

6月16-19日 於 京都大学、京都)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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： 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 横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学

分担研究者 松本直通 横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学

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ことを明らかにした。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る不適切なコラーゲン繊維形成異常が病態として考えられる。本年度は、本症候群を疑われる新規症例に関して、遺伝学的検査を行った。

#### 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家系を加えた計6家系で新型EDSの疾患概念を提唱した(Kosho et al. AJMG 2010)。さらにこの6家系において責任遺伝子を同定するに至った(Miyake et al. Hum Mutat 2010)。本年度は、新たに本症候群を疑われた11家系の遺伝学的検索を行った。

#### B. 研究方法

##### *CHST14* 遺伝子の変異解析

*CHST14* 遺伝子のタンパク質翻訳領域とエクソ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。常染色体劣性遺伝形式であるため、ホモ接合性変異もしくは複合ヘテロ接合性変異の有無を確認する。

#### C. 研究結果

11家系（13症例）に対して、サンガー法によるダイレクトシーケンス解析を行った。11家系中7家系において、ホモ接合性変異もしくは複合ヘテロ接合性変異を同定した。

現在までに解析の完了した合計17家系において、変異の同定された家系は13家系（76.5%）であった。非典型的な表現型を示した4家系では、*CHST14* に変異を同定しなかった。変異の種類は、8種類でその内訳はミスセンス変異3種類、ナンセンス変異4種類、欠失1種類であった。変異アリの出現頻度は以下になる。

c.2_10delTGTTCCCCC	p.Met1?:	2 (alleles)
c.145delG	p.Val49*:	2
c.205A>T	p.Lys69*:	1
c.485G>A	p.Trp162*:	1
c.626C>T	p.Phe209Ser:	3
c.842C>T	p.Pro281Leu:	13
c.866G>C	p.Cys289Ser:	1
c.878A>G	p.Tyr293Cys:	3

うち、p.Val49fs 以外は日本人症例であり、日本人

患者における p.Pro281Leu アリル頻度は、50%で、もっとも頻度が高いが、日本人以外の報告はない。

変異の同定されない4家系は臨床的に非典型で病型が異なる可能性がある。

#### D. 考察

臨床的に、典型であると診断された13症例の変異検出率は100%であった。さらに新規症例における *CHST14* 遺伝子の変異解析を継続し、詳細な遺伝型—臨床型連関を比較検討する。

#### E. 結論

新型エーラスダンロス症候群 (EDS) 患者と診断された17家系を解析し、13家系においてホモ接合性もしくは複合ヘテロ接合性の病的変異を認めた。また、変異を認めた13症例はいずれも臨床的に典型例であり、変異を認めなかった4症例は非典型症例であった。*CHST14* 変異による臨床像は非常に特異的であり、今後も非典型症例も含めて解析を継続することで、明確な診断基準を確立できると考える。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Okada I#, Hamanoue H#, (# 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, \*Saitu 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

\*Saitu 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 *STXBP1* mutation in Ohtahara syndrome. *Clin Genet* 80 (5):484-488, 2011.

\*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* 80 (5): 466-471, 2011.

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, Saitu H, Fukushima Y, Hirahara F, \*Matsumoto N. Breakpoint determination of X;autosome balanced translocations in four patients with premature ovarian failure. *J Hum Genet* 56(2) 156-160, 2011

Hiraki Y, Nishimura A, Hayashidani M, Terada Y, Nishimura G, Okamoto N, Nishina S, Tsurusaki Y, Doi H, Saitu H, Miyake N, \*Matsumoto N. A de novo deletion of 20q11.2-q12 in a boy presenting with abnormal hands and feet, retinal dysplasia, and intractable feeding difficulty. *Am J Med Genet* 152(2): 409-414, 2011

\*Tonoki H, Harada N, Shimokawa O, Yosozumi A, Monzaki K, Satoh K, Mika Kosaki R, Sato A, Matsumoto N, Iizuka S. Axenfeld-Rieger anomaly and Axenfeld-Rieger syndrome: clinical, molecular-cytogenetic, and DNA array analyses on three patients with chromosomal defects at 6p25. *Am J Med Genet Part A* 155 (12): 2925-2932

Tadaki H, Saitu H, Nishimura-Tadaki A, Imagawa T, Kikuchi M, Hara R, Kaneko U, Kishi T, Miyamae T, Miyake N, Doi H, Tsurusaki Y, Sakai H, Yokota S, \*Matsumoto N. De novo 19q13.42 duplications involving *NLRP* gene cluster in a patient with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *J Hum Genet* 56 (5): 343-347, 2011.

\*Miyake N, Yamashita S, Kurosawa K, Miyatake S,

- Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Matsumoto N. A novel homozygous mutation of DARS2 may cause a severe LBSL variant. *Clin Genet* 80(3): 293-296, 2011.
- Tadaki H, Saitsu H, Kanegane H, Miyake N, Imagawa T, Kikuchi M, Hara R, Kaneko U, Kishi T, Miyamae T, Nishimura A, Doi H, Tsurusaki Y, Sakai H, Yokota S, \*Matsumoto N. Exonic deletion of CASP10 in a patient presenting with systemic juvenile idiopathic arthritis, but not with autoimmune lymphoproliferative syndrome type IIa. *Int J Immunogenet* 38 (4): 287-293, 2011
- Tsurusaki Y, Osaka H, Hamanoue H, Shimbo H, Tsuji M, Doi H, Saitsu H, \*Matsumoto N, \*Miyake N. Rapid detection of a mutation causing X-linked leukodystrophy by exome sequencing. *J Med Genet* 48 (9): 606-609, 2011.
- \*Narumi Y, Shiihara T, Yoshihara H, Sakazume S, van der Knaape MS, Nishimura-Tadaki A, Matsumoto N, Fukushima Y. Hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum (H-ABC) in an infant with Down syndrome. *Clin Dysmorphol* 20 (3): 166-167, 2011
- Dai J, Kim O-K, Cho T-J, Miyake N, Song H-R, Karasugi T, Sakazume S, Ikema M, Matsui Y, Nagai T, Matsumoto N, Ohashi H, Kamatani N, Nishimura G, Furuichi T, Takahashi A, \*Ikegawa S. A founder mutation of CANT1 common in Korean and Japanese Desbuquois dysplasia. *J Hum Genet* 56(5): 398-400, 2011.
- \*Saitsu H, Matsumoto N. Genetic commentary: De novo mutations in epilepsy. *Dev Med Child Neurol* 53 (9):806-807, 2011.
- Shimizu K, Okamoto N, Miyake N, Taira K, Sato Y, Matsuda K, Akimaru N, Ohashi H, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, \*Kosho T. Delineation of dermatan 4-O-sulfotransferase 1 deficient Ehlers-Danlos syndrome: Observation of two additional patients and comprehensive review of 20 reported patients. *Am J Med Genet* 155(8): 1949-1958, 2011
- \*Saitsu H, Osaka H, Sugiyama S, Kurosawa K, Mizuguchi T, Nishiyama N, Nishimura A, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Harada N, Kato M, Matsumoto N. Early infantile epileptic encephalopathy associated with the disrupted gene encoding Slit-Robo Rho GTPase activating protein 2 (SRGAP2). *Am J Med Genet* 158A (1):199-205, 2011
- \*Saitsu H, Osaka H, Sasaki M, Takanashi J, Hamada K, Yamashita A, Shiina M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Miyake N, Doi H, Ogata K, Inoue K, \*Matsumoto N. Mutations in POLR3A and POLR3B encoding RNA polymerase III subunits cause an autosomal recessive hypomyelinating leukoencephalopathy. *Am J Hum Genet* 90 (1):86-90, 2012.
- Tsurusaki Y, Okamoto N, Suzuki Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Exome sequencing of two patients in a family with atypical X-linked leukodystrophy. *Clin Genet* 80 (2): 161-166, 2011
- Hannibal MC#, Buckingham KJ#, Ng SB#, (# denotes equal contribution) Ming JE, Beck AE, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Bigham AW, Tabor HK, Mefford HC, Cook J, Yoshiura KI, Matsumoto T, Matsumoto N, Miyake N, Tonoki H, Naritomi K, Kaname T, Nagai T, Ohashi H, Kurosawa K, Hou JW, Ohta T, Liang D, Sudo A, Morris CA, Banka S, Black GC, Clayton-Smith J, Nickerson DA, Zackai EH, Shaikh TH, Donnai D, Niikawa N, Shendure J, \*Bamshad MJ. Spectrum of MLL2 (ALR) mutations in 110 cases of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet* 155 (7): 1511-1516, 2011.
- \*Kosho T, Miyake N, Mizumoto S, Hatamochi A, Fukushima Y, Sugahara K, Matsumoto N. A response to: Loss of dermatan-4-sulfotransferase 1 (D4ST1/CHST14) function represents the first dermatan sulfate biosynthesis defect, "Dermatan sulfate-deficient adducted thumb-clubfoot syndrome". Which name is appropriate, "Adducted thumb-clubfoot syndrome" or "Ehlers-Danlos syndrome"? *Hum Mut* 32(12):1507-1509, 2011
- Doi H, Yoshida K, T Yasuda, Fukuda M, Fukuda Y, Morita H, Ikeda S-i, Kato R, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Sakai H, Miyatake S, Shiina M, Nukina N, Koyano S, Tsuji S, Kuroiwa Y, \*Matsumoto N. Exome sequencing reveals a homozygous SYT14 mutation in adult-onset autosomal recessive spinocerebellar ataxia with psychomotor retardation. *Am J Hum Genet* 89(2):320-327, 2011.
- \*Abdel-Salam GMH, Miyake N, Eid MM, Abdel-Hamid MS, Hassan NA, Eid OM, Effat LK, El-Badry TH, El-Kamah GY, El-Darouti M, \*Matsumoto N. A homozygous Mutation in RNU4ATAC as a cause of microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type I (MOPD I) with associated pigmentary disorder. *Am J Med Genet Part A* 155 (11): 2885-2896, 2011.

