

201231057B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（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～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者 西野 一三

平成25（2013）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（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～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者 西野 一三

平成25（2013）年 3月

目次

I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 9

III. 研究成果の刊行物・別刷 11

I. 総合研究報告

「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」

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

VI型コラーゲン (COL6) をコードする *COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3* 遺伝子の変異によって発症する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) の患者データベースの構築、両疾患の病態解明・治療法開発研究を促進するためのデータをを得ることを目的とした。

BMでは20例を対象に臨床情報を解析した。BMの1家系の *COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3* 遺伝子変異解析を行い、p. Lys319Argヘテロ接合性変異を同定した。遺伝学的に確定されたBMの2家系から長期経過を解析し、根本的な治療法開発とは別に患者の機能予後を改善する方法を探索した。早期の足関節拘縮が特徴であり、歩行障害は筋力低下よりも尖足によって生じること、リハビリテーションやアキレス腱延長術などの整形外科的治療が有効であることを明らかにした。BMの骨格筋COL6異常は筋線維鞘特異欠損 (SSCD) で、1例では正常と見誤る程度のSSCDであった。

UCMDの49例を対象として *COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3* 遺伝子変異解析を行った。そのうち33例の臨床情報を解析し、歩行、呼吸機能、脊柱変形の自然経過を明らかにした。さらに、遺伝子変異が同定された19例について、遺伝子型表現型の相関解析を行った。完全欠損 (CD) は、recessiveかつCOL6蛋白を産生しない変異で起こり、運動機能は最重症の経過をとる。SSCDはTriple helical domain (THD) の *de novo* ヘテロ接合性変異で起こり、*COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3* の各THDとそこに生ずる変異の種類によって多様な表現型異質性をとる。*COL6A1* c. 850G>A (p. Gly284Arg) 変異はSSCDを呈するが、CDに近い重症の例から14歳まで歩行可能な比較的軽症の例まであり、同一の遺伝子変異であっても広い表現型異質性がみられる。

遺伝子変異型から骨格筋のCOL6発現パターンは予測可能であるが、表現型の重症度を予測することは容易でない。THDのどのような部位がCOL6のアッセムブリーにより影響を与えるかどうかを明らかにする必要がある。また、その結果として起こるCOL6蛋白の局在異常の程度が表現型の重症度と相関する可能性がある。

劣性遺伝形式を呈するBMや軽症のUCMDは見逃されている可能性が高いと思われ、疑い例では *COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3* と共に関連蛋白の各遺伝子群について次世代シーケンサーを用いた解析を行った。関節拘縮や過伸展を伴うミオパチー2例でそれぞれ *COL6A1*, *COL6A2* にヘテロ接合性変異を同定した。次世代シーケンサーシステムを利用した患者の再検討によって診断効率を向上できる。

UCMD患者由来線維芽細胞でmRNA監視機構を抑制すると、欠損していたCOL6が一部合成され細胞機能が改善する。これらの治療薬とヒトリコンピナントトロンボモジュリン (rTM) との併用が有効な治療となりうるかどうかを解析するために、rTMをCOL6欠損線維芽細胞に添加し接着能と生存率が改善することを示した。

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

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

米川貴博・(独)国立精神・神経医療
研究センター神経研究所
疾病研究第一部流動研究員

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*, *COL6A2*, *COL6A3* 遺伝子変異によって発症する。両疾患は BM を軽症型、UCMD を重症型とする一連のスペクトラムを形成する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に基づく診断基準を作成した。

本研究では、①COL6 関連筋疾患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 COL6 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

①COL6 関連筋疾患の遺伝子診断システムの確立

COL6A1, *COL6A2*, *COL6A3* 遺伝子の全エクソンおよび近傍イントロンのシークエンス解析法を確立することを目指した。また、次世代シークエンスを用いた効率的な遺伝子診断システムの確立と運用を目指した。

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 COL6 に異常のない症例の新規原因遺伝子探索

COL6A1, *COL6A2*, *COL6A3* 遺伝子と共に collagen XIV α 1 (*COL14A1*), collagen XV α 1 (*COL15A1*), NG2 proteoglycan (*CSPG4*), HSP47 (*SERPINH1*), biglycan (*BGN*), fibromodulin (*FMOD*) を候補として次世代シークエンス解析を行った。

