

- diomyopathy and encephalomyopathy. *Ann. Neurol.*, 49:195-201, 2001.
- 13) Mandel, H., Szargel, R., Labay, V.N. et al.: The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat. Genet.*, 29:337-341, 2001.
  - 14) Newmeyer, D.D., Ferguson-Miller, S.: Mitochondria: Releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*, 112:481-490, 2003.
  - 15) Nishino, I., Spinazzola, A., Hirano, M.: Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science*, 283:689-692, 1999.
  - 16) Papadopoulou, L.C., Sue, C.M., Davidson, M.M. et al.: Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nat. Genet.*, 23:333-337, 1999.
  - 17) Parfait, B., Chretien, D., Rötig, A. et al.: Compound heterozygous mutations in the flavoprotein gene of the respiratory chain complex II in a patient with Leigh syndrome. *Hum. Genet.*, 106:236-243, 2000.
  - 18) Saada, A., Shaag, A., Mandel, H. et al.: Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat. Genet.*, 29:342-344, 2001.
  - 19) Schlame, M., Towbin, J.A., Heerdt, P.M. et al.: Deficiency of tetralinoleoyl-cardiolipin in Barth syndrome. *Ann. Neurol.*, 51:634-637, 2002.
  - 20) Schuelke, M., Smeitink, J., Mariman, E. et al.: Mutant NDUFV1 subunit of mitochondrial complex I causes leukodystrophy and myoclonic epilepsy. *Nat. Genet.*, 21:260-261, 1999.
  - 21) Spelbrink, J.N., Li, F.Y., Tiranti, V. et al.: Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat. Genet.*, 28:200-201, 2001.
  - 22) Tiranti, V., Hoertnagel, K., Carrozzo, R. et al.: Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*, 63:1609-1621, 1998.
  - 23) Triepels, R.H., van den Heuvel, L.P., Loeffen, J.L. et al.: Leigh syndrome associated with a mutation in the NDUF7 (PSST) nuclear encoded subunit of complex I. *Ann. Neurol.*, 45:787-790, 1999.
  - 24) Ujike, H., Tanabe, Y., Takehisa, Y. et al.: A family with X-linked dystonia-deafness syndrome with a novel mutation of the DDP gene. *Arch. Neurol.*, 58:1004-1007, 2001.
  - 25) Valnot, I., Osmond, S., Gigarel, N. et al.: Mutations of the SCO1 gene in mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency with neonatal-onset hepatic failure and encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.*, 67:1104-1109, 2000.
  - 26) Valnot, I., von Kleist-Retzow, J.C., Barrientos, A. et al.: A mutation in the human heme A:farnesyltransferase gene (COX10) causes cytochrome c oxidase deficiency. *Hum. Mol. Genet.*, 9:1245-1249, 2000.
  - 27) van den Heuvel, L., Ruitenbeek, W., Smeets, R. et al.: Demonstration of a new pathogenic mutation in human complex I deficiency: a 5-bp duplication in the nuclear gene encoding the 18-KD (AQDQ) subunit. *Am. J. Hum. Genet.*, 62:262-268, 1998.
  - 28) Van Goethem, G., Dermaut, B., Lofgren, A. et al.: Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat. Genet.*, 28:211-212, 2001.
  - 29) Visapaa, I., Fellman, V., Vesa, J. et al.: GRACILE syndrome, a lethal metabolic disorder with iron overload, is caused by a point mutation in BCS1L. *Am. J. Hum. Genet.*, 71:863-876, 2002.
  - 30) Yang, M.Y., Bowmaker, M., Reyes, A. et al.: Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. *Cell*, 111:495-505, 2002.
  - 31) Zhu, Z., Yao, J., Johns, T. et al.: SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat. Genet.*, 20:337-343, 1998.

# ミトコンドリア脳筋症の病因・病態解析

後藤 雄一

国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第2部 部長

ミトコンドリア脳筋症の病因は、大きく核DNAとミトコンドリアDNAに分けられる。ミトコンドリアDNA異常による病態の理解には、ミトコンドリアDNAのコピー数が多いという性質に依存するヘテロプラスミーの表現型を知ることが重要である。そのために、患者由来の培養細胞、モデル動物を用いた研究が行われている。一方、病因となる核DNA変異が次々と明らかになってきた。特にミトコンドリアDNAの複製・維持に関わる因子の遺伝子変異例の発見から、核-ミトコンドリア相互作用に関わる新しい分野が開けてきている。



ミトコンドリア脳筋症, ミトコンドリアDNA, ヘテロプラスミー, 閾値効果, dNTPプール, アンチコドン修飾, タウリン, Mito-mice.

## はじめに

ミトコンドリア脳筋症は、1962年のLuftらによる疾患概念の提唱に始まる。生化学的・形態学的手法に加えて、1988年のHoltらによるミトコンドリアDNA (mtDNA) 欠失の発見から分子遺伝学的手法が加わり、病因・病態に関する研究が大きく進展した。最近では、核DNA上に存在するミトコンドリア病に関わる遺伝子変異が次々と同定され、その知見に基づいた詳細な病態・治療研究が進められている。さらに、ミトコンドリアが細胞内エネルギー産生以外に、酸化ストレス・アポトーシス・細胞内カルシウム動態に重要な役

割を持つことが明らかにされ、ミトコンドリア脳筋症ばかりでなく、種々の神経変性疾患（アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病など）の病態における修飾因子としてのミトコンドリア機能異常が注目されてきている。

本稿では、ミトコンドリア脳筋症に関する最近の進歩を、特に病因と病態解析に焦点を当てて解説する。

## 1. 病因に関する新しい知見

### 1. ミトコンドリアDNA異常

ミトコンドリア脳筋症の病因としてmtDNA異常と核DNA上の遺伝子変異がある (図1)。mtDNAは、

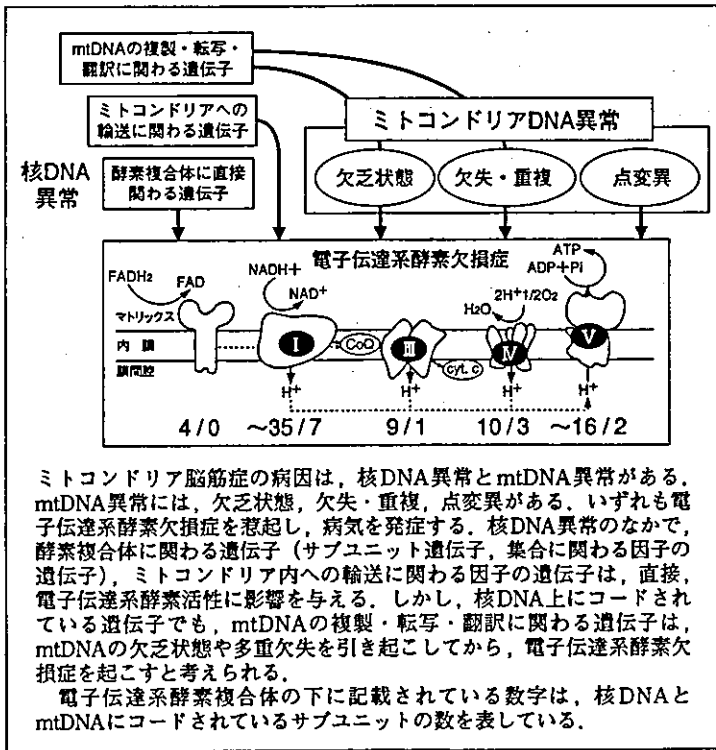
Yu-ichi Goto

Department of Mental Retardation & Birth Defect Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology & Psychiatry, Director

E-mail: goto@ncup.go.jp

： Study on genetics and pathogenesis of mitochondrial eucephalomyopathies

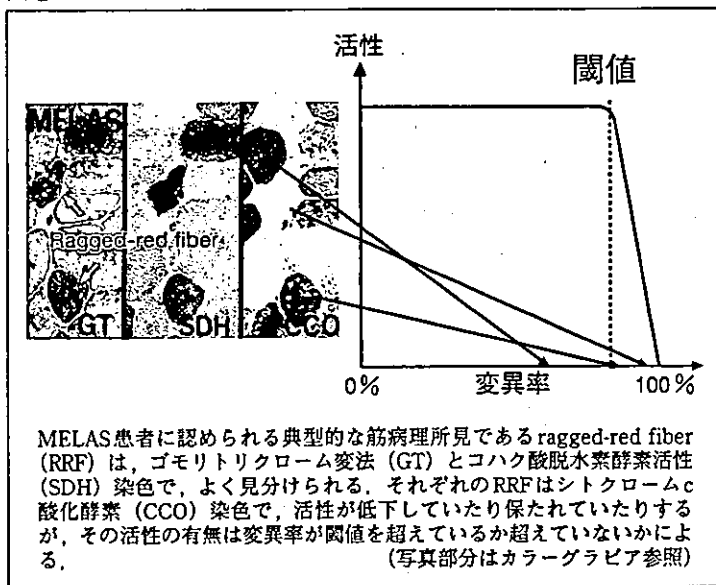
図① ミトコンドリア脳筋症の病因



ミトコンドリア脳筋症の病因は、核DNA異常とmtDNA異常がある。mtDNA異常には、欠乏状態、欠失・重複、点変異がある。いずれも電子伝達系酵素欠損症を惹起し、病気を発症する。核DNA異常のなかで、酵素複合体に関わる遺伝子（サブユニット遺伝子、集合に関わる因子の遺伝子）、ミトコンドリア内への輸送に関わる因子の遺伝子は、直接、電子伝達系酵素活性に影響を与える。しかし、核DNA上にコードされている遺伝子でも、mtDNAの複製・転写・翻訳に関わる遺伝子は、mtDNAの欠乏状態や多重欠失を引き起こしてから、電子伝達系酵素欠損症を起こすと考えられる。

電子伝達系酵素複合体の下に記載されている数字は、核DNAとmtDNAにコードされているサブユニットの数を表している。

図② ヘテロプラスミーと閾値



1個のミトコンドリア内に5ないし10コピー存在しており、さらにミトコンドリアは1細胞内に数十から数百個存在している。すなわち、mtDNAは1細胞に数百から数千コピー存在していることになる。mtDNA異常には質的異常と量的異常があり、質的異常として、欠失・重複、点変異が、量的異常として欠乏状態(1細胞内のコピー数の減少)が報告されている。最近になっても、新しい病因的点変異の報告が相次ぎ、総数として、転移RNAもしくはリボソームRNA領域の点変異が50あまり、タンパク質をコードしている領域の点変異も40あまりとなっている。

mtDNA異常の特徴として、多くの転移RNA上の点変異は、1細胞内に変異型と正常型が混在する状態で存在すること(これをヘテロプラスミーという)がほとんどであり、一方、タンパク質コード領域に存在する点変異は、変異型のみで存在すること(これをホモプラスミーという)が多い。興味深いのは、ヘテロプラスミーの割合(どれくらいの比率で変異型が存在するかということ)が、生化学的・病理学的な障害度と密接に関わっていることである。また、ヘテロプラスミーの比率が低いときは何も起きないが、それが一定の比率を超えると細胞の障害が出現することが知られており、このような効果を閾値効果と呼んでいる(図②)。この現象から、ある病因的変異が患者で検出されたとしても、閾値を超えない比率で存在しているmtDNAは何も障害を与えていない、すなわち、病気ではない可能性がある。変異mtDNAの存在が必ずしも病気であることと同義でないことは十分理解しておく必要がある。しかし、ホモプラスミーの場合はこのような関係は当てはまらない。