## 2. 学会発表

講演会「次世代シーケンサーを用いた最先端研究」・松本直通「次世代シーケンサーを用いたヒト疾患ゲノム解析法」(徳島・徳島大学医学部臨床第一講堂 8月26日)

第一回サイトジェノミクスセミナー・松本直通(特別講演)「次世代シーケンス法による疾患研究の最前線」(三菱化学メディエンス志村事業所・東京9月17日)

第46回産婦人科研究会(順天堂大学)松本直通(特別講演)「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析の現状」(順天堂大学医学部・東京9月20日)

第18回遺伝性疾患に関する出生前診断研究会・松本直通(特別講演)「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析の現状」(佐賀大学医学部・佐賀10月1日)

日本人類遺伝学会第56回大会・松本直通「ヒト遺伝性疾患の原因解明を目指して」学会賞受賞講演(於・幕張メッセ11月11日)

日本人類遺伝学会第56回大会「次世代シーケンサーを用いたヒト疾患ゲノム解析法」松本直通(シンポジスト)シンポジウム11(超高速シーケンサーによる疾患ゲノム解析)(於・幕張メッセ11月12日)

国立精神・神経医療研究センターTMC棟/クラスター研究棟開棟記念講演会「遺伝性神経疾患のエクソーム解析」松本直通(招待講演)(国立精神・神経医療研究センター11月22日)

The 34<sup>th</sup> annual meeting of the molecular biology society of Japan・Next generation sequencing technology enables a large scale medical genomic

research (symposium)「Disease genome analysis using next generation sequencer」Naomichi Matsumoto(Invited speaker)(Dec 14, 2011 at Yokohama, Japan)

Noriko Miyake, Tomoki Kosho, Shuji Mizumoto, Tatsuya Furuichi, Atsushi Hatamochi, Shiro Ikegawa, Shuhei Yamada, Kazuyuki Sugahara, Naomichi Matsumoto. *CHST14* mutations in Ehlers-Danlos syndrome. The 11<sup>th</sup> East Asia Union of Human Genetics Annual meeting (oral presentation) (幕張、11月10日)

Noriko Miyake, Tomoki Kosho, Shuji Mizumoto, Tatsuya Furuichi, Atsushi Hatamochi, Shiro Ikegawa, Shuhei Yamada, Kazuyuki Sugahara, Naomichi Matsumoto. Loss-of-function mutations of *CHST14* cause a new type of autosomal recessive Ehlers-Danlos syndrome. European Human Genetics Conference 2011 (poster session) (Amsterdam, The Netherlands, May 30th).

三宅紀子、古庄知己、水本秀二、松本直通 新型 Ehlers-Danlos 症候群 (D4ST1 欠損症) の遺伝学的検索。日本人類遺伝学会第56回大会(一般口演)(幕張、11月10日)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特願 2012-136 松本直通/鶴崎美徳/三宅紀子・コフィンーシリス症候群の検出方法・平成24年1月4日

特願 2011-247457 才津浩智/松本直通・孔脳症および周産期脳出血の検出方法・平成23年11月11日

特願 2011-226488・才津浩智/松本直通・び慢性大脳白質形成不全症の検出方法・平成23年10月14日

特願 2011-136277・松本直通/土井宏・常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症の検出方法・横浜市立大学・平成23年6月20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病態解明に関する研究

研究分担者 福嶋義光、鳴海洋子、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：新型エーラスダンロス症候群（新型 EDS ; EDS, Kosho Type）は、EDS 班の活動において発見した、顔貌上の特徴、先天性多発関節拘縮、進行性の結合組織脆弱性（皮膚弛緩、関節弛緩・変形、巨大皮下血腫など）を呈する全く新しいタイプの EDS である。CHST14 遺伝子の変異に基づきデルマタン 4-O-硫酸基転移酵素-1（D4ST-1）の活性が低下し、その結果、デコリンに付加するグリコサミノグリカン（GAG）鎖の組成変化（デルマタン硫酸[DS]が消失し、コンドロイチン硫酸[CS]に置換）が生じ、デコリンが媒介するコラーゲン細線維の assembly 不全に至ることが、本症候群の進行性結合組織脆弱性の病態と考えられている（Kosho et al., *Am J Med Genet* 138A: 282-287, 2005 ; Kosho et al., *Am J Med Genet* 152A: 1333-1346, 2010; Miyake et al., *Hum Mutat* 31: 966-974, 2010）。本分担研究では、病態のさらなる解明のための解析を試みた。生化学分析では、過去の患者同様に、新規患者において培養皮膚線維芽細胞の conditioned medium 中の DS は消失しており、デコリン上の GAG 鎖も全て CS に置換されていた。尿中 DS も完全に消失していることが示され、本症候群が全身性の DS 欠乏状態に基づくと考えられた。病理学的検討では、顕微鏡分析において、表皮が薄く波打っている、表皮直下の真皮のコラーゲン線維束が繊細になっている、といった特徴があった。Cupromeronic blue 染色を用いた電顕分析により、患者の真皮のコラーゲン細線維を束ねるデコリンの GAG 鎖を観察することに成功した。GAG 鎖は、真皮表層では長く、深層では短い傾向にあった。抗デコリン抗体を用いた免疫組織化学分析では、顕微鏡レベルでコントロールとは明らかに異なる特徴を有していた。今回、世界で初めて本症候群患者の iPS 細胞を樹立し、またノックアウトマウスも作製中である。今後、iPS 細胞やノックアウトマウスなどの疾患モデルを利用した詳細かつ包括的な解析により、病態のさらなる解析を行い、将来の根治療法開発への基盤としたい。

#### A. 研究目的

新型エーラスダンロス症候群（新型 EDS ; EDS, Kosho Type）は、EDS 班の活動において発見した、顔貌上の特徴、先天性多発関節拘縮、進行性の結合組織脆弱性（皮膚弛緩、関節弛緩・変形、巨大皮下血腫など）を呈する全く新しいタイプの EDS である（Kosho et al., *Am J Med Genet* 138A: 282-287, 2005 ; Kosho et al., *Am J Med Genet* 152A: 1333-1346, 2010）。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。CHST14 は、デルマタン 4-O-硫酸基転移酵素-1（D4ST-1）をコードする遺伝子であり、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（GAG）鎖の組成変化（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」という病態を示した（Miyake et al., *Hum Mutat* 31: 966-974, 2010）。ほぼ同時に、D4ST-1 の欠損が、内転母指および内反足の特徴とする新しい多発関節拘縮症“adducted thumb-clubfoot syndrome (ATCS)”（Dündar et al., *Am J Hum Genet* 85: 873-882, 2009）、および、後側彎型 EDS の垂型に分類されていた一部の患者（Musculocontractural EDS ; MCEDS）（Malfait et al., *Hum Mutat* 31: 1233-1239, 2010）の原因であると報告された。そして、ATCS の発見グループからは、本症は「dermatan sulfate-deficient ATCS」と命名すべきであり、EDS との分類は不適切であるとの主張が展開された。その根拠は、本症においては先天性多発関節拘縮、顔貌上の特徴、口唇口蓋裂、腸・腎の異常、筋緊張低下など通常 EDS には見られない

