

BioJapan2010 アカデミックシーズ発表会・松本直通「デルマタン 4-O-硫酸基転移酵素-1 は新しいタイプのエーラス・ダンロス症候群を引き起こす」パシフィコ横浜、9月30日)

Joint Egyptian-Japanese Scientific Workshop, “A new era of genetic diseases” (organized by Ghada M.H. Abdel Salam and Naomichi Matsumoto) (National Research Center, Cairo, Egypt, Oct 3-4, 2010) Naomichi Matsumoto “Microarray technologies: Hightways to genomic aberrations” (invited lecture)

Joint Egyptian-Japanese Scientific Workshop, “A new era of genetic diseases” (organized by Ghada M.H. Abdel Salam and Naomichi Matsumoto) (National Research Center, Cairo, Egypt, Oct 3-4, 2010) Naomichi Matsumoto “Isolation of the gene responsible for a new type of Ehlers-Danlos syndrome” (invited lecture)

Joint Egyptian-Japanese Scientific Workshop, “A new era of genetic diseases” (organized by Ghada M.H. Abdel Salam and Naomichi Matsumoto) (National Research Center, Cairo, Egypt, Oct 3-4, 2010) Naomichi Matsumoto “Haploinsufficiency of *STXBPI* causes Ohtahara syndrome” (invited

lecture)

The 4<sup>th</sup> Asian Chromosome Colloquium (Beijing, China, Oct 11-14) Naomichi Matsumoto “Identification of two epilepsy-related genes from a 2.25-Mb deletion in one patient.” (invited lecture)

日本人類遺伝学会第55回大会(大宮、10月30日) 松本直通「疾患ゲノム解析：遺伝性疾患のエクソーム解析」(次世代シーケンサーを用いたヒト(疾患)ゲノム解析の現状セッション・シンポジスト・座長)

第22回 NIH 金曜会 (National Institute of Health, Bethesda, MD 11月5日) Naomichi Matsumoto 「Identification of two genes responsible for age-dependent epileptic encephalopathy」(invited lecture)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願：渡邊淳，島田隆・家族性大動脈瘤の遺伝子変異スクリーニング方法(特開2011-50284)

特願 2010-106974・松本直通・Waardenburg 無眼球症候群の検出方法・横浜市立大学・平成22年5月7日

### Ⅲ. 分担研究報告

平成22年度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

エーラスダンロス症候群（主に血管型および新型）の実態把握および診療指針の確立

分担研究課題：血管型エーラスダンロス症候群の実態把握に関する研究

研究分担者 福嶋義光、古庄知己 信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座  
信州大学医学部附属病院遺伝子診療部

研究要旨：エーラスダンロス症候群（Ehlers-Danlos Syndrome; EDS）は、皮膚、関節、血管など結合組織の脆弱性に基づく遺伝性疾患である。これまでに全国調査が行われたことはなく、本邦におけるEDSの実態（患者数、診療状況）は不明であり、病型に合った適切な診療指針も確立されていない。特に、若年性動脈破裂・解離・瘤、腸破裂、妊娠中の子宮破裂などの生命に関わる深刻な症状を呈する血管型EDSでは、そのスクリーニング方法、予防法、治療法、遺伝カウンセリングのあり方が確立していないことが、大きな診療上の問題となっている。本研究の目的は、血管型EDSにおける本邦初の診療に関する実態調査を行うことである。一次調査として、現在日本において本症の確定診断のための生化学分析・遺伝子解析を行っている3施設がこれまで確定診断した全症例を収集、診療実態の概要を調査し、preliminary dataとして論文発表することができた（*遺伝カウンセリング学会雑誌* 31:157-161, 2010）。36家系41人が確認され、診断時年齢は平均28.6歳、初発症状が生じた平均年齢は21.9歳であった。合併症の頻度は動脈系63%、呼吸器系51%、消化器系24%であった。33家系において遺伝子変異が検出された（ミスセンス変異55%、スプライス変異45%）。現在、二次調査として自然歴に関する詳細なデータベースを構築するための準備中である。この結果をもとに診療指針の確立を目指したい。

#### A. 研究目的

エーラスダンロス症候群（Ehlers-Danlos Syndrome; EDS）は、皮膚、関節、血管など結合組織の脆弱性に基づく遺伝性疾患である。6病型に分類されており、推定頻度は約1/5000人とされている。特定疾患調査研究指定はなく、全国調査が行われたこともないため、本邦におけるEDSの実態（患者数、診療状況）は不明である。そのため、診療現場での認知度は低く、病型に合った適切な診療指針も確立されていない。特に、若年性動脈破裂・解離・瘤、腸破裂、妊娠中の子宮破裂などの生命に関わる深刻な症状を呈する血管型EDSでは、そのスクリーニング方法、予防法、治療法、遺伝カウンセリングのあり方が確立していないことが、大きな診療上の問題である。本研究の目的は、血管型EDSにおける本邦初の診療に関する実態調査を行うことである。

#### B. 研究方法

現在日本において本症の確定診断のための生化学分析・遺伝子解析を行っている施設は、獨協医科大学皮膚科（簗持淳教授、研究分担者）、日本医科大学遺伝診療科・生化学・分子生物学（渡邊淳准教授、研究分担者）、国立循環器病研究センター研究所分子生物学部（森崎裕子室長、研究分担者）のみである。本年度の研究班において、これら3施設がこれまで確定診断した全症例の抽出を行い、信州大学医学部附属病院遺伝子診療部（古庄知己、研究代表者；福嶋義光、研究分担者）において分析した。

なお、本研究は、信州大学医学部医の倫理委員会の承認、また各解析施設における遺伝子解析倫理委員会の承認を得て行われた。

#### C. 研究結果

生化学分析または遺伝子解析により確定診断されたのは、36家系41人であった。男性23人、女

性 18 人であり、家族例 16 人、孤発例 10 人、不明 15 人であった。診断時年齢は 14-54 歳（平均値 28.6 歳、中央値 27 歳）であった（表 1）。

初発症状は、呼吸器系が 17 人（気胸が 15 人で最多、続いて喀血または血痰 4 人）、動脈系が 12 人、消化器系が 5 人、皮膚が 2 人、筋骨格系が 1 人、卵巣出血が 1 人、不明が 1 人であった。初発症状が生じた年齢は 14-43 歳（データが得られたのは 17 人、その平均年齢は 21.9 歳、中央値は 20 歳）であった。また、家族検索で 2 人が見いだされた（表 1）。

動脈系合併症は 26 人（63%）に認められた。動脈瘤は 17 人に認められ、その部位は冠動脈 3 人、腎動脈 3 人、頸動脈 2 人、肝動脈 2 人、椎骨動脈 1 人、腸骨動脈 1 人、脾動脈 1 人であった。解離は 13 人に認められ、その部位は腸骨動脈 5 人、頸動脈 3 人、椎骨動脈 1 人、胸腹部大動脈 1 人、鎖骨下動脈 1 人、腎動脈 1 人、大腿動脈 1 人であった。破裂は 11 人に認められ、その部位は脾動脈 2 人、腸骨動脈 2 人、下腿動脈 1 人、腹腔動脈 1 人、腕頭動脈 1 人であった。また、頸動脈海綿静脈洞瘻が 5 人に認められた（表 1）。

消化器系合併症は 10 人（24%）に認められた。腸管破裂（穿孔）は 9 人に認められ、その部位は S 状結腸 6 人、小腸 1 人、結腸 1 人、直腸 1 人、食道 1 人だった。2 人が 2 部位の破裂を生じ、1 人は部位の記載がなかった。腸管壊死が 2 人に認められ、1 人は空腸壊死（S 状結腸破裂を併発）、1 人は腸間膜動脈閉塞を伴った腸管壊死であった（表 1）。

筋骨格系合併症は 12 人（29%）に認められた。靭帯損傷が 6 人に、先天性内反足が 5 人に、筋肉破裂・出血が 2 人に、脱臼が 2 人に認められた（表 1）。

中枢神経系合併症は 3 人（7%）に認められた。小脳低形成・梗塞が 1 人に、脳梗塞・脳出血（片麻痺を呈した）が 1 人に、梗塞が 1 人に認められた（表 1）。

