

図2 Pompe病の骨格筋病理所見

空胞化線維が大半を占める乳児型(a) (a-i: HE染色, a-ii: mGT)に比べて, 小児型(b) (b-i: HE染色, b-ii: mGT)では空胞化線維の数は少ない. 空胞化線維を認めない成人型(c) (c-i: mGT, c-ii: ACP)ではACP活性をもつ球状封入体が診断の手がかりになる例がある(矢印)(Bar 50 μ m).

活性と相関し, 乳児型と遅発型に分類される. 乳児型は全身性の筋緊張低下(floppy infant)や肝腫大, 巨舌を呈し, 呼吸不全や肥大型心筋症を伴う. 無治療ではほぼ18カ月以内に亡くなる予後不良な疾患であったが, 新生児期早期の酵素補充療法による心肥大の抑制や運動発達の獲得などの効果により予後は著明に改善している³⁾.

遅発型は発症時期により小児型と成人型に大別される. 近位筋優位の筋力低下は緩徐進行性であるが, 歩行可能な時期から呼吸障害が進行し呼吸不全が死因となることが多い. 遅発型Pompe病を無治療で18カ月間観察した結果, forced vital capacity (FVC) 予測値が2.2%低下したという報告がある⁴⁾. 心筋症の合併は稀である.

3. 骨格筋病理所見

骨格筋病理組織では好塩基性のもやもやした物質を含む巨大な空胞が特徴的である. とくに乳児型では筋線維の細胞質のほとんどが占拠され, 80%以上の筋線維が空胞化するが(図2-a), 遅発型では症状の程度に応じて空胞化の程度は軽くなる(図2-b, c). この特異な空胞化は診断に直結する所見であるが, とくに成人型ではわずかに縁取り空胞のような空胞を認めるのみで診断的所見に乏しい例が存在する(図2-c). このような非特異的な所見のみの例ではGomoriトリ

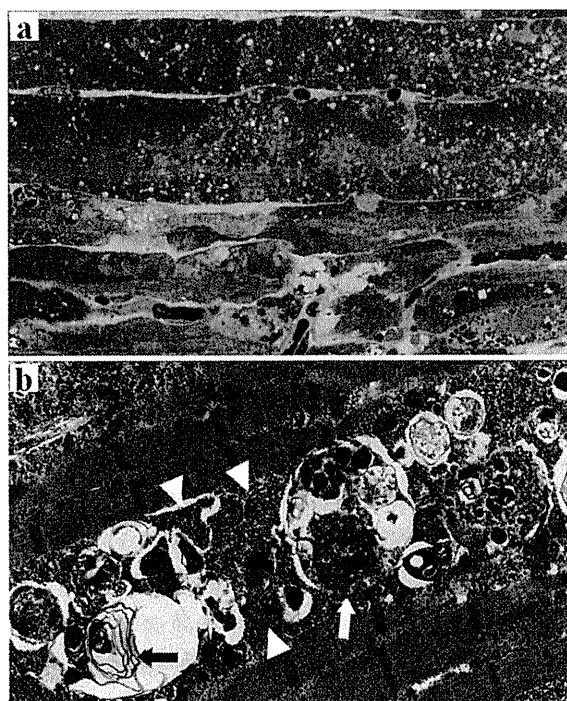


図3 Pompe病のエボン包埋PAS染色と電子顕微鏡写真

(a) 乳児型のエボン包埋PAS染色では充満したグリコーゲン(赤紫色)が確認できる. (b) 電子顕微鏡写真ではグリコーゲンが沈着し(矢頭), 周囲にミエリン様小体(黒矢印)や分解産物が集積した自己貪食空胞(白矢印)が多数みられる($\times 8,000$).

クローム変法(mGT)で紫色の球状の封入体が診断的所見になる. この封入体は酸フォスファター

ゼ活性を有する。

Periodic acid Schiff(PAS)染色はグリコーゲンを染色するが、通常の凍結筋ではグリコーゲンが抜けて濃染しない。しかし、電子顕微鏡用にエポン包埋した検体を用いてPAS染色をするとグリコーゲンが充満していることが確認できる(図3-a)。

電子顕微鏡による観察では、ライソゾーム内や筋原線維間に多量のグリコーゲン顆粒が蓄積するとともにミエリン様小体やグリコーゲンや細胞質分解産物の充満した自己貪食空胞が観察される(図3-b)。

4. 診 断

とくに成人型では他疾患との臨床的な鑑別がしばしば困難である⁵⁾。国立精神・神経医療研究センター(NCNP)の骨格筋レポジトリに登録されている遅発型Pompe病22例のうち、筋病理診断前にPompe病が疑われていた例は5例(22.7%)のみであった。主な臨床診断は肢体型筋ジストロフィーやBecker型筋ジストロフィー、先天性ミオパチーであり、血清クレアチンキナーゼ(CK)値は正常範囲内から3,000 IU/lほどの高値までとさまざまであった。筋疾患診断の際にはPompe病を常に鑑別診断として念頭におく必要がある。Pompe病の確定診断は骨格筋、リンパ球、濾紙血、線維芽細胞などを用いたGAA酵素活性の測定ならびに遺伝子解析によりなされる。

5. 治 療

2010年に組み換えrecombinant human GAA (rhGAA) 製剤による酵素補充療法の初めてのランダム化比較試験の結果が報告された⁴⁾。10~70歳の遅発型Pompe病患者をGAA治療群60人と無治療群30人に無作為に分けて78週間の経過を評価した。6分間歩行距離およびFVC予測値を主要エンドポイントとして評価し、歩行および呼吸機能がGAA治療群において優位に保たれることを示した。治療による改善は治療開始26週までの早期に得られ、その後はほぼ横ばいに保たれるという傾向があった。これはおそらく、すでに不可逆的な障害が生じた筋線維では効果が乏しいためと考えられ、早期治療開始の重要性が示唆される。抗rhGAA IgG抗体は治療群全例で陽性であったが明らかな影響はなかったと報告

されている。酵素補充療法の有効性が示される一方で、治療反応性に乏しい例や長期経過で症状が増悪していく例もある。また、治療の長期化に伴う抗rhGAA IgG抗体の影響や高額な治療費用も今後の課題である。

AVSF関連ミオパチー

AVSFを特徴とするAVMを時にAVSF関連ミオパチーと呼ぶ。AVSFの形成機序はまだ明らかではないが、筋鞘膜の性質を有する空胞膜は空胞内で新生されると推定されている⁶⁾。また、Danon病のモデルであるLAMP2欠損マウスの観察によると、加齢に伴ってAVSFの数は増加することが知られている。

AVSF関連ミオパチーとしてはDanon病およびXMEAが代表的である。そのほかに、AVM with late-onset and multiorgan involvementとしてAVSFを伴うAVMに網膜色素変性症、心筋症、肝腫大、尿細管障害を合併した41歳男性例が報告されている⁷⁾。また、XMEAに類似した筋病理所見を呈する小児期発症の双子女児2例が報告されている⁸⁾。

1. Danon病

a. 病 態

Danon病はlysosome-associated membrane protein-2(LAMP-2)をコードするLAMP2遺伝子変異によるX連鎖優性遺伝の稀な疾患である⁹⁾。LAMP-2はライソゾーム膜の主要な構成蛋白質であり、ライソゾームの移動やオートファゴゾームとの融合に関与している。LAMP-2にはエクソン9の選択的スプライシングによるLAMP-2A/B/Cの三つのアイソフォームが存在する。LAMP-2Aは組織普遍的に発現し、LAMP-2Bは主に心筋、骨格筋および脳に発現していることが知られているが、LAMP-2Cについてはまだ明らかではない点が多い。

b. 臨床症状

典型的な臨床症状として肥大型心筋症、ミオパチー、精神遅滞の三徴を呈する。男性患者は10歳代に症候化し、30歳以前に死亡することが多い。女性保因者は男性患者よりも遅く、通常は40歳前後で発症する。男女ともに主に肥大型心筋症、時に拡張型心筋症は必発であり、Wolff-

