

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	三橋 里美
論文題目	A congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities caused by defective <i>de novo</i> phosphatidylcholine biosynthesis （ミトコンドリア形態異常を伴う先天性筋ジストロフィーはホスファチジルコリン <i>de novo</i> 合成酵素欠損により起こる）		
（論文内容の要旨）			
背景			
先天性筋ジストロフィーは出生早期から筋力低下を来す遺伝性の疾患群であり、筋線維の壊死・再生を筋病理学的特徴とする。原因となる変異遺伝子が十数種類以上知られているが、未だ原因が不明の症例が存在する。この中に、骨格筋線維内に特徴的な巨大ミトコンドリアを持ち、重篤な精神遅滞を合併する一群の先天性筋ジストロフィー（CMDmt）患者 15 例を見いだしたが、原因となる遺伝子変異は不明であった。一方、自然発症のマウスにおいて、コリンキナーゼベータをコードする <i>Chkb</i> 遺伝子の機能喪失変異により、巨大化したミトコンドリアを伴う筋ジストロフィーが発症することが報告された（Sher <i>et al.</i> 2006）。コリンキナーゼは真核生物の主要なリン脂質であるホスファチジルコリン（PC）の <i>de novo</i> 合成経路（Kennedy 経路）の第一段階を触媒する酵素である。			
目的			
CMDmt 患者 15 例において、コリンキナーゼベータの関与を調べる。			
方法			
ゲノム DNA を用いて、コリンキナーゼベータをコードする <i>CHKB</i> 遺伝子のエクソンおよび隣接領域をダイレクトシーケンスし、遺伝子変異を調べる。患者骨格筋での、コリンキナーゼ活性および PC 含量を測定する。さらに、 <i>Chkb</i> 欠損マウスにおいて、骨格筋単離ミトコンドリアの PC 含量を測定する。			
結果			
15 例の患者全員において、 <i>CHKB</i> 遺伝子に 11 種類のホモ接合体、もしくは複合ヘテロ接合体の遺伝子変異を見いだした。2 家系の解析により、常染色体劣性遺伝形式を示すことが確認された。患者に見いだされた変異は、ナンセンス、ミスセンス、微小欠失、スプライス部位変異であった。ナンセンス変異をもつ患者の骨格筋では、コリンキナーゼ活性が検出されず、PC 含量が低下していた。また、ミスセンス変異および微小欠失をもつリコンビナントタンパク質のコリンキナーゼ活性は、いずれも野生型の 30%以下に低下していた。さらに、スプライス部位変異を持つ患者の骨格筋の cDNA 解析をしたところ、 <i>CHKB</i> の転写産物にスプライシング異常がみられ、コリンキナーゼ活性に重要な部位が失われていた。			
さらに、 <i>Chkb</i> 欠損マウスの骨格筋および骨格筋より単離したミトコンドリアを用いて、PC の脂肪酸分子種をマスマスペクトロメトリー解析したところ、n-2 部位にドコサヘキサエン酸を含む PC が著しく低下していた。			
なお、これらの患者の臨床および骨格筋病理には、以下の特徴がみられた。			
1) 筋線維辺縁のミトコンドリアが巨大化し、中心部のミトコンドリアが消失する			
2) 必ず重度の精神遅滞を合併するが、脳 MRI には異常がみられない			
3) 拡張型心筋症を発症する症例が約半数に見られ、時には死に至る			

考察 コリンキナーゼは、アルファとベータの二種類のアイソザイムが存在するが、骨格筋ではアルファの発現は見られず、ベータが主体である。CMDmt 患者では、 <i>CHKB</i> の機能喪失変異によって、骨格筋でのコリンキナーゼの活性が欠損するため、PC 合成に異常を来とし、PC 含量が低下すると考えられた。 <i>Chkb</i> 欠損マウスではミトコンドリアにおいても PC 含量が低下しており、膜リン脂質組成変化によってミトコンドリア形態異常を引き起こすことが示された。さらに、ドコサヘキサエン酸を含む PC は、骨格筋に多く含まれていることが知られており、この分子種合成に Kennedy 経路が重要であることが示唆された。
結論 <i>CHKB</i> の機能喪失変異によって、CMDmt を引き起こす。骨格筋コリンキナーゼ欠損は骨格筋およびミトコンドリアにおいて、PC 含量の低下および骨格筋に特徴的な分子種の合成に異常を来たす。
（論文審査の結果の要旨）
先天性筋ジストロフィーには未だ遺伝的原因が明らかでない病型が存在する。本研究では、骨格筋に特徴的なミトコンドリア形態異常を示す 15 例の患者を新たに見いだした。マウスにおいては、ホスファチジルコリン合成酵素であるコリンキナーゼベータ遺伝子の変異がミトコンドリア形態異常を伴う筋ジストロフィーをきたす。このため、これら 15 例の患者でのヒトコリンキナーゼ遺伝子変異の有無を解析した。 結果、全例にホモ接合性および複合ヘテロ接合性の変異が認められた。患者の骨格筋病理像は巨大化したミトコンドリアと、部分的なミトコンドリア消失を示した。生化学的解析では、コリンキナーゼ活性の消失およびホスファチジルコリン含量の低下を認めた。以上はコリンキナーゼベータ欠損マウスに見られる変化と同一であった。 ホスファチジルコリン分子種は、臓器によって異なる。コリンキナーゼ欠損が分子種プロファイルに与える影響を調べたところ、欠損マウスの骨格筋と単離ミトコンドリアにおいて、骨格筋に特徴的なドコサヘキサエン酸を含む分子種が著しく低下していた。 この結果からコリンキナーゼ欠損マウス骨格筋に残存するホスファチジルコリンは骨格筋外由来であることが示唆された。以上の研究は、ミトコンドリア形態異常を伴う先天性筋ジストロフィーの原因解明に貢献し、筋ジストロフィーの分子診断および病態機序解明に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成 23 年 11 月 29 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日 以降