

CRIM 陽性例において有意に心機能，運動機能が改善し，rhGAA に対する IgG 抗体は陰性例でより早期，より高力価，より長期に産生されている．外因性の蛋白に対する抗体産生が予後に影響を及ぼしていると考えられる．

世界的には乳児型 Pompe 病の約 20% が CRIM 陰性と推測される．免疫寛容を促し，CRIM 陰性における治療効果を改善する方法が現在検討されている．

## おわりに

希少疾患である Pompe 病に待望の酵素補充療法が導入され，本稿に記述したとおりさまざまな治療効果が得られている．一方で，CRIM 陰性例における免疫反応など新たな課題が浮き彫りにされている．今後，残存する症状や，酵素補充療法により新たに生じた課題に対するさらなる治療法の進歩が待たれている．

## 文献

- 1) Fukuda T et al : Acid alpha-glucosidase deficiency (Pompe disease). *Curr Neurol Neurosci Rep* 2007 ; 7 : 71-77
- 2) Tajima Y et al : Structural and biochemical studies on Pompe disease and a "pseudodeficiency of acid alpha-glucosidase". *J Hum Genet* 2007 ; 52 : 898-906
- 3) Kishnani PS et al : Recombinant human acid-glucosidase : major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease. *Neurology* 2007 ; 68 : 99-109
- 4) van der Ploeg ACP et al : Results from a randomized, double-blind multicenter, multinational, placebo-controlled study of the safety and efficacy of Myozyme, recombinant human acid alpha glucosidase (rhGAA), for the treatment of Pompe disease in juveniles and adults [abstract], in 60th Annual Meeting of the American Academy of Neurology, Chicago, Illinois, 2008
- 5) Kishnani PS et al : Cross-reactive immunologic material status affects treatment outcomes in Pompe disease infants. *Mol Genet Metab* 2010 ; 99 : 26-33

## 特集 第51回日本小児神経学会総会

## シンポジウムⅠ：遺伝性神経・筋疾患—診断と治療の最前線

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” —より良好な治療効果を目指して

福 田 冬季子

**要旨** Pompe 病は、グリコーゲンを分解するリソゾーム酵素、acid  $\alpha$ -glucosidase の欠損症であり、肥大型心筋症とミオパチーを主症状とする。乳児型および遅発型（小児型・成人型）に分類され、乳児型は肥大型心筋症により、遅発型は呼吸不全により生命が脅かされる。Pompe 病に対し酵素補充療法が導入され、心筋肥厚の改善により乳児型の生命予後が改善されたが、骨格筋症状への効果は症例により様々である。基礎研究により、骨格筋の治療抵抗性と進行性の骨格筋破壊に“autophagy”の機能不全が関与していることが示唆された。治療後に残存する症状により、今後解決すべき課題が浮き彫りにされ、治療の一層の進歩が望まれている。

**見出し語** Pompe 病、糖原病Ⅱ型、autophagy、肢帯型筋ジストロフィー、リソゾーム病

## はじめに

Pompe 病（糖原病Ⅱ型）はリソゾーム内のグリコーゲンを分解する acid  $\alpha$ -glucosidase (GAA) (別名 acid maltase) 欠損症<sup>1)</sup>で、様々な組織のリソゾーム内に過剰なグリコーゲンが蓄積する常染色体劣性遺伝性疾患である。発症頻度は 1:40,000<sup>2)</sup>と推定されるまれな疾患であり、臨床的に主に心筋、骨格筋を侵し、肥大型心筋症およびミオパチーを呈する。完全酵素欠損症である乳児型 Pompe 病は、全身の著明な筋緊張低下、筋力低下および心肥大を呈し、多くは心不全および呼吸不全により 1 歳未満に死亡する<sup>3)</sup>。また、残存酵素活性を有する遅発型 Pompe 病（小児型・成人型）では、通常心筋は侵されないが、近位筋優位のミオパチーが緩徐に進行し、横隔膜罹患のために呼吸不全を来し、死にいたる<sup>4,5)</sup>。

生命を脅かす Pompe 病に対し、根本的な治療が待ち望まれていたが、欧米では 2006 年、日本では 2007 年に CHO cell が産生する recombinant human GAA (rhGAA,  $\alpha$ glucosidase alpha) による酵素補充療法が承認された。心筋に対する酵素補充療法の効果は良好であり、乳児型の生命予後を著しく改善しているが、骨格筋に対する効果は様々である。

Pompe 病における骨格筋の治療抵抗性と進行性の骨格筋破壊のメカニズムの解明を目的に、我々はモデルマウスを用いて基礎研究を行い、骨格筋の治療抵抗性と骨格筋破壊の進行に対し、骨格筋内の二次的な病態“lysosomal-autophagic pathway の機能不全”の関与を示唆する知見を得た。

本稿では、Pompe 病の臨床症状と酵素補充療法の効果、および酵素補充療法の効果に影響を与える Pompe 病の二次的な病態について記述する。新しく導入された酵素補充療法の経験は、臨床医や研究者に新たに明確にすべき多くの課題を与えており、さらなる治療法の進歩が期待されている。

## I Pompe 病のスペクトラム

Pompe 病では臨床症状の発現時期、主体となる臨床症状や臨床経過は残存酵素活性と関連する。発症時期から乳児型（古典型）と小児型および成人型に分類される。乳児型は完全酵素欠損症で、心筋と骨格筋が主な罹患臓器であり、自然経過において、多くは 1 歳未満に死亡する。一方、小児型と成人型は、あわせて遅発型と称され、残存酵素活性（正常の 40%未満）を有し、緩徐進行性の近位筋優位のミオパチーを呈し、心筋は侵されないことが多い。呼吸筋症状も重要であり、他のミオパチーと異なり、四肢筋の筋力低下に比し呼吸筋症状が優位なことが多い。

骨格筋病理においては、乳児型ではグリコーゲンの過剰な蓄積によりリソゾームが拡大し、多数の空胞を認める典型的な“vacuolar myopathy”の像を示すが、小児型では空胞は比較的少なく、遅発型では空胞がほとんど見られない症例もある。

自治医科大学とちぎ子ども医療センター小児科

連絡先 〒 329-0498 下野市薬師寺 3311-1

自治医科大学とちぎ子ども医療センター小児科

(福田冬季子)

E-mail: toki-fukuda (a) jichi.ac.jp

(受付日: 2009. 9. 30)

Pompe 病は臨床症状および病理所見において幅広いスペクトラムを示すが、すべての症例でミオパチーは重要な症状である。酵素補充療法が導入された現在、Pompe 病は treatable myopathy として広く認識されるようになってきている。

## II 酵素補充療法の効果

日本では現在約 60 人の Pompe 病患者が酵素補充治療を受けていると推測される。

酵素補充療法では、本来ゴルジ体で産生される GAA の precursor を経静脈的に投与する。投与された GAA precursor は細胞表面で mannose-6-phosphate receptor に結合し細胞内に取り込まれ、endocytosis によって、エンドソームを経由し標的小器官であるリソゾームまで運搬<sup>8)</sup>され、酵素の processing により成熟型<sup>9)</sup>となる。

酵素補充療法の臨床試験<sup>10)</sup>の結果、呼吸不全がない状態で生後 6 カ月までに酵素補充 (1 回/2 週間, 20 mg/kg/回または 40 mg/kg/回) を開始した乳児型 Pompe 病では、生後 18 カ月の生存率が 1.9% から 100% に改善され、生命予後が著明に改善された。心筋肥厚は全例で改善し、left ventricular mass index (LVMI) の Z スコアは 52 週後に 7.1 から 3.3 に低下し、心筋に対する効果は良好である。一方、骨格筋に対する酵素補充療法の効果は、乳児型における治療開始後 52 週の効果では、18 人中歩行可能は 7 人、支持歩行可能および座位可能がそれぞれ 3 人だが、運動機能の改善がない症例が 5 人存在している。骨格筋症状が主症状である遅発型 Pompe 病では、18 カ月の治療後、6 分間歩行距離の有意な延長 (平均 30 m の延長) や、%予想努力性肺活量 (%FVC) の 1% 上昇 (プラセボ群では 3% 減少) が報告され、骨格筋および呼吸障害に関しては進行を阻止する効果が期待されるにとどまっている。

酵素補充療法によって、生命予後や心機能が改善されたが、骨格筋症状への効果は限定的である可能性がある。酵素補充療法導入後、Pompe 病を確実に治療に結びつけるために、未診断例の診断 (主に肢帯型筋ジストロフィーおよび呼吸筋症状を前面に認めるミオパチー症例を対象) が行われ<sup>11)</sup>、同時に、骨格筋構造破壊が進行する以前の早期に治療を開始することが治療成績を向上させると考えられ、Pompe 病の新生児スクリーニングについても検討が続けられている。また、病態研究においては、骨格筋における治療効果を左右する病態解明の必要性が示され、モデルマウスを用いた研究を行った。

## III 酵素補充療法の効果に関与する Pompe 病の二次的な病態—“autophagy の蓄積”

GAA 酵素欠損により生じる一次的病態は“グリコーゲン蓄積によるリソゾームの拡大 (空胞化)”であることは自明の理であるが、GAA 酵素の単独欠損の結果生じる二次的な病態として、単純に“拡張したリソゾームが破裂し、リソゾームの分解酵素が細胞質内に放出されることにより、Pompe 病の骨格筋構造の破壊が進行する”という仮説はあるがエビデン

スはない。我々は酵素補充療法の成績をふまえ、骨格筋における酵素補充療法の効果を左右する病態についてモデルマウスを用いた研究を行った。

ノックアウトマウスでは、酵素補充療法による glycolytic type II 筋線維 (以下 II 型筋線維) におけるグリコーゲン蓄積の解消はわずか<sup>12)</sup>で、酵素補充療法の骨格筋への効果は限定的であった。さらに、治療抵抗性を示す II 型筋線維の中心部に、ほぼ全長にわたる autophagosome を多数含む巨大な領域 (autophagic build up) を見出した。電子顕微鏡では、autophagic build up は二重膜で囲まれた多数の空胞、すなわち autophagosome の蓄積として観察された。

“Autophagy”は、「タンパクやミトコンドリアなどの小器官を分解するためにリソゾームに運搬しリサイクルする」細胞に保存された機構である<sup>13)</sup>。飢餓状態、細胞の分化や細胞死に際し誘導され、biogenesis と degradation の均衡が保たれる。“Macroautophagy”では、二重膜が細胞質を取り囲むように形成され、二重膜構造の autophagosome が取り込んだ内容物を、autophagosome の内膜がリソゾームと fusion することによりリソゾームに運び、autophagosome およびその内容物はリソゾーム酵素により分解される。一連の経路においてリソゾームの上流に位置し、細胞に不可欠な“macroautophagy (以下 autophagy)”が Pompe マウスの II 型筋線維において過剰に蓄積していた。

Autophagosome の特異的マーカー LC3 を用いた骨格筋線維の免疫組織染色では、“autophagy”の過剰な蓄積は月齢とともに増大し、autophagic build up area を形成することが明らかとなった。生後 1 カ月の若齢で筋線維の中央に蓄積しはじめ、徐々に全長にわたる領域を形成、24 カ月の老齢では、同部位の myofibril、小胞 (リソゾーム、autophagosome など) が消失し、膜タンパクの遺残のみが見られた<sup>15)(16)</sup>。

Autophagic build up area 外の高度に拡張したリソゾームは、筋原線維の構造を乱しておらず、「拡張したリソゾームが破裂し筋構造を破壊する」という前述の仮説の正当性は明らかではなく、むしろ autophagy の過剰な蓄積が Pompe 病の進行性筋構造破壊を引き起こし、さらに治療酵素の運搬に必要な小胞を消失させ、酵素のリソゾームへの到達を不可能にすると考えられた。“Macroautophagy”にとりこまれる物質は、長い間 non-selective であると考えられていたが、近年 polyubiquitinated protein が autophagy の基質となることが判明した。Autophagy とともに、Pompe マウスの骨格筋に細胞に毒性をもつ polyubiquitinated protein が蓄積している<sup>17)</sup>ことが示され、筋組織破壊に関与すると考えられる。