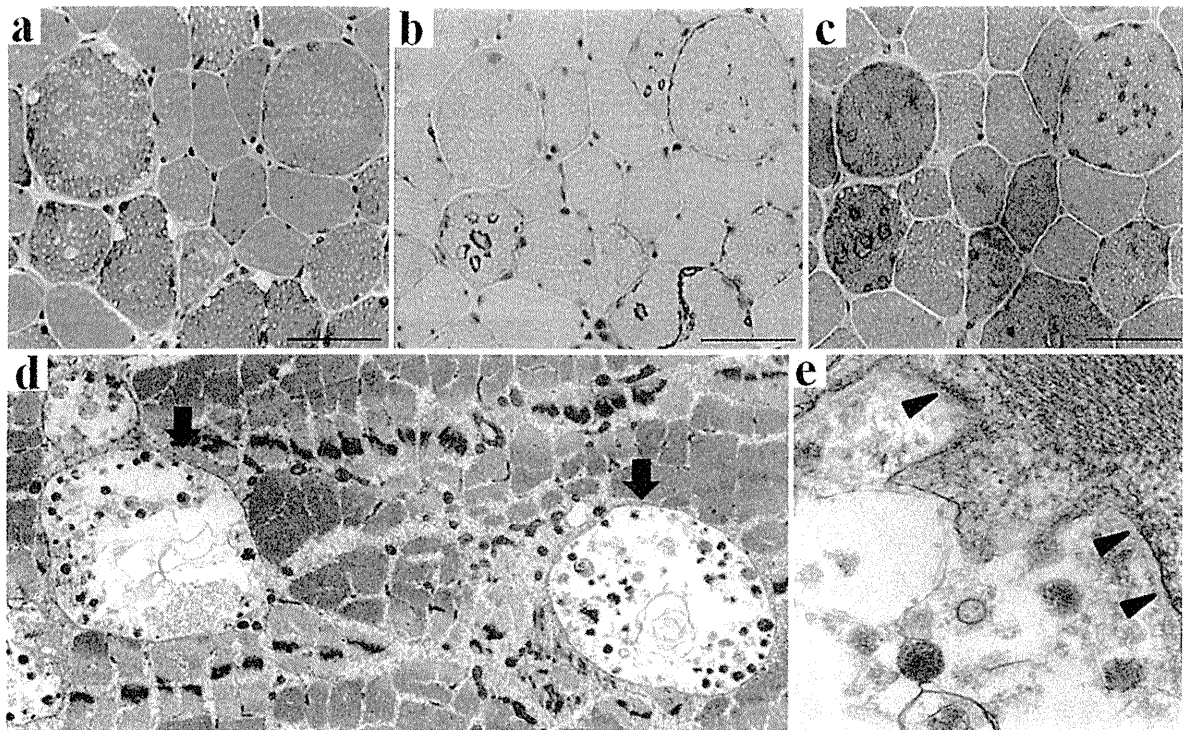


図4 Danon病の骨格筋病理所見と電子顕微鏡写真

小空胞(a:mGT)はAChE染色(b)やNSE染色(c)で陽性に染色される(Bar 50 μ m). 電子顕微鏡では膜で覆われた空胞がみられ(d:矢印, $\times 5,000$), その膜の一部には基底膜を認める(e:矢頭, $\times 10,000$).

Parkinson-White (WPW)症候群などの心伝導障害を高率に合併し, 突然死のリスクも高い. 血清CK値は男性では無症候の小児期から高値を示すが, 女性では正常~高値例までさまざまである. 筋力低下および精神遅滞は軽度であることが多い.

c. 骨格筋病理所見

骨格筋病理所見では軽度~中等度の筋線維径の大小不同があり, 小空胞をもつ筋線維が散在する(図4-a). 壊死・再生線維はない. この小空胞の膜にAChE活性が認められ, AChE染色やNSE染色で陽性に染色される(図4-b, c). 女性保因者では異常所見のない例や15~20%のAVSFを呈する若年発症例が報告されている¹⁰⁾.

電子顕微鏡による観察では膜で覆われていない自己貪食空胞やミエリン様小体も蓄積しているが, 不定形の異常な構造物やグリコーゲン顆粒を含む膜で覆われた空胞が特徴的である(図4-d). この膜の一部には基底膜がみられる(図4-e).

d. 診断と治療

診断は免疫染色やWestern blotによるLAMP-2欠損およびLAMP2遺伝子解析による. 女性保因者ではLAMP-2蛋白は欠損~正常までさまざま

ある. LAMP-2Bをコードするエクソン9Bの変異は臨床症状が比較的軽症であることが知られている¹¹⁾. 現状では心移植以外の治療法はなく, 新たな治療法の開発が求められている.

2. X-linked myopathy with excessive autophagy (XMEA)

a. 病態

X連鎖性の非常に稀な疾患である. Xq28のVMA21遺伝子が原因遺伝子の有力候補である¹²⁾. このVMA21遺伝子がコードするVMA21蛋白はvacuolar ATPase (V-ATPase)というプロトンポンプの複合体構造の構成に重要な役割をもち, その欠損はV-ATPaseの活性を低下させる. V-ATPaseはライソゾームの酸性pH維持に働くため, この障害によりライソゾーム内のpHが高くなり, ライソゾームの機能異常をきたすと推定されているが, まだ明らかではない点も多い.

b. 臨床症状

発症は小児期から中年期まで幅広く, 緩徐進行性の筋力低下, 500~1,000 IU/l程度の中等度の高CK血症を呈する¹³⁾. 心筋症や中枢神経症状はない. 時に呼吸障害を伴うが基本的には長生きする. Danon病とは異なり, 症候性の女性保因

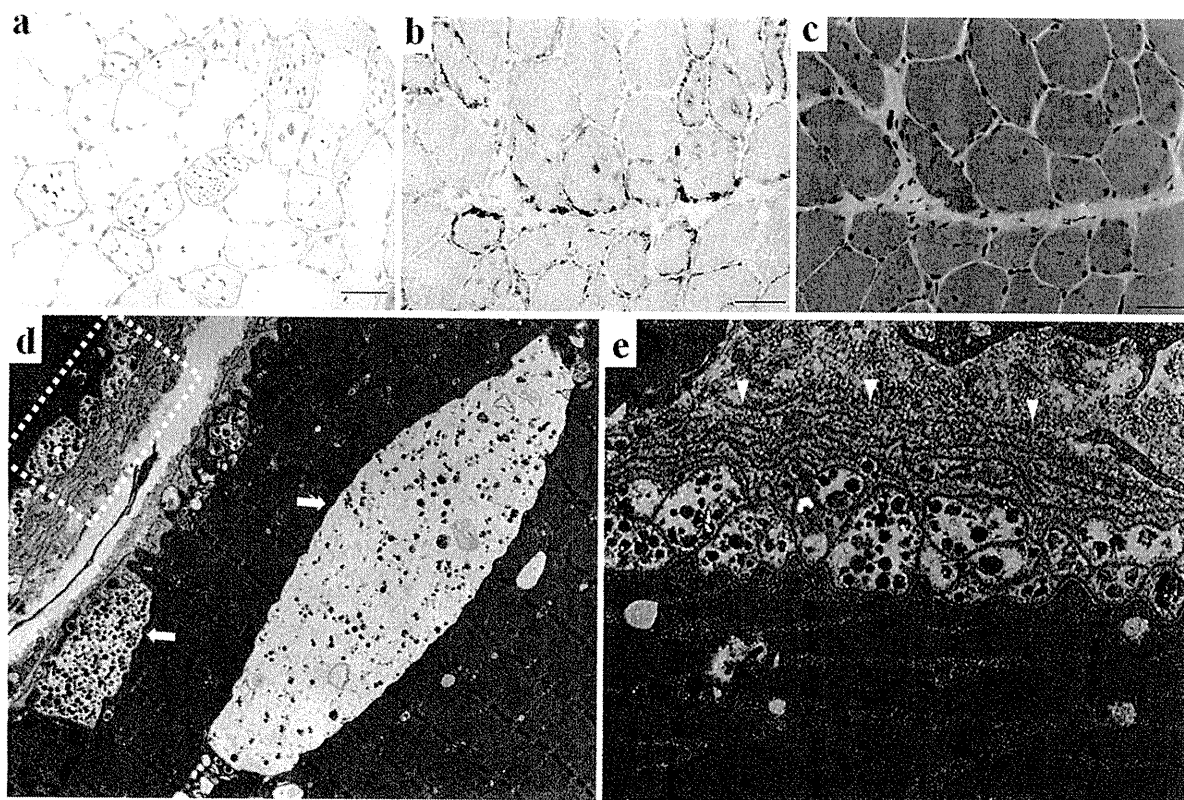


図5 XMEAの骨格筋病理所見と電子顕微鏡写真

多数のAVSFを認め(a: AChE染色), 非壊死線維にmembrane attack complex(MAC)が沈着している(b: 抗MAC抗体による免疫染色, c: bの連続切片, HE染色)(Bar 50 μ m). 電子顕微鏡では筋鞘膜下や筋原線維間に多数の空胞を認める(d: 矢印, $\times 3,000$). また, 基底膜が何層にも重なっているのが特徴的である(e: 矢頭, dの点線部拡大).

者は報告されていない。

c. 骨格筋病理所見

骨格筋病理所見では中等度の筋線維径の大小不同があり, 壊死・再生線維は認めない. AVSFを有する筋線維は全体の20~80%を占める(図5-a).

XMEAではDanon病と異なる病理所見が二つある⁶⁾¹³⁾. 一つ目は筋鞘膜への補体c5b-9のmembrane attack complex(MAC)の沈着である. しばしば壊死線維では非特異的にMACの沈着を認めるが, XMEAでは非壊死線維でこの所見がみられ, 興味深い所見である(図5-b, c). 二つ目は基底膜の多層化である. 電子顕微鏡による観察では, 基底膜が何層にも重なりその下の筋鞘膜下には多数の空胞が並んでいる. 同様の空胞は筋原線維間にも散在する(図5-d, e). 空胞内部には比較的均一な電子密度の高い球状構造やグリコーゲン顆粒などが充満している.

d. 診断と治療

発症年齢も幅広く, 臨床症状のみでは他疾患

との鑑別は困難である. X連鎖性の家族歴に加えて電子顕微鏡を含む骨格筋病理所見が診断に重要である. 現時点では原因遺伝子として推定されているVMA21遺伝子解析が診断の一助となる. しかし, まだ病態も明らかではない点が多く, 現状では有効な治療法も見出されていない. 今後の研究進展が期待される.

