan hydrobromide) が行われたが, 発作頻度は変わらなかった。この間に ZNS を投与されているが, 発作は抑制されず, 易興奮性となったため 2 週間で中止されたエピソードがある。また, 1999 年 2 月 (4 歳 11 カ月) に遠城寺式発達検査を施行した。移動運動 3 歳 6 カ月, 手の運動 2 歳 11 カ月, 基本的習慣 3 歳 11 カ月, 対人関係 3 歳 2 カ月, 発語 2 歳 11 カ月, 言語理解 3 歳 10 カ月, DQ73 相当と精神運動発達の遅れを認めた。しかし, こだわり行動・対人関係障害などは認められず, CARS (小児自閉症評定尺度) スコア<sup>1)</sup>は 23.75 (診

東北大学医学部小児科

連絡先 〒980-8574 仙台市青葉区星陵町 1-1

東北大学医学部小児科 (廣瀬三恵子)

E-mail: mhirosc@ped.med.tohoku.ac.jp

(受付日: 2001. 10. 12, 受理日: 2002. 11. 5)

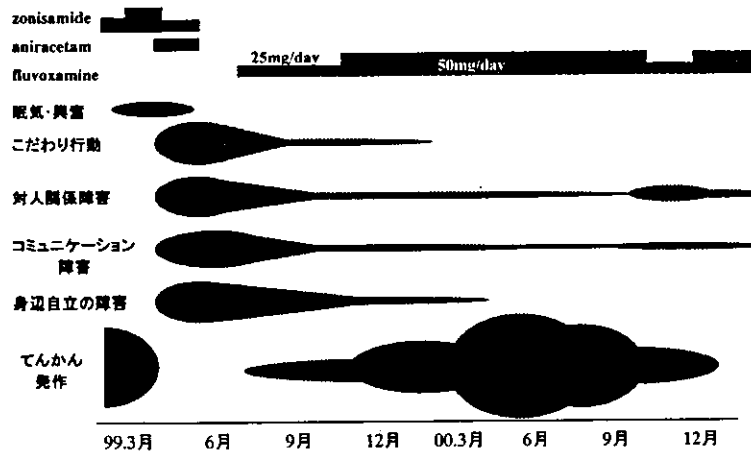


図1 臨床経過

ZNS投与後、てんかん発作の消失を認めた頃よりこだわり行動、対人関係障害などが著明となった。Fluvoxamine投与で精神症状は徐々に軽快したが、てんかん発作が再度出現した。

断区分：非自閉症)であった。

臨床経過を図1に示した。1999年3月9日(4歳11カ月)からZNS 35 mg (2 mg/kg/day)投与し、2週間後に60 mg (3.5 mg/kg/day)に増量した。増量した翌日からてんかん発作の消失を認めた。ZNS投与後第2日目から眠気が出現し、増量後より父親に殴りかかる、夜眠れないなどの易興奮性が出現した。4月1日よりZNSを夜のみの投与とし、興奮性に対してaniracetam 350 mg/dayの併用を開始した。日中の眠気は改善され、易興奮性は次第に抑制されたが、異なる精神症状が明らかとなった。

その症状は以下の通りである。

①社会的関係の障害：声をかけられても反応がない、返事・挨拶をしない、誰とも遊ぼうとしない。他人と目が合わない。母親にさえ、抱きつくなどの愛着行動がない。

②コミュニケーションの質的障害：ひそひそ声で独り言を繰り返す、家族・他人に話しかけない。今までしていたごっこ遊び(電話ごっこなど)をしない。

③こだわり行動の出現：自宅の気にいったドアをいつまでも繰り返し開閉する。当院受診時には自ら進んで処置室に入り、採血を要求し、採血の真似だけでは納得しない。

④社会的基本習慣の退行：トイレトレーニングの自立がなくなった。一人でスプーンを使ってご

飯が食べられなくなった。服を着たり脱いだりすることができなくなった。

ZNSの副作用としての精神症状を疑い、4月27日ZNSを20 mg/dayに減量し、aniracetamの併用を続けた。同時期の遠城寺式発達検査は暦年齢5歳2カ月、移動運動3歳2カ月、手の運動1歳8カ月、基本的習慣2歳5カ月、対人関係1歳5カ月、発語1歳3カ月、言語理解1歳3カ月で、DQは35相当であった。手の運動、対人関係、発語・言語理解面の遅滞が著明だった。CARSスコアは43(診断区分：重度自閉症)であった。その後も症状は改善されず、5月25日すべての投薬を一時中止した。中止後もてんかん発作はなかったが、1カ月以上経過しても精神症状は改善しなかった。ZNSの単なる副作用であれば投薬中止により症状の軽快がみられるはずであるが、症状は改善しなかった。精神症状と発作の有無とに相関が考えられ、ZNSで誘発された強制正常化現象を疑った。同日から精神症状、特にこだわり行動に対してfluvoxamine 25 mg/day投与を開始した。7月19日よりてんかん発作が再出現したため、7月22日よりmexiletine投与を開始した。8月に入って発作が増えるとともに主治医と目が合うようになり、呼びかけに返事をするなど対人関係面における改善が認められた。9月にはてんかん発作はZNS使用前とほぼ同頻度まで増加した。この頃、他人の言うことを理解した行動がとれるようになった。



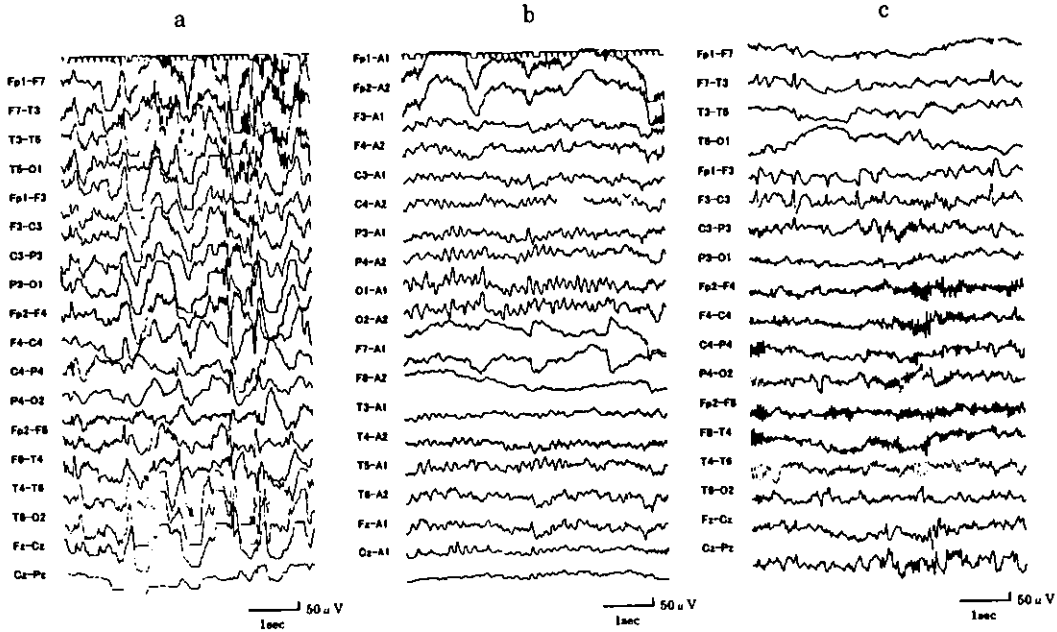


図2 脳波

- a. 1999年1月覚醒時。左右前頭部に全般性多棘徐波。棘徐波を認めた。
- b. 1999年4月覚醒時。てんかん性放電を認めず、正常範囲内と考えられた。
- c. 1999年7月睡眠時。左前頭部に棘波が出現し、脳波上増悪傾向を示した。

10月、てんかん発作の増加のため carbamazepine 投与を開始した。自発的な言語の使用がみられた。同時期の遠城寺式発達検査は暦年齢5歳7カ月、移動運動3歳6カ月、手の運動2歳11カ月、基本的習慣3歳2カ月、対人関係2歳2カ月、発語3歳0カ月、言語理解3歳6カ月、DQ54相当であり、対人関係面が低く、発達バランスの平均がとれていない。CARSスコアは27(診断区分：非自閉症)であった。11月てんかん発作は1日4~6回。11月下旬に保育所でも声を出してしゃべるようになった。12月にはトイレトレーニングも可能となった。その後てんかん発作は1日5~8回で、発作の抑制が困難な状態が続いたが、精神症状は徐々に軽快した。

