

201128070B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

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

平成22～23年度 総合研究報告書

研究代表者 杉江 秀夫

平成24（2012）年5月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

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

平成22～23年度 総合研究報告書

研究代表者 杉江 秀夫

平成24（2012）年5月

## 目 次

I.	総合研究報告	
	メタボローム解析による筋型糖原病の	1
	画期的な診断スクリーニング法の確立	
	と治療推進の研究	
		杉江 秀夫
	(資料1) 班員名簿	7
	(資料2) 筋型糖原病全国調査アンケート書式	8
	(資料3) 嫌気性解糖系の代謝マップ	9
	(資料4) 我が国における糖原病の診断例の病型分布	10
	(資料5) 発表1	11
II.	研究成果の刊行に関する一覧表	18
III.	研究成果の刊行物・別刷	22

# I 総合研究報告

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

研究代表者 杉江 秀夫 自治医科大学小児科学・教授

### 研究要旨

筋型糖原病は筋痛、筋硬直、筋力低下、横紋筋融解症を呈する先天代謝異常症である。本研究では筋型糖原病の画期的な診断法の開発と病態の解明を目指した。この目的の為に我々は2年間の研究期間において、新たに開発された物質分析手法であるLC-TOFMS、CE-TOFMSを、本疾患に応用した。平成10年度は既知の筋型糖原病について、生検筋を試料として解析を行い糖原病II型、III型、V型、VII型、PGK欠損症で特徴的な解糖中間体代謝物の蓄積パターンを示し、その代謝物パターンにより障害部位診断が可能であった。平成11年度は筋型糖原病の鑑別疾患である脂肪代謝異常症についても比較検討し、本方法でカルニチンプロファイルを検索できることも判明した。病態と治療を考える上で、筋型糖原病のもっとも頻度の高い糖原病V型（McArdle病）で解糖系及ぶその周辺の代謝経路（TCAサイクル、ペントースモノフォスフェート回路）について検討し、解糖系の基質の枯渇が、TCAサイクルの中間体の二次的低下を来し、ひいては呼吸鎖へのネガティブな関与が示唆された。従ってmetabolic hubに位置する、ピルビン酸の経口投与は本症で治療的試みとして期待できる。

本方法の利点は、網羅的に多くのメタボロームを少量の試料から解析できることで、筋型糖原病の診断のみならず、原因が未解明な代謝性ミオパチー症例に対して、病態の新たな解明と診断に寄与することも将来的に期待できると思われる。

また今回筋型糖原病に関する全国調査を、日本小児神経学会、日本神経学会の専門医を対象に行った。結果として我が国における筋型糖原病の病型の特徴は、糖原病II、III、V型が主要筋型糖原病であった。この3病型で全体の約90%を占めていた。特に糖原病II型（Pompe病）は10年前の調査に比較して明らかに実数が増加していた。これは酵素補充療法の開始により、主治医が診断のための検査を行い、今まで見過ごされていた症例が掘り起こされてきた可能性を示唆していると思われる。この実態調査の結果は、今後の診断戦略にまずスクリーニングする病型についてこの3種類を考えるということによって参考になる。

## 研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

西野 一三・国立精神・神経医療研究  
センター神経研究所疾病研究  
第1部  
部長  
福田冬季子・自治医科大学小児科  
講師  
石垣 恵子・東京女子医科大学小児科  
講師

### A. 研究目的

筋は収縮、筋細胞の維持に ATP を必要とする。ATP 産生はグリコーゲン代謝系、脂肪酸代謝系、カルニチンサイクル、アミノ酸代謝などの代謝機構により ATP は供給されるが、代謝性ミオパチーはこれらの代謝機構に関わる酵素、あるいは基質などの物質の先天的な欠損により、ATP 供給が障害を受け、筋硬直、筋力低下、筋痛、横紋筋融解症など発症する場合を指す。

本研究が対象としてとらえている希少疾患は、グリコーゲン代謝異常症に起因する代謝性ミオパチー（筋型糖原病）で、現在 14 病型が報告されている（資料 2）。

近年の筋型糖原病の治療に関する最も重要な進歩は、糖原病 II 型（Pompe 病）に対する酵素補充療法である。わが国でもすでに全国で 70 例近くがこの補充療法を受けている。乳児型では明らかに心機能と生命予後の改善が認められているが、成人型ではその効果は限定的である。

筋型糖原病の診断は主に生検筋を用いた酵素診断、あるいは遺伝子解析による。この解析手法は、個々の酵素、遺伝子を個別に解析するため、煩雑で時間がかかることが多い。従来解糖中間体は測定が困難であったが、今回の研究では新しい技術革新に