3. 縁取り空胞を伴う遠位型型ミオパチー(DMRV)

a. 病態

DMRVは欧米では主に遺伝性封入体ミオパチー(hereditary inclusion body myopathy: hIBM)と呼ばれている. 当初は1981年に埜中らが初めて報告したことから埜中ミオパチーまたは, その罹患部位からquadriceps sparing myopathy(QSM)と呼ばれていた¹⁴⁾¹⁵⁾. DMRVはGNE遺伝子の主にミスセンス変異による常染色体劣性遺伝性疾患である. 日本人とユダヤ人で多くの患者が見出されている.

GNE遺伝子はシアル酸の生合成にかかわる酵

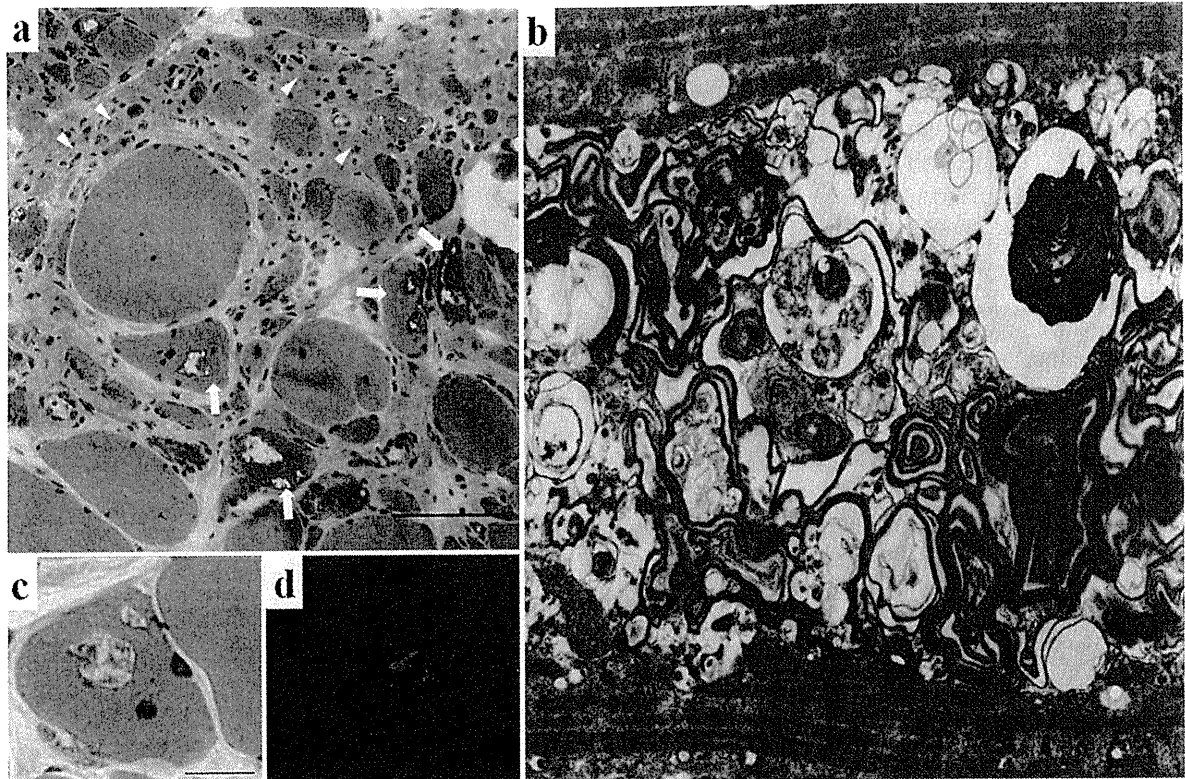


図6 DMRVの骨格筋病理所見と電子顕微鏡写真

(a) 萎縮線維が群を成し(矢頭), 縁取り空胞を伴う筋線維が散在する(矢印)(Bar 50µm). (b) 電子顕微鏡では縁取り空胞は自己貪食空胞やミエリン様小体の集積である(×3,000). (c, d) Congo-red染色では空胞内にアミロイド沈着を認める(Bar 20µm).

素であるUDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (UDP-GlcNac2-epimerase : GNE) / N-acetylmannosamine kinase (ManNac kinase : MNK) をコードしている. ほ乳類ではシアル酸の合成経路は一つしかないため, *GNE* 遺伝子変異による酵素活性の低下により体内のシアル酸レベルが低下する. 実際にDMRV患者の血清や骨格筋組織, 細胞ではシアル酸が低下している¹⁶⁾.

シアル酸は細胞膜表面の糖脂質や糖蛋白の糖鎖の主として末端糖として取り込まれ, 細胞の相互認識や接着, 分化など多彩な役割を担っていると考えられている. 体内で合成される以外に食物からも吸収されている.

b. 臨床症状

男女ともに通常は10歳代後半から40歳前に発症する. 病初期から下腿前面の前脛骨筋が選択的に侵されるためスリッパが脱げやすい, つまづきやすいなど垂れ足の症状で気づかれる. 筋力低下および筋萎縮は進行し, 次第に大腿後面のハムストリングや腰帯部, さらに頸部屈筋群も侵されていくが, QSMと呼ばれるように大腿

四頭筋は保たれる. 緩徐進行例もあるが, 発症から平均12年で歩行不能となる. 通常は呼吸筋障害や心筋症は伴わない. 血清CK値は正常上限値~1,000 IU/l程度と上昇は軽度である. *DYSF* 遺伝子変異による三好型(遠位型)ミオパチーは発症時期は同じであるが, 下腿後面の腓腹筋が選択的に侵される点や血清CK値は数1,000 IU/l単位の著明な高値を示す点で鑑別できる.

c. 骨格筋病理所見

骨格筋病理所見では筋線維径の大小不同は中等度で, 時に萎縮線維が群をなしてみられる. 複数の縁取り空胞をもつ線維が散在する(図6-a). 壊死・再生線維はみられない. 縁取り空胞は実際に空洞化しているのではなく, 電子顕微鏡レベルでは自己貪食空胞やミエリン様小体の集積である(図6-b). Congo-red染色では空胞内にアミロイドの沈着を認める(図6-c, d).

d. 診断と治療

発症年齢および罹患筋の分布はほかの遠位型ミオパチーとの臨床的な鑑別のポイントとなる(表2)¹⁷⁾¹⁸⁾. 骨格筋病理所見での縁取り空胞は鑑

表2 遠位型ミオパチーの鑑別診断

| 疾患名 | 発症年齢(歳) | 遺伝形式 | 原因遺伝子 | 罹患筋分布(下腿) |
|---------------------------------------|---------|------|--------------|-----------|
| Miyoshi myopathy | 15~30 | AR | <i>DYSF</i> | 後面 |
| DMRV | 15~40 | AR | <i>GNE</i> | 前面 |
| OPDM | >40 | AD | ? | 前面 |
| VCPDM | 35~55 | AD | <i>MATR3</i> | 前面 |
| Laing myopathy | 1~25 | AD | <i>MHY7</i> | 前面 |
| Udd myopathy | >35 | AD | <i>TTN</i> | 前面 |
| Desminopathy | 15~40 | AD | <i>DES</i> | 腓側 |
| Myotilinopathy | 40~60 | AD | <i>MYOT</i> | 後面 |
| Zaspopathy | 40~60 | AD | <i>ZASP</i> | 後面 |
| Early adulthood-onset distal myopathy | 15~25 | AD | <i>KLHL9</i> | 前面 |

DMRV : distal myopathy with rimmed vacuoles, OPDM : oculopharyngeal muscular dystrophy, VCPDM : vocal cord and pharyngeal weakness with distal myopathy. AR : 常染色体劣性, AD : 常染色体優性. (文献¹⁷⁾改変, 文献¹⁸⁾参照)

別診断の一つであるmyofibrillar myopathyでも時にみられる。確定診断は*GNE*遺伝子解析による。ほぼすべてが機能喪失型のミスセンス変異である。日本人ではp. V572L変異がもっとも多く、次いでp. D176V変異が多い。

NCNPのグループでは2007年にヒトのDMRV症状を再現したDMRVモデルマウスを作成し、その病態解析および治療法の開発を行ってきた。*Gne*ノックアウトマウス(*Gne*^{-/-})は胎生致死のため、p. D176V変異をもつヒト*GNE*を発現するトランスジェニックマウス(h*GNED176V-Tg*)と交配し、最終的にはp. D176V変異をもつヒト*GNE*のみを発現するマウス(*Gne*^{-/-}h*GNED176V-Tg*)を作成した¹⁹⁾。このマウスは生下時からシアル酸レベルが低く、20週齢頃から筋萎縮を呈し、筋力低下が進行する。また、30週齢頃から筋線維内にアミロイドが蓄積し、40週齢頃から縁取り空胞が出現する。この経過から、アミロイドの蓄積が縁取り空胞の出現に先行することが明らかになった。

治療研究においては、まず患者培養細胞を用いた*in vitro*の研究で*GNE*を介して合成されるN-acetylmannosamine (ManNAc)やシアル酸であるN-acetylneuraminic acid (NeuAc)の投与により細胞内のシアル酸レベルが回復することを示した¹⁶⁾。さらに発症前のモデルマウスにManNAcや

NeuAc, シアリル乳糖を継続的に経口投与した結果、骨格筋のシアル酸レベルが上昇し、ミオパチーの発症が抑えられることを報告した²⁰⁾。骨格筋病理所見では縁取り空胞は出現せず、継続的な投与により生存率が改善した。