COL3A1 遺伝子変異が検出されたのは 33 家系であった。うち 18 家系が 3 本鎖領域のグリシン残基のアミノ置換を来すミスセンス変異を有し、15 家系がスプライス変異を有した。COL3A1 遺伝子変異が検出されなかったのは 3 家系であった。うち

2 家系では III 型プロコラーゲン産生量が 10% に、1 家系では 50% に減少していた（表 1）。

#### D. 考察

診断されていない症例も少なくないと推定され、症例収集上のバイアスがある可能性はあるが、現時点での本邦における血管型 EDS 患者の概要を初めて示すものである。

合併症の頻度は、動脈系 63%、呼吸器系 51%、筋骨格系 29%、腸管 24%、中枢神経系 7% であった。臨床診断された 7 人を含む 31 人を調査した Oderich らの報告では、動脈系 24 人（77%）、腸管破裂 7 人（23%）、気胸 5 人（16%）、関節脱臼 5 人（16%）、水晶体脱臼 3 人（10%）であった（J Vasc Surg 42: 98-106, 2005）。今回の調査では呼吸器系（気胸、血気胸、喀血または血痰、肺出血）の頻度が高かったといえる。また初発症状のなかでも最多であった（45%）。最近、本症における呼吸器系合併症の重要性が指摘されている。Kawabata らは、生化学分析または遺伝子解析により確定診断された血管型 EDS 患者 9 人の肺病変に関する詳細な病理学的検討結果を報告した。これによると、肺病変の根本は特発性の肺組織裂傷であり、これに基づき血腫や線維性結節が形成するとしている（Histopathology 56: 944-950, 2010）。このことは喀血が多かった（17%）とする本調査結果と合致していた。

36 家系中 33 家系において COL3A1 遺伝子変異が検出され、ミスセンス変異 18 家系（55%）、スプライス変異 15 家系（45%）であった。従来の報告に比べてスプライス変異の比率が高い傾向にあった。本調査のなかで、獨協医科大学皮膚科で解析された 20 家系では、ミスセンス変異 45%、スプライス変異 55% であり（Br J Dermatol 163: 704-710, 2010）、残る 2 施設で解析された 13 家系では、ミスセンス変異 69%、スプライス変異 31% であった。日本人患者ではスプライス変異が多い可能性、または、患者収集上のバイアスである可能性が考えられた。変異が認められなかった家系においては、プロモーター領域の変異である可能性、他の遺伝子変異に基づき二次的に III 型コラーゲンの産生が低下している可能性が考えられる。さらに、遺伝子解析が mRNA を用いて行われているものであるため、nonsense-mediated decay を来

す変異（ナンセンス変異、out-of-frame となるスプライス変異や欠失など）を見逃している可能性がある。

## E. 結論

本邦初、世界でも大規模な部類に入る血管型 EDS 確定診断例の診療実態の概要を報告した。この結果は、新たに診断された患者、at risk の家族に対する遺伝カウンセリングにおいて、従来よりも詳細かつ的確な情報提供につなげられる点で有用と考えられる。今後、担当医と協力して本症患者の詳細かつ有用なデータベースを構築し、診療指針の確立を目指したい。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

古庄知己, 渡邊淳, 森崎裕子, 福嶋義光, 旗持淳. 難治性疾患克服研究事業による血管型エーラスダンロス症候群の実態調査. 日本遺伝カウンセリング学会誌 第 31 巻 3 号: 157-161, 2010. 12 月

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

生化学分析または遺伝子解析により確定診断された血管型EDS症例のまとめ

症例	家族	診断時年齢	性別	遺伝	初発症状(年齢、歳)	動脈系合併症				消化器系合併症	呼吸器系合併症	筋骨格系合併症	中枢神経系合併症	遺伝子変異
						瘤(発症した動脈)	結核(発症した動脈)	破裂(発症した動脈)	動脈系病態					
1	1	25	男		[呼] 咳血、気胸									ミズセツス
2	2	27	男		[動] 下腿動脈瘤破裂									ミズセツス
3	3	20	男	孤発	[呼] 咳血、肺出血									ミズセツス
4	4	19	女	家族	[呼] 咳血									ミズライヌ
5	5	31	男		[洞] S状結腸破裂									ミズライヌ
6	6	32	男		[動] 動脈瘤破裂									抽出されず
7	7	42	女		[呼] 咳血									ミズライヌ
8	8	50	女	家族	[動] 運動脈瘤破裂(肺動脈、腸管穿孔)									ミズセツス
9	9	46	男		[洞] 腸結腸破裂、腸管穿孔									抽出されず
10	10	17	男		[呼] 咳血、気胸									ミズセツス
11	11	27	女	孤発	[洞] 結腸穿孔(17歳)									ミズライヌ
12	12	23	女	家族	[皮] 肺出血、皮膚剥離									ミズセツス
13	13	27	女	家族	[呼] 咳血									ミズセツス
14	13	18	男	孤発	[呼] 咳血									ミズライヌ
15	14	23	男		[呼] 咳血、気胸									ミズセツス
16	15	20	男	家族	[洞] S状結腸破裂(19歳)									ミズライヌ
17	16	28	女	家族	家族様症 [呼] 咳血、気胸									ミズライヌ
18	16	25	男		[洞] 外腸骨骨折									ミズライヌ
19	17	25	女		[動] 外腸骨動脈破裂									ミズライヌ
20	18	14	男		[皮] 出血斑									ミズライヌ
21	19	23	女	孤発	[洞] 出血斑									抽出されず
22	20	22	女		[洞] 出血斑									ミズセツス
23	21	39	女		[動] 動脈瘤破裂									ミズセツス
24	22	30	男		[動] 腎梗塞									ミズセツス
25	23	41	女		[動] 肥厚性大動脈瘤									ミズセツス
26	24	19	女	家族	[呼] 咳血(22歳)									ミズセツス
27	27	30	女	家族	[動] 心筋梗塞(24歳)									ミズセツス
28	25	27	男	家族	[呼] 咳血(25歳)									ミズセツス
29	29	33	男	家族	家族様症									ミズセツス
30	26	16	女	孤発	[呼] 咳血(16歳)									ミズセツス
31	27	26	女	孤発	[呼] 咳血(14歳)									ミズセツス
32	28	20	女	孤発	[呼] 咳血(20歳)									ミズセツス
33	29	43	男	家族	[呼] 咳血(43歳)									ミズセツス
34	30	28	女	家族	[動] 頸動脈造影剤造影(27歳)									ミズライヌ
35	31	37	男	孤発	[呼] 咳血(29歳)									ミズライヌ
36	32	25	男	孤発	[動] 痔瘻出血、腹内出血(28歳)									ミズライヌ
37	33	20	男	家族	[呼] 咳血(18歳)									ミズセツス
38	34	38	男	孤発	[呼] 咳血(17歳)									ミズライヌ
39	35	37	男	家族	[動] 運動脈破裂(27歳)									ミズセツス
40	36	17	女	家族	卵巣出血(17歳)									ミズセツス
41	36	35	男	家族	[動] 急性大動脈瘤(2歳)									ミズセツス

[呼]:呼吸器系合併症、[動]:動脈系合併症、[洞]:消化器系合併症、[皮]:皮膚病合併症、[筋]:筋骨格系合併症

エーラスダンロス症候群（主に血管型および新型）の実態把握および診療指針の確立

分担研究課題：血管型エーラスダンロス症候群の遺伝子解析に関する研究

分担研究者 旗持 淳 獨協医科大学皮膚科

研究要旨：コラーゲン生化学分析および遺伝子解析に基づき、血管型を中心としたエーラスダンロス症候群の確定診断を行った。これまでに血管型22例を遺伝子診断しえた。欧米に比べてスプライス変異が多い傾向にあった（11/22）。症例数が少ないためバイアスがかかっている可能性があり、より多数例を検討する必要がある。また、重症合併症の頻度が低い傾向にあったが、診断年齢が低いためである可能性がある。今後合併症の出現が増加することが懸念され、患者・主治医への指導が重要と考えられた。

