

Loci for the genes *SLC6A8* and *ABCD1* are within a 55-kb span of Xq28. Loss-of-function mutations in *SLC6A8* are associated with X-linked creatine transporter deficiency (CRTR-D), which is characterized by severely reduced brain creatine on ¹H-magnetic resonance spectroscopy (¹H-MRS) and an increased creatine/creatinine ratio in urine. Males present with intellectual disability, severe speech delay, behavioral problems and seizures. The creatine uptake defect can be confirmed in cultured fibroblasts (1).

Loss-of-function mutations in *ABCD1* are associated with X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD), which is characterized by reduced β -oxidation of very long chain fatty acids (VLCFAs), demyelination of white matter and adrenal cortex atrophy. Elevated plasma VLCFA is present at birth. The phenotypic expression of *ABCD1* mutations varies widely. The most severe form, childhood cerebral X-ALD, has an onset usually after 3 years of age; it is characterized by neurological deterioration, often starting with behavioral problems and learning deficits, and later progresses to total disability and death (2).

BCAP31 is located between *SLC6A8* and *ABCD1*. It is in a head-to-head orientation with *ABCD1* and a tail-to-tail orientation with *SLC6A8*. In 2002, Corzo et al. (3) reported three male newborns with large *ABCD1* deletions that extended into *BCAP31* (*DXS1357E*). They had profound hypotonia, developmental delay, hepatic cholestasis and death prior to their first birthday. This severe neonatal presentation has never been observed in isolated *ABCD1* defects. The extent of the contiguous gene deletions was not determined in all the three boys, but the patient with the smallest deletion was characterized and showed that the critical region included the 5' coding exons of *BCAP31* and *ABCD1*. The syndrome was named 'contiguous *ABCD1* *DXS1357E* deletion syndrome' (CADDs). A fourth CADDs patient with a similar phenotype has been reported; he had a large deletion spanning seven genes: *BCAP31*, *ABCD1*, *PLXNB3*, *SRPK3*, *IDH3G*, *SSR4* and *PDZD4* (4).

Large deletions involving *SLC6A8* were reported in three boys with a more severe presentation than in classic CRTR-D; they had pronounced hypotonia and developmental delay, severe failure to thrive and dystonia or choreathetoid movements (5, 6). In one patient, the deletion extended into *BCAP31* (6). However, the deletion size was not determined in the other two patients (5).

These studies suggest that the clinical phenotypes associated with *ABCD1* or *SLC6A8* deficiencies were exacerbated by concomitant knockout of *BCAP31*. Just recently, isolated loss-of-function mutations in *BCAP31* were reported in association with a severe phenotype combining deafness, dystonia and cerebral hypomyelination (DDCH, MIM 300475) (7). Conclusions regarding the contribution of the separate genes in contiguous gene deletions involving *SLC6A8*, *BCAP31* and/or *ABCD1* were hampered by the fact that the deletion size was not determined in all the seven reported patients (3, 5). We characterized the break

points in five patients and provide an update of the patients who were alive at the time of the previous report (5, 6). In addition, we describe two new patients with a CADDs and one patient with an isolated partial *SLC6A8* deletion. We discuss the genotype-phenotype correlations in all the 10 patients.

Materials and methods

Materials and patients

DNA was isolated from blood or cultured fibroblasts of eight patients with suspected large gene deletions of *SLC6A8* and/or *ABCD1*. Three patients were suspected of *SLC6A8* deletions and five patients of *ABCD1* deletions, based on clinical and biochemical features and the absence of polymerase chain reaction (PCR) products of the involved gene. Case reports of two patients with *SLC6A8* deletions (5, 8) and three patients with CADDs (3) were previously reported. In addition, the genotype and phenotype of two previously reported contiguous gene deletion patients (4, 6) were reviewed (patients 9 and 10).

Break point analysis

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) using the P049 kit with probes for several exons of *SLC6A8*, *BCAP31*, *ABCD1* and neighboring genes was performed to confirm the deletions and to estimate their size. To narrow down the regions of the break point, PCRs of about 200 bp in intervals of ~5–10 kb were designed flanking the deleted MLPA probes. Finally, long-range PCR over the break point was performed followed by DNA sequencing to reveal the exact break points. All primers were designed with a high specificity for the X-chromosome, as a paralogous gene region occurs on chromosome 16.

RNA analysis of *BCAP31*

RNA was isolated from the available fibroblasts of patients 2–6 and 9. Subsequently, cDNA was synthesized using oligodT. In order to study whether the deletions resulted in truncated transcripts, we amplified specific regions of the *BCAP31* transcript (i.e. exons 1–8, 1–4 and 5–8) using specific reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) primers.

Results

Break point analysis

The break points were sequenced by long-range PCR in seven patients (Appendix S1, Supporting information). Although long-range PCR was unsuccessful in eighth patient (patient 6), MLPA and locus-specific PCR analyses narrowed down the break point sites to between exons 5 and 8 in *BCAP31* and between exons 7 and 8 in *ABCD1*. In total, of the 10 patients reported here, 2 had isolated partial *SLC6A8* deletions and 8

Gene deletions of *SLC6A8*, *BCAP31* and *ABCD1*

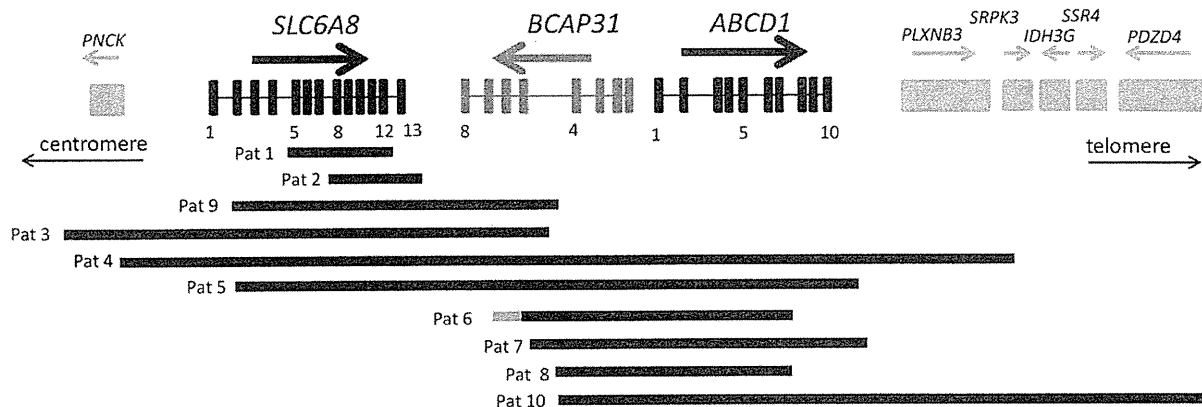


Fig. 1. Location and size of the deletions on Xq28. Deletions are depicted with black bars. The exact break point in patient 6 is unknown and the uncertainty of the involvement of *BCAP31* exons 6 and 7 in the deletion is depicted by a gray bar.

had a contiguous gene deletion involving *BCAP31* and *SLC6A8* and/or *ABCD1* (Fig. 1; Table 1).