症状があること、分子病態が EDS とは異なることであった (Janecke et al., Hum Mutat 32: 484-485, 2011)。

本分担研究の目的は、遺伝子治療など将来の根本治療開発の基盤となるよう、本症候群の病態を詳細に検討することである。具体的には、以下のプロジェクトを併行して行ってきた。

- ① 生化学分析
- ② 病理学的分析
- ③ 発現解析
- ④ iPS 細胞の樹立
- ⑤ ノックアウトマウスの作製

## B. 研究方法

### ① 生化学分析

研究協力者の菅原一幸教授（北海道大学大学院先端生命科学研究院・生命機能科学研究部門プロテオグリカンシグナリング医療応用研究室）の研究室において、主として水本秀二博士研究員が実施した。

#### 新規患者培養皮膚線維芽細胞におけるコンドロイチン硫酸 (CS) /デルマトン硫酸 (DS) の定量と構造解析、デコリン分析

P281L/C289S の複合ヘテロ型変異を有する新規患者由来の皮膚線維芽細胞を対象とした。無血清培地で培養して得られた conditioned medium を、限外濾過膜を利用した遠心濃縮カラムで濃縮した後、CS および DS をそれぞれ特異的に二糖単位にまで分解する細胞由来の酵素（コンドロイチナーゼ AC および B）で処理した。生じた二糖の還元末端を蛍光標識し、陰イオン交換 HPLC で定量した。また、生じた二糖に対して、抗ヒト・デコリン抗体（マウスモノクローナル抗体）を用いた western blotting を実施し、デコリン上の CS/DS 鎖を分析した。

#### 患者尿中 CS/DS の解析

5 人の患者（P281/Y293C が 2 人、P281L/homo が 2 人、P281L/C289S が 1 人）由来の尿を、

限外濾過膜を用いて遠心濃縮後、コンドロイチナーゼ ABC、AC、および B で消化し、陰イオン交換 HPLC で各二糖組成の分析と CS/DS 定量を行った。

### ② 病理学的分析

研究協力者の小林身哉教授（金城学院大学生生活環境学部食環境栄養学科）の研究室、野村義宏准教授（北海道大学大学院先端生命科学研究院・生命機能科学研究部門プロテオグリカンシグナリング医療応用研究室）の研究室、藤田芳和先生（名古屋大学大学院医学研究科教育研究機器センター）、および中山淳教授（信州大学大学院医学系研究科分子病理学分野）の研究室において実施された。

#### 光顕分析

3 人の患者（P281L/Y293C が 2 人、P281L/C289S が 1 人）および正常コントロール（1 人）由来パラフィンブロックを用いて、AZAN 染色を行い観察した。

#### 電顕分析 (Cupromeronic blue 染色)

1 人の患者（P281L/Y293C、19 歳時、脊椎後側彎手術に得られた背部皮膚）および病型不明の EDS 患者（10 歳、上腕外側）より検体を得た。グルタル固定後、洗浄し、GAG 鎖に特異的に反応する 0.05% (w/v) Cupromeronic blue 液で染色した。洗浄後、0.034M sodium tungstate で後染色した。洗浄、脱水、包埋し、観察した。

#### 抗デコリン抗体を用いた免疫組織化学分析

3 人の患者（P281/Y293C が 2 人、P281L/C289S が 1 人）および正常コントロール人（1 人）の光顕用パラフィン切片を抗ヒト・デコリン抗体（マウスモノクローナル抗体）で染色した。

1 人の患者（P281/Y293C）の皮膚片を採取し、免疫電顕用アクリル樹脂で包埋、超薄切後に一次抗体として抗ヒト・デコリン抗体（マウスモノクローナル抗体）を、二次抗体として金コロイド標識抗マウス IgG 抗体を反応させた。酢酸ウラニウム、鉛染色液にて電子染色を行い、電子顕微鏡で観察した。

### ③ 発現解析

4 人の患者（P281L/Y293C が 2 人、P281L/homo が

1人、O281L/C289Sが1人) および正常コントロール人(1人) 由来培養皮膚線維芽細胞を対象として、Illumina Human HT-12 ver.4のマイクロアレイを用いて解析した。

#### ④iPS細胞の樹立

研究協力者の江良拓実教授(熊本大学発生医学研究所幹細胞誘導分野)の研究室において実施された。

患者1人(P281L/Y293C)の皮膚片を採取、皮膚線維芽細胞を樹立した後、*OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4*、*c-MYC*を搭載したセンダイウイルスを用いた方法を用いた。

#### ⑤ノックアウトマウスの作製

研究分担者の三宅紀子准教授(横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学)、研究協力者の菅原一幸教授、野村義宏淳教授、水本秀二博士研究員とともに計画を進めてきた。

*CHST14*のノックアウトマウスは、既に作成され(Tang et al., *Nat Biotech* 28: 749-755, 2010)、米国の非営利的マウス供給センター(Mutant Mouse Regional Resource Centers; MMRRC) (<http://www.mmrrc.org/>)を通じて研究者に実費で提供されていた。MMRRCに依頼し、凍結精子を入手することとした。

なお、本研究は、「D4ST1欠損症(エーラスダロス症候群、古庄型)の遺伝子解析(受付番号304)」として、信州大学医学部医の倫理委員会の承認を得て行われた。iPS細胞樹立に関しては、さらにコマもと大学倫理委員会の承認(倫理第318号)も得て行われた。

### C. 研究結果

#### ①生化学分析

##### 新規患者培養皮膚線維芽細胞におけるコンドロイチン硫酸(CS)/デルマトン硫酸(DS)の定量と構造解析、デコリン分析

CS鎖は合成されていたが、DS鎖は合成されていなかった。さらにwild-typeと比べて6-O-硫酸化構造が増加し、CSの二糖総量もやや増加していた。デコリン上のCS/DS hybrid鎖は、DSを特異

的に分解する酵素であるコンドロイチナーゼBに抵抗性を示し、DSが含まれていないことを示した。

#### 患者尿中CS/DSの解析

5人全員の尿において、CS部分の二糖組成のみ検出され、DS部分の二糖組成は全く検出されなかった。

#### ②病理学的分析

##### 光顕分析

3人の患者(P281L/Y293Cが2人、P281L/C289Sが1人) および正常コントロール人(1人) 由来パラフィンブロックを用いて、AZAN染色を行い観察した。表皮は、コントロールに比べて、波打ち、薄い、という特徴があった。また、表皮直下の真皮のコラーゲン線維束は、コントロールに比べて、繊細になっていた(図1)。

##### 電顕分析(Cupromeronic blue染色)

本症候群患者において、真皮表層ではコラーゲン線維は細く、粗に配列する傾向にあった。コラーゲン細線維の配列に関するデコリンのGAG鎖(Cupromeronic blueで染色される)は比較的長かった。真皮深層では太いコラーゲン細線維の束が密な網工を形成しており、デコリンのGAG鎖は短かった(図2)。

##### デコリン抗体を用いた免疫組織化学分析

光顕では、コントロールではコラーゲン線維束に不均一ながらべったりと抗デコリン抗体により染色されたが、患者ではコラーゲン線維束にfilamentousに染色された(図3)。

電顕では、コラーゲン細線維表面に金コロイド粒子が検出されたが、明らかな規則性、傾向を見出すことはできなかった。

#### ③発現解析

コントロールと比較して、発現が増加傾向にある遺伝子が5個、減少傾向にある遺伝子が1個見出されたが、統計学的に優位な遺伝子発現変動、pathwayとしての異常は検出されなかった。

#### ③iPS細胞の樹立

iPS細胞の樹立に成功し、現在、各種細胞系統へ



の分化誘導を試みている。

#### ④ノックアウトマウスの作製

MMRRC を通じて、*CHST14* のノックアウトマウスの作製に用いる凍結精子を入手した。現在、専門業者に一部作業を委託しながら、ノックアウトマウスの復元のための準備を始めている。

#### D. 考察

生化学分析では、デコリン上の CS/DS hybrid 鎖が通常ではほぼ DS であるところ、全て CS に置換されていた。培養皮膚線維芽細胞から conditioned medium に産生される全ての CS/DS 関連プロテオグリカンにおいても、DS が消失し、全て CS となっていると考えられた。これらは、過去の報告を支持するものである (Miyake et al., *Hum Mutat* 31: 966-974, 2010)。尿中の CS/DS 組成は、今回我々は世界に先駆けて見出した知見である。尿中 DS が消失し、CS のみ検出されたことは、全身のあらゆる臓器、細胞において D4ST1 欠損の影響が及ぼされていること、したがって、本症候群が全身性の DS 欠乏状態に基づくことを示している。このことは、DS がヒト発生および細胞外マトリックス維持にどのような役割を果たすのかを初めて示すモデル疾患とする Zhang らの提言を支持するものである (Zhang et al., *Prog Mol Biol Transl Sci* 93: 289-307, 2010)。さらに、非侵襲的なスクリーニング方法としても期待される。

本症候群の病理所見の解釈として、ATCS として本症候群の原因解明を行ったグループでは「正常」との解釈を示した (Dündar et al., *Am J Hum Genet* 85: 873-882, 2009)。我々は、光顕分析ではコラーゲン線維束が繊細に見える、電顕分析では 1 本 1 本のコラーゲン細線維の径は大小不同なく正常であるが、正常のようにパックされずにばらけて存在することを示した (Miyake et al., *Hum Mutat* 31: 966-974, 2010)。今回の光顕および電顕分析結果は、我々の分析結果の妥当性を示すものであった。また、今回、世界で初めて本症候群患者におけるデコリン GAG 鎖 (DS が消失し、全て CS に置換されている) を Cupromeronic blue 染色で直接観察することに成功した。コントロールが病型不明の EDS であったため、解釈は困難であるが、真皮表層と深層で、GAG 鎖の長さが異なることなどの所見を得た。今後患者検体と年齢、性別、採取部位をマッチさせた正常コントロールを入手し、分析を進めていく必要がある。

今回、世界で初めて本症候群患者において、抗デコリン抗体を用いた免疫組織化学を行った。光顕所見は正常と全く異なっており、診断的価値もある可能性があると考えられた。抗デコリン抗体はデコリンのコアタンパクを認識するものであり、この相違は、正常と比べてコラーゲン細線維が密に packing されていない状態を反映している可能性が考えられた。免疫電顕において有意な結果が得られなかった要因としては、コラーゲン細線維に対して金コロイド粒子が大きすぎた (5nm) ことによるのではないかと考えられた。

発現解析によって得られた結果の解釈は、現時点では困難である。その要因として、検体数が少ないこと、細胞培養の状態が個々に異なることなどが考えられる。

今回、世界で初めて本症候群患者由来の iPS 細胞の樹立に成功した。今後、本症候群での罹患臓器細胞への分化誘導を試み、疾患研究モデルとして利用可能かの検証を行っていく必要がある。

*CHST14* のノックアウトマウスが既に作製されていたため、予想よりも大幅に早く動物モデルを入手できる見通しがついた。ノックアウトマウスを復元し、表現型の解析を行い、疾患モデルとして適切かの検証を行っていく必要がある。

#### E. 結論

本症候群に関する先駆的な病態解析を進めてきた。世界で初めて、患者尿中の DS が消失していること、皮膚光顕にて抗デコリン抗体が正常と明らかに異なっていたことを示し、また iPS 細胞の樹立にも成功した。また、*CHST14* のノックアウトマウスの作製も進行中であり、根治療法の開発に向けた重要な疾患モデルとなると期待される。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Omori H, **Hatamochi A**, Koike M, Sato Y,

**Kosho T**, Kitakado Y, Oe T, Mukai T, Hari Y, Takahashi Y, Takubo K. Sigmoid colon perforation induced by the vascular type of Ehlers-Danlos syndrome: report of a case. *Surg Today*. 2011 May;41(5):733-6.

Shimizu K, Okamoto N, **Miyake N**, Taira K, Sato Y, Matsuda K, Akimaru N, Ohashi H, Wakui K, **Fukushima Y**, **Matsumoto N**, **Kosho T** (equal contribution, corresponding author). Delineation of Dermatan 4-O-sulfotransferase 1 Deficient Ehlers-Danlos Syndrome: Observation of Two Additional Patients and Comprehensive Review of 20 Reported Patients. *Am J Med Genet Part A*. 2011 Aug;155A(8):1949-58.

Wakabayashi Y, Yamazaki K, **Narumi Y**, Fuseya S, Horigome M, Wakui K, **Fukushima Y**, Matsubara Y, Aoki Y, **Kosho T** (corresponding author). Implantable Cardioverter Defibrillator for Progressive Hypertrophic Cardiomyopathy in a Patient with LEOPARD Syndrome and a Novel *PTPN11* Mutation Gln510His. *Am J Med Genet Part A*. 2011 Oct;155A(10):2529-33.

**Kosho T** (corresponding author), **Miyake N**, Mizumoto S, **Hatamochi A**, **Fukushima Y**, Yamada S, Sugahara K, **Matsumoto N**. A response to: loss of dermatan-4-sulfotransferase 1 (D4ST1/CHST14) function represents the first dermatan sulfate biosynthesis defect, "dermatan sulfate-deficient Adducted Thumb-Clubfoot Syndrome". Which name is appropriate, "Adducted Thumb-Clubfoot Syndrome" or "Ehlers-Danlos syndrome"? *Hum Mutat*. 2011 Dec;32(12):1507-9.

Saitsu H, Igarashi N, Kato M, Okada I, **Kosho T**, Shimokawa O, Sasaki Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, **Miyake N**, Harada N, Hayasaka K, **Matsumoto N**. De novo 5q14.3 translocation 121.5-kb upstream of MEF2C in a patient with severe intellectual disability and early-onset epileptic encephalopathy. *Am J Med Genet A*. 2011 Nov;155A(11):2879-84.

Narumi Y, Shiohara M, Wakui K, Hama A, Kojima S, Yoshikawa K, Amano Y, **Kosho T**, Fukushima Y. Myelodysplastic syndrome in a child with 15q24 deletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2012 Feb;158A(2):412-6.

古庄知己. デルマタン 4-O-硫酸基転移酵素-1 欠損に基づく新型エーラスダンロス症候群の発見と疾患概念の確立. *信州医学雑誌* 59(5) : 305-319, 2011.

古庄知己. Ehlers-Danlos 症候群の臨床・疫学. 特集「Weak connective tissue disease の肺病変」*日本胸部臨床* 70 巻 4 号 : 329-337, 2011 (4 月)

古庄知己. 保因者診断とその進め方. *遺伝子医学 MOOK 別冊「遺伝カウンセリングハンドブック」* (編集: 福嶋義光, 編集協力: 山内泰子, 安藤記子, 四元淳子, 河村理恵), *メディカルドゥー* (大阪), 70-71, 2011. 7 月.

古庄知己. 検査実施の妥当性 (カンファレンスと倫理委員会). *遺伝子医学 MOOK 別冊「遺伝カウンセリングハンドブック」* (編集: 福嶋義光, 編集協力: 山内泰子, 安藤記子, 四元淳子, 河村理恵), *メディカルドゥー* (大阪), 162-163, 2011. 7 月.

古庄知己. 健康管理 (遺伝カウンセリングから地域の医療や福祉へ). 遺伝子医学 MOOK 別冊「遺伝カウンセリングハンドブック」 (編集: 福嶋義光, 編集協力: 山内泰子, 安藤記子, 四元淳子, 河村理恵), メディカルドゥー (大阪), 204-205, 2011. 7月.

古庄知己. 遺伝カウンセリング. 周産期医学必修知識第 7 版, 『周産期医学』編集委員会編, 41 巻増刊号, 971-972, 2011.

古庄知己. 18 トリソミー症候群. 今日の小児治療指針 15 版 (総編集: 大関武彦, 古川漸, 横田俊一郎, 水口雅), 医学書院 (東京), 180-181, 2012 (2月)

古庄知己. Ehlers-Danlos 症候群. 今日の小児治療指針 15 版 (総編集: 大関武彦, 古川漸, 横田俊一郎, 水口雅), 医学書院 (東京), 186, 2012 (2月)

## 2. 学会発表

古庄知己<sup>1)</sup>、三宅紀子<sup>2)</sup>、水本秀二<sup>3)</sup>、籠持淳<sup>4)</sup>、高橋淳<sup>5)</sup>、鳴海洋子<sup>1)</sup>、福嶋義光<sup>1)</sup>、菅原一幸<sup>3)</sup>、松本直通<sup>2)</sup>. 1) 信州大学医学部附属病院遺伝子診療部 2) 横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学 3) 北海道大学大学院先端生命科学研究院・生命科学院・生命情報分子科学コース・細胞膜分子科学分野プロテオグリカンシグナリング医療応用研究室 4) 獨協医科大学皮膚科 5) 信州大学医学部運動機能学講座. デルマタン 4-O 硫酸基転移酵素欠損に基づく新型エーラスダンロス症候群. 第 3 回日本小児科学会長野地方会 (平成 23 年 6 月 5 日 於 長野県佐久勤労者福祉センター, 佐久)

古庄知己、鳴海洋子、関島良樹、福嶋義光、水内麻子、山下浩美、玉井真理子、櫻井晃洋 (信州大学医学部附属病院遺伝子診療部)、渡邊淳 (日本医科大学付属病院 遺伝診療科・ゲノム先端医療部). 下肢の痙性で発症、広汎性発達障害を伴い急速進行性の経過をたどる重症関節型エーラスダンロス症候群. 第 35 回日本遺伝カウンセリング学会 (遺伝医学合同学術集会) (平成 23 年 6 月 16-19 於 京都大学、京都)

古庄知己<sup>1)</sup>、鳴海洋子<sup>1)</sup>、三宅紀子<sup>2)</sup>、関島良樹<sup>1)</sup>、渡邊淳<sup>3)</sup>、松本直通<sup>2)</sup>、福嶋義光<sup>1)</sup>. 1) 信州大学医学部附属病院 遺伝子診療部、2) 横浜市立大学大学院医学研究科 遺伝学、3) 日本医科大学付属病院 遺伝診療科・ゲノム先端医療部. 下肢の痙性で発症、発達障害を伴い急速進行性の経過をたどる重症関節型エーラスダンロス症候群. 第 34 回日本小児遺伝学会学術集会 (平成 23 年 8 月 11 日 於 パシフィコ横浜、横浜)

古庄知己<sup>1)</sup> 水内麻子<sup>1)</sup> 鳴海洋子<sup>1)</sup> 玉井真理子<sup>1)</sup> 山下浩美<sup>1)</sup> 涌井敬子<sup>1)</sup> 高津亜希子<sup>2)</sup> 田中恭子<sup>2)</sup> 菊地範彦<sup>2)</sup> 大平哲史<sup>2)</sup> 岡賢二<sup>2)</sup> 塩沢丹里<sup>2)</sup> 金井誠<sup>3)</sup> 福嶋義光<sup>1)</sup>. 1) 信州大学医学部附属病院遺伝子診療部, 2) 産科婦人科学, 3) 保健学科小児・母性看護学. 出生前遺伝カウンセリングを起点とする遺伝性疾患のフォローアップ. 第 13 回遺伝性疾患に関する甲信越・北陸出生前診断研究会 (平成 23 年 10 月 1 日 於 信州大学医学部附属病院遺伝子診療部、松本)

古庄知己<sup>1,2)</sup>、鳴海洋子<sup>1,2)</sup>、関島良樹<sup>1)</sup>、坂本明之<sup>3)</sup>、成田信代<sup>4)</sup>、高橋淳<sup>4)</sup>、加藤博之<sup>4)</sup>、渡邊淳<sup>5-7)</sup>、三宅紀子<sup>8)</sup>、松本直通<sup>8)</sup>、福嶋義光<sup>1,2)</sup>. 1) 信州大学 医学部附属病院 遺伝子診療部 2) 信州大学 医学部 遺

伝医学・予防医学講座 3) 信州大学 医学部 麻酔蘇生学講座 4) 信州大学 医学部 運動機能学講座 5) 日本医科大学付属病院 遺伝診療科・ゲノム先端医療部 6) 日本医科大学 生化学・分子生物学 7) 日本医科大学 大学院医学研究科 分子遺伝医学専攻 8) 横浜市立大学 大学院医学研究科 遺伝学. 下肢の痙性、発達障害を伴い急速進行性の経過をたどる重症関節型エーラスダンロス症候群. 日本人類遺伝学会第 56 回大会 (平成 23 年 11 月 9 日～12 日 於 幕張メッセ、千葉)

鳴海洋子<sup>1,2)</sup>、塩原正明<sup>3)</sup>、天野芳郎<sup>4)</sup>、古庄知己<sup>2)</sup>、涌井敬子<sup>1)</sup>、福嶋義光<sup>1,2)</sup>. 1) 信州大学 医学部附属病院 遺伝子診療部 2) 信州大学 医学部 遺伝医学・予防医学講座 3) 信州大学医学部附属病院小児科 4) 長野赤十字病院小児科. 血小板減少、好中球減少を伴う 15q24 欠失症候群の 1 例. 第 34 回日本小児遺伝学会学術集会 (平成 23 年 8 月 11 日 於 パシフィコ横浜、横浜)

鳴海洋子<sup>1,2)</sup>、古庄知己<sup>2)</sup>、中村恒一<sup>3)</sup>、西村玄<sup>4)</sup>、福嶋義光<sup>1,2)</sup>. 1) 信州大学 医学部附属病院 遺伝子診療部 2) 信州大学 医学部 遺伝医学・予防医学講座 3) 信州大学医学部附属病院整形外科 4) 東京都立小児総合医療センター. NOTCH2 遺伝子異常を伴う Hadju-Cheney 症候群の 1 例. 日本人類遺伝学会第 56 回大会 (平成 23 年 11 月 9 日～12 日 於 幕張メッセ、千葉)

招待講演「エーラスダンロス症候群研究班」  
古庄知己 遺伝性結合織病 市民公開セミナー in 東京 (平成 23 年 11 月 20 日 於 日本医科大学教育棟, 東京)

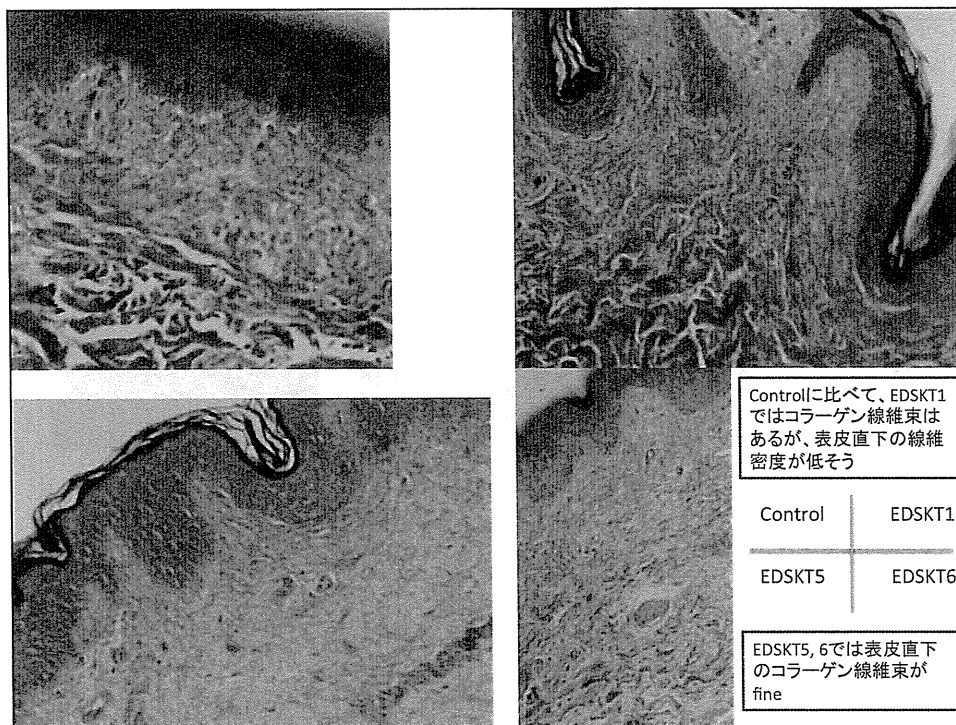
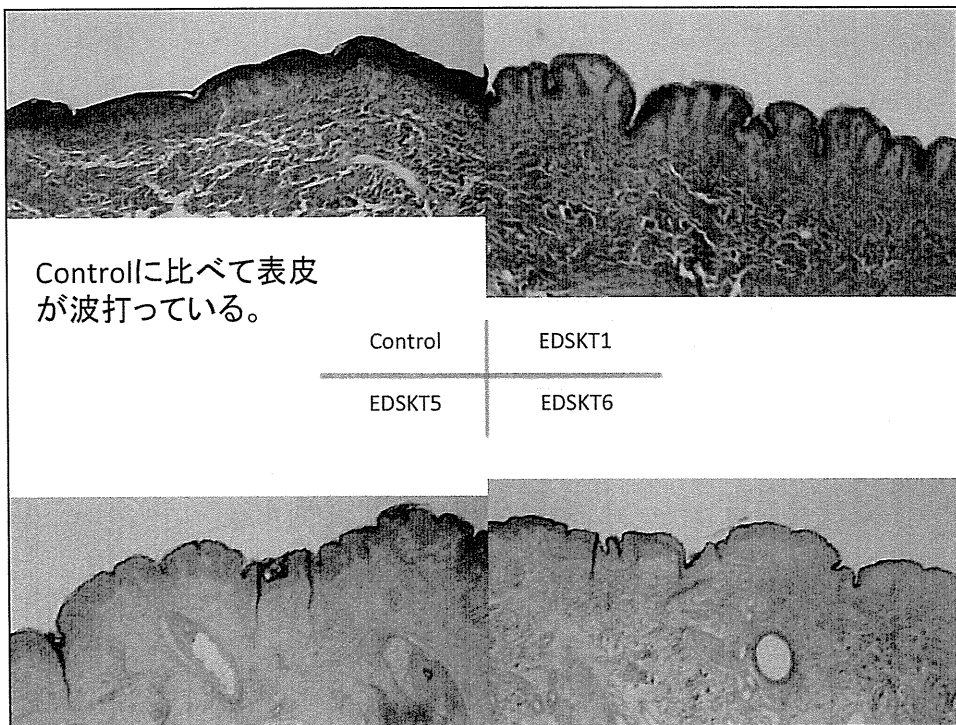
招待講演「エーラスダンロス症候群研究班」

古庄知己 遺伝性結合織病 市民公開セミナー in 大阪 (平成 23 年 12 月 10 日 於 大阪府医師協同組合 大ホール, 大阪)

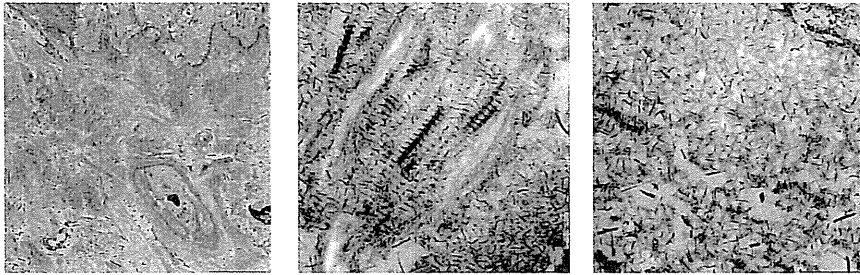
招待講演「ジストロフィン異常症児および家族への早期介入の試み」古庄知己. 第 17 回信州遺伝子診療研究会 (平成 24 年 1 月 20 日 於 信州大学医学部第 1 臨床講堂, 松本)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



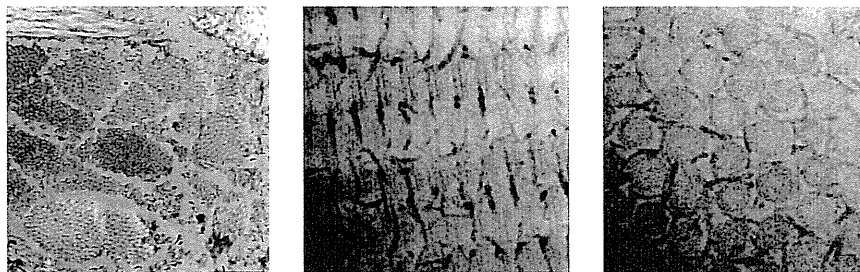
## EDSKT1 真皮表層



真皮表層はコラーゲン線維は細く、疎に配列する。

コラーゲン細線維の配列に関与するデコリンの「ひげ」は比較的長い。

## EDSKT1 真皮深層



真皮深層は、密な線維性結合組織でできている。

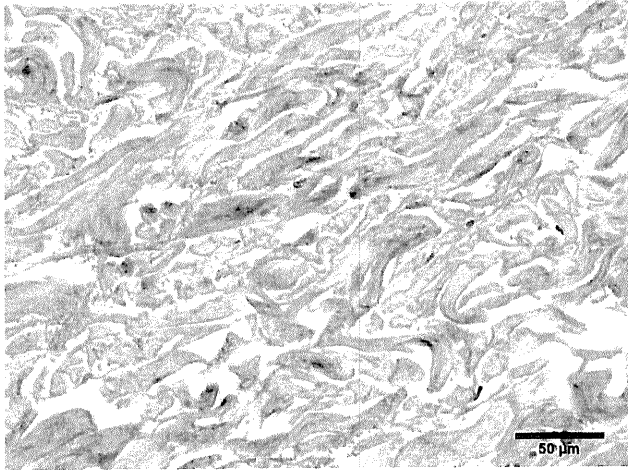
太いコラーゲン細線維の束が密な網工を形成する。

デコリンの「ひげ」は短い。

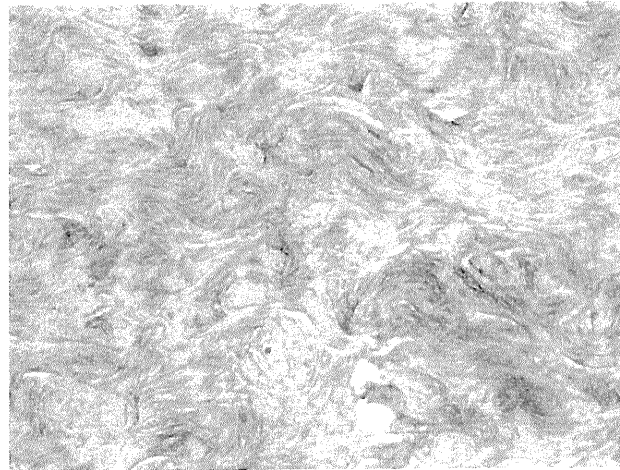
CB染色で電子染色により濃く染まったデコリンは、コラーゲンの規則的バンドパターンの特定の位置に付く。



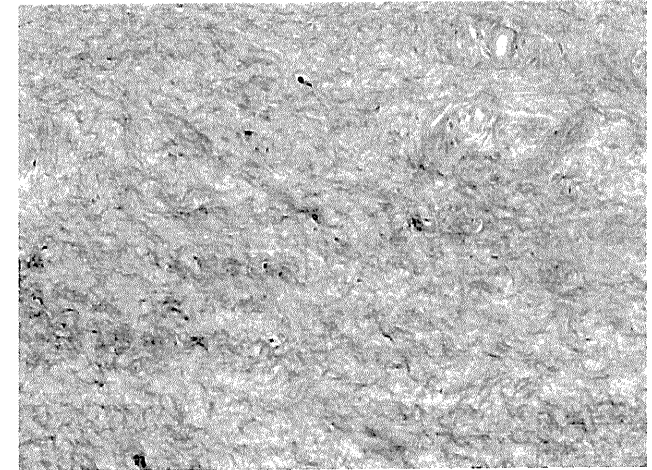
# Summary



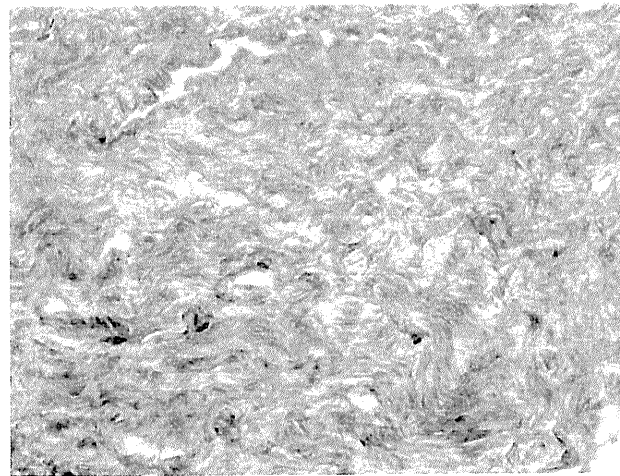
Control 14F upper arm



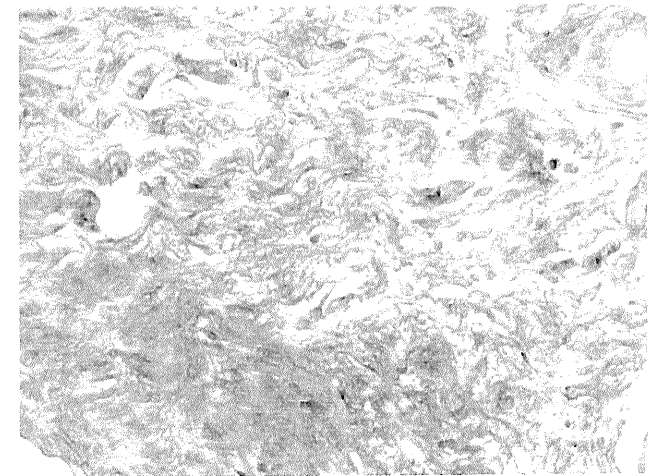
EDSKT1 16F abdomen



EDSKT5 19F upper arm



EDSKT1 18F back



EDSKT6 4F upper arm

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診療指針の確立に関する研究

研究分担者 福嶋義光、鳴海洋子、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：新型エーラスダンロス症候群（新型 EDS ; EDS, Kosho Type）は、EDS 班の活動において発見した、顔貌上の特徴、先天性多発関節拘縮、進行性の結合組織脆弱性（皮膚弛緩、関節弛緩・変形、巨大皮下血腫など）を呈する全く新しいタイプの EDS である。CHST14 遺伝子の変異に基づきデルマトタン 4-O-硫酸基転移酵素-1 (D4ST-1) の活性が低下し、その結果、デコリンに付加するグリコサミノグリカン (GAG) 鎖の組成変化（デルマトタン硫酸の消失）が生じ、デコリンが媒介するコラーゲン細線維の assembly 不全に至ることが、本症候群の進行性結合組織脆弱性の病態と考えられている (Kosho et al., *Am J Med Genet* 138A: 282-287, 2005; Kosho et al., *Am J Med Genet* 152A: 1333-1346, 2010; Miyake et al., *Hum Mutat* 31: 966-974, 2010)。本分担研究では、これまでに論文報告された症例および自験例の臨床データの集積から、本症候群の診療指針を作成した。新生児期、顔貌上の特徴および内転母指、内反足などの骨格症状から疑い、CHST14 遺伝子解析により診断を確定。診断時、スクリーニングとして先天性心疾患、眼奇形、泌尿生殖器奇形、難聴の有無を評価。乳幼児期、内反足に対する整形外科的治療、運動発達遅滞に対する理学療法、便秘に対する緩下剤投与・浣腸、男児では停留精巣の固定術。その後、整形外科（足部変形、脊椎変形）、眼科（斜視、屈折異常、緑内障）、耳鼻科（滲出性中耳炎、難聴）、泌尿器科（排尿障害、膀胱拡張）。循環器科（弁の異常、上行大動脈拡張）の定期検診。他に、外傷対策として転倒予防、巨大皮下血腫予防を目的とした DDAVP 点鼻療法。思春期以降、二次性徴の観察、（血）気胸、大腸憩室への予防・治療、皮膚過敏性があり上腕のゴム駆血また血圧測定で耐え難い苦痛を呈するので手首式血圧計を使用 (Shimizu et al., *Am J Med Genet* 155A: 1949-1958, 2011; Kosho et al., *Hum Mutat* 32: 1507-1509, 2011; 古庄知己, *信州医学誌* 59: 305-319, 2011)。また、深刻な合併症である脊椎変形に対する手術、巨大皮下血腫後の広範性皮膚壊死に対する人工真皮・自家培養皮膚線維芽細胞・自家分層網状皮膚および自家培養表皮シート移植療法を経験した。

#### A. 研究目的

新型エーラスダンロス症候群（新型 EDS ; EDS, Kosho Type）は、EDS 班の活動において発見した、顔貌上の特徴、先天性多発関節拘縮、進行性の結合組織脆弱性（皮膚弛緩、関節弛緩・変形、巨大皮下血腫など）を呈する全く新しいタイプの EDS である (Kosho et al., *Am J Med Genet* 138A: 282-287, 2005; Kosho et al., *Am J Med Genet* 152A: 1333-1346, 2010)。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。CHST14 は、デルマトタン 4-O-硫酸基転移酵素-1 (D4ST-1) をコードする遺伝子であり、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 (GAG) 鎖の組成変化（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」という病態を示した (Miyake et al., *Hum Mutat* 31: 966-974, 2010)。ほぼ同時に、D4ST-1 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)” (Dündar et al., *Am J Hum Genet* 85: 873-882, 2009)、および、後側彎型 EDS の亜型に分類されていた一部の患者 (Musculocontractural EDS ; MCEDS) (Malfait et al., *Hum Mutat* 31: 1233-1239, 2010) の原因であると報告された。そして、ATCS の発見グループからは、本症は「dermatan sulfate-deficient ATCS」と命名すべきで



あり、EDS との分類は不適切であるとの主張が展開された。その根拠は、本症においては先天性多発関節拘縮、顔貌上の特徴、口唇口蓋裂、腸・腎の異常、筋緊張低下など通常 EDS には見られない症状があること、分子病態が EDS とは異なることであった (Janecke et al., Hum Mutat 32: 484-485, 2011)。

平成 21-22 年度 EDS 班の活動において、新たに見出した EDSKT の 2 症例と既報告の EDSKT、ATCS、MCEDS 合計 20 症例の臨床像を包括的かつ詳細に分析し、これらが D4ST-1 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 の新病型と結論付けた (Shimizu et al., Am J Med Genet 155A: 1949-1958, 2011)。

本分担研究の目的は、これまでに論文報告された症例および自験例の臨床データの集積から本症候群の診療指針を作成することである。

## B. 研究方法

これまでに ATCS、EDSKT、および MCEDS として論文報告されてきた 14 家系 22 人、in press の 3 家系 4 人、および未発表 7 家系 8 人を合わせた 24 家系 34 人 (うち 16 家系 18 人が本邦で発見された) の合併症、治療状況を論文または自験例では診療録をもとに調査し、診療指針の作成を目指した。

この間、EDSKT の 1 症例が進行性後側彎症の手術を行った。また同一症例が交通外傷後に下肢の巨大皮下血腫を呈し、それに伴う重症広範性皮膚壊死に陥り、これらを治療する経験をした。これらの経過をまとめた。

なお、本研究は、「D4ST1 欠損症 (エーラスダンロス症候群、古庄型) の遺伝子解析 (受付番号 304)」、「重症出血症状を呈するエーラスダンロス症候群に対する DDAVP 点鼻療法 (受付番号 1186)」、「エーラスダンロス症候群 (古庄型) 患者における重症広範性皮膚壊死に対する人工真皮・自家培養皮膚線維芽細胞・自家分層網状皮膚および自家培養表皮シート移植療法 (受付番号 1751)」として、信州大学医学部医の倫理委員会

の承認を得て行われた。

## C. 研究結果

臨床症状のまとめを資料 1 に示す。これに基づき、以下診療指針 (案) を作成した。

### <新型 EDS (EDS, Kosho Type) の診療指針>

診断	<p>新生児期、顔貌上の特徴 (大きい大泉門、眼間開離、小さく、眼瞼裂斜下、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、薄い上口唇、小さい口、小さく後退した下顎)、骨格症状 (内転母指、内反足を含む多発関節拘縮) で疑い、CHST14 遺伝子解析を行う。</p> <p>診断時のスクリーニングとして、先天性心疾患、眼奇形、泌尿生殖器奇形、難聴の有無を評価する。</p>
乳幼児期	<p>内反足に対する整形外科的治療 (装具、手術)、運動発達遅滞に対する理学療法を行う。</p> <p>便秘に対して緩下剤投与、浣腸を行う。</p> <p>男児では停留精巣に対する固定術を行う。</p>
定期検診	<p>整形外科：足部変形、脊椎変形。</p> <p>眼科：斜視、屈折異常、緑内障。</p> <p>耳鼻科：滲出性中耳炎、難聴。</p> <p>泌尿器科：排尿障害、膀胱拡張。</p> <p>循環器科：弁の異常 (MVP などあれば、感染性心内膜炎の予防)、上行大動脈拡張。</p>
外傷対策	<p>転倒などの外傷により、皮膚裂傷、関節脱臼を生じやすい。</p> <p>巨大皮下血腫については、DDAVP 点鼻療法 (STIMATE™) が有効。</p>
思春期以降	<p>二次性徴の観察 (女性では乳房発育不全、男性では性腺機能低下の可能性)。</p> <p>(血) 気胸、憩室穿孔に対する治療。</p>

その他	皮膚の過敏性のため、採血時のゴム駆血、上腕での血圧測定が著しい苦痛を伴うので、配慮する（幅広いゴムや徒手的駆血、手首式血圧計）。
-----	------------------------------------------------------------------

(Shimizu et al., *Am J Med Genet* 155A: 1949-1958, 2011; Kosho et al., *Hum Mutat* 32: 1507-1509, 2011; 古庄知己, *信州医学誌* 59: 305-319, 2011)