伴って開発されたメタボローム解析法で、網羅的な解糖中間体を含む代謝物が一斉分析できる利点があり、本症の診断・病態解析に応用した。

我々が行った約 1000 例における分析では、代謝性ミオパチーが疑われた症例のうち約 70% の症例で原因が同定できなかった。今後この 70% の原因不明症例をいかに解明してゆくかが重要である。我々は CE-TOFMS、LC-TOFMS を用いた筋型糖原病の生検筋のメタボローム解析を行い、診断の有用性と病態の解明を試み、従来原因不明の症例に適応できないか検討した。

### B. 研究方法

（1）筋メタボロームの分析（平成 22 年度、23 年度）

生検筋のホモゲネートで、どのような代謝物が分析可能かを検討するため、酵素診断で確定した既知の筋型糖原病で糖原病 II 型；Pompe 病（4 例）、糖原病 III 型；Cori 病（3 例）、糖原病 V 型；McArdle 病（3 例）、糖原病 VII 型；Tarui 病（2 例）、糖原病 IX 型；phosphoglycerate kinase (PGK) 欠損症（2 例）の生検筋約 10 mg を用いた。

正常対照として、血清 CK が正常で、筋組織学的に異常を認めない生検筋 5 例を選択して使用した。

生検筋は前処理として内部標準物質 50  $\mu\text{M}$  を含んだ 500  $\mu\text{L}$  のメタノール溶液を破砕用チューブに入れ、液体窒素により凍結し、ビーズ式細胞破砕装置（トミー精工、MS-100R）を用いて破砕（4,000 rpm, 60 秒  $\times$  5 回）した。これに 500  $\mu\text{L}$  のクロロホルム及び 200  $\mu\text{L}$  の Milli-Q 水を加え攪拌し、遠心分離（2,300  $\times$  g, 4°C, 5 分）を行った。遠心分離後、水相を限外ろ過チューブ

（MILLIPORE, ウルトラフリー MC PBCC 遠心式フィルターユニット 5 KDa）に 200

μL×2 本移し取った。これを遠心分離 (9,100 × g, 4°C, 120 分) し、限外ろ過処理を行った。ろ液を乾固させ、再び25 μLの Milli-Q 水に溶解して測定に供した。

Agilent CE-TOFMS system (Agilent Technologies 社) CE-TOFMS あるいは LE-TOFMSで検出されたピークは、自動積分ソフトウェアのMasterHands ver.1.0.6.12 (慶應義塾大学開発) を用いて自動抽出し、ピーク情報として質量電荷比 ( $m/z$ )、泳動時間 (Migration time: MT) とピーク面積値を得た。得られたピーク面積値は下記の式を用いて対面積値に変換した。相対面積値 = 目的ピークの面積値 ÷ 内部標準物質の面積値 × 試料重量 (mg)

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

(倫理面への配慮)

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

(2) 筋型糖原病の病型全国調査 (平成23 年度)

神経内科専門医 (603 名) および小児神経専門医(2591 名)を対象に、過去 10 年間に筋型糖原病と診断した各疾患別の症例数および疑い症例数に関する調査用紙を郵送し、結果を分析した。同一医療機関の所属の解答からは症例数においては症例の重複を避けて分析した。

(倫理面への配慮) 自治医科大学倫理委員会の承認を得て、個人が特定される情報は厳密に管理した。

### C. 研究結果

(1) 筋型糖原病における筋メタボローム解析：

1. CE-TOFMS により解糖系 10 種類、TCA サイクル 8 種類、ペントースモノホスフェートシャントのメタボライト 4 種類が同定できた。

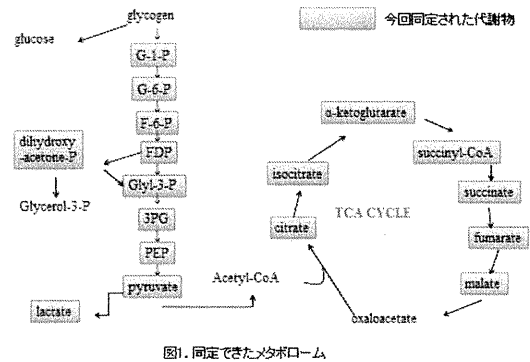


図1. 同定できたメタボローム

図1 同定されたメタボライト

2. 既知の糖原病を用いた解析では、糖原病 II 型、III 型、V 型、VII 型、phosphoglycerate kinase 欠損症における解糖系メタボロームの結果を示す (図 2、3、4)。