Genotype–phenotype correlation

The clinical features of the patients are summarized in Table 1. The patients with contiguous gene deletions involving *BCAP31* ($n=8$) shared many features: profound developmental delay, severe failure to thrive, sensorineural hearing loss and childhood death. Seizures occurred in some. All the patients with deletions involving both *BCAP31* and *ABCD1* ($n=6$) developed cholestatic liver disease and died in the first year of life. It is not documented whether the cause of death was related to liver failure in all cases. By contrast, patients with deletions of *SLC6A8* and *BCAP31* but not *ABCD1* ($n=2$) did not develop cholestatic liver disease, survived until at least 6 years and developed severe dystonia and choreoathetosis after 3 years. Patient 2 with an isolated deletion of exons 8–13 of *SLC6A8* also had a severe presentation with death at 8 years, but without sensorineural hearing loss. By contrast, patient 1 with an isolated deletion of exons 5–12 of *SLC6A8* had a phenotype consistent with classic CRTR-D.

RNA analysis of *BCAP31*

RT-PCR confirmed the absence of *BCAP31* transcripts in patients 4–6. A truncated transcript of exons 1–4 was present in patients 3 and 9. In patient 2, a full-length *BCAP31* transcript was detected (Appendix S1, Supporting information). Because patient 2 had a severe phenotype that suggested *BCAP31* deficiency, the open reading frame and splice sites of *BCAP31* gDNA were additionally sequenced; no pathogenic mutation was identified.

Discussion

The phenotype of patients with contiguous gene deletions involving *BCAP31* was more severe, overall,

than the isolated defects of *SLC6A8* (causing CRTR-D) or *ABCD1* (causing X-ALD); this suggests an important role for *BCAP31* in patients harboring these contiguous gene deletions. *BCAP31* encodes B-cell-receptor-associated protein 31 (BAP31), an integral membrane protein that is localized in the endoplasmic reticulum (ER) membrane (9). It is a protein-sorting factor that controls the fates (egress, retention, survival and degradation) of newly synthesized integral membrane proteins (10). However, BAP31 is also involved in apoptosis, participating in ER–mitochondrial apoptosis signaling. The mitochondrial fission protein Fission 1 (Fis1) interacts with BAP31 at the ER, forming a platform for recruitment and activation of procaspase-8 during Fas-mediated apoptosis (11). BAP31 is cleaved by caspase-8, generating p20 that remains integrated in the membrane (9, 12). p20 induces apoptosis (9) by causing a rapid transfer of ER calcium into the mitochondria, which leads to mitochondrial recruitment of dynamin-like protein 1 (Dlp1) and mitochondrial fission (12). By contrast, full-length BAP31 inhibits Fas-mediated apoptosis (13). BAP31 also associates with the components of the cytoskeleton actomyosin complex, suggesting that BAP31 may play a role in the structural organization of the cytoplasm (14).

Recently, loss-of-function mutations in *BCAP31* were found in seven individuals from three families presenting with severe motor and intellectual disability, dystonia, sensorineural deafness, hypomyelination, failure to thrive and early death. Fibroblasts of affected individuals showed altered ER morphology and disorganized Golgi; however, contrary to expectation, there was not an excessive accumulation of unfolded proteins or exacerbated cell death (7). The profound developmental delay, sensorineural hearing loss, failure to thrive and childhood death in the patients with contiguous gene deletions involving *BCAP31* are very similar to the isolated *BCAP31* defects and confirm the association of loss of *BCAP31* with this phenotype.

Neonatal hepatic cholestasis leading to liver failure and death in the first year was restricted to the patients with deletions involving both *ABCD1* and *BCAP31* and

Table 1. Clinical features. Patient order is based on the location of the deletion (from centromeric to telomeric)

Patient	1	2	9	3	4	5	6	7	8	10	CRTR-D	BCAP31	X-ALD
Deletion size	2.1 kb	4.9 kb	19 kb	40 kb	110 kb	64 kb	34–42 kb	50 kb	31 kb	90 kb	Isolated defect	Isolated defect	Isolated defect
Involved genes	<i>SLC6A8</i>	<i>SLC6A8</i>	<i>SLC6A8</i> , <i>BCAP31</i>	<i>PNCK</i> , <i>SLC6A8</i> , <i>BCAP31</i>	<i>PNCK</i> , <i>SLC6A8</i> , <i>BCAP31</i> , <i>ABCD1</i> , <i>PLXNB3</i> , <i>SRPK3</i>	<i>SLC6A8</i> , <i>BCAP31</i> , <i>ABCD1</i>	<i>BCAP31</i> , <i>ABCD1</i>	<i>BCAP31</i> , <i>ABCD1</i>	<i>BCAP31</i> , <i>ABCD1</i>	<i>BCAP31</i> , <i>ABCD1</i> , <i>PLXNB3</i> , <i>SRPK3</i> , <i>IDH3G</i> , <i>SSR4</i> , <i>PDZD4</i>	<i>SLC6A8</i>	<i>BCAP31</i>	<i>ABCD1</i>
Age	40 years	Died 8 years, septic shock	9 years	Died 8 years, unknown cause	Died <5 months	Died 4 months, LF, RF	Died 8 months	Died 11 months, LF, GI bleeding	Died 4 months, RF, GI bleeding	Died 8 months, pneumonia, sepsis	Normal life expectancy	Death, 7 months –24 years ^a	Average death at 9.4 years
Development	Walking at 2 years, speaks single words	Smiles, eye contact, no milestones attained	Profound delay, no head control	Some eye contact, no milestones attained	?	Profound delay	Delayed, smiles, alert and active at 4 mo, sedated at 7 months	Profound delay	Profound delay	No milestones attained	Mild-severe delay, walking at mean age of 2 years	No milestones attained or only head control ^b	Early develop- ment normal, onset neurological deterioration usually >3 years
Motor symptoms	–	Profound axial hypotonia, hypertonic limbs, quadriplegia	Hypertonic	Profound neonatal hypotonia	Hypertonic	Profound neonatal hypotonia	Hypotonia	Profound neonatal hypotonia	Profound neonatal hypotonia	Hypotonia	Mild hypotonia	Pyramidal signs, quadriplegia	Neurological deterioration >3 years
Extrapyramidal	–	Dystonia from 3 months; severe choreoa- thetosis from 4–5 years	Severe dystonia and athetosis from 4 months	Severe choreoa- thetosis from 3 years	?	–	–	Frequent episodes of opistho- tonus, bruxism	–	–	Mild choreoa- thetosis or dystonia in some patients	Severe dystonia	–
Seizures (onset)	2 years	–	4 years status	4 years	?	2 months	–	–	2 months	–	+/-	+/-	+/-
FTT (height and weight)	–	–3 to –4 SD	–3 to –4 SD	–3 SD	?	++, IUGR	–3 to –4 SD	++	++	–6 SD, IUGR	+/-	–2 to –8 SD, IUGR	–
Head circumference	0 SD	–3 SD	?	–2.5 SD	?	?	–3 SD	?	?	–10 SD	Normal	–2 to –5 SD	Normal
Hepatic	–	–	Mildly elevated liver transami- nases	Transient elevated liver transami- nases	Cholestasis	Cholestasis	Cholestasis	Cholestasis	Cholestasis	Cholestasis	–	Transient elevated liver transami- nases	–
Congenital SNHL	– ^b	– ^c	+	+	+	?	?	+	+	+	–	+	–
Ophthalmological	–	Strabismus	Does not pursue objects	Pigmentary retinopathy at 3 years	?	?	–	Cataract	?	Blind	Strabismus	Strabismus, optic atrophy	–
Dysmorphic	Mild	–	–	+ ^d	?	–	Mild ^d	–	–	+ ^d	Mild atypical	+/-	–