モデルマウスと同様に、Pompe 病患者の骨格筋においても、autophagic build up が認められ<sup>18)</sup>、autophagic build up は Pompe 病患者の骨格筋破壊のメカニズムとして重要であると考えられる。

#### IV Pompe病の二次的な病態のメカニズムと治療の今後の課題

Pompe病骨格筋における“autophagy”の過剰な蓄積が、Pompe病の筋構造破壊に関与し、酵素補充療法の効果を妨げる病態であると考えられたため、さらにPompe病におけるautophagic build upのメカニズムの研究が進められた。

Autohagic build upがautophagyの異常な亢進であれば、autophagyを抑制することによりPompe病の予後を改善させようと考えられた。研究の結果、Western blotでautophagosomeに特異的なLC3-II (PE-conjugated form)のみでなく、可溶性のLC3-Iも増加していることから、Pompe病骨格筋におけるautophagyの亢進が証明された。同時に、autophagic build upの領域には、本来直ちにリソゾームとfusionし、消化されるべきautophagosomeのマーカーが、リソゾームのマーカーと同時に二重染色される(免疫組織染色)小胞が多数存在することから、Pompe病では“リソゾームがautophagosomeとfusionし、autophagosomeとその内容物が分解される”というautophagic-lysosomal pathwayの機能不全が同時に存在すると推測される。

さらに、骨格筋autophagyとGAAのダブルノックアウトマウスを用いた研究<sup>17)</sup>では、Pompeマウスの骨格筋のautophagyの抑制は、リソゾームのグリコーゲン量は変化させないが、Pompe病の筋症状を悪化させることが示された。Pompe病におけるautophagic build upはautophagic-lysosomal pathwayの機能不全の代償である可能性が高いため、その機能不全(autophagosomeとリソゾームの融合不全、autophagosomeの内容物を消化する機能不全)に介入する方法によってPompe病の予後が改善される可能性がある。

現在Pompe病の予後改善のために、遺伝子治療、substrate reduction therapy、chemical chaperon療法、治療酵素の改善などの研究が進行中であり、上記で想定されたautophagosomeとリソゾームの融合不全への介入の可能性も含め、combination therapyなど今後のさらなる治療の進歩が期待される。

#### 文 献

- 1) Hers HG. alpha-Glucosidase deficiency in generalized glycogen storage disease (Pompe's disease). *Biochem J* 1963; **86**:11-6.
- 2) Auzens MG, Verbiest J, Hermans MP, et al. Frequency of glycogen storage disease type II in The Netherlands: implications for diagnosis

- and genetic counselling. *Eur J Hum Genet* 1999; **7**:713-6.
- 3) Slonim AE, Bulone L, Ritz S, Goldberg T, Chen A, Mariniuk F. Identification of two subtypes of infantile acid maltase deficiency. *J Pediatr* 2000; **137**:283-5.
- 4) Kishnani PS, Howell RR. Pompe disease in infants and children. *J Pediatr* 2004; **144**:S35-43.
- 5) van den Hout HM, Hop W, van Diggelen OP, et al. The natural course of infantile Pompe's disease: 20 original cases compared with 133 cases from the literature. *Pediatrics* 2003; **112**:332-40.
- 6) Winkel LP, Hagemans ML, van Doorn PA, et al. The natural course of non-classic Pompe's disease: a review of 225 published cases. *J Neurol* 2005; **252**:875-84.
- 7) Muller-Felber W, Horvath R, Gempel K, et al. Late onset Pompe disease: clinical and neurophysiological spectrum of 38 patients including long-term follow-up in 18 patients. *Neuromuscul Disord* 2007; **17**:698-706.
- 8) Kornfeld S. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem* 1992; **61**:307-30.
- 9) Moreland RJ, Jin X, Zhang XK, et al. Lysosomal acid alpha-glucosidase consists of four different peptides processed from a single chain precursor. *J Biol Chem* 2005; **280**:6780-91.
- 10) Kishnani PS, Corzo D, Nicolino M, et al. Recombinant human acid [alpha]-glucosidase: major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease. *Neurology* 2007; **68**:99-109.
- 11) 福田冬季子, 杉江秀夫. Pompe病の酵素補充療法(Myozyme). *Annual Review 神経* 2009. 東京:中外医学社, 2009:197-202.
- 12) Raben N, Jatkar T, Lee A, et al. Glycogen stored in skeletal but not in cardiac muscle in acid alpha-glucosidase mutant (Pompe) mice is highly resistant to transgene-encoded human enzyme. *Mol Ther* 2002; **6**:601-8.
- 13) Raben N, Fukuda T, Gilbert AL, et al. Replacing acid alpha-glucosidase in Pompe disease: recombinant and transgenic enzymes are equipotent, but neither completely clears glycogen from type II muscle fibers. *Mol Ther* 2005; **11**:48-56.
- 14) Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 2005; **12** (suppl 2): 1542-52.
- 15) Fukuda T, Ewan L, Bauer M, et al. Dysfunction of endocytic and autophagic pathways in a lysosomal storage disease. *Ann Neurol* 2006; **59**:700-8.
- 16) Fukuda T, Ahearn M, Roberts A, et al. Autophagy and mistargeting of therapeutic enzyme in skeletal muscle in Pompe disease. *Mol Ther* 2006; **14**:831-9.
- 17) Raben N, Hill V, Shea L, et al. Suppression of autophagy in skeletal muscle uncovers the accumulation of ubiquitinated proteins and their potential role in muscle damage in Pompe disease. *Hum Mol Genet* 2008; **15**:3897-908.
- 18) Raben N, Takikita S, Pittis MG, et al. Deconstructing Pompe disease by analyzing single muscle fibers: to see a world in a grain of sand. *Autophagy* 2007; **3**:546-52.

## 自己貪食空胞性ミオパチーの病態解明と治療法開発

西野 一三\*

要旨：自己貪食空胞性ミオパチー (AVM) は、筋病理学的に自己貪食空胞の出現により定義される一群の遺伝性筋疾患である。歴史的にもっとも研究が進んでいる Pompe 病以外に、最近 2 つの AVM のカテゴリーが新たに認識されつつある。一つは、Danon 病を初めとする一連の筋疾患である。この筋疾患群は、特異な筋鞘膜の性質を有する自己貪食空胞 (AVSF) の出現を特徴とする。AVSF では、アセチルコリンエステラーゼをふくむ、ほぼすべての筋鞘膜蛋白質が空胞膜に発現する。Danon 病はライソゾーム膜蛋白質 LAMP-2 の原発性欠損による。興味深いことに、本疾患における AVSF の数は年齢とともに増加する。AVSF ミオパチーとしては、他に、最近 VMA21 変異によることが明らかとなった、過剰自己貪食をとまなう X 連鎖性ミオパチー (XMEA) がある。もう一方の AVM は、縁取り空胞の出現を特徴とするミオパチーである。縁取り空胞は電顕的には自己貪食空胞の集塊である。もっとも良く知られた疾患として、縁取り空胞をとまなう遠位型ミオパチー (DMRV) がある。本疾患は、欧米では遺伝性封入体ミオパチー (HIBM) と呼ばれる。DMRV はシアル酸生合成経路律速酵素遺伝子 *GNE* の変異により発症する。DMRV モデルマウスにおいては、シアル酸補充療法によりほぼ完全に筋症状を抑制することができる。このことは、シアル酸低下がミオパチーの原因であることとシアル酸補充がヒトでも有効である可能性を示唆している。現時点で原因遺伝子が明らかとなっている AVSF ミオパチーはともにライソゾーム機能異常を根本原因としている。一方、縁取り空胞は、DMRV/HIBM が低シアル化を原因としているように、ライソゾーム外の異常が根本原因であり、二次的に形成されるものである。

(臨床神経 2010;50:1-6)

Key words : 自己貪食, 遠位型ミオパチー, 遺伝性封入体ミオパチー, 縁取り空胞, シアル酸, *GNE*

## はじめに

正常骨格筋組織で自己貪食やライソゾームを見ることはほとんどないため、骨格筋では自己貪食の果たす役割は大きくないと考えられていた時代もあった。しかしながら、近年の研究により、骨格筋においても、自己貪食が重要な役割を担っていることが徐々に明らかにされてきている。実際、ある種の筋疾患は自己貪食空胞の出現を特徴とする。その内、歴史的にもっとも研究が進んでいるのが Pompe 病であるが、Pompe 病以外の筋疾患については、その原因は比較的最近まで、まったく不明であった。筋病理学的観察では、Pompe 病以外には、2 つのタイプの自己貪食空胞性ミオパチー (autophagic vacuolar myopathy : AVM) がある<sup>1,2)</sup>。一つは、筋鞘膜の性質を有する膜で覆われた自己貪食空胞 (autophagic vacuole with sarcolemmal features : AVSF) する AVM であり、Danon 病などがその代表である。もう一方は、縁取り空胞の出現を特徴とする一連の縁取り空胞性ミオパチー (rimmed vacuolar myopathy : RVM) であり、縁取り空胞をとまなう遠位型ミオパチー (distal myopathy with rimmed vacuoles : DMRV) が

その代表である。本稿では、Danon 病およびその類縁疾患と DMRV に関するこれまでの研究状況を紹介したい。

## 1. Danon 病

## a) 臨床症状

「酸性マルターゼが正常なライソゾーム性糖原病」と題して、1981 年に Danon らが報告した疾患で、その後様々な疾患名で呼ばれたが、現在は Danon 病と呼ばれている。肥大型心筋症、ミオパチー、精神遅滞臨床的三徴である<sup>3)</sup>。発端者は全例男性で、典型的には 10 歳代で心症状が出現し、30 歳代で心不全または不整脈で死亡する<sup>4)</sup>。網膜も障害されることが知られている<sup>5,6)</sup>。今のところ、根本的治療は心臓移植しかない。ミオパチーは比較的軽度なことが多いが、血中クレアチニン・キナーゼ (CK) はほぼ例外なく 1,000IU/l 程度に上昇している。精神遅滞は軽微で、約 1/3 の例は、IQ が正常範囲にある。また、ほぼすべての例で、発端者の母親も軽度な心筋障害を中年期に発症する<sup>4)</sup>。これは、X 連鎖性遺伝の可能性を強く示唆している。

\*Corresponding author: 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部 [〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1]

国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部

(受付日: 2009 年 11 月 17 日)

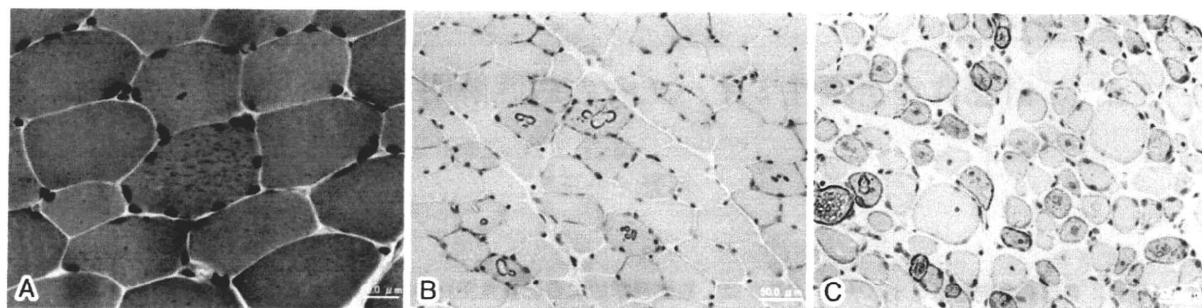


Fig. 1 Muscle pathology of Danon disease and X-linked congenital AVM.