2000年9月には精神症状はほぼ消失したため fluvoxamine を減量した。しかし10月には、精神症状、特に対人関係障害が増悪してきたため、再度維持量まで増量した。翌11月、精神症状は落ち着きを取り戻し、2001年6月(7歳3カ月)現在まで fluvoxamine 投薬を維持している。

図2aに1999年1月12日(4歳11カ月)ZNS投

与前の覚醒時脳波を示した。頻回に全般性多棘徐波、棘徐波を認めるほかに、左右前頭部に棘波を認めた。図2bに1999年4月1日(5歳0カ月)ZNS投与後20日、発作消失後約1週間たった時期の覚醒時脳波を示した。てんかん性放電はなく、正常範囲内と考えられた。また、図2には示していないが、睡眠時脳波には左前頭部にわずかに棘波を認めた。図2cに示す睡眠時脳波は1999年7月7日(5歳4カ月)、発作消失後約3カ月半経過し、ZNSを中止してから1カ月半後で精神症状の改善が認められなかった時期の記録である。覚醒時脳波は4月の状態と比較してあまり変化がみられなかったが、睡眠時脳波は左前頭部棘波を示し、増悪している。この記録の12日後にてんかん発作が再出現した。

II 考 察

Landolt が forcierte Normalisierung (強制正常化)を提唱して以来<sup>2)</sup>、てんかん患者における精神症状の出現と脳波変化の関連について注目されるようになった。強制正常化現象は成人のてんかん患者の約8%にみられる<sup>3)</sup>との報告があるが、小児例の報告は

極めて少ない。Okaら<sup>4)</sup>は2,267名のてんかんをもつ小児の中で強制正常化様現象を示したのは3人のみだと報告している。これは小児の精神症状が周囲に認識されていないためかもしれない。本症例も小児であり、かつこれまで報告された中の最年少例であるが、Krishnamoorthyらの提唱する診断基準<sup>5)</sup>の(1)臨床病歴、脳波、画像所見においててんかんと診断されていること、(2)急性・亜急性に出現する行動障害の存在、(3)覚醒時脳波において棘波の総数の減少、または1週間以上のてんかん発作の完全抑制、の3項目すべてを満たしており、強制正常化現象と診断され得ると考えられる。

本例ではこれまでに報告されている、不眠、不安、抑うつ、易刺激性、昏迷、被害妄想などのうち不眠、興奮などの症状が最初にみられ、その後それらとは異なる症状、対人関係の障害、言語・非言語性のコミュニケーションのとりにくさ、特定場所でのこだわり行動の出現など、自閉症でみられるような症状が特徴的であった。このように幼小児での強制正常化の症状は成人例とは異なる場合があることが示唆される。富士原ら<sup>6)</sup>は8歳女児へのZNS投与時に視線の合いにくさ、コミュニケーション障害などが出現し、ZNS中止後も独語・空笑などが改善しなかったと報告しており、我々と同様の症状をみている可能性がある。

さらに本例ではZNSの投与量が維持量の半分ほどで、その血中濃度が低値の時から症状が出現したこと、および、これまでにこのような低年齢では強制正常化現象の報告がみられていないことから、本例の強制正常化現象はZNSの薬物特異的な副作用であるかもしれない。

また、強制正常化現象に対する治療としては現在まで確立した治療法がない。本症例ではこだわり行動、コミュニケーション障害などの自閉症にみられるような精神症状が特徴的であった。近年、McDougleら<sup>7)</sup>、横山ら<sup>8)</sup>によって、それぞれ成人、

小児の自閉症患者の強迫症状に対して fluvoxamine 投与が有効であるとの報告がなされた。それを踏まえ、我々は患児の精神症状、特にこだわり行動に同薬の投与を試みたところ、こだわり行動が他の症状よりも短期間で消失し、社会的関係障害、コミュニケーション障害も徐々に軽快していった。しかし以前のようにコミュニケーションがとれるようになるまでは1年以上を費やし、さらに fluvoxamine 減量により対人関係障害が再増悪するなどがみられた。これらから fluvoxamine は強制正常化の精神症状(特にこだわり行動など)に対して有効である可能性が示唆された。

#### 文 献

- 1) Schopler E, Reichler RJ, DeVellis RF, Daly K. Toward objective classification of childhood autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). *J Autism Dev Disord* 1980;10:91-103.
- 2) Landolt H. Die Dämmer- und Verstimmungszustände bei Epilepsie und ihre Elektroenzephalographie. *Deutsch Z Nervenheilkd* 1963;185:411-30.
- 3) Pakalnis A, Drake ME Jr, John K, Kellum JB. Forced normalization. acute psychosis after seizure control in seven patients. *Arch Neurol* 1987;44:289-92.
- 4) Oka E, Yamatogi Y, Ichiba N, et al. Psychotic symptoms in childhood epilepsy — an electroencephalographic study. *Folia Psychiatry Neurol Jpn* 1983;37:239-44.
- 5) Krishnamoorthy ES, Trimble MR. Forced normalization: clinical and therapeutic relevance. *Epilepsia* 1999;40:S57-64.
- 6) 富士原誠次, 鳴戸敏幸, 山野恒一, 島田司巳, 家森百合子. Zonisamide による幻覚妄想状態と思われる症状が見られた小児例. *脳と発達* 1991;23(suppl): S212.
- 7) McDougle CJ, Naylor ST, Cohen DJ, Volkmar FR, Heninger GR, Price LH. A double-blind, placebo-controlled study of fluvoxamine in adults with autistic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 1996;53:1001-8.
- 8) 横山浩之, 廣瀬三恵子, 萩野谷和裕, 宗形光敏, 飯沼一宇. 自閉症児の自傷行為・攻撃行動に対する fluvoxamine 投与の試み. *脳と発達* 2002;34:249-53.

Original Paper

## Platelet-derived growth factor and its receptors are related to the progression of human muscular dystrophy: an immunohistochemical study

Yajuan Zhao,<sup>1,2</sup> Kazuhiro Haginoya,<sup>1\*</sup> Guilian Sun,<sup>1</sup> Hongmei Dai,<sup>1</sup> Akira Onuma<sup>3</sup> and Kazuie Inuma<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Tohoku University School of Medicine, Sendai 980-8574, Japan

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, Second Clinical College of China Medical University, Shenyang, China

<sup>3</sup>Department of Pediatrics, Takutou Rehabilitation Center for Disabled Children, Sendai, Japan

\*Correspondence to:

Kazuhiro Haginoya, MD,  
Department of Pediatrics,  
Tohoku University School of  
Medicine, 1-1 Seiryomachi,  
Aobaku, Sendai  
980-8574, Japan.

E-mail:

khaginoya@ped.med.tohoku.ac.jp

### Abstract

This study has examined the immunological localization of platelet-derived growth factor (PDGF)-A, PDGF-B, and PDGF receptor (PDGFR) alpha and beta to clarify their role in the progression of muscular dystrophy. Biopsied frozen muscles from patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD), Becker muscular dystrophy (BMD), and congenital muscular dystrophy (CMD) were analysed immunohistochemically using antibodies raised against PDGF-A, PDGF-B, and PDGFR alpha and beta. Muscles from two dystrophic mouse models (*dy* and *mdx* mice) were also immunostained with antibodies raised against PDGFR alpha and beta. In normal human control muscle, neuromuscular junctions and vessels were positively stained with antibodies against PDGF-A, PDGF-B, PDGFR alpha and PDGFR beta. In human dystrophic muscles, PDGF-A, PDGF-B, PDGFR alpha and PDGFR beta were strongly immunolocalized in regenerating muscle fibres and infiltrating macrophages. PDGFR alpha was also immunolocalized to the muscle fibre sarcolemma and necrotic fibres. The most significant finding in this study was a remarkable overexpression of PDGFR beta and, to a lesser extent, PDGFR alpha in the endomysium of DMD and CMD muscles. PDGFR was also overexpressed in the interstitium of muscles from dystrophic mice, particularly *dy* mice. Double immunolabelling revealed that activated interstitial fibroblasts were clearly positive for PDGFR alpha and beta. However, DMD and CMD muscles with advanced fibrosis showed very poor reactivity against PDGF and PDGFR. Those findings were confirmed by immunoblotting with PDGFR beta. These findings indicate that PDGF and its receptors are significantly involved in the active stage of tissue destruction and are associated with the initiation or promotion of muscle fibrosis. They also have roles in muscle fibre regeneration and signalling at neuromuscular junctions in both normal and diseased muscle. Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords:** platelet-derived growth factor; platelet-derived growth factor receptor alpha; platelet-derived growth factor receptor beta; muscular dystrophy; fibrosis; *mdx* mice; *dy* mice

Received: 12 August 2002

Revised: 7 January 2003

Accepted: 26 March 2003

### Introduction

The progression of muscular weakness in patients suffering from Duchenne muscular dystrophy (DMD) and congenital muscular dystrophy (CMD) correlates directly with the progressive loss of myofibres, which is accompanied by connective tissue and adipose tissue replacement. The mechanism of histological progression remains unclear. Previous studies suggest that there is a progressive loss of regenerating capacity in muscle fibres [1]. Interstitial fibrosis may be attributed to a loss of regenerating capacity in satellite cells, which is caused by a reduced blood supply to individual muscle fibres [2,3]. Alternatively, Melone *et al* recently proposed that growth factors released locally by diseased muscle tissue may reduce the regenerating capacity of satellite cells [4,5]. Recent studies

also suggest that growth factors such as transforming growth factor beta 1 (TGF $\beta$ 1) and basic fibroblast growth factor (bFGF) have important roles in disease progression [6–10].