#### A. 研究目的

獨協医科大学皮膚科は、コラーゲン生化学分析および遺伝子解析により本邦において最も多数のエーラスダンロス症候群（EDS）患者の診断に携わっている。本研究の目的は、血管型を中心に、当科において診断を行った症例の臨床像と遺伝子型を検討することである。

#### B. 研究方法

本学倫理委員会の承認（No. 1818）のもと、患者皮膚を生検し、一部は組織学的診断法に用い、残りを皮膚線維芽細胞の培養に用いる。線維芽細胞をトリチウム放射性プロリンと共に培養し、産生されたコラーゲンを回収して電気泳動で分離し、フィルムに感光して産生されたI型、III型コラーゲンを解析し、血管型、多発関節弛緩型、皮膚脆弱型の診断を行う。尿中の lysylpyridinoline/hydroxylysylpyridinoline 比にて後側彎型を診断する。また血管型はCOL3A1の遺伝子検索も施行し解析する。

#### C. 研究結果

これまでに多発関節弛緩型2例、血管型22例、古典型5例の確定診断を下した。特に血管型ではIII型コラーゲン遺伝子（COL3A1）の解析でグリシンの置換変異とスプライスサイト変異が2:1で見られるとのこれまでの欧米の結果に反して

前者が半数の11例、後者が11例であった。また、重症合併症の頻度が低い傾向にあった。

#### D. 考察

本邦における血管型EDSの遺伝子変異には素スプライス変異が欧米に比べて多い可能性が示唆されたが、症例数が少ないためバイアスがかかっている可能性がある。重症合併症の頻度が低い傾向に関しては、診断年齢が低いためである可能性があり、今後合併症の出現が増加することが懸念される。

#### E. 結論

22例の血管型EDSを遺伝子診断しえた。欧米に比べてスプライス変異が多い傾向にあった（11/22）。また、重症合併症の頻度が低かった。今後、合併症の出現に注意して生活するよう患者・主治医への指導が重要と考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Okita H, Ikeda Y, Mitsushashi Y, Namikawa H, Kitamura Y, Hamasaki Y, Yamazaki S, Hatamochi A: A novel point mutation at donor splice-site in Intron 42 of type III collagen gene resulting in the inclusion of 30 nucleotides into the mature mRNA in a case of vascular type of Ehlers-Danlos syndrome. *Arch Dermatol Res* 302: 395-399, 2010

Sadakata R, Hatamochi A, Kodama K, Kaga A, Yamaguchi T, Soma T, Usui Y, Nagata M, Ohtake A, Hagiwara K, Kanazawa M: Ehlers-Danlos Syndrome Type IV, Vascular Type, Which Demonstrated a Novel Point Mutation in the COL3A1 Gene. *Intern Med* 49: 1797-800, 2010

Shimaoka Y, Kosho T, Wataya-Kaneda M, Funakoshi M, Suzuki T, Hayashi S, Mitsushashi Y, Isei T, Aoki Y, Yamazaki K, Ono M, Makino K, Tanaka T, Kunii E, Hatamochi A: Clinical and genetic features of 20 Japanese patients with vascular-type Ehlers-Danlos syndrome. *Br J Dermatol* 163:704-710, 2010

Kawabata Y, Watanabe A, Yamaguchi S, Aoshima M, Shiraki A, Hatamochi A, Kawamura T, Uchiyama T, Watanabe A, Fukuda Y: Pleuropulmonary pathology of vascular Ehlers-Danlos syndrome: spontaneous laceration, haematoma and fibrous nodules. *Histopathology* 56:944-950, 2010

Omori H, Hatamochi A, Koike M, Sato Y, Kosho T, Kitakado Y, Oe T, Mukai T, Takubo K: Sigmoid colon perforation induced by the vascular type of Ehlers-Danlos Syndrome: Report of a Case. *Surgery Today* 2010 (in press)

簀持 淳: 【遺伝子がかかわる皮膚疾患入門,責任遺伝子をはっきりした疾患】 Ehlers-Danlos 症候

## 2. 学会発表

Shimaoka Y, Omori H, Koike M, Sato Y, Kosho, Takubo K, Hatamochi A: Sigmoid colon perforation induced by the vascular type of Ehlers-Danlos Syndrome: report of a case. 9<sup>th</sup> Congress of the German-Japanese Society of Dermatology. June 15-17,2010, Weimar, Germany

Koyano S, Hatamochi A, Yoshino M, Hashimoto T, Byers PH: A Japanese patient with Arthrochalasia-type Ehlers-Danlos syndrome. 9<sup>th</sup> Congress of the German-Japanese Society of Dermatology. June 15-17,2010, Weimar, Germany

Hatamochi A: Clinical and genetic features of Japanese patients with the vascular-type of Ehlers-Danlos syndrome. 9<sup>th</sup> Congress of the German-Japanese Society of Dermatology. June 15-17,2010, Weimar, Germany

嶋岡弥生、簀持 淳、菅野美紀、濱崎洋一郎、山崎雙次、船越美由紀、橋本 隆、芳野 信、Peter H.Byers: 多発関節弛緩型 Ehlers-Danlos 症候群 (EDS) の 1 例 第 109 回日本皮膚科学会総会 2010 年 4 月 16 日 大阪

牧野公治、尹 浩信、緒方健一、簀持 淳: 血管型エーラスダンロス症候群の 1 例 第 109 回日本皮膚科学会総会 2010 年 4 月 16 日 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録: なし

エーラスダンロス症候群（主に血管型および新型）の実態把握および診療指針の確立  
分担研究課題：血管型エーラスダンロス症候群の新規遺伝子変異解析法の開発  
ならびに nonsense mediated mRNA decay(NMD)を来す変異における臨床像の解析

研究分担者 渡邊 淳 日本医科大学附属病院遺伝診療科，同生化学・分子生物学

研究要旨：血管型エーラスダンロス症候群（vEDS）は、3型プロコラーゲン（COL3A1）のヘテロ遺伝子変異により発症し、2/3はトリプルヘリックス領域にみられる3アミノ酸ごとに繰り返すグリシンが置換するミスセンス変異，残りはスプライシング異常を言われていた。これまでの多くのCOL3A1遺伝子解析は培養皮膚線維芽細胞から抽出したmRNAを用いて行われた。線維芽細胞からの解析は皮膚生検，培養技術が必要となる。分担者は，末梢血由来によるゲノムDNAを用いるCOL3A1遺伝子変異スクリーニングを高解像度融解曲線分析（high resolution melting curve analysis; hrMCA）法を基盤とした手法で開発した。本手法では，RNA手法で同定できたCOL3A1遺伝子のグリシン変異とスプライシング変異は同定可能であった。さらに，RNAで同定できないnonsense mediated mRNA decay(NMD)を来すナンセンス変異，欠失変異も同定可能とした。本手法は，血管型EDSの遺伝子診断において，末梢血由来DNAを用いるという点で非侵襲的であるのみならず，培養皮膚線維芽細胞由来mRNAでは検出しえないnonsense mediated mRNA decay(NMD)を来す変異をも同定できる有望な解析法と考えられた。本手法で新たに同定されたnonsense mediated mRNA decay(NMD)を来すCOL3A1遺伝子変異を来す3家系の臨床像を解析したところ，患者の重症度は様々であり，重症度はCOL3A1タンパク量と相関する可能性があること，家系内での重症度も様々で変異を有するが60歳を超える未発症者もいることが判明した。COL3A1遺伝子のnonsense mediated mRNA decay(NMD)を来す変異では，vEDS発症において新たな因子の存在が推定された。

#### A. 研究目的

血管型エーラスダンロス症候群（vEDS）は，血管破裂，消化管破裂，子宮破裂を合併し，ときに突然死を呈する常染色体優性遺伝病である。本疾患は，3型プロコラーゲン（COL3A1）のヘテロ遺伝子変異により発症し，2/3はトリプルヘリックス領域にみられる3アミノ酸ごとに繰り返すグリシンが置換するミスセンス変異，残りはスプライシング異常を来すといわれていた。これまでの多くのCOL3A1遺伝子解析は培養皮膚線維芽細胞から抽出したmRNAを用いて行われた。本研究は，末梢血由来のDNAを用いた新しい遺伝子診断法の開発を目的とし，本手法で得られた新規変異について臨床像を解析する。