③遺伝子型・表現型相関解明

本研究班で行った全国実態調査で解析対象とした UCMD 症例に加え、TMC 凍結生検筋レポジトリーで当研究班の UCMD 診断基準を満たす症例を合わせた計 49 例のうち、遺伝子変異未解析の 12 例について、*COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3* の全エクソン、隣接イントロンを直接シークエンス法で解析した。そのうち、UCMD19 例は遺伝学的に確定され、周生期・発達歴、臨床症状、骨格筋 COL6 異常、運動機能、

呼吸や側弯症の長期経過についての情報があるため、genotype-phenotypeの相関の有無を解析した。

また、常染色体優性遺伝形式をとり、遺伝学的にも診断確定された BM 家系で長期経過を解析した。

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。

UCMD 患者由来線維芽細胞で mRNA 監視機構を抑制すると、欠損していた COL6 が一部合成され細胞機能が改善する。これらの治療薬とヒトリコンビナントトロンボモジュリン (rTM) との併用が有効な治療となりうるかどうかを解析するために、rTM を COL6 欠損線維芽細胞に添加し接着能と生存率が改善するかどうかを解析した。

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)

本申請研究において使用するすべてのヒト検体は、生検時に NCNP 倫理委員会で承認を受けた「診断と検体の研究使用に関する承諾書」を用いてインフォームド・コンセントを得ており、「神経・筋疾患の病態解明と治療法開発」を目的とした研究への検体使用が認可されている。鹿児島大学における筋病理学的検索についても、インフォームド・コンセントを得て採取された組織を扱う。また、臨床情報を扱う際には、連結可能匿名化された既存の情報のみを扱う。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。

C. 研究結果

①COL6 関連筋疾患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。また、今後は、まず次世代シーケンスを用いて遺伝子変異を同定し、直接シーケンス法によって確認する遺伝子診断システムを運用する。

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 COL6 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

遺伝子変異未解析の 12 例のうち、3 例でヘテロ接合性変異が確認された。2 例は $\alpha 1$ 鎖の Tripple helical domain (THD) における Gly のミスセンス変異 c. 850G>A p. Gly284Arg、c. 860G>A p. Gly287Glu であり、1 例は $\alpha 2$ 鎖の THD の deletion 変異であった。残りの 9 例には、genome DNA の全エクソン、隣接イントロンに変異は同定できなかった。本研究で対象とした 49 例のうち、33 例 (67%) に変異を同定し、未同定は 15 例、未解析は 1 例となった。

骨格筋 COL6 の complete deficiency

(CD)は4/19例で、うち3例では splice site 変異か frame shift 変異をホモ接合性或いは複合ヘテロ接合性に有していた。CDの1例は、 $\alpha 3$ 鎖の THD 外のミスセンス変異をヘテロ接合性に有していた。一方、sarcolemma specific collagen VI deficiency (SSCD)を示す15例では、 $\alpha 1$ 鎖の THD に変異を有する例は9例、 $\alpha 2$ 鎖の THD に変異を有する例は3例、 $\alpha 3$ 鎖の THD に変異を有する例は3例であった。

CD 4例のうち、3例は独歩未獲得で、1例は6歳で独歩不能となった。SSCD 例には、独歩未獲得2例、歩行機能を喪失した年齢が6歳1例、10歳1例、11歳3例、14歳1例おり、また16歳でも歩行可能な例があるなど、運動機能について大きな表現型異質性が認められた。呼吸機能については、%VC 値の変化を CD、SSCD 群で比較することはできないが、noninvasive ventilation (NIV) 導入年齢については、運動機能ほど両群に違いはなかった。側弯症の悪化は、CD 3例と SSCD 12例の Cobb 角で評価し、SSCD の方が側弯は重度で進行も早い可能性が示唆された。