Platelet-derived growth factor (PDGF) consists of two disulphide-linked peptide chains, A and B, and occurs naturally in three isoforms, PDGF-AA, PDGF-AB, and PDGF-BB [11]. PDGF is a growth stimulant and chemoattractant, principally for mesenchymal connective tissue-forming cells [11,12]. By binding to specific high-affinity cell surface receptors, PDGF induces cell proliferation and a number of other critical processes. There are two PDGF receptor subunits; the alpha subunit (PDGFR alpha) binds both the PDGF-A and the PDGF-B chains, while the beta subunit (PDGFR beta) binds only the PDGF-B chain [13]. There have been some reports of PDGF and PDGFR

expression in muscle tissue. PDGF-A chain mRNA and PDGFR beta mRNA are expressed in rat L6 cultured myoblasts [14,15] and PDGFR beta immunoreactivity has been reported in regenerating muscle fibres of dystrophin-deficient *mdx* mice [16]. L6 myoblasts bind the PDGF-BB isoform, but not the PDGF-AA isoform, and the addition of PDGF-BB to culture media results in myoblast proliferation and the inhibition of myoblast differentiation [17]. These results suggest that the BB isoform of PDGF has a significant effect on skeletal muscle regeneration.

There have been no studies of the functional role of PDGF and its receptors in diseased human muscle. This prompted us to examine the immunolocalization of PDGF-A, PDGF-B, PDGFR alpha, and PDGFR beta in biopsied muscle from patients with various types of muscular dystrophy to clarify their role in disease progression. In addition, we compared PDGFR alpha and beta expression in muscles from *dy* and *mdx* mice to confirm the results from human muscles.

### Materials and methods

We studied diagnostic muscle biopsies from 32 patients, aged 8 months to 18 years. Written informed consent to use these specimens for research was obtained from all of the patients' families. Of the biopsies studied, eight had a diagnosis of DMD, nine had congenital muscular dystrophy (CMD) [six with Fukuyama-type CMD (FCMD) and three with merosin-positive CMD], five had Becker muscular dystrophy (BMD), and ten were normal. Diagnosis was based on clinical, laboratory, muscle

biopsy histochemistry, and dystrophin and merosin immunohistochemistry. A clinical summary of the patients is given in Table 1. Transverse sections (10 µm) of fresh-frozen muscle biopsies were used for immunohistochemical staining. For the detection of PDGF-A, PDGF-B, PDGFR alpha, and PDGFR beta, affinity-purified rabbit antisera were raised against the following: (1) a synthetic peptide mapping to the carboxy-terminal of human PDGF-A (sc-128; Santa Cruz Biotechnology; dilution 1:400; 0.5 µg/ml); (2) a synthetic peptide (amino acid sequence 136–190) mapping to the carboxy-terminal of mature human PDGF-B (sc-7878; Santa Cruz Biotechnology; dilution 1:400; 0.5 µg/ml); (3) a synthetic peptide mapping to the carboxy-terminal of human PDGFR alpha (sc-338; Santa Cruz Biotechnology; dilution 1:400; 0.5 µg/ml); and (4) a synthetic peptide mapping to the carboxy-terminal of human PDGFR beta (sc-339; Santa Cruz Biotechnology; dilution 1:400; 0.5 µg/ml).

Indirect immunoperoxidase (ABC) (Vectastain ABC kit; Vector, Burlingame, CA, USA) and immunofluorescence methods were used to stain the samples. For ABC reactions, the sections were fixed with 4% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min at room temperature and washed in PBS. Sections were pre-incubated for 30 min in normal goat serum (1:10) and incubated for 36 h at 4 °C in the primary antibody and for 1 h in biotinylated anti-rabbit IgG diluted 1:200. The sections were then incubated for 1 h in ABC complex and visualized in 0.03% diaminobenzidine (DAB) (Dojin, Kumamoto, Japan) containing 0.005% peroxide. The specificity of the immunoreactivity was verified by omitting the primary antibody, replacing the polyclonal antibody with

**Table 1.** Clinical summary of the patients

Patient	Diagnosis	Sex	Age(y) of onset	Age(y) at biopsy	Clinical symptoms at biopsy	Serum CK
1	DMD	M	0.8	1.2	Difficulty in standing up	22 000
2	DMD	M	2	2.8	Frequent falling down	14 250
3	DMD	M	1.5	3.5	Frequent falling down	16 130
4	DMD	M	2	4	Abnormal gait	21 000
5	DMD	M	3	4.4	Unsteady gait	14 690
6	DMD	M	4	5	Frequent falling down	14 550
7	DMD	M	3	8	Abnormal gait	13 600
8	DMD	M	3	15	Frequent falling down	2428
9	FCMD	F	0.1	0.7	Hypotonia	3600
10	FCMD	M	0.1	0.7	Floppy infant	2726
11	FCMD	M	0.3	1	Motor delay	11 850
12	FCMD	M	0.5	2.7	Motor delay	6009
13	FCMD	M	0.1	7	Severe developmental delay	3930
14	FCMD	F	0.5	18	Motor delay	300
15	CMD	M	0.1	0.7	Floppy infant	2463
16	CMD	M	0.3	0.7	Delayed head control	6092
17	CMD	F	1.5	2.2	Gait disturbance	965
18	BMD	M	no symptom	5	Hypercknesia	1847
19	BMD	M	5	7	Muscle pain	3844
20	BMD	M	5	11	Slow runner	5159
21	BMD	M	6	11	Leg pain	5159
22	BMD	M	no symptom	13	Hypercknesia	5000

DMD: Duchenne muscular dystrophy, FCMD: Fukuyama type congenital muscular dystrophy, CMD: merosin-positive congenital muscular dystrophy, BMD: Becker muscular dystrophy.

non-immune rabbit IgG (Zymed, San Francisco, CA, USA) at the same concentration, and absorbing the primary polyclonal anti-PDGFR alpha or beta antibody with recombinant PDGFR alpha or beta peptides (sc-338p and sc-339p; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Omission of the primary antibody and replacement of polyclonal antibodies with non-immune IgG abolished reactivity. Absorption of anti-PDGFR alpha or beta antibody (0.5 µg/ml) with PDGFR alpha or beta peptide (final concentration 100 µg/ml) overnight at 4 °C resulted in complete blocking of the reaction products.

For immunohistochemical analysis of PDGFR alpha and beta in dystrophic mouse models, we used hamstring muscles from B-10 mice as a control, *dy* mice as a progressive and fibrotic model, and *mdx* mice as a non-fibrotic model at 16 weeks old. The *dy* mice are known to be a merosin-deficient CMD model and *mdx* mice are known to be a DMD model [18]. Muscles were obtained after neck dislocation and were immediately frozen in isopentane and stored at -80 °C until used. Immunohistochemical studies were performed with the same antibodies that were used for human muscle biopsies using the ABC reaction. The protocol for the use of mouse tissue was approved by the Animal Experimentation Committee of the School of Medicine, Tohoku University.