#### B. 研究方法

vEDS患者末梢血由来ゲノムDNAによる

COL3A1遺伝子変異スクリーニングをPCR法とDNAインターカレート蛍光色素を利用した2本鎖DNAの融解曲線パターンの違いで遺伝子変異の有無をスクリーニングする高解像度融解曲線分析法（high-resolution melt curve analysis; hrMCA）を用いて検討した。COL3A1遺伝子のトリプルヘリックス領域の44エクソンを含む全コード領域52エクソン各々に対し両端のイントロン領域を含むPCRプライマーを設計した。DNAインターカレート蛍光色素(LCGreen)を加えた単一PCR産物のhrMCAはLight Scanner (Idaho technology社)を使用した。本手法を用いて既知のCOL3A1変異を有する血管型EDS患者ならびに臨床的に血管型EDSを疑われた患者のゲノムDNAを解析した。

#### C. 研究結果

高解像度融解曲線分析法によりRNA手法で同定できたCOL3A1遺伝子のグリシン変異とスプラ

イシング変異では同定可能であった。さらに、臨床的に血管型 EDS を疑われた患者 3 人 (3 家系) に対して、従来の mRNA からの遺伝子変異解析手法では変異を同定できない 3 変異 (2 つの nonsense 変異と 1 つの欠失変異) を同定した。これらの変異は nonsense mediated mRNA decay(NMD)によるものと考えられた。nonsense mediated mRNA decay(NMD)では、COL3A1 変異 RNA はすべての COL3A1 領域でないことから、COL3A1 遺伝子で頻度の高いコード内一塩基多型 (cSNP) パターンを検出できる手法 (small amplicon genotyping; SAG) を開発し、ゲノム DNA と RNA での cSNP の塩基パターンの違いから nonsense mediated mRNA decay(NMD)を来す COL3A1 変異を有するかどうか推定することを可能とした。

本法で検出された nonsense mediated mRNA decay(NMD)を来す変異を有する 3 患者において、臨床像は様々であった。

症例 1 (20 代男性) は特徴的な顔貌を有し、10 代に気胸を来し、動脈瘤破裂を 20 歳で発症し、2 回目の破裂 (21 歳) で突然死した。線維芽細胞の COL3A1 タンパク量は著しく減弱していた。COL3A1 遺伝子 Exon 42 においてナンセンス変異 (c.2992C>T; Gln831Ter) をヘテロに有していた。家族歴では兄が 25 歳で突然死を来していた。

症例 2 (40 代男性) は生来健康であったが、40 代に腹部動脈瘤破裂で発症した。線維芽細胞の COL3A1 タンパク量は半量の減少であった。COL3A1 遺伝子 Exon 51 においてナンセンス変異 (c.4141C>T; Gln1214Ter) をヘテロに有していた。家族歴はなかったが、60 代のこれまで無症状の母親に同様変異を有していた。

症例 3 (30 代男性) は生来健康であったが、30 代後半に血気胸で発症した。肺病変が特徴的であり本症を疑い、COL3A1 遺伝子 Exon 32 において 1 塩基欠失 (c.2187delA) をヘテロに有していた。本変異により 181 塩基下流 (exon35) に早期に終止コドンを生じていた。家族歴はなかったが、60 代のこれまで無症状の母親に同様変異を有していた。

#### D. 考察

高解像度融解曲線分析 (hrMCA) 法を基盤とした COL3A1 遺伝子変異スクリーニング法は、血管

型 EDS の遺伝子診断において、末梢血由来 DNA を用いるという点で非侵襲的であるのみならず、培養皮膚線維芽細胞由来 mRNA では検出しえない nonsense mediated mRNA decay(NMD)を来す変異をも同定できる有望な解析法と考えられた。他のコラーゲンに変異を来す遺伝性疾患ではおよそ 5-10% にナンセンス変異が報告されている。COL3A1 遺伝子において、nonsense mediated mRNA decay(NMD)を来すナンセンス変異の報告は我々の報告が初めてであり、Total RNA からの COL3A1 遺伝子解析により変異を同定できず、臨床的に vEDS を疑う場合には、ゲノム DNA からの解析の検討が必要と考えられる。今回開発した頻度の高い SNP を検出する SAG 法と hrMCA の組み合わせにより、効率よく COL3A1 遺伝子変異スクリーニングを可能とした。

nonsense mediated mRNA decay(NMD)を来す遺伝子変異では、変異由来タンパク質は発現しないことから、ハプロ不全により発症すると推測され症状が軽減し劣性遺伝形式をとる傾向がある。nonsense mediated mRNA decay(NMD)を来す COL3A1 変異を来す 3 家系の臨床像を解析したところ、患者の重症度は様々であり、発症者はすべて男性であり、重症度は COL3A1 タンパク量と相関する可能性があること、家系内での重症度も様々で変異を有するが 60 歳を超える未発症者 (すべて女性) もいることが判明した。COL3A1 遺伝子の nonsense mediated mRNA decay(NMD)を来す変異では、vEDS 発症において新たな因子の存在が推定された。nonsense mediated mRNA decay(NMD)を来す COL3A1 遺伝子変異では、多くの血管型 EDS 患者でこれまで想定されている優性阻害効果とは異なるため、臨床経過ならびに治療方針も異なると予測され、今後の臨床経過も含め症例を集積しさらなる検討を行う必要がある。

#### E. 結論

末梢血由来によるゲノム DNA を用いる COL3A1 遺伝子変異スクリーニングを、高解像度融解曲線分析 (hrMCA) 法を基盤とした手法で開発した。本手法では、RNA 手法で同定できた COL3A1 遺伝子のグリシン変異とスプライシング変異だけではなく、RNA で同定できない nonsense mediated mRNA decay(NMD)を来すナンセンス変

異，欠失変異も同定可能とした． nonsense medicated mRNA decay(NMD)を来す *COL3A1* 遺伝子変異では，従来のグリシン変異，スプライシング変異とは異なる臨床像を呈する可能性があり，今後の症例集積が重要である．

## F. 健康危険情報

特になし．

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kawabata Y, Watanabe A, Yamaguchi S, Aoshima M, Shiraki A, Hatamochi A, Kawamura T, Uchiyama T, Watanabe A, Fukuda Y. Pleuropulmonary pathology of vascular Ehlers-Danlos syndrome: Laceration, haematoma, and fibrous nodules. *Histopathology* 56 944-950, 2010

Kimura K, Sakai-Kimura M, Takahashi R, Watanabe A, Mukai M, Noma S, Fukuda K: Too friable to treat? *Lancet* 375:1578, 2010

古庄知己, 渡邊 淳, 森崎裕子, 福嶋義光, 簀持 淳 : 難治性疾患克服事業による血管型エーラスダンロス症候群の実態調査. *日本遺伝カウンセリング学会誌* 31:157-161, 2010

Banyar Than Naing, Watanabe A, Shimada T: A novel mutation screening system for Ehlers-Danlos Syndrome, vascular type by high-resolution melting curve analysis in combination with small amplicon genotyping using genomic DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 405:368-372, 2011

### 2. 学会発表

渡邊 淳, 古庄知己, 鈴木由美, 日本エーラスダンロス症候群協会 (友の会) . 日本におけるエーラス・ダンロス症候群の現状と課題患者会と協働で行ったアンケート調査を踏まえて. 第34回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 (平成22年5月, 於東京)

バニャー タン ナイン, 渡邊 淳, 島田 隆. 高解像度融解曲線分析法を用いた血管型 Ehlers-Danlos 症候群(vEDS, EDS type IV)の新規遺伝子変異スクリーニングシステムの開発. 第42回日本結合組織学会学術大会 (平成22年8月, 於秋田)

吉橋博史, 濱崎祐子, Banyar Than Naing, 島田 隆, 渡邊 淳. 腎移植を契機に診断された血管型エーラスダンロス症候群の1例. 日本人類遺伝学会 第55回大会 (平成22年10月, 於さいたま)