Table 1. continued

Patient	1	2	9	3	4	5	6	7	8	10	CRTR-D	BCAP31	X-ALD
Brain MRI	nd	T2 hyperintensities in periatlial WM, thin CC	T2 hyperintensities in GP, decreased volume WM, myelination delay, very thin CC; cerebellar vermician atrophy	T2 hyperintensities in BG, myelination delay, thin CC	Mild focal dilatation left Sylvian fissure, immature myelination	Myelination delay	No abnormalities	nd	Diffuse increased T1 hyperintensities in WM	Enlarged ventricles, thin CC, thin WM, myelination delay ^g	Myelination delay, T2 hyperintensities, thin CC, enlarged ventricles, cerebellar/cerebellar atrophy	Periventricular hypomyelination, cerebellar/cerebellar atrophy	Predominantly parieto-occipital WM abnormalities
Cerebral creatine (MRS)	nd	Deficient	Deficient	Deficient	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Deficient	nd/normal ^f	nd
Adrenal	nd	nd	nd	nd	?	Small adrenal glands	nd	nd	nd	Adrenal hypoplasia	nd	nd	Addison's disease
Other symptoms				Episodes of high fever, hydronephrosis	Hydronephrosis					Thymus hypoplasia		Unexplained episodic fever	
Creatine uptake in fibroblasts	nd	Deficient	Deficient	Deficient	Deficient	Deficient	nd	nd	nd	nd	Deficient	nd	nd
Urinary Cr/Crn	Increased	Increased	Increased	Increased	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Increased	nd	nd
VLCFAs	nd	Normal	Normal	Normal	Increased	Increased	Increased	Increased	Increased	Increased	nd	nd	Increased
Other biochemical abnormalities		Possible mitochondrial dysfunction ^g , elevated NH ₃ during febrile episodes		Possible mitochondrial dysfunction ^g , elevated NH ₃ during febrile episodes			Mildly elevated NH ₃ , normal lactate and organic acids				Possible mitochondrial dysfunction (rare) ^h		
Reference	Kamp et al. (1)	Anselm et al. (5), patient 1; Howidi et al. (8); Kamp et al. (1)	Osaka et al. (6)	Anselm et al. (5), patient 2		Corzo et al. (3), patient 3		Corzo et al. (3), patient 1	Corzo et al. (3), patient 2	Iwasa et al. (4)	Kamp et al. (1)	Cacciagli et al. (7)	Steinberg et al. (2)

BG, basal ganglia; CC, corpus callosum; Cr/Crn, creatine to creatinine ratio; CRTR-D, creatine transporter deficiency; FTT, failure to thrive; GI, gastro intestinal; GP, globus pallidus; IUGR, intrauterine growth retardation; LF, liver failure; MRI, magnetic resonance spectroscopy; MRS, magnetic resonance spectroscopy; nd, not determined; RF, respiratory failure; SD, standard deviations; SNHL, sensorineural hearing loss; VLCFAs, very long chain fatty acids; WM, white matter; X-ALD, X-linked adrenoleukodystrophy, ?, unknown; -, absent; +, present.

^aOne exceptional patient is alive at 13 years and attained sitting, with autonomous wheelchair and simple sign language.

^bNormal audiogram at 4 years, mild low-frequency hearing loss at 36 years.

^cNormal brain stem evoked potentials at 1 year.

^dNo consistent dysmorphisms were described.

^eBrain autopsy showed in addition to heterotopia and dysplasia of inferior olivary nuclei.

^fNormal creatine levels were measured in one patient.

^gTransient elevated lactate, increased excretion tricarboxylic acid intermediates, ethyl-malonic acid and 3-methylglutaconic acid and/or decreased activity of respiratory chain complexes in muscle biopsy.

^hReported in one patient with a *SLC6A8* mutation.

is not described in isolated *ABCD1* (2) or *BCAP31* deficiencies (7). Only transient increases of liver transaminases, mainly during febrile episodes, were found in patients with *BCAP31*–*SLC6A8* deletions and were also described in patients with isolated *BCAP31* defects (7). Therefore, the hepatic cholestasis appears to result from the combined loss of *BCAP31* and *ABCD1*. Loss of *BCAP31* might aggravate the peroxisomal defect caused by *ABCD1* deficiency. BAP31 interacts with Fis1 (11), which, together with Dlp1, is implicated in both mitochondrial and peroxisomal fission (15). However, peroxisomes of normal size and number were reported in patients with *BCAP31*–*ABCD1* deletions (3, 4). Although the mechanism remains unclear, clearly there is a synergistic deleterious effect on bile acid transport and/or synthesis associated with concomitant BAP31 and ALD protein deficiency.

Severe dystonia and choreoathetosis were only noted in patients with *SLC6A8*–*BCAP31* deletions. However, dystonia is probably related to loss of *BCAP31* because it was also described in isolated *BCAP31* defects. Patients with *BCAP31*–*ABCD1* deletions died before these neurological symptoms usually appear.

Remarkably, patient 2 with an isolated deletion of the 3'-end exons of *SLC6A8* had the same severe phenotype as patients with *BCAP31* deficiency, but without the hearing loss. RT-PCR detected *BCAP31* mRNA in fibroblasts of this patient, which rules out a complete abrogation of *BCAP31* transcription; however, we did not rule out the possibility of an impaired transcription. It is unlikely that the severe phenotype is only due to the complete loss of *SLC6A8* because deletion of *SLC6A8* exons 5–12 was not associated with this severe presentation. If only deletions extending beyond the 3'-end of *SLC6A8* are associated with a more severe phenotype, then it is plausible that this phenotype is due to a perturbation of regulatory elements in the non-coding region between *SLC6A8* and *BCAP31*. Interestingly, one of the patients reported by Cacciagli et al. (7) had a deletion of *BCAP31* exon 8 to *SLC6A8* 3'-UTR. He had normal cerebral creatine levels but reduced fibroblast *SLC6A8* mRNA.