Double or triple fluorescence labelling was used to co-localize PDGF-A, PDGF-B, PDGFR alpha or PDGFR beta with desmin,  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ -BT), CD31, CD68, prolyl 4-hydroxylase (P-4-H) or Hoechst 33342. For double fluorescence staining, sections were fixed with 4% formaldehyde in PBS for 5 min at room temperature, washed in PBS, and pre-incubated for 30 min in normal donkey serum diluted 1:10. Sections were incubated for 36 h at 4 °C in the appropriately diluted mixture of primary antibodies and then incubated for 1 h in a mixture of secondary antiserum containing Texas Red-labelled donkey anti-rabbit IgG and Cy2-labelled donkey anti-mouse IgG (Jackson Immuno Res, West Grove, PA, USA) diluted at 1:200. To visualize intramuscular nuclei, some sections were triple labelled by incubation in 10 µg/ml Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 5 min. Monoclonal antibodies against desmin (1:100) (Zymed, San Francisco, CA, USA), CD31 (1:100) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), CD68 (1:100), and P-4-H (1:100) (Dako, Glostrup, Denmark) were used to identify regenerating fibres, vessels, macrophages, and fibroblasts actively producing collagen [19], respectively. Neuromuscular junctions (NMJs) were identified with tetramethylrhodamine-labelled  $\alpha$ -BT (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) diluted at 1:1000. Immunofluorescence images were observed with a fluorescence microscope and were captured separately from the same area with a CCD camera connected to a personal computer. The images were combined using a Q550CW fluorescence imaging system (Leica, Cambridge, UK). The staining intensity of muscle fibres

and extracellular matrix (ECM) was scored separately by reviewing the entire tissue section with a semi-quantitative scale: 0, no staining; 0.5, trace staining; 1, light staining; 2, moderate staining; and 3, intense staining.

To evaluate endomysial fibrosis, serial sections were stained for cytochrome c oxidase and three images that included only the endomysial area (0.403 mm<sup>2</sup> in total) were captured at  $\times 200$  magnification with a CCD camera connected to a personal computer. The endomysial interstitial area of each image (ie the cytochrome c oxidase-negative area) was measured using a colour image computer analyser (MacSCOPE, version 2.5, Mitani Corp, Hukui, Japan) and the mean value of three images was determined as the endomysial interstitial area for each sample, which is expressed as a percentage in Table 2.

For immunoblot analysis, ten 10-µm-thick cryosections of three FCMD muscles biopsied in early infancy (two) and at an advanced stage (one) and one control muscle biopsy were collected on ice; homogenized in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 150 mM KF, 15 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 10 mg/ml leupeptin, 1 mM benzamidine, and 1 µM/ml 2-mercaptoethanol; and centrifuged at 10 000 g for 15 min at 4 °C. For SDS-PAGE, equal amounts of muscle protein [10 µg diluted in SDS incubation medium: 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, and 0.02% bromophenol blue] were loaded on the gel (12.5% acrylamide) according to the method of Laemmli [20]. The upper and lower running buffers contained 25 mM Tris (base), 192 mM glycine, and 0.1% SDS, and the gel was run at 200 V for 30 min. The proteins were then transferred onto nitrocellulose sheets for 1 h at 4 °C at 100 V using a transfer buffer containing 182 mM glycine, 6 mM Tris, and 20% methanol at pH 8.2. After blocking the blots in 5% non-fat dry milk in PBST (PBS, pH 7.4, containing 0.1% Tween-20) for 2 h, they were incubated with the primary antibody (anti-PDGFR beta; 1:100) overnight and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:1500; Chemicon, Temecula, CA, USA) for 1 h. Immunoreactive proteins were visualized using a DAB kit (Vector, Burlingame, CA, USA) or with enhanced chemiluminescence (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

## Results

### Human muscular dystrophy (Figures 1–4 and Table 2)

#### PDGF-A Immunolocalization (Figures 1 and 2)

In normal muscle biopsies, trace PDGF-A immunoreactivity was observed in vascular smooth muscle (Figure 1A). The neuromuscular junctions in all muscles were stained positively, as described in our

Table 2. Results of immunolocalization of PDGF-A, PDGF-B, PDGFR alpha, and PDGFR beta

Patient	Age (y) at biopsy	Diagnosis	PDGF-A		PDGF-B		PDGFR alpha		PDGFR beta		Interstitial Area (%)
			MF <sup>1</sup>	ECM	MF <sup>1</sup>	ECM	MF <sup>1&amp;2</sup>	ECM	MF <sup>1</sup>	ECM	
1	1.2	DMD	0.5	0.5	2	1	2	0.5	0	2	14.9
2	2.8	DMD	0.5	1	1	2	2	0.5	0	3	20.5
3	3.5	DMD	1	1	1	1	2	1	0	2	16.6
4	4	DMD	0.5	1	0.5	1	1	0.5	0	2	16.7
5	4.4	DMD	1	0.5	1	1	2	1	0	2	20.7
6	5	DMD	0.5	0.5	1	1	0.5	0.5	0	3	15.8
7	8	DMD	1	0.5	1	1	1	1	0	2	16.3
8	15	DMD	0.5	0.5	0	0.5	0	0	0	1	37.3
9	0.7	FCMD	1	0.5	2	2	2	2	0	3	29.6
10	0.7	FCMD	1	0.5	2	2	2	1	0	3	40.9
11	1	FCMD	0.5	0.5	1	0.5	0.5	2	0	3	40.7
12	2.7	FCMD	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	1	67.8
13	7	FCMD	0	0.5	0	0.5	0	0	0	0	52.6
14	18	FCMD	0	0	0	0	0	0	0	0	92
15	0.7	CMD	1	0.5	2	1	2	0.5	0	2	49.8
16	0.7	CMD	1	0.5	2	1	2	1	0	3	43.3
17	2.2	CMD	1	0.5	2	1	2	1	0	2	49.8
18	5	BMD	0	0	0	0.5	0.5	0	0	0	11.1
19	7	BMD	0	0	0	0	0.5	0	0	0	6.4
20	11	BMD	0	0	0	0	0.5	0	0	0	7.5
21	11	BMD	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0	0	0	6.2
22	13	BMD	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0	0	0	8.8
23	1.5	normal	0	0	0	0	0	0	0	0	8.8
24	2.2	normal	0	0	0	0	0	0	0	0	6.5
25	2.3	normal	0	0	0	0	0	0	0	0	7.5
26	3	normal	0	0	0	0	0	0	0	0	5.2
27	3.5	normal	0	0	0	0	0	0	0	0	6.3
28	5	normal	0.5	0	0	0	0	0	0	0	4.5
29	6.5	normal	0.5	0	0	0	0	0	0	0	8.8
30	8	normal	0	0	0	0	0	0	0	0	5.6
31	12	normal	0	0	0	0	0	0	0	0	7.8
32	13	normal	0	0	0	0	0	0	0	0	8.6

MF: muscle fibers.

ECM: extracellular matrix.

MF<sup>1</sup>: immunolocalization except for regenerating fibers.MF<sup>2</sup>: sarcolemmal immunolocalization.

PDGF: platelet-derived growth factor.

PDGFR: platelet-derived growth factor receptor.