Banyar Than Naing, 渡邊 淳, 森崎裕子, 菅野美紀, 船越美由紀, 簀持 淳, 島田 隆. *COL3A1* 遺伝子にナンセンス変異を同定した血管型 Ehlers-Danlos 症候群2症例. 日本人類遺伝学会 第55回大会 (平成22年10月, 於さいたま)

Banyar Than Naing, WATANABE A, HATAMOUCHI A, MORISAKI M, SHIMADA T. Nonsense mutations of *COL3A1* gene causing nonsense-mediated mRNA decay in two Japanese patients with Vascular type of Ehlers-Danlos Syndrome. 60<sup>th</sup> Annual meeting of American Society of Human Genetics ASHG(Nov, 2010,ワシントン DC)

WATANABE A, Banyar Than Naing, SHIMADA T. a novel mutation screening system FOR vascular type Ehlers-Danlos syndrome (vEDS, EDS type IV) using high resolution melting curve analysis (hrMCA). 9<sup>th</sup> Asia Pacific Conference on Human

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願：渡邊淳，島田隆・家族性大動脈瘤の遺伝子  
変異スクリーニング方法（特開2011-50  
284）

実用新案登録：なし

平成22年度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

エーラスダンロス症候群（主に血管型および新型）の実態把握および診療指針の確立  
分担研究課題： 新型エーラスダンロス症候群の責任遺伝子単離に関する研究

分担研究者 三宅紀子 横浜市立大学医学研究科遺伝学

分担研究者 松本直通 横浜市立大学医学研究科遺伝学

研究要旨：既知のいずれの病型に属さない新しいタイプのエーラスダンロス症候群（EDS）2症例を端緒に同様の症例をこれまでに計6家系集積しホモ接合性マッピング、ハプロタイプ解析で候補領域を6.3Mbまで狭め、この領域に存在する遺伝子 *CHST14* が本疾患の責任遺伝子であることを突き止めた。さらに機能的解析により遺伝子異常が惹起する機能喪失型の変異により *CHST14* がコードするD4ST1が活性を失い症例の繊維芽細胞のグリコサミノグリカン組成が変化する。特に皮膚のコラーゲン細繊維の集合に重要な役割を果たしているデコリンプロテオグリカンのデルマトン硫酸がコンドロイチン硫酸に取って代わることによって適切なコラーゲン繊維形成異常が惹起されることが病態発症メカニズムである可能性が高い。

#### A. 研究目的

エーラスダンロス症候群（EDS）は関節と皮膚の弛緩ならびに組織脆弱性を特徴とする多様な結合織疾患である。少なくとも6つのタイプに分類され、さらに亜型が複数存在する。研究代表の古庄は、いずれのタイプにも属さない新たなタイプのEDSを2家系に見出し(Kosho et al. *AJMG* 2005)、さらに4家系を加えて計6家系の集積を行い、新型EDSとして疾患概念を提唱した(Kosho et al. *AJMG* 2010)。本研究はこれら6家系を遺伝学的に解析し責任遺伝子を同定すること遺伝子異常が来す病態発症メカニズムを明らかにすることを目的とした。

#### B. 研究方法

##### ①血族婚家系を用いたホモ接合性マッピングによる遺伝子座の探索

集積した6家系のうち2家系で両親の血族婚を認めた。常染色体劣性遺伝性疾患を想定し血族婚家系2家系に於いてAffymetrix社のSNP 10Kアレーを用いたホモ接合性マッピングを行って責任遺伝子座を決定する。ホモ接合性領域がマップ出来たら情報性の高いマイクロサテライトマーカー解析を追加し責任領域を狭める。

##### ②責任遺伝子座の候補遺伝子スクリーニング

特定された責任遺伝子座内にマップされる候補遺伝子群の機能情報を基にして優先度を付け変異スクリーニングを行う。タンパク翻訳領域とエクソンイントロン境界領域をカバーするようPCRプライマーを設計しPCR-ダイレクトシーケンスで変異を同定する。

##### ③責任遺伝子の機能解析

変異が同定された責任遺伝子の機能に応じた機能解析を展開し変異のもたらす影響を調査し病態メカニズムの解明を目指す。

#### C. 研究結果

##### ①血族婚家系を用いたホモ接合性マッピングによる遺伝子座の探索

血族婚家系2家系を用いたホモ接合性マッピングにより常染色体領域に8.1Mbの責任領域を1カ所同定した(Lod score 2.885)。責任領域内と近傍の7つのマイクロサテライトマーカー解析を行い責任領域を6.3Mbにまで狭小化した。

##### ②責任遺伝子座の候補遺伝子スクリーニング

6.3Mbの候補領域内の109遺伝子の中から機能的に関連性の疑われる7つの遺伝子を選択し変異解析を行った。この結果遺伝子 *CHST14* においてホモ接合性変異あるいは複合ヘテロ接合性変異を6

家系の症例全例で認め、*CHST14* が本疾患の責任遺伝子で常染色体劣性遺伝性疾患であるとの結論に至った。

### ③*CHST14* の機能解析

*CHST14* はデルマタン 4-O 硫酸転移酵素 (D4ST1) をコードする。同定されたナンセンス変異 1 種 (p.K69X) とミスセンス変異 3 種 (p.P281L, p.Y293C, p.C289S) における D4ST1 酵素活性を検討し、いずれの変異も酵素活性が欠如し機能喪失性変異であることが強く示唆された。D4ST1 の機能喪失変異が及ぼす身体への影響を検討するため症例から採取した繊維芽細胞のグリコサミノグリカン組成の変化と、皮膚におけるコラーゲン繊維の集合に関与するデコリンプロテオグリカンのデルマタン硫酸の喪失とコンドロイチン硫酸への変化を確認した。コリンプロテオグリカンのグリコサミノグリカンの組成変化によってコラーゲン繊維を束ねる機能が損なわれコラーゲン繊維の生成異常や機械的ストレスにおける易障害性が病態の基礎にある可能性があることが解った。

#### D. 考察

症例の繊維芽細胞の検討によりデコリンプロテオグリカンのグリコサミノグリカンの組成変化によってコラーゲン繊維を束ねる機能が損なわれコラーゲン繊維の生成異常や機械的ストレスにおける易障害性が病態の基礎にある可能性が高いと考えられた。

#### E. 結論

新型 EDS の責任遺伝子 *CHST14* の単離に成功した。本遺伝子のコードする酵素の機能障害によりコラーゲン繊維の病的異常を来し新型 EDS が発症すると考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Shiihara T, Maruyama K-i, Yamada Y, Nishimura A, Matsumoto N, Kato M, Sakazume S. A case of Baraitser-Winter syndrome with unusual brain

MRI findings of pachygyria, subcortical band heterotopia and periventricular heterotopias. *Brain Dev* 32(6): 502-505, 2010.

Saitsu H, Tohyama J, Kumada T, Egawa K, Hamada K, Okada I, Mizuguchi T, Osaka H, Miyata R, Furukawa T, Haginoya K, Hoshino H, Goto T, Hachiya Y, Yamagata T, Saitoh S, Nagai T, Nishiyama K, Nishimura A, Miyake N, Komada M, Hayashi K, Hirai S, Ogata K, Kato M, Fukuda A, Matsumoto N. Dominant negative mutations in  $\alpha$ -II spectrin cause early onset West syndrome with severe cerebral hypomyelination, spastic quadriplegia, and developmental delay. *Am J Hum Genet* 86(6):881-889, 2010.