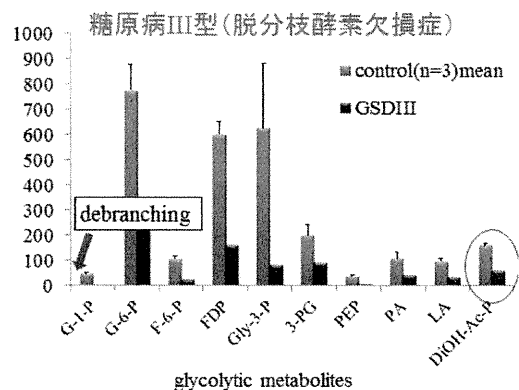


図2 糖原病 III 型のメタボライト

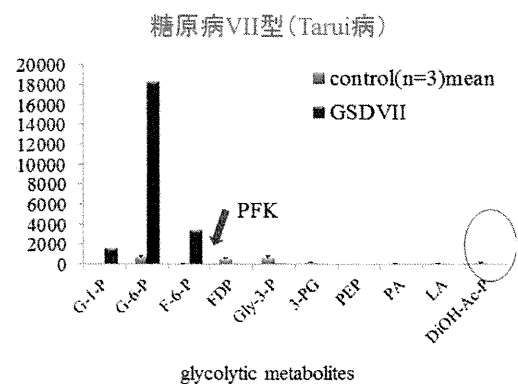


図3 糖原病 VII 型のメタボライト

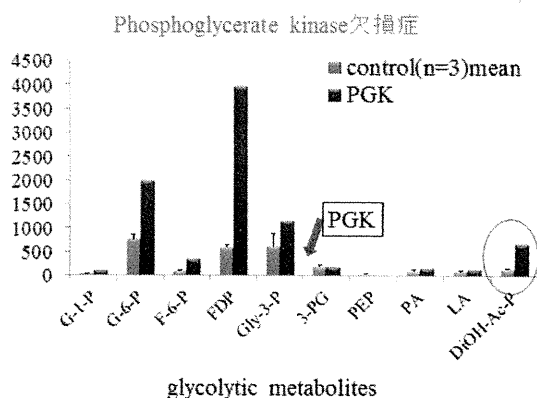


図4 PGK欠損症のメタボライト

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

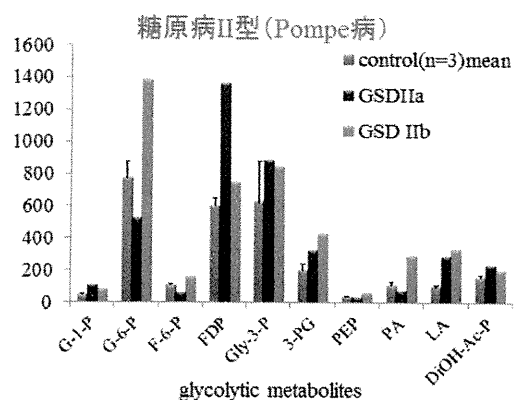


図5 糖原病II型のメタボローム

グリコーゲン分解に関わるIII型(脱分枝酵素欠損症)、V型(McArdle病)では、解糖過程の最初のステップでの障害であり、予想通りglucose-1-P以下の解糖中間体の基質はすべて著明な減少を示す事が特徴であった。

Glucose-6-P以下の過程での障害である糖原病VII型(Tarui病)では、解糖中間体のFructose-6-Pより上流の基質の蓄積が見られるが、Fructose-Di-Pより下流の中間体は枯渇しており、本疾患ではF-6-PとFDPの間で解糖の障害が発

生していることが、この責任酵素はphosphofructokinaseである事から、Tarui病と診断できた。

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

(2) 調査票の回収率は、38%(1214/3194)であった。調査表の回収数は神経内科専門医844、小児神経専門医283、記名がないため、専門医の種別不明の専門医23であった。専門医の種別が明らかに調査票の回収率は神経内科専門医からは32.6%、小児科専門医からは46.9%であった。

過去10年間に1例以上筋型糖原病と診断したまたは疑い症例を経験したと回答した件数は、神経内科専門医102件、小児神経専門医40件であった。

筋型糖原病各疾患の過去10年における確定診断数は、II型(Pompe病)76例、III型(debranching酵素欠損症)14例、V型(McArdle病)17例、VII型(垂井病)5例、IX型(PGK欠損症)3例、IV型(branching酵素欠損症)1例、LDH欠損症1例、0型(筋型グリコーゲン合成酵素欠損症)1例合計118例であった。各疾患の占める割合は、II型64.4%、III型11.9%、V型14.4%、VII型4.2%、IX型2.5%、IV型、LDH欠損症、0型はそれぞれ0.8%であった。診断疑い例は、II型22例、III型(debranching酵素欠損症)1例、V型(McArdle病)11例、VII型(垂井病)2例、その他1例、型不明10例合計47例であった。

確定診断症例の専門医別内訳(神経内科/小児科)は、II型45/31、III型(debranching酵素欠損症)8/6、V型15/2、VII型5/0、IX型1/2であった。