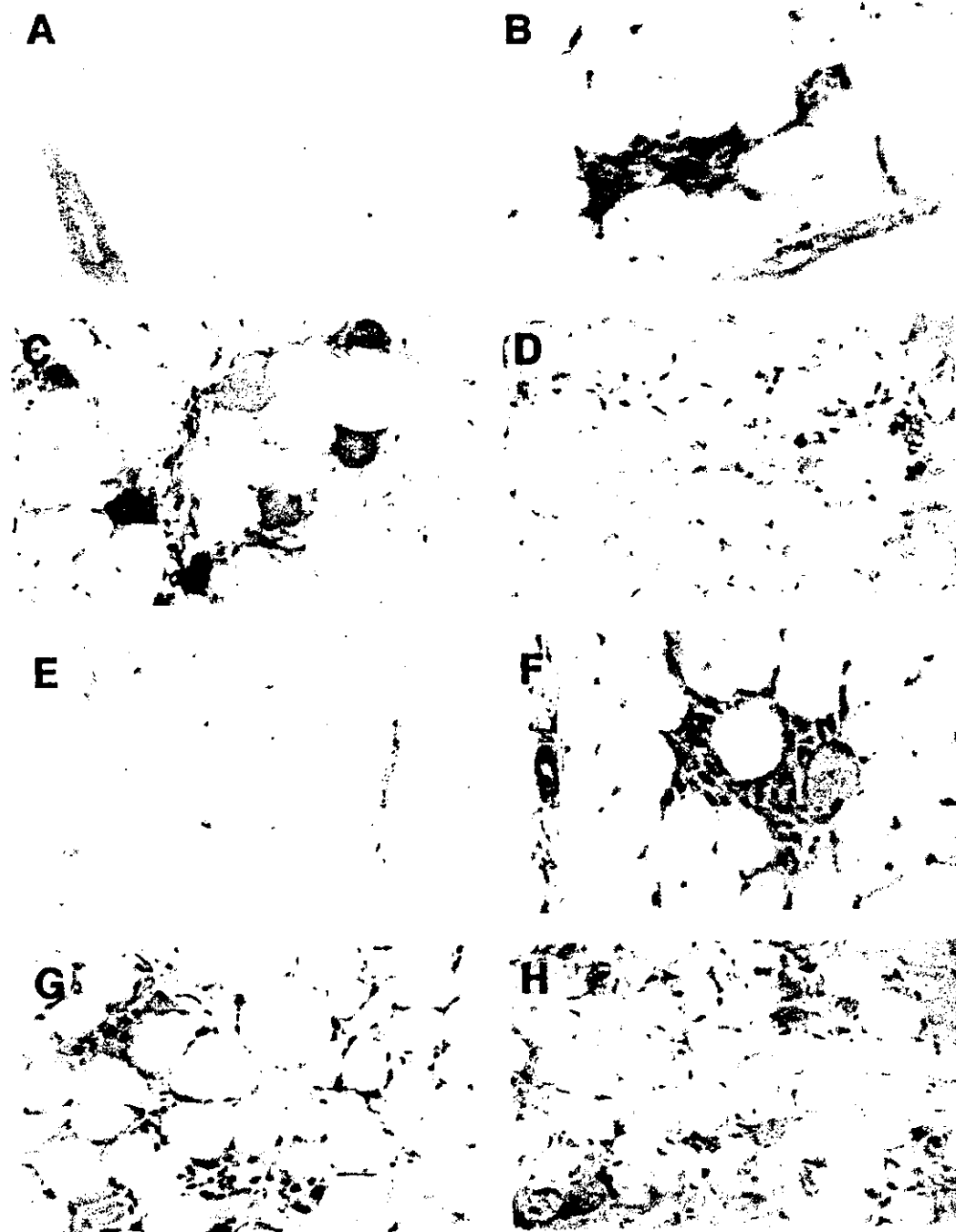
Intensity of immunostaining: 0; no staining, 0.5; trace staining, 1; light staining, 2; moderate staining, 3; intense staining.

previous report [21]. Necrotic fibres with mononuclear cell infiltration showed positive immunoreactivity (Figure 1B) in all dystrophic muscles examined. The cytoplasm and nuclei of regenerating muscle fibres were strongly positive in all dystrophic muscles (Figure 1C); this was confirmed by double labelling with PDGF-A and desmin (Figures 2A and 2B). Triple labelling with PDGF-A, CD68, and Hoechst 33342 (Figures 2C and 2D) demonstrated co-localization of PDGF-A immunoreactivity on the regenerating fibre nuclei and macrophages infiltrating the endomysium. However, elderly CMD and DMD cases with advanced fibrosis showed trace or no PDGF-A reactivity (Table 2).

#### PDGF-B immunofocalization (Figures 1 and 2)

In normal muscle biopsies, trace PDGF-B immunoreactivity was observed in muscle fibre nuclei and

vascular smooth muscle (Figure 1E). Double immunolabelling with PDGF-B and  $\alpha$ -BT showed that neuromuscular junctions in all muscles were positively stained (Figures 2H and 2I). Mononuclear cells that infiltrated in and around necrotic fibres showed intense positivity for PDGF-B in DMD, CMD, and BMD (Figures 1F–1H). Double labelling with antibodies against PDGF-B and CD68 showed exclusive PDGF-B co-localization (Figures 2E–2G) on almost all macrophages in the endomysium. The vascular walls and muscle fibre nuclei of non-regenerating fibres in dystrophic muscles were lightly to moderately immunostained (Figures 1F–1H and 2E). The cytoplasm and nuclei of regenerating muscle fibres, which were characterized by strong desmin immunoreactivity (data not shown), showed intense staining in all dystrophic muscles. However, elderly CMD and DMD cases with advanced fibrosis showed trace or no PDGF-B reactivity (Table 2).

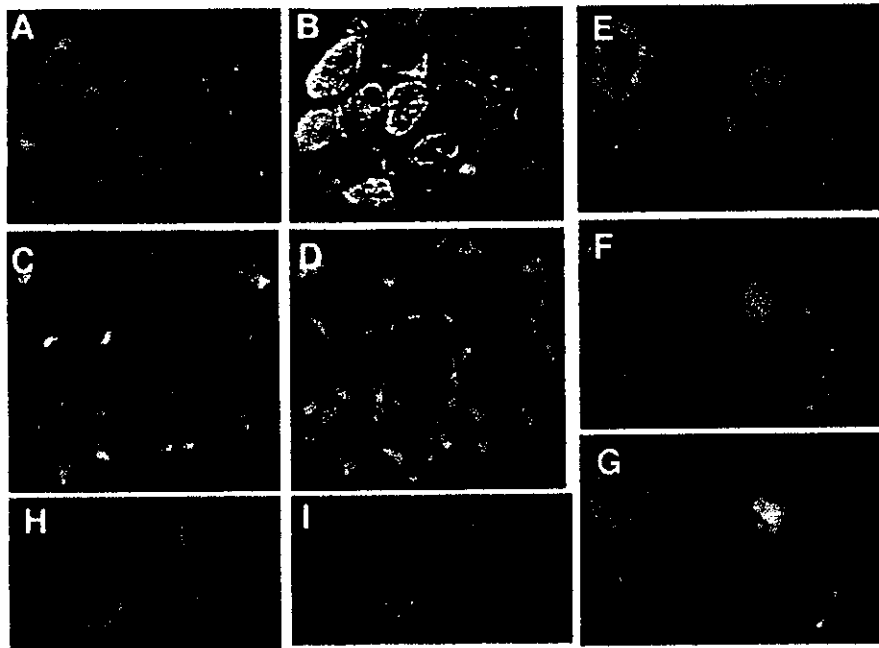


**Figure 1.** Immunolocalization of PDGF-A (A–D) and PDGF-B (E–H) in biopsied muscles from control (A, E), BMD (B, F), DMD (C, G), and FCMD (D, H). PDGF-A and PDGF-B immunoreactivity was prominent in infiltrating cells, regenerating muscle fibres, and muscle fibre nuclei in dystrophic muscles

**PDGFR alpha immunolocalization (Figures 3 and 4)**

In control muscle biopsies, moderate PDGFR alpha immunoreactivity was observed in neuromuscular junctions [20] and trace immunoreactivity was observed around muscle fibre nuclei (Figure 3A). Some sections showed moderate staining of the perimysial connective tissue. In the DMD and CMD muscle fibres examined, muscle fibre sarcolemma was lightly immunostained in 20–40% of muscle

fibres (Figures 3B and 3D), whereas in BMD muscle fibres, 1–3% of muscle fibre sarcolemma was faintly immunostained. The cytoplasm of necrotic and regenerating muscle fibres was moderately to intensely stained in dystrophic muscles (Figures 4A and 4B) and nuclei of non-regenerating muscle fibres were also lightly to moderately stained. The endomysium of CMD cases biopsied at an early stage showed moderate staining of the endomysium (Figure 3D).



**Figure 2.** Immunolabelling of DMD muscles. (A, B) PDGF-A was immunolocalized in regenerating muscle fibres that showed strong desmin immunoreactivity and in their nuclei [double labelling; A: PDGF-A (red); B: desmin (green)]. (C, D) Infiltrating macrophages were positive for PDGF-A (yellow). Nuclei of regenerating fibres were intensely positive for PDGF-A and nuclei of non-regenerating fibres were also lightly positive [triple labelling; C: merged PDGF-A (red)/CD68 (green); D: merged PDGF-A (red)/Hoechst 33342 (blue)]. (E–G) PDGF-B was strongly expressed in the intramuscular vessels and phagocytic macrophages (yellow) infiltrating into the necrotic fibre [double labelling; E: PDGF-B (red); F: CD68 (green); G: merged PDGF-B/CD68]. (H–I) PDGF-B co-localized with  $\alpha$ -BT at the neuromuscular junctions [double labelling; H: PDGF-B (green); I:  $\alpha$ -BT (red)]

However, relatively elderly CMD and DMD cases with advanced fibrosis showed very poor PDGFR alpha reactivity (Table 2). Double labelling with antibodies against PDGFR alpha and CD68 demonstrated that PDGFR alpha was intensely expressed in macrophages infiltrating in and around necrotic fibres (Figure 4C). Double immunolabelling with antibodies against PDGFR alpha and P-4-H demonstrated that P-4-H-positive activated fibroblasts were clearly positive for PDGFR alpha in DMD and CMD muscle (Figure 4D).