Saitsu H, Kato M, Okada I, Orii KE, Kondo N, Wada T, Hoshino H, Kubota M, Arai H, Tagawa T, Kimura S, Sudo A, Miyama S, Takami Y, Watanabe T, Nishimura A, Nishiyama K, Miyake N, Osaka H, Hayasaka K, Matsumoto N. *STXBPI* mutations in severe infantile epilepsies with suppression-burst pattern. *Epilepsia* 51(12): 2397-2405, 2010

Sakai H<sup>#</sup>, \*Yoshida K<sup>#</sup> (<sup>#</sup>denotes equal contribution), Shimizu Y, Morita H, Ikeda S-i, Matsumoto N. Analysis of an insertion mutation in a cohort of 93 patients with spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31) from Nagano, Japan. *Neurogenet* 11(4): 409-415, 2010

Osaka H, Yamamoto R, Hamanoue H, Nezu A, Sasaki M, Saitsu H, Kurosawa K, Shimbo H, Matsumoto N, Inoue K. Disrupted SOX10 regulation of GJC2 transcription causes Pelizaeus-Merzbacher-Like Disease. *Ann Neurol* 68(2): 250-254, 2010

Nishimura A, Hiraki Y, Shimoda H, Tadaki H, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. *De novo* deletion of 1q24.3-q31.2 in a patient with severe growth retardation. *Am J Med Genet* 152A:1322-1325, 2010

Komoike Y, Fujii K, Nishimura A, Hiraki Y, Michiko, Hayashidani M, Shimojima K, Nishizawa T, Higashi K, Yasukawa K, Saitsu H, Miyake N, Mizuguchi M, Matsumoto N, Osawa M, Kohno Y, Higashinakagawa T, Yamamoto T. Zebrafish gene knockdowns imply roles for human *YWHAG* in

- infantile spasms and cardiomegaly. *Genesis* 48(4): 233-243, 2010.
- Doi H, Koyano S, Miyatake S, Matsumoto N, Kameda T, Tomita A, Miyaji Y, Suzuki Y, Sawaishi Y, Kuroiwa Y. Siblings with the adult-onset slowly progressive type of pantothenate kinase-associated neurodegeneration and a novel mutation, Ile346Ser, in PANK2: Clinical features and (99m)Tc-ECD brain perfusion SPECT findings. *J Neurol Sci* 290 (1-2): 172-176, 2010.
- Miyake N, Kosho T, Mizumoto S, Furuichi T, Hatamochi A, Nagashima Y, Arai E, Takahashi K, Kawamura R, Wakui K, Takahashi J, Kato H, Yasui H, Ishida T, Ohashi H, Nishimura G, Shiina M, Saitsu H, Tsurusaki T, Doi H, Fukushima Y, Ikegawa S, Yamada S, Sugahara K, Matsumoto N. Loss of decorin dermatan sulfate impairing collagen bundle formation in a new type of Ehlers-Danlos syndrome. *Hum Mut* 31(8): 966-974, 2010
- Kosho T, Miyake N, Hatamochi A, Takahashi J, Kato H, Miyahara T, Yasui H, Ishida T, Ono K, Kosuda T, Inoue A, Kohyamab M, Hattori T, Ohashi H, Nishimura G, Kawamura R, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N. A New Ehlers-Danlos Syndrome With Craniofacial Characteristics, Multiple Congenital Contractures, Progressive Joint and Skin Laxity, and Multisystem Fragility-related Manifestations. *Am J Med Genet* 152A (6): 1333-1346, 2010.
- Kimura S, Saitsu H, Blanka A, Schaumann BA, Shiota K, Matsumoto N, and Ishibashi M. Rudimentary Claws and Pigmented Nail-like Structures on the Distal Tips of the Digits of *Wnt7a* Mutant Mice: *Wnt7a* Suppresses Nail-like Structure Development in Mice. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88(6):487-496, 2010
- Kanazawa K, Kumada S, Mitsuhiro K, Saitsu H, Kurihara E, Matsumoto N. Choreo-ballistic movements in a case carrying a missense mutation in syntaxin binding protein 1 gene. *Mov Disord* 25(13):2265-2267, 2010
- Ng S, Bigham A, Buckingham K, Hannibal M, McMillin M, Gildersleeve H, Beck A, Tabor H, Cooper G, Mefford H, Lee C, Turner E, Smith J, Rieder M, Yoshiura K, Matsumoto N, Ohta T, Niikawa N, Nickerson D, Bamshad M, Shendure J. Exome sequencing identifies *MLL2* mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet* 42(9): 790-793, 2010.
- Yamada-Okabe T, Imamura K, Kawaguchi N, Sakai H, Yamashita M, Matsumoto N. Functional characterization of the zebrafish *WHSC1*-related gene, a homologue of human *NSD2*. *Biochem Biophys Res Commun* 402(2): 335-339, 2010.
- Okada I<sup>#</sup>, Hamanoue H<sup>#</sup>, (<sup>#</sup> denotes equal contribution) Terada K, Tohma T, Megarbane A, Chouery E, Abou-Ghoch J, Jalkh N, Cogulu O, Ozkinay F, Horie K, Takeda J, Furuichi T, Ikegawa S, Kiyomi Nishiyama K, Miyatake S, Nishimura A, Mizuguchi T, Niikawa N, Hirahara F, Kaname T, Yoshiura K-i, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Furukawa T, \*Matsumoto N, \*Saitsu H. *SMOC1* is essential for ocular and limb development in humans and mice. *Am J Hum Genet* 88(1): 30-41, 2011
- Tohyama J, Kato M, N, Kawasaki S, Kawara H, Matsui T, Akasaka N, Ohashi T, Kobayashi Y, Matsumoto N. Dandy-Walker malformation associated with heterozygous *ZIC1* and *ZIC4* deletion: Report of a new patient. *Am J Med Genet* 155(1): 130-131, 2011
- Furuichi T, Dai J, Cho T-J, Sakazume S, Ikema M, Matsui Y, Baynam G, Nagai T, Miyake N, Matsumoto N, Ohashi H, Unger S, Superti-Furga A, Kim O-H, Nishimura G, \*Ikegawa S. *CANT1* is also responsible for Desbuquois dysplasia, type 2 and Kim variant. *J Med Genet* 48(1): 32-37, 2011
- Saitsu H, Hoshino H, Kato M, Nishiyama N, Okada I, Yoneda Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Kubota M, Hayasaka K, Matsumoto N. Paternal mosaicism of a *STXBPI* mutation in Ohtahara syndrome. *Clin Genet* (in press)
- Yano S, Bagheri A, Watanabe Y, Moseley K, Nishimura A, Matsumoto N, Baskin B, Ray PN. Familial Simpson-Golabi-Behmel syndrome: Studies of X-chromosome inactivation and clinical phenotypes in two female individuals with

GPC3 mutations. Clin Genet (in press)

Nishimura-Tadaki A, Wada T, Bano G, Gough K, Warner J, Kosho T, Ando N, Hamanoue H, Sakakibara H, Nishimura G, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Wakui K, Saitsu H, Fukushima Y, Hirahara F, \*f. Breakpoint determination of X;autosome balanced translocations in four patients with premature ovarian failure. J Hum Genet (in press)

## 2. 学会発表

第9回東北出生前医学研究会(1月30日於仙台)・松本直通「疾患遺伝子研究の新潮流」(特別講演)

An International Workshop on Translational Science: Clinical Use, Efficacy and Translation of Basic Discoveries (Feb 1 at Yokohama) f“Whole Genome Approach to the Epilepsy-Related Gene” (invited lecture)

第19回群馬遺伝子診療研究会(2月23日於群馬大学、前橋)・松本直通「年齢依存性てんかん性脳症の最近の話題」(特別講演)

平成21年度厚生労働科学研究費難治性疾患克服研究事業研究成果発表会(3月12日於学術情報センター、東京) 松本直通・年齢依存性てんかん性脳症の分子疫学と臨床像の解明

第113回日本小児科学会学術集会(4月23日於岩手県民情報交流センター、盛岡)・シンポジウム「先天性疾患における最近の進歩：病態解明から遺伝子診断へ」・松本直通「染色体異常からの疾患遺伝子探索」(シンポジスト)

European Human Genetic Conference 2010・Naomichi Matsumoto, Akira Nishimura, Yoko Hiraki. De novo deletion of 1q24.3-q31.2 in a patient with severe growth retardation. (Poster presentation) (June 12-15, 2010 at Gothenburg, Sweden)

久留米大学 Pediatric Ground Rounds・松本直通「年齢依存性てんかん性脳症の新知見」(招待講演)(久留米大学医学部、7月16日)