- A. Tiny vacuoles in Danon disease look more like basophilic granules rather than vacuoles (hematoxylin and eosin).  
 B. Vacuolar membranes express acetylcholinesterase in Danon disease, showing the nature of AVSF (acetylcholinesterase stain).  
 C. AVSF can also be seen in X-linked congenital AVM (acetylcholinesterase stain)

#### b) 筋病理

筋病理では、筋線維内に小空胞をみとめることが特徴である<sup>7</sup>。これは電顕レベルでは自己貪食空胞であるが、光顕レベルでは、むしろ好塩基性の小顆粒にみえる (Fig. 1)。興味深いのは、一部の空胞は、その膜に AChE を発現していることである。これは、AChE や NSE の活性染色で確認することができる<sup>7-9</sup>。AChE は通常は神経筋接合部の筋線維側の基底膜部に存在している。いいかえれば、特殊な筋鞘膜に局在しているのである。このことは、空胞膜が何らかの特殊な筋鞘膜の性質を有していることを示唆している。そこで、各種筋鞘膜蛋白質に対する抗体をもちいて免疫染色をおこなってみると、この筋線維内空胞膜には、ほぼすべての筋鞘膜蛋白質が発現していることが確認される<sup>7</sup>。電顕的にもこれらの空胞は、基底膜を有しており、筋鞘膜の性質を有していることが確認できる。われわれは、この筋鞘膜の性質を有し AChE を発現する自己貪食空胞を AVSF (autophagic vacuoles with sarcolemmal features) と名付けた<sup>27</sup>。

一方、Danon 病の筋線維内には、基底膜を有していない自己貪食空胞もみとめられる。ライソゾーム膜蛋白質の一つ LIMP-1 と筋鞘膜蛋白質ジストロフィンとの二重免疫染色をおこなってみると、LIMP-1 陽性のライソゾームあるいは自己貪食空胞がジストロフィンでかこまれているもの (すなわち AVSF) とかこまれていないものの 2 種類あることがわかった。これを患者年齢と比較してグラフを描いてみると興味深いことに、前者は年齢とともに増加するのに対し、後者は年齢とともに減少した。しかも、その総和は年齢にかかわらずほぼ同じであった。このことは、筋鞘膜でかこまれていない自己貪食空胞が先行する本質的な変化であり、筋鞘膜様の膜はその後から二次的に形成されることを強く示唆している<sup>7</sup>。

#### c) 原因遺伝子

Danon 病が X 連鎖性のライソゾーム病であり、細胞膜と空胞膜の間に何らかの異常な関連をみることから、その時点までに報告されていた Danon 病家系の検体を全世界より集め、X 染色体に注目した連鎖解析をおこなった。その結果、候補領

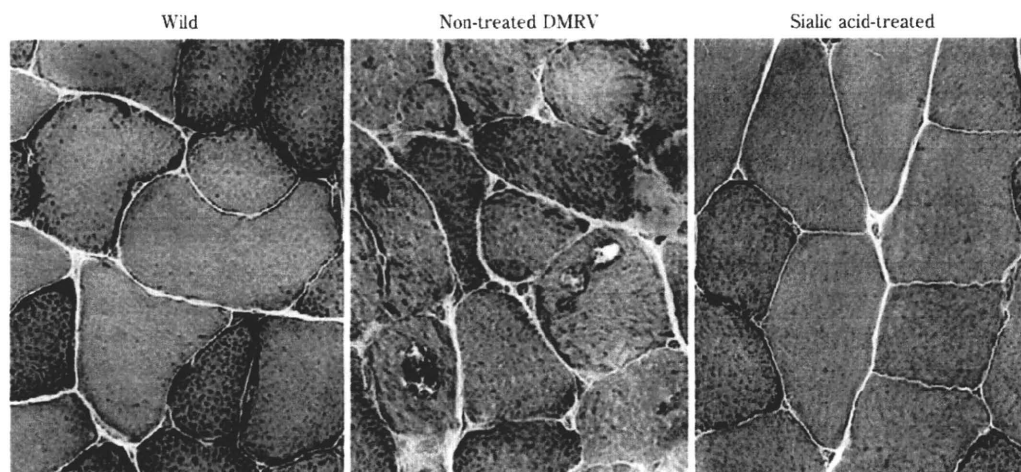
域内に遺伝子座があり、ライソゾーム膜蛋白質 lysosome-associated membrane protein-2 (LAMP-2) をコードする LAMP-2 を、Danon 病の重要な候補遺伝子と考え、LAMP-2 遺伝子のシーケンスをおこなった。その結果、Danon らの最初の症例報告中にある 1 例をふくむ全例の患者で変異をみいだした<sup>10</sup>。変異は、一例を除いて、全例 null またはフレーム・シフト変異であり、変異体では膜貫通ドメインが失われていた。つまり、変異体はもはや膜蛋白として機能しえないことになる。ウエスタン・ブロットおよび骨格筋の免疫染色では、しらべた全例で LAMP-2 蛋白が消失していた<sup>10</sup>。一方、同時期に発表された LAMP-2 ノックアウトマウスでも同様に骨格筋や心筋をふくむ臓器に自己貪食空胞が出現したことから、Danon 病は原発性 LAMP-2 欠損症であることが確定した<sup>11</sup>。

#### d) LAMP-2 の機能と病態

LAMP-2 は、ライソゾーム膜の主要な糖蛋白質である。発現量がきわめて多いことから、その常染色体上の相同体である LAMP-1 とともに、ライソゾーム膜をほぼ完全に埋め尽くし、ライソゾーム膜および細胞質をライソゾーム腔内の多様な消化酵素から守っていると考えられている<sup>12</sup>。しかし、一方で、このタンパク質はライソゾームだけでなく細胞膜にも少量発現しており、その生物学的な意味は不明であるが、転移性癌細胞など様々な状況で、細胞表面での発現が増えている。

LAMP-2 は、ライソゾーム膜を 1 回貫通する膜蛋白で、N 端側アミノ酸残基の約 90 パーセントがライソゾーム腔内に存在し、強力な糖修飾を受けている。このドメインには、システイン残基間のジスルフィド結合により形成される 4 つのループが存在する。細胞質ドメインは小さく、C 端の 11 残基のみで構成され、ライソゾーム移行シグナルと考えられるチロシン残基が存在している<sup>13</sup>。

LAMP-2 オープン・リーディング・フレームは、1233 ヌクレオチドからなり、410 アミノ酸をコードする。mRNA は、9 個のエクソンがスプライシングを受けて作られる。第 9 エクソンがエクソン 9A、9B、9C の 3 種類あり、オルタネイ



**Fig. 2** Muscle pathology of DMRV model mice with or without sialic acid supplementation. Without sialic acid treatment, DMRV mice show numerous rimmed vacuoles, in addition to marked variation in fiber size, at age 55 weeks. These features are essentially identical to those seen in human DRMV/HIBM patients. In contrast, with sialic acid treatment, DMRV mice show virtually no abnormality, clearly demonstrating that sialic acid can preclude DRMV/HIBM. ManNAc and sialyllactose also showed essentially the same efficacy. Modified Gomori trichrome stain. Gastrocnemius muscles.

タイプ・スプライシングにより、LAMP-2A、2B、2Cの3つのアイソフォームが作られる。

一例の患者では、フレーム・シフト変異がエクソン9Bにあり、LAMP-2Bアイソフォームのみ影響がある。この例の骨格筋をもちいたウエスタン・プロットでは、極微量のバンドが検出された<sup>10)</sup>。このバンドはLAMP-2Aアイソフォームを反映していると考えられる。以上の実験結果は、骨格筋や心筋で、LAMP-2Bが主要なアイソフォームであるという事実と良く一致している。また、この患者は、明らかな精神遅滞はないものの、心筋症やミオパチーは他の患者と同程度と考えられることから、LAMP-2B欠損のみでもDanon病が起こりうることを示している。近年オートファジーには様々な様態があることが知られてきており、この中で、ある種の蛋白質はシャペロンとLAMP-2Aを介してライソゾーム内に直接取り込まれて分解されるとされている<sup>13)</sup>。この、シャペロン介在性オートファジー(chaperone-mediated autophagy: CMA)と呼ばれる機構は、LAMP-2そのものを欠くDanon病においてはまったく機能していないはずであり、Danon病の病態の一端はCMAがおこなわないことによるものだと仮説も成立しえる。しかし、LAMP-2B欠損のみでDanon病を発症する患者の存在は、少なくとも骨格筋や心筋においては、CMAは主要な役割を果たしていない可能性を示唆している。

LAMP-2ノックアウトマウスの検討結果からは、LAMP-2欠損により、一部のライソゾーム酵素のミスターゲティングにより、ライソゾームへと正しく運ばれないことが知られている<sup>14)</sup>。もしこのことがDanon病の主要な病態であるならば、Danon病も一部のライソゾーム酵素の部分欠損症との解

釈も成り立つ。また、最近では、LAMP-2がオートファゴソームの成熟に関係しているとの報告もある<sup>15)</sup>。しかし、Danon病の詳細な病態、とくに、なぜAVSFが形成されるのかは、まったく不明であり、更なる検討が必要である。

## 2. その他のAVSFミオパチー

### a) 過剰な自己貪食をともなうX連鎖性ミオパチー

過剰な自己貪食をともなうX連鎖性ミオパチー(X-linked myopathy with excessive autophagy: XEMA)は、当初フィンランドから報告された比較的軽症のミオパチーである<sup>16)</sup>。Danon病とことなり、骨格筋のみが侵され、心筋や脳は侵されない。60歳を過ぎても歩行可能な例が多く、Danon病と比較して予後良好とされている。筋病理学的には、Danon病と同様にAVSFを呈する。加えて、電顕上、基底膜が重層化し、同部位にカルシウムと補体C5b-9の沈着がみとめられる<sup>17)18)</sup>。最近、本疾患が、ライソゾーム腔内の酸性化に決定的な役割を有するvacuolar ATPaseのアセンブリ因子をコードするVMA21の変異によることが明らかとなった<sup>19)</sup>。XEMA例では、実際にライソゾーム内の酸性度が低下していることが報告されている。Danon病もXEMAもともにライソゾーム機能異常により発症する疾患であることは興味深い。これとは対照的に、後で述べるRVMは、基本的にライソゾーム外に根本的原因が存在する。

### b) 乳児型/先天型自己貪食空胞性ミオパチー

われわれは、これまでに、乳児重症型AVM<sup>20)</sup>やX連鎖性を示唆する家族歴を有し、生下時より先天性ミオパチー様の臨床症状を呈する兄弟例を報告している<sup>21)</sup>。この例はAVSF

を有しており、Danon 病や XMEA 等が鑑別診断として挙げられたが、発症年齢も重症度もことなることから、別の AVSF と捉えられる。筋病理学的には、AVSF をみとめるとともに (Fig. 1)、基底膜の重層化と補体 C5b-9 の筋鞘膜への沈着があり、どちらかという XMEA に近い病態が示唆される。

#### c) 成人型自己貪食空胞性ミオパチー

Nonaka I らは、成人で骨格筋内に多数の AVSF を呈し、脳、心、肝、肺、腎など多臓器が侵された例を報告しているが、その病因・病態はまったく不明である<sup>22</sup>。今後さらに、AVSF を呈するミオパチーが新たにみだされていくものと思われる。

### 3. 縁取り空胞をともなう遠位型ミオパチー

#### a) 臨床症状

RVM の代表として、縁取り空胞をともなう遠位型ミオパチー (distal myopathy with rimmed vacuoles : DMRV) の研究を取り上げる。本疾患は、欧米では、遺伝性封入体ミオパチー (hereditary inclusion body myopathy : HIBM) と呼ばれている<sup>23,24</sup>。常染色体劣性の筋疾患であり、男女ほぼ平等に侵されて、通常 15 歳～40 歳で発症する。前脛骨筋と大腿後面筋が侵されやすく、大腿四頭筋は病後期まで比較的良好に保たれる。前脛骨筋の障害を反映して、多くの患者で下垂足が初発症状である。平均的には発症後約 12 年程度で歩行不能となり、車椅子状態となるが、最近では、臨床的重症度や進行の速さにはかなりばらつきがあることが知られるようになってきている。