#### PDGFR beta immunolocalization (Figures 3 and 4)

In control muscle biopsies, light PDGFR beta immunoreactivity was observed in neuromuscular junctions (data not shown), capillaries, and vascular smooth muscle (Figures 3E, 4E, and 4F). The cytoplasm of strongly desmin-positive regenerating muscle fibres showed light staining in dystrophic muscles (Figures 4G and 4H). Triple labelling with PDGFR beta, CD68, and Hoechst 33342 demonstrated that PDGFR beta was expressed partly by CD68-positive macrophages infiltrating the endomysium and by other mononuclear cells in the interstitium (Figures 4I and 4J). The most remarkable finding was the intense immunoreactivity of the endomysium in DMD and CMD muscles (Figures 3F, 3H, and 3I). However, there was no endomysial PDGFR beta expression in BMD muscles (data not shown). Compared with DMD muscle, PDGFR beta expression was clearly predominant in CMD muscles biopsied in early infancy

(Figures 3H and 3I). Double immunolabelling with antibodies against PDGFR beta and P-4-H demonstrated that P-4-H-positive activated fibroblasts were exclusively PDGFR beta-positive in DMD and CMD muscle (Figures 4K–4M). In contrast to CMD and DMD muscles biopsied in early infancy, CMD and DMD muscles with advanced fibrosis showed no or faint reactivity against PDGFR beta (Figure 3J).

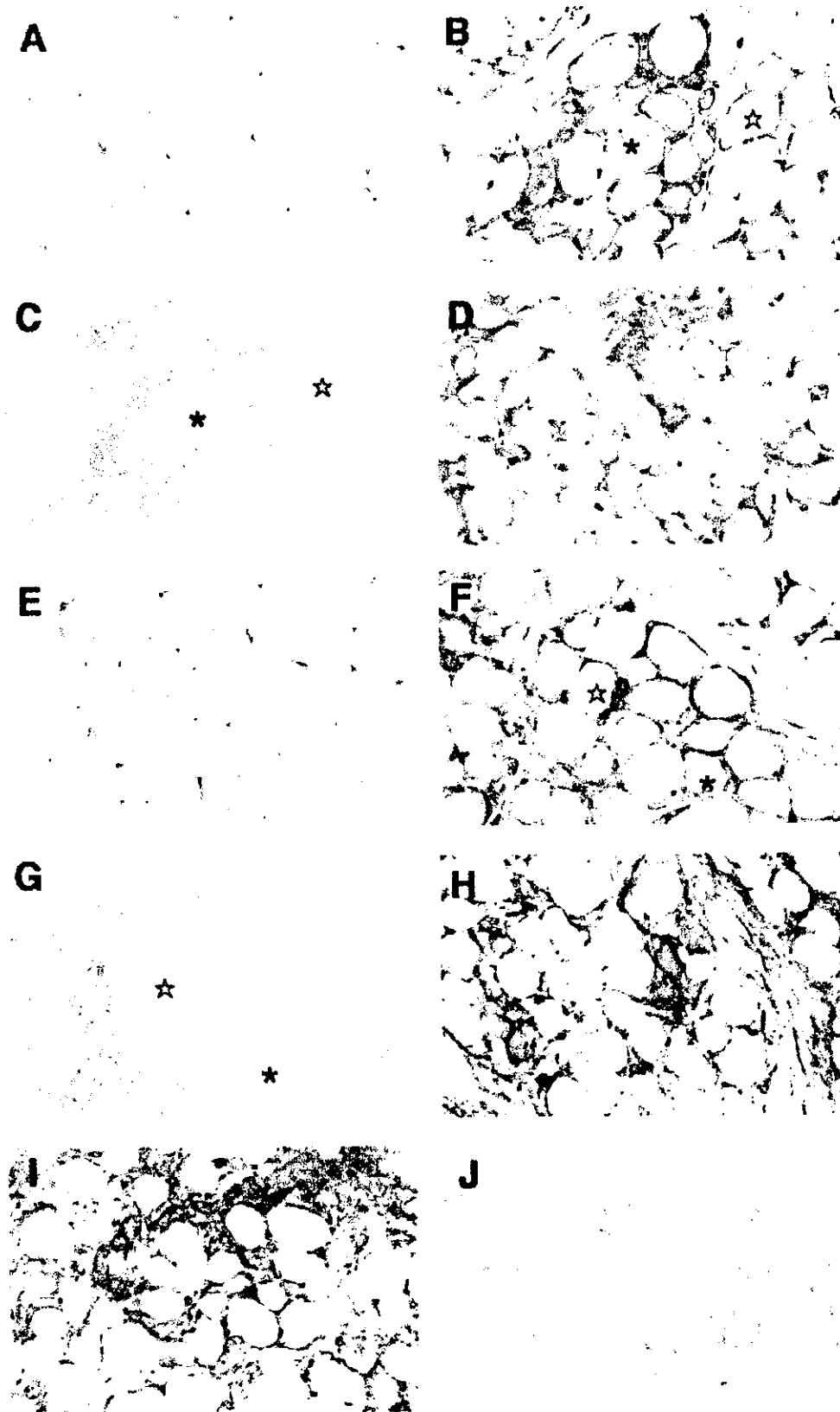
#### Immunoblots for PDGFR beta (Figure 5)

Immunoblots of muscle extracts from FCMD patients biopsied in early infancy revealed a clear immunoreactive band with an apparent molecular mass of 180 kD corresponding to the 180 kD PDGFR beta, while muscle extracts from a FCMD patient biopsied at an advanced stage and the control patient lacked this 180 kD immunoreactive band. These findings are consistent with the results of the immunohistochemical analysis. Owing to the small size of the diagnostic muscle biopsies, we did not have sufficient material to perform immunoblotting with anti-PDGFR alpha, PDGF-A, or PDGF-B antibodies.

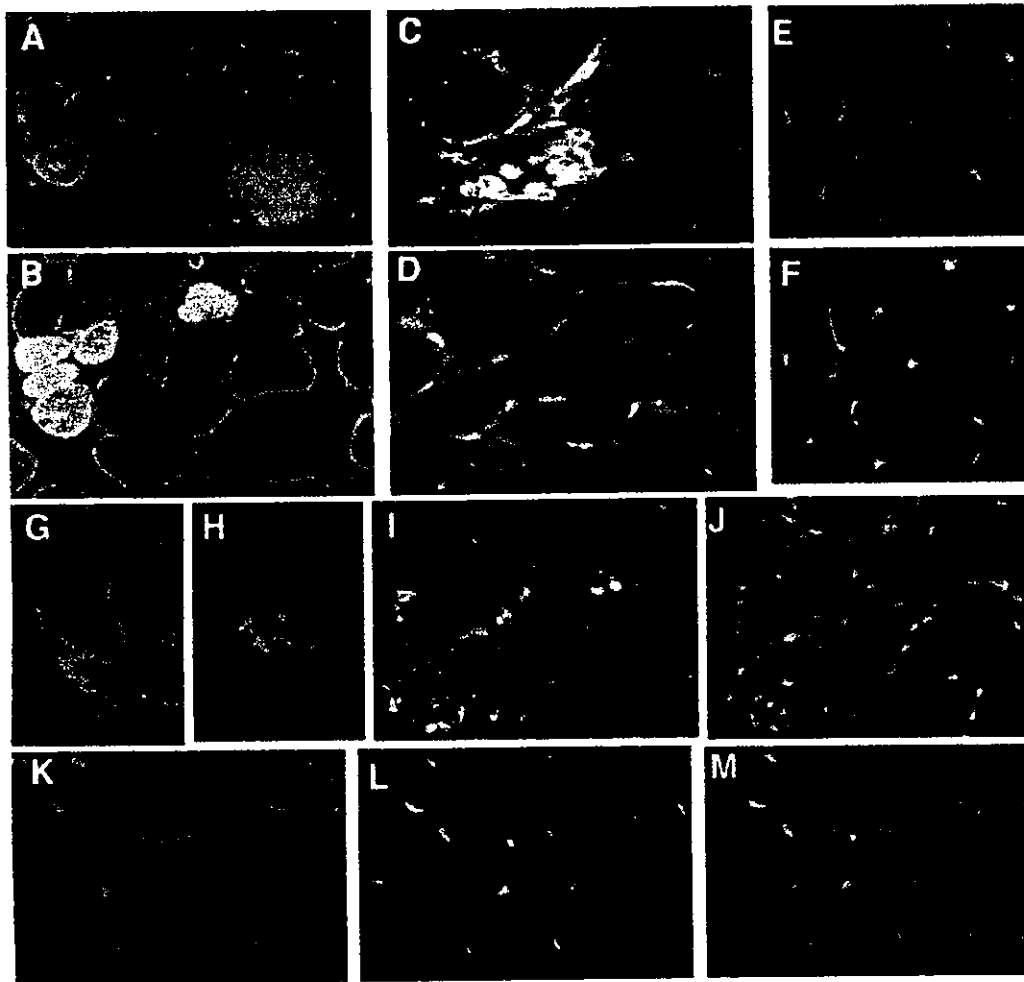
#### Mouse muscular dystrophy (Figure 6)