2. 核DNA上の遺伝子変異

(1) 電子伝達系酵素を構成するサブユニットの遺伝子

最近の病因研究での進歩は、核DNA上に存在する遺伝子変異の発見が挙げられる(表①)。まず、電子伝達系酵素複合体の核DNA由来のサブユニット遺伝子

変異として、複合体 I の *NDUFV1*, *NDUFS4*, *NDUFS7*, *NDUFS8*, *NDUFS2*, *NDUFS1* の 6 個に発見された<sup>11-13</sup>。複合体 I の核由来サブユニットは 30 数個知られており、これ以外のサブユニット遺伝子の変異が存在することは否定できない。しかし、すべての複合体 I 欠損症に対して、30 個以上の遺伝子を網羅的に検索することは困難であり、今のところ遺伝子診断は臨床応用することはできていない。これらの多くは、生化学的には複合体 I 欠損を示し、臨床的には Leigh 脳症、心筋症があるのが特徴である。また、ある Leigh 脳症患者では複合体 II のフラボプロテインサ

ブユニットをコードしている *SDHA* 遺伝子の変異が報告された<sup>14-16</sup>。

(2) 酵素複合体の集合に関わる因子の遺伝子

電子伝達系酵素複合体サブユニットそのものではなく、集合に関わる因子の遺伝子変異も報告されている。その代表は、複合体 IV (チトクローム c 酸化酵素: COX) 欠損を伴う Leigh 脳症で認める *SURF-1* 変異である。この遺伝子産物の機能はまだ明らかにされていないが、欠損すると COX 集合に障害の起こることが示されている<sup>10</sup>。また、同じ COX 欠損を示す患者で、心筋症を伴う脳筋症患者で *SCO2*<sup>11)</sup>、肝不全を伴う脳筋症患者で *SCO1*<sup>12)</sup>、また別の脳筋症患者で *COX10*<sup>13)</sup> の遺伝子変異が報告された。また複合体 III 欠損患者で、集合因子である *BCS1L* 遺伝子の変異が同定されている<sup>10</sup>。

(3) ミトコンドリア DNA の維持・複製に関わる因子

ミトコンドリア DNA の維持・複製に関わる核 DNA 由来因子の遺伝子変異も次々と明らかにされている。この場合、mtDNA 側の異常としては、多重欠失と欠乏状態が惹起される。すなわち、核 DNA 変異と mtDNA 異常と一緒に存在していることになる。多重欠失を起こす遺伝子変異は、*TP* (thymidine phosphorylase)<sup>15)</sup>、*ANT-1* (adenine nucleotide translocator-1)<sup>16)</sup>、*Twinkle*<sup>17)</sup>、*POLG* (DNA polymerase gamma)<sup>18)</sup> が知られており、そのうち *TP* は劣性遺伝、それ以外の遺伝子は優性遺伝家系の原因遺伝子となっている。また、mtDNA の欠乏状態は、*TP* 以外に、*TK2* (thymidine kinase 2)<sup>19)</sup>、*dGK* (deoxyguanosine kinase)<sup>20)</sup> が報告された。これらは、ミトコンドリア内の dNTP プールの維持に関与していると考えられ、その破綻が mtDNA 複製に悪影響を与えるものと考えられている。さらに、mtDNA の転写・複製に関わる *Tfam1* のノックアウトマウスで、ヒトのミトコンドリア脳筋症と類似した症状を示すことが報告されたが<sup>21) 22)</sup>、*Tfam1* の遺伝子変異はヒトではいまだ見出されていない。

表 1 核 DNA 変異

病因遺伝子	臨床表現型
複合体 I サブユニット	
<i>NDUFV1</i>	脳筋症
<i>NDUFS4</i>	Leigh 脳症
<i>NDUFS7</i>	Leigh 脳症
<i>NDUFS8</i>	心筋症を伴う Leigh 脳症
<i>NDUFS2</i>	心筋症を伴う脳筋症
<i>NDUFS1</i>	脳筋症, Leigh 脳症
複合体 II サブユニット	
<i>SDHA</i>	Leigh 脳症, 視神経萎縮+運動失調
<i>SDHB</i>	家族性褐色細胞腫, 遺伝性傍神経節腫
<i>SDHC, SDHD</i>	遺伝性傍神経節腫
複合体 III に関係する因子	
<i>BCS1L</i>	GRACILE 症候群 腎尿管障害+肝障害を伴う筋症
複合体 IV に関係する因子	
<i>SURF-1</i>	Leigh 脳症
<i>SCO2</i>	心筋症を伴う脳筋症
<i>SCO1</i>	肝不全を伴う脳筋症
<i>COX10</i>	脳筋症
<i>COX15</i>	心筋症を伴う脳筋症
その他	
<i>TP</i>	MNGIE (mitochondrial neuro-gastro-intestinal encephalomyopathy)
<i>ANT-1</i>	進行性外眼筋麻痺症候群
<i>Twinkle</i>	進行性外眼筋麻痺症候群
<i>POLG</i>	進行性外眼筋麻痺症候群
<i>TK2</i>	ミトコンドリア DNA 欠乏症候群
<i>dGK</i>	ミトコンドリア DNA 欠乏症候群

## II. 病態に関する新しい知見

### 1. 細胞レベルの研究成果

ミトコンドリア脳筋症の病態を理解するには、遺伝子型と表現型との関係を理解することである。その際に、ミトコンドリア、細胞、組織、臓器、個体などの構造上のレベルを認識しておくことが重要である。mtDNA異常が原因で起こるミトコンドリア脳筋症の場合、1細胞に数千コピー存在するmtDNAが、どのような挙動をとり、ミトコンドリア、細胞という構造レベルでその発現効果が表現されるのかは、主に培養細胞を用いた研究で進められている。特に、病因的mtDNA点変異のヘテロプラスミーとその効果に関する研究では、いくつか興味深い結果が報告されている。

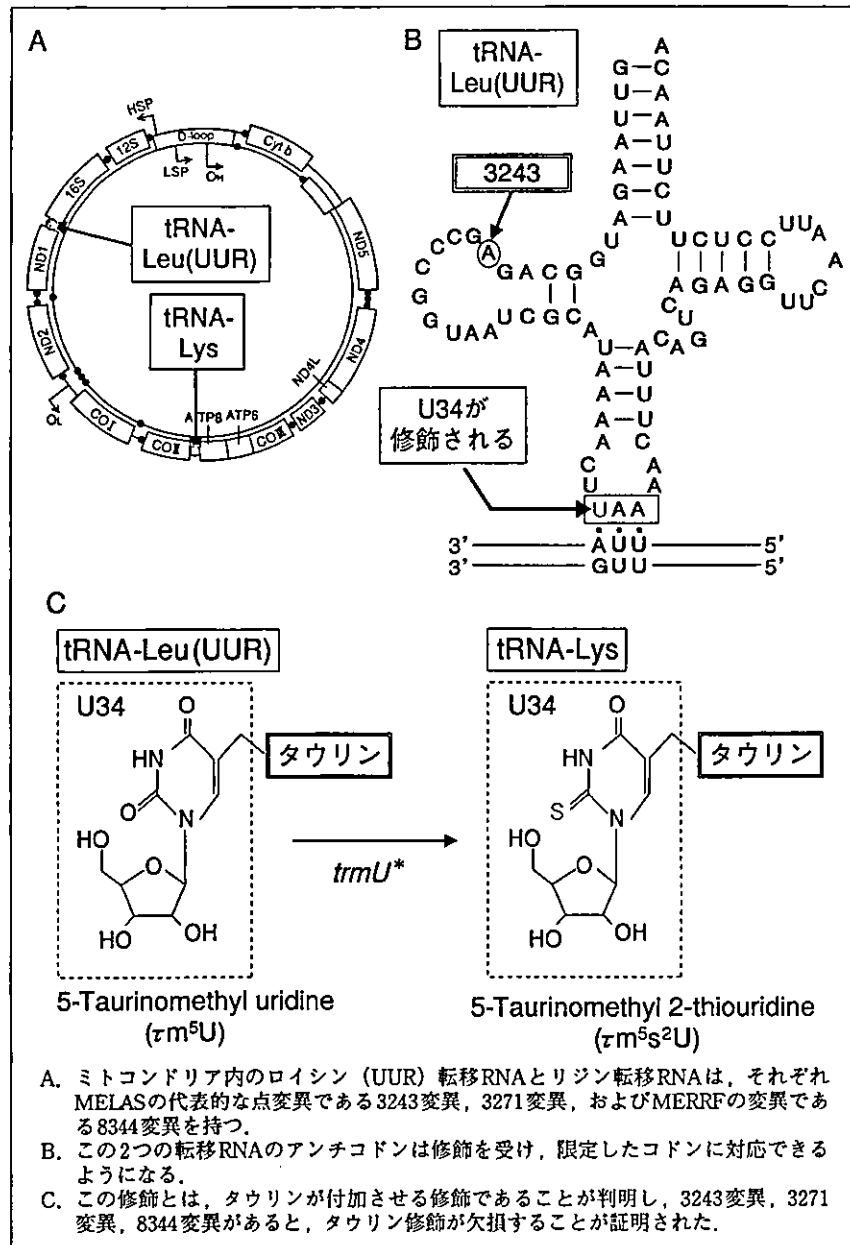
#### (1) 異なる点変異を持つmtDNA間の代償作用の有無

1つの培養細胞内には、数百のミトコンドリアが存在しており、それがダイナミックに結合したり分裂したりしている。ミトコンドリア脳筋症患者では、そのmtDNAに病的点変異が存在していることになるが、例えば3243変異を例にとると、変異を持つmtDNAが90%以上にならないと酵素活性に異常が出てこない。すなわち90%の変異率が閾値である。また、mtDNAは突然変異を生じやすいことも知られている。そこで、

老化の原因として、mtDNAの点変異の蓄積が電子伝達系酵素活性の低下を招き、細胞が病的になるという仮説が提唱されている。実際に、変異の蓄積は、細胞レベルでどう表現されるのであろう。

ミトコンドリア脳筋症の代表的な点変異である3243変異と8344変異をそれぞれ持つ培養細胞を融合させ、お互いの酵素活性低下を代償するかどうかという実験がなされ、うまく代償されないことが示された<sup>23) 24)</sup>。しかし、一方で筑波大学の林研究室の実験では、4269

図3 タウリン修飾とその異常



変異と3243変異が互いに代償し合うことを報告した。しかし、代償作用が十分に発揮されるためには、細胞融合後10日から14日もかかることも報告された<sup>25)</sup>。代償がないとするグループも反論を試みており、この代償があるかどうかの結論は、老化に伴うmtDNAの変異蓄積が細胞障害を引き起こすかどうかを決定づける重要な要因であるので、たいへん興味深い。