SSCD を呈する4例は、*COL6A1*c. 850G>A p. Gly284Arg ヘテロ接合性変異を有していた。うち2例は独歩未獲得で、SSCD ながら CD に近い重症度を示した。一方、ほかの2例は独歩を獲得し、14歳まで歩行可能であった例と、5歳時で歩行可能であることが確認された例があった。同一変異を有する例の間にも重症度に大きな違いがみられた。

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ルーチンの COL6 免疫染色に異常は認められなかったが、IV 型

コラーゲン、VI 型コラーゲンに対する蛍光抗体を用いた二重染色法では、筋線維鞘特異的欠損 (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 の自然歴とは異なっていた。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、いずれもルーチンの COL6 免疫染色では 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一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。

④分子病態解明

常染色体優性遺伝形式をとり遺伝学的にも確定されたBM家系の骨格筋におけるCOL6異常は、蛍光抗体を用いた二重染色法によって明らかとなるSSCDであり、ルーチンのCOL6抗体染色では見逃される可能性があった。UCMDの典型例では、ルーチンのCOL6抗体染色ではほぼ診断可能であることから、COL6蛋白の筋線維膜に対する位置関係が表現型の重症度と相関する可能性がある。

rTMをCOL6欠損線維芽細胞に添加したところ、接着能と生存率が改善した。

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思われるBM 20、UCMD 49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システムを運用する必要がある。

BM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目立つものであった。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。

BMのCOL6免疫染色については、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。SSCDには、典型的な例から正常と見誤るほどの例まであり、COL6蛋白の筋線維膜に対する位置関係が表現型の重症度と相関する可能性がある。最近COL6関連筋疾患患者のなかにUCMD、BMに分類できないintermediate formを呈する患者がいることが知られている。典型的なSSCDを呈するが、UCMDより軽症でBMより重症の例は、intermediate formに該当すると思われる。

UCMDのmutation detection rateは67%であり、海外の他グループと同程度と考えられる。変異未同定の例では、deletion、duplication、或いはintronicな変異が存在すると考えられる。

CDは、splice siteまたはframe shift変異をホモ接合性或いは複合ヘテロ接合性に有することが報告されているが

(Okada M, et al. 2007)、1例のCDは、 $\alpha 3$ 鎖のTHD外のミスセンス変異をヘテロ接合性に有するのみで、COL6の完全欠損に至るメカニズムは今回の研究では明らかではない。*COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3*の1つまたは複数にまたがる deletion や duplication、intronic な変異をホモ接合性ないしは複合ヘテロ接合性にもつ可能性が否定できない。

CDは、recessiveかつCOL6蛋白を形成できない変異によって起こるため、SSCDよりも重症の表現型をとることが予想される。実際、運動機能についてはSSCDより重症である。しかし、呼吸機能や側弯症の重症度との相関はみられず、むしろ側弯症はSSCD例の方が重度の側弯を呈するようである。SSCDはTHDのdominant *de novo*変異で発症し、不完全なCOL6蛋白が形成されるために、筋線維膜へのアンカリングができないと考えられる。側弯症の重症度とCOL6局在異常との関係を明らかにするためにはさらに研究が必要である。

SSCDには大きな表現型異質性がみられる。THDの同じようなグリシンのミスセンス変異でも、COL6のアッセムブリーに参与する部位かどうかにより、COL6蛋白量および臨床像が異なることが知られており、*COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3*の各THDとそこに生ずる変異の種類が多様な重症度を引き起こすと考えられる。さらに、*COL6A1* c. 850G>A (p. Gly284Arg) の変異例の表現型異質性からも明らかなように、modifier geneの存在も考える必要があり、遺伝子変異型から表現型を予測することは容易ではない。今後さらに症例を蓄積し、THDのどのような部位がCOL6のアッセムブリーにより影響を与えうるかを明らか

かにすることで、臨床像の予測につながる可能はある。

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。

rTMによる実験的治療を細胞レベルから実験動物レベルに進めて臨床応用を目指す。

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。すなわち、COL6局在異常は、完全欠損から正常に近いSSCDにまで遺伝子変異によって異なり、最重症のUCMD例から典型的なUCMD例、比較的軽症のUCMD或いは比較的重症のBM例、典型的なBM例まで異なる表現型を生み出す。

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. 研究発表

1. 論文発表

Mitsuhashi S, Ohkuma A, Talim B, Karahashi M, Koumura T, Aoyama C, Kurihara M, Quinlivan R, Sewry C, Mitsuhashi 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, 2011.

Fujita M, Mitsuhashi H, Isogai S, Nakata T, Kawakami A, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I: 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* 361 (1) : 79-89, 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, 2012.

Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsuhashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: *In Vivo* Characterization of Mutant Myotilins. *Am J Pathol.* 180 (4) : 1570-1580, 2012.

米川貴博, 西野一三: ベスレムミオパチーとウルリッヒ病. 先天代謝異常症候群 (第2版) 下-病因・病態研究, 診断・治療の進歩-別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズNo. 20:736-740, Dec, 2012.

2. 学会発表

米川貴博, 小牧宏文, 齋藤貴志, 齋藤義朗, 中川栄二, 須貝研司, 佐々木征行, 岡田麻里, 林由起子, 埜中征哉, 西野一三: ウルリッヒ型先天性筋ジストロフィーの全国実態調査. 第54回日本小児神経学会総会. 札幌, 5. 17-5. 19, 2012.

Yonekawa T, Komaki H, Okada M, Hayashi YK, Nonaka I, Sugai K, Sasaki M, Nishino I: Natural course of Ullrich congenital muscular dystrophy in Japan. The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center. Kyoto, 6. 6-6. 8, 2012.

米川貴博, 小牧宏文, 岡田麻里, 林由起子, 埜中征哉, 樋口逸郎, 齋藤貴志, 齋藤義朗, 中川栄二, 須貝研司, 佐々木征行, 西野一三: ウルリッヒ型先天性筋ジストロフィーの全国実態調査. 第29回小児神経筋疾患懇話会. 東京, 8. 25, 2012.

Yuan J, Higuchi I, Sakiyama Y, Inamori Y, Matsuura E, Higuchi Y, Yoshimura A, Hashiguchi A, Higashi K, Koreeda Y, Arimura K, Takashima H: Novel missense mutations and partial deficiency of collagen VI in Ullrich congenital muscular dystrophy. Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, San Francisco, USA, 11. 7, 2012.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ. 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, Nishino I: 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, 2011.
Fujita M, Mitsuhashi 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. <i>Dev Biol.</i> 361(1):79-89, 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. <i>Neuromuscul Disord.</i> 22(2):149-151, 2012.
Keduka E, Hayashi YK, Shalaby S, Mitsuhashi H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: <i>In Vivo</i> Characterization of Mutant Myotilins. <i>Am J Pathol.</i> 180(4): 1570-1580, 2012.
米川貴博, 西野一三：ベスレムミオパチーとウルリッヒ病. 先天代謝異常症候群（第2版）下－病因・病態研究, 診断・治療の進歩－別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 20 : 736-740, 2012.

Ⅲ. 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	Endomyxial 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
4	M	Japanese	22 yr	+	2 yr 6 mo	230	3–10	+	+	–	–	4 yr 11 mo	+	+	+	+	het	c.116C>A	p.Ser39X	1	2
																	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.

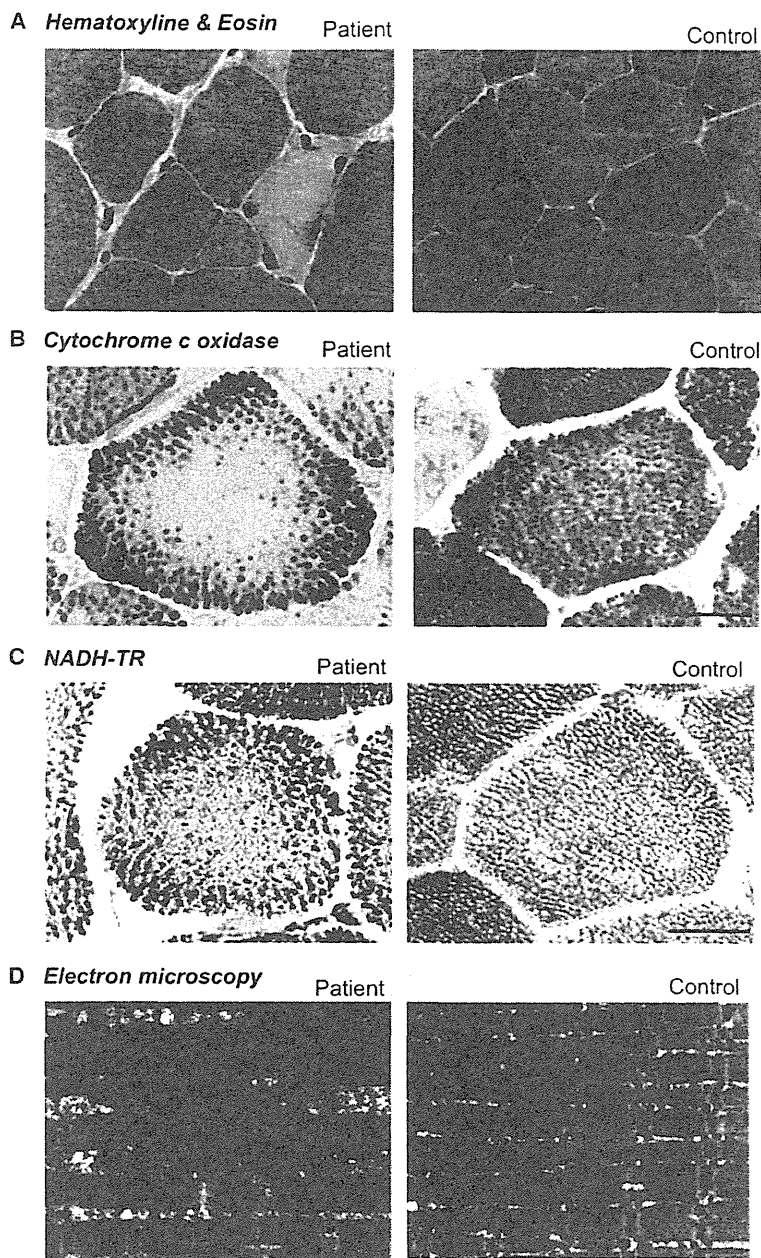


Figure 1. Muscle Pathology of the Affected Individuals

Cross-sections of muscle fiber from a human control and individual 4.

(A) On H&E staining, nonspecific dystrophic features with necrotic and regenerating fibers, internalized nuclei, and endomysial fibrosis are seen. The scale bar represents 25 μm .

(B) On cytochrome c oxidase staining, enlarged mitochondria at the periphery and central areas devoid of mitochondria were seen. The scale bar represents 20 μm .

(C) On NADH-TR staining, the intermyofibrillar network was preserved even in the central areas that are devoid of mitochondria, suggesting the presence of myofibrils and only absence of mitochondria. The scale bar represents 20 μm .

(D) Electron microscopy confirmed enlarged mitochondria. The scale bar represents 1 μm .

members of individual 1 and 2 were not available. Individuals 3 and 4 (siblings, Japanese) had the same compound heterozygous mutation c.116C>A (p.Ser39X) and c.458dup (p.Leu153PhefsX57). Both parents were healthy, and the father was heterozygous for mutation c.116C>A (p.Ser39X), whereas the mother was heterozygous for mutation c. 458dup (p.Leu153-PhefsX57), thus confirming a recessive inheritance pattern. These mutations cosegregated with the disease phenotype in all family members tested.

We therefore measured CHK activity in biopsied muscle. For all biochemical analyses, because of the limiting amounts of remaining tissue, biopsied muscle samples were available only from individuals 2, 3, and 4. Biopsied muscle samples from these three individuals were homogenized in 3 volumes of 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 154 mM KCl, and 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride with a sonicator (MISONIX), and supernatant fractions (105,000 \times g, 60 min) were prepared and analyzed for CHK activity as

previously described.⁶ Similar to muscles of *rmd* mice,¹ muscles from individuals 2, 3, and 4, who carried homozygous or compound heterozygous nonsense mutations, did not have any detectable CHK activity (Figure 2A). Individuals 7, 8, and 9 had homozygous missense mutations c.847G>A (p.Glu283Lys) and c.1130 G>T (p.Arg377Leu) and a homozygous 3 amino acid deletion, c.554_562 del (p.Pro185_Trp187del), respectively. We screened 210 control chromosomes for the identified missense mutations and small in-frame deletion by direct sequencing or single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. SSCP was performed with Gene Gel Excel (GE Healthcare) as previously described.⁷ These missense mutations and this small in-frame deletion were not identified in control

previously described.⁶ Similar to muscles of *rmd* mice,¹ muscles from individuals 2, 3, and 4, who carried homozygous or compound heterozygous nonsense mutations, did not have any detectable CHK activity (Figure 2A). Individuals 7, 8, and 9 had homozygous missense mutations c.847G>A (p.Glu283Lys) and c.1130 G>T (p.Arg377Leu) and a homozygous 3 amino acid deletion, c.554_562 del (p.Pro185_Trp187del), respectively. We screened 210 control chromosomes for the identified missense mutations and small in-frame deletion by direct sequencing or single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. SSCP was performed with Gene Gel Excel (GE Healthcare) as previously described.⁷ These missense mutations and this small in-frame deletion were not identified in control

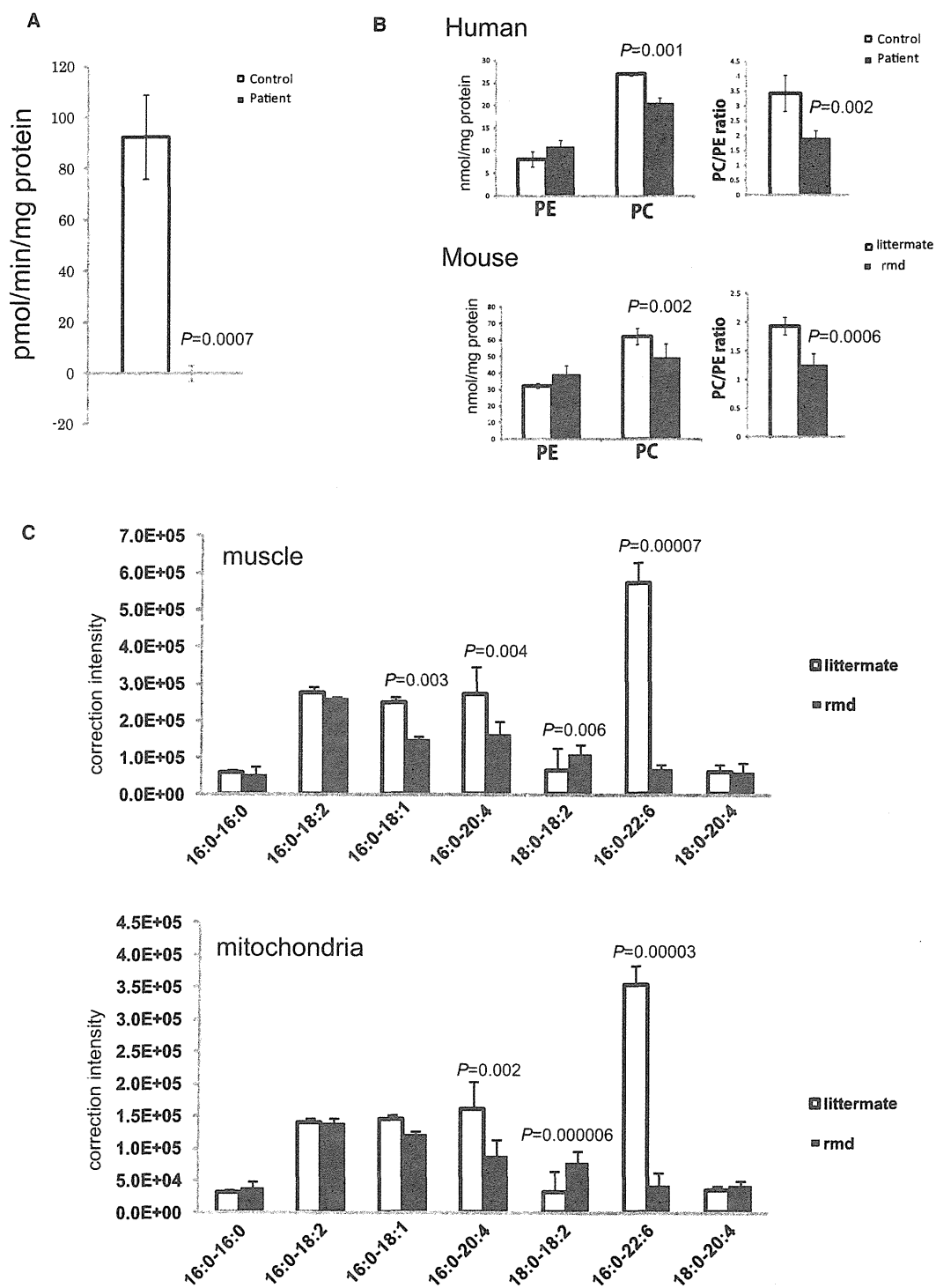


Figure 2. Choline Kinase Activity and Phospholipid Analyses

(A) In muscle tissue from individuals 2, 3, and 4, CHK activity cannot be detected ($n = 3$). Data represent the mean of three individuals. (B) PC and PE content in frozen biopsied muscle tissues from individuals 2, 3, and 4 and hindlimb muscles from 8-week-old *rmd* mice ($n = 4$) and control littermates ($n = 5$) were analyzed by thin-layer chromatography followed by phosphorus analysis. PC and the PC/PE ratio are significantly decreased in affected individuals and *rmd* mice ($n = 3$ for humans, $n = 4$ for *rmd* mice, $n = 5$ for littermates). (C) Fatty acid composition of PC molecular species in muscles and isolated mitochondria from hindlimb muscles of *rmd* mice are determined by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). We observed that 34:1-PC (16:0-18:1), 36:4-PC (16:0-20:4), and 38:6-PC (16:0-22:6) species are significantly decreased, whereas 36:2-PC (18:0-18:2) is increased in *rmd* muscle. Similarly, in isolated mitochondria from hindlimb muscle, 36:4-PC (16:0-20:4) and 38:6-PC (16:0-22:6) species are decreased, whereas 36:2-PC (18:0-18:2) is increased.

chromosomes. To elucidate the pathogenesis of these substitutions, we measured CHK activity in recombinant proteins with mutations. We cloned the open reading frame of *CHKB* into pGEM-T easy (Promega), then subcloned it into pET15b (Novagen) to make His-tagged CHK- β .⁸ Each mutation was induced by site-directed mutagenesis.⁷ Plasmids were transformed into *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) and inoculated at 20°C to an OD₆₀₀ of approximately 0.5, and the addition of 0.4 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside induced expression. The His-tagged CHK- β proteins were subjected to affinity purification on a nickel column (GE Healthcare) and eluted with 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5 M NaCl, 300 mM imidazol, and 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, and 25 ng protein was analyzed for CHK activity. CHK activity of recombinant proteins with these mutations decreased to less than 30% of wild-type CHK activity, suggesting that these mutations are causative in these individuals (Figure S2). For individual 13, who had a mutation at the splice site of the exon-intron border after exon 9 (c.1031+1G>A), we also analyzed cDNA sequences. Exons 4 through 10 were amplified from the first-strand cDNAs, and direct sequencing followed. cDNA analysis of *CHKB* in skeletal muscle from individual 13 showed four splicing variants, all of which remove consensus domains for *CHKB* (Figure S3). This suggests the same loss-of-function mechanism in humans and *rmd* mice.

Because phosphorylation of choline by CHK is the first enzymatic step for phosphatidylcholine (PC) biosynthesis,⁹ we anticipated that PC content should be altered in affected individuals' muscles. Phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), and total phospholipid amounts were measured in biopsied muscles from individuals 2, 3, and 4 and in leg muscles from 8-week-old *rmd* mice by either one-dimensional or two-dimensional thin-layer chromatography (TLC) followed by phosphorus analysis.^{10,11} As expected, PC levels decreased in affected individuals' skeletal muscle (Figure 2B), as they did in *rmd* mice (Figure 2B and Sher et al.¹), suggesting that the CMDs due to *CHKB* mutations in humans and *rmd* mice are not only pathologically but also pathomechanistically similar.

PC is present in all tissues and accounts for around 50% of phospholipids in biological membranes in eukaryotes. Selective tissue involvement can be explained by the different tissue distribution of CHK isoforms. There are two CHK isoforms: CHK- α and CHK- β , encoded by distinct genes, *CHKA* (MIM 118491) and *CHKB*, respectively. They

are known to form both homodimers and heterodimers, with differential tissue distribution.¹² In mice, disruption of *Chka* causes embryonic lethality,¹³ suggesting the importance of CHK- α in embryonic development. In skeletal muscles from *rmd* mice, CHK activity is absent, and PC levels are decreased.¹ In other tissues, however, CHK activity is only mildly decreased, PC levels are not altered, and no obvious pathological change is seen.¹ CHK activity in skeletal muscle from individuals 2, 3, and 4 is barely detectable, and PC levels are significantly decreased, suggesting that CHK- β is the major isoform in human skeletal muscle. In support of this notion, CHK- α was not detected in human muscle (Figure S4). These results suggest that muscular dystrophy in affected individuals and *rmd* mice is caused by a defect in muscle PC biosynthesis. In addition, in *rmd* mice, hindlimb muscles are more significantly affected than forelimb muscles.¹ This is most likely explained by the fact that CHK activity is detected, though decreased, in forelimb muscles in *rmd* mice as a result of the continued post-natal expression of *Chka*.¹⁴ This indicates that the severity of muscle involvement is determined by the degree of deficiency of CHK activity.

Generally, phospholipids have saturated or monounsaturated fatty acids at the *sn*-1 position and polyunsaturated fatty acids at the *sn*-2 position of glycerol backbone.¹⁵ It has been shown that phospholipids have tissue-specific fatty acid composition.¹⁵ For example, heart PC and muscle PC mainly contain docosahexaenoic acid (22:6) (Nakanishi et al.¹⁵ and Figure 2C), but liver PC includes various fatty acids.¹⁵ NanoESI-MS analyses of PC molecular species in muscle and isolated mitochondria were performed with a 4000Q TRAP (AB SCIEX, Foster City, CA, USA) and a chip-based ionization source, TriVersa NanoMate (Advion BioSystems, Ithaca, NY, USA).¹⁶ Quadriceps femoris (hindlimb) and Triceps (forelimb) muscle from affected *rmd* mice and littermate controls were frozen with liquid nitrogen, and total lipid was extracted by the Bligh and Dyer method.¹⁰ The ion spray voltage was set at -1.25kV, gas pressure at 0.3 pound per square inch (psi), and flow rates at 200 nl/min. The scan range was set at m/z 400-1200, declustering potential at -100V, collision energies at -35~-45V, and resolutions at Q1 and Q3 "unit." The mobile phase composition was chloroform:methanol (1/2) containing 5 mM ammonium formate and was normalized to the muscle weight. The total lipids were directly subjected by flow injection, and selectivity was analyzed by neutral loss scanning of the polar head

In muscle and isolated mitochondria, the 38:6-PC molecular species is profoundly decreased (n = 6 for muscle, n = 5 for isolated mitochondria).

Mitochondria from skeletal muscles of whole hindlimbs of *rmd* mice were isolated by the differential centrifugation method. Fresh muscle was minced and homogenized with a motor-driven Teflon pestle homogenizer with ice-cold mitochondrial isolation buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.2], 320 mM sucrose, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1 mM PMSE, 1 mg/ml BSA, and protease inhibitor cocktail [Roche]) and centrifuged at 1,500 \times g for 5 min. The supernatant fraction was centrifuged at 15,000 \times g for 20 min, the pellet was resuspended in mitochondrial isolation buffer, and the centrifugation/resuspension was repeated twice more.

All data are presented as means \pm standard deviation (SD). Means were compared by analysis with a two-tailed t test via R software version 2.11.0.