In B-10 mouse muscle, PDGFR alpha was faintly immunolocalized on muscle sarcolemma and intensely localized at neuromuscular junctions (Figure 6A). In *mdx* mouse muscle, PDGFR alpha was immunolocalized lightly to moderately on the sarcolemma of





**Figure 3.** Immunolocalization of PDGFR alpha (A–D) and PDGFR beta (E–J) in biopsied muscles from control (A, E), DMD (B, C, F, G), FCMD (D, H, I), and merosin-positive CMD (I). Immunoreactivity against PDGFR alpha (B) and beta (F) was completely abolished after absorption with antigen peptides (C, G). Immunoreactivity against both PDGFRs in CMD muscle biopsied in early infancy was marked in the endomysium (D, H, I), while FCMD muscles biopsied from elderly cases with advanced fibrosis showed a lack of immunoreactivity (J)



**Figure 4.** Double and triple labelling of PDGFR alpha and beta in DMD muscles (A–D, G–M) and control (E, F). (A, B) PDGFR alpha was expressed in regenerating fibres with remarkable desmin positivity and necrotic fibres without desmin immunoreactivity [double labelling; A: PDGFR alpha (red); B: desmin (green)]. (C) PDGFR alpha was co-localized with CD68 in the macrophages infiltrating into and around necrotic fibres (yellow) [merged PDGFR alpha (red)/CD68 (green)]. (D) PDGFR alpha was co-localized with a marker of activated fibroblasts, P-4-H (yellow) [double labelling; merged PDGFR alpha (red)/P-4-H (green)]. (E, F) PDGFR beta was co-localized with CD31 at the intramuscular capillaries [double labelling; E: PDGFR beta (red); F: CD31 (green)]. (G, H) PDGFR beta was lightly expressed in regenerating fibres with remarkable desmin positivity, while vessels and interstitium showed intense staining [double labelling; G: PDGFR beta (red); H: desmin (green)]. (I, J) PDGFR beta was co-localized with CD68 in some macrophages (yellow) in the interstitium. Other mononuclear interstitial cells were also positively stained [triple labelling; I: merged PDGFR beta (red)/CD68 (green); J: merged PDGFR beta (red)/Hoechst 33342 (blue)]. (K–M) PDGFR beta was exclusively co-localized with activated fibroblasts in the endomysium (yellow) [double labelling; K: PDGFR beta (red); L: P-4-H (green); M: merged PDGFR beta/P-4-H]

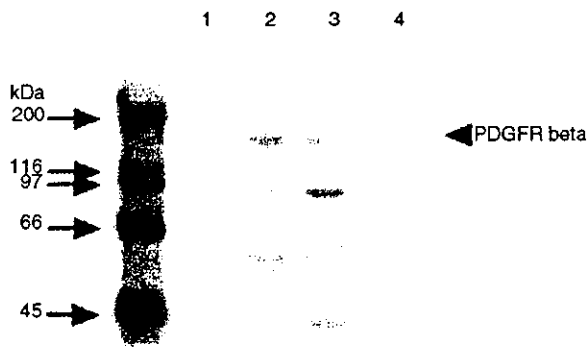
regenerating muscle fibres (Figure 6B). The cytoplasm and internal nuclei of regenerating muscle fibres were also lightly stained. In *dy* mouse muscle, PDGFR alpha was moderately to intensely immunolocalized in the endomysium and muscle fibre sarcolemma also showed light to moderate staining. Cells distributed in the endomysium and nuclei of regenerating fibres were intensely immunostained (Figure 6C).

PDGFR beta immunostaining showed light positivity in the vessels and interstitium in B-10 mice (Figure 6D), while in *mdx* mice, the cytoplasm of regenerating muscle fibres and endomysium were lightly stained (Figure 6E). In *dy* mice, the interstitium and cells distributed in the endomysium were intensely stained with PDGFR beta, as seen in human

DMD and CMD muscles (Figure 6F). Regenerating fibre cytoplasm was also lightly immunostained.

## Discussion

Previous studies have shown that TGF $\beta$ 1 and bFGF are involved in the pathophysiology of human muscular dystrophy, particularly in muscle fibrosis [6–8,22]. However, their distinct localization in dystrophic muscles had not been studied in detail with double immunolocalization. Moreover, receptors for these growth factors had not been studied, except for FGF receptor 4, which was expressed in one patient with FSHD [22]. Our study has shown that PDGF



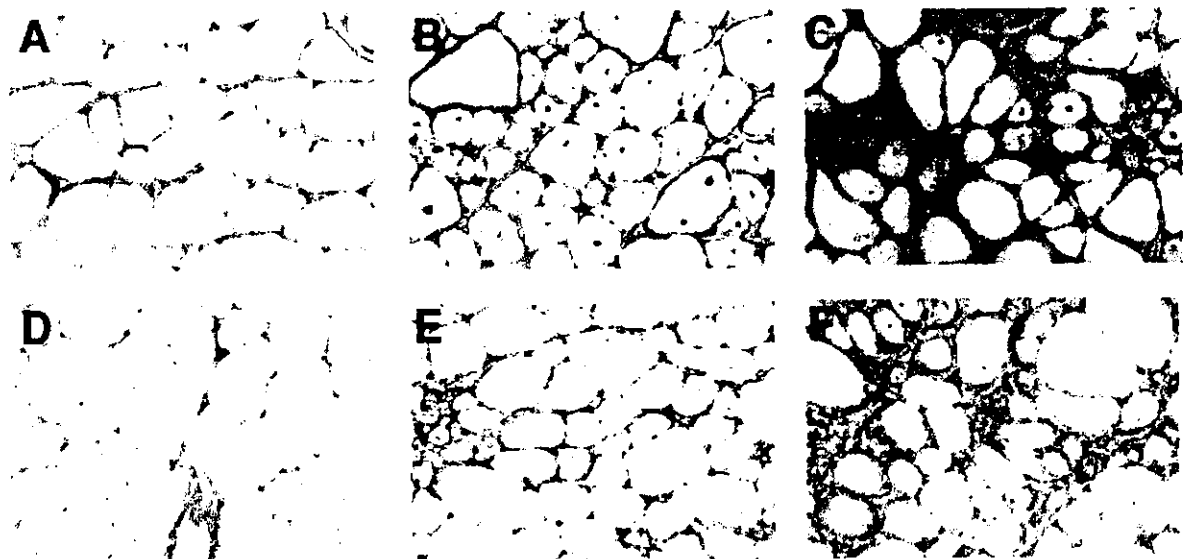
**Figure 5.** Immunoblot analysis of PDGFR beta in extracts from muscles from the normal control (lane 1), FCMD biopsied in early infancy (lanes 2 and 3), and FCMD biopsied in an elderly patient (lane 4). A 180 kD band corresponding to PDGFR beta protein is clearly present in the muscles of cases with early FCMD, while the muscles of normal controls and cases with advanced FCMD lacked a recognizable band for PDGFR beta

and its receptors are involved in the pathophysiology of dystrophic muscles. Using double immunohistochemistry, we have shown that in dystrophic muscles, PDGF is immunolocalized in infiltrating macrophages, regenerating muscle fibres, and myofibre nuclei, and that PDGFR is immunolocalized in infiltrating macrophages, regenerating and necrotic muscle fibres, interstitial fibroblasts, and muscle fibre sarcolemma.

It is well known that fibrotic changes occur in the muscle tissue of *dy* mice in the early stage of development, while *mdx* mice show minimal fibrotic changes throughout their life, despite their lack of dystrophin [18]. There has been no reasonable explanation so far why *mdx* mice have a very slight clinical alteration, unlike DMD muscle. In the present study, PDGFR alpha and beta were immunolocalized markedly in the

endomysium of *dy* mice, compared with *mdx* mice. These results were comparable to the results for human dystrophic muscles. The relative abundance of interstitial PDGFR expression might contribute to the tissue fibrosis seen in *dy* mice.