患者数は日本国内に 150 人から 400 人程度と予想され、超希少疾病である。

#### b) 筋病理

縁取り空胞と管状線維性封入体の出現が特徴である。免疫染色をおこなえば、 $\beta$ -アミロイド沈着やタウ蛋白質リン酸化といった神経変性疾患に似た変化もみとめられる<sup>23,24</sup>。縁取り空胞は、電顕的には自己貪食空胞の集塊であり、DMRV は自己貪食空胞性ミオパチーとしての側面も有している<sup>3</sup>。これに加えて、小角化線維様の萎縮線維をみとめる。われわれが作製した DMRV モデルマウスでの解析結果からは、萎縮線維がまず先行して出現し、次に  $\beta$ -アミロイドが沈着し、その後、縁取り空胞やリン酸化タウが出現してくることが明らかになっている<sup>25,26</sup>。

#### c) 原因遺伝子

2001 年にイスラエルのグループにより HIBM の原因遺伝子がシアル酸合成経路律速酵素をコードする *GNE* であることが明らかにされた<sup>27</sup>。本邦 DMRV 患者でも同様に *GNE* 変異がみだされることから、DMRV と HIBM は同一疾患であることが確定した<sup>28</sup>。これまでに見つかった患者のアレルの 95% 以上がミスセンス変異であり、null 変異を両アレルに有する例はみだされていない。これは、*Gne* ノックアウトマウスは胎生致死である事実とよく合致している<sup>29</sup>。本邦では p.V572L 変異が一番多く、p.D176V 変異が 2 番目に多い。

#### d) 分子病態とモデルマウス

患者の血液、筋組織、線維芽細胞、筋管細胞で、シアル酸量が低下し、とくに筋管細胞においては、細胞表面のシアリル化が低下している<sup>30</sup>。さらに、培養線維芽細胞および筋管細胞において、*GNE* 代謝産物の *N*-アセチルマンノサミン (ManNAc) または主要なシアル酸であるノイラミン酸 (NeuAc) の投与により、これらが効率よく細胞内に取り込まれてシアリル化状態の回復がみとめられることを示した<sup>30</sup>。これは、仮にシアリル化減少が DMRV の本態であるならば、*in vitro* ではすでに治療可能であることを示している。

われわれは *Gne* ノックアウトのヘテロ接合体マウスとヒト *GNE*p.D176V 変異体を発現するトランスジェニックマウスを作製して掛け合わせ、ヒト *GNE*p.D176V を *GNE* ノックアウトバックグラウンドで発現する *Gne*<sup>-/-</sup>h*GNE* D176V-Tg マウス (DMRV モデルマウス) を作製した<sup>25</sup>。われわれのマウスは、生後 21 週以降より、体重減少と筋萎縮を、31 週より筋線維内のアミロイド沈着、41 週よりリン酸化タウ、管状線維性封入体、縁取り空胞の出現をみとめ、更に、全身臓器でのシアル酸量低下と軽度の血清 CK 値上昇をみとめた<sup>25,26</sup>。これは、われわれのマウスが、ヒト DMRV を臨床的・病理学的・生化学的に再現する世界ではじめての DMRV/HIBM モデルマウスであることを示している。加えて、われわれのマウスにより、アミロイド沈着が縁取り空胞よりも時間的に先に形成されることがはじめて明らかとなり、病態の一端が解明された<sup>26</sup>。

われわれのマウスでの解析により、DMRV/HIBM でみとめられる縁取り空胞形成はかなり下流の現象であることが明らかとなった。これは、相当幅広い疾患に縁取り空胞がみとめられる事実と良く合致している。この点は、AVSF を呈するミオパチーがライソゾーム機能異常を原因としていることと対照的であり、興味深い。

#### e) 治療法開発

NeuAc や ManNAc は静注すると約 2 分で尿中に排泄されてしまうことが良く知られている。そこで、正常マウスで腹腔内投与と経口投与を比較したところ、経口投与の方が尿中への排泄速度が遅く、さらに、投与 2 時間後の血中濃度も高かった。マウスは一日に約 12 回飲水をおこなうことから、自由飲水による経口投与をおこない、その治療効果を検討した<sup>31</sup>。

まず、まだ症状を呈していない時期の 15 週前後の DMRV マウスに対して、3 つのことなる投与量 (20, 200, 2,000 mg/kg 体重/日) で ManNAc を与えたところ、いずれの用量においても、無治療であれば、ほぼすべての症状が出そろった 55 週の時点でも症状がみとめられなかった<sup>31</sup>。そこで、この最小量もちい、ManNAc に加えて、NeuAc、シアル酸結合物であるシアリル乳糖の投与を同様のスケジュールでおこなった。その結果、どの薬剤においても、ManNAc と同様に、55 週の時点でほぼ完全に DMRV 発症を抑制できた。病理学的にも、筋線維萎縮、 $\beta$ -アミロイド沈着、縁取り空胞形成などの変化はいずれもみとめなかった (Fig. 2)。肝や腎などへの毒性もとくにみとめられなかった<sup>31</sup>。これらの結果は、*GNE* 代謝産物が



DMRV に対して有効であることを明確に示すと同時に、確かに低シアル酸状態が DMRV の原因であることを明確に示した点でも意義が大きい。

これらの結果を踏まえると、当然、次はヒトでの検討、すなわち臨床試験ということになる。本邦でおこなわれる希少疾病薬開発の大半は、既存薬の適応拡大または欧米での既承認薬の国内承認を目的とするものである。われわれの知るかぎり、これまで、日本の研究室からの基礎研究成果に基づいて、DMRV のような「超」希少疾病に対する治療薬の開発が、原薬製造の段階から国内でおこなわれたことはない。DMRV の治療薬開発は、本邦における今後の希少疾病薬開発研究の試金石となると考えられる。

## まとめ

AVM は、その疾患概念が徐々に受け入れられつつあり、今後はさらにあらたな疾患がみいだされていくことになると考えられる。AVSF を呈するミオパチーは Danon 病と XMEA の原因遺伝子が明らかとなり、ともにライソゾーム機能異常を原因としている点で共通している。一方、DMRV などの RVM はライソゾーム外に根本的原因があり、その下流現象として自己貪食が惹起されている可能性が高い。いずれにせよ、今後さらに病態が解明されて治療法開発が進むことになるであろうが、このような「超」希少疾病の治療薬開発に対して、本邦はどのようなスタンスで望んでいくのか、幅広い議論が必要であろう。

謝辞：AVM 研究を始めるきっかけをお与え下さるとともに、日頃から暖かいご指導を賜っております国立精神・神経センター病院名誉院長の埜中征哉先生、Danon 病研究でご指導を仰いだ米国コロンビア大学神経内科 Michio Hirano 先生ならびに Salvatore DiMauro 先生、そして、いつも一緒に研究を進めてくれている国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第一部の過去と現在の同僚、とくに昼夜を問わず実験を積み重ねて DMRV 治療開発につながる重要な成果を挙げた May Malicdan 医師と野口悟室長に感謝いたします。また、一連の研究にご協力下さった主治医の先生方、患者およびご家族の方々、遠位型ミオパチー患者会の方々に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Nishino I. Autophagic vacuolar myopathy. *Semin Pediatr Neurol* 2006;13:90-95.
- 2) Nishino I. Autophagic vacuolar myopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2003;3:64-69.
- 3) Danon MJ, Oh SJ, DiMauro S, et al. Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase. *Neurology* 1981;31:51-57.
- 4) Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, et al. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. *Neurology* 2002;58:1773-1778.
- 5) Schorderet DF, Cottet S, Lobrinus JA, et al. Retinopathy in Danon disease. *Arch Ophthalmol* 2007;125:231-236.
- 6) Prall FR, Drack A, Taylor M, et al. Ophthalmic manifestations of Danon disease. *Ophthalmology* 2006;113:1010-1013.
- 7) Sugie K, Noguchi S, Kozuka Y, et al. Autophagic vacuoles with sarcolemmal features delineate Danon disease and related myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:513-522.
- 8) Murakami N, Goto Y-I, Itoh M, et al. Sarcolemmal indentation in cardiomyopathy with mental retardation and vacuolar myopathy. *Neuromuscul Disord* 1995;5:149-155.
- 9) Muntoni F, Catani G, Mateddu A, et al. Familial cardiomyopathy, mental retardation and myopathy associated with desmin-type intermediate filaments. *Neuromuscul Disord* 1994;4:233-241.
- 10) Nishino I, Fu J, Tanji K, et al. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* 2000;406:906-910.
- 11) Tanaka Y, Guhde G, Suter A, et al. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* 2000;406:902-906.
- 12) Fukuda M. Biogenesis of the lysosomal membrane. *Subcell Biochem* 1994;22:199-230.
- 13) Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy. *Methods Mol Biol* 2008;445:227-244.
- 14) Eskelinen EL, Illert AL, Tanaka Y, et al. Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Biol Cell* 2002;13:3355-3368.
- 15) Saftig P, Beertsen W, Eskelinen EL. LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy* 2008;4:510-512.
- 16) Kalimo H, Savontaus M-L, Lang H, et al. X-linked myopathy with excessive autophagy: a new hereditary muscle disease. *Ann Neurol* 1988;23:258-265.
- 17) Villanova M, Louboutin JP, Chateau D, et al. X-linked vacuolated myopathy: complement membrane attack complex on surface membranes of injured muscle fibers. *Ann Neurol* 1995;37:637-645.
- 18) Louboutin JP, Villanova M, Lucas-Heron B, et al. X-linked vacuolated myopathy: membrane attack complex deposition on muscle fiber membranes with calcium accumulation on sarcolemma. *Ann Neurol* 1997;41:117-120.
- 19) Ramachandran N, Munteanu I, Wang P, et al. VMA21 deficiency causes an autophagic myopathy by compromising V-ATPase activity and lysosomal acidification. *Cell* 2009;137:235-246.
- 20) Yamamoto A, Morisawa Y, Verloes A, et al. Infantile autophagic vacuolar myopathy is distinct from Danon disease. *Neurology* 2001;57:903-905.
- 21) Yan C, Tnaka M, Sugie K, et al. A new congenital form of

- X-linked autophagic vacuolar myopathy. *Neurology* 2005; 65:1132-1134.
- 22) Kaneda D, Sugie K, Yamamoto A, et al. A novel form of autophagic vacuolar myopathy with late-onset and multiorgan involvement. *Neurology* 2003;61:128-131.
- 23) Nonaka I, Noguchi S, Nishino I. Distal myopathy with rimmed vacuoles and hereditary inclusion body myopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2005;5:61-65.
- 24) Malicdan MC, Noguchi S, Nishino I. Recent advances in distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV) or hIBM: treatment perspectives. *Curr Opin Neurol* 2008;21:596-600.
- 25) Malicdan MC, Noguchi S, Nonaka I, et al. A Gne knockout mouse expressing human GNE D176V mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet* 2007;16:2669-2682.
- 26) Malicdan MC, Noguchi S, Hayashi YK, et al. Muscle weakness correlates with muscle atrophy and precedes the development of inclusion body or rimmed vacuoles in the mouse model of DMRV/hIBM. *Physiol Genomics* 2008;35:106-115.
- 27) Eisenberg I, Avidan N, Potikha T, et al. The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy. *Nat Genet* 2001;29:83-87.
- 28) Nishino I, Noguchi S, Murayama K, et al. Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy. *Neurology* 2002;59:1689-1693.
- 29) Schwarzkopf M, Knobloch KP, Rohde E, et al. Sialylation is essential for early development in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5267-5270.
- 30) Noguchi S, Keira Y, Murayama K, et al. Reduction of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase activity and sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles. *J Biol Chem* 2004;279:11402-11407.
- 31) Malicdan MC, Noguchi S, Hayashi YK, et al. Prophylactic treatment with sialic acid metabolites precludes the development of the myopathic phenotype in the DMRV-hIBM mouse model. *Nat Med* 2009;15:690-695.

### Abstract

#### Elucidation of pathomechanism of and development of therapy for autophagic vacuolar myopathies

Ichizo Nishino, M.D.

Department of Neuromuscular Research, National Institute of Neuroscience,  
National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP)

Autophagic vacuolar myopathy (AVM) is an entity defined by the presence of autophagic vacuoles on muscle pathology. There are two emerging categories in AVM in addition to the best characterized Pompe disease.

One is Danon disease and its related disorders, which are characterized by autophagic vacuoles with unique sarcolemmal features (AVSF). AVSF express virtually all sarcolemmal proteins, in addition to acetylcholinesterase, on their vacuolar membranes. Danon disease is caused by primary deficiency of a lysosomal membrane protein, LAMP-2. Interestingly, in this disease, the number of AVSF increases as the patients age. Other AVSF myopathies include X-linked myopathy with excessive autophagy which is now known to be caused by *VMA21* mutations.

The other AVM is typified by the presence of rimmed vacuoles, which are actually clusters of autophagic vacuoles on electron microscopy. One of the well known diseases in this group is distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV), also called hereditary inclusion body myopathy (hIBM). DMRV is caused by mutations in *GNE* gene that encode a rate-limiting enzyme in the sialic acid biosynthetic pathway. Interestingly, in DMRV model mice, sialic acid supplementation almost completely precluded the disease phenotype, indicating that decreased sialic acid is the cause of myopathic phenotype and sialic acid supplementation can prevent the disease process.

Interestingly, both genetically diagnosable AVSF myopathies are primarily due to lysosomal dysfunctions. In contrast, rimmed vacuoles are secondarily caused by extra-lysosomal defects, such as hyposialylation in DMRV/hIBM, and are formed at later stages of the disease.

(*Clin Neurol* 2010;50:1-6)

**Key words:** autophagy, distal myopathy, hereditary inclusion body myopathy, rimmed vacuole, sialic acid, GNE

of p62 positive aggregates correlate pretty well with myofiber atrophy. In general the degradation systems appear to be still functioning in these patients and seem to contribute positively to counteract disease progression. In conclusion, present data underline the role of unproductive autophagy and accumulation of aggregate-prone ubiquitinated proteins in the pathogenesis of GSDII, especially in more severely affected patients.

### SM202. An exploratory analysis of scoliosis in 182 children and adults with Pompe disease from the Pompe Registry

Merlini, Luciano<sup>1</sup>; Case, Laura<sup>2</sup>; Kishnani, Priya<sup>2</sup>; Muller-Felber, Wolfgang<sup>3</sup>; Roberts, Mark<sup>4</sup>; van der Ploeg, Ans<sup>5</sup>; Prasad, Suyash<sup>6</sup>

<sup>1</sup>University of Ferrara, Ferrara, Italy; <sup>2</sup>Duke University Medical Center, Durham, United States; <sup>3</sup>Friedrich-Baur Institute, Munich, Germany; <sup>4</sup>Withington Hospital, Manchester, United Kingdom; <sup>5</sup>Erasmus Medical Center, Rotterdam, Netherlands; <sup>6</sup>Genzyme Corporation, Cambridge, United States

The prevalence of scoliosis and its relationship with respiratory function are explored in patients enrolled in the Pompe Registry. Scoliosis status was reported for 575 patients, 182 of whom had scoliosis (25 children age 0 to < 2 years or ≥ 2 to < 13 years; 24 teenagers age ≥ 13 to < 20 years, and 133 adults age ≥ 20 years).

Children age ≥ 2 years with scoliosis had a mean age at Pompe symptom onset of 1.1 years, identical to children without scoliosis. Teenagers with scoliosis had a mean age at symptom onset of 5.8 years compared with 9.1 years in teenagers without scoliosis. Adults with scoliosis had mean age at symptom onset of 25.3 years compared with 32.8 years in adults without scoliosis.

Among the subset of patients with FVC data, children age ≥ 2 years (n = 6) and teenagers (n = 9) with scoliosis had lower % predicted forced vital capacity (FVC) upright median scores (68.0% and 59.0%, respectively) than those in similar age groups without scoliosis (15 children, 5 teenagers; 77.0% and 91.1%, respectively). Children age ≥ 2 years with scoliosis (n = 3) had lower median % predicted FVC supine scores than those in similar age groups without scoliosis (n = 5) (47.0% versus 70.0%, respectively). Supine scores for teenagers without scoliosis were unavailable. Among adults, FVC % predicted upright and supine median scores were similar regardless of scoliosis status.

Further analysis and collection of detailed scoliosis and respiratory function data is needed to better understand this relationship and how scoliosis affects quality of life in patients with Pompe disease.

### SM203. Quantitative metabolome profiling of biopsied muscle in the patients with glycogen storage diseases using capillary electrophoresis mass spectrometry

Fukuda, Tokiko<sup>1</sup>; Sugie, Yoko<sup>2</sup>; Sugie, Hideo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Jichi Medical University, Tochigi, Japan; <sup>2</sup>Hamamatsu Medical University, Pediatrics, Hamamatsu, Japan; <sup>3</sup>Jichi Medical University, Pediatrics, Shimotsuke, Japan

Metabolome analysis has lately been applied for the characterization of disease-specific metabolism. Recently developed

capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS) has enabled quantitative analysis of charged metabolites by the simultaneous measurement of their levels in tissues. In order to characterize the metabolism of muscular glycogen storage diseases (M-GSD), and also to evaluate whether CE-TOFMS could be a valuable diagnostic tool for M-GSD, we applied CE-TOFMS to measure the metabolites involved in energy production in the muscles of M-GSD. Biopsied muscles were obtained from each patient with GSDIIa, IIb, III, V, VII, and phosphoglycerate kinase (PGK) deficiency. Histologically normal muscles from three myopathy patients with normal CK values were used as controls. We identified 10 metabolites involved in glycolysis, 8 in TCA cycle, and 4 in pentose phosphatase pathway. The amounts of glycolytic intermediates locating downstream of G-1-P in the glycolytic pathway were much less in muscles of GSD III and V than in control muscles, while the amounts of glycolytic intermediates locating upstream of FDP (G-6-P, G-1-P and F-6-P) and those locating upstream of 3-phosphoglycerate were significantly high in muscles of GSD VII and in PGK deficiency, respectively. There was no difference in the amounts of glycolytic intermediates between GSD II and controls. The amounts of the metabolites in TCA cycle were higher in muscles of GSD II than in controls. The metabolome analysis of biopsied muscles had clearly determined the blockage of the metabolic pathway. We conclude that this method could be a high through-put and good method for diagnosis in M-GSD.

### SM204. Adult Pompe disease: bone mineral density before and after enzyme replacement therapy

Papadimas, George-Konstantinos<sup>1</sup>; Terzis, Gerasimos<sup>2</sup>; Methenitis, Spyridon<sup>2</sup>; Spengos, Konstantinos<sup>2</sup>; Papadopoulos, Constantinos<sup>2</sup>; Kavouras, Stavros<sup>2</sup>; Michelakakis, Helen<sup>3</sup>; Manta, Panagiota<sup>2</sup>

<sup>1</sup>University of Athens, Medical School, Neurology, Athens, Greece;

<sup>2</sup>University of Athens, Athens, Greece; <sup>3</sup>Ag. Sophia Children's Hospital, Athens, Greece

Pompe disease is an autosomal recessive disorder caused by lysosomal  $\alpha$ -glucosidase deficiency. The infantile form is characterized by cardiomegaly and severe muscle weakness with an early fatal outcome, while the adult form is usually milder with progressive muscle weakness and respiratory dysfunction. Bone mineral density (BMD) seems to be decreased in the infantile form leading to osteopenia and fractures, but data concerning the adult form of the disease are still limited. The aim of the present study is to evaluate BMD in patients with the adult form of Pompe disease before and after enzyme replacement therapy (ERT).

Body composition was examined by means of dual x-ray absorptiometry at baseline and after 9-12 months of ERT in five patients with the adult onset form of Pompe disease.

One patient had reduced BMD in total body, L2-L4 spine and femoral neck in the range of osteopenia, one other had reduced L2-L4 spine BMD and two patients had slightly reduced femoral neck BMD. After 9-12 months of ERT, BMD was not considerably altered in any patient.

A slight reduction of BMD among patients with the adult form of Pompe disease might be occasionally found. The short-



## Letter to the Editor

**Liver biopsy is an important procedure in the diagnosis of glycogen storage disease type IV**

Tatsuki Mizuochi,<sup>1</sup> Akihiko Kimura,<sup>1</sup> Hiroshi Nishiura,<sup>1</sup> Yukihiro Inomata,<sup>4</sup> Hideaki Okajima,<sup>4</sup> Hideo Sugie,<sup>6</sup> Hiroshi Mitsubuchi,<sup>5</sup> Minoru Yagi<sup>2</sup> and Masayoshi Kage<sup>3</sup>

Departments of <sup>1</sup>Pediatrics and Child Health, and <sup>2</sup>Pediatric Surgery, and <sup>3</sup>Pathology, Kurume University School of Medicine, Kurume, and Departments of <sup>4</sup>Pediatric Surgery and Transplantation and <sup>5</sup>Pediatrics, Kumamoto University Graduate School of Medical Science, Kumamoto University, Kumamoto, and <sup>6</sup>Department of Pediatrics, Jichi Medical University and Jichi Children's Medical Center, Tochigi, Japan

Glycogen storage disease type IV (GSD IV) is a rare autosomal recessive metabolic disorder characterized by deficient glycogen branching enzyme (GBE) activity. This severe metabolic disease results in abnormal deposition of amylopectin-like glycogen in multiple organs, such as the liver, muscle, heart, and the nervous system.<sup>1,2</sup> This disease most frequently presents in the first few months of life, with hepatosplenomegaly and failure to thrive. This is followed by progressive liver cirrhosis with portal hypertension, ascites, esophageal varices, and death by 5 years of age.<sup>3</sup> Generally, diagnosis of GSD does not require liver biopsy. However it is difficult to diagnose GSD IV when symptoms extend to multiple organs. No specific treatment for this disease exists. Liver transplantation has been proposed as a treatment;<sup>2,4,5</sup> however, this may not improve extrahepatic manifestations in the same patients.<sup>4</sup>

We experienced a case of GSD IV in a 5-month-old boy who was born without complications after 38 weeks of gestation. He had no significant family history and developed normally until the age of 4 months, at which time he experienced high fever, tachypnea, and poor feeding. On admission to our hospital, he had hepatosplenomegaly with elevation of serum transaminases (aspartate aminotransferase [AST], 312 IU/l and alanine aminotransferase [ALT], 108 IU/l); hypotonia; cardiomegaly (cardiothoracic ratio, 67%); elevated white blood count (27 570/ $\mu$ l) and C-reactive protein (9.1 mg/dl). Ultrasonography revealed pericardial effusion and increased myocardial thickness. After admission, the patient rapidly developed signs of cardiomyopathy and respiratory distress accompanied by high fever and petechiae. However, serum creatine phosphokinase concentration was normal. Therefore, his cardiac

findings may have been due to a respiratory problem, such as infection, or to a combination of abnormal deposition of amylopectin-like glycogen and infection. He was treated with respiratory therapy, antibiotics,  $\gamma$ -globulin, and a diuretic. However, his condition did not improve, and his liver function sharply deteriorated: AST, 729 IU/l; ALT, 146 IU/l; total bilirubin, 2.6 mg/dl; and prothrombin, 54% (normal range: >60%). At that time we were still unable to make a diagnosis so we carried out an open liver biopsy. We did not evaluate leukocytes.<sup>5</sup> The biopsy specimen showed periodic acid-Schiff-positive cytoplasmic inclusions, largely resistant to diastase digestion (Fig. 1). GBE activity in a sample from the specimen was very low (0.09  $\mu$ mol Pi/min/mg protein; control,  $1.2 \pm 0.3$ ), as measured in the laboratory of Dr H. Sugie.

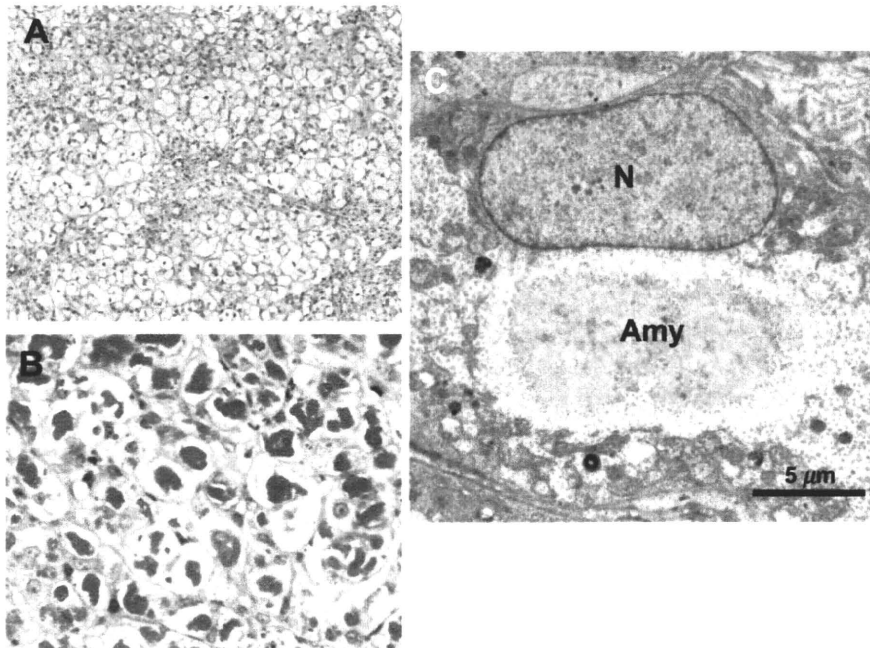
From the above results, especially the histological findings from the biopsy, the patient was diagnosed as having GSD IV. He received a living-donor liver transplant from his mother at Kumamoto University Hospital. After transplantation, his symptoms, including abnormal liver function, cardiomyopathy, dyspnea, hypotonia, and petechiae, rapidly improved except for fever. Histological findings from the liver biopsy specimen, particularly the faintly stained basophilic inclusions in hepatocytes, were very useful and ultimately led to the diagnosis of GSD IV. We therefore consider liver biopsy very important for the diagnosis of this disease. However, it should be kept in mind that enzyme assay in the liver can be very tricky when the liver is cirrhotic.

We carried out living-donor liver transplant with the patient's mother as the donor. After liver transplantation, all disease manifestations except for fever abated. Resorption of extrahepatic deposits of abnormal glycogen has been demonstrated after liver transplantation;<sup>6,7</sup> the mechanism for resorption of deposits in organs apart from the liver remains unknown.

In conclusion, we report a 5-month-old boy with GSD IV, including fever of unknown origin both before and after liver transplantation, and emphasize the importance of liver biopsy in the diagnosis of GSD IV.

Correspondence: Akihiko Kimura, MD PhD, Department of Pediatrics and Child Health, Kurume University School of Medicine, 67 Asahi-machi, Kurume 830-0011, Japan. Email: hirof@med.kurume-u.ac.jp

Received 21 January 2010; revised 12 April 2010; accepted 8 September 2010.



**Fig. 1** Liver biopsy specimen from our patient with GSD IV. (a) Hepatocytes are enlarged and contain faintly stained basophilic cytoplasmic inclusions (hematoxylin–eosin stain,  $\times 100$ ). (b) The inclusions are periodic acid-Schiff-positive and diastase-resistant ( $\times 400$ ). (c) Ultrastructurally, hepatocytes are occupied by large aggregates consistent with amylopectin ( $\times 10\,000$ ). N, nucleus; Amy, amylopectin.

### References

- 1 Greene HL, Brown BI, McClenathan DT, Agostini RM Jr, Taylor SR. A new variant of type IV glycogenosis: deficiency of branching enzyme activity without apparent progressive liver disease. *Hepatology* 1988; **8**: 302–6.
- 2 Sokal EM, Von Hoof F, Alberti D *et al*. Progressive cardiac failure following orthotopic transplantation for type IV glycogenosis. *Eur. J. Pediatr.* 1992; **151**: 200–3.
- 3 Chen Y-T. Glycogen storage disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, 2001; 1521–51.
- 4 Rosenthal P, Podesta L, Grier R *et al*. Failure of liver transplantation to diminish cardiac deposits of amylopectin and leukocyte inclusions in type IV glycogen storage disease. *Liver Transpl. Surg.* 1995; **1**: 373–6.
- 5 Shin YS. Glycogen storage disease: clinical, biochemical, and molecular heterogeneity. *Semin. Pediatr. Neurol.* 2006; **13**: 115–20.
- 6 Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M *et al*. Chimerism after liver transplantation for type IV glycogen storage disease and type I Gaucher's disease. *N. Engl. J. Med.* 1993; **328**: 745–9.
- 7 Davis MK, Weinstein DA. Liver transplantation in children with glycogen storage disease: controversies and evaluation of the risk/benefit of this procedure. *Pediatr. Transpl.* 2008; **12**: 137–45.



## Patient Report

**Case of glycogen storage disease type VI (phosphorylase deficiency) complicated by focal nodular hyperplasia**Atsushi Ogawa,<sup>1</sup> Emi Ogawa,<sup>1</sup> Shigenori Yamamoto,<sup>1</sup> Tokiko Fukuda,<sup>2</sup> Hideo Sugie<sup>2</sup> and Yoichi Kohno<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Pediatrics, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba-shi, Chiba and <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Jichi Children's Medical Center Tochigi, Shimotsuke-shi, Tochigi, Japan**Key words** focal nodular hyperplasia, glycogen phosphorylase, glycogen storage disease.

Although it is well known that hepatic tumors often develop in patients with glycogen storage disease (GSD) types Ia and III, the formation of these tumors has not been reported in other forms of hepatic GSD. In this report, a patient with GSD type VI (phosphorylase deficiency; OMIM 232700) complicated with a hepatic benign tumor, focal nodular hyperplasia (FNH), is presented. This case indicates that regular check-ups for hepatic tumors are necessary, not only in patients with GSD types Ia or III, but also in patients with other forms of hepatic GSD.

**Case Report**

A female patient was referred to our hospital when she was 5 years of age for further investigation of hepatomegaly, which had been detected when she had visited a clinic when she was 5 years old. She was born to healthy non-consanguineous parents and had no history of hypoglycemia or nasal bleeding. On physical examination, her height was 101 cm (−1.5 SD) and her body-weight was 16 kg (−1.0 SD). The liver was firm and palpable 7 cm below the right costal margin, whereas the spleen was not palpable. The results of a fasting blood test collected at that time were as follows: aspartate aminotransferase 37U/L, alanine aminotransferase 24U/L, blood glucose 85 mg/dL, lactate 6.2 mg/dL, uric acid 5.9 mg/dL, total cholesterol 229 mg/dL and triglyceride 88 mg/dL. A plain abdominal computed tomography (CT) scan showed an enlarged liver with a density considerably higher than that of the spleen (CT values: liver, 80; spleen, 42) (Fig. 1). Glucose and galactose loading tests were performed. The serum lactate level was not elevated when glucose was loaded, although it increased to a maximum of 56 mg/dL one hour after loading (normal <35 mg/dL). A glucagon loading test was performed after a 15-h fast, with the serum glucose level increasing from 71 to 128 mg/dL one hour after loading. On the basis of these data, GSD was suspected and accordingly the enzyme activities of hepatic GSD, that is, debranching enzyme, phosphorylase and phosphorylase b kinase, were measured in

peripheral blood. The results of all these tests were normal (Table 1). Informed consent for a liver needle biopsy for measurement of enzyme activity was not obtained. Although the enzyme activity of phosphorylase b kinase measured in peripheral blood was normal, a tentative diagnosis of GSD type IX (phosphorylase b kinase deficiency) was made based on the physical, laboratory and radiological findings and the results of the loading tests. Regular check-ups including abdominal CT scans for potential formation of hepatic tumor were performed every year. The patient's growth curve showed that she attained mean values around the time of puberty. The results of blood tests obtained between 5 and 14 years of age were as follows (mean ± SD): uric acid 5.9 ± 0.6 mg/dL, total cholesterol 208 ± 21.0 mg/dL and triglyceride 198 ± 111 mg/dL.

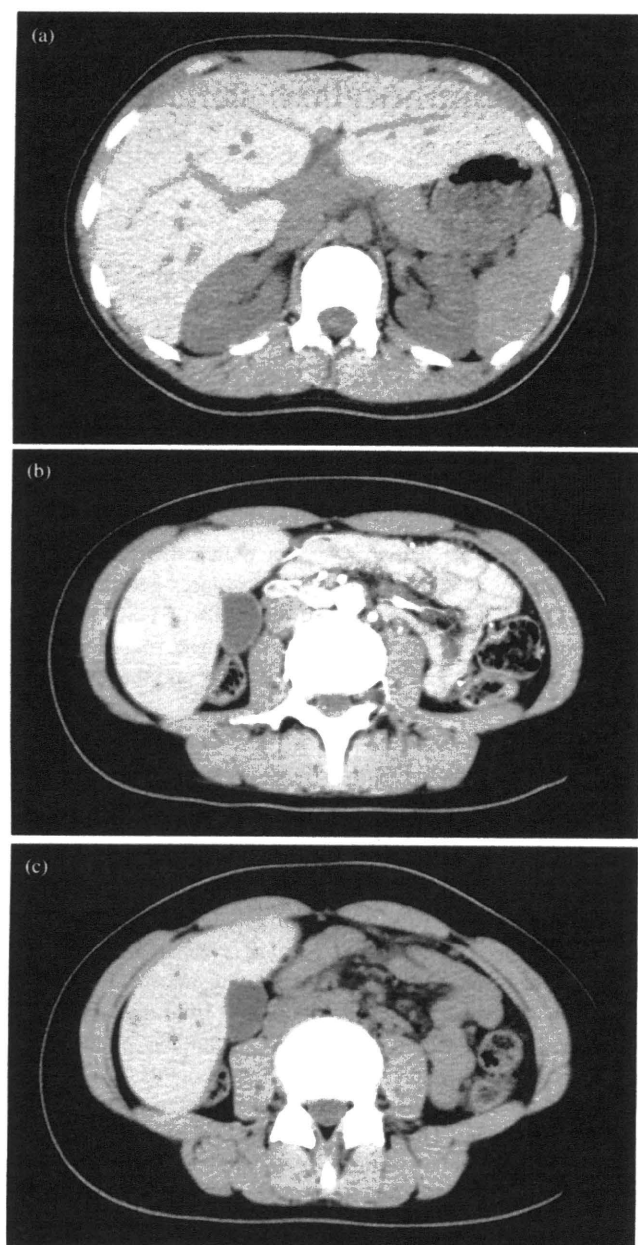
When the patient was 15 years of age, the early phase of a contrast-enhanced abdominal CT scan revealed an enhanced lesion in the liver (Fig. 1). After obtaining informed consent, specimens were obtained by needle biopsy from the tumor and non-tumor part of the liver. Histological findings of the non-tumor specimen showed strong periodic acid-Schiff (PAS) staining in hepatocytes that disappeared following diastase treatment, findings compatible with GSD. Histology of the tumor specimen demonstrated pericellular fibrosis, compatible with the diagnosis of FNH (Fig. 2). Fibrous bands containing bile ductules were not observed in the specimens. Enzyme activities of hepatic GSD were measured using liver tissue from the non-tumor section, which revealed that phosphorylase enzyme activity was 2.3 nmol/min/mg protein, a value corresponding to 24% of normal. The enzyme activity of both debranching enzyme and phosphorylase b kinase was normal (Table 1). Informed consent for gene analysis of phosphorylase (*PGYL*) could not be obtained. We concluded that the patient's diagnosis was GSD VI (phosphorylase deficiency) complicated by FNH. We elected to forego surgical treatment in favor of long-term observation. The size of the tumor has been monitored regularly with ultrasonography. As of now, the tumor does not appear to be enlarging.

**Discussion**

In this report we present a patient with GSD type VI complicated by FNH. This is the first report of a hepatic tumor complication

Correspondence: Atsushi Ogawa, MD PhD, Department of Pediatrics, Chiba University Graduate School of Medicine, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan. Email: aogawa@faculty.chiba-u.jp

Received 28 February 2009; revised 7 June 2009; accepted 9 July 2009.



**Fig. 1** (a) The findings of a plain abdominal computed tomography (CT) scan at 5 years of age. The CT value of the liver was markedly elevated compared with that of the spleen and kidneys. (b) The findings of the early phase of a contrast-enhanced abdominal CT scan at 15 years of age showing an enhanced lesion. (c) The findings of the same section as (b), without contrast enhancement.

in a patient with GSD type VI, a different hepatic form of GSD than types Ia or III. As hepatic tumors are often found in patients with GSD types Ia and III, regular check-ups for these tumors are performed routinely in these patients. However, this report indicates that regular check-ups for hepatic tumor are also necessary in patients with hepatic forms of GSD other than types Ia or III.

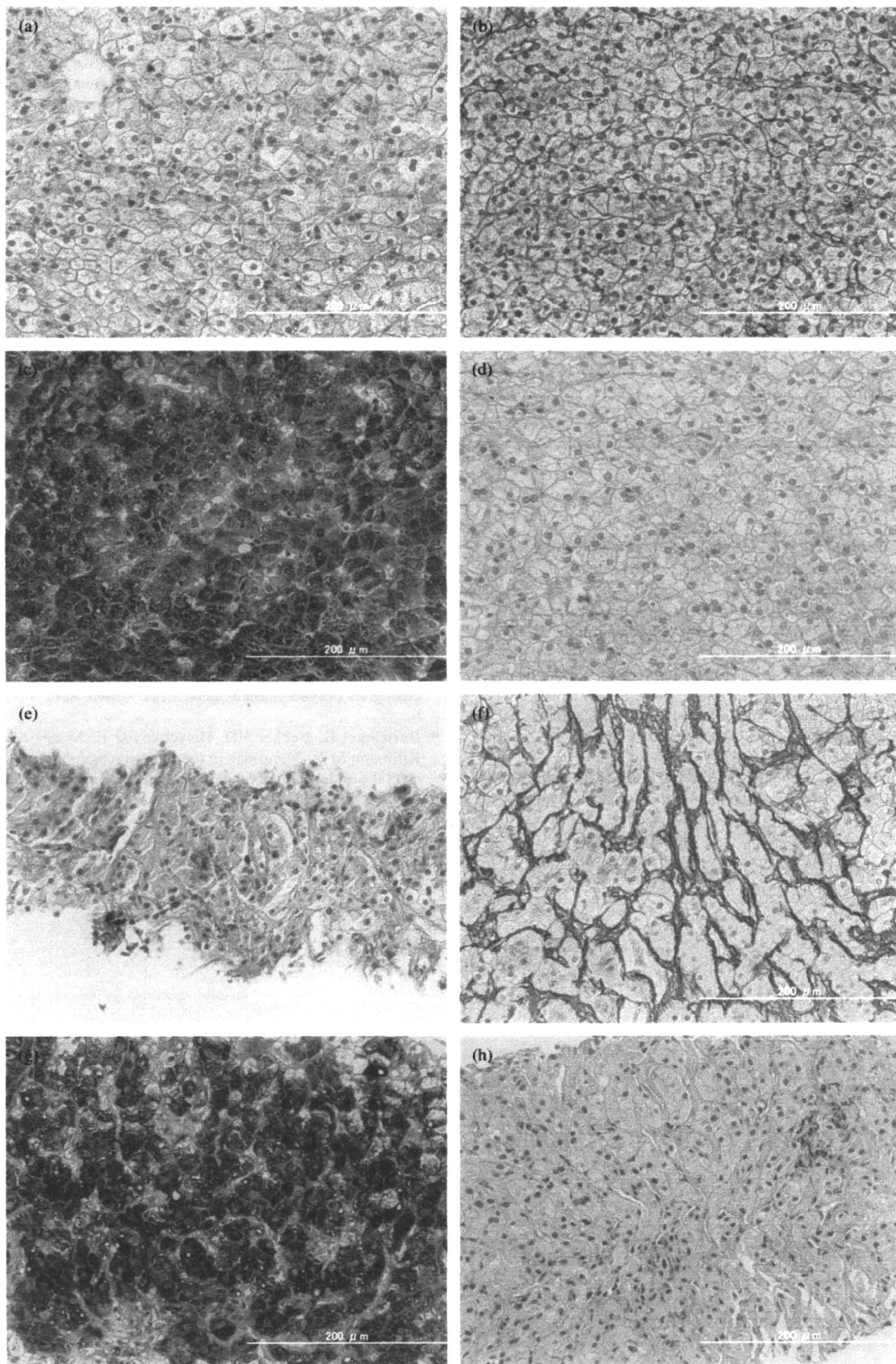
In patients with GSD type Ia, hepatic adenoma is the most common tumor described; however other tumors, including hepatocellular carcinoma (HCC),<sup>1</sup> described in patients with GSD III,<sup>2</sup> hepatoblastomas,<sup>3</sup> and FNH<sup>4</sup> have also been reported.

Hepatic adenomas are a benign tumor, consisting of a nodular proliferation of hepatocytes arranged in cords having no relationship to portal tracts. They often have a pushing border abutting against the surrounding liver. The hepatic adenoma has, on rare occasions, been known to progress to HCC,<sup>1</sup> and this is one of the most important reasons why regular check-ups and follow up after the discovery of an adenoma are necessary in a patient with GSD Ia. FNH is typically a single mass in an otherwise healthy liver characterized by central scarring that radiates between multiple nodules of regenerating parenchyma. Like the hepatic adenoma, it is also a benign tumor parenchyma but the potential for malignant transformation of FNH into HCC has not been demonstrated. However, a case of HCC arising within FNH has been reported recently<sup>5</sup> and this report emphasizes the importance of detecting FNH, even though the FNH itself is benign.

The mechanism of tumor formation in GSD type Ia is considered to occur by the following sequence.<sup>6</sup> Increased amounts of free fatty acids are released from adipose tissue, taken up by the liver and channeled into triglyceride formation. Malonyl-CoA is a key lipogenic intermediate in this process, which, in turn, causes inhibition of carnitine palmitoyltransferase I and limitation of mitochondrial beta-oxidation. This results in fatty acids being more likely to be channeled into extramitochondrial pathways, such as within peroxisomes, leading to an increase in hydrogen peroxide generation. This results in increased generation of free radicals that are capable of inflicting direct DNA damage, which may initiate the development of hepatic tumors. Although the patient reported here was diagnosed with GSD type VI, hypertriglyceridemia was almost always observed during the clinical course of the disease, similar to that seen in cases with type I GSD. We anticipate this would have resulted in increased generation of free radicals by the mechanism described above and could possibly have caused the formation of FNH we observed in the patient.

In our patient we observed a difference in phosphorylase activity between peripheral blood and liver tissue. Three isoforms of phosphorylase exist, that is, liver, brain and muscle. As the liver isoform is expressed in peripheral blood,<sup>7,8</sup> phosphorylase activity in peripheral blood and the liver should be the same. The reason why phosphorylase activity in peripheral blood and liver was different in our patient is not clear, although similar findings have been reported elsewhere.<sup>9</sup> Mutation analysis of the liver glycogen phosphorylase gene (*PYGL*) is necessary for further confirmation of this diagnosis.

In summary, we report a patient with GSD VI complicated with FNH. This case indicates that regular check-ups for hepatic tumors are necessary, not only in patients with GSD types Ia or III, but also in patients with other forms of hepatic GSD.





**Fig. 2** Histological findings of the liver from (a–d) non-tumor and (e–h) tumor specimens. (a and e) Hematoxylin–eosin (HE) stain, (b and f) silver staining, (c and g) periodic acid–Schiff (PAS) staining and (d and h) PAS staining after diastase treatment. In the non-tumor specimen, the hepatocytes had (a) clear cytoplasm with (b) no fibrosis observed. (c and d) All the hepatocytes were stained strongly by PAS, which disappeared following diastase treatment. (e and f) In tumor specimens, pericellular fibrosis was observed, whereas fibrous bands in which bile ductules were proliferating were not. On the basis of the finding of pericellular fibrosis, a diagnosis of focal nodular hyperplasia was made. The original magnification was  $\times 20$ .

**Table 1** Results of enzyme activity measurements in the patient and controls

Peripheral blood	Patient	Control 1	Control 2	
Debranching enzyme	14.8	24.9	19.1	Nmole glucose/hour/mg
Phosphorylase	6.3	6.1	7.2	Nmole/min/mg
Phosphorylase b kinase	45.8	44.5	42.0	Nmole/min/g Hb
Liver	Patient	Controls		
Debranching enzyme	243.4	197.4 $\pm$ 32.8 ( $n = 10$ )		Nmole glucose/hour/mg
Phosphorylase	2.3	9.6 $\pm$ 1.7 ( $n = 10$ )		Nmole/min/mg
Phosphorylase b kinase	49.6	62.7 $\pm$ 11.8 ( $n = 9$ )		Nmole/min/mg

## References

- 1 Franco LM, Krishnamurthy V, Bali D *et al.* Hepatocellular carcinoma in glycogen storage disease type Ia: A case series. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2005; **28**: 153–62.
- 2 Demo E, Frush D, Gottfried M *et al.* Glycogen storage disease type III-hepatocellular carcinoma a long-term complication? *J. Hepatol.* 2007; **46**: 492–8.
- 3 Ito E, Sato Y, Kawauchi K *et al.* Type Ia glycogen storage disease with hepatoblastoma in siblings. *Cancer* 1987; **59**: 1776–80.
- 4 Takamura M, Mugishima H, Oowada M, Harada K, Uchida T. Type Ia glycogen storage disease with focal nodular hyperplasia in siblings. *Acta Paediatr. Jpn.* 1995; **37**: 510–3.
- 5 Petsas T, Tsamandas A, Tsota I *et al.* A case of hepatocellular carcinoma arising within large focal nodular hyperplasia with review of the literature. *World J. Gastroenterol.* 2006; **12**: 6567–71.
- 6 Lee PJ. Glycogen storage disease type I: Pathophysiology of liver adenomas. *Eur. J. Pediatr.* 2002; **161**(Suppl 1): S46–9.
- 7 Proux D, Dreyfus JC. Phosphorylase isoenzymes in tissues: Prevalence of the liver type in man. *Clin. Chim. Acta* 1973; **48**: 167–72.
- 8 Proux D, Vibert M, Meienhofer MC, Dreyfus JC. The isozymes of glycogen phosphorylase in human and rabbit tissues. II. Electrofocusing in polyacrylamide gels. *Clin. Chim. Acta* 1974; **57**: 211–6.
- 9 Burwinkel B, Bakker HD, Herschkovitz E, Moses SW, Shin YS, Kilimann MW. Mutations in the liver glycogen phosphorylase gene (PYGL) underlying glycogenesis type VI. *Am. J. Hum. Genet.* 1998; **62**: 785–91.

Original article

## Study of *HOXD* genes in autism particularly regarding the ratio of second to fourth digit length

Yoko Sugie<sup>a,\*</sup>, Hideo Sugie<sup>b</sup>, Tokiko Fukuda<sup>b</sup>, Junko Osawa<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Pediatrics, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, Shizuoka, Japan

<sup>b</sup> Department of Pediatrics, Jichi Medical University and Jichi Children's Medical Center, Tochigi, Japan

Received 30 December 2008; received in revised form 14 May 2009; accepted 16 May 2009

### Abstract

Multiple genes are involved in the pathogenesis of autism. To study the causative gene, the relationship between autism endo-phenotypes and their closely related genes has been analyzed. There is a subgroup of autism spectrum disorder (ASD) in which the ratio of second digit length to fourth digit length (2D/4D) is low (short digit group, SDG). We studied the relationship between ASD and *HOXD* genes, which are located in the candidate locus for ASD and are associated with digit morphogenesis, with a particular focus on SDG. We analyzed 25 SNPs of *HOXD11*, *HOXD12*, and *HOXD13* in the subject of 98 ASD, 89 healthy controls, and 16 non-autistic patients (non-ASD). There was no significant difference in the genotype frequencies between the ASD and the healthy controls. However, the G-112T heterozygote in the promoter region of *HOXD11* was observed in only four patients with ASD and in none of the healthy controls or non-ASD subjects. Moreover, this *HOXD11* G-112T was observed in three of 11 SDG with ASD but in none of the 15 non-SDG patients with ASD. There were eight SDG patients among the non-ASD ones, but this polymorphism was observed in none of them. Considering the above results, it is expected that candidate genes will be further identified, using *HOXD11* G-112T polymorphism as a marker, by analyzing genes located near 2q in a larger number of ASD subjects with clinical signs of SDG.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Autism; *HOXD*; 2D/4D; Endophenotype; Genetic polymorphism

This research was partly supported by a Grant-in-Aid for the Mentally and Physically Handicapped from the Ministry of Health, Labor and Welfare and the research Grant (14B-4-17) for Nervous and Mental Disorders from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan. The authors declare that they have no competing interests.

\* Corresponding author. Address: Department of Pediatrics, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1, Handayama, Higashi-ku, Hamamatsu 431-3192, Japan. Tel.: +81 53 435 2312; fax: +81 53 435 4311.

E-mail addresses: y-sugie@umin.ac.jp (Y. Sugie), sugie@jichi.ac.jp (H. Sugie), toki-fukuda@jichi.ac.jp (T. Fukuda), yusosawa@nifty.com (J. Osawa).

0387-7604/\$ - see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.braindev.2009.05.005

### 1. Introduction

Autism is basically characterized by severely impaired social interaction and communication, and a limited range of activities and interests. As the diagnosis of autism is made on the basis of patients' behavioral characteristics, the disorder is not caused by only one factor. It is considered that various genetic and environmental factors are involved in the occurrence of autism, and their interactions are complex. In 1998, the International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSC) reported their genome-wide linkage analysis of families in which there was more than one member with idiopathic autism [1]. On the basis of the results of a subsequent large-scale genome-wide scan, candidate

Please cite this article in press as: Sugie Y et al. Study of *HOXD* genes in autism particularly regarding the ratio of second to fourth digit length. Brain Dev (2009), doi:10.1016/j.braindev.2009.05.005

gene loci, including 7q21.2–q36.2, 16p12.1–p13.3, 6q14.3–q23.2, 2q24.1–q33.1, 17q11.1–q21.2, 1q21–q44, and 3q21.3–q29, were identified [2]. In an attempt to increase the linkage, a nearly homogeneous group was selected among patients with autism of heterogeneous causes. Autism patients were classified into subgroups or subsets in accordance with the phenotype of autism [3], such as through a quantitative trait locus (QTL) analysis of the constituent elements of endophenotypes in autism [4], and an ordered-subset analysis [5] was carried out. The ratio of second digit (2D) length to fourth digit (4D) length (2D/4D) is very low in some autism patients [6,7]. The *homeo box D (HOXD)* gene family is involved in skeletal morphogenesis, and correlations between digit length and the expression levels of *HOXD11*, *HOXD12*, and *HOXD13* have been observed [8,9]. In addition, *HOXD* genes form a cluster at 2q24.1–q33.1, which has been found to be a candidate locus by a genome-wide scan [3]. Therefore, we considered that digit length is one of the small physical signs of autism. Hence, we investigated the relationships between autism and polymorphism of *HOXD11*, *HOXD12*, and *HOXD13*. Moreover, we classified autism patients into two categories: patients with a low 2D/4D formed the short digit group (SDG), while the remaining patients formed the non-short-digit group (non-SDG). We also examined the genetic polymorphism of these three genes between SDG and non-SDG with autism and also between SDG with and without autism. No analysis of autism focusing on these relationships has been reported to date.

## 2. Subjects and methods

Seven patients with autism in the SDG were screened for the presence or absence of gene mutations in the exon and intron of *HOXD11*, *HOXD12*, and *HOXD13*, and for gene polymorphisms. The genotypic frequencies of the detected polymorphisms and the polymorphisms already listed in the GenBank were compared between the autism patients and the controls. Finally, the genotypes of the above polymorphisms of the autism patients in SDG were investigated.

### 2.1. Subjects

The subjects examined by genetic analysis in this study were 98 patients who visited the Department of Pediatrics, Hamamatsu University School of Medicine and Hamamatsu City Medical Center for Developmental Medicine, and who were diagnosed as having autism, PDD-NOS, and Asperger syndrome on the basis of the criteria in the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV [10]). Patients with clear underlying diseases such as chromosomal abnormalities, tuberous sclerosis, and Fragile X syndrome were

excluded from the study. The patients were of 82 males and 16 females with ages ranging from 5 years and 2 months to 31 years and 10 months (mean age: 12 years and 7 months). In terms of ethnicity, 95 patients had Japanese parents, 2 had Japanese fathers and Filipino mothers, and 1 had Bangladeshi parents. Eighty-nine subjects without any neurological abnormality served as healthy controls for gene analysis; all of them were Japanese and their sex and age were not determined. Thirty patients were also examined as disease controls, including 16 non-autistic patients, 14 mentally retarded patients, and 2 AD/HD patients, all of whom were Japanese.

### 2.2. Measurement of second and fourth digit lengths

A digital camera providing three-megapixel images was used for the measurement of the 2D and 4D lengths. Each subject's right hand was placed palm-up on a flat desk, and was photographed with the camera 20 cm above the hand. Three pediatric neurologists separately measured the 2D and 4D lengths from the line of the base to the tip of the digits three times using the image analyzing software Scion Image (NIH). The mean ratio of 2D length to 4D length (2D/4D) was calculated. In this study, patients with lower than the mean 2D/4D of the autism patients reported by Osawa et al., that is, a 2D/4D of 0.94 or lower, were classified as SDG [7].

### 2.3. Gene analysis

Seven patients with autism (6 males and 1 female) in the SDG were screened for the presence or absence of gene mutations and gene polymorphisms by the direct sequencing method. *HOXD11*, *HOXD12*, and *HOXD13* – each consisting of two exons and one intron – were searched for in a region from approximately 500 bp upstream, including a promoter, to approximately 500 bp downstream of the gene. Genomic DNA extracted from lymphocytes using a DNA extraction kit (Takara Co., Shiga, Japan) was used. DNA was amplified by PCR using a Taq PCR Core kit (QIAGEN Co., CA, USA), and the base sequence was obtained by the direct sequencing method. Genotypes were determined for single nucleotide polymorphism (SNP) in five loci that were newly found by this method in this study and for SNP in 20 loci that are listed in the online database GenBank (NCBL dbSNP). Genotypes in some loci were also determined by real-time PCR analysis using a TaqMan allelic discrimination assay (Applied Biosystems).

### 2.4. Statistical analysis

Genotypic frequency and allelic frequency of the autism patients were compared to those of the healthy con-

trol group using a  $\chi^2$  test or Fisher's exact test with SPSS 12.0J for a Windows-based System. A statistical significance level of  $p \leq 0.05$  was set.

### 3. Results

2D/4D was determined in 28 patients (24 males and 4 females) out of the 98 autism patients. Eleven patients (9 males and 2 females) of these 28 patients were classified as SDG. The clinical features of these patients, including sex, age, and the severity of mental retardation, are shown in Table 1. A high percentage of patients with severe mental retardation were observed in SDG with autism, whereas no patients with severe mental retardation were observed in non-SDG with autism. We also measured 2D/4D in 16 non-autistic patients in the disease control group, and 8 patients were classified as SDG and 8 patients as non-SDG. The results of the 2D/4D values of the 28 ASD and 30 non-ASD patients are shown in Fig. 1.

The results of the polymorphism analysis are shown in Table 2. No significant difference in polymorphism was observed between the autism patients and the healthy control group. However, with regarding to

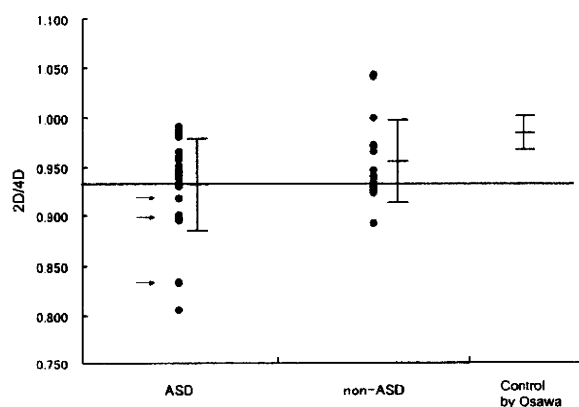


Fig. 1. 2D/4D values for the ASD28 cases and the non-ASD30 cases. Mean  $\pm$  SD was presented. The M-ASD line is the average for the ASD cases; at or below this line is the SDG. As a reference, we showed the mean  $\pm$  SD for normally healthy children as calculated by Osawa et al. [7]. The arrow indicates cases with *HOXD11* heterogeneity.

SNP in the promoter region of *HOXD11* G-112T, heterozygosity was observed in 4 autism patients, but not in the healthy or disease control group. The SNP in the promoter region of *HOXD12* -C226A and the SNP in

Table 1  
Clinical features of patients.

	All the autistic disorder patients	Patients with 2D/4D determined		
		Total	SDG	NSDG
Number of patients	98	28	11	17
Sex				
Males:females	82:16 (5.1:1)	24:4 (5.5:1)	9:2 (4.5:1)	15:2 (7.5:1)
Age	5 y 2 m–31 y 10 m	5 y 4 m–31 y 10 m	8 y 1 m–31 y 10 m	5 y 4 m–16 y 7 m
Median	11 y 6 m	12 y 0 m	14 y 4 m	9 y 2 m
Mean	12 y 7 m	12 y 11 m	16 y 6 m	10 y 4 m
Family history: (3 generations)				
With <sup>a</sup>	22 (22.4%)	10 (35.7%)	3 (30.0%)	7 (41.2%)
Those with autism	7 (7.3%)	5 (17.9%)	2 (20.0%)	3 (17.4%)
Without	69 (70.4%)	16 (57.1%)	7 (70.0%)	7 (41.2%)
Mental retardation				
Without	10 (10.3%)	7 (25.0%)	2 (18.2%)	5 (29.4%)
Minor	21 (21.6%)	6 (21.4%)	2 (18.2%)	4 (23.5%)
Moderate	44 (45.4%)	10 (35.7%)	2 (18.2%)	8 (47.1%)
Severe	22 (22.7%)	5 (17.9%)	5 (45.5%)	0
Age at walk alone	9–48 m (91 cases)	9–48 m (26)	11–48 m (10)	9–18 m (16)
Median	13 m	12 m	12 m	12 m
Mean	13.9 m	14.3 m	18 m	12.9 m
Age at first word	10 m–6 y 10 m (80 cases)	11 m–6 y 10 m (25)	11 m–6 y 10 m (10)	1 y 3 m–3 y 5 m (15)
Median	1 y 6 m	1 y 6 m	1 y 6 m, 1 y 11 m	1 y 10 m
Mean	1 y 9 m	2 y 1 m	2 y 4 m	1 y 11 m
No. of patients 2 y or over	28	10	4	6
Age at first phrase	1 y 6 m–5 y 0 m (31 cases)	1 y 7 m–5 y 0 m (13)	2 y 6 m–5 y 0 m (5)	1 y 7 m–4 y 0 m (8)
Median	2 y 11 m	2 y 11 m	3 y 0 m	2 y
Mean	2 y 10 m	2 y 9 m	3 y 2 m	2 y 5 m
No. of patients 3 y or over	16	5	3	2

<sup>a</sup> Family history with psychiatric disorders including major depression, autism etc.

Please cite this article in press as: Sugie Y et al. Study of *HOXD* genes in autism particularly regarding the ratio of second to fourth digit length. Brain Dev (2009), doi:10.1016/j.braindev.2009.05.005