BioJapan2010 アカデミックシーズ発表会・松本直

通「デルマタン4-O-硫酸基転移酵素-1は新しいタイプのエーラス・ダンロス症候群を引き起こす」パシフィコ横浜、9月30日)

Joint Egyptian-Japanese Scientific Workshop, “A new era of genetic diseases” (organized by Ghada M.H. Abdel Salam and Naomichi Matsumoto) (National Research Center, Cairo, Egypt, Oct 3-4, 2010) Naomichi Matsumoto “Microarray technologies: Highways to genomic aberrations” (invited lecture)

Joint Egyptian-Japanese Scientific Workshop, “A new era of genetic diseases” (organized by Ghada M.H. Abdel Salam and Naomichi Matsumoto) (National Research Center, Cairo, Egypt, Oct 3-4, 2010) Naomichi Matsumoto “Isolation of the gene responsible for a new type of Ehlers-Danlos syndrome” (invited lecture)

Joint Egyptian-Japanese Scientific Workshop, “A new era of genetic diseases” (organized by Ghada M.H. Abdel Salam and Naomichi Matsumoto) (National Research Center, Cairo, Egypt, Oct 3-4, 2010) Naomichi Matsumoto “Haploinsufficiency of *STXBPI* causes Ohtahara syndrome” (invited lecture)

The 4<sup>th</sup> Asian Chromosome Colloquium (Beijing, China, Oct 11-14) f “Identification of two epilepsy-related genes from a 2.25-Mb deletion in one patient.” (invited lecture)

日本人類遺伝学会第55回大会(大宮、10月30日)  
松本直通「疾患ゲノム解析：遺伝性疾患のエクソーム解析」(次世代シーケンサーを用いたヒト(疾患)ゲノム解析の現状セッション・シンポジスト・座長)

第22回 NIH 金曜会 (National Institute of Health, Bethesda, MD 11月5日) Naomichi Matsumoto 「Identification of two genes responsible for age-dependent epileptic encephalopathy」(invited lecture)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願 2010-106974・松本直通・Waardenburg 無眼球  
症候群の検出方法・横浜市立大学・平成 22 年  
5 月 7 日

エーラスダンロス症候群（主に血管型および新型）の実態把握および診療指針の確立

分担研究課題：新型エーラスダンロス症候群の臨床的研究

研究代表者 古庄知己 信州大学医学部附属病院遺伝子診療部

研究要旨：Ehlers-Danlos 症候群（EDS）は、皮膚の伸展性、関節弛緩など結合組織の脆弱性を持つ先天性疾患の総称であり、古典型（Classical type）、関節過動型（Hypermobility type）、血管型（Vascular type）、後側彎型（Kyphoscoliosis type）、多発関節弛緩型（Arthrochalasia type）、皮膚脆弱型（Dermatosparaxis type）の6つの主病型に分類されている。いずれも、コラーゲン分子そのもの、または修飾酵素の遺伝子変異により生じる。最近、大病型に属さない新たな病型が、その生化学的、遺伝学的基盤とともに相次いで発見されている。研究代表者は、顔貌上の特徴、先天性多発関節拘縮、進行性の皮膚・関節弛緩および全身脆弱性を呈する6症例を見出し、全く新しいタイプのEDS（EDS, Kosho Type; EDSKT）であることと結論付けた（Kosho et al., *Am J Med Genet 152A: 1333-1346, 2010*）。さらに連鎖解析および糖鎖医学分析により、デルマトタン 4-O-硫酸基転移酵素-1（D4ST-1）をコード遺伝子 *CHST14* が原因遺伝子であること、発症機構として「D4ST-1 欠損→デコリンに付加するグリコサミノグリカンの組成変化（デルマトタン硫酸の消失）→デコリンが媒介するコラーゲン細線維の assembly 不全」という病態を発見した（Miyake et al., *Hum Mutat 31: 966-974, 2010*）。我々の報告にわずかに先行する形で、*CHST14* の変異に基づく D4ST1 の欠損が、内転母指および内反足を特徴とする新しい多発関節拘縮症 “adducted thumb-clubfoot syndrome (ATCS)” を引き起こすことが報告された（Dündar et al., *Am J Hum Genet 85: 873-882, 2009*）。また、わずかに遅れる形で、D4ST1 の欠損が、EDSVIB に分類されていた2家系3症例の原因であると報告され、Musculocontractural EDS (MCEDS) との名称が提案された（Malfait et al., *Hum Mutat 31: 1233-1239, 2010*）。本分担研究では、EDSKT、ATCS、MCEDS が臨床的には異なる allelic diseases なのか、同一疾患の家族間または年齢による variability といえるのかを検討するため、新たに見出した2症例の詳細な臨床経過および身体所見を記載し、さらに、これまで EDSKT、ATCS、MCEDS として報告された全20症例の包括的レビューを行った。結論として、独立に発見された ATCS、EDSKT、MCEDS は、D4ST1 欠損に基づく臨床的に同一の疾患であり、進行性結合組織脆弱性（皮膚過伸展・脆弱性、全身関節弛緩・慢性脱臼・変形、巨大皮下血腫など）および発生異常（顔貌の特徴、先天性多発関節拘縮など）に特徴付けられる EDS の新病型と考えられた。

#### A. 研究目的

Ehlers-Danlos 症候群（EDS）は、皮膚の伸展性、関節弛緩など結合組織の脆弱性を持つ先天性疾患の総称であり、古典型（Classical type）、関節過動型（Hypermobility type）、血管型（Vascular type）、後側彎型（Kyphoscoliosis type）、多発関節弛緩型（Arthrochalasia type）、皮膚脆弱型（Dermatosparaxis type）の6つの主病型に分類されている。いずれも、コラーゲン分子そのもの、または修飾酵素の遺伝子変異により生じる。最近、大病型に属さない新たな病型が、その生化学的、遺伝学的基盤とともに相次いで発見されている。

研究代表者は、2000年、皮膚・関節の過伸展性・脆弱性に加えて、先天性内反足、顔貌や椎体の特徴、巨大皮下血腫の反復などの症状を有する7歳女兒（Patient 1）に出会った。6つの主病型には合致しない特異な病型である可能性を疑ったが、原因を突き止めることはできなかった。2003年、Patient 1 と酷似した臨床経過をたどる26歳女性（Patient 2）が長野県内に見出した。Patient 1 の診療を再開し、また Patient 2 にも診察する機会を得、検討の後、これら2症例が、これまでの分類には当てはまらない新型 EDS であると考えた。この時点では、主病型のなかでは後側彎型（旧分類では

VI型)に類似した脊椎変形、皮膚や動脈の脆弱性を呈しているものの、後側彎型の病因である lysyl hydroxylase の欠損を認めない EDSVIB として論文を発表した (lysyl hydroxylase の欠損を伴う通常の後側彎型を EDSVIA と分類する場合) (Kosho et al., *Am J Med Genet* 138A: 282-287, 2005)。

研究代表者は、2007年より日本エーラスダンロス症候群協会 (JEFA) の賛助会員をしているが、その創設会において1人の30歳男性患者 (Patient 3) に出会った。経過をうかがうと、Patient 1 および 2 と酷似していた。その後、彼の入院先の病院に出向き、診察をしたところ全く同様の身体所見を有することがわかった。その頃、札幌医科大学内科の安井寛博士、石田禎夫博士より、類似の症状を有する32歳男性症例 (Patient 4) の相談をいただいた (Yasui et al., *Am J Hematol* 72:71-72, 2003)。さらに、獨協医科大学皮膚科旗持淳教授との共同研究で19歳女性症例 (Patient 5)、4歳女児例 (Patient 6) を見出した。これら6症例の臨床経過および身体所見を詳細に分析し、顔貌上の特徴、先天性多発関節拘縮、進行性の皮膚・関節弛緩および全身脆弱性を呈する全く新しいタイプのEDS (EDS, Kosho Type) であることと結論付けた (Kosho et al., *Am J Med Genet* 152A: 1333-1346, 2010)。その特徴は以下のとおりである。

