

201024164A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

メタボローム解析による筋型糖原病の画期的な  
診断スクリーニング法の確立と治療推進の研究

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 杉江 秀夫

平成23（2011）年5月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

メタボローム解析による筋型糖原病の画期的な  
診断スクリーニング法の確立と治療推進の研究

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 杉江 秀夫

平成23（2011）年5月

## 目次

|      |   |     |
|------|---|-----|
| I.   | 総括研究報告  |     |
|      | メタボローム解析による筋型糖原病の<br>画期的な診断スクリーニング法の確立<br>と治療推進の研究<br>杉江 秀夫 | 1   |
|      | (資料1) 班員名簿  | 1 4 |
|      | (資料2) 筋型糖原病の種類  | 1 5 |
|      | (資料3) 嫌気性解糖系の代謝マップ  | 1 6 |
|      | (資料4) 我が国における糖原病の診断例の病型分布                                   | 1 7 |
|      | (資料5) 糖原病の診断検査  | 1 8 |
| II.  | 研究成果の刊行に関する一覧表  | 2 5 |
| III. | 研究成果の刊行物・別刷   | 2 7 |



# I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患研究克服事業）  
総括研究報告書

メタボローム解析による筋型糖原病の画期的な診断スクリーニング法の  
確立と治療推進の研究

研究代表者 杉江 秀夫 自治医科大学小児科学・教授

### 研究要旨

本研究では筋型糖原病の画期的な診断法の開発と病態の解明を目指している。そのブレークスルーとして、細胞のメタボロームを網羅的に解析する手法に注目し、筋型糖原病の生検筋への応用を試みた。既知の筋型糖原病（糖原病II、III、V、VII型及びphosphoglycerate kinase:PGK欠損症）の生検筋を病的コントロールとしてメタボローム解析を行った。それぞれの糖原病病型でメタボロームの蓄積パターンに特徴があり、その蓄積パターンにより欠損酵素に一致した病型診断が可能であることを示した（Fukuda T, Sugie H et al. Acta Myol, 2010）。

さらに本方法を適用することで、嫌気性解糖系とは別のエネルギー代謝過程のメタボロームとしてTCAサイクル、脂肪代謝系のメタボロームも同様に同定できる事が判明し、未解明な症例の病態解明や筋型糖原病の病態評価に応用が期待できる。遺伝性代謝異常症の治療は、遺伝子治療が究極の方法である。しかしメタボロームの解析により病態解明が進めば、病態を考慮した治療として、前駆物質の制限（restriction）、蓄積物質の除去（removal）、補充療法（replacement）、残存酵素活性の増強(reinforcement)が理論的に考えられる。

### 研究分担者氏名・所属研究機関名及び 所属研究機関における職名

西野 一三・国立精神・神経医療研究  
センター、神経研究所、  
疾病研究第一部 部長  
福田冬季子・自治医科大学小児科  
講師

（ATP）を必要とする。ATP 産生はグリコーゲン代謝系、脂肪酸代謝系、カルニチンサイクル、アミノ酸代謝などの生体内代謝機構により供給されている。代謝性ミオパチーはこれらの代謝機構にかかわる酵素あるいは物質の先天的な欠損により、ATP 供給が障害を受け、筋硬直、筋力低下、筋痛、横紋筋融解症など発症する場合を指す。そのなかで筋型糖原病はグリコーゲン代謝異常に起因する代謝性ミオパチーで、現在 12 病型が報告されて

### A. 研究目的

筋の収縮、あるいは筋細胞のホメオスターシス維持にはアデノシン3 磷酸

いる（資料1）。

従来筋型糖原病の治療法は主に食事療法が主体であったが、筋型糖原病の代謝病態がしだいに明らかになるにつれ、病態に応じた治療が考案され成果を上げつつある。その最も重要な進歩は糖原病II型（Pompe病）に対する酵素補充療法である。わが国でもすでに全国で50例近くがこの補充療法を受けているが、いまだに診断がなされていないためにこの治療法の恩恵にあずかれない患者も存在している。

筋型糖原病の診断は主に生検筋による酵素診断、あるいは遺伝子解析による。これらの解析は時間がかかること、比較的多くの試料量が必要であること、一斉分析というよりも個々の酵素を個別に測定するという方法が主体であり、早期診断、多数の患者のスクリーニングができないという点でハイスループットな分析とは言えない。

今までに我々が行った約1000例における分析では、代謝性ミオパチーが疑われた症例のうち約70%の症例で原因が同定できなかった。この原因を考察すると、

- (1) 生理的範囲を超えた負荷であったためであって、元々代謝異常は存在しない
- (2) 検索した以外の酵素異常症の存在
- (3) 複合的な代謝異常があり、解糖障害を引き起こしている。

等の可能性が考えられる。

70%の原因不明症例の解明には、従

来の個々の酵素活性測定あるいは物質の測定では不可能で、in vivoでのダイナミックな代謝過程を検証できる方法が必要である。

近年様々な生体試料を用いた網羅的なメタボロームの解析は疾患の病態を検索する上で、その有用性が報告されている。我々はCE-TOFMSを用いた筋型糖原病の生検筋のメタボローム解析を行い、診断の有用性と病態の解明を試み、従来原因不明の症例に適用できないか検討した。

## B. 研究方法

対象は酵素診断で確定した既知の筋型糖原病で糖原病II型；Pompe病（4例）、糖原病III型；Cori病（3例）、糖原病V型；McArdle病（3例）、糖原病VII型；Tarui病（2例）、糖原病IX型；phosphoglycerate kinase (PGK)欠損症（2例）の生検筋約10mgを用いた。

正常対照として、血清CKが正常で、筋組織学的に異常を認めない生検筋5例を選択して使用した。また前腕運動負荷試験による継時的な血液材料もメタボローム解析の対象とし、生検筋以外の材料による試料での分析の可能性を検索した。生検筋は前処理として内部標準物質50  $\mu\text{M}$  を含んだ500  $\mu\text{L}$  のメタノール溶液を破砕用チューブに入れ、液体窒素により凍結し、ビーズ式細胞破砕装置（トミー精工、MS-100R）を用いて破砕（4,000 rpm, 60秒  $\times$  5回）した。これに500  $\mu\text{L}$  のクロロホルム及び200  $\mu\text{L}$  のMilli-Q水を加え攪拌し、遠心分離（2,300  $\times$  g,

4°C, 5 分) を行った。遠心分離後、水相を限外ろ過チューブ (MILLIPORE, ウルトラフリーMC PBCC 遠心式フィルターユニット 5 KDa) に200 µL × 2 本移し取った。これを遠心分離 (9,100 × g, 4°C, 120 分) し、限外ろ過処理を行った。ろ液を乾固させ、再び25 µLのMilli-Q 水に溶解して測定に供した。

Agilent CE-TOFMS system (Agilent Technologies 社) CE-TOFMS で検出されたピークは、自動積分ソフトウェアのMasterHands ver.1.0.6.12 (慶應義塾大学開発) を用いて自動抽出し、ピーク情報として質量電荷比 ( $m/z$ )、泳動時間 (Migration time: MT) とピーク面積値を得た。得られたピーク面積値は下記の式を用いて

相対面積値に変換した。相対面積値 = 目的ピークの面積値 ÷ 内部標準物質の面積値 × 試料重量 (mg)

解糖系、pentose monophosphate shunt (PMP) 及びTCA 回路の中間体54 物質について定量解析を行った。検量線は内部標準物質により補正したピーク面積を用い、各物質について100 µM の一点検量 (内部標準物質200µM) として濃度を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究は自治医科大学倫理委員会 (遺07-29) の承認のもと行われている。

### C. 研究結果

筋型糖原病における筋メタボローム解析:

1. CE-TOFMS により Glycolysis の

メタボライト 10 種類、TCA cycle のメタボライト 8 種類、PMP のメタボライト 4 種類が同定できた (図 1)。

2. 糖原病 II 型、III 型、V 型、VII 型、phosphoglycerate kinase 欠損症における解糖系メタボロームの結果を示す (図 2、3、4、5)。

糖原病 II 型は嫌気解糖の経路とは異なるリソゾームでのグリコーゲン分解の異常で、今回のメタボロームの分析では IIa、IIb ともに特異な蓄積パターンは認めなかった (図 2)。

グリコーゲンの直接分解にかかわる III 型 (脱分枝酵素欠損症)、V 型 (McArdle 病) では解糖中間体の基質はすべて著明な減少を示す事が特徴であった。

糖原病 VII (Tarui 病) では解糖中間体の F-6-P より上流の基質の蓄積が見られるが、FDP より下流の中間体は枯渇しており、本疾患では F-6-P と FDP の間で解糖の障害が発生していることが推定でき、この責任酵素は

phosphofructokinase である事から、Tarui 病と診断できた。PGK 欠損症では 3-P-glyceroyl-phosphate より上流の基質が増加し、3-phosphoglycerate より下流で基質の枯渇を認め、責任酵素である PGK 欠損症と診断できた。

3. 前腕運動試験で得られた継時的な試料について、解糖中間体を含むメタボロームを測定した。G-1-P、

G-6-P、F-6-P、FDP、3PGA、2PGA、ピルビン酸、乳酸が同定できた。正常個体では4分後に2.5倍以上の乳酸の増加が認められた。

#### D. 考察

筋型糖原病の診断は酵素診断が主流であるが、遺伝子診断が登場してからは酵素診断を行う研究室が減少し、酵素診断が将来も安定して機能するかどうか危惧されている。つまり筋型糖原病の診断は従来生検筋を用いた、筋組織化学、電顕、筋生化学により診断をされていた。特に酵素活性を測定する筋生化学検査は、診断には欠かせない。しかしながら筋型糖原病は現在12種類あり、個々の酵素活性を測定するには多くの試料が必要であることと、非常に時間がかかる手技が必要であった。またそれでもなお70%の症例で原因が判明しないという事実は、現状の診断方法の限界を示している。この状況を解決するブレイクスルーとして今回筋細胞内の代謝物を網羅的に解析するメタボローム解析を応用した。これにより、筋型糖原病の病型診断の可能性とともに、筋型糖原病の新たな代謝病態を解明することが可能となると思われた。問題として本方法は酵素診断のような直接診断ではなく間接的な化学診断であるという事である。有機酸異常症ではやはり尿中有機酸を分析する化学診断で多くの症例を診断している事から、本方法の有用性を検証するには今後より多くの症例における検索の蓄積が必要

であると思われた。

メタボロームの分析で網羅的に代謝物をスクリーニングすることは、診断においても、病態をみるうえでも有用である。

#### E. 結論。

網羅的に筋細胞内のメタボロームを分析する手法は、筋型糖原病の診断のみならず、筋型糖原病におこっている代謝病態の解析によい手段である。

また遺伝性代謝異常症の治療は、遺伝子治療が究極の方法である。しかし近年の病態解明の進歩により、病態を考慮した治療として、前駆物質の制限(restriction)、蓄積物質の除去(removal)、補充療法(replacement)、残存酵素活性の増強(reinforcement)が用いられ成果を挙げている。現状では最も安全で現実的な治療法であり、今後も治療の潮流と考えられる。

本研究は筋型糖原病を効率よく診断する画期的な診断法の開発であり、この方法が実現することにより、少量の生検筋試料からあるいはより侵襲の少ない血液試料から筋型糖原病の診断ができることから、患者の治療、医学的対応に早期に関わることができ、患者のQOLの改善には有効である。本研究でその実用化が検証できれば、他の多くの代謝性疾患への応用の波及も期待でき、さまざまな治療戦略への道が開けることは、国民の医療・福祉の上に大きく寄与する。

#### F. 健康危険情報



特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 福田冬季子、杉江秀夫：【必携 小児の薬の使い方】疾患に対する薬剤の選び方・使い方と注意 神経筋疾患 ギラン・バレー症候群。小児内科 42 巻増刊 551-553、2010
2. 福田冬季子、杉江秀夫：【先天代謝異常症を見逃さない】診断へのアプローチ 臨床症状 筋力低下、運動不耐。小児内科 42(7):1115-1117、2010.
3. 門田行史(自治医科大学 小児科学教室)、山形崇倫、福田冬季子、森雅人、杉江秀夫、桃井真里子：欠神てんかんに複雑部分発作を合併した 1 例。小児科臨床 63(2):265-270、2010.
4. 福田冬季子：代謝性ミオパチー。小児科臨床 63(9):1907-1912、2010.
5. 福田冬季子：Pompe 病の酵素補充療法。小児科 51 (6) : 811-815、2010.
6. 福田冬季子：【小児の治療指針】代謝 ライソゾーム病 Pompe 病(糖原病 II 型) . 小児科診療 73 巻 (増刊) : 513-514、2010.
7. 福田冬季子：Pompe 病(糖原病 II 型)における酵素補充療法とその効果に関与する病態研究の進歩：Pompe 病骨格筋における autophagy 脳と発達 42 (2) : 114-116、2010.
8. 西野一三：各種難病の最新治療情報 遠位型ミオパチーの治療法開発 難病と在宅ケア 16(4) :50-53、2010.
9. 圓谷理恵、西野一三：小児難病を知る； 先天性ミオパチー。Journal of Clinical Rehabilitation 19 (7) : 687-690、2010.
10. 西野一三：自己貪食空胞性ミオパチーの病態解明と治療法開発 臨床神経学 50 (1) : 1-6、2010
11. 西野一三：各種疾患 筋肉疾患 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーの治療法開発 Annual Review 神経 pp243-250、2010
12. 臨床神経学 50 (1) : 1-6、2010
13. Fukuda T, Sugie H, Sugie Y: Quantitative metabolome profiling of biopsied muscle in the patients with glycogen storage diseases using capillary electrophoresis mass spectroscopy. Acta Myol, XII ICNMD Proceeding 183, 2010
14. Mizuochi T, Kimura A, Nishiura H, Inomata Y, Okajima H, Sugie H, Mitsubuchi H, Yagi M, Kage M.: Liver biopsy is an important procedure in the diagnosis of glycogen storage disease type IV. Pediatr Int. 53(1):129-30.,2011
15. Ogawa A, Ogawa E, Yamamoto S, Fukuda T, Sugie H, Kohno Y.: Case of glycogen storage disease type VI (phosphorylase deficiency) complicated by focal nodular

- hyperplasia. *Pediatr Int.* 52(3):150-3.. 2010
16. Sugie Y, Sugie H, Fukuda T, Osawa J.: Study of HOXD genes in autism particularly regarding the ratio of second to fourth digit length. *Brain Dev.* 32(5):356-61, 2010.
  17. Malicdan MC, Noguchi S, Nishino I: A preclinical trial of sialic acid metabolites on distal myopathy with rimmed vacuoles/hereditary inclusion body myopathy, a sugar-deficient myopathy: a review. *Ther Adv Neurol Disord.* 3(2):127-35, 2010
  18. Tominaga K, Hayashi YK, Goto K, Minami N, Noguchi S, Nonaka I, Miki T, Nishino I.: Congenital myotonic dystrophy can show congenital fiber type disproportion pathology. *Acta Neuropathol* 119(4):481-6, 2010
  19. Liang WC, Nishino I.:Lipid storage myopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 11(1):97-103, 2011
- 2 学会発表  
学会発表
1. 杉江陽子、杉江秀夫ら：自閉症スペクトル障害における出生時の両親年齢および出生順位の検討。第 52 回日本小児神経学会総会。福岡 2010.5 月
  2. 森雅人，松本歩，福田冬季子，根本健二，村井弘通，武田いづみ，山形崇倫，桃井真里子，杉江秀夫：14 番環状染色体症候群の 2 例 第 44 回日本てんかん学会 岡山 2010 年 10 月
  3. 長嶋雅子(自治医科大学 小児科)，山形崇倫，柚木佐与，森雅人，杉江秀夫，桃井真里子，五味玲，渡辺英寿：嗅覚刺激で複雑部分発作が誘発された側頭葉腫瘍例 第 44 回日本てんかん学会 岡山 2010 年 10 月
  4. Fukuda T, Sugie H, Sugie Y. : Quantitative metabolome profiling of biopsied muscle in the patients with glycogen storage diseases using capillary electrophoresis mass spectroscopy. XII International Congress on Neuromuscular Diseases. Naples, Italy July 17-22, 2010
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

| 病型       | glycogen<br>蓄積 | gene<br>symbol | chromosome    | 症状       | 欠損酵素                         |
|----------|----------------|----------------|---------------|----------|------------------------------|
| Oa       | -              | GY52           | 12p12.2       | 肝        | glycogen synthase(liver)     |
| Ob*      | -              | GY51           | 19q13.3       | 肝筋       | glycogen synthase(muscle)    |
| Ia       | +++            | G6PC           | _17q21.31     | 肝        | glucose-6-P-ase              |
| Ib       | +++            | SLC37A4        | 11q23.3       | 肝        | glucose -6-P-ase transporter |
| II*      | +++            | GAA            | 17q25.3       | 肝、筋、心    | acid maltase                 |
| IIla*    | +++            | AGL            | 1p21          | 肝、筋、心    | Debrancher enzyme            |
| IIlb     |                | AGL            |               | 肝        |                              |
| IV       | ++             | GBE1           | 3p12.3        | 肝 + 全身臓器 | Brancher enzyme              |
| V*       | +              | PYGM           | 11q13.1       | 筋        | Phosphorylase(muscle)        |
| VI       | ++             | PYGL           | 14q21.2       | 肝        | Phosphorylase(liver)         |
| VII*     | +              | PFKM           | 12q13.11      | 筋、赤血球    | Phosphofruktokinase          |
| VIII/IX* | +              | PHKA2          | Xp22.13       | 筋、肝、筋    | Phosphorylase kinase         |
| PGK*     | +~±            | PGK1           | Xq21.1        | 筋が主      | Phosphoglyverate kinase      |
| X*       | +~±            | PGAM2          | 7p13          | 筋        | Phosphoglycerate mutase      |
| XI*      | +~±            | LDHA           | 11p15.1-p14.3 | 筋        | LDH-A                        |
| XII*     | +~±            | ALDOA          | 16q22.2       | 筋、赤血球    | aldolase-A                   |
| XIII*    | +~±            | ENOS           | 17p13.2       | 筋        | β-enolase                    |

表 1 . グリコーゲン代謝異常症  
( \*筋型糖原病 )

[ ]

今回同定された代謝物

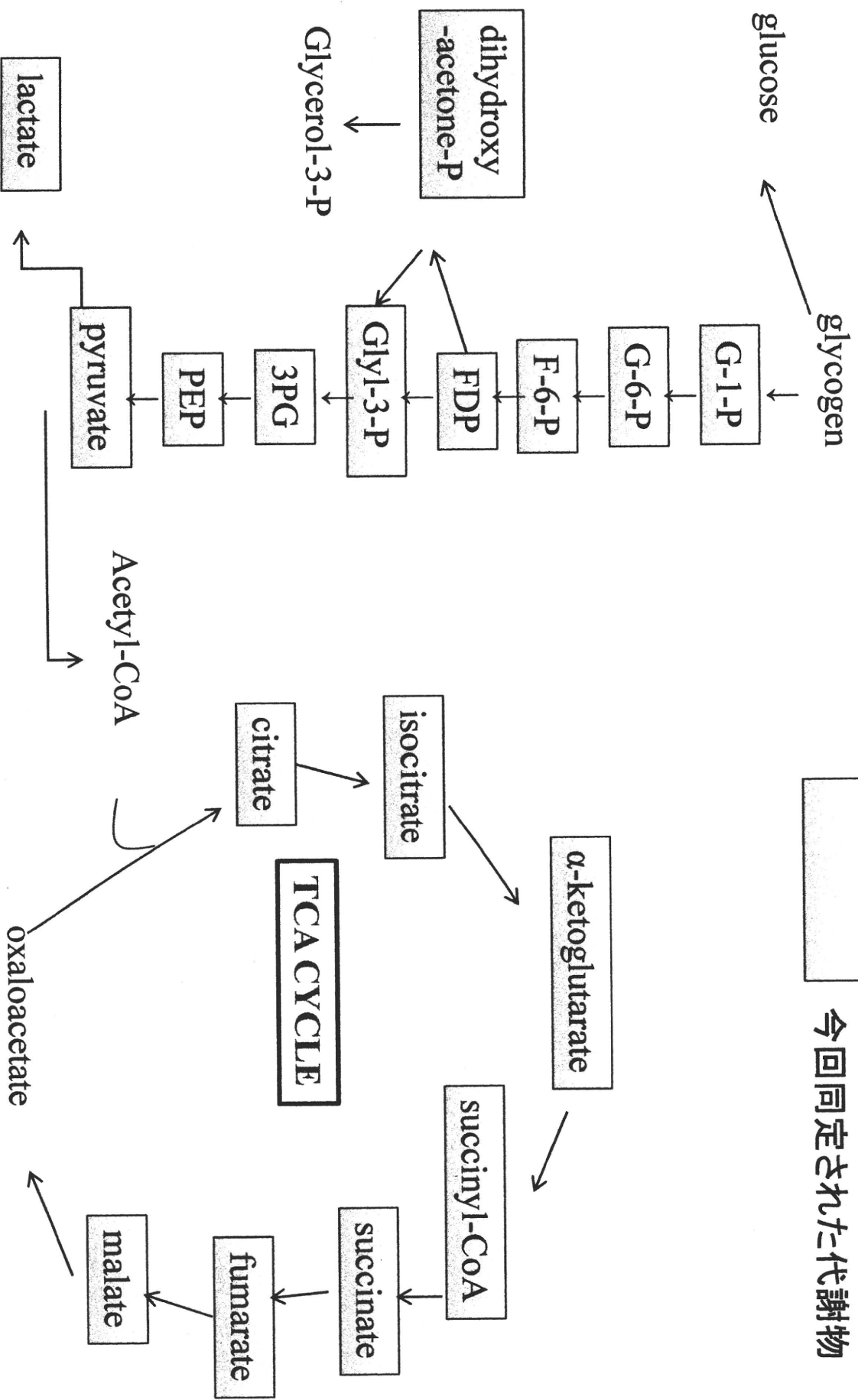


図1. 同定できたメタボローム

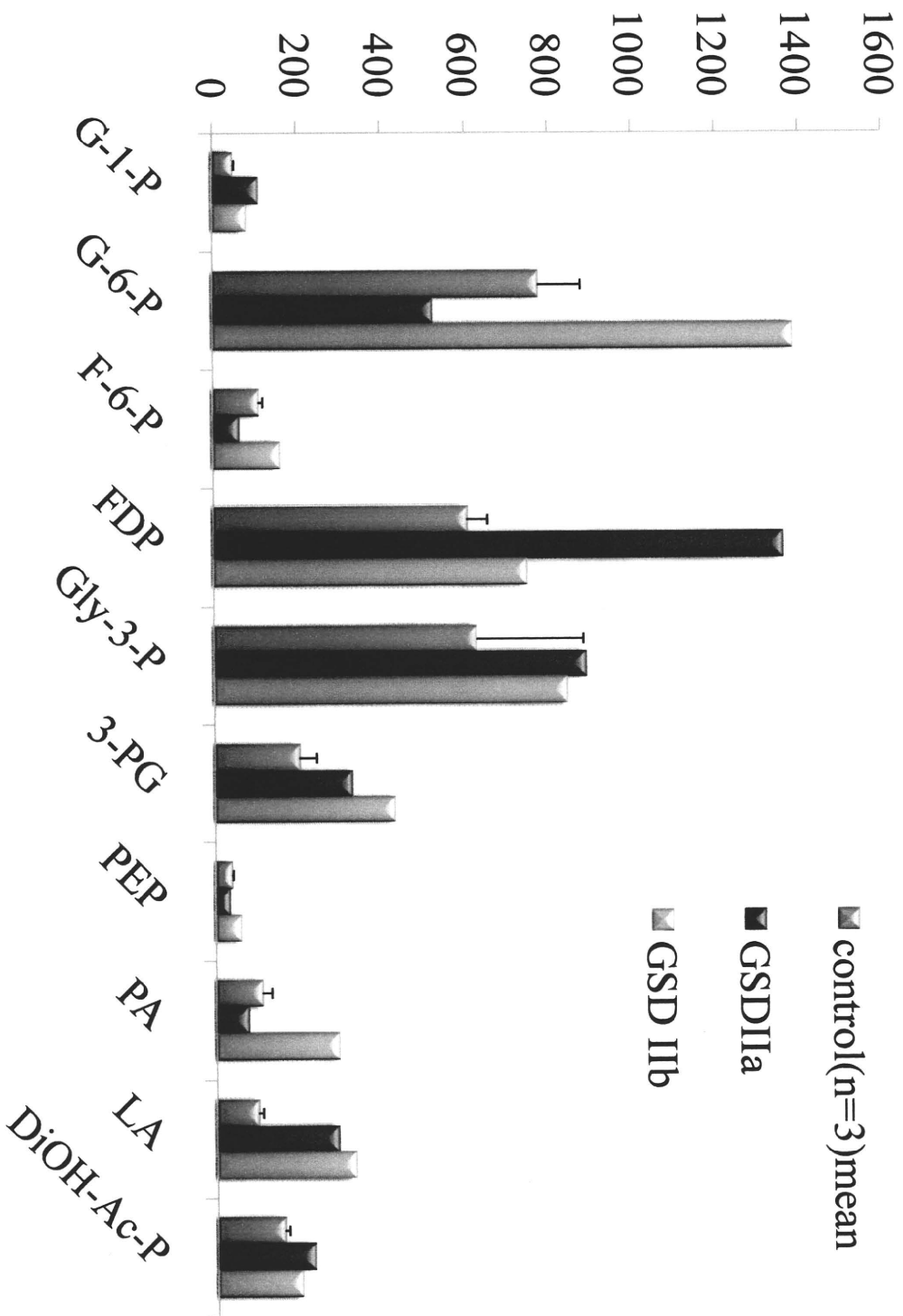


図2. 糖原病II型(Pompe病)のメタボローム



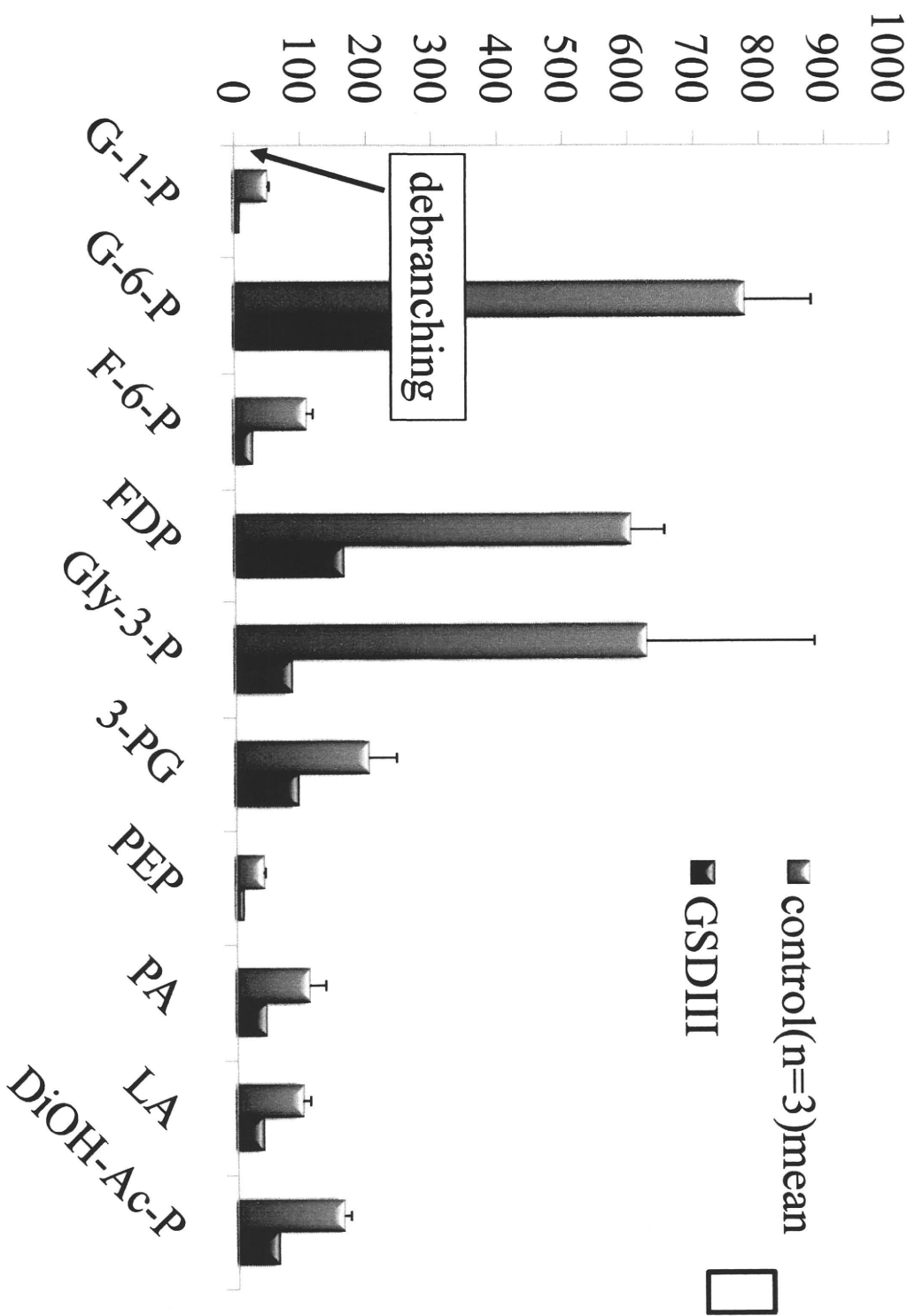


图3. 糖原病III型(脱分枝酵素欠損症)

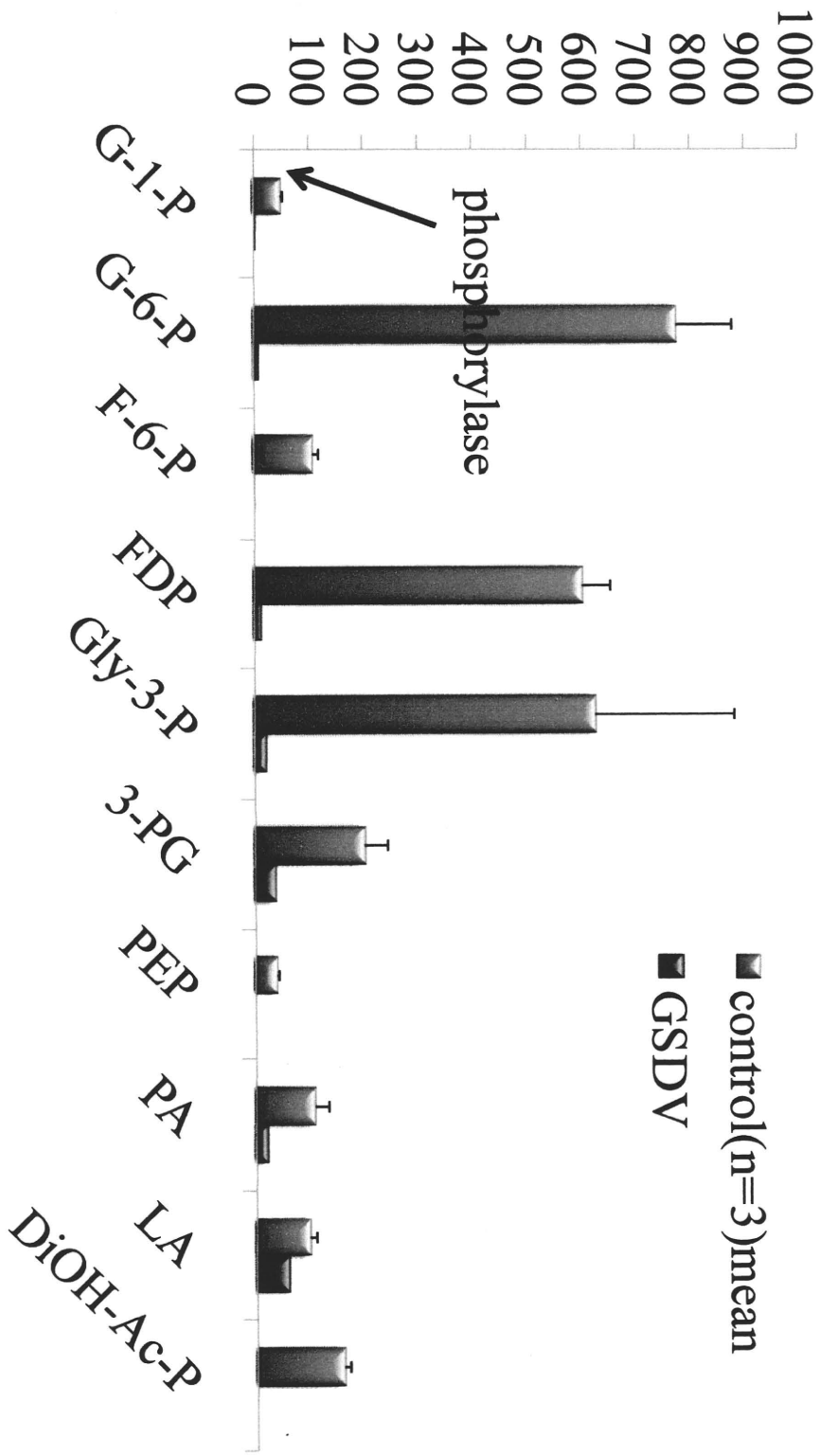


图4. 糖原病V型(McArdle病)のメタボローム

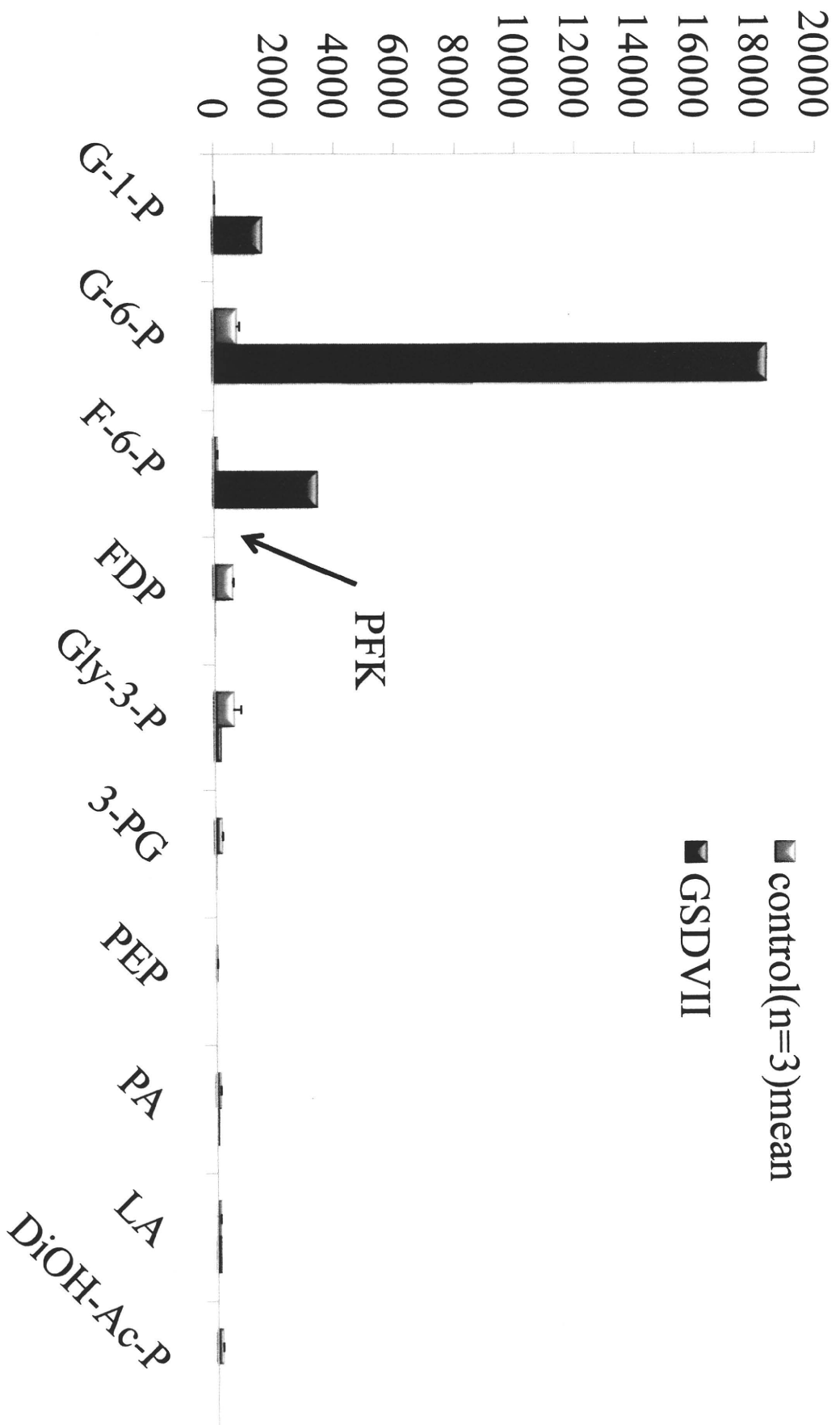


図5. 糖原病VII型(Tarui病)のメタボローム

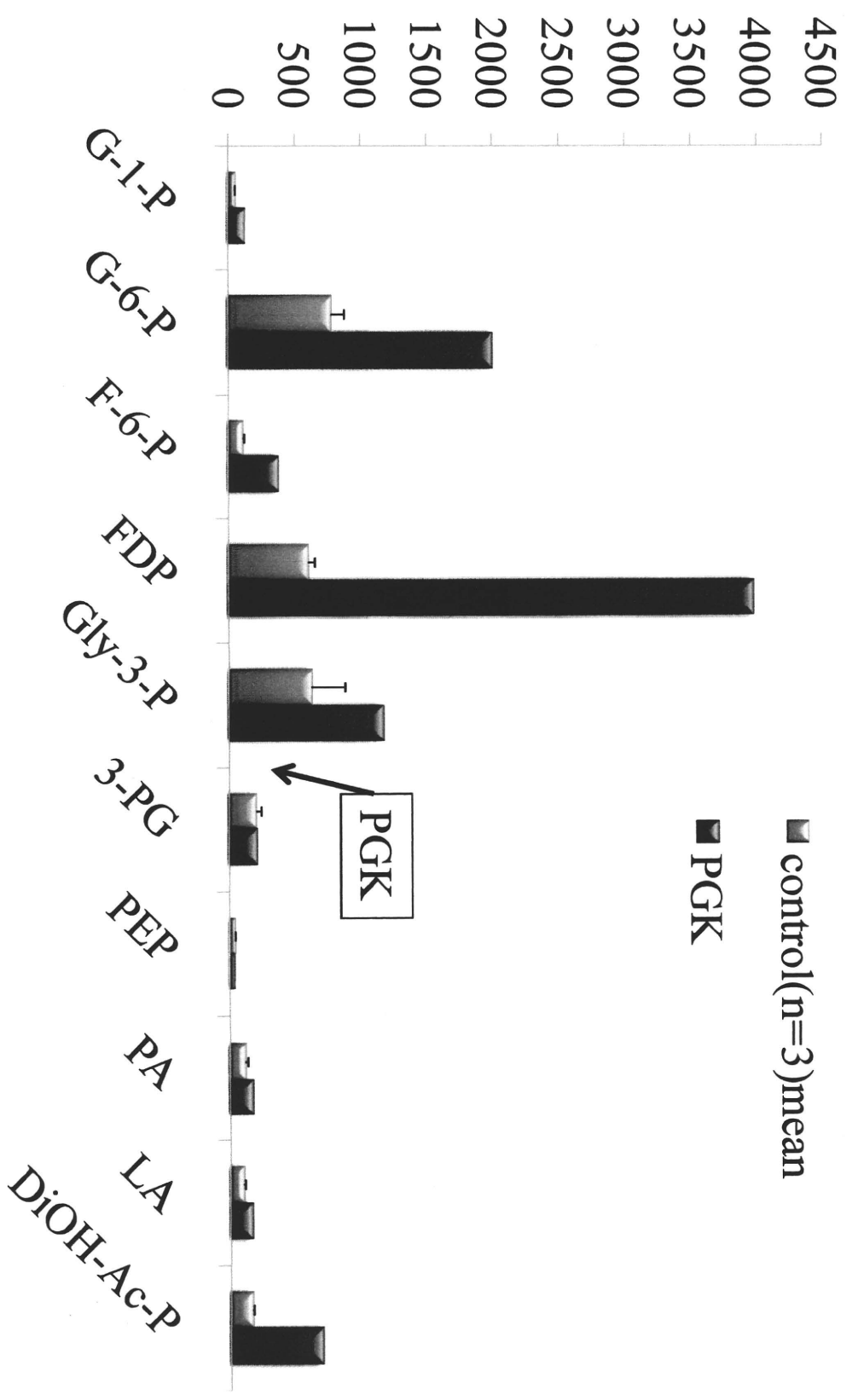


図6. Phosphoglycerate kinase 欠損症のメタボローム

資 料



資料 1

班員名簿

班員名簿

| 区分    | 氏名     | 所属等                                | 職名   |
|-------|--------|------------------------------------|------|
| 研究代表者 | 杉江 秀夫  | 自治医科大学小児科                          | 教授   |
| 研究分担者 | 西野 一三  | 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター、神経研究所疾病研究第一部 | 部長   |
| 研究分担者 | 福田 冬季子 | 自治医科大学小児科                          | 講師   |
| 研究協力者 | 杉江 陽子  | 浜松医科大学小児科                          | 臨床教授 |
| 研究協力者 | 長嶋 雅子  | 自治医科大学小児科                          | 臨床助教 |

資料 2

筋型糖原病の種類

| 病型         | 欠損酵素                     | 遺伝子          | Enzyme ID                | 酵素診断可能組織       |
|------------|--------------------------|--------------|--------------------------|----------------|
| 糖原病 0b 型   | Muscle glycogen synthase | <i>GYS1</i>  | 2.4.1.11                 | 筋、恐らく他の臓器でも測定可 |
| 糖原病 II 型   | Acid maltase             | <i>GAA</i>   | 3.2.1.20                 | リンパ球、線維芽細胞、筋   |
| 糖原病 III 型  | Debranching enzyme       | <i>AGL</i>   | 2.4.1.25,3.2.1.33        | 筋、肝臓、白血球、赤血球   |
| 糖原病 IV 型   | Branching enzyme         | <i>GBE1</i>  | 2.4.1.18                 | 赤血球、肝臓         |
| 糖原病 V 型    | Muscle phosphorylase     | <i>PYGM</i>  | 2.4.1.1                  | 筋              |
| 糖原病 VII 型  | phosphofruktokinase      | <i>PFKM</i>  | 2.7.1.11                 | 筋、赤血球？         |
| 糖原病 VIII 型 | Phosphorylase kinase     | <i>PHKB</i>  | 2.7.1.38                 | 筋              |
| 糖原病 IX 型   | Phosphoglycerate kinase  | <i>PGKI</i>  | 2.7.2.3                  | 赤血球、白血球、筋      |
| 糖原病 X 型    | Phosphoglycerate mutase  | <i>PGAM2</i> | 5.4.2.1,3.1.3.13,5.4.2.4 | 筋              |
| 糖原病 XI 型   | Lactate dehydrogenase-A  | <i>LDHA</i>  | 1.1.1.27                 | 筋、血清（電気泳動パターン） |
| 糖原病 XII 型  | Aldolase-A               | <i>ALDOA</i> | 4.1.2.13                 | 赤血球、筋          |
| 糖原病 XIII 型 | $\beta$ -enolase         | <i>ENO3</i>  | 4.2.1.11                 | 筋              |