The present study is the first report of significant PDGFR beta and alpha overexpression in the endomysium in human and mouse dystrophic muscles, particularly in *dy* mouse muscle. The present study is also the first to demonstrate that P-4-H-positive activated fibroblasts in the endomysium clearly express PDGFR alpha and beta. These findings demonstrate that fibroblasts in the endomysium of dystrophic muscles remain activated partly through paracrine regulation by PDGF. Interestingly, PDGF and its receptors are remarkably expressed in DMD and CMD muscles biopsied at an early stage of disease progression. However, immunoreactivity was almost abolished in DMD and CMD muscles biopsied from elderly patients with advanced fibrosis. This was clearly confirmed by immunoblot analysis, as shown in Figure 5. These findings suggest that PDGF and its receptors are significantly involved in the active stage of tissue destruction and are associated with the initiation or promotion of muscle fibrosis. These processes might occur in concert with other cytokines and growth factors, since *in vitro* studies have shown that (1) TGFβ increases PDGF-B mRNA transcription in microvascular endothelial cells [23] and also increases PDGFR beta transcription in human liver fat-storing cells [24]; (2) TGFβ up-regulates PDGFR alpha expression in human scar fibroblasts and fibroblasts from scleroderma patients [25]; (3) bFGF up-regulates PDGFR alpha expression in smooth muscle cells [26]; (4) PDGF-BB up-regulates PDGFR alpha and beta expression in human foreskin fibroblasts [27]; and (5) tissue fibroblasts are activated and transformed



**Figure 6.** Immunolocalization of PDGFR alpha (A–C) and beta (D–F) in muscles of B-10 (A, D), *mdx* (B, E), and *dy* (C, F) mice. Immunoreactivities of the endomysium for both PDGFRs were prominent in *dy* mice compared with those of *mdx* mice

to myofibroblasts by TGF $\beta$  and PDGF [28]. In fibrosis, PDGF-BB and PDGFR alpha or beta contribute to scleroderma formation and liver fibrosis, while PDGF-AA and PDGFR alpha contribute to pulmonary fibrosis [29]. In dystrophic muscles, our study clearly shows that fibrosis is controlled by both PDGFR alpha and beta signalling.

Previous studies have shown that necrotic muscle fibres release chemotactic factors to attract polymorphonuclear leukocytes and macrophages, while macrophages release factors that induce a chemotactic response in satellite cells [30–32]. Satellite cells migrate to the necrotic area and begin to proliferate, and muscle fibre regeneration is accomplished after the fusion of those cells [30]. In all the dystrophic muscles examined in this study, PDGF-A and PDGF-B were strongly immunolocalized in the cytoplasm and nuclei of regenerating muscle fibres and in macrophages infiltrating into necrotic fibres. PDGFR alpha and beta were also immunolocalized in regenerating muscle fibre cytoplasm and macrophages. Previous *in vitro* studies using mouse and porcine cultured myoblasts demonstrated that the PDGF-BB/PDGFR beta signalling pathway is mainly involved in myoblast proliferation [13,33]. However, our study shows that PDGF-A and PDGF-B peptides and their beta and alpha receptors are expressed equally in regenerating fibres. This suggests that both chains have autocrine and paracrine roles in muscle fibre regeneration or satellite cell chemotaxis in dystrophic skeletal muscles.

PDGFR alpha was overexpressed in the non-regenerating muscle fibre sarcolemma in DMD and CMD, but faintly expressed in BMD. However, it remains to be clarified whether PDGFR alpha has any physiological function in non-regenerating dystrophic muscle fibres. Utrophin, an autosomal homologue to dystrophin, preferentially accumulates at the postsynaptic membrane in normal muscle fibres [34], but is overexpressed at the sarcolemma of DMD muscle fibres [35]. Recent research revealed that the up-regulation of utrophin functionally compensates for the lack of dystrophin in *mdx* mice [36]. Since PDGFR alpha also accumulates at the neuromuscular junction in normal muscle, it will be interesting to study the functional relationship between PDGFR alpha and dystrophin-related proteins.

The present study demonstrates that PDGF-A, PDGF-B, PDGFR alpha, and PDGFR beta are all immunolocalized at the neuromuscular junction, suggesting that they have physiological roles in the interaction between the presynaptic and postsynaptic components [21]. Similar roles have been reported for other growth factors expressed at the neuromuscular junction, such as bFGF, TGF $\beta$ 1 and TGF $\beta$ 2 [37–39].

We have demonstrated that PDGF and its receptors are related to muscle fibre regeneration and fibrosis, and that they may be important for the progression of muscular dystrophy. Recently, the *in vivo* transfer of the PDGFR beta extracellular domain effectively ameliorated bleomycin-induced pulmonary fibrosis [40].

Other PDGF antagonists have also been used to reduce pathological changes induced by PDGF [41,42]. These methods should also be tested in models of muscular dystrophy.

#### Acknowledgement

This work was supported partly by funding from The Morinaga Hoshi-kai, Japan.

#### References

1. Mastaglia FL, Kakulas BA. Regeneration in Duchenne muscular dystrophy: a histological and histochemical study. *Brain* 1969; **92**: 809–818.
2. Cuzzato G. Consideration about a possible role played by connective tissue proliferation and vascular disturbances in the pathogenesis of progressive muscular dystrophy. *Eur Neurol* 1968; **1**: 158–179.
3. Ionasescu V, Lora-Braud C, Zellweger H, et al. Fibroblast cultures in Duchenne muscular dystrophy. Alterations in synthesis and secretion of collagen and noncollagen proteins. *Acta Neurol Scand* 1977; **55**: 407–417.
4. Melone MAB, Peluso G, Petillo O, et al. Defective growth *in vitro* of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: the molecular and biochemical basis. *J Cell Biochem* 1999; **76**: 118–132.
5. Melone MAB, Peluso G, Gakderisi U, et al. Increased transcription of IGF binding protein-5 (IGFBP-5) mRNAs in Duchenne muscular dystrophy (DMD) fibroblasts correlates with the fibroblast induced down regulation of DMD myoblast proliferation: an *in vitro* analysis. *Neurology* 2000; **54**(Suppl 3): A438–A439.
6. Bernasconi P, Torchiana E, Confalonieri P, et al. Expression of transforming growth factor-beta1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. *J Clin Invest* 1995; **96**: 1137–1144.
7. Bernasconi P, Di Blasi C, Mora M, et al. Transforming growth factor-beta 1 and fibrosis in congenital muscular dystrophies. *Neuromuscular Disord* 1999; **9**: 28–33.
8. Yamazaki M, Minota S, Sakurai H, et al. Expression of transforming growth factor-beta1 and its relation to endomyosial fibrosis in progressive muscular dystrophy. *Am J Pathol* 1994; **144**: 221–226.
9. D'Amore PA, Brown JRH, Ku P-T, et al. Elevated basic fibroblast growth factor in the serum of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 1994; **35**: 362–365.
10. Ishitobi M, Haginoya K, Zhao Y, et al. Elevated plasma levels of transforming growth factor beta1 in patients with muscular dystrophy. *NeuroReport* 2000; **11**: 4033–4035.
11. Heldin C-H, Westermark B. Platelet-derived growth factor: mechanism of action and possible *in vivo* function. *Cell Regul* 1990; **1**: 555–566.
12. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 1986; **46**: 155–169.
13. Seifert RA, Hart CE, Phillips PE, et al. Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factor receptors. *J Biol Chem* 1989; **264**: 8771–8778.
14. Jin P, Rahm M, Claesson-Welsh L, et al. Expression of PDGF A-chain and B-receptor genes during rat myoblast differentiation. *J Cell Biol* 1990; **110**: 1665–1672.
15. Sejersen T, Betsholtz C, Sjolund M, et al. Rat skeletal myoblasts and arterial smooth muscle cells express the gene for the A chain but not the gene for the B chain (c-sis) of platelet-derived growth factor (PDGF) and produce a PDGF-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; **83**: 6844–6848.
16. Tidball JG, Spencer MJ, Pierre BA. PDGF-receptor concentration is elevated in regenerative muscle fibers in dystrophin-deficient muscle. *Exp Cell Res* 1992; **203**: 141–149.
17. Jin P, Sejersen T, Ringertz NR. Recombinant platelet-derived growth factor-BB stimulates growth and inhibits differentiation of rat L6 myoblasts. *J Biol Chem* 1991; **266**: 1245–1249.