## D. 考察

過去 25 年間に、生検筋を用いて代謝性ミオパチーを分析した経験では、検索を行ったものの 70% の症例が未解明の状態であり、現状の分析手法の限界を示している。この状況を解決するブレークスルーとして網羅的に解析するメタボローム解析を応用した。

今回の 2 年間にわたる研究成果として、本方法が診断及び、病態の解析、さらには病態に基づいた治療への試みにも利用できることが判明した。さらに我が国における筋型糖原病の病型が、II 型、III 型、V 型で 90% を占めることがわかり、今後筋型糖原病をスクリーニングするのに効率的な検索方法のヒントとなる。

## E. 結論。

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

本方法が病態を研究する一つのツールであることが証明できたことは、今後さまざまな治療戦略への道が開け、国民の医療・福祉の上に大きく寄与する。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) 福田冬季子、杉江秀夫：生化学的診断.Pompe 病、Current Diagnosis and Treatment(衛藤義勝編集). 診断と治療社 東京 pp92-95、2009
- (2) Sohn EH, Kim HS, Lee AY, Fukuda T, Sugie H, Kim DS. A novel PYGM

mutation in a Korean patient with McArdle disease: the role of nonsense-mediated mRNA decay. *Neuromuscul Disord.* 18:886-9, 2008

- (3) Sugie H, Fukuda T, Ito M, Sugie Y, Kojoh T, Nonaka I. Novel exon 11 skipping mutation in a patient with glycogen storage disease type IIIId. *J Inherit Metab Dis.* 24:535-45, 2001
  - (4) 杉江秀夫:先天代謝異常症の診断戦略 糖原病の鑑別診断 特に new phenotype の診断と臨床特徴. 日本先天代謝異常学会誌 27: 105-111、2011
  - (5) 杉江秀夫:【腎障害をきたす全身性疾患-最近の進歩】トピックス 代謝疾患 糖原病日本内科学会雑誌 100: 1213-1219、2011 Mizuochi T, Kimura A, Nishiura H, Inomata Y, Okajima H, Sugie H, Mitsubuchi H, Yagi M, Kage M.:Liver biopsy is an important procedure in the diagnosis of glycogen storage disease type IV. *Pediatr Int.* 53:129-30. 2011
  - (6) Ishigaki K, Murakami T, Osawa M et al.:Close monitoring of initial enzyme replacement therapy in a patient with childhood-onset Pompe disease. *Brain Dev.* 2012 Feb;34(2):98-102.
  - (7) Ishigaki K, Yoshikawa Y, Osawa M et al. High-density CT of muscle and liver may allow early diagnosis of childhood-onset Pompe disease. *Brain Dev.* 2012 Feb;34(2):103-6
- ### 2. 学会発表
- (1) Ishigaki K, Saito T, Kuwatsuru R, Murakami T, Sato T, Onai S, Nonaka I, Osawa M. Longitudinal study of skeletal muscle images in childhood-onset Pompe disease patients receiving enzyme replacement therapy (ERT). 16<sup>th</sup> International Congress of the World

Muscle Society. Algarve(Portugal), 2011,10.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