Three patients had contiguous gene deletions that extended beyond *SLC6A8*, *BCAP31* and *ABCD1*. These additional genes may also have contributed to their phenotype. Patient 10 had more profound microcephaly and more genes deleted than the other patients. *PLXNB3*, based on its abundant expression in the brain and role in neurite outgrowth, may contribute to cerebral features (16). In support of this, a patient with a deletion of *ABCD1* exons 3–10 and *PLXNB3* exons 1–2 had convulsions, predominantly occipital white matter abnormalities and possible developmental delay at 3 years (17). *PNCK* (deleted in patients 3 and 4) is also mainly expressed in the brain (18). No isolated defects of this gene have been reported to the best of our knowledge.

In conclusion, we confirm that *BCAP31* deficiency is associated with profound developmental delay, sensorineural hearing loss, failure to thrive, severe dystonia, increases of liver transaminases and childhood

death. However, only deletions involving both *BCAP31* and *ABCD1* are associated with hepatic cholestasis and death in the first year, probably due to synergistic effects. Isolated deletions of *SLC6A8* extending beyond the 3'-end may be associated with a more severe phenotype than the classic CRTR-D, comparable to the phenotype in loss of *BCAP31* but without the hearing loss.

Supporting Information

The following Supporting information is available for this article:

Appendix S1. Data on direct sequencing of the break points and RT-PCR of *BCAP31*.

Additional Supporting information may be found in the online version of this article.

Acknowledgements

The authors are grateful to Vincent Lauffer, Warsha Kanhai, Lorna Pope, Ben Nota and Joe Ndika for their excellent laboratory assistance.

References

- van de Kamp JM, Betsalel OT, Mercimek-Mahmutoglu S et al. Phenotype and genotype in 101 males with X-linked creatine transporter deficiency. *J Med Genet* 2013 Jul; 50 (7): 463–472.
- Steinberg SJ, Moser AB, Raymond GV. X-linked adrenoleukodystrophy. In: RA P, Adams MP, Bird TD, eds. *Online GeneReviews*. 1999, revised April 2012.
- Corzo D, Gibson W, Johnson K et al. Contiguous deletion of the X-linked adrenoleukodystrophy gene (*ABCD1*) and *DXS1357E*: a novel neonatal phenotype similar to peroxisomal biogenesis disorders. *Am J Hum Genet* 2002; 70 (6): 1520–1531.
- Iwasa M, Yamagata T, Mizuguchi M et al. Contiguous *ABCD1* *DXS1357E* deletion syndrome: report of an autopsy case. *Neuropathology* 2013; 33 (3): 292–298.
- Anselm IA, Alkuraya FS, Salomons GS et al. X-linked creatine transporter defect: a report on two unrelated boys with a severe clinical phenotype. *J Inher Metab Dis* 2006 Feb; 29 (1): 214–219.
- Osaka H, Takagi A, Tsuyusaki Y et al. Contiguous deletion of *SLC6A8* and *BAP31* in a patient with severe dystonia and sensorineural deafness. *Mol Genet Metab* 2012; 106 (1): 43–47.
- Cacciagli P, Sutera-Sardo J, Borges-Correia A et al. Mutations in *BCAP31* cause a severe X-linked phenotype with deafness, dystonia, and central hypomyelination and disorganize the Golgi apparatus. *Am J Hum Genet* 2013; 93 (3): 579–586.
- Howidi M, Parsons H. A case of creatine transporter deficiency in a young child with choreoathetosis. *Curr Pediatr Res* 2010; 14 (2): 102–105.
- Ng FW, Nguyen M, Kwan T et al. p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 1997; 139 (2): 327–338.
- Wang B, Heath-Engel H, Zhang D et al. BAP31 interacts with Sec61 translocons and promotes retrotranslocation of CFTR Δ F508 via the derlin-1 complex. *Cell* 2008; 133 (6): 1080–1092.
- Iwasawa R, Mahul-Mellier AL, Datler C, Pazarentzos E, Grimm S. Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *EMBO J* 2011; 30 (3): 556–568.
- Breckenridge DG, Stojanovic M, Marcellus RC, Shore GC. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol* 2003; 160 (7): 1115–1127.
- Wang B, Nguyen M, Breckenridge DG et al. Uncleaved BAP31 in association with A4 protein at the endoplasmic reticulum is an inhibitor of Fas-initiated release of cytochrome c from mitochondria. *J Biol Chem* 2003; 278 (16): 14461–14468.

Gene deletions of *SLC6A8*, *BCAP31* and *ABCD1*

14. Ducret A, Nguyen M, Breckenridge DG, Shore GC. The resident endoplasmic reticulum protein, BAP31, associates with gamma-actin and myosin B heavy chain. *Eur J Biochem* 2003; 270 (2): 342–349.
15. Koch A, Yoon Y, Bonekamp NA, McNiven MA, Schrader M. A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 5077–5086.
16. Hartwig C, Veske A, Krejcova S, Rosenberger G, Finckh U. Plexin B3 promotes neurite outgrowth, interacts homophilically, and interacts with Rin. *BMC Neurosci* 2005; 6: 53.
17. Matsumoto T, Miyake N, Watanabe Y et al. X-linked adrenoleukodystrophy with partial deletion of ALD due to fusion with the neighbor gene, PLXNB3. *Am J Med Genet A* 2005; 138A (3): 300–302.
18. Gardner HP, Rajan JV, Ha SI et al. Cloning, characterization, and chromosomal localization of Pnck, a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *Genomics* 2000; 63 (2): 279–288.