低シアル酸がDMRVを生じる機構についてはまだ議論の余地がある。しかし、このシアル酸代謝産物の投与によるミオパチーの発症抑制は低シアル酸がDMRVの病態解明および治療開発の鍵であることを示唆している。現在、この知見を基に実際の臨床試験を開始している。

まとめ

多くの自己食空胞性ミオパチー(AVM)はまだ研究途上にあり、有効な治療法が見出されている疾患はまだ少ない。AVMの病態解明はautophagyの機構を解明する重要な手がかりになると考えられ、今後のさらなる研究発展が期待される。

文献

- 1) Nishino I. Autophagic vacuolar myopathy. *Semin Pediatr Neurol* 2006 ; 13 : 90-5.
- 2) 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 ; 17 : 3897-908.
- 3) Chien YH, Lee NC, Thurberg BL, et al. Pompe disease in infants : improving the prognosis by newborn screening and early treatment. *Pediatrics* 2009 ; 124 : e1116-25.
- 4) van der Ploeg AT, Clemens PR, Corzo D, et al. A randomized study of alglucosidase alfa in late-onset Pompe's disease. *N Engl J Med* 2010 ; 362 : 1396-406.
- 5) Kishnani PS, Steiner RD, Bali D, et al. Pompe disease diagnosis and management guideline. *Genet Med* 2006 ; 8 : 267-88.
- 6) 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 : 513-22.
- 7) Kaneda D, Sugie K, Yamamoto A, et al. A novel form

- of autophagic vacuolar myopathy with late-onset and multiorgan involvement. *Neurology* 2003 ; 61 : 128-31.
- 8) Holton JL, Bessley C, Jackson M, et al. Autophagic vacuolar myopathy in twin girls. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006 ; 32 : 253-9.
- 9) Nishino I, Fu J, Tanji K, et al. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* 2000 ; 406 : 906-10.
- 10) Kim H, Cho A, Lim BC, et al. A 13-year-old girl with proximal weakness and hypertrophic cardiomyopathy with Danon disease. *Muscle Nerve* 2009 ; 41 : 879-82.
- 11) Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, et al. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. *Neurology* 2002 ; 58 : 1773-8.
- 12) Ramachandran N, Munteanu I, Wang P, et al. VMA21 deficiency causes and autophagic myopathy by compromising V-ATPase activity and lysosomal acidification. *Cell* 2009 ; 137 : 235-46. (Retracted)
- 13) Chabrol B, Figarella-Branger D, Coquet M, et al. X-linked myopathy with excessive autophagy : a clinicopathological study of five new families. *Neuromuscul Disord* 2001 ; 11 : 376-88.
- 14) Nonaka I, Sunohara N, Ishiura S, et al. Familial distal myopathy with rimmed vacuole and lamellar (myeloid) body formation. *J Neurol Sci* 1981 ; 51 : 141-55.
- 15) Argov Z, Yarom R. "Rimmed vacuolar myopathy" sparing the quadriceps. A unique disorder in Iranian Jews. *J Neurol Sci* 1984 ; 64 : 33-43.
- 16) 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 : 11402-7.
- 17) Griggs R, Vihola A, Hackman P, et al. Zaspopathy in a large classic late-onset distal myopathy family. *Brain* 2007 ; 130 : 1477-84.
- 18) Fischer D, Kley RA, Strach K, et al. Distinct muscle imaging patterns in myofibrillar myopathies. *Neurology* 2008 ; 71 : 758-65.
- 19) Malicdan MC, Noguchi S, Hayashi YK, 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 : 2669-82.
- 20) 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 : 690-5.

* * *



縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーのシアル酸補充療法

Sialic Acid Supplementation Therapy for Distal Myopathy with Rimmed Vacuoles

西野 一三* 野口 悟*

Ichizo Nishino*, Satoru Noguchi*

Abstract

Distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV), also called hereditary inclusion body myopathy, is an autosomal recessive disease that typically affects tibialis anterior and hamstring muscles in young adults although other muscles are also involved in later stages. The disease is caused mostly by missense mutations in the *GNE* gene that encodes a protein with two enzymatic activities in sialic acid biosynthetic pathway: UDP-GlcNAc 2-epimerase and ManNAc kinase, respectively catalyzing the rate-limiting step and the subsequent reaction. Accordingly, sialic acid production is reduced in patients' cells and cells are hyposialylated. We have previously shown that this hyposialylation status can be recovered by simply giving sialic acid, suggesting that hyposialylation status in the muscle should be the cause of myopathy. In support of this notion, myopathic manifestations were virtually completely suppressed by oral administration of sialic acid in our DMRV model mice. Similar efficacy was seen also by ManNAc, precursor of sialic acid, or sialyllactose, a conjugate form of sialic acid. Based upon these *in vitro* and *in vivo* results, phase I clinical trial for sialic acid supplementation therapy for human patients was conducted in Japan in 2011. Another phase I trial, using slow release tablets of sialic acid, is currently in progress in the US. Hopefully, phase II trial to see the efficacy of the therapy will be initiated soon.

Key words : distal myopathy with rimmed vacuoles, hereditary inclusion body myopathy, *GNE* myopathy, myopathy, rimmed vacuole, *GNE*, sialic acid, ManNAc

はじめに

本邦においては、希少疾病は患者数5万人未満の疾患と定義される。教科書的に、筋疾患の中で最も頻度が高いとされるデュシェンヌ型筋ジストロフィーですら、本邦での患者数は1,500~3,000人程度と推定されており、希少疾病の定義である患者数の1割にも満たない。したがって、筋疾患はすべて希少疾病である。本稿で述べる縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーは本邦での患者数が150~400人程度と推計されており、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの1/10、希少疾病の基準患者数の1/100

にすら満たない“超”希少疾病である。希少疾病用医薬品は、その開発の難しさからしばしばオーファン・ドラッグと呼ばれるが、縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーのような“超”希少疾病用医薬品はさらに開発が困難であり、最近、特にウルトラオーファン・ドラッグと呼ばれるようになってきている。本疾患は、幸いにして、治療法開発方法の原理を本邦研究室で確立することができた。

本稿では、本邦におけるウルトラオーファン・ドラッグ開発のモデルケースとなることを願いつつ進めている縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー治療薬開発の現状を、その疾患の概要とともに記す。

* 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〔〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1〕Department of Neuromuscular Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP), 4-1-1 Ogawahigashi-cho, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan

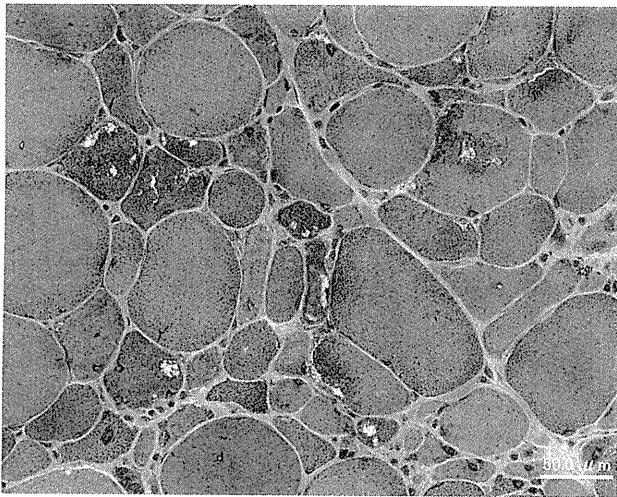


Fig. 1 DMRVの筋病理

萎縮した筋線維が散見され、一部ではまとまって存在している。一方、非萎縮線維は代償性にやや肥大している。萎縮線維を中心に縁取り空胞が認められる。(ゴモリトリクローム変法染色)

I. 縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー

1. 疾患名

本疾患は、1981年に本邦において世界に先駆けて報告された疾患であり、「縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (distal myopathy with rimmed vacuoles: DMRV)」と命名された¹⁻³⁾。諸外国では、しばしば、埜中ミオパチー (Nonaka myopathy) とも呼ばれる。

DMRVが報告されて3年後に、1984年にイスラエルのArgovら⁴⁾により、臨床病理学的に極めて類似する筋疾患が、quadriceps sparing myopathy (QSM)として報告された。その後QSMは、封入体筋炎 (inclusion body myositis: IBM) との病理学的類似性から、Askanasら⁵⁾により遺伝性封入体ミオパチー (hereditary inclusion body myopathy: hIBM) と呼ばれることが提唱され、現在に至っている。

本邦を中心とするアジア諸国ではDMRVが、欧米ではhIBMが病名として用いられることが多い。あるいは、遺伝性の封入体ミオパチーの中で、常染色体優性遺伝のものをIBM1としたため、本症はIBM2とも呼ばれる。しかし、hIBMまたはIBM2という病名は、炎症性筋疾患であり明らかに病態の異なる封入体筋炎と同じ略語が用いられており混乱しやすい。そのため、洋の東西を問わず専門家の間ではhIBMという病名に対して批判的な意見が強い。混乱を防ぐ目的で統一的な名称を求める動きも強く、最近では、後に述べる原因遺伝子名に

基づきGNE myopathyと呼ぶことが提唱されつつある。

2. 臨床症状

本邦では血族婚が少ないこともあり、世代をまたぐ家族歴を有する患者はいない。同胞発症もあるが、患者の多くは孤発例である。一般に発症年齢は15~40歳で、男女ともに罹患する¹⁻³⁾。前脛骨筋が好んでおかされ、スリッパが脱げやすい、あるいは、段差でつまずきやすいなどの垂れ足の症状で異常に気づくことが多い¹⁻³⁾。頸部屈筋群、傍脊柱筋、大腿後面の膝屈筋群もおかされやすいが、比較的後期まで大腿四頭筋が保たれる。

筋力低下と筋萎縮は進行し、発症からおよそ10年で歩行不能となる。デュシェンヌ型筋ジストロフィーが4~5歳頃に発症し、15歳までに歩行不可能となることを考えると、DMRVの進行はデュシェンヌ型筋ジストロフィーと同程度に早いと考えることもできる。ただし、患者によって重症度や進行速度にかなり差があることがわかってきている。生命予後に関する知見は確立していない。

3. 筋病理所見

筋病理では、小角化した萎縮線維とともに、筋線維内に一部が空胞状に白く抜けて、その周りがゴモリトリクローム変法で赤紫色に染まる顆粒状物質で囲まれる構造が認められる。この構造を縁取り空胞 (rimmed vacuole) という¹⁻³⁾ (Fig. 1)。縁取り空胞を電子顕微鏡で観察すると、自己貪食空胞あるいはその類縁構造物であるミエリン様小体 (myeloid body) が集塊をなしている¹⁻³⁾。核内および細胞質の一部には、直径15~20 nmの管状線維性封入体 (tubulofilamentous inclusion) を認める¹⁻³⁾。縁取り空胞にも管状線維性封入体にも疾患特性はなく、縁取り空胞が出現する疾患ではほぼ例外なく管状線維性封入体が認められることに注意が必要である。

しばしば、筋線維内にβアミロイドの沈着やリン酸化タウ蛋白質を認め、アルツハイマー病類似の変性過程が存在すると考えられている^{1-3,5)}。自己貪食空胞は、しばしばβアミロイドの沈着と近接して存在している。ユビキチン・プロテアソーム系の活性化やアポトーシスの関与を示唆するデータもあり、さまざまな変性のプロセスが知られている。

4. 原因遺伝子

DMRV/hIBMの原因遺伝子は第9染色体上のGNEである^{6,7)}。このGNEはシアル酸生合成経路の律速段階

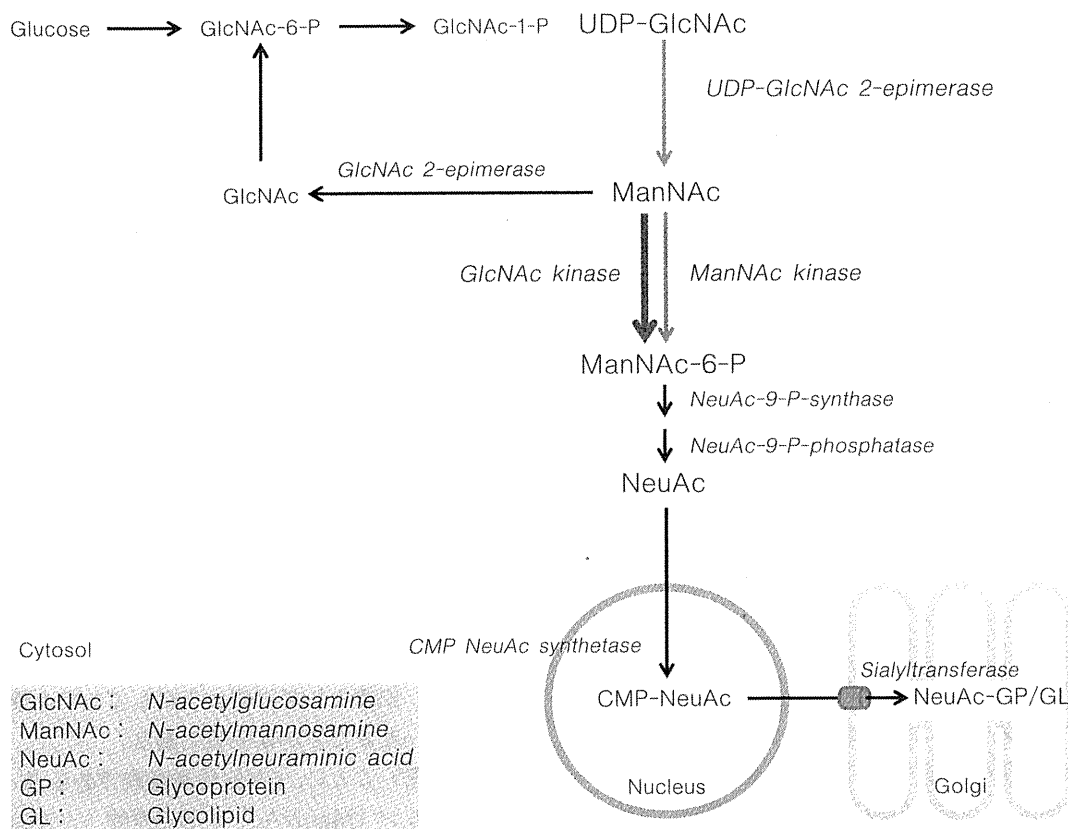


Fig. 2 シアル酸合成経路

シアル酸 [ヒトの場合は *N*-アセチルノイラミン酸 (NeuAc)] は細胞質でグルコースから生合成される。合成された NeuAc は核に移行して CMP-NeuAc となり、これがゴルジ体において、糖蛋白質または糖脂質の糖鎖合成に用いられる。糖鎖にシアル酸が取り込まれる現象をシアル化という。DMRV の原因遺伝子 *GNE* がコードする蛋白質は、シアル酸生合成経路律速段階の UDP-*N*-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) → *N*-アセチルマンノサミン (ManNAc) の反応を触媒する UDP-*N*-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼ (UDP-GlcNAc 2-epimerase : *GNE*) と、その次の反応 (ManNAc → ManNAc-6-P) を触媒する酵素 *N*-アセチルマンノサミン・キナーゼ (ManNAc kinase) の 2 つの酵素活性を有している。このうち、後者の反応については、細胞質内に豊富に存在する *N*-アセチルグルコサミン・キナーゼ (GlcNAc kinase) も同じ反応を触媒できることから、恐らく DMRV においては、*N*-アセチルマンノサミン・キナーゼ活性の低下ではなく、UDP-*N*-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼ活性の低下が本質的な原因と考えられる。後述するように、*GNE* 遺伝子に変異があっても ManNAc を投与することでシアル酸合成およびその後のシアル化を回復できることは、GlcNAc kinase が ManNAc kinase の反応を代償できる事実と合致する。

を触媒する酵素 UDP-*N*-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼ (UDP-GlcNAc 2-epimerase : *GNE*) と、その次の反応を触媒する酵素 *N*-アセチルマンノサミン・キナーゼ (ManNAc kinase) の 2 つの酵素活性を持つ蛋白質をコードしている (Fig. 2)。患者で見出されるほぼすべての変異がミスセンス変異であり、両アレルに null 変異を有する例は 1 例も報告されていない。

日本人では、p.V572L 変異が 1 番多く、日本人患者アレルの半数以上を占めている。次に多いのが、p.D176V 変異で、20% 程度のアレル頻度である⁷⁾。韓国でも p.V572L 変異が最も多いが⁸⁾、北京では p.D176V 変異が

最も高頻度という (Dr. Yun Yuan, Personal communication)。ユダヤ人患者では、大半の患者が p.M712T を有している^{9,10)}。これ以外にも世界各地から、多くの共通変異が見出されてきている。

遺伝子型・表現型相関 (genotype-phenotype correlation) についてははっきりとその存在を示した論文はないが、p.M712T を有するユダヤ人患者よりも主に p.V572L を有する日本人患者のほうが重症傾向にあるようである (Dr. Zohar Argov, Personal communication)。ただし、同じ変異を有する患者であっても重症度にはかなりばらつきがあることがわかっており、話は単

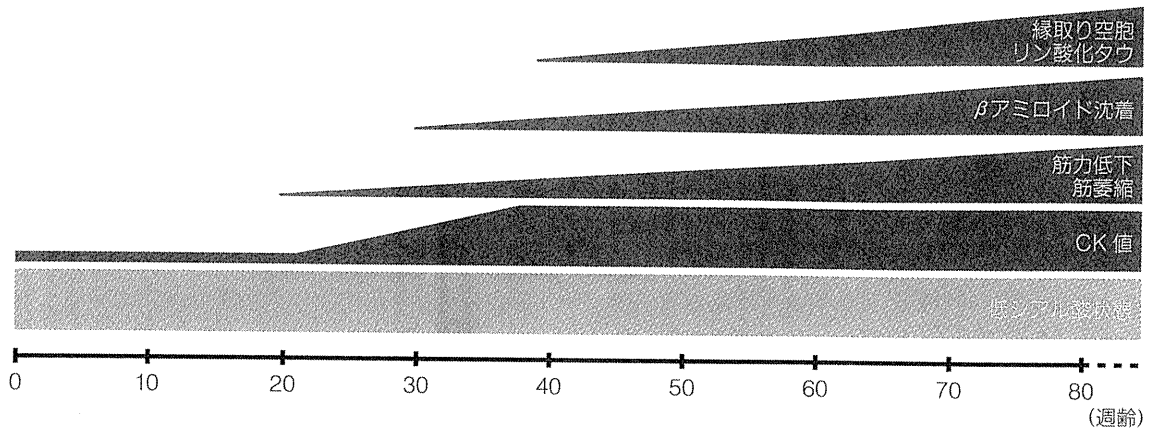


Fig. 3 DMRV モデルマウスの疾患再現性

国立精神・神経医療研究センターで作製したモデルマウスは、20 週齢過ぎから筋力低下と筋萎縮を、30 週齢過ぎから β アミロイド沈着、40 週齢過ぎから線取り空胞やリン酸化タウを認める。さらに、血中 CK 値が 20 週齢過ぎから軽度上昇する。一方、各種臓器での低シアル酸状態（シアル酸欠乏）は、生下時より持続的に認められる。これらの変化は、臨床的・病理学的・生化学的に DMRV を良好に再現している。

純ではない^{7,11)}。さらに興味深いことに、*GNE* 遺伝子にホモ接合型の変異を有しているながら、60 歳を過ぎても無症状の健常者も存在する^{7,10)}。このことは、*GNE* 変異の存在のみが DMRV/hIBM 発症の決定的な因子ではないことを意味している。言い換えるならば、もしこのような因子を見出すことができれば、治療法開発の糸口となる可能性がある。

5. 疫学

正確な患者数を知ることは困難であるが、国立精神・神経医療研究センターで行っている筋病理診断サービスでの検体数からは、国内で 150~400 名程度と推計される。これまでに国立精神・神経医療研究センターで遺伝学的診断を確定した例は、既に 150 名を超えている。他施設での診断例を併せると、本邦には少なくとも 200 名を超える患者が存在するものと考えられる。遺伝学的診断が確立している患者に関していえば、本邦の患者数は世界最多である。

II. 分子病態から治療法開発へ

1. 生化学的異常

DMRV における *GNE* 変異は、機能喪失型変異であり、酵素活性が低下している⁷⁾。そのためシアル酸量が減少し、患者細胞ではシアル化が低下している¹²⁾。シアル酸は細胞表面の糖脂質および糖蛋白質上のオリゴ糖の末端に広範に存在しており、細胞表面の保護や細胞の相互認識など多彩かつ重要な役割を担っていると考えられて

いるが、依然としてどのようにしてシアル酸の低下がミオパチーをきたすかは不明である。

興味深いことに、*GNE* 代謝産物である *N*-アセチルマンノサミン (ManNAc) や最終産物 (シアル酸) である *N*-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) を患者培養細胞に投与すると、線維芽細胞、骨格筋細胞のいずれにおいても、正常レベルまで細胞内シアル酸量が回復する¹³⁾。このことは、もし、低シアル化がミオパチーの原因であるならば、既に *in vitro* で治療できていることを意味している。

2. モデルマウスの作製

GNE 遺伝子をノックアウトさせたマウス *Gne*^{-/-} は胎生致死である¹⁴⁾。このことは、シアル酸合成が哺乳類の発生にとって必須であることを意味している。事実、DMRV 患者で見出される変異はほぼすべてミスセンス変異であり、null 変異のホモ接合体は見出されていない。

米国 National Institute of Health のグループは、ユダヤ人患者に認められる p.M712T 変異を有するノックインマウスの作製を行った。しかし、ホモ接合型マウスは、重篤な腎障害を呈し、ほぼすべてが生後 72 時間以内に死亡した¹⁵⁾。妊娠母胎に ManNAc を投与したところ、12 匹が誕生したが、9 匹が 12 日までに死亡した。いずれのマウスにおいても筋障害を認めなかった。

これに対し、国立精神・神経医療研究センターでは、運よくヒト DMRV を良好に再現するマウスの作製に成功した¹⁶⁻¹⁸⁾ (Fig. 3)。われわれは、まず、*GNE* トランスジェニックマウス (h*GNE*D176V-Tg) を作製した。この

マウスは、日本人患者で2番目に多い p.D176V 変異を有するヒト *GNE* を高発現するものである¹⁴⁾。この hGNED176V-Tg マウスと *Gne*^{-/-} のヘテロ接合体マウス (*Gne*^{+/-}) を掛け合わせて、内在性のマウス *Gne* を欠き p.D176V 変異を有するヒト *GNE* のみを発現する DMRV モデルマウス (*Gne*^{-/-} hGNED176V-Tg) を作製した¹⁴⁾。

この DMRV モデルマウスは、生下時には特に異常を認めないものの、20 週齢以降に筋力低下と筋萎縮、運動能力低下を示した¹⁷⁾。また、血中 CK 値も軽度上昇していた。30 週齢からは、骨格筋内 β アミロイド沈着、40 週齢以降には縁取り空胞、リン酸化タウを認めるとともに、筋萎縮と筋力低下はさらに進行した (Fig. 3)。シアル酸は血中および脳を除くすべての組織で著しく減少していた。すなわち、臨床的・病理学的・生化学的に、ヒト患者における表現型を良好に再現していたのである。

3. 治療法開発研究

まず、DMRV モデルマウスに対して、離乳時から ManNAc を 3 種類の投与量 (低用量 20 mg/kg/day, 中用量 200 mg/kg/day, 高用量 2,000 mg/kg/day) で飲水に混ぜ、連続投与した。その結果、いずれの用量においても、50 週齢を越えても、運動能力低下、筋萎縮、筋力低下、縁取り空胞形成、 β アミロイド沈着、リン酸化タウ、高 CK 血症などの所見をいずれも認めず、ほぼ完全に DMRV 発症を抑制できた¹⁷⁾。

そこで、次に、NeuAc ならびにシアリル乳糖を低用量 20 mg/kg/day で飲水投与した。その結果、NeuAc、シアリル乳糖においても同様に、ほぼ完全に DMRV を抑制することに成功した¹⁹⁾。ManNAc、NeuAc、シアリル乳糖の 3 種類の化合物間で有効性の違いはみられなかった。骨格筋内のシアル酸は正常の 70% 程度にまで回復していた。また、これら 3 種類の化合物の長期投与において、肝機能と腎機能への毒性は認めなかった。これらの結果は、低シアル酸状態が確かにミオパチーの原因となっていること、外部から *GNE* 代謝産物を投与することでミオパチーを予防できることを示している¹⁷⁾。

この結果を受け、後に述べるように、NeuAc を用いた第 I 相試験が日本および米国で実施されている。まだ、NeuAc のヒトへの効果は不明であるが、少なくともモデルマウスにおいては、単純な NeuAc や ManNAc の投与では、骨格筋内のシアル酸量を完全に正常化することはできていない。さらに治療効果を高めることを考えると、骨格筋内のシアル酸量をさらに増加させる必要性がある。われわれのグループは、ManNAc を人工的に

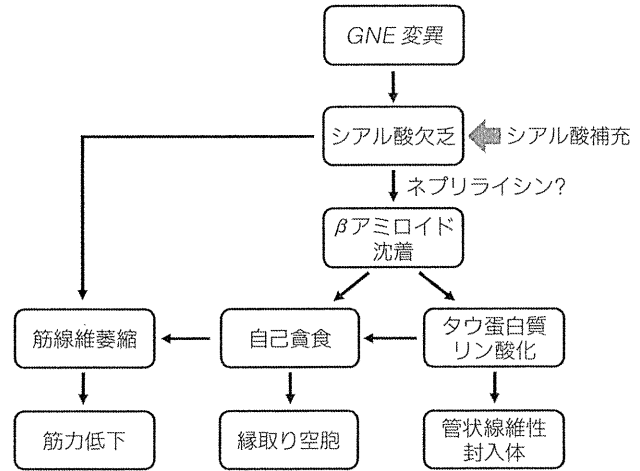


Fig. 4 DMRV の分子病態

これまでに明らかになった事実から、シアル酸欠乏こそが、ミオパチーの原因となっており、筋萎縮、 β アミロイド沈着、縁取り空胞形成などの変化は、その下流現象として生じていると考えられる。シアル酸補充によりこのシアル酸欠乏を回復させることができれば、一連の下流現象を止めることができるはずである。シアル酸補充療法はこのような考え方に基いている。

アセチル化したテトラ-O-アセチル ManNAc がより強力なシアル酸増加効果を有し、より高い治療効果を有することを見出している²⁰⁾。

4. 依然として不明な分子病態

われわれは、モデルマウスでの実験において、シアル酸代謝物投与によって骨格筋のシアル酸レベルを上昇させることで、ミオパチー症状を抑制できることを示した¹⁷⁾。このことは、ミオパチーが低シアル酸状態を原因としていること、すなわち、DMRV はいわば先天的なシアル酸欠乏症であることを意味している (Fig. 4)。

それでは、なぜシアル酸欠乏によってミオパチーをきたすのであろうか。 β アミロイド蛋白質の分解に関わる膜金属ペプチダーゼのネプリライシンにおいては、そのシアリル化がペプチダーゼ活性に必要なことから、脱シアリル化によって β アミロイド沈着をきたすと考える研究者もいる²¹⁾。DMRV 発症へのネプリライシンの関与の程度についてはさらなる検討を待つ必要があるが、筋変性を引き起こす分子病態の詳細を明らかにすることができれば、新たな治療法開発への道が開けるだけでなく、同様に β アミロイド沈着や縁取り空胞の出現を認める封入体筋炎などの根本的治療法がない疾患に対しても治療法開発への道が開ける可能性がある。

III. 臨床試験

2010年11月から東北大学神経内科の青木正志教授をリーダーとするチームによって、シアル酸製剤の薬物動態を探る第I相試験が6名の患者を対象として、医師主導型治験の形で行われた(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01236898)。途中、2011年3月11日に東北地方太平洋沖地震に見舞われたものの、2011年6月末までに、予定された試験は無事終了した。最大で、1日2,400 mgを5日間投与したが、有害事象はまったく認められなかった。さらに、米国では2011年9月から、シアル酸徐放剤を用いた第I相試験が企業主導で実施されている(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01359319)。本試験においては、最大、1日4,875 mgが7日間投与される。早ければ、2011年12月末には終了し、2012年中にも、第II相試験を開始したいとしている。

IV. これから進むべき道

基礎研究レベルでは、既にシアル酸の有効性を示すことができた。シアル酸欠乏症であるDMRVにシアル酸を補充することは、極めて理にかなった治療法である。加えて、シアル酸は日常的に食事から摂取しているものであり、本質的に毒性が高いとは考えられない。このように比較的安全と予想され、その理論的根拠が明確である治療法であっても、DMRVのような“超”希少疾病で第I相試験にたどり着くのは容易ではなかった。これは、ひとえに希少疾病薬開発が、仮に治験に成功したとしてもその費用を回収するためのマーケットが小さく、製薬会社にとっては極めてリスクの高いプロジェクトであるからである。そのため、希少疾病の治療薬開発に乗り出そうとする製薬企業は、特に日本では、皆無に近いのが現状である。

このような現状を克服しようと、遠位型ミオパチー患者会(<http://enigata.com>)が立ち上がり、署名集めや政府・関係省庁・国会への要望書提出など精力的な活動を繰り広げてきた。これまでに180万筆を越す署名を集めたが、このことは、日本の一般人口のおよそ70人に1人がDMRVという疾患名を耳にしたことがあることを意味している。DMRVのような“超”希少疾病がこれほど認知されている国は、世界中どこを探しても日本以外にはない。曲がりなりにも第I相試験を行うことができたのは、このような患者会の活動があってこそである。実際、シアル酸製剤開発を引き受けるべく企業を説得した

のも患者会であった。今後ともDMRVのような“超”希少疾病の治療薬開発が問題になると予想されるが、遠位型ミオパチー患者会の活動は素晴らしいモデルケースとなるであろう。

今後、実際に「くすり」として世の中に出るまでには、まだまだ多くの困難が待ち受けており、患者・医師・研究者・製薬会社・関係省庁などの関係者が協力していくことが必須である。DMRVのような“超”希少疾病の治療薬開発、すなわち、ウルトラオーファン・ドラッグの開発においては、教科書的な対応をしてはまったく埒が明かない。関係者は、不可能を可能にするという意識で、現在の各種規制に立ち向かっていくことが必要であろう。

基礎研究レベルでは、単なるシアル酸補充から一步進んで、シアル酸欠乏により生じている筋変性現象のより深い病態理解と、その病態理解に基づく治療法開発が求められる。このような治療法が開発されれば、シアル酸補充にアドオンの形で投与が行われ、より高い治療効果を期待できると考えられる。また、われわれは骨髄移植や遺伝子治療の可能性も探っている。しかしこのような理論的に根本的な治療が成功しても、進行期の患者において、失われた骨格筋を元に戻すことはそう簡単ではないだろう。DMRVに限らず、筋疾患の根本的な治療法開発では、このような失われた筋肉の再生を視野に入れていく必要がある。

文献

- 1) Nonaka I, Sunohara N, Ishiura S, Satoyoshi E: Familial distal myopathy with rimmed vacuole and lamellar (myeloid) body formation. *J Neurol Sci* 51: 141-155, 1981
- 2) Nonaka I, Murakami N, Suzuki Y, Kawai M: Distal myopathy with rimmed vacuoles. *Neuromuscul Disord* 8: 333-337, 1998
- 3) Nonaka I: Distal myopathies. *Curr Opin Neurol* 12: 493-499, 1999
- 4) Argov Z, Yarom R: 'Rimmed vacuole myopathy' sparing the quadriceps. A unique disorder in Iranian Jews. *J Neurol Sci* 64: 33-43, 1984
- 5) Askanas V, Engel WK: Sporadic inclusion-body myositis and hereditary inclusion-body myopathies: current concepts of diagnosis and pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol* 10: 530-542, 1998
- 6) Eisenberg I, Avidan N, Potikha T, Hochner H, Chen M, et al: The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy. *Nat Genet*

- 29: 83-87, 2001
- 7) Nishino I, Noguchi S, Murayama K, Driss A, Sugie K, et al: Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy. *Neurology* **59**: 1689-1693, 2002
 - 8) Kim BJ, Ki CS, Kim JW, Sung DH, Choi YC, et al: Mutation analysis of the GNE gene in Korean patients with distal myopathy with rimmed vacuoles. *J Hum Genet* **51**: 137-140, 2006
 - 9) Eisenberg I, Grabov-Nardini G, Hochner H, Korner M, Sadeh M, et al: Mutations spectrum of GNE in hereditary inclusion body myopathy sparing the quadriceps. *Hum Mutat* **21**: 99, 2003
 - 10) Argov Z, Eisenberg I, Grav-Nardini G, Sadeh M, Wirguin I, et al: Hereditary inclusion body myopathy: The middle Eastern genetic cluster. *Neurology* **60**: 1519-1523, 2003
 - 11) Arai A, Tanaka K, Ikeuchi T, Igarashi S, Kobayashi H, et al: A novel mutation in the GNE gene and a linkage disequilibrium in Japanese pedigrees. *Ann Neurol* **52**: 516-519, 2002
 - 12) Noguchi S, Keira Y, Murayama K, Ogawa M, Fujita M, et al: Reduction of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase activity and sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles. *J Biol Chem* **279**: 11402-11407, 2004
 - 13) Bardor M, Nguyen DH, Diaz S, Varki A: Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. *J Biol Chem* **280**: 4228-4237, 2005
 - 14) Schwarzkopf M, Knobeloch KP, Rohde E, Hinderlich S, Wiechens N, et al: Sialylation is essential for early development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 5267-5270, 2002
 - 15) Galeano B, Klootwijk R, Manoli I, Sun M, Ciccone C, et al: Mutation in the key enzyme of sialic acid biosynthesis causes severe glomerular proteinuria and is rescued by N-acetylmannosamine. *J Clin Invest* **117**: 1585-1594, 2007
 - 16) Malicdan MC, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I: 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* **16**: 2669-2682, 2007
 - 17) Malicdan MC, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: 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* **35**: 106-115, 2008
 - 18) Malicdan MC, Noguchi S, Nishino I: Recent advances in distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV) or hIBM: treatment perspectives. *Curr Opin Neurol* **21**: 596-600, 2008
 - 19) Malicdan MC, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I: Prophylactic treatment with sialic acid metabolites precludes the development of the myopathic phenotype in the DMRV-hIBM mouse model. *Nat Med* **15**: 690-695, 2009
 - 20) Malicdan MC, Noguchi S, Tokutomi T, Goto YI, Nonaka I, et al: Peracetylated N-acetylmannosamine, a synthetic sugar molecule, effectively rescues muscle phenotype and biochemical defects in a mouse model of sialic acid deficient myopathy. *J Biol Chem* **287**: 2689-2705, 2012
 - 21) Broccolini A, Gidaro T, De Cristofaro R, Morosetti R, Gliubizzi C, et al: Hyposialylation of neprilysin possibly affects its expression and enzymatic activity in hereditary inclusion-body myopathy muscle. *J Neurochem* **105**: 971-981, 2008



Patient Report

Case of glycogen storage disease type VI (phosphorylase deficiency) complicated by focal nodular hyperplasiaAtsushi Ogawa,¹ Emi Ogawa,¹ Shigenori Yamamoto,¹ Tokiko Fukuda,² Hideo Sugie² and Yoichi Kohno¹¹Department of Pediatrics, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba-shi, Chiba and ²Department 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.

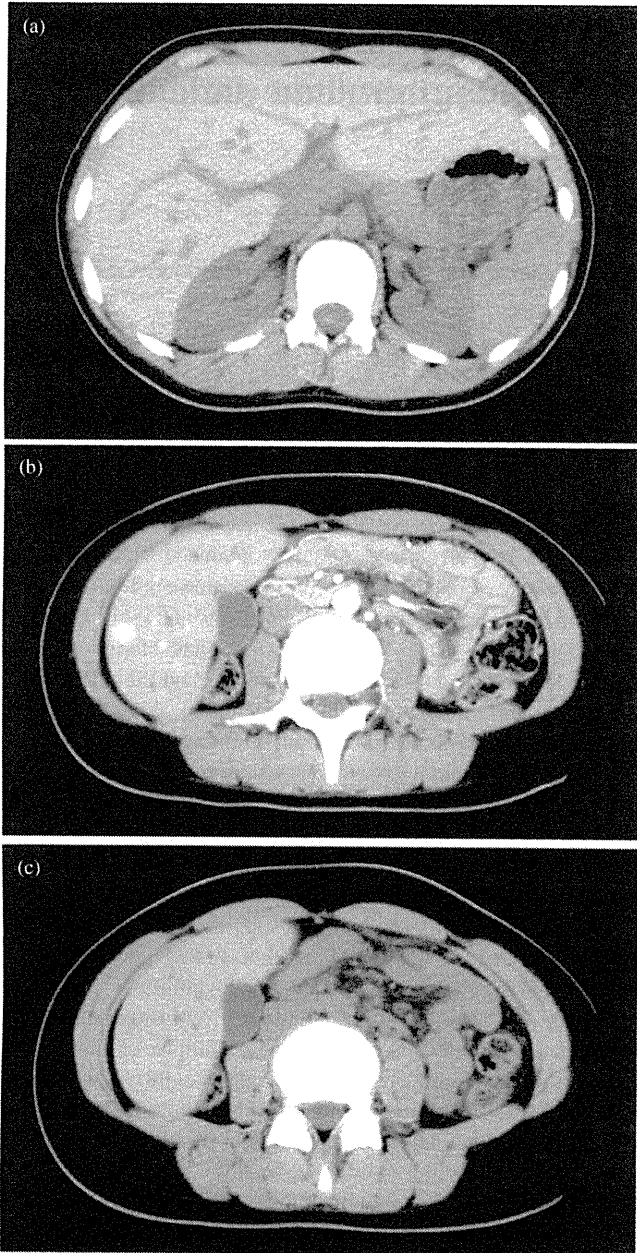


Fig. 1 (a) The findings of a plain abdominal computed tomography (CT) scan at 5 years of age. The CT value of the liver was markedly elevated compared with that of the spleen and kidneys. (b) The findings of the early phase of a contrast-enhanced abdominal CT scan at 15 years of age showing an enhanced 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),¹ described in patients with GSD III,² hepatoblastomas,³ and FNH⁴ 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,¹ 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 recently⁵ 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.⁶ 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,^{7,8} 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.⁹ 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.

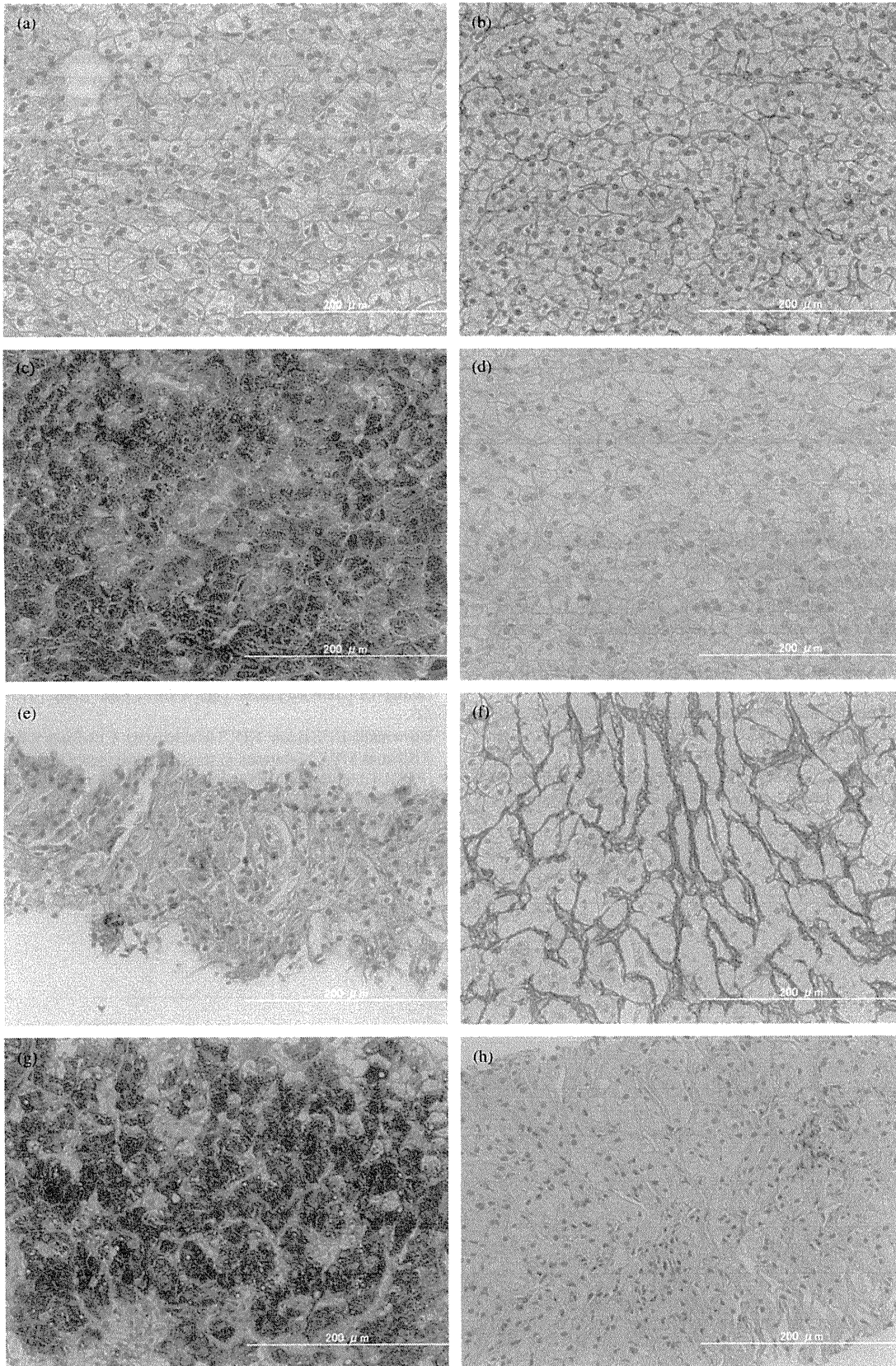


Fig. 2 Histological findings of the liver from (a–d) non-tumor and (e–h) tumor specimens. (a and e) Hematoxylin–eosin (HE) stain, (b and f) silver staining, (c and g) periodic acid-Schiff (PAS) staining and (d and h) PAS staining after diastase treatment. In the non-tumor specimen, the hepatocytes had (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 glycogenosis type VI. *Am. J. Hum. Genet.* 1998; **62**: 785–91.



Letter to the Editor

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

Tatsuki Mizuochi,¹ Akihiko Kimura,¹ Hiroshi Nishiura,¹ Yukihiko Inomata,⁴ Hideaki Okajima,⁴ Hideo Sugie,⁶ Hiroshi Mitsubuchi,⁵ Minoru Yagi² and Masayoshi Kage³

Departments of ¹Pediatrics and Child Health, and ²Pediatric Surgery, and ³Pathology, Kurume University School of Medicine, Kurume, and Departments of ⁴Pediatric Surgery and Transplantation and ⁵Pediatrics, Kumamoto University Graduate School of Medical Science, Kumamoto University, Kumamoto, and ⁶Department 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.^{1,2} 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.³ 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;^{2,4,5} however, this may not improve extrahepatic manifestations in the same patients.⁴

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/ μ 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, γ -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.⁵ 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 μ mol Pi/min/mg protein; control, 1.2 ± 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;^{6,7} 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.

© 2011 The Authors

Pediatrics International © 2011 Japan Pediatric Society

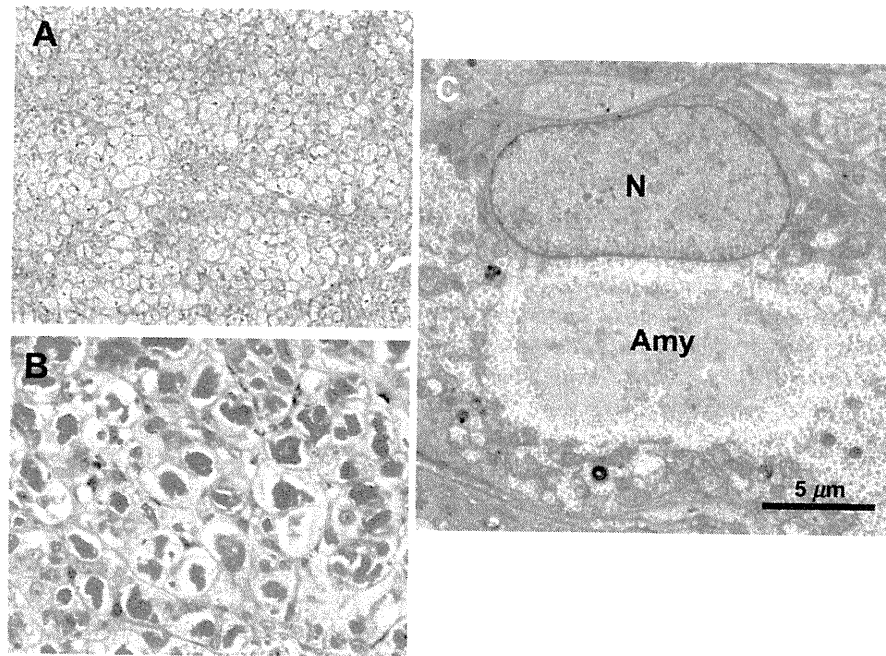


Fig. 1 Liver biopsy specimen from our patient with GSD IV. (a) Hepatocytes are enlarged and contain faintly stained basophilic cytoplasmic inclusions (hematoxylin–eosin stain, $\times 100$). (b) The inclusions are periodic acid-Schiff-positive and diastase-resistant ($\times 400$). (c) Ultrastructurally, 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.