資料 1

班員名簿

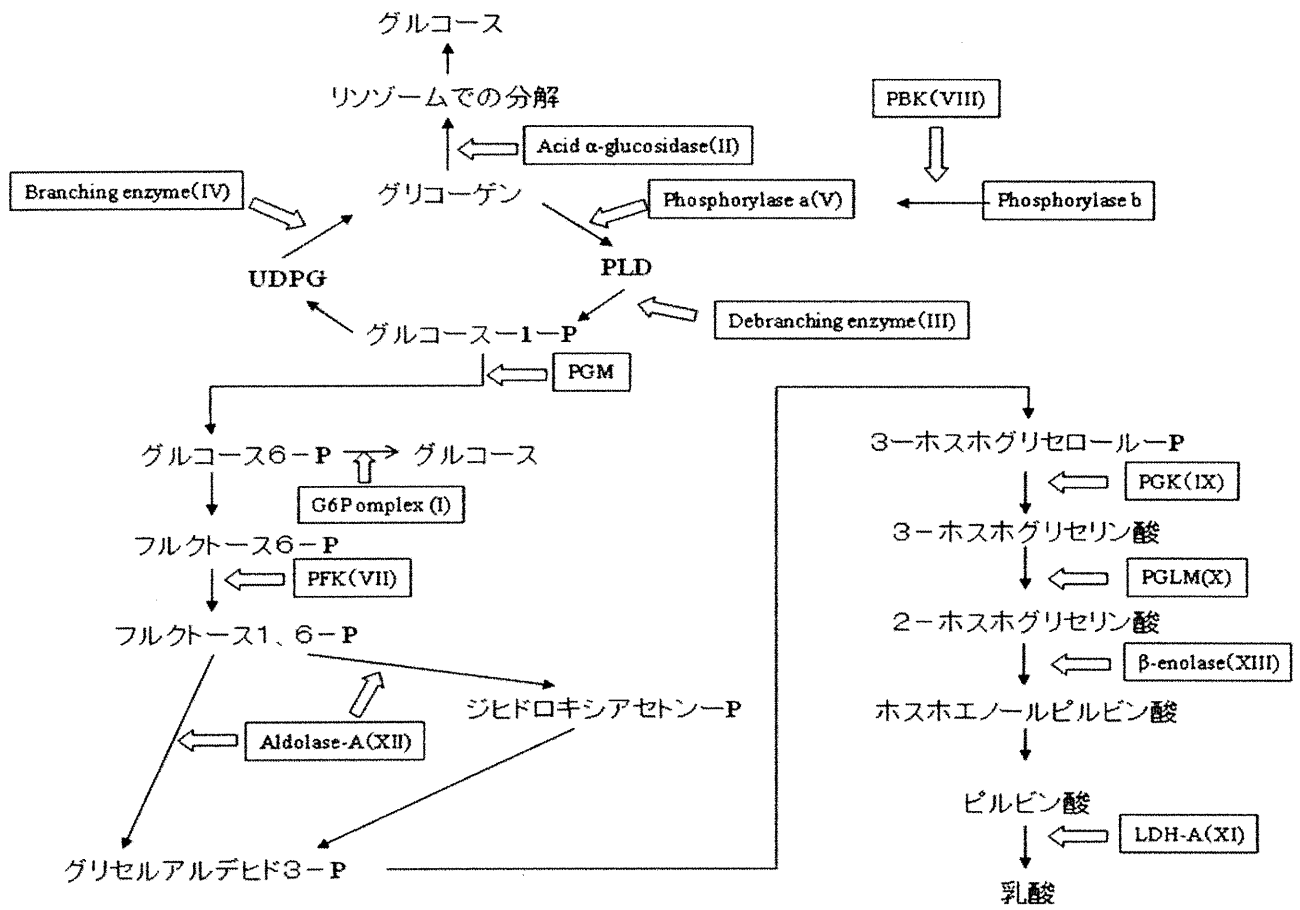
研究者名	所属研究機関 (専門分野)	所属研究機関における職名
杉江 秀夫	自治医科大学 (小児神経学、代謝性ミオパチー)	教授
福田冬季子	自治医科大学 (小児神経学、代謝性ミオパチー)	講師
西野 一三	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第1部、 (筋病学、分子遺伝学)	部長
石垣 景子	東京女子医科大学	講師

資料 2

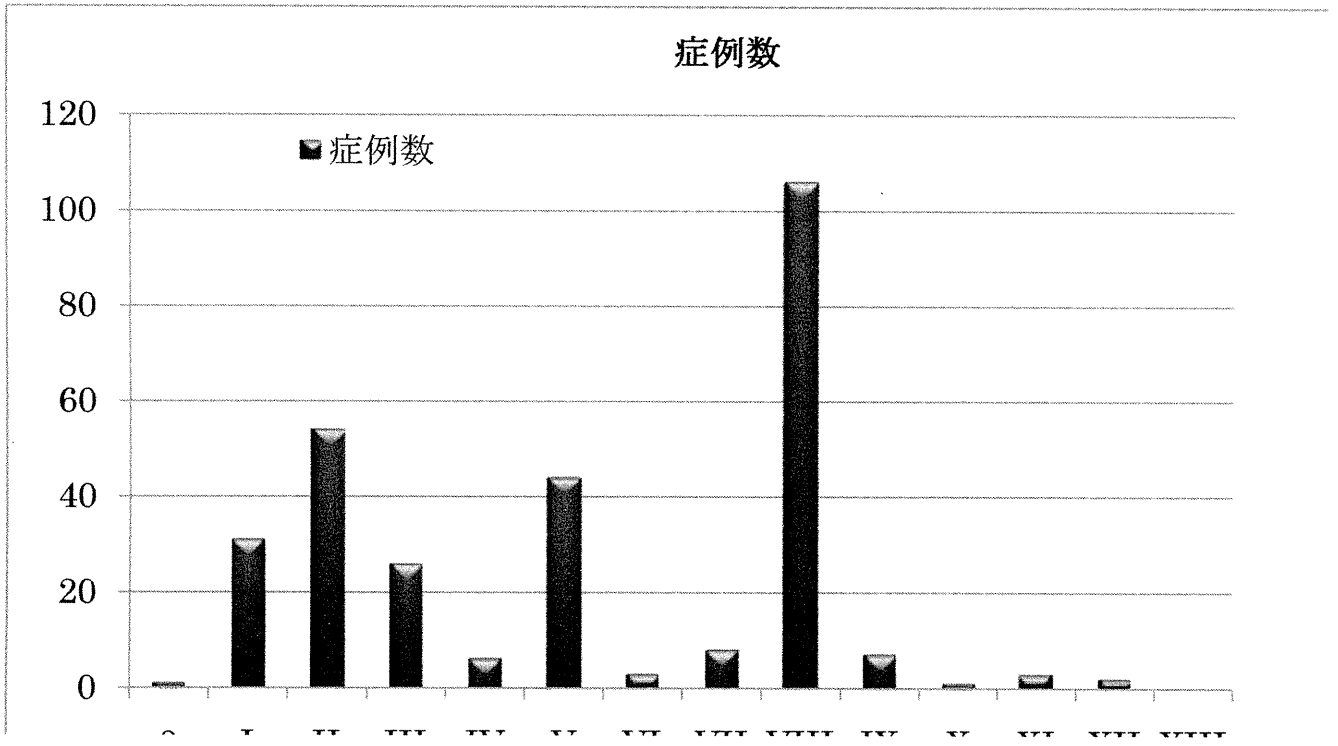
筋型糖原病の種類

病型	欠損酵素	遺伝子	Enzyme ID	酵素診断可能組織	病型
糖原病 Ia 型	Glucose-6-phosphase	<i>G6PC</i>	3.1.3.9	肝臓	肝型
糖原病 Ib 型	G-6-P transporter	<i>SLC37A4</i>	-	肝臓(凍結不可)	肝型
糖原病 II 型	Acid $\alpha$ -glucosidase	<i>GAA</i>	3.2.1.20	リンパ球、線維芽細胞、筋	肝筋型
糖原病 III 型	Debranching enzyme	<i>AGL</i>	2.4.1.25,3.2.1.33	筋、肝臓、白血球、赤血球	肝型、肝筋型
糖原病 IV 型	Branching enzyme	<i>GBE1</i>	2.4.1.18	赤血球、肝臓	肝型、肝筋型
糖原病 V 型*	Muscle phosphorylase	<i>PYGM</i>	2.4.1.1	筋	筋型
糖原病 VI 型	Liver phosphorylase	<i>PFGL</i>	2.4.1.1	肝	肝型
糖原病 VII 型*	Phosphofruktokinase (PFK)	<i>PFKM</i>	2.7.1.11	筋、赤血球	筋型
糖原病 VIII 型*	Phosphorylase kinase (PBK)	<i>PHKB</i>	2.7.1.38	?	筋型
糖原病 VIII 型*	Phosphoglycerate kinase	<i>PGK1</i>	2.7.2.3	筋	筋型
糖原病 IX 型*	Phosphoglycerate mutase (PGLM)	<i>PGAM2</i>	5.4.2.1,3.1.3.13,5.4.2.4	赤血球、白血球、筋	筋型、溶血
糖原病 X 型*	Lactate dehydrogenase-A (LDH)	<i>LDHA</i>	1.1.1.27	筋	筋型
糖原病 XI 型*	Aldolase-A	<i>ALDOA</i>	4.1.2.13	筋、血清 (電気泳動パターン)	筋型
糖原病 XII 型	$\beta$ -enolase	<i>ENOF</i>	4.2.1.11	赤血球、筋	筋型、溶血
糖原病 XIII 型*				筋	筋型

嫌気性解糖系の代謝マップ



### 我が国における糖原病の診断例の病型分布



糖原病診断支援例数(1994-2011)		
		累積診断確定症例数 今年度診断確定数
Type 0	Glycogen synthase	1 0
Type Ia,b	Von Giercke	36 3
Type II	Pompe	61 3
Type III	Cori	43 3
Type IV	Andersen	12 0
Type V	McArdle	47 2
Type VI	Hers	17 0
Type VII	Tarui	10 2
Type VIII	Phosphorylase kinase	131 6
Type IX	Phosphoglycerate kinase	6 0
Type X	Phosphoglycerate mutase	0 0
Type XI	Kanno	2 0
Type XII	Aldolase-A	1 0
Type XIII	beta-enolase	0 0
PGM1	Phosphoglucomutase	2 0
GLUT2	Fanconi-Bickel	1 0
GLUT1	De Vivo	1 0
		371 19

### 代謝性ミオパチーの治療の進歩

#### 治療の進歩

Pompe病の酵素補充療法

pseudodeficiency

成人型への効果？

治療費

新生児マススクリーニング

- 代謝性ミオパチーの診断
  - 既知の代謝性ミオパチー
  - 新たな代謝性ミオパチーの発見
- high-throughputな診断
  - メタボローム解析
  - 診断→特定の重要なメタボライトの抽出
  - 病態解析への応用