## (2) アンチコドン修飾異常

MELAS (高乳酸血症, 脳卒中様発作を伴うミトコンドリア脳筋症) の代表的な点変異である3243変異, 3271変異とMERRF (ミオクロノステんかんを伴うミトコンドリア脳筋症) の代表的な変異である8344変異は, それぞれロイシン (UUR) 転移RNAとリジン転移RNA内に存在する (図③A)。ロイシン (UUR) 転移RNAはコドンUUAとUUGを認識し, リジン転移RNAはコドンAAAとAAGを認識する。東京大学の安川大学院生, 鈴木講師, 渡辺教授, 日本医科大学の大田教授らは, コドン3文字目がAかGの場合に認識できるこれらの転移RNAにおいて, 正常ではアンチコドンの1文字目 (U34) がタウリン修飾を受けているのに, 患者由来の変異を持つ転移RNAではその修飾が欠損していることを見出した<sup>26)–28)</sup> (図③C)。そして, 実際の転移RNA活性を調べ, 対応するアミノ酸の翻訳効率が落ちること, コドン-アンチコドンの対合自体が弱まることを証明した。これらの実験結果は, 変異を持つ転移RNAそのものが, 翻訳反応レベルで異常をきたしうることを直接的に証明したことになる。

## 2. 組織・臓器レベルの病態に関する新知見

組織・臓器レベルのミトコンドリア脳筋症患者の研究も不可欠である。細胞レベルでの基礎研究が進んでも, その知見が直ちに組織・臓器レベル, すなわち臨床レベルでの情報とはなりにくい。特に, ミトコンドリア脳筋症において, 再生が活発な骨格筋や肝臓細胞と, 再生の乏しい心筋や神経細胞とでは, その病態が

異なることは明らかである。ミトコンドリア脳筋症においてもいくつかの疾患モデルが作製されてきたが, mtDNA変異を有するモデル動物は実在しなかった。しかし, 2000年にわれわれと筑波大学, 国立感染症研究所との共同研究で, ヒトの病気と同様な欠失mtDNAを有するマウス (Mito-Mice) の作出に成功した<sup>29) 30)</sup>。

欠失mtDNAを80%以上で有するMito-Miceは生後約2ヵ月くらいから体重増加不良を認め, おおよそ6ヵ月で死亡する。死因は腎不全で, 病理学的には高度の糸球体硬化像を認める。また, 網膜変性, 心伝導障害, 高乳酸血症を認め, 筋病理所見もヒトの所見と酷似している。従って, Mito-Miceは, ヒトのKearns-Sayre症候群 (KSS) の疾患モデルといえる。KSSでは, 大脳白質の変性所見や糖尿病の合併なども認められるので, その点の確認などが今後の課題である。

Mito-Miceとヒトの病気の間の最も大きな相違点は, 遺伝形式である。KSSは通常遺伝性がなく, 突然変異で起こると考えられている。ただし, ヒトの場合でも欠失と同時に重複が存在するときは, 母系遺伝したと考えられる症例が報告されている。Mito-Miceを調べたところ, 骨格筋を含むいくつかの臓器で, 重複mtDNAの存在が確認されている<sup>29)</sup>。重複mtDNAの存在と母系遺伝との関係について, Mito-Miceの卵細胞を詳細に検討することで, 新しい知見が得られる可能性がある。

## 参考文献

- 1) Benit P, Chretien D, et al: Am J Hum Genet 68, 1344-1352, 2001.
- 2) Loeffen J, Smeitink J, et al: Am J Hum Genet 63, 1598-1608, 1998.
- 3) Loeffen J, Elpeleg O, et al: Ann Neurol 49, 195-201, 2001.
- 4) Schuelke M, Smeitink J, et al: Nat Genet 21, 260-261, 1999.
- 5) Triepels RH, van den Heuvel LP, et al: Ann Neurol 45, 787-789, 1999.
- 6) van den Heuvel LP, Ruitenbeek W, et al: Am J Hum Genet 62, 262-268, 1998.

- 7) Birch-Machin MA, Taylor RW, et al: Ann Neurol 48, 330-335, 2000.
- 8) Bourgeron T, Rustin P, et al: Nat Genet 11, 144-148, 1995.
- 9) Parfait B, Chretien D, et al: Hum Genet 106, 236-243, 2000.
- 10) Tiranti V, Galimberti C, et al: Hum Mol Genet 8, 2533-2540, 1999.
- 11) Papadopoulou LC, Sue CM, et al: Nat Genet 23, 333-337, 1999.
- 12) Valnot I, Osmond S, et al: Am J Hum Genet 67, 1104-1109, 2000.
- 13) Valnot I, von Kleist-Retzow JC, et al: Hum Mol Genet 9, 1245-1249, 2000.
- 14) de Lonlay P, Valnot I, et al: Nat Genet 29, 57-60, 2001.
- 15) Nishino I, Spinazzola A, et al: Science 283, 689-692, 1999.
- 16) Kaukonen J, Juselius JK, et al: Science 289, 782-785, 2000.
- 17) Spelbrink JN, Li FY, et al: Nat Genet 28, 200-201, 2001.
- 18) van Goethem G, Dermaut B, et al: Nat Genet 28, 211-212, 2001.
- 19) Saada A, Shaag A, et al: Nat Genet 29, 342-344, 2001.
- 20) Mandel H, Szargel R, et al: Nat Genet 29, 337-341, 2001.
- 21) Larsson NG, Wang J, et al: Nat Genet 18, 231-236, 1998.
- 22) Wang J, Wilhelmsson H, et al: Nat Genet 21, 133-137, 1999.
- 23) Enriquez JA, Cabezas-Herrera J, et al: J Biol Chem 275, 11207-11215, 2000.
- 24) Yoneda M, Miyatake T, et al: Mol Cell Biol 14, 2699-2712, 1994.
- 25) Ono T, Isobe K, et al: Nat Genet 28, 272-275, 2001.
- 26) Yasukawa T, Suzuki T, et al: J Biol Chem 275, 4251-4257, 2000.
- 27) Yasukawa T, Suzuki T, et al: FEBS Lett 467, 175-178, 2000.
- 28) Suzuki T, Suzuki T, et al: EMBO J 21, 6581-6589, 2002.
- 29) Inoue K, Nakada K, et al: Nat Genet 26, 176-181, 2000.
- 30) Nakada K, Inoue K, et al: Nat Med 7, 934-940, 2001.

## 第2回大阪北部(彩都)地域知的クラスターシンポジウム

### 「バイオベンチャーと製薬企業とのアライアンス：共存の可能性を探る」

主催：大阪北部(彩都)地域知的クラスター本部  
後援：文部科学省・近畿経済産業局・大阪府・(社)関西経済連合会・大阪商工会議所・大阪医薬品協会・NPO法人近畿バイオインダストリー振興会議・(財)大阪産業振興機構・彩都(国際文化公園都市)建設推進協議会・国際文化公園都市(株)

開催日：11月4日(火)13:00~17:00  
場所：千里ライフサイエンスセンター5階ライブホール

#### プログラム

基調講演：ベンチャーと企業との共存の可能性

日経BP社先端技術情報センター長……………宮田 満

一般講演：企業からの期待されるベンチャー

山之内製薬創薬研究本部研究推進部主任研究員……………根本 靖久

：ベンチャーの立場から見た期待される企業

(株)メディカル・プロテオスコープ取締役会長……………藤田 芳司

ナノキャリア㈱代表取締役社長……………中富 一郎

：投資家の立場から見たアライアンスのあり方

(株)バイオフロンティアパートナーズ代表取締役社長……………大滝 義博

パネルディスカッション：宮田 満(司会)・根本靖久・藤田芳司

中富一郎・大滝義博

参加費：無料 定員：400名(先着順)

申込方法：氏名、勤務先・学校名、〒住所、電話およびFAX

番号を記載の上、郵便、FAX、電子メールにて下記宛お申し込みください。参加証は発行しません

ので当日は直接ご来場ください。

申込先：〒560-0082 大阪府豊中市新千里東町1-4-2

千里ライフサイエンスセンタービル8階

(財)千里ライフサイエンス振興財団内

大阪北部(彩都)地域知的クラスター本部

TEL.06-6873-2006 FAX.06-6873-2306

E-mail: cluster-lsf@senri-ic.co.jp

http://www.senri-ic.co.jp/slf/

## 第19回 Wakoワークショップ

### 「自然免疫機構・病原体認識、シグナル伝達、疾患との連関」

開催日：11月28日(金)10:00~17:00

開催場所：全電通ホール(東京:御茶ノ水)

(東京都千代田区神田駿河台3-6, TEL. 03-3119-2211)

総合企画：三宅 健介(東京大学医科学研究所感染遺伝学分野教授)

講演プログラム

10:00 開会挨拶 和光純英

10:05 はじめに……………三宅 健介(東大医科研)

1. 病原体の認識

10:10 自然免疫によるウイルス感染細胞認識機構

……………荒瀬 尚(千葉大院医)

10:50 エンドキシン認識機構……………三宅 健介(東大医科研)

11:30 アポトーシスにおけるDNA分解とその異常

……………長田 重一(阪大院医)

12:10 昼食

2. シグナル伝達、獲得免疫との連携

13:10 Toll-like receptorsを介するシグナル伝達経路

……………審良 静男(阪大微研)

13:50 樹状細胞機能と免疫応答の制御

……………稲葉 カヨ(京大院生命科学)

14:30 CD25+CD4+制御性T細胞による免疫制御

……………坂口 志文(京大再生研)

15:10 コーヒーブレイク

3. 疾患との連関

15:30 自然免疫とアレルギー……………中西 憲司(兵庫医大医)

16:10 自然免疫関連分子の遺伝子変異と疾患との関連

……………白川 太郎(京大院医)

16:50 おわりに……………三宅 健介(東大医科研)

17:00 閉会挨拶 和光純英

参加費：無料 定員：420名(先着順)

申込先：和光純英工業株式会社

試薬営業本部 学術部 ワークショップ係

〒103-0023 東京都中央区日本橋本町四丁目5番13号

TEL: 03-3270-8582 FAX: 03-3270-8243

E-mail: seminar@wako-chem.co.jp

# A neonatal form of glycogen storage disease type IV

M. Nambu, MD, PhD; K. Kawabe, MD; T. Fukuda, MD, PhD; T.B. Okuno, MD; S. Ohta, MD; I. Nonaka, MD, PhD; H. Sugie, MD, PhD; and I. Nishino, MD, PhD

**Abstract**—We report of an infant with neonatal glycogen storage disease type IV (GSD IV) who was examined for severe hypotonia and cardiomyopathy. On the muscle biopsy there were many fibers with diastase-resistant polyglucosan bodies. Glycogen branching enzyme (GBE1) activity in the muscle was markedly reduced. The infant had a homozygous single nucleotide deletion in the open reading frame of *GBE1* gene.

