

リアは、細胞を維持させる方向へと働くのか、細胞を消滅させる方向に進ませるのかを、いったいどのように決めているのであろう。この重大な選択に関する詳細な機構は明らかになっていない。小説「パラサイト・イヴ」のように、ミトコンドリアに意思があると考えたくなるのもうなずけるほどである。

## ●ミトコンドリア機能異常の分子メカニズム

ミトコンドリア病とは、ミトコンドリア機能異常を本態とする病気の総称である。ミトコンドリア機能の多様性から考えると、その病的状態である機能異常もエネルギー産生低下、活性酸素による細胞傷害、シグナル伝達異常、アポトーシスの変調など、質的に多様になるのは当然である。しかも、ミトコンドリア機能異常がどのように細胞に傷害を与え、その影響が組織や臓器レベルでどうなるかを知ることが病態の理解につながり、新しい治療法や予防法へとつながる研究となる。

実は、これまでのミトコンドリア病研究はエネルギー産生低下にかかわる研究が主体であった。近年、ミトコンドリアにかかわるタンパク質をコードする核遺伝子やミトコンドリア内に存在するミトコンドリアDNAの変異がミトコンドリア病患者で見出され、その分子レベル、細胞レベルの効果が詳細に検討されている。本特集ではその点を解説していただくことにした。そして、病気のメカニズムを知るには、まず分子、細胞レベルの機能異常を知ることが前提であり、これらの知識をもってより大きいレベルである組織、臓器での機能異常を理解することが重要である。

ミトコンドリアDNAは、核DNAと違って1細胞内に存在するコピー数が多く（核DNAは1対、ミトコンドリアDNAは数千コピー）、その複製の仕方も核DNAと大きく異なるとされてきた。しかしながら、最近の研究で、これまで信じられてきたミトコンドリアDNAの特異な複製の仕方に疑義が出された。ミトコンドリア異常によって起こるミトコンドリア病を理解するためにもこの問題は重要である（安川論文）。

ミトコンドリアDNA変異で最も頻度の高いのは3243位の点変異である。この変異はミトコンドリアDNAのロイシンtRNA上に存在し、若年者に発症する脳卒中様症状を特徴とするMELAS（mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes）と関係が深い。また、糖尿病患者の約1%がこの3243変異によるものであることが日本を含め各国の研究で明らかにされている。その3243変異がもたらす効果として、ロイシンtRNAのアンチコドン修飾異常が発見された。この発見は、治療の可能性を含めて、さらなる研究の進展が期待できる（鈴木論文）。

また、ミトコンドリアDNAは顕著な病的効果を表す変異以外に、正常者でも見出される多型がよく知られている。この多型は、分子進化学、法医学などにも応用されているが、実は老化や神経変性疾患、糖尿病、心筋症など、ミトコンドリア病の一症状と考えられる病気の疾患感受性を上げる効果があるのではないかと考えられている。このような観点からのミトコンドリアDNA研究について解説していただいた（田中、武安、福ならびに藤田論文）。

また、ミトコンドリアDNA変異の効果を細胞レベルばかりでなく、組織・臓器レベルでの効果を研究するには、モデル動物が必要である。ミトコンドリアDNA変異をもつ動物を世界に先駆けて作製した筑波大学の林純一教授のグループに解説をいただく（中田、林論文）。

## ミトコンドリア脳筋症の病態と治療への展望\*

後藤 雄一\*\*

**Key Words :** mitochondrial encephalomyopathy, complex I, anticodon modification, Mito-Mice, L-arginine

### はじめに

ミトコンドリア脳筋症 (MEM) は、1962年のLuftらによる疾患概念の提唱にはじまる。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、核DNA上に存在するミトコンドリア病にかか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、MEMばかりでなく、種々の神経変性疾患 (Alzheimer病, Parkinson病, Huntington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、MEM研究に関する最近の進歩を解説する。

### I. 病因に関する新しい知見

#### 1. 核DNA上の遺伝子変異

##### a. 電子伝達系酵素を構成するサブユニットの遺伝子

MEMの原因は、ミトコンドリアDNA変異と

核DNA上の遺伝子変異である (Fig. 1)。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あげられる (Table 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NDUFB1, NDUFB4, NDUFB7, NDUFB8, NDUFB2, NDUFB1の6個に発見された<sup>1-6)</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に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>7-9)</sup>。

##### b. 酵素複合体の集合にかかわる因子の遺伝子

電子伝達系酵素複合体サブユニットそのものではなく、集合にかかわる因子の遺伝子異常も報告されている。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

\* The Prospects for Pathogenesis and New Therapy of Mitochondrial Encephalomyopathy.

\*\* 国立精神神経センター Yu-ichi Goro: National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry

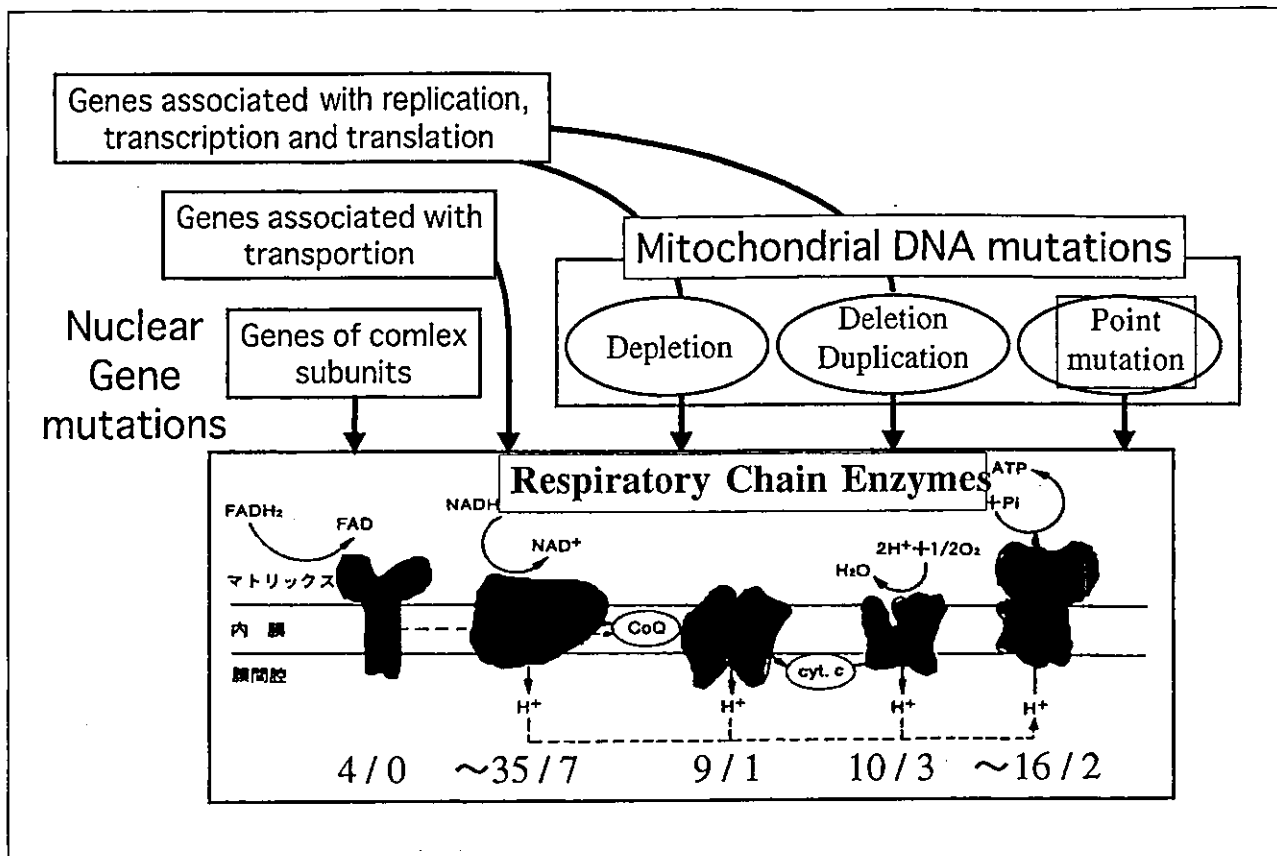


Fig. 1 Causes of mitochondrial encephalomyopathy

Mitochondrial encephalomyopathies are caused by mutations in nuclear genes and mitochondrial DNA. The latter include depletion, deletion/duplication and point mutation and these mutations result in defect in respiratory chain enzymes. Among nuclear gene mutations, those in enzyme complexes (subunit genes and assembly genes) and those in translocation into mitochondria directly affect respiratory chain enzyme activities. Mutations in the other genes associated with replication, transcription and translation of mtDNA cause multiple deletion and/or depletion of mtDNA resulting in enzyme deficiencies. The numbers below the complexes indicate the numbers encoded in nuclear DNA and mitochondrial DNA.