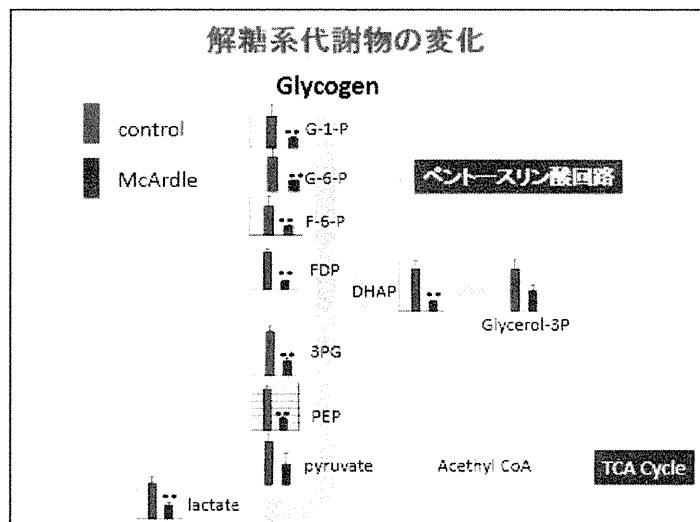
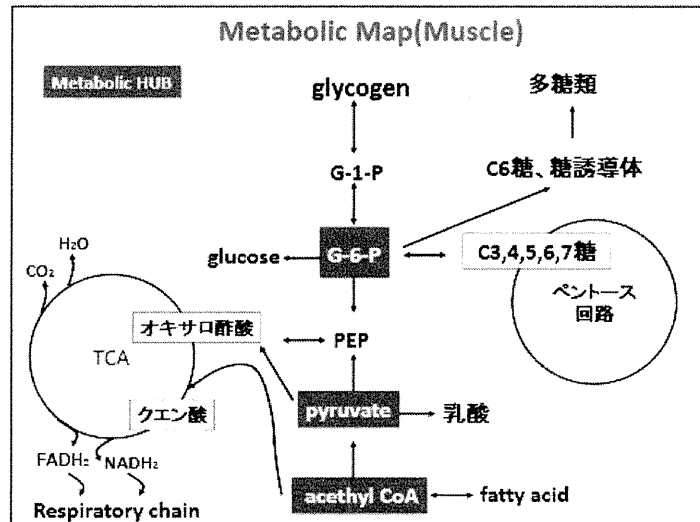
↓

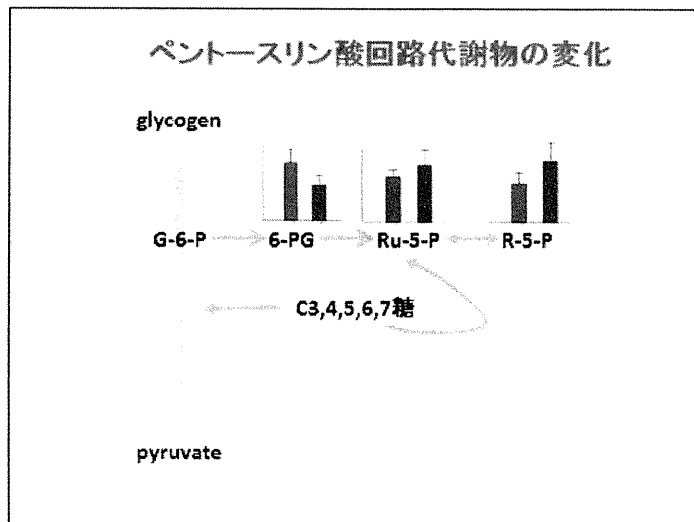
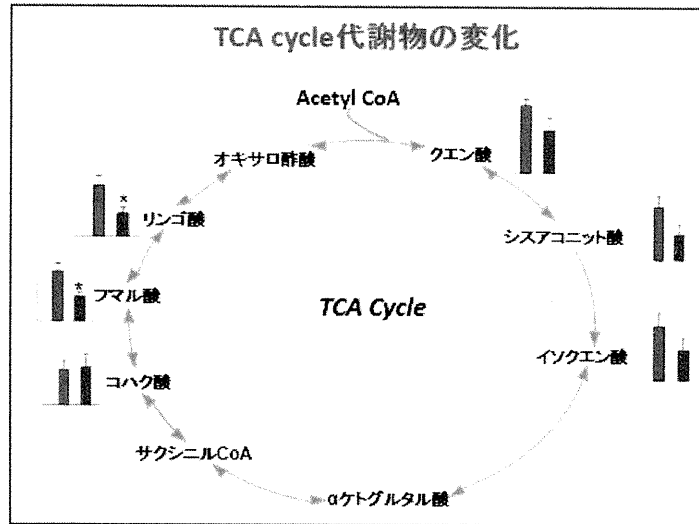
病態治療への可能性
- 筋型糖原病の簡便な診断法の開発