NEUROLOGY 2003;61:392–394

Glycogen storage disease type IV (GSD IV; Andersen disease) is an autosomal recessive disorder caused by a deficiency of the glycogen branching enzyme (GBE1; 1,4-glucan: 1,4-glucan 6-glycosyl transferase).<sup>1</sup> The classic form of GSD IV is characterized by progressive liver cirrhosis. Less frequently, there are patients with liver disease without apparent progression. In addition to the hepatic form, some patients with the rare neuromuscular form presenting at birth with severe hypotonia have been reported.<sup>2–5</sup> Some mutations in the same *GBE1* gene have been found in patients with various presentations of GSD IV.<sup>6–8</sup> We report a newborn infant with GSD IV with a homozygous deletion of a single nucleotide in *GBE1* gene, who had profound hypotonia and dilated cardiomyopathy.

**Clinical course of this patient.** A female neonate was born at 36 weeks of gestation. Her mother noted decreasing fetal movements at 34 weeks. Polyhydramnios was shown by ultrasonic tomography at 35 weeks of gestation, but no anomalies were detected. Fluid was seen in the stomach, excluding the possibility of esophageal atresia.

At birth, the infant weighed 2,220 g, head circumference was 33 cm, and body length was 48.5 cm. There was more than 2,000 mL of amniotic fluid. The infant was not able to breathe adequately on her own and was intubated immediately after birth. She had severe hypotonia. Her deep tendon reflexes were absent, and her bowel sounds were barely audible. She required continuous mechanical ventilation and tube feeding.

The parents and other family members had no neuromuscular disorders. The mother's previous pregnancy had resulted in a first trimester fetal demise. There was no consanguinity.

EMG showed diffuse fibrillations and very small

motor unit potentials with dorsiflexion of the ankle. There was no waxing and waning phenomenon. EEG showed no abnormality and no repetitive local spike or sharp wave discharges. Median nerve conduction velocities were normal. An echocardiogram showed cardiomyopathy with left ventricular dilatation and hypokinesis of both ventricles. Ejection fraction was 52% at age 2 months and 25% at age 3 months.

Serum creatine kinase (CK) and CK-MB levels were 597 IU/L (normal, 20 to 180) and 225 IU/L (normal, 5 to 20) at birth, 4,616 and 227 IU/L at age 1 day, 500 to 1000 and 80 to 120 IU/L from age 5 to 20 days, and 300 to 500 and 50 to 80 IU/L after age 20 days.  $\alpha$ -Glucosidase activity in her leukocytes was normal. Urine organic acid analysis was normal. In the right biceps, biopsy done at age 3 months showed many muscle fibers with polyglucosan bodies resistant to diastase digestion.

Her clinical condition deteriorated as cardiomyopathy worsened. Hypoglycemia was not severe, but at age 4 months it became difficult to control her blood glucose levels. Her liver gradually became larger and firmer at age 4 months, but alanine aminotransferase (ALT) levels were <100 IU/L (normal, 3 to 30) and total bilirubin levels were normal. She died of a cardiomyopathy at age 4 months, but permission for autopsy was not obtained.

**Histochemical examination of skeletal muscle.** Serial 10- $\mu$ m transverse sections of frozen muscle were stained with hematoxylin and eosin (H-E), modified Gomori trichrome, and various histochemical methods.

There was moderate variation in fiber size, ranging from 5 to 40  $\mu$ m in diameter. There were no necrotic or regenerating fibers. Many fibers contained polyglucosan bodies (figure 1A). Tiny baso-

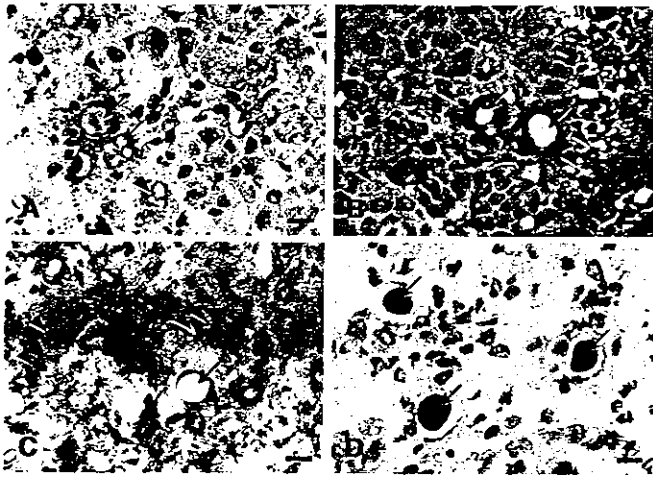
From the Department of Pediatrics (Drs. Nambu, Okuno, and Ohta), Tenri Hospital, Nara; Department of Neuromuscular Research (Drs. Kawabe and Nishino), National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP), Tokyo; Department of Pediatric Neurology (Drs. Fukuda and Sugie), Hamamatsu City Medical Center for Developmental Medicine, Shizuoka; and National Center Hospital for Mental, Nervous, and Muscular Disorders (Drs. Nonaka and Nishino), NCNP, Tokyo, Japan.

Received December 23, 2002. Accepted in final form March 22, 2003.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Mitsuhiko Nambu, Department of Pediatrics, Tenri Hospital, 200 Mishima-cho, Tenri, Nara, Japan; e-mail: nambum@tenriyoro-zu-hp.or.jp

392 Copyright © 2003 by AAN Enterprises, Inc.



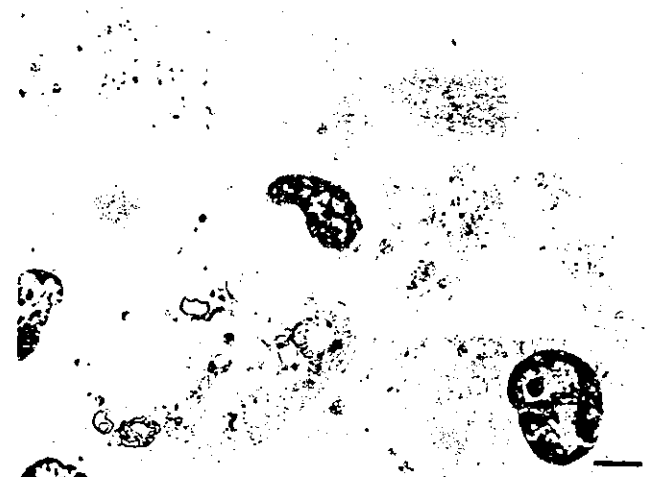


**Figure 1.** Histochemical staining of skeletal muscle. (A) Hematoxylin and eosin. In addition to marked variation in fiber size, many fibers have pale crystalloid polyglucosan bodies in the cytoplasm (arrows). Purple-colored granules are seen in many fibers (arrowheads). (B) Modified Gomori trichrome. Polyglucosan bodies are not stained (arrows). Purple-colored granules sometimes resemble rimmed vacuoles (arrowheads). (C) Acid phosphatase. Enzymatic activity is markedly increased in almost all fibers, indicating activation of lysosomal system. Some polyglucosan bodies have markedly increased enzyme activity (arrowheads), whereas others do not (arrows). (D) Periodic acid Schiff (PAS) after diastase treatment. Crystalloid structure retains PAS positivity even after diastase treatment (arrows), demonstrating that the inclusions are polyglucosan bodies. Bars indicate 10  $\mu\text{m}$ .

philic granules were scattered in the cytoplasm, especially in small fibers, and sometimes resembled rimmed vacuoles (figure 1B). There was no cellular infiltration or increase in fibrous tissue. IM nerve bundles were well myelinated. Acid phosphatase activity was markedly increased in virtually all fibers (figure 1C). Some polyglucosan bodies, particularly in small fibers, had markedly increased acid phosphatase activity, whereas others did not. Intracytoplasmic polyglucosan bodies were highlighted with periodic acid Schiff (PAS) stain but were only partially sensitive to diastase digestion (figure 1D). Immunohistochemical analyses with antibodies to sarcolemmal proteins, including dystrophin, sarcoglycans,  $\beta$ -dystroglycan, and laminin- $\alpha$ 2 chain (merosin), were normal (data not shown).

**Electron microscopic examination.** Many myofibers had intracytoplasmic amorphous inclusions of various sizes (figure 2). Myofibrils had degenerated in most of the fibers and were sometimes completely replaced by amorphous inclusions, particularly in small fibers. There were a variable number of autophagic vacuoles and myeloid bodies in the degenerated fibers.

**Glycogen branching enzyme activity.** We determined branching enzyme activity of cultured myo-



**Figure 2.** Electron micrograph of skeletal muscle. Two muscle fibers have amorphous intracytoplasmic inclusions (asterisks). Most fibers have degenerated myofibrils with a variable number of autophagic vacuoles (arrows). Bar represents 5  $\mu\text{m}$ .

blasts using the method previously described.<sup>9</sup> The activity of this enzyme was markedly reduced in our patient (0.01  $\mu\text{mole Pi/min/mg}$ ) compared with three control samples (0.25, 0.26, and 0.53  $\mu\text{mole Pi/min/mg}$ ), showing that our patient had branching enzyme deficiency.

**Genetic analysis.** For genetic analysis, we extracted total RNA from skeletal muscle following standard procedure. We reverse-transcribed the mRNA with oligo dT primer and amplified the cDNA fragment with primers 44F, 5'-CTCTCGGGCCTCGGCTACTT-3' and 2258R, 5'-AAGCTGTGTGACAGTGATA-3', which encompass the entire open reading frame. We sequenced the amplified fragment directly using 12 internal primers, which cover both strands completely. To confirm the mutation at the genomic DNA level, we amplified exon 2 and its flanking intronic sequence of genomic DNA extracted from skeletal muscle with primers 2F, 5'-ACTAAAGCAGTTACTTAATTACAGTAGC-3' and 2R, 5'-AATTCTAAGGCTCTATCTGAAAAGTCTG-3'. We sequenced the amplified fragment directly, and we also sequenced genomic DNA fragments from 50 healthy subjects.

Our patient had a homozygous deletion of adenine at nucleotide 288 in the open reading frame of *GBE1* gene (figure 3), which is predicted to truncate the protein at the 142nd residue. We also confirmed the mutation at the genomic DNA level. One hundred normal chromosomes had no such deletion. Genetic analyses were not performed in the infant's parents.

**Discussion.** A human *GBE* cDNA has been cloned,<sup>10</sup> and some mutations in the same *GBE1* gene have been identified in patients with various presentations of GSD IV.<sup>6-8</sup> However, there has been only one report of a genetically confirmed patient with the fatal neonatal form.<sup>5,6</sup> Our patient is the

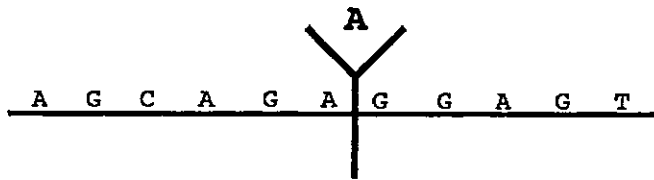


Figure 3. Electropherogram of the mutation. A homozygous deletion of adenine at nucleotide position 288 is found in the patient.

second patient with genetically confirmed neonatal GSD IV. Our patient had a single nucleotide deletion in exon 2 of the *GBE1* gene, whereas the first patient had a 210-base pair deletion in cDNA resulting from a splice-site mutation.<sup>6</sup> The mutation in our patient shifts the frame of codon at the 96th amino acid and is predicted to terminate the translation at the 142nd amino acid. Because the *GBE1* gene encodes 702 amino acids, the mutant protein, if present, makes up only 20% of the polypeptide in length. This apparently deleterious mutation may explain the severity of the phenotype in our patient.

Many muscle fibers in our biopsy sample had diastase-resistant polyglucosan bodies. Of note, acid phosphatase activity was markedly increased in most fibers. Polyglucosan bodies showed variable acid phosphatase activity, suggesting that lysosomes may be secondarily activated to scavenge polyglucosan bodies. Large numbers of autophagic vacuoles in the myofibers seen in our electron micrographs appear to support this notion.

Our patient's clinical course was similar to that of the first patient.<sup>5</sup> Although the severe infantile neuromuscular form of GSD IV is very rare, this disease should be included in the differential diagnosis of the floppy infant with a history of polyhydramnios and decreased fetal movements in the later stages of pregnancy.

#### Acknowledgment

The authors thank Dr. S. M. Sumi (Department of Pathology, University of Washington) for reviewing the manuscript, Dr. J. Muroi (Department of Pediatrics, Kyoto University, Kyoto, Japan) for measurement of  $\alpha$ -glucosidase activity, Dr. Y. Shigematsu (Department of Health Science, School of Nursing, Fukui Medical University, Fukui, Japan) for organic acid analysis, and the staff at Department of Neuromuscular Research, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo, and Department of Pediatric Neurology, Hamamatsu City Medical Center for Developmental Medicine, Shizuoka, Japan, for analyzing the muscle sample morphologically and biochemically.

#### References

- Andersen DH. Familial cirrhosis of the liver with storage of abnormal glycogen. *Lab Invest* 1956;5:11-20.
- Zellweger H, Mueller S, Ionasescu V, Schochet SS, McCormick WF. Glycogenosis IV: a new cause of infantile hypotonia. *J Pediatr* 1972;80:842-844.
- van Noort G, Straks W, van Diggelen OP, Hennekam RCM. A congenital variant of glycogenosis type IV. *Pediatr Pathol* 1993;13:685-698.
- Herrick MK, Twiss JL, Vladutiu GD, Glasscock GF, Horoupian DS. Concomitant branching enzyme and phosphorylase deficiencies. An unusual glycogenosis with extensive neuronal polyglucosan storage. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994;53:239-246.
- Tang TT, Segura AD, Chen Y-T, et al. Neonatal hypotonia and cardiomyopathy secondary to type IV glycogenosis. *Acta Neuropathol* 1994;87:531-536.
- Bao Y, Kishnani P, Wu J-Y, Chen Y-T. Hepatic and neuromuscular forms of glycogen storage disease type IV caused by mutations in the same glycogen-branching enzyme gene. *J Clin Invest* 1996;97:941-948.
- Bruno C, DiRocco M, Lamba LD, et al. A novel missense mutation in the glycogen branching enzyme gene in a child with myopathy and hepatopathy. *Neuromusc Disord* 1999;9:403-407.
- Ziemssen F, Sindern E, Schröder JM, et al. Novel missense mutations in the glycogen-branching enzyme gene in adult polyglucosan body disease. *Ann Neurol* 2000;47:536-540.
- Brown BI, Brown DH. Lack of an 1,4-glucan: 1,4-glucan 6-glycosyl transferase in a case of type IV glycogenosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1966;56:725-729.
- Thon VJ, Khalil M, Cannon JF. Isolation of human glycogen branching enzyme cDNAs by screening complementation in yeast. *J Biol Chem* 1993;268:7509-7513.

Case report

## A 1-year-old infant with McArdle disease associated with hyper-creatine kinase-emia during febrile episodes

Yasushi Ito<sup>a,\*</sup>, Kayoko Saito<sup>a</sup>, Keiko Shishikura<sup>a</sup>, Haruko Suzuki<sup>a</sup>, Eriko Yazaki<sup>a</sup>,  
Kitami Hayashi<sup>a</sup>, Tokiko Fukuda<sup>b</sup>, Masataka Ito<sup>b</sup>, Hideo Sugie<sup>b</sup>, Makiko Osawa<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Pediatrics, Tokyo Women's Medical University, School of Medicine, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan

<sup>b</sup>Department of Pediatric Neurology and Neuromuscular Laboratory, Hamamatsu City Medical Center for Developmental Medicine, Shizuoka, Japan

Received 28 September 2001; received in revised form 14 January 2003; accepted 28 January 2003

### Abstract

A 14-month-old girl was hospitalized due to repeated hyper-creatine kinase (CK)-emia during pyrexia. Mild hypotonia was observed, but other physical and neurological findings were unremarkable. The serum CK level was normal at rest or normothermia. Open muscle biopsy was performed on the rectus femoris, and showed glycogen storage and complete lack of phosphorylase activity histochemically and biochemically, establishing the diagnosis of McArdle disease. The diagnosis of McArdle disease in early infancy is uncommon. Until this study there have been no reports of clinical symptoms or muscle biopsy findings for McArdle disease in early childhood. This disease must be considered when transient hyper-CKemia is observed in infants, even if glycogen storage is unremarkable as compared with adult cases. © 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** McArdle disease; Early infant case; Pyrexia; Hyper-creatine kinase (CK)-emia

### 1. Introduction

McArdle disease is a congenital metabolic myopathy caused by a phosphorylase deficiency in skeletal muscle [1–3]. This disease is glycogenosis type V, and is a typical muscular glycogen storage disease. The normal supply of energy to muscle cells is impaired by exercise or pyrexia, resulting in muscle necrosis, and followed by hyper-creatine kinase (CK)-emia and other muscular symptoms. Typical cases are diagnosed during adolescence or at a later age [4]. There have been no documented reports of infants as probands since 1965. We present a female infant case of McArdle disease, and review literature in this field.

### 2. Case presentation

The patient is a 14-month-old Japanese girl. There is no family history of consanguinity, neuromuscular disorder, or abnormal reaction to anesthesia.

The patient was born at term after an uneventful

pregnancy. She measured 49 cm in height and weighed 2970 g at birth. There was no neonatal asphyxia or difficulty in sucking or crying. She was capable of visual tracking and social smiling within 2 months of birth, head control at 4 months, sitting unsupported at 6 months, rolling at 6–7 months, walking with support by 12 months, and walking unaided at 13 months. At 14 months, she could speak more than five words.

At 9 months, she appeared lethargic, despite only a low-grade fever of 37°C. A biochemical test conducted by her family doctor revealed a serum CK level of 400 IU/l. Three days later she was admitted to another hospital for persistent fever and hyper-CKemia. Laboratory studies provided the following values: WBC, 19,100/μl; CRP, 5.4 mg/dl; AST, 155 IU/l; ALT, 79 IU/l; and LDH, 1061 IU/l. The CK level was 5240 IU/l. She was in an ill humor and lethargic, but no muscular symptoms were observed. The next day the CK level increased to 17,700 IU/l, and aldolase and myoglobin levels were 159.5 IU/l (normal range, 1.7–5.7) and 310 ng/ml (normal range, below 60), respectively. Blood chemistry values improved during the second week. At 11 months, her CK level was 1017 IU/l when she was hospitalized with acute bronchitis. The attending physician referred her to our hospital. At 12 months, after catching a

\* Corresponding author. Tel.: +81-3-3353-8111; fax: +81-3-5269-7338.  
E-mail address: ymitoh@cf6.so-net.ne.jp (Y. Ito).

common cold, her CK level increased to 800 IU/l. At 14 months, she was admitted to our hospital for a comprehensive examination of repeated hyper-CKemia.

Her physical growth was standard for her age. She did not have a myopathic face. Mild hypotonia was illustrated by a double folding posture, hyperextended elbows and knees, and positive heel-ear and scarf signs. No muscle weakness or atrophy was recognized. Deep tendon reflexes were normal, Babinski reflexes were positive bilaterally, and other neurological findings were unremarkable.

The following hematological and biochemical findings on admission were within normal ranges at rest or normothermia: myogenic enzymes (CK, 192; AST, 39; ALT, 17; LDH, 673; aldolase, 11.7 IU/l, and myoglobin, 46 ng/ml); electrolytes; and metabolites, including blood sugar, ammonia, urate, lactate, pyruvate, ketones. Hormonal functions were normal. Results of blood gas analyzes were normal. The anti-Jo-1 antibody was negative, and results of plasma amino acids assays and urinary amino acids and organic acids assays were unremarkable. Brain magnetic resonance imaging, muscle computed tomography, echocardiography, electroencephalography, motor

nerve conduction study, and electrocardiography were not abnormal. Tsumori's test of psychological development showed her developmental age to be 16 months with a developmental quotient of 114. Semi-ischemic forearm exercise testing and electromyography were not performed.

### 3. Muscular biopsy findings

An open muscle biopsy of the left femoral rectus muscle was performed. The preoperative serum CK level was normal.

Histochemical findings. Hematoxylin-eosin (H-E) staining revealed a low level of internal nuclei and a difference in muscle fiber size, but no necrosis, regeneration, or inflammatory cell infiltration. H-E and Gomori-trichrome stains demonstrated the presence of minute vacuoles in muscle cells, which stained strongly with Periodic acid Schiff (PAS) (stippling), suggesting glycogen accumulation (Fig. 1a). Some muscle fibers showed slight subsarcolemmal accumulation of glycogen. Acid phosphatase staining was negative and phosphorylase activity was completely

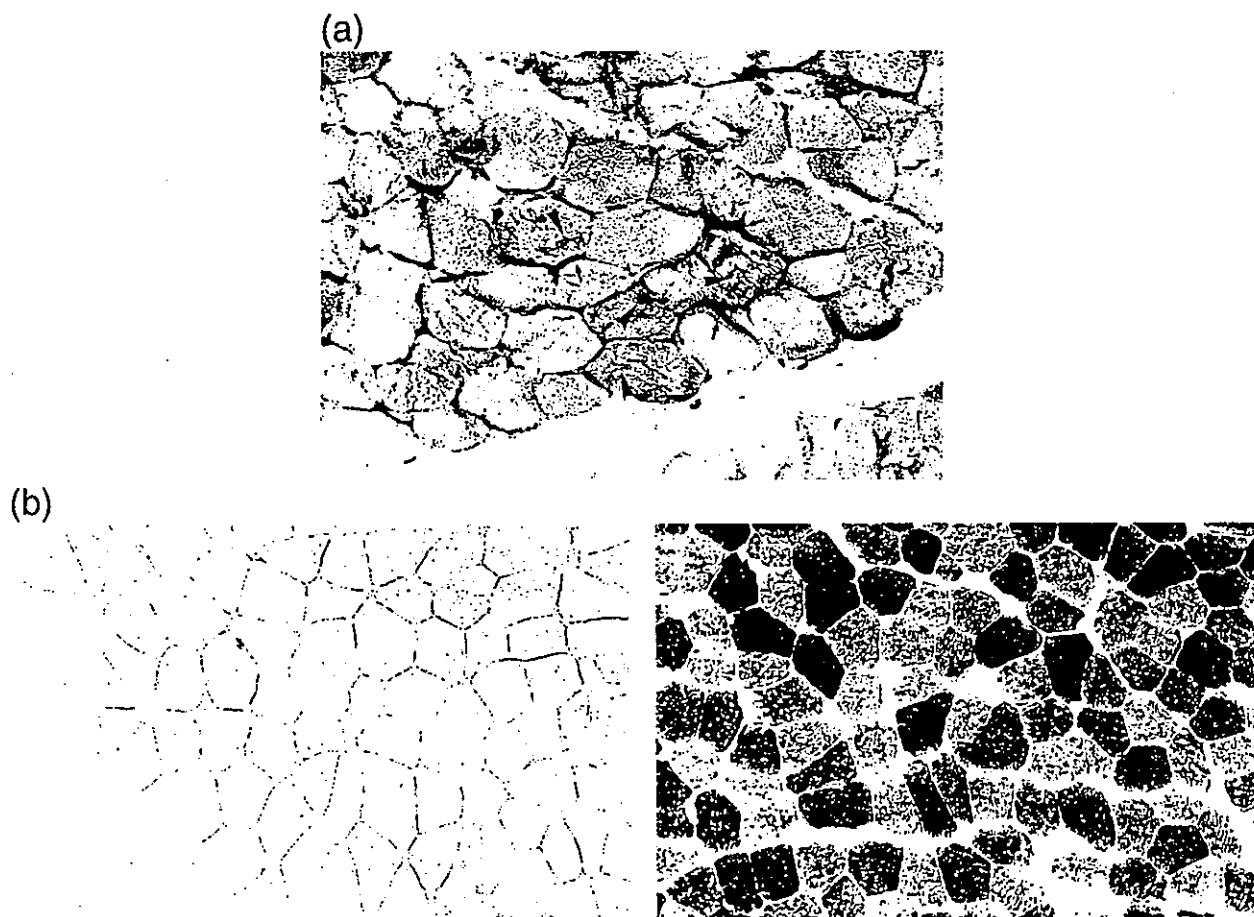


Fig. 1. (a) Periodic acid Schiff (PAS) staining ( $\times 200$ ). Very small vacuoles in muscle cells demonstrated by Hematoxylin-eosin and Gomori-trichrome staining were strongly stained with PAS (stippling), suggesting glycogen accumulation ( $\blacktriangleright$ ). Some muscle fibers showed slight subsarcolemmal accumulation of glycogen ( $\rightarrow$ ). (b) Phosphorylase staining ( $\times 200$ ). Left: control. Right: the present case: phosphorylase activity was completely absent.

absent (Fig. 1b). Muscle fiber subtypes were normally distributed, but modified ATPase staining showed an increase in type 2C fibers. There was no increase or accumulation of mitochondria, and cytochrome c oxidase activity was normal.

Electron microscopic findings (Fig. 2). Muscle fibers were scattered, showing a moderate accumulation of glycogen in the subsarcolemmal region. Mild to intermediate glycogen accumulation was also noted among myofibrils.

Biochemical findings. There was no lactate production in anaerobic glycolysis *in vitro* when glycogen was used as a substrate. However, lactate was produced when glucose-1-phosphate, a glycogen decomposition product generated by phosphorylase, was used as an alternative substrate. Several anaerobic glycolytic enzymes were analyzed. A deficiency in phosphorylase activity was detected (0.1 n mole/minute/mg protein; reference standard,  $58.9 \pm 17.5$ ).

#### 4. Discussion

Transient, repetitive hyper-CKemia associated with pyrexia may be caused by several myopathies. Clinical entities that should be considered in the differential

diagnosis include: metabolic myopathies such as mitochondrial myopathy, glycogen storage myopathy, and impaired fatty acid and organic acid metabolism; endocrine myopathies such as thyroid myopathy; preclinical stage or carrier for muscular dystrophy; congenital myopathies; inflammatory myopathies; and malignant hyperthermia. On the basis of histochemical findings and analysis of muscle enzyme activities, a diagnosis of McArdle disease was made. Gene analysis revealed the absence of the common Japanese McArdle disease mutation (F 708 [709] del) [5].

McArdle disease is an autosomal recessive glycogen storage disease, characterized clinically by recurrent and reversible exercise-induced symptoms of exercise intolerance including ready fatigue, myalgia, cramps, weakness, second wind phenomenon, myoglobinuria, and hyper-CKemia [4,6,7]. Generally, these symptoms develop in association with intense or sustained exercise, though later in life progressive (fixed) muscle weakness may occur. The diagnosis is usually established in a proband during adolescence or after, although muscular symptoms like exercise intolerance and ready fatigue become apparent in early childhood. Roubertie et al. compiled the clinical symptoms of eight patients detected during the pre-adolescent period, and noted negative clinical manifestations such as clumsiness, disinclination, lethargy, slow

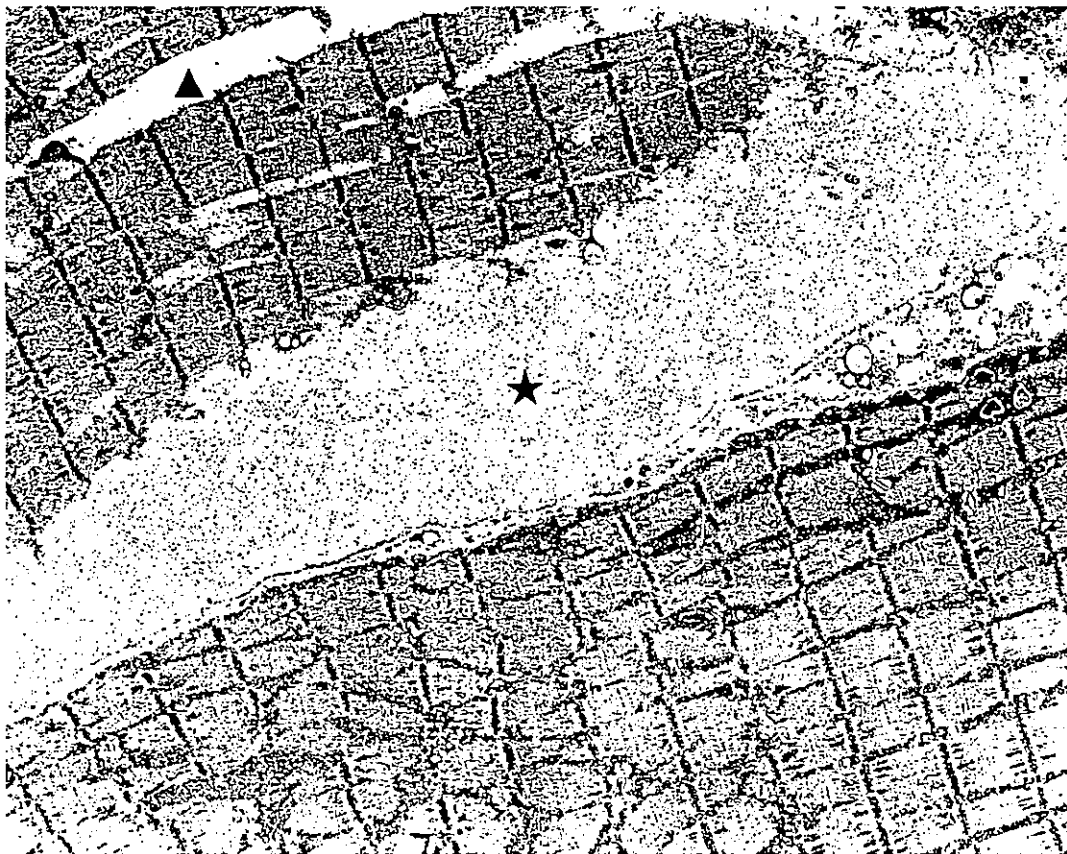


Fig. 2. Electron microscopic observation ( $\times 3500$ ). Muscle fibers were scattered, showing a moderate accumulation of glycogen particle in the subsarcolemmal region (★). Mild to intermediate glycogen accumulation was also observed among myofibrils (▲).

movement, or laziness, other than usual muscular symptoms [6].

Glycogen is an essential source of energy during intense muscular exercise and in the early stages of intermediate exercise. Although glycogenolysis in skeletal muscles is impaired in McArdle's disease, intermediate muscular exercise usually generates no symptoms. Intense exercise often results in muscular symptoms as a manifestation of insufficient energy supply. It is possible that symptoms of McArdle's disease are not obvious during childhood, as most children are unlikely to engage in heavy exertion in the pre-adolescent stage, and children with the disease consciously or unconsciously avoid intense and sustained exertion as it results in an unpleasant experience. Consequently, these children are often regarded as quiet and placid. Exercise intolerance and ready fatigue are non-specific symptoms, and may be overlooked as psychogenic reactions in the pre-adolescent period. Bartram et al. noted that the greater the mitochondrial oxidative capacity, the less dependent an individual is on glycogenolysis. Children are more active than adults with a higher aerobic capacity per kilogram body weight, which may also explain why McArdle's disease is not usually diagnosed in young children [7].

Hyper-CKemia was unexpectedly discovered in our patient when she was being examined for lethargy, despite having only a low-grade fever of around 37°C. No abnormal muscular symptoms were observed. This case is highly significant because it is rare for McArdle's disease to be discovered at such a young age. A search of the literature published since 1965 yielded no records of clinical symptoms or muscle biopsy findings related to this disease in infants. The development of hyper-CKemia and exercise

intolerance, in association with pyrexia but not intense exercise, is uncommon in adult cases, and may be a feature specific to young cases. Another feature specific to young cases is the histological absence of the lace-like vacuoles typically observed in adults as a result of glycogen accumulation. Therefore, we cannot exclude the possibility of McArdle's disease when confronted with transient hyper-CKemia in infants even if glycogen accumulation is only slight.

## References

- [1] McArdle B. Myopathy due to a defect in muscle glycogen breakdown. *Clin Sci* 1951;10:13–33.
- [2] Schmid R, Mahler R. Chronic progressive myopathy with myoglobinuria: demonstration of a glycogenolytic defect in the muscle. *J Clin Invest* 1959;38:2044–58.
- [3] Mommaerts WF, Illingworth B, Pearson CM, Guillory RJ, Seraydarian K. A functional disorder of muscle associated with the absence of phosphorylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1959;45:791–7.
- [4] Kono N, Shimizu T, Mineo I, Ono A, Nishimura T, Shingu R, et al. [Glycogen storage disease] (in Japanese). *Nihon Rinsho* (Osaka) 1993;51:285–96.
- [5] Sugie H, Sugie Y, Ito M, Fukuda T, Nonaka I, Igarashi Y. Genetic analysis of Japanese patients with myophosphorylase deficiency (McArdle's disease): single-codon deletion in exon 17 is the predominant mutation. *Clin Chim Acta* 1995;236:81–6.
- [6] Roubertie A, Patte K, Rivier F, Pages AM, Maire I, Echenne B. McArdle's disease in childhood: report of a new case. *Eur J Paediatr Neurol* 1998;2:269–73.
- [7] Bartram C, Edwards RH, Beynon RJ. McArdle's disease-muscle glycogen phosphorylase deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1995;1272:1–13.

## 原 著

筋型糖原病の全国調査および浜松市発達医療総合センターにおける  
筋型糖原病診断症例の比較検討

福田冬季子<sup>1)</sup> 杉江 秀夫<sup>1)</sup> 伊藤 政孝<sup>1)</sup> 杉江 陽子<sup>2)</sup>  
 斎藤加代子<sup>3)</sup> 西野 一三<sup>4)</sup> 清水 輝夫<sup>5)</sup>

要旨：我が国における筋型糖原病の罹患頻度を明らかにするために、2001年全国調査を実施し、浜松市発達医療総合センターにて筋型糖原病と診断した経験と比較した。全国調査、自験例とも糖原病Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ型が多く、この3病型で筋型糖原病の約80%を占めた。自験例の診断方法は、生検筋をもちいた酵素測定がもっとも多かったが、糖原病Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅸ型は、血球をもちいた酵素診断が可能であり、日本人糖原病Ⅴ型の約50%に共通遺伝子変異をみとめるため、筋型糖原病の約70%で血液をもちいた診断が可能であることが明らかとなった。さらにMcArdle病の筋症状の初発時期は様々であるが、45%の症例で筋力低下などの固定性筋症状がみられることが明らかとなった。

(臨床神経, 43:243—248, 2003)

Key words: 筋型糖原病, McArdle病, 全国調査, Pompe病, ミオグロビン尿症

## はじめに

筋型糖原病は、グリコーゲン代謝に関与する酵素の先天的欠損症である糖原病のうち、筋症状を呈する病型であり、現在DiMauro<sup>1)</sup>により11病型に分類されている (Table 1)。

臨床症状は、典型的にはMcArdle病 (糖原病Ⅴ型) のように強い等縮性運動、歩行やジョギングなどの運動時に、筋硬直、筋痛、ミオグロビン尿症などを発症するが、糖原病Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ型では固定性の筋症状を呈する。生検筋組織化学では、筋細胞内 (糖原病Ⅱ型ではリソゾーム内) にグリコーゲンが蓄積するが、グリコーゲン脱分枝鎖酵素の異常による糖原病Ⅲ型では、リミットデキストリンが、グリコーゲン分枝酵素による糖原病Ⅲ型ではアミロペクチン様物質の蓄積をみとめる<sup>1)2)</sup>。

臨床症状や、阻血下前腕運動負荷試験 (近年は非阻血下前腕運動試験の有用性が報告されている<sup>3)</sup>)、PAS染色などの生検筋組織所見により筋型糖原病がうたがわれ、各病型における生検筋組織などをもちいた解糖系酵素測定、又は、糖原病Ⅴ型、Ⅶ型における、ホスホリラーゼ染色、ホスホフルクトキナーゼ染色などにより診断が確定する。

筋型糖原病は比較的まれな疾患であるため、本態は不明な点が多い。今回、筋型糖原病の第1次全国調査を実施し、我が

国における罹患頻度を明らかにするとともに、筋型糖原病の中で高頻度であったPompe病 (糖原病Ⅱ型)、McArdle病について第2次全国調査をおこない、Pompe病の臨床病型、McArdle病の臨床所見、診断方法を明らかにしようとした。

又、浜松市発達医療総合センターにて筋型糖原病と診断した症例の病型別分布と、第一次全国調査結果との比較をおこなう。われわれの施設において実施した診断方法の検討、および選択可能な診断方法につき考察することを目指した。それらにより筋型糖原病診断方法の選択に示唆を与えたいと考えた。

以上に基づき、筋型糖原病診断のフローチャートを試案したので、あわせて報告する。

## 方 法

1) 第1次全国調査：厚生労働省「筋ジストロフィーおよび関連疾患の臨床病態解明と治療法開発に関する研究」(清水輝夫班長)により2001年に実施した。調査項目は、1991年から2001年の10年間に、筋型糖原病 (Table 1に示す11病型およびphosphoglucomutase欠損症) と診断した病型別症例数である。調査対象は、大学病院、ベッド数200床以上の国公立病院の小児科、神経内科および小児総合医療施設で、計2,299診療科に質問用紙を送付した。えられた回答について集計し

<sup>1)</sup>浜松市発達医療総合センター小児神経科 (〒434-0023 浜北市高園775-1)

<sup>2)</sup>浜松医科大学小児科

<sup>3)</sup>東京女子医科大学小児科

<sup>4)</sup>国立精神神経センター疾病研第一部

<sup>5)</sup>帝京大学神経内科

(受付日: 2003年1月8日)

Table 1 Classification of muscle glycogen storage diseases and samples for diagnostic enzyme assay

	Glycogen storage disease	Deficient enzyme	Tissues available for diagnostic enzyme assay
II	Pompe Disease	Acid maltase	Muscle, lymphocyte, fibroblast
III	Forbes-Cori Disease	Debranching enzyme	Liver, WBC, RBC, muscle
IV	Andersen Disease	Branching enzyme	Liver, WBC, muscle, RBC, fibroblast
V	McArdle's Disease	Myophosphorylase	Muscle
VI	Tarui Disease	Phosphofructokinase	Muscle
VII		Phosphorylase b kinase	Muscle
IX		Phosphoglycerate kinase	Muscle, RBC, WBC, fibroblast
X		Phosphoglycerate mutase	Muscle
XI		Lactate dehydrogenase-A	Muscle
XII		Aldolase-A	Muscle
XIII		$\beta$ -enolase	Muscle

WBC, white blood cell; RBC, red blood cell

Table 2 Number of the patients with muscle glycogen storage diseases (MGSDs) nation-wide survey and our experiences at Hamamatsu City Medical Center for Developmental Medicine

Glycogen Storage Disease	Nation-wide survey (1991 ~ 2001)	Our experiences (1989 ~ 2001)
II	37	31
III	20	19
IV	5	3
V	22	38
VI	7	3
VII	0	5
IX	6	5
X	2	0
XI	0	0
XII	0	0
XIII	0	0
PGM Def	2	2
total	101	106

PGM Def. phosphoglucomutase deficiency

た。

2) 当施設における筋型糖原病診断症例の検討：当施設で1986年から2001年までに、筋型糖原病がうたがわれ全国から検査の依頼があった951例のうち筋型糖原病と診断した症例の病型別頻度と確定診断の根拠となった診断方法、もちいた検体の種類について集計した。

3) Pompe病第2次全国調査(臨床病型について)：第1次全国調査の結果、10年間にPompe病と診断した経験があると回答があった31診療科を調査対象にアンケート用紙を送付し、Pompe病と診断された症例の病型調査を実施した。回答をえた26診療科の臨床病型別症例数を集計した。病型は、乳児型(生後数カ月以内の発症、心肥大、著明な筋緊張低下、筋力低下を呈するもの)、小児型(生後6カ月以降の発症、緩徐進行性の筋力低下を呈するもの)、成人型(成人以降の発症、緩徐進行性の筋力低下を呈するもの)に分類した。

4) McArdle病第2次全国調査：McArdle病の自然歴を調

査する目的で、1次調査にてMcArdle病と診断した経験があると回答があった22診療科に、質問用紙を送付した。調査項目は、家族歴、血族婚の有無、発症年齢、発症時の症状、現在の症状、診断時年齢、検査所見(血清CK値、阻血下前腕運動試験)、確定診断のために実施した検査方法についてである。回答がえられた11例について分析した。

## 結 果

1) 第1次全国調査結果(Table 2)：第1次全国調査にて回答がえられた1,425診療科(回収率62%)において、10年間に筋型糖原病と診断された症例は101例であった。糖原病II型がもっとも多く(36.7%)、III型(21%)、V型(20%)が続いていた。糖原病II、III、V型の3型で、第1次調査でえられた筋型糖原病症例の78%を占めていた。

2) 当施設における筋型糖原病診断例の分析



Table 3 Diagnostic methods and samples of specimens using for diagnosis of muscle glycogen storage disease

Glycogen Storage Disease	Enzymatic Assay					Gene Analysis	Total
	biopsied muscle	WBC	RBC	autopsied muscle	fibroblast	DNA	
II	28	3*	0	0	0	0	31
III	15	4	0	0	0	0	19
IV	0	0	1	1	1	0	3
V	34	0	0	0	0	4	38
VI	3	0	0	0	0	0	3
VII	5	0	0	0	0	0	5
IX	5	0	0	0	0	0	5
PGM dif	2	0	0	0	0	0	2
Total	92	7	1	1	1	4	106

PGM dif, phosphoglucomutase deficiency; WBC, white blood cell; RBC, red blood cell

\*, isolated lymphocyte

Table 4 Clinical symptoms of the patients with McArdle's disease (Nation-wide survey)

Pt	Sex/age	FH/conanguinity	First visiting		Present symptoms	
			Symptoms	Age	Symptoms	Age at onset
1	F/3	-/-	no symptom except for high CK	1	exercise intolerance rabdomyolysis with fever	2 1
2	M/19	-/-	exercise intolerance muscle pain on exercise myoglobinuria	15	exercise intolerance muscle pain on exercise muscle cramp on exercise myoglobinuria	11 11 11 11
3	M/21	+/+	no symptom except for high CK	11		
4	F/31	-/+	muscle pain on exercise muscle weakness	29	muscle pain on exercise muscle weakness	27 27
5	F/35	-/-	exercise intolerance	27	muscle pain on exercise myoglobinuria muscle weakness muscle atrophy	26 19 25 unclear
6	M/47	-/-	muscle pain on exercise	13	muscle pain on exercise	13
7	M/51	+/-	no symptom except for high CK	39	exercise intolerance muscle pain on exercise muscle cramp on exercise myoglobinuria	11 11 11 11
8	M/61	+/-	exercise intolerance muscle pain on exercise muscle cramp on exercise muscle weakness muscle atrophy	54	exercise intolerance muscle pain on exercise muscle cramp on exercis muscle weakness muscle atrophy	child child child child child
9	F/66	-/+	muscle pain on exercise	65	muscle pain on exercise	unclear
10	F/69	-/-	muscle weakness	62	muscle weakness	62
11	M/79	-/-	exercise intolerance muscle cramp on exercise muscle weakness muscle atrophy	79	exercise intolerance muscle cramp on exercise myoglobinuria muscle weakness muscle atrophy	6 adult 79 adult unclear

F, female; M, male; FH, family history

Table 5 Laboratory data and diagnostic methods of the patients with McArdle's disease (Nation-wide survey)

Pt	Age on diagnosis	Serum CK (IU/L)		Ischemic forearm test (Lactate)	Diagnostic methods
		minimum	max		
1	1	94	17,700	N.D	enzyme assay histochemistry
2	15	561	11,638	Not elevated	enzyme assay
3	12	127	5,280	N.D	enzyme assay
4	29	292	9,260	Not elevated	enzyme assay
5	27	1,534	53,604	N.D	enzyme assay histochemistry
6	41	100	1,704	Not elevated	enzyme assay
7	39	407	16,510	Not elevated	histochemistry gene analysis
8	55	1,265	18,990	N.D	enzyme assay
9	65	242	2,500	Not elevated	enzyme assay
10	64	445	22,000	Not elevated	enzyme assay histochemistry
11	79	421	6,207	N.D	enzyme assay histochemistry gene analysis

N.D: not determined, enzyme assay: measurement of myophosphorylase using biopsied muscle, histochemistry: phosphorylase stain.

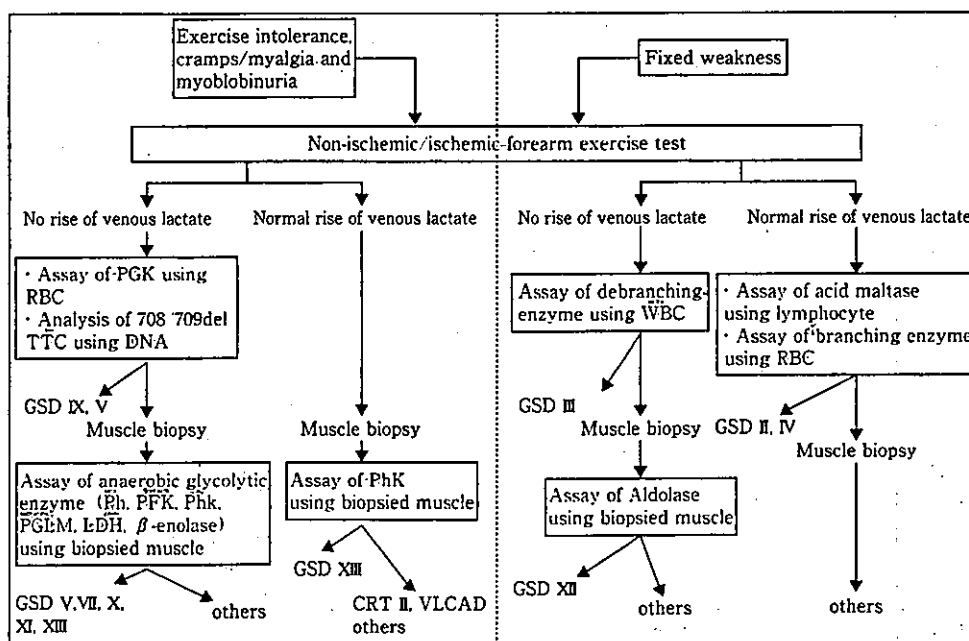


Fig. 1 Proposal diagnostic flow chart of muscle glycogen storage diseases

PGK, phosphoglycerate kinase; Ph, phosphorylase; PFK, phosphofructokinase; PhK, phosphorylase b kinase; PGLM, phosphoglycerate kinase; VLCAD, vary long chain acyl-CoA dehydrogenase

I) 病型別症例数 (Table 2) : 当施設において筋型糖原病と診断した病型別症例数を Table 2 に示す。106 例のうち、糖原病 V 型がもっとも多く (36%), II 型 (29%), III 型 (IIIa/d<sup>+</sup>) (18%) が続く。糖原病 II, III, V 型の 3 型で当施設において筋型糖原病と診断した症例の 83% を占めていた。

II) 確定診断のための検査方法および検体の種類 (Table 3) : 酵素診断 102 例, 遺伝子診断 4 例 (酵素診断による診断確

定後, 遺伝子診断を実施した症例は除外した) であった。酵素診断にもちいた検体の種類は, 骨格筋 93 例, その他 10 例であった。遺伝子診断は, 4 例とも白血球より抽出した DNA がもちいられた。

3) Pompe 病第 2 次全国調査 (病型調査) : 38 例のうち, 乳児型 10 例 (男 5 例, 女 5 例), 小児型 17 例 (男 9 例, 女 8 例), 成人型 11 例 (男 8 例, 女 3 例) であった。

4) McArdle 病第 2 次全国調査 (Table 4, 5) : 11 症例の分析ができ、筋症状の発現時期は 1 歳から 79 歳と多様であった。初診時労作時の筋痛、ミオグロビン尿症などの動的な症状は 9 例/11 例でみとめた。高 CK 血症のみで初診時無症状の症例もあるが、経過中、筋力低下、筋萎縮などの固定性の筋症状をみとめた症例は 5 例であった。6 例で血清 CK 値の最高値は 10,000IU/L 以上であった。

## 考 察

今回の一次全国調査、および当センターにおける筋型糖原病診断症例の検討で、両者とも同様に、病型分類では糖原病 II, III, V 型が主体で、この 3 型で筋型糖原病の約 80% を占めていた。

当施設における筋型糖原病診断方法は、各病型とも生検筋を使用した酵素測定がもっとも多かった (Table 3)。解糖系酵素測定に利用できる組織の種類は、筋組織のみでなく<sup>2)</sup>、糖原病 II 型, III 型, IV 型, IX 型においては血液や線維芽細胞をもちいた診断も可能である (Table 1)。糖原病 III 型, VIII 型では、血球および筋組織による酵素活性測定により肝型と肝筋型の生化学的な病型分類が可能である。また、筋型糖原病の遺伝子変異は heterogeneity をもつものが多い<sup>3)</sup>。しかし V 型では筋ホスホリラーゼ遺伝子に 708/709 delTTC 変異が日本人患者の約 50% にみとめられるため<sup>4)</sup>、同変異のスクリーニングが診断確定に有用である。II 型, III 型, V 型の頻度が高い事実を考慮すると、我が国における筋型糖原病の約 70% で、血球をもちいての診断が可能である。

この結果を踏まえ、われわれは図 (Fig. 1) に示す筋型糖原病の診断のフローチャートを提案する。ただし、筋型糖原病以外の代謝性ミオパチーも類似の症状を呈するばあいがあり、十分な鑑別を要する<sup>5)</sup>。筋型糖原病では血清 CK 値に変動はみとめるが、常に高値を示す例が多い。一方、CPT II 欠損症、very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) 欠損症などの脂質代謝異常によるミオパチーでは、筋症状出現の間欠期には正常値となる例が多い<sup>6)</sup>。フローチャートにしたがい、血液をもちいて診断が確定しないばあいには、筋型糖原病以外の疾患の鑑別もふくめて、筋生検が必要であると思われる。

病型別頻度が高かった糖原病 II 型, V 型については更に第 2 次調査を実施した。Pompe 病では小児型がもっとも多く 45% を占めていた。McArdle 病では、血清 CK 最高値が 10,000 以上の例が 55% あり、McArdle 病では急激に筋の崩壊が生じる危険性があることが示唆された。小児期に診断された症例はわずか 27% であり、成人期に横紋筋融解症などの合併症が高頻度になることから、本症を小児期に診断し、重篤な合併症を予防することが重要であると思われる。また、経過

中、固定性の筋症状が出現する例が 45% であったため、今後有効な治療法の検討の必要性を示す結果であった。

謝辞：本研究の論旨は、第 44 回日本小児神経学総会 (仙台) および、10<sup>th</sup> International Congress on Neuromuscular Diseases (Vancouver) にて発表した。本研究は厚生労働省精神神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーおよび関連疾患の臨床病態解明と治療法開発に関する研究」(11 公-1) (清水輝夫班長) の助成により実施した。本研究班の前班長であり、さまざまな助言をいただいた故荒畑喜一先生、全国調査にご協力いただいた全国の神経内科、小児科の先生方、当施設に筋型糖原病診断の機会をいただきました多数の先生方に深謝申し上げます。

## 文 献

- 1) DiMauro S, Lamperti C : Muscle glycogenoses. Muscle Nerve 2001 ; 24 : 984—999
- 2) 杉江秀夫, 杉江陽子 : 代謝性筋疾患. 臨床検査 2002 ; 46 : 479—486
- 3) Kazemi-Esfarjani P, Skomorowska E, Jensen TD, et al : A nonischemic forearm exercise test for McArdle Disease. Ann Neurol 2002 ; 52 : 153—159
- 4) Coleman RA, Winter HS, Wolf B, et al : Glycogen storage disease type III (glycogen debranching enzyme deficiency) : correlation of biochemical defects with myopathy and cardiomyopathy. Ann Int Med 1992 ; 116 : 896—900
- 5) Tsujino S, Huie M, Kanazawa N, et al : Frequent mutations in Japanese patients with acid maltase deficiency. Neuromuscul Disord 2000 ; 10 : 599—603
- 6) Fukuda T, Sugie H, Ito M : Novel mutations in two Japanese cases of glycogen storage disease type IIIa and a review of the literature of the molecular basis of glycogen storage disease type III. J Inher Metab Dis 2000 ; 23 : 95—106
- 7) Sugie H, Sugie Y, Ito M, et al : Genetic analysis of Japanese patients with myophosphorylase deficiency (McArdle's disease) : single-codon deletion in exon 17 is the predominant mutation. Clin Chim Acta 1995 ; 236 : 81—86
- 8) 杉江秀夫 : 筋型糖原病の遺伝子診断法の確立及び病態に即した治療法の開発. 厚生労働省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー及び関連疾患の臨床病態解明と治療法開発に関する研究, 平成 11—13 年度研究報告書, pp 84—86
- 9) Darras BT, Friedman NR : Metabolic myopathies : A clinical approach ; Part I. Pediatr Neurol 2000 ; 22 : 87—97

## Abstract

## Nation-wide survey on muscle glycogen storage disease (MGSDs) and comparison with our experiences in diagnosis of MGSDs

Tokiko Fukuda, M.D.<sup>1)</sup>, Hideo Sugie, M.D.<sup>1)</sup>, Masataka Ito, M.D.<sup>1)</sup>, Yoko Sugie, M.D.<sup>2)</sup>, Kayoko Saito, M.D.<sup>3)</sup>,  
Ichizo Nishino, M.D.<sup>4)</sup> and Teruo Shimizu, M.D.<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Pediatric Neurology, Hamamatsu City Medical Center for Developmental Medicine

<sup>2)</sup>Department of Pediatrics, Hamamatsu University School of Medicine

<sup>3)</sup>Department of Pediatrics, Tokyo Women's Medical University

<sup>4)</sup>Department of Neuromuscular Research National Institute of Neuroscience,  
National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP)

<sup>5)</sup>Department of Neurology, Teikyo University School of Medicine

To clarify the actual frequency of each type of muscle glycogen storage diseases (MGSDs) in Japan, we performed nation-wide survey in 2001. We compared the results with our diagnostic experiences at Hamamatsu City Medical Center for Developmental Medicine. The majority (approximately 80%) of the MGSDs consisted of type II, V and III in Japan. In our experiences, most of the patients were diagnosed by the assays of glycolytic enzyme activities using biopsied skeletal muscles. However, the biochemical diagnoses of MGSDs type II, III, IV, and IX can be made using blood samples. Additionally, common genetic mutation (708/709 delTTC) of myophosphorylase gene has been found approximately in 50% of the Japanese patients with MGSDs type V. Therefore, approximately 70% of the MGSDs may be diagnosed by biochemical and genetic analysis using blood samples. Additional survey on McArdle's disease showed that the onset of muscle symptoms in McArdle's disease were variable, however, fixed muscular symptoms such as muscle weakness and muscle atrophy were present in 45% of patients.

(Clinica Neurol, 43 : 243—248, 2003)

**Key words :** muscle glycogen storage disease, McArdle's disease, Nation-wide survey, Pompe disease, myoglobinuria