= 症例報告 =

尿中クレアチン/クレアチニン比と家族歴より診断に至った
クレアチントランスポーター欠損症の1家系：本邦3家系目

野崎 章仁¹ 熊田 知浩¹ 柴田 実¹ 藤井 達哉¹ 和田 敬仁² 小坂 仁³

要旨 クレアチントランスポーター欠損症は、筋緊張低下、知的障害とけいれんを特徴とする X 連鎖劣性遺伝性疾患である。本邦3家系目を経験したので報告する。発端者は8歳男児。重度知的障害とけいれんを認めた。2名の兄にてんかんと重度知的障害を認め、長兄は17歳で突然死した。尿中クレアチン/クレアチニン比上昇、頭部MRスペクトロスコピーでクレアチンピーク低下、SLC6A8遺伝子解析でc.1661 C>T;p.Pro554Leuの既報告ミスセンス変異を認め、確定診断した。兄にも同じ変異があり、母はヘテロ接合変異を認めた。知的障害、けいれんや発達障害等を認め、X連鎖劣性遺伝を示唆する男児例では尿中クレアチン/クレアチニン比の測定をすることが重要である。

見出し語 クレアチントランスポーター欠損症、クレアチン代謝異常症、尿中クレアチン/クレアチニン比、頭部MRS

はじめに

クレアチンは、細胞内でクレアチン・キナーゼの働きでホスホクレアチンとなり、エネルギー源として貯蓄される¹⁾。SLC6A8 (solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8; MIM*300036) 遺伝子変異によるクレアチントランスポーター (creatine transporter; CRTR) 欠損症 (cerebral creatine deficiency syndrome 1; MIM #300352) は、神経細胞内にクレアチンが輸送出来ず、エネルギー生成不良を来す X 連鎖劣性遺伝のクレアチン代謝異常症である。2001年に Salomons ら²⁾が初めて報告して以来知的障害の新しい原因疾患として注目をされ、これまでに78家系170例が診断されている¹⁾。本邦では2012年に初めてSLC6A8を含む欠失例が報告された³⁾。さらに2013年に1家系3症例が尿中クレアチン/クレアチニン比上昇を契機にCRTR欠損症が疑われ、遺伝子検査により確定診断されている⁴⁾。我々は、筋緊張低下、重度知的障害とけいれんを認め、家族歴からX連鎖性知的障害を疑い、尿中クレアチン/クレアチニン比上昇よりCRTR欠損症の診断に至った8歳男児例から本邦3家系目を経験したので報告する。

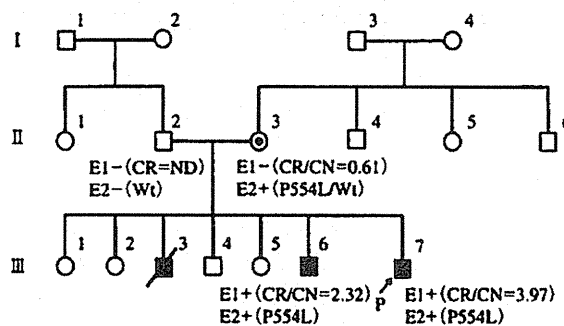


図1 家系図

CR：クレアチン、CN：クレアチニン、ND：検出せず、Wt：野生型。
E1-：尿中クレアチン/クレアチニン比上昇なし、E1+：尿中クレアチン/クレアチニン比上昇あり、E2-：SLC6A8遺伝子変異なし、E2+：SLC6A8遺伝子変異あり。

Ⅲ-2に軽度知的障害、Ⅲ-3にてんかん、重度知的障害および17歳での突然死を認めた。Ⅲ-6(症例2)に難治性てんかん、重度知的障害および自閉症を認めた。Ⅲ-7(症例1)に筋緊張低下、重度知的障害、有熱時のけいれんと無熱性けいれんを認めた。Ⅱ-3は説明内容の理解に乏しさを認めた。

I 症 例

1. 家族歴 (図1)

4名男子、3名女子の7人兄弟姉妹。次女(Ⅲ-2)に軽度知的障害、長兄(Ⅲ-3)にてんかん、重度知的障害および17歳での突然死、三男(Ⅲ-6)にてんかん、重度知的障害および自閉症を認めた。母(Ⅱ-3)は説明内容の理解に乏しさを認めた。

¹滋賀県立小児保健医療センター小児科

²京都大学大学院医学研究科医療倫理学・遺伝医療学分野

³自治医科大学小児科

連絡先 〒524-0022 守山市守山5-7-30

滋賀県立小児保健医療センター小児科(野崎章仁)

E-mail: nozaki-kgw@umin.ac.jp

(受付日: 2014. 1. 9, 受理日: 2014. 6. 26)

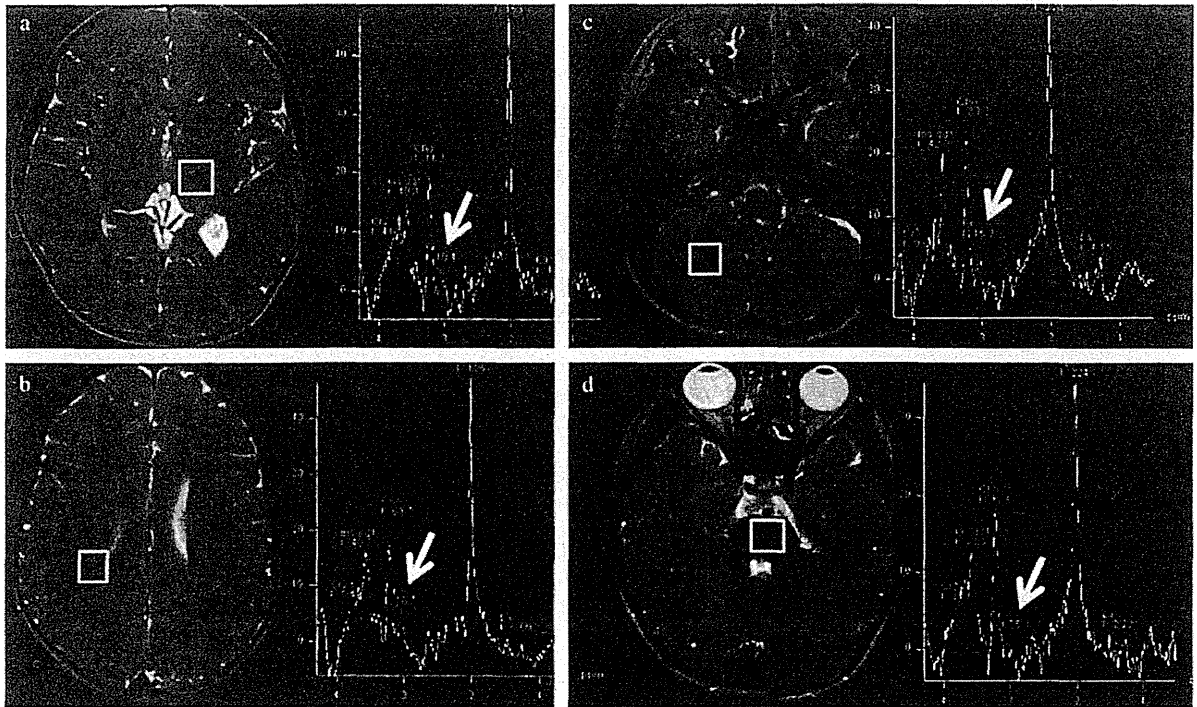


図2 各部位での頭部 MRS 所見

a: 視床, b: 大脳白質, c: 小脳半球, d: 橋
すべての部位でクレアチンピークの低下を認めた (白矢印)。

2. 症例 1: 8 歳男児 (Ⅲ-7: 発端者)

10 カ月時から筋緊張低下および精神運動発達遅滞にて当科にて発達観察をされていた。歩行は 4 歳で可能となるも、有意語は認めなかった。5 歳時に有熱時にけいれんを 1 回および 7 歳時に無熱性けいれんを 1 回認めた。周産期異常はなし。

身体所見 身長 113 cm (-2.2 SD), 体重 16 kg (-2.0 SD), 頭囲 52 cm (0.0 SD), 胸部異常所見なし。皮膚に異常なく、外表奇形なし。神経学的所見では四肢体幹の筋緊張低下を認めた。脳神経、深部腱反射、腹壁反射、筋力に異常なく、小脳徴候、筋硬直、筋萎縮、線維索性収縮、不随意運動は認めなかった。また、歩行は可能であり、歩容異常はなかった。Romberg 試験、感覚異常の有無の判定は施行できなかった。療育手帳では重度知的障害の判定を受けていた。

検査所見 血清クレアチニン 0.13 mg/dl (正常値: 0.2 ~ 0.6 mg/dl) と低値であった。その他の血算、生化学検査では異常を認めなかった。脳波も異常所見なし。頭部 MRI では異常所見を認めなかった。MR スペクトロスコピー (MRS) (図 2) を撮影条件 1.5 T, single voxel spectroscopy, TE=30 msec, TR=1,500 msec, voxel volume 15 mm³にて行った。視床に設定した関心領域 (region of interest: ROI) ではクレアチンピークの低下を認め、クレアチン/コリン比は 0.14 で対象の 11.6% であった (2 ~ 15 歳の対象 5 例の視床部クレアチン/コリン比は 1.20±0.17)。また大脳白質、小脳半球および橋に設定し

た ROI でもクレアチンピークの低下があり、クレアチン/コリン比はそれぞれ 0.29, 0.18 および 0.11 であった。

3. 症例 2: 18 歳男児 (Ⅲ-6)

13 歳時にてんかんを認め当科受診。群発する全般性強直間代発作を週に数回認め、valproate で効果なく、phenytoin, topiramate および levetiracetam の 3 剤併用にて月に数回認める程度に改善した。歩行は 1 歳台で可能となり、筋緊張低下は認めず、他の身体所見の異常も認めなかった。療育手帳では重度知的障害の判定を受けており、自閉症も認めた。

検査所見 血清クレアチニン 0.29 mg/dl であった。その他の血算、生化学検査では異常を認めなかった。脳波も異常所見なし。頭部 MRI は異常所見なく、頭部 MRS にて視床に設定した ROI ではクレアチンピークの低下を認め、クレアチン/コリン比は 0.13 で対象の 11.8% であった。

4. 尿中クレアチン/クレアチニン比測定

HPLC 法を用いて部分尿でのクレアチンおよびクレアチニンを測定した⁵⁾。症例 1 の尿中クレアチン 472 mg/dl, 尿中クレアチニン 119 mg/dl で尿中クレアチン/クレアチニン比 3.97 mg/dl/mg/dl [6 ~ 10 歳の正常値: 0.57±0.49 (n=25)]⁴⁾ であった。症例 2 の尿中クレアチン 438 mg/dl, 尿中クレアチニン 189 mg/dl で尿中クレアチン/クレアチニン比 2.32 mg/dl/mg/dl [11 歳以上の正常値: 0.51±0.60 (n=18)]⁴⁾ であった。母親の尿中クレアチン 124 mg/dl, 尿中クレアチニン 204

mg/dl で尿中クレアチン/クレアチニン比 0.61 mg/dl/mg/dl で正常であった。

5. 遺伝子解析

SLC6A8 の遺伝子解析を行い、exon 12 に c.1661 C>T; p.Pro554Leu のミスセンス変異を症例 1 および 2 に認めた。母ではこの変異をヘテロ接合性に認めた。この変異は過去に報告されたものと同じであった⁶⁾。

6. 診断

尿中クレアチン/クレアチニン比上昇を認め、頭部 MRS にてクレアチンピークが低下し、*SLC6A8* 遺伝子変異を検出した事より症例 1 および症例 2 は CRTR 欠損症と診断した。母はヘテロ接合変異であり保因者と、また突然死した長兄 (Ⅲ-3) は重度知的障害とてんかんを認め母親が保因者であることより臨床的に CRTR 欠損症疑いと判断した。

II 考 察

クレアチンは食事由来と、主に肝臓、腎臓および脾臓による生合成由来からなり、生合成はグリシンとアルギニンから L-アルギニン:グリシンアミジノトランスフェラーゼ (L-arginine:glycine amidinotransferase; AGAT) の働きでまずグアニジノ酢酸が合成される。次にグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ (guanidinoacetate methyltransferase; GAMT) によってクレアチンが合成される。体内のクレアチンはエネルギーを要する代謝経路に関わり、95%は骨格筋に存在し、その他脳などに存在する。クレアチンを生合成できない組織にとって、クレアチンの輸送機能は極めて重要である。CRTR は Na⁺/K⁻依存性トランスポーターであり、その遺伝子である *SLC6A8* は、大部分の組織で発現している。最も発現量が高いのは骨格筋と腎であり、それよりやや低い発現が大腸、脳、心臓、精巣、前立腺で見られる²⁾。クレアチンは血液脳関門を通過できず、脳への輸送には CRTR が必要である¹⁾。クレアチン代謝異常症にはクレアチンの合成異常として AGAT 欠損症と GAMT 欠損症があり、クレアチンの細胞内輸送異常症として CRTR 欠損症がある¹⁾。CRTR 欠損症はクレアチン代謝異常症の中では最も多く、非症候性の X 連鎖劣性遺伝男性知的障害の 2.1%を占めるとされる⁷⁾。しかし、本邦での報告はまだ少ない⁴⁾。

CRTR 欠損症は細胞内にクレアチンが輸送されない結果当該組織がエネルギー代謝不足に陥ることで症状が生じる。臨床症状は軽度知的障害や言語発達遅滞 (特に表出性言語障害) から重度の筋緊張低下、知的障害、けいれんおよび、発達障害まで幅広く非特異的である¹⁷⁾。自験例の症状も筋緊張低下、重度知的障害とけいれんと非特異的であった。自験例と同じ p.Pro554Leu 変異を認めた過去の報告は、ヨーロッパ X 連鎖性男性知的障害コンソーシアムから DNA 解析にて判明した報告であった⁶⁾。知的障害以外の詳細な症状は不明で自験例との比較はできなかった。一般的に CRTR 欠損症の予後は良好とされており、突然死の報告は認めていない⁷⁾。しかし不

整脈の報告もあり、心臓超音波や心電図などの注意深い経過観察が必要である⁷⁾⁸⁾。評価し得たⅢ-6、Ⅲ-7では心臓超音波と心電図異常は認めなかった。今後も定期的な経過観察を予定している。CRTR 欠損症疑い例であるⅢ-3の具体的な死因は不明で、心疾患に由来していたかはわからなかった。女性保因者では、知的障害、認知障害、行動異常、学習障害などが見られることがある¹⁷⁾。自験例の母 (Ⅱ-3) では知能検査など客観的評価はできていないが、説明内容の理解に乏しさを認めた。家族には、母親が保因者であること、および女性同胞も保因者である可能性があることを説明した。しかし説明内容の理解に乏しさがあるため、今後も引き続き十分な遺伝カウンセリングが繰り返し必要と思われた。

クレアチン代謝異常症の診断上のスクリーニング検査として、尿中のグアニジノ酢酸・クレアチン・クレアチニン測定や頭部 MRS でのクレアチンピークの測定が挙げられる¹⁷⁾。AGAT 欠損症では、尿中グアニジノ酢酸低値あるいは正常域低値・尿中クレアチン低値・尿中クレアチン/クレアチニン比正常。GAMT 欠損症では尿中グアニジノ酢酸高値・尿中クレアチン低値・尿中クレアチン/クレアチニン比正常。CRTR 欠損症男子では尿中グアニジノ酢酸正常あるいは軽度上昇・尿中クレアチン高値あるいは正常域高値・尿中クレアチン/クレアチニン比高値を示す⁷⁾。尿中クレアチン/クレアチニン比の上昇は CRTR 欠損症に特異的であるが、血中クレアチニンは 3 疾患とも正常ないし低値である⁷⁾。頭部 MRS ではどの病型でもクレアチンピークの低下を認める。自験例の頭部 MRS では視床、大脳白質、小脳半球および橋にクレアチンピーク低下を認めた。灰白質のクレアチンは白質に比べて 20%程度多いとされているが⁹⁾、自験例では灰白質でもクレアチンピーク低下を認めた (図 2)。以上から、MRS はどの部位に ROI を設定しても良いと考えられる。

尿中クレアチン/クレアチニン比は年齢により正常値が異なり、0~5 歳 (1.03±0.93 mg/dl/mg/dl)、6~10 歳 (0.57±0.49 mg/dl/mg/dl) および 11 歳以上 (0.51±0.60 mg/dl/mg/dl) である⁴⁾。CRTR 欠損症と確定診断された 8 人の報告例では、尿中クレアチン/クレアチニン比は 2.13~6.70 mg/dl/mg/dl であり³⁾⁴⁾¹⁰⁾¹¹⁾、我々の症例もその範囲内であった。尿クレアチン/クレアチニン比は、高蛋白質の食事による擬陽性があり、可能なら 2 回以上の検査が望ましいという報告がある¹⁰⁾。一方、偽陰性の報告はなく、日内変動がないことからランダムな 1 回の尿検査でも十分であるとする報告もある¹⁾。尿検査は非侵襲的検査であるため、偽陽性が疑われる数値なら再検査が有用である。女性保因者においては、症状を呈していても尿クレアチン/クレアチニン比が正常範囲であり、注意が必要である⁷⁾。したがって、女性保因者の診断には遺伝子検査が必要となる⁷⁾。

本邦での報告が少ない原因として、どの所見から疑い、どのように検査を行っていくかが臨床医に十分認識されていない可能性がある。自験例では、筋緊張低下、重度知的障害お

よびけいれんと非特異的な臨床症状であったが、部分尿での尿中クレアチン/クレアチニン比の上昇とX連鎖劣性遺伝を示す家族歴がCRTR欠損症の診断への糸口になった。症例1では血清クレアチニン低値であったが、クレアチン代謝異常症の血清クレアチニン値は低値～正常とされているため⁷⁾、血清クレアチニン値が低値でなくても臨床症状と家系図からCRTR欠損症を疑うことが重要である。X連鎖劣性遺伝を示す男児例に筋緊張低下、知的障害、表出性言語障害、けいれん、発達障害などを認める際に、スクリーニング検査として尿中クレアチン/クレアチニン比を測定することは有用であると考えられた。孤発例もあることから家系図からX連鎖が明確でなくとも知的障害などを認める男児のスクリーニング検査に尿中クレアチン/クレアチニン比を入れることは有用であろう。

尿検査および遺伝子解析をご担当いただいた神奈川県立こども医療センター臨床研究所 新保裕子研究員に深謝いたします。

本論文の要旨は、第55回日本先天代謝異常学会(2013年11月、千葉)で報告した。

著者の利益相反: 本論文発表内容に関連して開示すべき事項なし。

文 献

- 1) Stöckler-Ipsiroglu S, Mercimek-Mahmutoglu S, Salomons GS. Creatine deficiency syndromes. In: Saudubray JM, Van den Berghe G, Walter JH, eds. *Inborn metabolic diseases. Diagnosis and treatment*. 5th ed. Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2012:239-47.
- 2) Salomons GS, van Dooren SJ, Verhoeven NM, et al. X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: a new creatine-deficiency syndrome. *Am J Hum Genet* 2001;68:1497-500.
- 3) Osaka H, Takagi A, Tsuyusaki Y, et al. Contiguous deletion of SLC6A8 and BAP31 in a patient with severe dystonia and sensorineural deafness. *Mol Genet Metab* 2012;106:43-7.
- 4) Kato H, Miyake F, Shimbo H, et al. Urine screening for patients with developmental disabilities detected a patient with creatine transporter deficiency due to a novel missense mutation in SLC6A8. *Brain Dev* 2014;36:630-3.
- 5) Wada T, Shimbo H, Osaka H. A simple screening method using ion chromatography for the diagnosis of cerebral creatine deficiency syndromes. *Amino Acids* 2012;43:993-7.
- 6) Rosenberg EH, Almeida LS, Kleefstra T, et al. High prevalence of SLC6A8 deficiency in X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 2004;75:97-105.
- 7) Mercimek-Mahmutoglu S, Stöckler-Ipsiroglu S, Salomons GS. Creatine deficiency syndromes. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al eds. *GeneReviews*TM [Internet], 2009 [updated 2011 Aug 18] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3794>
- 8) Anselmi IA, Coulter DL, Darras BT. Cardiac manifestations in a child with a novel mutation in creatine transporter gene SLC6A8. *Neurology* 2008;70:1642-4.
- 9) 木村浩彦. MRI, MRSの原理. 大場 洋, 編. 小児神経の画像診断. 東京: 秀潤社, 2010;88-101.
- 10) Mencarelli MA, Tassini M, Pollazzon M, et al. Creatine transporter defect diagnosed by proton NMR spectroscopy in males with intellectual disability. *Am J Med Genet A* 2011;155A:2446-52.
- 11) Garcia P, Rodrigues F, Valongo C, Salomons GS, Diogo L. Phenotypic variability in a portuguese family with x-linked creatine transport deficiency. *Pediatr Neurol* 2012;46:39-41.

A family with creatine transporter deficiency diagnosed with urinary creatine/creatinine ratio and the family history: the third Japanese familial case

Fumihito Nozaki, Tomohiro Kumada, Minoru Shibata, Tatsuya Fujii, Takahito Wada, Hitoshi Osaka

Department of Pediatrics, Shiga Medical Center for Children Moriyama, Shiga (FN, TK, MS, TF);

Department of Medical Ethics and Medical Genetics, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto (TW);

Department of Pediatrics, Jichi Medical University, Shimotsuke, Tochigi (HO)

Creatine transporter deficiency (CRTR-D) is an X-linked disorder characterized by hypotonia, developmental delay, and seizures. We report the third Japanese family with CRTR-D. The proband was an 8-year-old boy who presented with hypotonia, severe intellectual disability and two episodes of seizures associated with/without fever. Among 7 siblings (4 males, 3 females), the eldest brother had severe intellectual disability, epilepsy, and sudden death at 17 years of age, while 18-year-old third elder brother had severe intellectual disability, autism, and drug-resistant epilepsy. The proband's urinary creatine/creatinine ratio was increased. A reduced creatine peak on brain magnetic resonance spectroscopy and a known pathogenic mutation in the *SLC6A8* gene (c.1661 C>T;p.Pro554Leu) confirmed the diagnosis of CRTR-D. The same mutation was found in the third elder brother. Their mother was a heterozygote. Symptoms of CRTR-D are non-specific. Urinary creatine/creatinine ratio should be measured in patients with hypotonia, developmental delay, seizure and autism whose family history indicates an X-linked inheritance.

No To Hattatsu 2015;47:49-52

脳クレアチン欠乏症候群

cerebral creatine deficiency syndrome

京都大学大学院医学研究科医療倫理学・遺伝医療学分野 和田敬仁

定義・概念

脳クレアチン欠乏症候群 (CCDS) は、グアニジノ酢酸メチル基転移酵素 (GAMT) 欠損症、アルギニン・グリシンアミジノ基転移酵素 (AGAT) 欠損症、クレアチン輸送体 (SLC6A8) 欠損症の3疾患からなる。クレアチン生合成や輸送の障害により脳内クレアチン欠乏をきたし、知的障害、自閉症、てんかんを主症状とする。脳内クレアチンの改善による治療法がある知的障害であり、鑑別診断として重要である。

病因・病態生理

クレアチン/リン酸クレアチン系は、脳や筋における化学的エネルギーの細胞質貯蔵の緩衝系として働く。他に、脳内クレアチンは、タンパク合成、細胞膜安定化、神経調節物質、神経細胞保護作用などが知られている。クレアチンは食事由来と、体内での合成により供給される。アルギニン (Arg) とグリシン (Gly) を基質として AGAT によりグアニジノ酢酸 (GAA) が生成され、GAMT により、クレアチン (Cr) に変換される。血液脳関門を通過し、神経細胞に入るには、クレアチン輸送体を介する。なお、Arg, Gly, GAA, Cr はグアニジン基をもつグアニジノ化合物である。

GAMT 欠損症 (GAMT 遺伝子, 19p13.3): 常染色体劣性疾患。

AGAT 欠損症 (AGAT 遺伝子, 15q21.1): 常染色体劣性疾患

SLC6A8 欠損症 (SLC6A8 遺伝子, Xq28): X 連鎖性疾患であるが、女性も様々な程度で症状 (軽度~中等度の知的障害, 学習障害など) を呈しうる。

発生頻度

GAMT および AGAT 欠損症は、世界的にもまれな疾患である。前者は国内で1例報告されている¹⁾。SLC6A8 欠損症は、遺伝性知的障害の中では脆弱 X 症候群について最も頻度が高い疾患で、知的障害をもつ男性患者の 0.3~3.5% (米国では 42,000 人, 世界では 100 万人) と推定されている。現在までにわが国では 7 家系で診断されているのみであり^{2,3)}、未診断症例が多数存在すると推測される。

症状・診断

知的障害、自閉症、てんかんを主症状とし、特異的所見に乏しい。他に錐体外路症状、身体所見として低

身長や体重増加不良を呈する。

診断には、脳 MRS によるクレアチンピークの低下が有用である。SLC6A8 欠損症では、尿中クレアチン/クレアチニン比の上昇により容易に診断が可能なため、特に知的障害を示す男性患者においては、全例において確認すべきである。女性においては、発症していても正常値を示すことに注意が必要である²⁾。確定診断は遺伝子変異解析による。

治療・予後

GAMT および AGAT 欠損症においては、早期のクレアチン投与が有効である。SLC6A8 欠損症に対しては、有効な治療法がない。動物レベルで、cyclocreatine の有効性が示されており、近い将来臨床治験が行われる可能性がある。

文献

- 1) Akiyama T, et al.: JIMD Rep 12: 65-69, 2014
- 2) Kato H, et al.: Brain Dev 36: 630-633, 2014
- 3) 野崎章仁・他: 脳と発達 47: 49-52, 2015

著者連絡先

〒606-8501 京都府京都市左京区吉田近衛町
京都大学大学院医学研究科医療倫理学・遺伝医療学分野
和田敬仁

IV. 研究班構成員名簿

脳クレアチン欠乏症候群の臨床研究班

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	和田敬仁	京都大学大学院 医療倫理学・遺伝医療学分野	准教授
研究分担者	相田典子 小坂仁 後藤知英 新保裕子	神奈川県立こども医療センター 放射線科 自治医科大学 小児科 東京都立小児総合医療センター 神経内科 神奈川県立こども医療センター 臨床研究室	部長 教授 部長 研究員
研究協力者	加藤秀一 黒澤裕子 高野亨子 露崎 悠 富安もよこ 青木志保 中村幸恵 大槻純男 伊藤慎悟 立川正憲	神奈川県立精神医療センター 立命館大学総合科学技術研究機構 信州大学医学部 神奈川県立こども医療センター 放射線医学総合研究所重粒子医科学センター 自治医科大学小児科 自治医科大学大学院 熊本大学大学院生命科学研究部 熊本大学大学院生命科学研究部 東北大学大学院薬学研究科	医員 研究員 助教 医長 主任研究員 研究補助員 大学院生 教授 助教 准教授
(症例紹介)	秋山倫之 絹笠英世 野崎章仁	岡山大学病院小児神経科 筑波学園病院 滋賀県立小児保健医療センター	講師 科長 医員
(患者登録システム)	倉田真由美 樋野村亜希子 深川明子 平田誠 松山晃文	国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所	