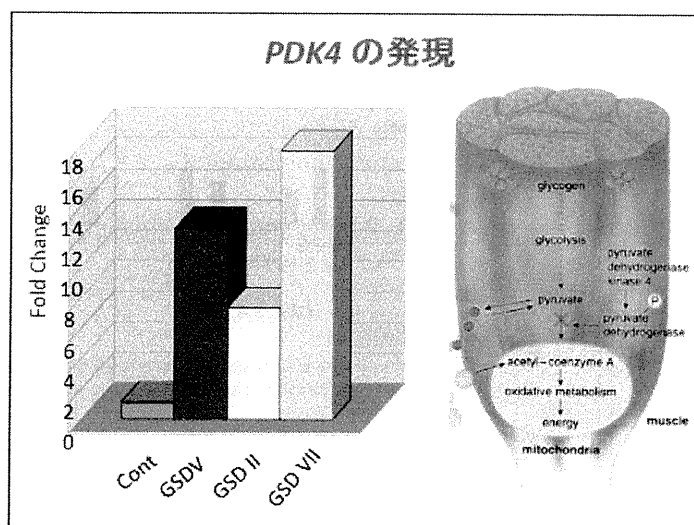
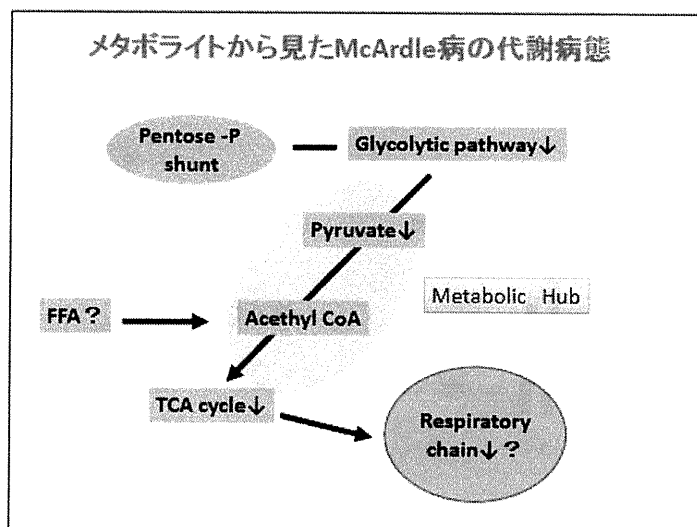
### 対象と方法

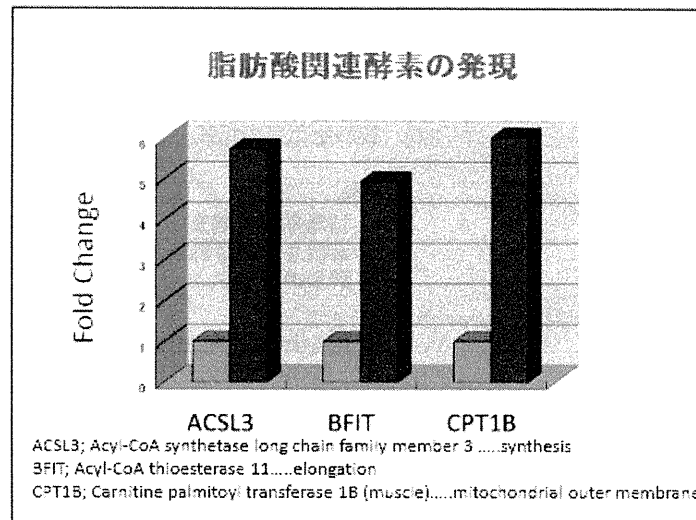
- 生検筋
  - McArdle病 5例
  - 正常対象(組織化学で異常なく、CK正常) 5例
- 解糖系、TCAサイクル、Pentose-P shuntの代謝物











### McArdle病の治療 (Cochrane Review, 2010)

1. High Protein Diet
2. High fat diet
3. Glucagon administration
4. Others
  - B6, Ribose, glucose IV, creatine, GM, VPA, oral sucrose,

#### 残存酵素活性の賦活

- Izumi R et al: A case of McArdle disease: efficacy of vitamin B6 on fatigability and impaired glycogenolysis *Intern Med* 2010;49(15):1623-5
- Sato S, et al: Confirmation of the efficacy of vitamin B6 supplementation for McArdle disease by follow-up muscle biopsy. *Muscle and Nerve* (in press)