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>14)</sup>。

### c. ミトコンドリアDNAの維持・複製にかかわる因子

ミトコンドリアDNAの維持・複製にかかわる核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異常が一緒に存在し

ていることになる。多重欠失を起こす遺伝子変異は、thymidine phosphorylase (TP)<sup>15)</sup>、adenine nucleotide translocator-1 (ANT-1)<sup>16)</sup>、Twin-*kle*<sup>17)</sup>、DNA polymerase gamma (POLG)<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、thymidine kinase 2 (TK2)<sup>19)</sup>、deoxyguanosine kinase (dGK)<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・複製にかかわるTfam1のノックアウトマウスで、ヒトのMEMと類似した症状を

Table 1 Mutations in nuclear-encoded genes

GENES	PHENOTYPES
Complex I subunits	
NDUFV1	Encephalomyopathy
NDUFS4	Leigh encephalopathy
NDUFS7	Leigh encephalopathy
NDUFS8	Leigh encephalopathy with cardiomyopathy
NDUFS2	Encephalopathy with cardiomyopathy
NDUFS1	Encephalopathy, Leigh encephalopathy
Complex II subunits	
SDHA	Leigh encephalopathy, Optic nerve atrophy and ataxia
SDHB	Familial pheochromocytome, Hereditary paraganglioma
SDHC, SDHD	Hereditary paraganglioma
Gene associated with complex III	
BCS1L	GRACILE syndrome Tubulopathy, encephalopathy and liver failure
Genes associated with complex VI assembly	
SURF-1	Leigh encephalopathy
SCO2	Encephalopathy with cardiomyopathy
SCO1	Encephalopathy with liver failure
COX10	Encephalopathy
COX15	Encephalopathy with cardiomyopathy
Others	
Thymidine phosphorylase	Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy
ANT-1	Chronic progressive external ophthalmoplegia
Twinkle	Chronic progressive external ophthalmoplegia
Mitochondrial polymerase $\gamma$	Chronic progressive external ophthalmoplegia
Thymidine kinase-2	Mitochondrial DNA depletion syndrome
Deoxyguanosine kinase	Mitochondrial DNA depletion syndrome

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未だ見出されていない。

## II. 病態に関する新しい知見

### 1. 細胞レベルの研究結果

MEMの病態を理解することとは、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MEM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



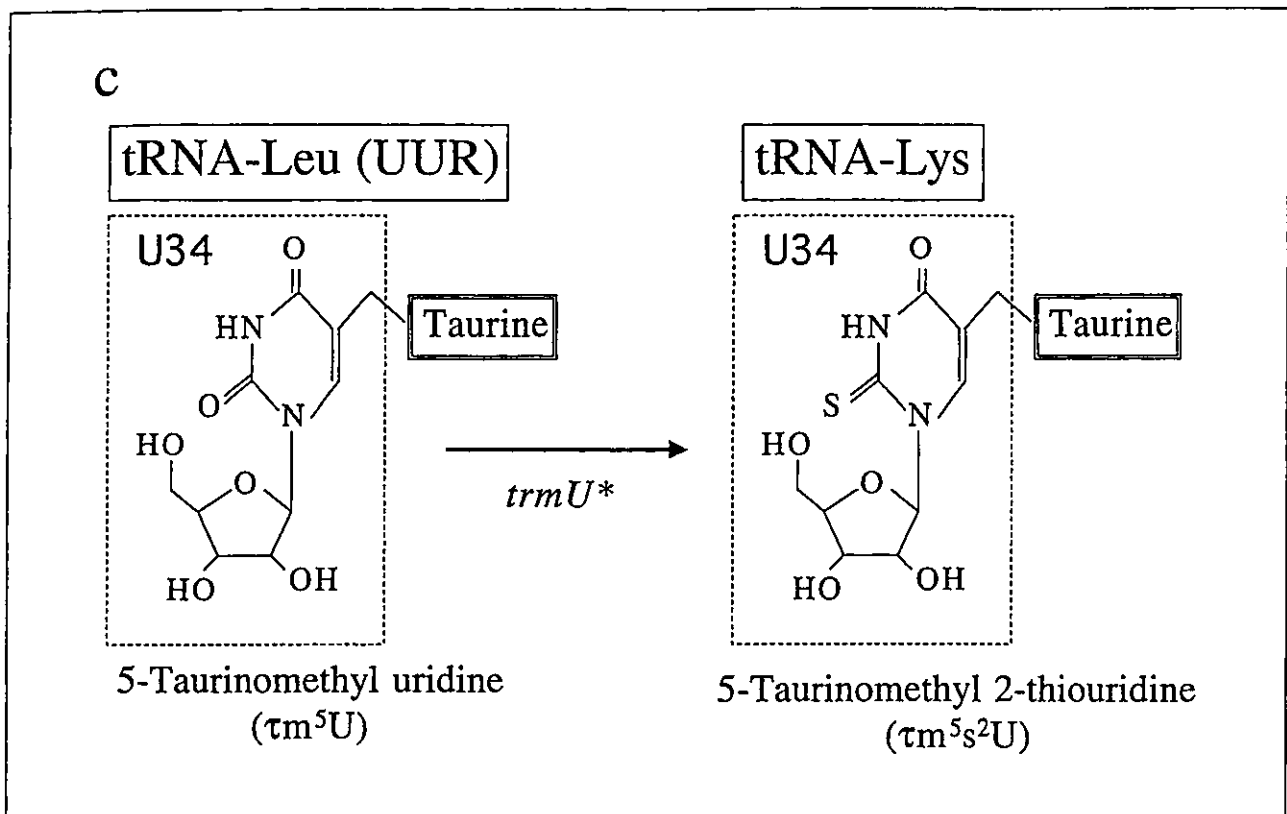


Fig. 3

な要因であるので、たいへん興味深い。

**b. アンチコドン修飾異常**

MEMの代表的な点変異である3243変異, 3271変異とMEM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 (Fig. 3a). 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> (Fig. 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, 変異をもつ転移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発見**

組織・臓器レベルのMEM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, MEM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. MEM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月くらいから体重増加不良を認め, おおよそ6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. したがって, 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もっとも大きな相違点は、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。

### III. 治療に関する新しい知見

#### 1. エネルギー代謝賦活薬

酵素異常の確定した症例の蓄積とともに、理論的な代謝賦活薬の投与が試み始められている(Fig. 1)。特に、電子伝達系酵素異常症で比較的残存活性が残っている症例に対して、ピルビン酸脱水素酵素活性を高めるdichloroacetateとビタミンB<sub>1</sub>の併用療法が効果的であるという報告がいくつかの施設からでてきている<sup>31, 32)</sup>。特に、複合体I欠損症(Leigh脳症, MEM)に効果的であるという印象が強いが、その厳密な効果判定にはケースコントロール研究が必要である。本薬剤は試薬であり、使用に際しては各病院の倫理審査委員会での承認を必要とする。また、過量投与で、意識障害、肝機能障害、末梢神経障害、低カルシウム血症などが報告されているので、血中濃度のモニタリングが重要である。

米国では、uridineの治験が始まっており、また欧米ではクレアチン療法を行っているところもある。クレアチンは、酸化ストレスの原因である活性酸素を除去する働きもあることから、今後さらにその使用が増加する可能性がある。MEMに対するこの2者の効果については、いまのところ定かではない。

また、従来から用いられてきたコエンザイムQやカルニチンは、おそらくそれぞれの欠乏状態が存在する患者においては劇的に効く可能性がある。実際に、コエンザイムQ欠乏やカルニチン

欠乏を骨格筋を用いて測定する検査がルーチン化されていない現状では、今後も頻繁に臨床的に使用されるのはやむを得ない。

#### 2. 病態から考え出された新しい治療法

MEMの脳卒中様発作がどのような機序で起こるかについては、脳細胞(神経細胞やグリア細胞)の代謝異常と脳内小動脈の機能異常の両者の要因があると考えられている。久留米大学の古賀博士らは、急性期にL-アルギニンを投与することで血管拡張をうながし、症状を軽減できたと報告している<sup>33)</sup>。さらに、アルギニンの経口薬により、脳卒中発作の予防効果があるという予備的な成果が出てきている。早急に治験を行いその有効性を確認すべきである。

### 文 献

- 1) Benit P, Chretien D, Kadhon N et al : Large-scale deletion and point mutations of the nuclear NDUFV1 and NDUF51 genes in mitochondrial complex I deficiency. *Am J Hum Genet* 68 : 1344-1352, 2001
- 2) Loeffen J, Smeitink J, Triepels R et al : The first nuclear-encoded complex I mutation in a patient with Leigh syndrome. *Am J Hum Genet* 63 : 1598-1608, 1998
- 3) Loeffen J, Elpeleg O, Smeitink J et al : Mutations in the complex I NDUF52 gene of patients with cardiomyopathy and encephalomyopathy. *Ann Neurol* 49 : 195-201, 2001
- 4) Schuelke M, Smeitink J, Mariman E et al : Mutant NDUFV1 subunit of mitochondrial complex I causes leukodystrophy and myoclonic epilepsy. *Nature Genet* 21 : 260-261, 1999
- 5) Triepels RH, van den Heuvel LP, Loeffen JLCM et al : Leigh syndrome associated with a mutation in the NDUF57 (PSST) nuclear encoded subunit of complex I. *Ann Neurol* 45 : 787-789, 1999
- 6) van den Heuvel, 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
- 7) Birch-Machin MA, Taylor RW, Cochran B et al : Late-onset optic atrophy, ataxia, and myopathy associated with a mutation of a complex II gene. *Ann Neurol* 48 : 330-335, 2000
- 8) Bourgeron T, Rustin P, Chretien D et al : Muta-

- tion of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nature Genet* 11 : 144-148, 1995
- 9) Parfait B, Chretien D, Rotig 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
  - 10) Tiranti V, Galimberti C, Nijtmans L et al : Characterization of SURF-1 expression and Surf-1p function in normal and disease conditions. *Hum Mol Genet* 8 : 2533-2540, 1999
  - 11) Papadopoulou LC, Sue CM, Davidson MM et al : Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nat Genet* 23 : 333-337, 1999
  - 12) 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
  - 13) Valnot I, von Kleist-Retzow JC, Barrientos A et al : A mutation in the human heme A : farnesyl-transferase gene (COX10) causes cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet* 9 : 1245-1249, 2000
  - 14) De Lonlay P, Valnot I, Barrientos A et al : A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat Genet* 29 : 57-60, 2001
  - 15) Nishino I, Spinazzola A, Hirano M : Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 283 : 689-692, 1999
  - 16) Kaukonen J, Juselius JK, Tiranti V et al : Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science* 289 : 782-785, 2000
  - 17) Spelbrink JN, Li FY, 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
  - 18) 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
  - 19) Saada A, Shaag A, Mandel H et al : Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet* 29 : 342-344, 2001
  - 20) Mandel H, Szargel R, Labay V et al : The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat Genet* 29 : 337-341, 2001
  - 21) Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H et al : Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 18 : 231-236, 1998
  - 22) Wang J, Wilhelmsson H, Graff C et al : Dilated cardiomyopathy and atrioventricular conduction blocks induced by heart-specific inactivation of mitochondrial DNA gene expression. *Nat Genet* 21 : 133-137, 1999
  - 23) Enriquez JA, Cabezas-Herrera J, Bayona-Bafaluy MP et al : Very rare complementation between mitochondria carrying different mitochondrial DNA mutations points to intrinsic genetic autonomy of the organelles in cultured human cells. *J Biol Chem* 275 : 11207-11215, 2000
  - 24) Yoneda M, Miyatake T, Attardi G : Complementation of mutant and wild-type human mitochondrial DNAs coexisting since the mutation event and lack of complementation of DNAs introduced separately into a cell within distinct organelles. *Mol Cell Biol* 14 : 2699-2712, 1994
  - 25) Ono T, Isobe K, Nakada K et al : Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat Genet* 28 : 272-275, 2001
  - 26) Yasukawa T, Suzuki T, Ueda T et al : Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNAs<sup>Leu</sup> (UUR) with pathogenic mutations of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *J Biol Chem* 275 : 4251-4257, 2000
  - 27) Yasukawa T, Suzuki T, Ishii N et al : Defect in modification at the anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNA<sup>Lys</sup> with the MERRF encephalomyopathy pathogenic mutation. *FEBS Lett* 467 : 175-178, 2000
  - 28) Suzuki T, Suzuki T, Wada T et al : Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs : new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *EMBO J* 21 : 6581-6589, 2002
  - 29) Inoue K, Nakada K, Ogura A et al : Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat Genet* 26 : 176-181, 2000
  - 30) Nakada K, Inoue K, Ono T et al : Inter-mitochondrial complementation : Mitochondria-specific



- system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat Med* 7 : 934-940, 2001
- 31) 内藤悦雄, 伊藤道徳 : ジクロル酢酸ナトリウム療法. *日本先天代謝異常学会誌* 13 : 305-340, 1997
- 32) Saitoh S, Momoi M, Yamagata T et al : Effect of dichloroacetate in three patients with MELAS. *Neurology* 50 : 531-531, 1998
- 33) Koga Y, Ishibashi M, Ueki I et al : Effects of L-arginine on the acute phase of strokes in three patients with MELAS. *Neurology* 58 : 827-828, 2002

## **The Prospects for Pathogenesis and New Therapy of Mitochondrial Encephalomyopathy**

Yu-ichi Goto

National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry

Recent advances in research on mitochondrial encephalomyopathy are described based on etiology, pathomechanism and therapy. First, nuclear pathogenic genes have been identified such as structural genes for complex I and II, assemble factors for complex III and IV, and several factors associating with mtDNA replication. Second, the pathogenesis of the disease has been extensively studied using culture cells

and mouse models. Inter-mitochondrial compensation of the mtDNA genome having different pathogenic point mutations, wobble modification defect of 3243 and 8344 mutations, and the newly established mouse with large-scale deletion of mtDNA are reviewed. Third, topics of the therapeutic research, such as dichloroacetate and L-arginine as new drugs are also described in this review.

# ミトコンドリア病の組織診断—ゴモリ染色, 活性染色, 免疫染色

後藤雄一<sup>1)</sup>

**[SUMMARY]** ミトコンドリア病の診断において、組織診断は有力な情報を提供する。典型的な病理所見である、赤色ぼろ線維(ragged-red fiber), 高SDH 活性血管(strongly SDH-reactive blood vessel), シトクロームc 酸化酵素欠損線維のいずれか、もしくはその組み合わせを検出することが肝要である。〔臨床検査 49:45-49, 2005〕

**[KEYWORDS]** RRF, SSV, シトクロームc 酸化酵素欠損線維

## はじめに

ミトコンドリア病の診断においては、特徴的な臨床症状をとらえることに加え、ミトコンドリア異常の存在を証明する必要がある。その基本となる検査手段は、病理学検査、生化学検査、分子遺伝学的検査であり、その中でも病理学的検査は、歴史的にミトコンドリア病の疾患概念を確立する際に重要な役割を果たしたばかりでなく、現在においても確定診断には不可欠な検査である。

ミトコンドリア病の罹患臓器は全身の臓器に及び、その病理学的検査の対象は多種多様になるはずである。しかし、臨床診断という意味ではその対象は骨格筋に絞られるとあってよい。その理由は、骨格筋は生検が比較的容易な臓器であり、これまでの研究による知見が蓄積されていること、筋線維は細胞が一行に連なって形成された多核の細胞であり、ミトコンドリア異常があっても筋線維全体が失われることなく(細胞死になりにくい)

その異常がそのまま病理学的にとらえられやすいことが挙げられる。他の臓器・組織では、ミトコンドリア異常によって細胞死が起こり、病理変化をとらえようにもそもそも細胞が失われている可能性が高い。

## ゴモリ染色

ゴモリ染色とは、Gomoriトリクローム変法染色のことである。英文ではmodified Gomori trichrome stainingと記載される。この染色では、細胞小器官としては小胞体とミトコンドリアが赤く染まり、それ以外の成分は青緑色に染まる。ミトコンドリア病の患者生検筋において、赤色ぼろ線維(ragged-red fiber; RRF)がこの染色法で観察できる(図1)。筋線維内部が点状に赤く染色されるが、筋鞘膜直下が特に強く赤く染色される場合が多い。これは、電子顕微鏡像で明らかのように、その部位でミトコンドリアが異常に増殖していることを反映した像である。さらに電子顕微鏡像を詳細にみると、病理学的には3つの変化が起きている。数の増加、大きさの変化(巨大化)、内部構造の変化(クリスタの変形、封入体の出現)である。

これらの変化は機能が低下したミトコンドリアが、数を増すことでその機能を代償させようとする反応であると考えられている。しかし、どのような機能低下がこのようなミトコンドリアの形態変化を促進させるのかの詳細はわかっていない。現象としては、ミトコンドリア病の原因のうち、

1) GOTO Yu-ichi 国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第二部・部長

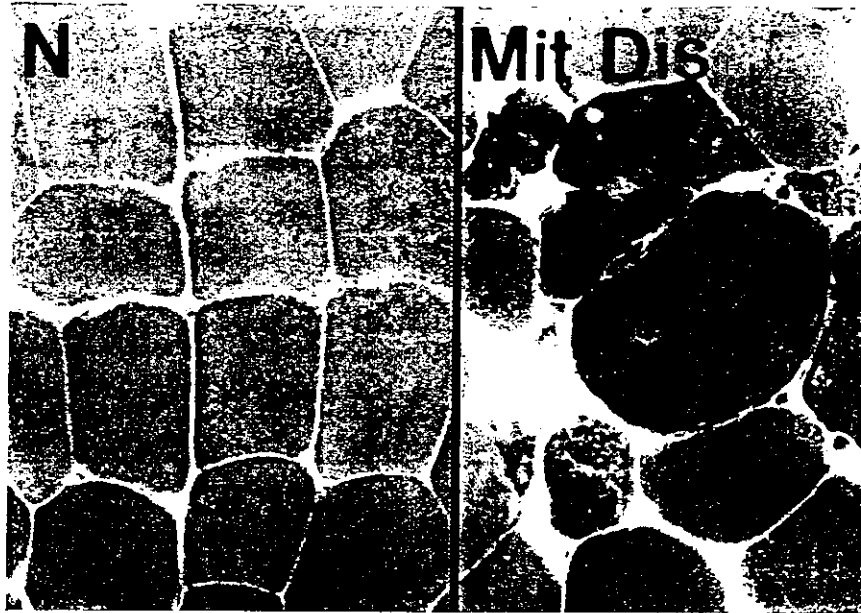


図1 赤色ぼろ線維(Ragged-red fiber ; RRF)のゴモリ染色像  
 右図中央に見えるいくつかの線維は、ミトコンドリアが増殖した RRF である。  
 特に、筋鞘膜直下の赤色が著明であるが、内部の赤色染色性も増加している。左  
 上の2つの線維は、すでに筋線維の構造が崩壊しつつあるのがみえる。

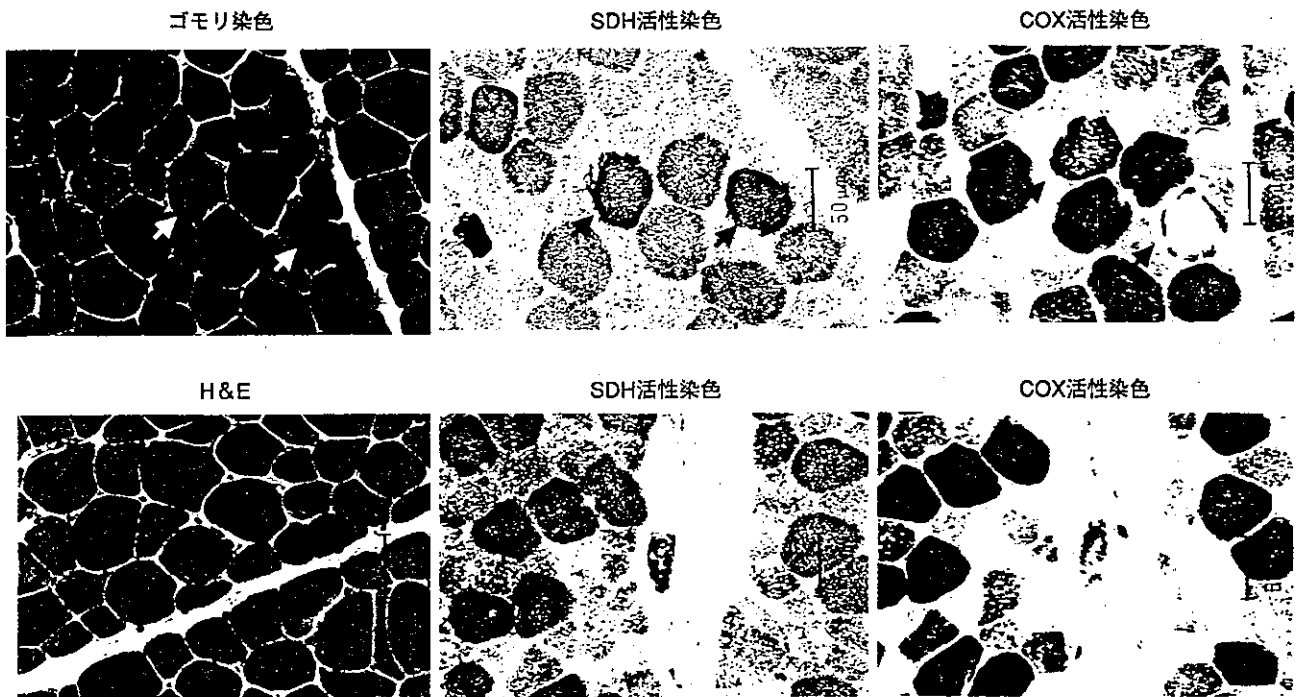


図2 赤色ぼろ線維、高 SDH 活性血管(SSV)の光顕像  
 上段は RRF を、下段は SSV の光顕像である。RRF は SDH で濃染し、COX 染色では、濃染するもの(高活性)と淡染するもの(活性低下)がある。SSV も SDH で濃染する。

mtDNA 異常があり、点変異が tRNA 領域に存在するときや大きな欠失があるときに RRF を認める場合が多い。一方、同じ mtDNA 異常でも、点変異が蛋白コード領域の場合や核 DNA 上に存在する原因遺伝子変異の場合は、RRF は比較的まれである。しかしこれにも例外があって、核

DNA 上の遺伝子の異常が予想されている乳児致死型、乳児良性型シトクローム c 酸化酵素欠損症では、多数の RRF が認められる。

RRF の存在比率と臨床症状の軽重とは直接には結びつかない。筋力低下をもたらすのは筋線維数の減少であり、病理変化の強い筋線維が多数あ

ることと筋線維数は直接には関係ないからである。また RRF は年齢の高い人の骨格筋ではときどき認められることがある。40 歳以上の患者筋において、生検筋全体で(検体の大きさによるが)、例えば 1,000 個の筋細胞になかに 1, 2 個存在する RRF が、病的意味をもつかどうかの判断は難しい。赤筋(タイプ 1)の大小不同、筋線維タイプの分布異常、小角化線維の出現などの他の病理所見と合わせた総合的な判断が必要になる。場合によっては、生化学検査や分子遺伝学的検査の結果に頼らざるを得ない。

## ■ 活性染色

ミトコンドリア病の組織化学染色でよく使用される 2 つの活性染色を紹介する。活性染色は、構造そのものを正確にとらえているのではなく、あくまで生化学的な反応をみているだけであり、加える基質や発色物質の量、反応時間などに大きく影響を受ける。したがって、常にコントロールを同じプレパラート上において染色することが不可欠である。また、正確な活性値の測定は、生化学的な方法によらなくてはならない。

### 1. コハク酸脱水素酵素活性染色

コハク酸脱水素酵素(succinate dehydrogenase; SDH)は、TCA 回路の構成酵素であるとともに、電子伝達系の複合体 II(コハク酸-ユビキノン酸化還元酵素)の部分反応にもなっている。すなわち、TCA 回路と電子伝達系を結びつける重要な役割を果たしている。複合体 II は 4 つのサブユニットからなり、すべて核 DNA 上にコードされているが、そのうち最も大きなフラボプロテインサブユニット(Fp)が SDH 反応を担っている。

SDH はミトコンドリア内に限局して存在している。また mtDNA にコードされたサブユニットをもたないので、mtDNA の異常が存在するかどうかあまり影響を受けない。RRF は SDH 染色で濃染する(図 2)。それは、たとえ mtDNA に変異があろうとも、単純にミトコンドリアの数(内膜面積)が増加することが SDH 活性の上昇としてとらえられるからと考えられる。

脳卒中様発作を特徴とするミトコンドリア病で

ある MELAS においては、骨格筋や脳(おそらく全身)の小動脈にも病変が認められる。SDH 染色では、その活性がホルマザン顆粒の大きさとして表現されるので、小動脈の横断面をみると全周性ではなくところどころに粗大な顆粒が存在しているように観察できる。このような血管を、高 SDH 活性血管(strongly SDH-reactive blood vessel; SSV)といい、MELAS 患者の 80% に存在する(図 2)。SSV を電子顕微鏡でみると、血管平滑筋細胞内にミトコンドリアが集簇している像が確認できる。

また、ミトコンドリア病の一病型に SDH 欠損症がある。この場合は SDH 染色で骨格筋(および血管など)が染まらないことが診断の一助になる。

### 2. シトクローム c 酸化酵素活性染色

シトクローム c 酸化酵素(cytochrome c oxidase; COX)は、電子伝達系の複合体 IV と同義である。13 個のサブユニットからなる複合体で、そのうち 3 個は mtDNA にコードされている。したがって、mtDNA 変異でも、核 DNA 上の遺伝子変異でも COX 欠損症が起きる。これまで診断されたミトコンドリア病で最も多いのが COX 欠損症であり、かつ最も研究が進んでいる。その理由は、COX 活性染色で酵素欠損が容易に確認できるからである。

COX 欠損は、病理学的に部分欠損とびまん性欠損に大別できる。ここでいう部分欠損というのは、英語で focal deficiency の意味である。典型的な COX 欠損線維は mtDNA に大きな欠失がある患者筋で認められ、正常活性の筋線維のなかに散在している COX 活性の全くない筋線維が確認できる。その多くは RRF であるが、ゴモリ染色で一見正常に見える筋線維で COX 欠損を示しているものもある。

RRF はいつも COX 欠損であるかというところ必ずしもそうではない。多くは COX 欠損であるが、MELAS 患者骨格筋ではときに正常もしくは高活性の RRF が認められる(図 2)。この現象は以下のように考えると理解しやすい。個々の筋線維は異なる比率で 3243 位や 3271 位の変異 mtDNA を有している。通常このようなヘテロプラスミーの場合、変異率がある値(閾値)以上にな

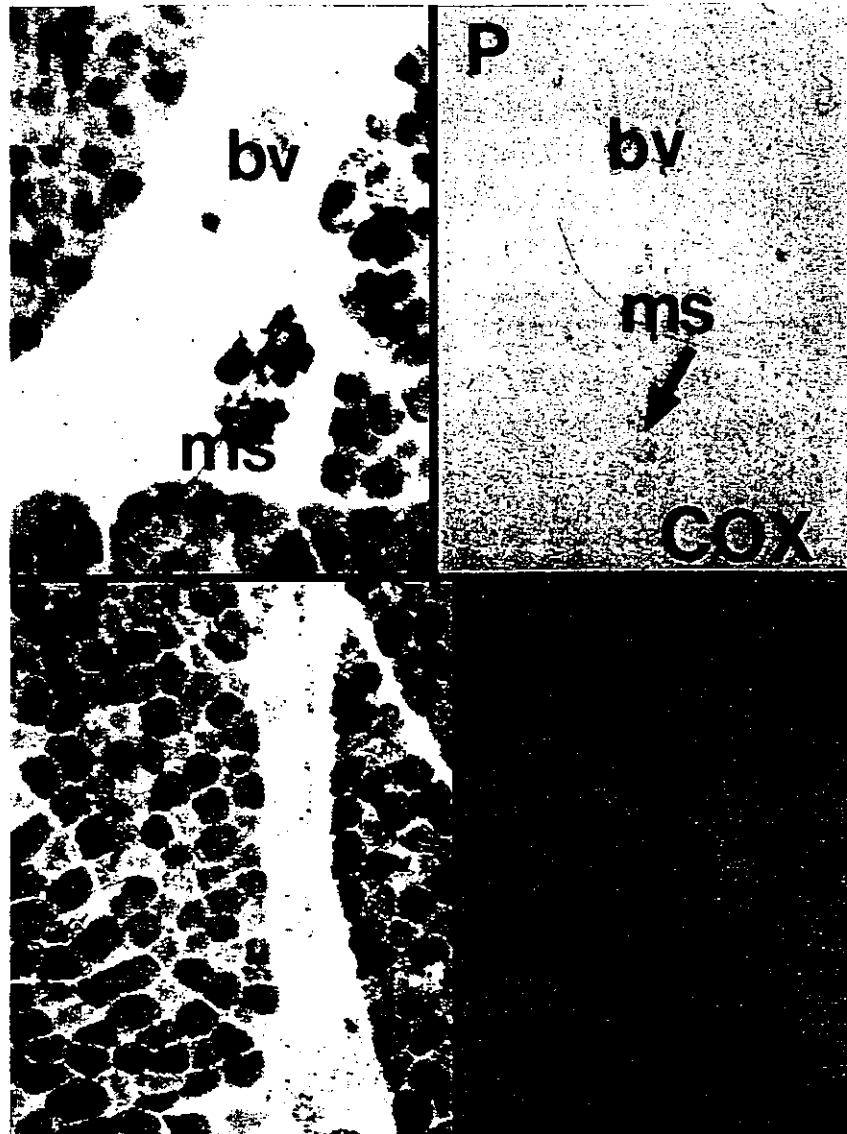


図3 びまん性シトクロームc酸化酵素欠損  
 上段は非特異性びまん性COX欠損，下段は筋特異性びまん性COX欠損の例である。非特異的の場合，筋細胞以外の，筋紡錘(ms)，血管(bv)もCOXが欠損している。一方，筋特異的の場合，筋紡錘，血管のCOX活性が保たれている。N：健常者筋，P：患者筋

ると機能障害を起こす。実はこれら MELAS の変異の場合，複合体 I 活性低下の閾値が COX 活性低下の閾値よりも低く，この両者の閾値の間の比率をもつ細胞は，ミトコンドリアが増殖した RRF にはなるが増加したミトコンドリアは COX 活性が維持されていると考えられる。したがって，COX 活性が正常だったり，高かったりするものと考えられる。同じ転移 RNA の変異でも，8344 などの MERRF の変異の場合，両者の閾値にほとんど差がなく，RRF はすべて COX 欠損線維となっている。このように，RRF の COX 活性の有無によって MELAS タイプと MERRF タイプが分けられ，これが責任遺伝子変異の検索

の有力な情報になる。また，RRF が全筋線維数の 5% でも病理学的には優位な所見であるが，同じ検体を生化学的に検査すると COX 活性の低下は優位になることはない。多くの正常活性をもつ筋線維が一部の活性低下をマスクするからである。このように，病理組織検査は生化学検査より鋭敏に異常をとらえることができる。

びまん性 COX 欠損の場合，全筋線維の活性が低下していることから，生化学的にも検出が可能である。骨格筋のびまん性 COX 欠損には 2 種類あり，筋細胞とともに，筋紡錘内の筋細胞(核鎖線維，核袋線維)，間質に存在する血管細胞，線維芽細胞などのすべてが COX 欠損を示す非特

異的 COX 欠損の場合と、筋細胞だけが COX 欠損を示す筋特異的 COX 欠損の場合がある(図 3)。前者の病理像で、Leigh 脳症の臨床病型である場合、多くは SURF 1 遺伝子変異の場合の可能性がある。一方、筋特異的 COX 欠損の場合は、いまだ責任遺伝子が同定されていない。

COX 欠損は遺伝的な病的状態ばかりでなく、他の要因でも起きることがある。皮膚筋炎や多発性筋炎など障害の強い部位の筋線維は欠損を示すことがある。また、長期臥床のために四肢を動かしていないと COX 欠損が認められる。ラットを 2 週間程度低重力状態にただけでも COX 欠損が生じることが知られている。したがって、病気が重篤で長期にベッドで臥床している患者の生検筋においては、COX 欠損が基礎疾患に由来するのか、長期臥床に由来するのかを見極める必要がある。

## 免疫染色

ミトコンドリア病の原因となる遺伝子産物が存在するかどうかについて抗体を用いて検査することが理論的に可能である。臨床現場ではあまり普及していないが、ミトコンドリア病の種々の病因が明らかになるにつれて、今後はその重要性が増すことが予想される。

### 1. SURF 1

COX 欠損を示す Leigh 脳症のなかで、SURF 1 遺伝子の変異によるものがある。抗 SURF 1 抗体による免疫組織化学染色では、あきらかに染色性が落ちることで欠損の判断が可能である。

### 2. COX サブユニット、複合体 I サブユニット

COX の各サブユニットに対する抗体は市販さ

れており容易に手に入る。しかしながら、各サブユニットの抗体を用いた免疫組織化学染色を診断に利用する段階まで達していない。その理由は、遺伝子変異が存在するサブユニットが特異的に欠損するのではなく、1つの遺伝子産物の異常でその後のアッセンブリーが障害され多数の遺伝子産物の欠損となることが挙げられる。

同様なことは複合体 I サブユニットにもいえる。

## おわりに

ミトコンドリア病の病理検査は情報量が多い、有意義な検査である。しかしながら、この検査だけでも確定診断に至らない場合もあることを事前に被験者に十分理解していただく必要がある。

また、病理検査の試料となる生検筋は、生化学検査や分子遺伝学的検査にも利用されるものであり、また線維芽細胞や筋芽細胞などの樹立の出発点にもなる。他の検査方法での結果を合わせた総合的な診断が不可欠であるという意味でも、この病理検査の意義は大きいと考える。

最後に、骨格筋以外の生検組織を用いてミトコンドリア病を診断しようとする場合は、正常組織と比較検討することを忘れてはならない。ミトコンドリア異常による心筋症を診断する場合に、患者心筋でミトコンドリアが増殖していることを根拠にミトコンドリア心筋症とする例が文献的に散見する。正常心筋でも比較的ミトコンドリアが集積して存在する像が得られることから、その解釈は慎重であるべきである。

## MEDICAL BOOK INFORMATION

## 医学書院

脳損傷による視覚障害のリハビリテーション  
Rehabilitation of visual disorders after brain injury

著 Josef Zihl  
訳 平山和美

A5 頁264 2004年  
定価3,675円(本体3,500円+税5%)  
[ISBN4-260-24432-9]

脳損傷によって起こるさまざまな視覚障害について長年研究してきた著者のライフワーク。障害の回復と代償の観点から脳の可塑性について研究した著者が、豊富な事例から患者のリハビリテーションの理念と訓練法についてわかりやすく概説した書。

## Altered Expression of ARPP Protein in Skeletal Muscles of Patients with Muscular Dystrophy, Congenital Myopathy and Spinal Muscular Atrophy

Chisato Nakada<sup>a</sup> Yoshiyuki Tsukamoto<sup>a</sup> Akira Oka<sup>b</sup> Ikuya Nonaka<sup>d</sup>  
Kenzo Sato<sup>a</sup> Shigeo Mori<sup>e</sup> Hisao Ito<sup>c</sup> Masatsugu Moriyama<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Division of Molecular Biology, Department of Molecular and Cellular Biology, <sup>b</sup>Division of Child Neurology, Institute of Neurological Science, and <sup>c</sup>Division of Organ Pathology, Department of Microbiology and Pathology, Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago, and <sup>d</sup>National Center Hospital for Mental, Nervous and Muscular Disorders, NCNP, and <sup>e</sup>Department of Pathology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan

### Key Words

Ankyrin-repeated protein with PEST and a proline-rich region (ARPP) · Muscular dystrophy · Congenital myopathy · Spinal muscular atrophy

### Abstract

**Objectives:** Ankyrin-repeated protein with PEST and a proline-rich region (ARPP) is a recently identified protein with 4 ankyrin-repeated motifs in its central portion. Type 1 myofibers of skeletal muscle express high levels of ARPP. Recently, we have found that ARPP expression was induced in mouse denervated skeletal muscle. This led us to hypothesize that ARPP expression might be induced in skeletal muscle under some pathological conditions. **Methods:** In this study, we performed immunohistochemical analysis of ARPP expression in biopsy specimens of muscle tissue from 15 patients with muscular dystrophies (MDs), 13 with congenital myopathies and 11 with spinal muscular atrophies (SMAs). **Results:** The ARPP expression levels of all the specimens from MD patients appeared to be lower than control muscle levels. In contrast, the specimens from the 13 patients with congenital myopathies were all ARPP positive. We

also found increased numbers of ARPP-positive myofibers in patients with congenital myopathies, and these myofibers co-expressed the slow myosin heavy chain. Indeed, it has been reported that type 1 myofibers are predominant in patients with congenital myopathies, suggesting that increased numbers of ARPP-positive myofibers in such patients may be associated with increased numbers of type 1 fibers. In patients with SMAs, we found that ARPP-positive myofibers tended to be distributed in groups. As grouped myofibers have been reported to result from the process of denervation, innervation and subsequent denervation of re-innervated myofibers, the grouped ARPP-positive myofibers in SMA patients may result from denervation of the motor units. **Conclusions:** These findings suggest that evaluation of ARPP may be helpful for the histological diagnosis of muscle diseases.

Copyright © 2004 S. Karger AG, Basel

This work was carried out as a part of 'Ground-Based Research Announcement for Space Utilization' promoted by the Japan Space Forum.

### KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail [karger@karger.ch](mailto:karger@karger.ch)  
[www.karger.com](http://www.karger.com)

© 2004 S. Karger AG, Basel  
1015-2008/04/0711-0043\$21.00/0

Accessible online at:  
[www.karger.com/pat](http://www.karger.com/pat)

Masatsugu Moriyama, MD, PhD  
Division of Molecular Biology, Department of Molecular and Cellular Biology  
School of Life Science, Faculty of Medicine, Tottori University, 86 Nishimachi  
Yonago City, Tottori 683-8503 (Japan)  
Tel. +81 859 34 8040, Fax +81 859 34 8274, E-Mail [moriyama@grape.med.tottori-u.ac.jp](mailto:moriyama@grape.med.tottori-u.ac.jp)

## Introduction

Recently, we have identified a novel human protein, ankyrin-repeated protein with PEST and a proline-rich region (ARPP) [1, 2]. This protein has also been designated Ankrd2 [3, 4]. ARPP is characterized structurally by the presence of 4 ankyrin-repeated domains in its central portion [1, 2]. The amino acid sequence of ARPP is highly homologous with that of cardiac restricted ankyrin-repeated protein (CARP; 52%) [5] and diabetes-related ankyrin-repeated protein (DARP; 37%) [6], which suggests that ARPP, CARP and DARP may be members of the same family.

CARP expression was reported to be confined to the heart but barely detectable in skeletal muscle [5, 7–9]. In contrast, we observed high expression levels of ARPP in skeletal muscle and the heart [1, 10]. The molecular basis for the muscle-specific expression of ARPP is unknown at this stage. However, we have recently reported that the promoter region of the ARPP gene contains a multiple E box which is rich in muscle-specific gene [4, 11], suggesting that muscle-specific expression of the ARPP gene may be regulated at a transcriptional level. ARPP was selectively expressed in type 1 myofibers of skeletal muscle [2], and, therefore, ARPP-positive myofibers were arranged in a checkerboard-like pattern [4, 10]. Recently, we have found that ARPP expression was up-regulated in experimentally denervated skeletal muscle [2], which led us to speculate that ARPP expression might be induced in some pathological conditions.

In this study, based on a hypothesis that ARPP expression might be induced in patients with muscle diseases, we performed an immunohistochemical analysis of ARPP expression in myofibers of 15 patients with muscular dystrophies (MDs), 13 with congenital myopathies and 11 with spinal muscular atrophies (SMAs). We found that ARPP expression tended to be down-regulated in patients with MDs but was frequently up-regulated in those with congenital myopathies. In SMA patients, the ARPP-positive myofibers were not distributed in a checkerboard-like pattern but were arranged in groups and expressed ARPP at comparable levels to normal skeletal muscle specimens. These findings raise the possibility that evaluation of ARPP could be useful for monitoring diseased muscles.

## Materials and Methods

### Tissues

Thirty-nine specimens of unfixed, frozen biceps muscle tissue taken for diagnostic purposes from patients with MDs, congenital myopathies and SMAs were used. The patients with MDs included 7 with Duchenne MD (DMD), 1 with Becker MD (BMD), 2 with limb girdle MD (LGMD), 1 with facioscapulohumeral MD (FSHMD) and 4 with congenital MDs (CMDs). The latter 4 comprised 3 patients with Fukuyama type congenital MD and 1 with laminin- $\alpha_2$ -deficient MD. The 13 patients with congenital myopathies comprised 4 with nemaline myopathy, 3 with myotubular myopathy, 3 with central core disease and 3 with congenital fiber type disproportion (CFTD). The 11 patients with SMAs included 4 with SMA1, 3 with SMA2 and 4 with SMA3. The use of these tissue samples for the study was approved by the Institutional Review Board of Tottori University (permission No. 186).

### Antibodies

The anti-ARPP antibody [ $\alpha$ -ARPP(FL) Ab] against the 329 amino acids of the human ARPP protein (5–333) was raised in our laboratory. The characteristics of this Ab are described in detail elsewhere [1]. The commercially available anti-slow-myosin-heavy-chain (slow MHC) monoclonal Ab (YLEM, Rome, Italy) was also used for the double-labeled immunohistochemistry.

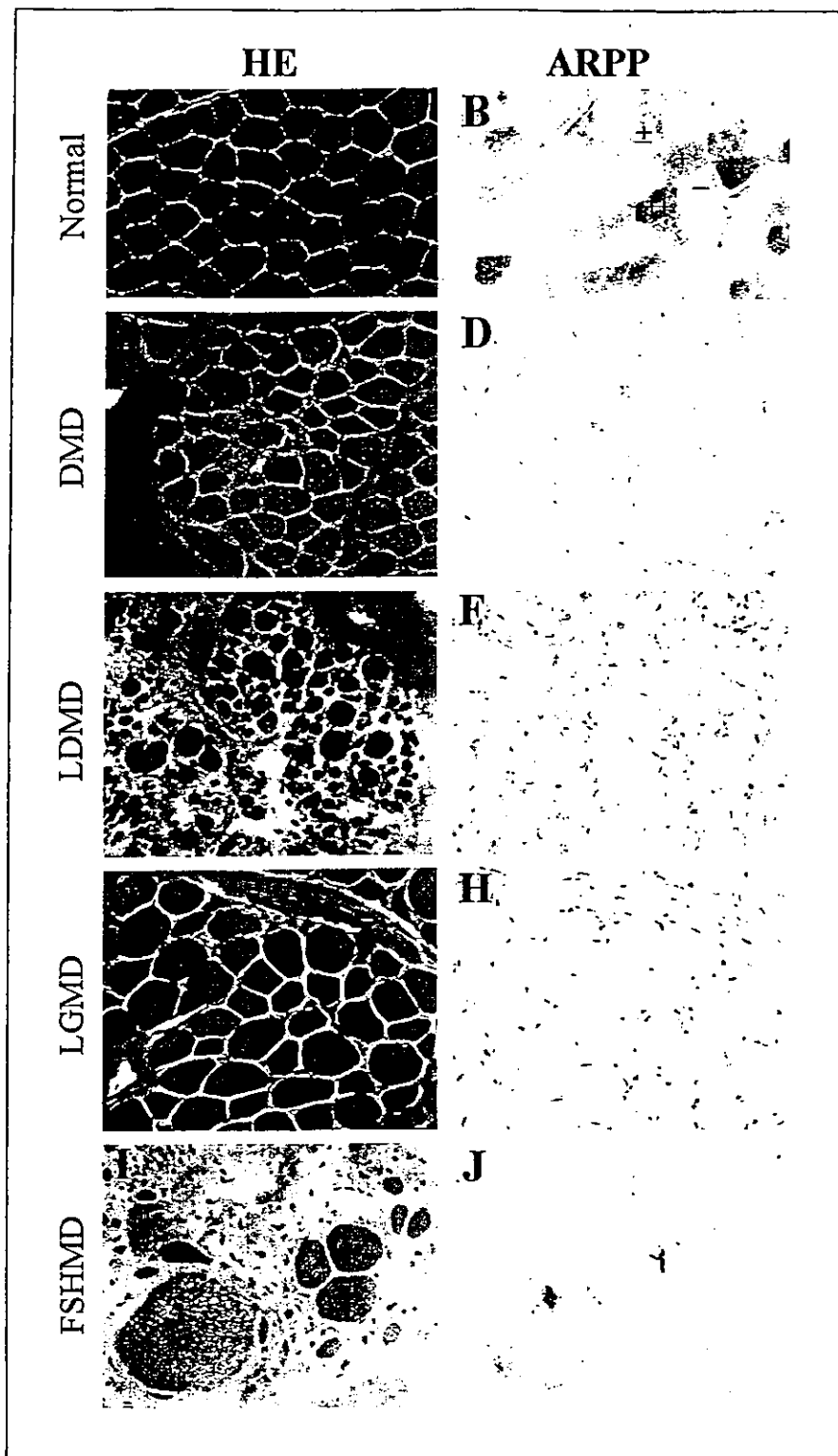
### Immunohistochemistry

Frozen tissue sections were prepared as follows. The biopsy samples of biceps muscle were snap-frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen and then tissue sections were prepared with a cryostat. After fixation in acetone at  $-20^\circ\text{C}$  for 1 h, these sections were washed with  $1 \times$  phosphate-buffered saline (PBS), treated with 3% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 5 min at room temperature (RT) and blocked with 10% (v/v) goat serum (Nichirei) for 30 min at RT. Then, immunohistochemical staining with the  $\alpha$ -ARPP(FL) Ab was performed as follows. The tissue sections were incubated with the  $\alpha$ -ARPP(FL) Ab diluted 1:2,000 with diluting solution (Dako, Carpinteria, Calif., USA) for 18 h at  $4^\circ\text{C}$ , washed with  $1 \times$  PBS and incubated for 30 min with biotinylated goat antirabbit IgG (Nichirei). After being washed with  $1 \times$  PBS, they were incubated with a solution of avidin-conjugated horseradish peroxidase (Vectastain Elite ABC kit; Vector Laboratories Inc., Burlingame, Calif., USA) for 15 min, according to the manufacturer's recommendations, then washed again with  $1 \times$  PBS for 5 min. Peroxidase activity was detected with  $\text{H}_2\text{O}_2$ /diaminobenzidine substrate solution, and the sections were counterstained with hematoxylin before dehydration and mounting.

### Double-Labeled Immunohistochemistry

Frozen tissue sections were fixed in acetone at  $-20^\circ\text{C}$  for 1 h, blocked with 10% (v/v) normal goat serum (Nichirei Co.) for 30 min at RT and then incubated for 18 h at  $4^\circ\text{C}$  with a mixture of the  $\alpha$ -ARPP(FL) Ab diluted with  $1 \times$  PBS at 1:1,000 and the  $\alpha$ -slow-MHC Ab diluted at 1:40. After being washed with  $1 \times$  PBS, they were incubated for 2 h at RT with a mixture of Alexa fluor-488-conjugated goat antirabbit Ab diluted to 1:200 and Alexa fluor-546-conjugated goat antimouse Ab (Molecular Probes) diluted to 1:200 with  $1 \times$  PBS. They were then washed with  $1 \times$  PBS, mounted with gel/mount (Biomedex Corp.), observed with a fluorescence microscope (Eclipse E800; Nikon) and the images were processed by the MRC-1024 confocal system (Bio-Rad).





**Fig. 1.** Down-regulation of ARPP expression in patients with MDs. Frozen skeletal muscle tissue sections from MD patients [DMD (**C** and **D**), laminin- $\alpha_2$ -deficient MD (LDMD; **E** and **F**), LGMD (**G** and **H**) and FSHMD (**I** and **J**)] and a sample of normal control muscle were subjected to immunohistochemical staining with the  $\alpha$ -ARPP(FL) Ab (**B**, **D**, **F**, **H** and **J**) and hematoxylin-eosin (HE) staining (**A**, **C**, **E**, **G** and **I**). Original magnification  $\times 100$ . ARPP-positive fibers were arranged in a checkerboard-like pattern in normal muscle (**B**), whereas no such pattern was observed in muscle from MD patients and their weakly positive fibers were distributed uniformly (**D**, **F**, **H** and **J**). The intensities of ARPP immunoreactivity were classified as strongly positive (++) , weakly positive (+), borderline ( $\pm$ ) or negative (-).

**Table 1.** Expression of ARPP protein in congenital myopathies

Case No.	Histology	Age	Sex	Positive rates	Intensities of immunoreactivity
1	nemaline (S)	4 months	M	++	+
2	nemaline (B)	9 years	M	++	++
3	nemaline (B)	7 months	M	+	+
4	nemaline (S)	11 months	M	+++	++
5	myotubular (S)	5 months	M	+++	++
6	myotubular (S)	1 years	M	++	++
7	myotubular (S)	8 months	M	++	++
8	central core (B)	6 years	M	+++	±
9	central core (B)	34 years	M	+	+
10	central core (B)	8 months	M	+++	±
11	CFTD (B)	2 years	M	+++	+
12	CFTD (B)	28 years	M	++	+
13	CFTD (B)	10 months	F	++	+

S = Severe infantile form; B = benign congenital form. Positive rates were classified based on the proportions of the positive fibers: +++ = >90%; ++ = 90–50%; + = 50–5%; – = 5–0%. Intensities of immunoreactivity were classified into three groups: +++ = strong; ++ = weak; ± = borderline.

#### *Semi-Quantitative Analysis of ARPP-Positive Myofibers*

Intensities of immunoreactivities of ARPP-positive myofibers were classified into 4 groups. As shown in figure 1B, strongly positive (++) , moderately positive (+) , weakly positive (±) and negative (–) myofibers were diagnosed according to their intensities.

## Results

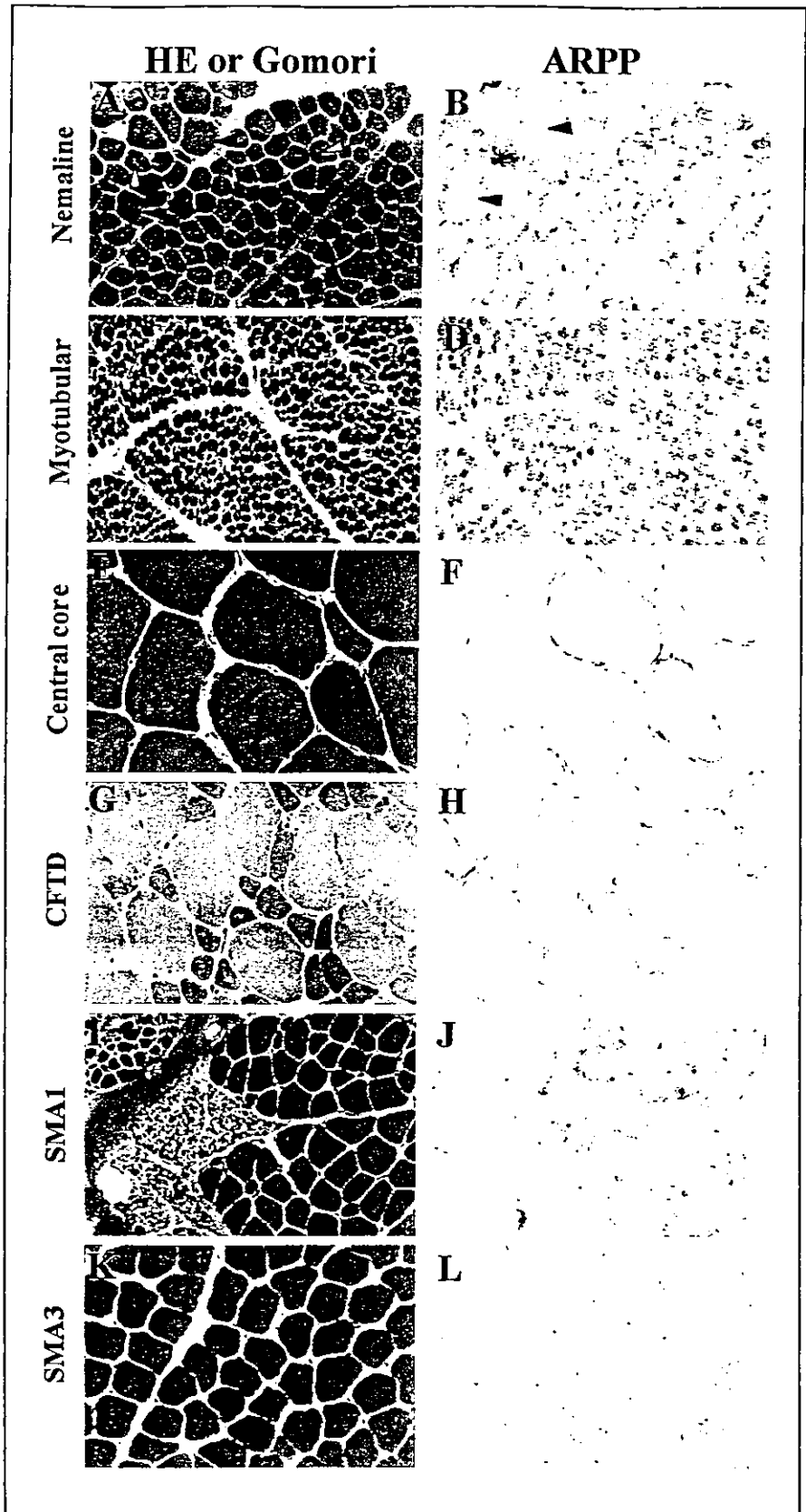
#### *Down-Regulation of ARPP Expression in MD Patients*

To evaluate ARPP expression in skeletal muscle of patients with MDs, we subjected skeletal muscle biopsy samples from 15 MD patients to immunohistochemical analysis. Consistent with the results of our previous study [10], the ARPP-positive and negative myofibers in control normal muscle were arranged randomly in a checkerboard-like pattern (fig. 1B and 3A1–3). The ARPP expression levels of the ARPP-positive myofibers were not all the same. As shown in figure 1B, myofibers that were strongly positive, weakly positive and negative for ARPP were admixed in normal muscle, whereas in muscle from MD patients, the ARPP expression levels appeared to be lower than those in normal muscle (fig. 1D, F, H and J). Although the expression levels were low in most fibers, we noticed that hypertrophic myofibers, which were occasionally scattered among dystrophic myofibers, tended to express ARPP at comparable levels to normal control muscle fibers (fig. 1J).

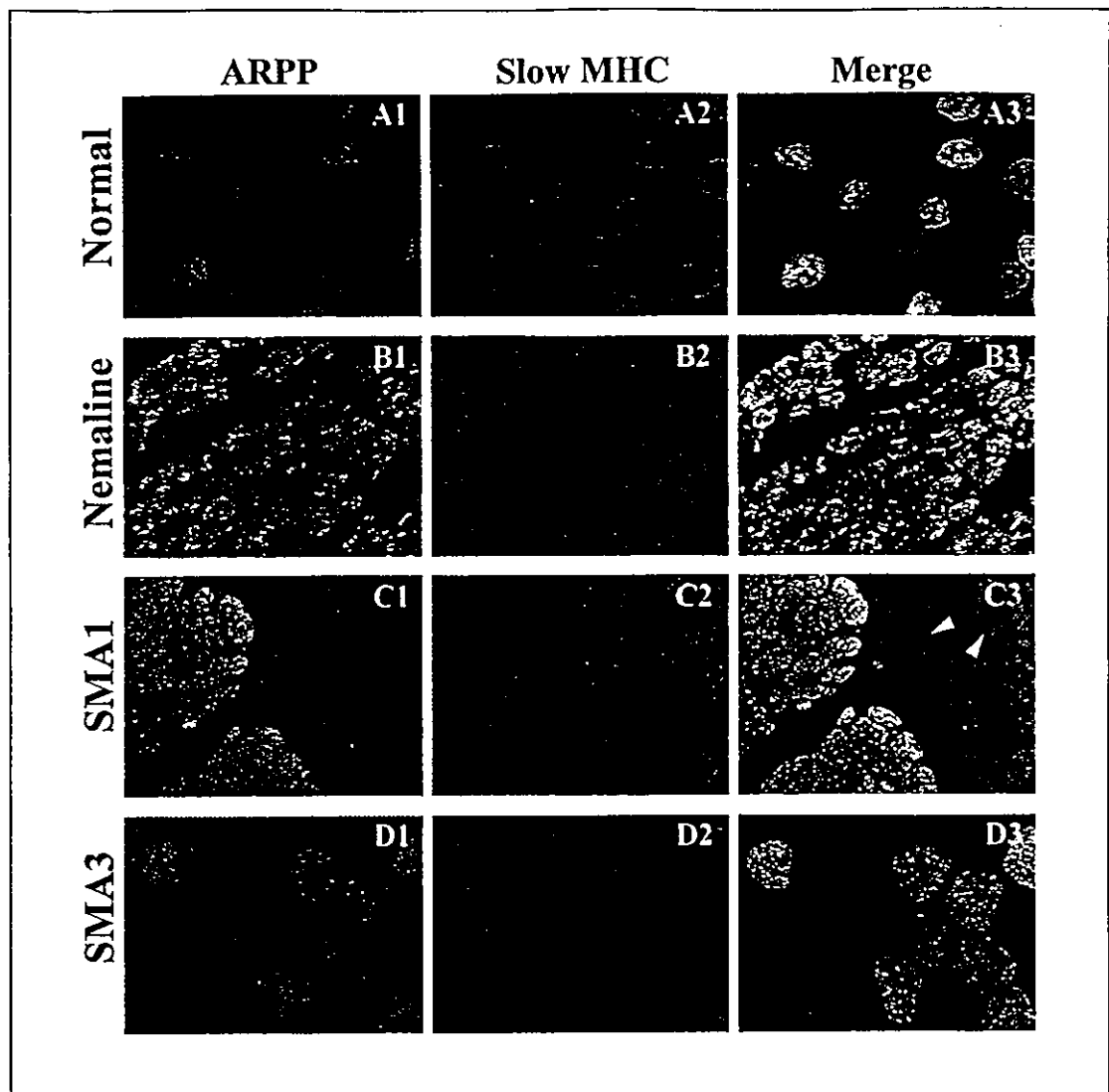
#### *ARPP Is Highly Induced in Myofibers of Congenital Myopathy Patients*

To evaluate ARPP expression in myofibers of patients with congenital myopathies, we subjected muscle tissues from 13 patients with congenital myopathies, which included 4 with nemaline myopathy, 3 with myotubular myopathy, 3 with central core disease and 3 with CFTD (table 1), to immunohistochemical analysis. All 13 samples were ARPP positive (table 1).

*Nemaline Myopathy.* Although all 4 muscle samples were found to express ARPP, the proportions of ARPP-positive myofibers differed among the patients (cases 1–4 in table 1). Small atrophic myofibers tended to express ARPP (fig. 2A and B), and positive and negative myofibers were randomly admixed (fig. 2B). Interestingly, analysis of serial tissue sections by Gomori trichrome staining and immunohistochemical staining of ARPP showed that ARPP-positive myofibers tended to contain nemaline rods (fig. 2A and B). Conversely, ARPP-negative myofibers (arrowheads in fig. 2B) rarely contained these rods. This trend was also observed in the other 3 patients. Double-labeled immunohistochemistry with the  $\alpha$ -ARPP(FL) and  $\alpha$ -slow-MHC Abs revealed that, in patients with nemaline myopathy, the ARPP-positive myofibers coincided with the slow-MHC-positive myofibers (fig. 3B1–3). This suggests that the increased numbers of ARPP-positive myofibers may be associated with increased numbers of type 1 fibers.



**Fig. 2.** ARPP expression in patients with congenital myopathies and SMAs. Frozen skeletal muscle tissue sections from patients with congenital myopathies and SMAs were analyzed by immunohistochemical staining with the  $\alpha$ -ARPP(FL) Ab (**B, D, F, H, J** and **L**), Gomori trichrome staining (**A**) and hematoxylin-eosin (HE) staining (**C, E, G, I** and **K**). Original magnification  $\times 100$ . Nemaline rods are shown by open arrowheads (**A**). ARPP-negative myofibers without nemaline rods are shown by solid arrowheads (**A** and **B**).



**Fig. 3.** Double-labeled immunohistochemistry of patients with nemaline myopathy and SMA1 and SMA2 with the  $\alpha$ -ARPP(FL) and  $\alpha$ -slow-MHC Abs. To evaluate whether ARPP and slow MHC were co-expressed in patients with nemaline myopathy and SMA1 and SMA2, muscle specimens were subjected to double-labeled immunohistochemistry with the  $\alpha$ -ARPP(FL) and  $\alpha$ -slow-MHC Abs and analyzed using confocal microscopy. The secondary antibodies used

were a mixture of Alexa fluor-546-conjugated goat antimouse and Alexa fluor-488-conjugated goat antirabbit antibody. ARPP and slow MHC are shown as green (**A1**, **B1**, **C1** and **D1**) and red (**A2**, **B2**, **C2** and **D2**) signals, respectively, and the merged signals are yellow (**A3**, **B3**, **C3** and **D3**). The arrowheads in **C3** show the slow-MHC-positive atrophic myofibers that did not express ARPP. Original magnification  $\times 200$ .

*Myotubular Myopathy.* All 3 specimens were ARPP positive and exhibited characteristic morphological features of markedly atrophic myofibers with centrally placed nuclei. Similarly to normal control muscle, ARPP-positive and negative myofibers were randomly admixed (fig. 2C and D). Both the proportions of ARPP-positive myofibers and the ARPP expression level of each myofi-

ber were higher than those observed with the other subtypes of congenital myopathy (cases 5–7 in table 1).

*Central Core Disease.* In 1 patient (case 9; fig. 2E and F), ARPP-positive and negative fibers were arranged in a checkerboard-like pattern similar to that of normal muscle. But, in the other 2, almost all the fibers were positively immunostained and their expression levels were relative-