<顔貌の特徴>乳児期は、大泉門開大、眼間開離、短い眼瞼、青色強膜、短い鼻、耳介低位、高口蓋、長い人中、薄い上嘴唇、小口、小下顎。思春期以降、細長い、非対称、下顎突出。

<骨格の特徴>出生時、手指、手首、股関節の拘縮、内反足。小児期以降、全身性関節弛緩・変形が進行 (多発脱臼、外反扁平または凹足、扁平または漏斗胸、後側彎)。

<皮膚の特徴>進行性の過伸展性・易出血性・脆弱性、成人期には顕著なたるみと特異な手掌の皺。

<その他>心臓弁の逸脱・逆流、血管の破綻による反復性巨大皮下血腫、腸憩室破裂、斜視、近視、眼圧上昇、運動発達遅滞など。

症例の集積と並行し、2005年度信州医学振興会医学研究助成および2007年度信州若手研究者萌芽研究支援事業の支援を得て、病態解明へ向けたプロジェクトを進めた。関連遺伝子解析では原因遺伝子を同定することができなかった。そこで、厚

生労働科学研究費補助金・難治性疾患克服研究事業 (2009-2011年度) の支援を得て、横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学の松本直通教授、三宅紀子助教 (現 准教授) (研究分担者) との共同研究で、近親婚2家系を利用した連鎖解析による原因遺伝子単離を試みた。ホモ接合体マッピングにより責任領域を限局、デルマタン4-O-硫酸基転移酵素-1 (D4ST-1) をコード遺伝子 *CHST14* が原因遺伝子であることを突き止めた。D4ST-1 は、プロテオグリカン (PG) の側鎖であるグリコサミノグリカン (GAG) を構成するデルマタン硫酸 (DS) のNアセチルガラクトサミン残基の4位に硫酸基を付加する酵素である。北海道大学大学院先端生命科学研究院プロテオグリカンシグナリング医療応用研究室の菅原一幸教授 (研究協力者)、水本秀二助教との共同研究により、患者皮膚由来線維芽細胞において D4ST-1 酵素活性が顕著に低下していることが明らかになった。次に、DS を含有する代表的な PG であり、コラーゲン細線維を密に束ねる (assembly) のに重要な役割を果たすデコリン (DCN) に着目した。DCN の GAG は通常コンドロイチン硫酸 (CS) とデルマタン硫酸との複合体であるが、患者皮膚由来線維芽細胞においては DS がなくなり、全て CS になっていた。さらに、旗持淳博士 (研究分担者) との共同研究により、患者皮膚の電子顕微鏡像において、コラーゲン細線維が正常人のように密に束ねられず、ばらけて存在することがわかった。以上から、少なくとも本症の進行性結合組織脆弱性の発症機構として「D4ST-1 欠損→デコリンに付加するグリコサミノグリカンの組成変化 (デルマタン硫酸の消失) →デコリンが媒介するコラーゲン細線維の assembly 不全」という病態を提唱した (Miyake et al., *Hum Mutat* 31: 966-974, 2010)。

研究代表者らの研究報告にわずかに先行する形で、*CHST14* の変異に基づく D4ST1 の欠損が、内転母指および内反足を特徴とする新しい多発関節拘縮症 “adducted thumb-clubfoot syndrome (ATCS)” を引き起こすことが報告された (Dündar et al., *Am J Hum Genet* 85: 873-882, 2009)。また、筆者らの研究報告にわずかに遅れる形で、D4ST1 の欠損が、EDSVIB に分類されていた2家系3症例の原因であると報告され、Musculocontractural EDS (MCEDS) との名称が提案された (Malfait et al., *Hum Mutat* 31: 1233-1239, 2010)。

EDS Kosho Type (EDSKT)、ATCS、MCEDS が臨床的には異なる allelic diseases なのか、同一疾患の家族間または年齢による variability といえるのかを検討するため、これまで EDSKT、ATCS、MCEDS として報告された 20 症例と新たに見出した 2 症例の詳細な臨床経過および身体所見に関する包括的レビューを行った。

## B. 研究方法

本研究期間において、研究代表者は新たに 2 症例（2 歳男児、6 歳男児）を見出した。これに既報告の 20 症例を加え、合計 22 症例を対象として臨床症状を分析した。

本研究は、新たな 2 症例の遺伝子解析を含んでおり、これは新型 EDS (D4ST1 欠損症) に関する遺伝子解析研究と位置づけられる。研究代表者は、平成 19 年～22 年には「新型エーラスダンロス症候群の遺伝子解析 (受付番号 214)」として、平成 22 年以降は「D4ST1 欠損症 (エーラスダンロス症候群, 古庄型) の遺伝子解析」として信州大学医学部医倫理委員会の承認を得ている。診療施設から臨床情報を収集する際には、個人情報の保護に留意した。

本研究は、過去の報告例を記載した文献の収集と分析という側面も持つ。これに関しては、出版の段階で協力者の同意を得ていると考えられるため、特段の倫理的手続きを要しないと考えられた。

## C. 研究結果 (表 1、2)

**CHST14 変異:** V49X が 2 家系 (ATCS、MCEDS) に、K69X が 1 家系 (EDSKT) に、R135G が 1 家系 (ATCS) に、L137Q が 1 家系 (ATCS) に、F209S が 1 家系 (EDSKT) に、R213P が 1 家系 (ATCS) に、P281L が 8 家系 (EDSKT) に、C289S が 1 家系 (EDSKT) に、Y293C が 4 家系 (ATCS、EDSKT) に、E334GfsX107 が 1 家系 (MCEDS) に検出された。

### 顔貌上の特徴:

出生時～乳児早期、ATCS、EDSKT、MCEDS ともに、大きい大泉門、眼間分離、小さく、垂れ下がった (斜下) 眼瞼裂、青色強膜、短い鼻、低形成

の鼻柱、低位かつ後傾した耳介、高口蓋、長い人柱、薄い上唇、小さい口、小さく後退した下顎が認められた。学童期以降、EDSKT においては、下顎が突出した細長い顔になり、左右非対称さも伴っていた。この特徴は、ATCS の年長児例 (6 歳、8 歳、15 歳) および MCEDS (21 歳) においても認められた。ATCS の日本人同胞例においては、それぞれ口唇口蓋裂、粘膜下口蓋裂が認められた。

### 骨格系の特徴:

先天性多発関節拘縮は、ATCS、EDSKT、MCEDS いずれにおいても必発症状であった。とりわけ、母指の内転および屈曲拘縮、内反足が特徴的であった。手指は、「先細り」「細長い」「筒状」などと表現される独特な形態をしていた。EDSKT においては、手指の動きの異常 (II-V 指の DIP 関節、母指の IP および MP 関節の屈曲・伸展ができない。II-V 指の MP 関節もほとんど屈曲・伸展ができない) が認められる症例もあった。腱の付着異常を呈する症例もあった。

小児期、側彎、後側彎といった脊椎異常、外反扁平足などの足部変形が生じ、進行した。マルファン症候群様体型、関節脱臼の反復、胸郭変形 (平坦、漏斗胸、鳩胸) も認められた。

骨密度は、ATCS の 2 症例 (6 歳、15 歳)、EDSKT の 2 症例 (29 歳、31 歳) において低下していたが、ATCS の 1 症例 (8 歳)、EDSKT の 1 症例 (15 歳) においては正常であった。破骨細胞のマーカーである尿 NTX は、EDSKT の 3 症例 (16 歳、28 歳、31 歳) において増加し、骨芽細胞のマーカーである BAP は、同 3 症例において正常であった。骨芽細胞に比して破骨細胞の活動性が亢進していることが、本症の骨密度低下や骨粗鬆症に関係している可能性が示唆された。

レントゲン上、EDSKT の 5 症例において手指骨および中手骨の骨幹狭小化が、ATCS の 1 症例および EDSKT の 4 症例において検出され、足趾骨および中足骨の骨幹狭小化が、ATCS の 1 症例と EDSKT の 4 症例において検出された。「背の高い」椎体が EDSKT の 5 症例 (11 歳以上)、MCEDS の 1 症例において検出されたが、EDSKT の 2 小児例 (2 歳) においては検出されなかった。

### 皮膚の特徴: