

201128233A

厚生労働科学研究補助金

難治性疾患克服研究事業

バスレムミオパチーとその類縁疾患の診断と病態に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西野 一三

平成24年(2012年)3月

厚生労働科学研究補助金

難治性疾患克服研究事業

ベスレムミオパチーとその類縁疾患の診断と病態に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西野 一三

平成24年(2012年)3月

目次

I. 総括研究報告

ベスレムミオパチーとその類縁疾患の診断と病態に関する研究 1

西野一三【(独) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第一部 部長】

II. 分担研究報告

1. collagen VI 関連筋疾患の臨床的、病理学および遺伝子学的研究 7

樋口逸郎【鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経内科・老年病学 准教授】

橋口昭大【鹿児島大学医学部・歯学部附属病院 神経内科 医員】

2. ベスレムミオパチー／ウルリッヒ型先天性筋ジストロフィーの表現型と遺伝子型の関連解析
..... 9

米川貴博【(独) 国立精神・神経医療研究センター 病院小児神経科 レジデント】

小牧宏文【(独) 国立精神・神経医療研究センター 病院小児神経科 医長】

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 13

IV. 研究成果の刊行物・別刷 14

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

「ベスレムミオパチーとその類縁疾患の診断と病態に関する研究」

研究代表者 西野 一三

(独) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第一部 部長

研究要旨

COL6A1, A2, A3遺伝子解析システムを確立し、本邦ベスレムミオパチー (BM) 患者 20名およびその関連疾患であるウルリッヒ型先天性筋ジストロフィー (UCMD) 59名を把握して、将来的な患者レジストリ確立の基盤を形成した。さらに、臨床・病理所見と遺伝子変異の関連を検討した。BMが疑われる一大家系では発症者すべてにヘテロ接合型のp. Lys319Arg変異を見出した。

BM家系内の5例で幼少時から足関節伸展拘縮を認め、うち4例でアキレス腱延長術の既往があった。発症時期は幼少期3例、思春期1例、成人期1例で、アキレス腱延長術の施行年齢は6、10、14、15歳であった。また鹿児島大学での調査では、小児期発症例だけでなく、成人発症のBM例も存在することが明らかとなった。

UCMD 59例中遺伝子解析を実施し得た41例のうち、COL6A1変異を20例に、COL6A2変異を8例に、COL6A3変異を7例に認めた。変異の多くがtriple-helical domainに位置した。4例にCOL6A1のp. Gly284Arg変異がみられ、うち3例は独歩未獲得であり、この変異が重症型と関連する可能性が示めされた。このことは、すなわちCOL6関連筋疾患においては、遺伝子型・表現型に関連性があることを示唆している。

興味深いことに、COL6免疫染色を実施得たBM患者は、全例が筋線維鞘特異的欠損 (sarcolemma specific collagen VI deficiency: SSCD) のパターンを示した。従来の報告および欧米の診断基準によれば、BMではCOL6の染色性が保たれるか部分欠損になるとされており、今回の結果は、これに反するものである。今回の結果は、少なくとも本邦例においては欧米の診断基準が当てはまらないことを示すとともに、COL6関連筋疾患が、BMとUCMDを含む一連の連続したスペクトラムを形成する疾患として捉えるべきものであることを示唆している。

研究分担者

林由起子・(独) 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 室長

米川貴博・(独) 国立精神・神経医療
研究センター病院
小児神経科 レジデント

樋口逸郎・鹿児島大学大学院医歯学総合
研究科 神経内科・老年病学
准教授

研究協力者

橋口昭大・鹿児島大学医学部歯学部附属
病院 神経内科 医員
小牧宏文・(独)国立精神・神経医療
研究センター 病院
小児神経科 医長

A. 研究目的

ベスレムミオパチー (BM) およびその類縁疾患であるウルリッヒ型先天性筋ジストロフィー (UCMD) は、ともに IV 型コラーゲン (COL6) をコードする COL6A1, A2, A3 遺伝子変異によって発症する。両疾患は BM を軽症型として UCMD を重症型とする一連のスペクトラムを形成ものと捉えることが出来る。平成 22 年度「ベスレムミオパチーとその類縁疾患の実態調査」においては、本邦 UCMD の患者頻度は 4-8/100 万、BM は疑い例を含めたとしても UCMD の 1/10 程度で、極めてまれであることを明らかにするとともに、特徴的な臨床症状、COL6 免疫染色や遺伝子検査結果を下にした診断基準を作成した。

この成果を受けて、本研究では、① collagen VI (COL6) 遺伝子の遺伝子診断システムの確立、②臨床的にベスレムミオパチーやウルリッヒ病と診断されるが collagen VI に異常のない例の新規原因遺伝子探索、③遺伝子型・表現型相関解明、④分子病態解明、⑤患者レジストリ確立に向けた基盤形成、を行うことを目指した。

B. 研究方法

①collagen VI 遺伝子の遺伝子診断システムの確立

Sanger 法を用いたこれまでの経験を

活用して、COL6A1, A2, A3 遺伝子の全エクソンおよび近傍イントロンのシーケンス解析法を確立することを目指した。

②臨床的にベスレムミオパチーやウルリッヒ病と診断されるが collagen VI に異常のない例の新規原因遺伝子探索

主に細胞外マトリックスをコードする遺伝子を候補として、シーケンス解析を行った。

③遺伝子型・表現型相関解明

これまでに同定された BM 20 例、UCMD 64 例について、COL6A1, A2, A3 遺伝子解析を行った。また、国立精神・神経医療研究センター筋レポジトリに新たに追加された BM、UCMD 例についても COL6 遺伝子解析を行った。全 64 例のうち 5 例は COL6 免疫染色が不明で遺伝子解析用血液もなかったため今回の研究対象からは除外した。残り 59 例について、臨床・病理所見と遺伝子変異型との関連を解析した。

BM では、9 例の患者血液で COL6A1, A2, A3 遺伝子解析を行った。そのうち、生検筋検体があるものは 4 例であり、臨床・病理所見と遺伝子変異型との関連を解析した。

④分子病態解明

生検筋に対して COL6 免疫染色を行い、UCMD と BM の所見を比較することで病態の違いを検討した。

⑤患者レジストリ確立に向けた基盤形成

上記の解析を行う中で、可能な限り多

くの本邦患者を把握することに務めた。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会への申請、承認を得たうえで開始し、連結可能匿名化された既存の情報のみを得て行った。

C. 研究結果

①collagen VI 遺伝子の遺伝子診断システムの確立

これまでの経験を活用して、国立精神・神経医療研究センター内で遺伝子診断が行える体制を確立した。

②臨床的にベスレムミオパチーやウルリッヒ病と診断されるがcollagen VIに異常のない例の新規原因遺伝子探索

主に細胞外マトリックスをコードする数個の候補遺伝子について検討したものの、変異は見出されなかった。

③遺伝子型・表現型相関解明

常染色体優性遺伝形式をとる BM の大家系において、COL6A1 遺伝子の p. Lys319Arg ヘテロ接合性変異を同定した。家系内発症者骨格筋に対する COL6 免疫染色では、筋線維鞘特異的欠損 (sarcolemma specific collagen VI deficiency: SSCD) を認めた。さらに、長期経過がわかる 5 例では、全例足関節伸展拘縮を認め、4 例でアキレス腱延長術を受けていた。発症時期は幼少期 3 例、思春期 1 例、成人期 1 例で、アキレス腱延長術の施行年齢は 6、10、14、15 歳であった。

アンケート調査で UCMD 例に含まれた

親子例 (父、子 2 名発症) については、研究で明らかとなった UCMD の自然歴とは明らかにことなっていた。四肢筋力低下については軽症の経過を辿りながら、関節拘縮や側弯症は著しく、優性遺伝形式であることから BM が強く疑われた。この家系全例で発症時期は不明ながら足関節伸展拘縮を認め、2 名ではアキレス腱延長術を 10 代前半に受けていた。本家系の 2 名は筋生検を受けており、いずれも COL6 免疫染色パターンは SSCD であった。遺伝子解析は、父のみ実施済で変異は見出されなかった。

国立精神・神経医療研究センター筋レポジトリーに新たに追加された小児例においても、臨床的につま先歩行がみられるとともに、病理学的には COL6 免疫染色で SSCD であった。本例の家系内には、尖足に対してアキレス腱延長術を受けた既往を有する 2 例が含まれ、BM が強く疑われた。

鹿児島大学の調査では、COL6A1 遺伝子 IVS14DS, G-A, +1 変異を有するベスレムミオパチー家系の長期追跡調査を継続しており、3 世代にわたる患者は幼少期発症例が多いが成人発症例も存在していた。関節拘縮は筋力低下よりも早期に顕在化し、特に足関節の伸展拘縮は歩行障害の最も大きな原因となっていた。患者の 2 人は 10 歳代でアキレス腱延長術が施行され、その後長期にわたり歩行能力を維持していた。

UCMD59 例のうち、国立精神・神経医療研究センター筋レポジトリー内で新たに同定された例は 7 例であった。全例 COL6 免疫染色パターンは SSCD であった。COL6A1, A2, A3 遺伝子解析は、実施 41 例、未実施 18 例であった。実施 41 例のう

ち、COL6A1 変異例 20, COL6A2 変異例 8, COL6A3 変異例は 7、いずれにも変異が認められなかったのは 6 例であった。多くの変異が triple-helical domain をコードするエクソン内にみられた。また、4 例に COL6A1 遺伝子の p. Gly284Arg 変異がみられ、そのうち 1 例は 14 歳まで歩行可能であったのに対し、3 例では独歩を獲得したものはいなかった。

1 成人例については、臨床像は本症に一致する重症の経過を辿っているが、COL6 免疫染色は正常パターンであった。本例は、COL6A1 遺伝子解析の結果、p. Gly319Arg 変異をヘテロ接合性に有していた。

④分子病態解明

上記の遺伝子型・表現型相関解析の検討と関連して COL6 免疫染色を実施した。国立精神・神経医療研究センターで COL6 免疫染色を行い得た BM 例は、全例 SSCD であった。これは、従来 BM では COL6 が保たれるか、または、部分欠損となるという欧米の報告とは異なる結果であった。

⑤患者レジストリ確立に向けた基盤形成

上に述べたように、患者レジストリの基礎となる遺伝子解析システムを確立するとともに、すでに本邦例のかなりを占めるとされる BM20 例、UCMD59 例を確保した。

D. 考察

国立精神・神経医療研究センター内で遺伝子診断を行える体制を確立して、患者レジストリ確立の基盤を形成するこ

とができた。ただし、COL6 遺伝子は 100 を越えるエクソンを解析しなくてはならないことから、今後は次世代型シーケンサーを活用したより効率的な解析を検討する必要があると考えられた。

今回 BM 20 例が同定されたが、そのうち、アキレス腱延長術の既往が 7 例にあり（年齢 6-15 歳）、うち 3 例はそれぞれ 12、35、53 歳まで歩行可能が確認できた。本症の関節拘縮は筋力低下よりも早期に顕在化し、特に足関節の伸展拘縮は歩行障害の原因となることが明らかとなった。新たに同定された小児例についても、症状は筋力低下より尖足による歩行障害のほうが主たるものであった。家系内で症状や重症度が非常に異なることや、アキレス腱延長術の既往を有する 2 例がみられることから BM が疑われる。

鹿児島大学の調査においても、関節拘縮は筋力低下よりも早期に顕在化し、特に足関節の伸展拘縮は歩行障害の最も大きな原因となることが示された。このことは、アキレス腱延長術など整形外科的治療やリハビリテーションは ADL の改善につながることを示唆している。

COL6 免疫染色は、調べ得た全例（典型的な BM 家系からの 1 例、親子例の 2 例、孤発例）で SSCD であった。欧米の BM 診断基準においては、一般に生検筋の COL6 染色性は保たれるとされているが、この結果はそれと異なるものであった。尚、本研究班で作成された診断基準では、このような結果を踏まえて、COL6 異常（SSCD や部分欠損など）を認めることがあるとしている。

今回の結果は、発症年齢や臨床症状、COL6 染色性から BM と UCMD とを明確に区別することが困難な場合があることを

示しており、COL6関連筋疾患を典型的なUCMDと軽症のBMを両端とした一連の連続したスペクトラムを形成する疾患としてとらえるべきものであることを示唆している。

UCMDでは、独歩未獲得の最重症3例において、COL6A1遺伝子にp. Gly284Arg変異がみられており、重症の表現型と関連する可能性が示唆された。運動発達に比し、長期経過の情報には限界があり、歩行不能年齢や呼吸機能障害、側弯症の重症度とCol6遺伝子変異との関連解析にはさらに検討が必要である。

E. 結論

国立精神・神経医療研究センター内で遺伝子診断を行える体制を確立して、患者レジストリ確立の基盤を形成することができた。

COL6 遺伝子変異と表現型の間には関連性が存在することが示唆された。特にBMでは、調べ得た全例でSSCDの染色パターンを示した。このことは、UCMDとBMが一連の連続したスペクトラムを形成する疾患であることを示唆している。

また、BMにおいては、臨床的に筋力低下よりも関節拘縮が早期に顕在化し、幼少期から足関節伸展拘縮を呈することが特徴であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Mitsubishi S, Ohkuma A, Talim B, Karahashi M, Koumura T, Aoyama C, Kurihara M, Quinlivan R, Sewry C, Mitsubashi H, Goto K, Koksai B, Kale G,

Ikeda K, Taguchi R, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Sher RB, Sugimoto H, Nakagawa Y, Cox GA, Topaloglu H, Nishino I: A congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities caused by defective de novo phosphatidylcholine biosynthesis. *Am J Hum Genet.* 88(6): 845-851, Jun, 2011.

Fujita M, Mitsubashi H, Isogai S, Nakata T, Kawakami A, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I, Kudo A. Filamin C plays an essential role in the maintenance of the structural integrity of cardiac and skeletal muscles, revealed by the medaka mutant zacro. *Dev Biol.* 1;361(1):79-89, Jan, 2012.

Hattori A, Komaki H, Kawatani M, Sakuma H, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I. A novel mutation in the LMNA gene causes congenital muscular dystrophy with dropped head and brain involvement. *Neuromuscul Disord.* 22(2):149-151, Feb, 2012.

2. 学会発表

なし

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

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

「collagen VI 関連筋疾患の臨床的、病理学のおよび遺伝子学的研究」

研究分担者 樋口逸郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
神経内科・老年病学 准教授
研究協力者 橋口昭大 鹿児島大学医学部・歯学部附属病院
神経内科 医員

研究要旨

ベスレムミオパチーの治療法開発につながるデータを得ることを目的として、collagen VI 関連筋疾患の連続したスペクトラムの両端に位置する疾患である典型的なベスレムミオパチーと重症のウルリッヒ病の遺伝子解析と臨床的長期経過観察による病状分析を施行した。

次世代シーケンサーシステムを用いたcollagen VI および関連蛋白の遺伝子解析は現在継続中である。

ベスレムミオパチーは幼少時発症例が多いが成人発症例も存在した。関節拘縮は筋力低下よりも早期に顕在化し、特に足関節の伸展拘縮は歩行障害の最も大きな原因となっていた。従って、アキレス腱延長術など整形外科的治療やリハビリテーションは機能予後の改善につながり極めて有効であった。

A. 研究目的

collagen VI 関連筋疾患の臨床的研究および病態解明研究により本症の治療法開発につながるデータを得ることを目的とする。

を扱う際には、匿名化した情報のみを扱う。

遺伝子解析は「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」を遵守した上で、施行される。解析情報を使用するにあたっては、匿名化した上で使用する。

B. 研究方法

優性遺伝を呈する典型的なベスレムミオパチーの家系列について、長期経過観察による病状変化を分析し、家系内での重症度の相違や病状を修飾する因子の有無を明らかにする。

各種collagen VI 関連筋疾患の遺伝子異常、筋病理および臨床徴候を解析し治療につながる因子を明らかにする。

遺伝子解析は collagen VI の 3 遺伝子 (*COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3*), および collagen XIV α 1 (*COL14A1*), collagen XV α 1 (*COL15A1*), NG2 proteoglycan (*CSPG4*), HSP47 (*SERPINH1*), biglycan (*BGM*), fibromodulin (*FMOD*) などの各遺伝子について次世代シーケンサーシステムを利用して行う。

C. 研究結果

Collagen VI 欠損ウルリッヒ病患者の筋組織では細胞外マトリックスに他の collagen や細胞外マトリックス蛋白が過剰発現する傾向にある。現在、次世代シーケンサーシステムを用いて collagen VI および関連蛋白の遺伝子学的解析が進行中である。

また *COL6A1*, IVS14DS, G-A, +1 変異を有するベスレムミオパチー家系の長期追跡調査を継続しており、3 世代にわたる患者は幼少時発症例が多いが成人発症例も存在した。関節拘縮は筋力低下よりも早期に顕在化し、特に足関節の伸展拘縮は歩行障害の最も大きな原因となっていた。従って、アキレス腱延長術など整形外科的治療やリハビリテーションは ADL の改善につながり、患者の 2 人は 10 歳代で、アキレス腱延長術が施行され、その後長期にわたり歩行能力を維持している。

(倫理面への配慮)

筋病理学的検索はインフォームド・コンセントを得て採取された組織で行い、臨床情報

D. 考察

劣性遺伝を呈するベスレムミオパチーや軽症のウルリッヒ病は見逃されている可能性が高いと思われ、これまで原因不明であった筋疾患の再検討を行い新たな症例を発掘する必要がある。

アキレス腱延長術など整形外科的治療やリハビリテーションはADLの改善につながり、ベスレムミオパチーのように筋力低下の進行が緩徐である疾患では特に効果が期待できると考えられた。

E. 結論

非定型的な collagen VI 関連筋疾患は見逃されている可能性が高い。

ベスレムミオパチーでは整形外科的治療やリハビリテーションにより機能予後が改善する。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

樋口逸郎. コラーゲン 6 型変異によるミオパチー Brain and Nerve 2011 63 (11) :1169-78

Sakiyama Y, Okamoto Y, Higuchi I, Inamori Y, Sangatsuda Y, Michizono K, Watanabe O, Hatakeyama H, Goto Y, Arimura K, Takashima H. A new phenotype of mitochondrial disease characterized by familial late-onset predominant axial myopathy and encephalopathy. Acta Neuropathol. 2011 121 (6) :775-83

樋口逸郎. Ullrich 病の筋病理. 神経内科 2009 71 (4) :360-8

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし。

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

「ベスレムミオパチー／ウルリッヒ型先天性筋ジストロフィーの表現型と遺伝子型の関連解析」

研究分担者 米川貴博

(独) 国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経科レジデント

研究協力者 小牧宏文

(独) 国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経科医長

研究要旨

BMとUCMDの遺伝子変異の位置やタイプと臨床像の相関を明らかにした報告はない。本研究では、確保されたBM 20、UCMD 59例の臨床像と遺伝子変異やCOL6免疫染色性との関連を明らかにすることを目的とする。

COL6A1, A2, A3遺伝子解析は国立精神神経医療研究センター（当施設）トランスレーショナルメディカルセンターにある患者血液を対象とする。臨床情報や生検筋COL6免疫染色がわかる例で臨床像と遺伝子変異やCOL6免疫染色性との関連解析を行う。

BMが疑われる一大家系の発症者5名と未発症者1名のCOL6A1遺伝子解析の結果、発症者ではすべて同じp. Lys319Arg変異をヘテロ接合性に有していることを明らかにした。また、発症者1名の生検筋COL6染色性は筋鞘膜特異的欠損（SSCD）であった。同家系内の5例の長期経過に足関節伸展拘縮を認め、うち4例でアキレス腱延長術の既往があった。発症時期は幼少期3例、思春期1例、成人期1例で、アキレス腱延長術の施行年齢は6、10、14、15歳であった。同一変異を有していながら、筋力低下や関節拘縮の発症年齢や進行はさまざまであった。BM疑いの2家系のCOL6染色性はSSCDであった。UCMD 59例中遺伝子解析は、実施41例、未実施18例であった。実施41例のうち、COL6A1変異例20、COL6A2変異例8、COL6A3変異例は7、変異なしは6例であった。変異の多くがtriple-helical domainに位置した。4例にCOL6A1のp. Gly284Arg変異がみられ、うち3例は独歩未獲得であり、重症型と関連する変異の可能性があった。

BMでは幼少期から足関節伸展拘縮を呈することが特徴で、歩行障害の原因となる例がある。今回BMのCOL6染色性として3家系でSSCDが観られたことは、BMとUCMDは臨床像やCOL6表現型が連続したスペクトラムの中にあるCOL6関連筋疾患として捉えるべきであることを示唆する。表現型と関連するCOL6遺伝子変異の存在する可能性が示され、歩行能力や呼吸機能の障害、関節拘縮や側弯症の重症度などとの関連解析にさらなる長期経過の情報が必要となる。

A. 研究目的

ベスレムミオパチー（BM）とウルリッヒ型先天性筋ジストロフィー（UCMD）は、IV型コラーゲン（COL6）をコードするCOL6A1, A2, A3遺伝子の変異によって発症する。両疾患はBMを軽症型としてUCMDを重症型とする一連のスペクトラムを形成する考えられる。平成22年度「ベスレムミオパチーとその類縁疾患の実態調査」において、UCMDの患者頻度は

4-8/100万、BMは疑い例を含めたとしてもUCMDの1/10程度で、極めてまれであることを明らかにした。また、抽出された特徴的な臨床症状、COL6免疫染色や遺伝子検査結果から診断基準を作成した。

BMとUCMDの遺伝子変異の位置やタイプと臨床像の相関を明らかにした報告はない。本研究では、これまでに確保されたBM、UCMD例に加え、国立精神神経医療研究センター（当

施設)凍結生検筋レポジトリーから新たに確保された症例も含め、臨床像と遺伝子変異やCOL6免疫染色パターンとの関連を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

これまでに確保されたBM 20例、UCMD 64例については、当施設トランスレーショナルメディカルセンター(TMC)に患者血液がある例のCOL6A1, A2, A3遺伝子解析を行う。また、当施設凍結生検筋レポジトリーから新たに確保されたBM、UCMD例についても未解析の患者血液の遺伝子解析を行う。

BMでは、9例の患者血液でCOL6A1, A2, A3遺伝子解析を行う。そのうち、生検筋検体があるものは4例であり、臨床像とCOL6免疫染色や遺伝子変異型との関連を解析する。

UCMDでは、64例のうち5例はCOL6免疫染色が不明で遺伝子解析用血液もなく、今回の研究対象からは除外した。残った59例の臨床像とCOL6免疫染色や遺伝子変異型との関連を解析する。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会への申請、承認を得たうえで開始し、連結可能匿名化された既存の情報のみを得て行った。

C. 研究結果

1) BM

疑い例で常染色体優性遺伝形式をとる大きな家系では、これまで当施設疾病研究第一部で各種多型マーカーを用いCOL6遺伝子座への連鎖がないことが判明していた。今回発症者5名と未発症者1名のCOL6A1遺伝子解析の結果、発症者ではすべて同じp. Lys319Arg変異をヘテロ接合性に有していることが明らかとなった。また、この家系内の発症者1名のみ筋生検を受けており、COL6免疫染色パターンは筋鞘膜特異的欠損(SSCD)であった。この家系内で長期経過がわかる5例では、全例足関節伸展拘縮を認め、4例でアキレス腱延長術を受けていた。発症時期は幼少期3例、思春期1例、成人期1例で、アキレス腱延長術の施行年齢は6、10、14、15歳であった。

アンケート調査でUCMD例に含まれた親子例(父、子2名発症)については、研究で明らかとなったUCMDの自然歴とは明らかにこ

となっていた。四肢筋力低下については軽症の経過を辿りながら、関節拘縮や側弯症は著しく、優性遺伝形式であることからBMが強く疑われた。この家系全例で発症時期は不明ながら足関節伸展拘縮を認め、2名ではアキレス腱延長術を10代前半に受けていた。本家系の2名は筋生検を受けており、いずれもCOL6免疫染色パターンはSSCDであった。遺伝子解析は、父のみ実施済で変異は見出されなかった。

当施設筋レポジトリーから新たに確保された小児例においてもつま先歩行がみられ、COL6免疫染色パターンはSSCDであった。本例の家系内には、尖足に対してアキレス腱延長術を受けた既往を有する2例が含まれ、BMが強く疑われた。

2) UCMD

59例のうち、当施設筋レポジトリーから新たに確保された例は7例であった。全例COL6免疫染色パターンはSSCDであった。COL6A1, A2, A3遺伝子解析は、実施41例、未実施18例であった。実施41例のうち、COL6A1変異例20、COL6A2変異例8、COL6A3変異例は7、いずれにも変異が認められなかったのは6例であった。多くの変異がtriple-helical domainをコードするエクソン内にみられた。また、4例にCOL6A1遺伝子のp. Gly284Arg変異がみられ、そのうち1例は14歳まで歩行可能であったのに対し、3例では独歩を獲得したものはいなかった。

1成人例については、臨床像は本症に一致する重症の経過を辿っていないながら、COL6免疫染色は正常パターンであった。本例は、COL6A1遺伝子解析の結果、p. Gly319Arg変異をヘテロ接合性に有していた。

D. 考察

BMは、幼少期に発症する例が多いが、成人発症例の報告もある。緩徐に進行する近位筋優位の筋力低下と筋萎縮、比較的早期に関節拘縮が認められることが特徴である。通常は、COL6遺伝子のヘテロ変異により発症する優性遺伝形式をとる。BM家系内でも症状や重症度が非常に異なることが知られている。一般に生検筋のCOL6免疫染色では異常がなく、培養線維芽細胞においてCOL6発現低下がみられることがあるとされる。

今回確保されたBM 20例のうち、病歴上アキ

レス腱延長術の既往が7例にあり（年齢6-15歳）、うち3例はそれぞれ12、35、53歳まで歩行可能が確認できた。本症の関節拘縮は筋力低下よりも早期に顕在化し、特に足関節の伸展拘縮は歩行障害の原因となることが明らかとなった。新たに確保された小児例についても、症状は筋力低下より尖足による歩行障害のほうが主たるものであった。家系内で症状や重症度が非常に異なることや、アキレス腱延長術の既往を有する2例がみられることからBMが疑われる。

COL6免疫染色は、典型的なBM家系からの1例、親子例の2例、孤発例でSSCDであった。欧米のBM診断基準においては、一般に生検筋のCOL6染色性は保たれるとされているが、本研究班で作成された診断基準では、COL6異常（筋鞘膜特異的欠損や部分欠損など）を認めることがあるとされている。一方、ウルリッヒ病のCOL6染色性は、本研究班、欧米ともに完全欠損から鞘膜特異的欠損、または部分欠損である。発症年齢や臨床症状、COL6染色性から病型を明確に分類することが困難な症例があり、典型的なUCMDと軽症のBMを両端としたCOL6関連筋疾患の連続したスペクトラムとして両疾患を捉えるべきである。

UCMDでは、独歩未獲得の最重症3例において、*COL6A1*遺伝子にp. Gly284Arg変異がみられており、重症の表現型と関連する可能性がある。運動発達に比し、長期経過の情報には限界があり、歩行不能年齢や呼吸機能障害、側弯症の重症度と*COL6*遺伝子変異との関連解析にはさらに検討が必要である。

E. 結論

BMでは、筋力低下よりも関節拘縮が早期に顕在化する。幼少期から足関節伸展拘縮を呈することが特徴で、歩行障害の原因となる例がある。一方、UCMDでは筋力低下のため10歳頃には歩行不能となる例が多く、足関節伸展拘縮は出現しても歩行障害の原因とはならない。

表現型と関連する*COL6*遺伝子変異の存在する可能性が示され、歩行能力や呼吸機能の障害、関節拘縮や側弯症の重症度などとの関連解析にはさらなる長期経過の情報が必要となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名：論文タイトル名. 発表誌名 巻号：ページ, 出版年
Mitsuhashi S, Ohkuma A, Talim B, Karahashi M, Koumura T, Aoyama C, Kurihara M, Quinlivan R, Sewry C, Mitsuhashi H, Goto K, Koksal B, Kale G, Ikeda K, Taguchi R, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Sher RB, Sugimoto H, Nakagawa Y, Cox GA, Topaloglu H, <u>Nishino I</u> : A congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities caused by defective de novo phosphatidylcholine biosynthesis. <i>Am J Hum Genet.</i> 88(6): 845-851, Jun, 2011.
Fujita M, Mitsuhashi H, Isogai S, Nakata T, Kawakami A, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, <u>Nishino I</u> , Kudo A. : Filamin C plays an essential role in the maintenance of the structural integrity of cardiac and skeletal muscles, revealed by the medaka mutant zacro. <i>Dev Biol.</i> 1;361(1):79-89, Jan, 2012.
Hattori A, <u>Komaki H</u> , Kawatani M, Sakuma H, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Hayashi YK, Nonaka I, <u>Nishino I</u> . : A novel mutation in the LMNA gene causes congenital muscular dystrophy with dropped head and brain involvement. <i>Neuromuscul Disord.</i> 22(2):149-151, Feb, 2012.

IV. 研究成果の刊行物・別刷

A Congenital Muscular Dystrophy with Mitochondrial Structural Abnormalities Caused by Defective De Novo Phosphatidylcholine Biosynthesis

Satomi Mitsuhashi,¹ Aya Ohkuma,¹ Beril Talim,² Minako Karahashi,³ Tomoko Koumura,³ Chieko Aoyama,⁴ Mana Kurihara,⁵ Ros Quinlivan,^{6,7} Caroline Sewry,^{6,8} Hiroaki Mitsuhashi,¹ Kanako Goto,¹ Burcu Koksak,² Gulsev Kale,² Kazutaka Ikeda,⁹ Ryo Taguchi,⁹ Satoru Noguchi,¹ Yukiko K. Hayashi,¹ Ikuya Nonaka,¹ Roger B. Sher,¹⁰ Hiroyuki Sugimoto,⁴ Yasuhito Nakagawa,³ Gregory A. Cox,¹⁰ Haluk Topaloglu,¹¹ and Ichizo Nishino^{1,*}

Congenital muscular dystrophy is a heterogeneous group of inherited muscle diseases characterized clinically by muscle weakness and hypotonia in early infancy. A number of genes harboring causative mutations have been identified, but several cases of congenital muscular dystrophy remain molecularly unresolved. We examined 15 individuals with a congenital muscular dystrophy characterized by early-onset muscle wasting, mental retardation, and peculiar enlarged mitochondria that are prevalent toward the periphery of the fibers but are sparse in the center on muscle biopsy, and we have identified homozygous or compound heterozygous mutations in the gene encoding choline kinase beta (*CHKB*). This is the first enzymatic step in a biosynthetic pathway for phosphatidylcholine, the most abundant phospholipid in eukaryotes. In muscle of three affected individuals with nonsense mutations, choline kinase activities were undetectable, and phosphatidylcholine levels were decreased. We identified the human disease caused by disruption of a phospholipid de novo biosynthetic pathway, demonstrating the pivotal role of phosphatidylcholine in muscle and brain.

A spontaneous mutant mouse with a neonatal-onset autosomal-recessive rostral-to-caudal muscular dystrophy (*rmd* mouse) due to a loss-of-function mutation in choline kinase beta (*Chkb*) was identified in 2006.¹ Interestingly, *rmd* mice exhibit a unique mitochondrial morphology in muscle fibers, which show enlarged mitochondria at the periphery of the fiber but none at the center (Figure S1). These features are similar to those seen in a congenital muscular dystrophy (CMD) that we previously reported in four Japanese individuals.² We therefore screened 15 genetically undiagnosed cases of CMD with fairly homogeneous clinical features (Table 1) for mutations in choline kinase beta (*CHKB*); we included the four cases from in our previous study in these 15 cases. Features included peculiar mitochondrial changes in muscle as well as motor delay followed by the appearance of severe mental retardation and microcephaly without structural brain abnormalities (Figure 1 and Table 1).

All clinical materials used in this study were obtained for diagnostic purposes with written informed consent. The study was approved by the Ethical Committee of the National Center of Neurology and Psychiatry. All mouse protocols were approved by the Ethical Review Committee on the Care and Use of Rodents in the National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychi-

atry. For muscle pathology, samples of skeletal muscle were obtained from biceps brachii or quadriceps femoris in humans and from quadriceps femoris muscle in 8-week-old *rmd* mice. Muscles were frozen and sectioned at a thickness of 10 μ m according to standard procedures, and a battery of routine histochemical stains, including hematoxylin and eosin (H&E), modified Gomori trichrome (mGT), NADH-tetrazolium reductase (NADH-TR), succinate dehydrogenase (SDH), cytochrome c oxidase (COX), and Oil Red O, were analyzed. For electron microscopic analysis, muscles were fixed as previously described,³ and ultra-thin sections were observed at 120kV or 80kV. All affected individuals exhibited nonspecific dystrophic features (Figure 1A). However, in mGT, NADH-TR, SDH, and COX staining, prominent mitochondria at the periphery as well as central areas devoid of mitochondria were seen (Figures 1B and 1C). Oil Red O staining was unremarkable (data not shown). Electron microscopy confirmed enlarged mitochondria (Figure 1D).

We directly sequenced all exons and their flanking intronic regions in *CHKB* (MIM 612395, NM_005198.4, GenBank Gene ID 1120) in genomic DNA extracted from individuals' peripheral lymphocytes. All 15 individuals in three different populations (Japanese, Turkish, and British) had homozygous or compound heterozygous mutations in

¹National Institute of Neuroscience, Department of Neuromuscular Research, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo 1878502, Japan;

²Department of Pediatrics, Pathology Unit, Hacettepe Children's Hospital, Ankara, 06100, Turkey; ³School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, Tokyo, 1088641, Japan; ⁴Department of Biochemistry, Dokkyo Medical University School of Medicine, Mibu, 3210293, Japan; ⁵Department of Pediatrics, The Kanagawa Rehabilitation Center, Kanagawa, 2430121, Japan; ⁶Dubowitz Neuromuscular Centre, Great Ormond Street Hospital for Children NHS Trust, London, WC1N 3JH, UK; ⁷MRC Centre for Neuromuscular Disorders, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, Queen Square, London, WC1N 3BG, UK; ⁸RJAH Orthopaedic Hospital, Oswestry, SY107AG, UK; ⁹Department of Metabolome, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, 1130033, Japan; ¹⁰The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, 04609, USA; ¹¹Department of Pediatrics, Child Neurology Unit, Hacettepe Children's Hospital, 06100, Ankara, Turkey

*Correspondence: nishino@ncnp.go.jp

DOI 10.1016/j.ajhg.2011.05.010. ©2011 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.

Table 1. Summary of Clinical and Laboratory Features

Individual	Sex	Origin	Phenotypic Findings						Muscle Pathology						Mutations				Literature ref. on phenotype		
			Age at Last Follow-Up	Floppy at Birth	Walk Alone	Serum Creatine Kinase (IU/liter)	Head Circumference (percentile)	Mental Retardation	Seizure	Cardiomyopathy	Skin Change	Age at Muscle Biopsy	Necrotic Fiber	Regenerative Fiber	Endomyal Fibrosis	Mitochondrial Enlargement	Status	cDNA		Consequence	Exon
1	F	Japanese	died at 13 yr	+	2 yr 6 mo	370	ND	+	-	+	-	7 yr 3 mo	+	+	+	+	homo	c.810T>A	p.Tyr270X	7	2
2	M	Japanese	died at 23 yr	+	1 yr 9 mo	190–2676	25–50	+	+	+	-	1 yr 2 mo	+	+	+	+	homo	c.810T>A	p.Tyr270X	7	2
3	F	Japanese	28 yr	+	1 yr 6 mo	502	ND	+	+	+	-	8 yr	+	+	+	+	het	c.116C>A	p.Ser39X	1	2
																	het	c.458dup	p.Leu153PhefsX57	3	2
4	M	Japanese	22 yr	+	2 yr 6 mo	230	3–10	+	+	-	-	4 yr 11 mo	+	+	+	+	het	c.116C>A	p.Ser39X	1	
																	het	c.458dup	p.Leu153PhefsX57	3	
5	M	Turkish	7 yr	-	2 yr 6 mo	843	<3	+	-	-	+	6 yr	±	+	+	+	homo	c.611_612insC	p.Thr205AsnfsX5	5	
6 ^a	M	Turkish	died at 2 yr 6 mo	+	no	258	<3	+	-	+	-	1 yr 3 mo	±	±	+	+	homo	c.922C>T	p.Gln308X	8	
7	F	Turkish	2 yr	-	no	368	3–10	+	-	^b	-	9 mo	-	±	+	+	homo	c.847G>A	p.Glu283Lys	8	
8	M	Turkish	13 yr	ND	2 yr	1122	ND	+	-	-	-	12 yr 10 mo	±	±	+	+	homo	c.1130 G>T	p.Arg377Leu	11	
9	F	Turkish	17 yr	+	3 yr	2669	<3	+	-	ND	-	17 yr	±	±	+	+	homo	c.554_562del	p.Pro185_Trp187del	4	
10	F	Turkish	16 yr	+	3 yr	1103	<3	+	-	^c	+	3 yr	-	±	+	+	homo	c.677+1G>A	ND	5	
11	F	Turkish	3 yr 3 mo	+	no	497	10–25	+	-	ND	-	3 yr	±	-	+	+	homo	c.677+1G>A	ND	5	
12	F	Turkish	5 yr	-	3 yr 6 mo	467	25–50	+	-	^d	+	4 yr 6 mo	±	+	+	+	homo	c.677+1G>A	ND	5	
13	M	Turkish	3 yr 6 mo	+	no	428	<3	+	-	+	+	3 yr	+	+	+	+	homo	c.1031+1G>A	aberrant splicing	9	
14	F	Turkish	6 yr 4 mo	-	1 yr 3 mo	1606	3–10	+	-	+	-	4 yr	+	+	+	+	homo	c.1031+1G>A	ND	9	
15	M	British	died at 8 yr	-	3 yr 4 mo	607–1715	<3	+	-	+	+	2 yr 2 mo	+	-	+	+	homo	c.852_859del	p.Trp284X	8	

Detailed clinical information for individual 1 to 4 was previously described (2). Eleven CHKB mutations were identified in 15 affected individuals. All exhibited generalized muscle hypotonia and weakness from early infancy. Ambulation was delayed, and gait in those who achieved walking was limited. In addition, all displayed marked mental retardation, and most never acquired meaningful language. Microcephaly with head circumferences at or below the 3rd to 10th percentile was observed in most cases. Cranial magnetic resonance imaging showed no developmental brain defects. Six individuals had dilated cardiomyopathy, and two had cardiac anomaly. Individuals 1, 2, 6, and 15 died from cardiomyopathy at ages 13 yr, 23 yr, 2 yr 6 mo, and 8 yr, respectively. No one had respiratory insufficiency. Ichthyosiform skin changes were frequent. All showed mildly to moderately elevated serum creatine kinase (CK) levels. Individuals 7 and 9 also had homozygous single-nucleotide substitutions, c.902C>T (p.Thr301Ile) and c.983A>G (p.Gln328Arg), respectively. CHK activities of recombinant CHK- β proteins with p.Thr301Ile and p.Gln328Arg were only mildly decreased (Figure S2), suggesting these are likely to be neutral polymorphisms or only mildly hypomorphic mutations. Individuals 10, 11, and 12, who have same c.677+1G>A mutation, and individuals 13 and 14, who have same c.1031+1G>A mutation, are not siblings. Abbreviations are as follows: ND, not determined; p, percentile; F, female; and M, male.

^a An affected sibling had ichthyosis and died at age 6 years with cardiomyopathy.

^b Patent ductus arteriosus.

^c Atrial septal defect.

^d Mitral valve prolapse.