本症患者において2症例目の脊椎手術（進行性後側彎症に対する後方固定術）を経験した。椎骨は予想以上に硬度があり、予定どおりの処置ができた（資料1）が、皮膚弛緩のため動脈ラインが体位変換に伴い、抜けてしまい、巨大皮下血腫を形成した。DDAVP点鼻で血腫の急速な増大を予防することができた。術後4か月、別な合併症に対する手術中の圧迫で脊椎のロッド部に褥瘡ができ、ロッドを1本抜去することになった。

本症患者における下肢全体にわたる広範性皮膚壊死の治療を経験した。交通外傷後に股関節脱臼を来し、その修復後、左下肢全体に皮下血腫を形成し、虚血性の壊死に至った。これに対し、まず人工真皮・自家培養皮膚線維芽細胞移植を行い、二期的に自家分層網状皮膚および自家培養表皮シート（ジェイス™）移植を行った。その後、自家分層網状皮膚を追加し、受傷から8か月で退院となった（資料1）。

#### D. 考察

本症候群は、皮膚・関節の過伸展性、各種組織の脆弱性というEDSの中核症状を有することから、先天性多発関節拘縮症（arthrogryposis syndrome）ではなく、EDSとの分類が妥当と考えられた。病因論的にも、進行性の結合組織脆弱性に関しては「D4ST1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」といったコラーゲンの生合成異常と位置づけられ、EDSとの分類が妥当と考えられた。以上から、我々は「D4ST1-deficient EDS (DD-EDS)」との疾患名を提案している(Kosho et al., *Hum Mutat* 32: 1507-1509, 2011; 古庄知己, *信州医学誌* 59: 305-319, 2011)。

続々と新規症例が見出されており、比較的頻度の高い病型であることが明らかになってきた。EDS

班のこれまでの検討から、診療指針の骨格を構築することができた。また、今回、進行性後側彎症、巨大皮下血腫後の広範性皮膚壊死というきわめて深刻な合併症に対する治療経験を行うことができた。脊椎固定手術それ自体は、椎骨の硬度が十分であったことから予想よりも順調に行われたが、術中の動脈ラインもれによる巨大皮下血腫や術後の褥瘡といった周辺の問題がより重大であり、注意が必要と考えられた。広範性皮膚壊死に対しては、保存的治療では罹患脚切断を避けられず、また感染による生命の危機でもあったため、準備しうる最善の治療を行った（人工真皮・自家培養皮膚線維芽細胞移植、自家分層網状皮膚および自家培養表皮シート（ジェイス™）移植、自家分層網状皮膚）。結果として救命でき、脚切断も回避できたので、一定の効果はあったと考えられる。今回のエピソードはあらためて、本症における巨大皮下血腫の重大さ、予防対策の重要性を示すものであった。愛護的対応をすることは言うまでもないが、DDAVP点鼻による予防対策（輸入製剤であり、高額の患者負担を強い）を全ての患者が受けられるようにすることが急務であると考えられた。DDAVPは、軽症の血友病A、von Willebrand's病において欧米で使用されており、凝固因子の放出を促すことによる止血効果が期待されているが、本症における止血効果は明らかに早期で劇的であり、異なる治療病態が推測された。例えば、動脈破裂後の血管収縮不全が大出血を来すとした場合、DDAVPによる血管収縮効果が初期効果として機能している可能性が考えられた。

#### E. 結論

新型EDSの診療情報を詳細に検討し、新生児期の診断に始まる縦断的な診療指針を作成した。また、深刻な合併症である脊椎変形に対する手術、巨大皮下血腫後の広範性皮膚壊死に対する人工真皮・自家培養皮膚線維芽細胞・自家分層網状皮膚および自家培養表皮シート移植療法を経験した。

#### F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Omori H, **Hatamochi A**, Koike M, Sato Y, **Kosho T**, Kitakado Y, Oe T, Mukai T, Hari Y, Takahashi Y, Takubo K. Sigmoid colon perforation induced by the vascular type of Ehlers-Danlos syndrome: report of a case. *Surg Today*. 2011 May;41(5):733-6.

Shimizu K, Okamoto N, **Miyake N**, Taira K, Sato Y, Matsuda K, Akimaru N, Ohashi H, Wakui K, **Fukushima Y**, **Matsumoto N**, **Kosho T** (equal contribution, corresponding author). Delineation of Dermatan 4-O-sulfotransferase 1 Deficient Ehlers-Danlos Syndrome: Observation of Two Additional Patients and Comprehensive Review of 20 Reported Patients. *Am J Med Genet Part A*. 2011 Aug;155A(8):1949-58.

Wakabayashi Y, Yamazaki K, **Narumi Y**, Fuseya S, Horigome M, Wakui K, **Fukushima Y**, Matsubara Y, Aoki Y, **Kosho T** (corresponding author). Implantable Cardioverter Defibrillator for Progressive Hypertrophic Cardiomyopathy in a Patient with LEOPARD Syndrome and a Novel *PTPN11* Mutation Gln510His. *Am J Med Genet Part A*. 2011 Oct;155A(10):2529-33.

**Kosho T (corresponding author)**, **Miyake N**, Mizumoto S, **Hatamochi A**, **Fukushima Y**, Yamada S, Sugahara K, **Matsumoto N**. A response to: loss of dermatan-4-sulfotransferase 1 (D4ST1/CHST14) function represents the first dermatan sulfate biosynthesis defect, "dermatan sulfate-deficient Adducted Thumb-Clubfoot Syndrome". Which name

is appropriate, "Adducted Thumb-Clubfoot Syndrome" or "Ehlers-Danlos syndrome"? *Hum Mutat*. 2011 Dec;32(12):1507-9.

Saitsu H, Igarashi N, Kato M, Okada I, **Kosho T**, Shimokawa O, Sasaki Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, **Miyake N**, Harada N, Hayasaka K, **Matsumoto N**. De novo 5q14.3 translocation 121.5-kb upstream of MEF2C in a patient with severe intellectual disability and early-onset epileptic encephalopathy. *Am J Med Genet A*. 2011 Nov;155A(11):2879-84.

Narumi Y, Shiohara M, Wakui K, Hama A, Kojima S, Yoshikawa K, Amano Y, **Kosho T**, Fukushima Y. Myelodysplastic syndrome in a child with 15q24 deletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2012 Feb;158A(2):412-6.

古庄知己. デルマタン 4-O-硫酸基転移酵素-1 欠損に基づく新型エーラスダンロス症候群の発見と疾患概念の確立. *信州医学雑誌* 59(5) : 305-319, 2011.

古庄知己. Ehlers-Danlos 症候群の臨床・疫学. 特集「Weak connective tissue disease の肺病変」*日本胸部臨床* 70 巻 4 号 : 329-337, 2011 (4 月)

古庄知己. 保因者診断とその進め方. *遺伝子医学 MOOK 別冊「遺伝カウンセリングハンドブック」* (編集: 福嶋義光, 編集協力: 山内泰子, 安藤記子, 四元淳子, 河村理恵), *メディカルドゥー* (大阪), 70-71, 2011. 7 月.

古庄知己. 検査実施の妥当性 (カンファレンスと倫理委員会). *遺伝子医学 MOOK 別冊「遺*

伝カウンセリングハンドブック」(編集：福嶋義光，編集協力：山内泰子，安藤記子，四元淳子，河村理恵)，メディカルドゥー(大阪)，162-163，2011. 7月.

古庄知己. 健康管理(遺伝カウンセリングから地域の医療や福祉へ). 遺伝子医学 MOOK 別冊「遺伝カウンセリングハンドブック」(編集：福嶋義光，編集協力：山内泰子，安藤記子，四元淳子，河村理恵)，メディカルドゥー(大阪)，204-205，2011. 7月.

古庄知己. 遺伝カウンセリング. 周産期医学必修知識第7版，『周産期医学』編集委員会編，41巻増刊号，971-972，2011.

古庄知己. 18トリソミー症候群. 今日の小児治療指針15版(総編集：大関武彦，古川漸，横田俊一郎，水口雅)，医学書院(東京)，180-181，2012(2月)

古庄知己. Ehlers-Danlos 症候群. 今日の小児治療指針15版(総編集：大関武彦，古川漸，横田俊一郎，水口雅)，医学書院(東京)，186，2012(2月)

## 2. 学会発表

古庄知己<sup>1)</sup>、三宅紀子<sup>2)</sup>、水本秀二<sup>3)</sup>、籠持淳<sup>4)</sup>、高橋淳<sup>5)</sup>、鳴海洋子<sup>1)</sup>、福嶋義光<sup>1)</sup>、菅原一幸<sup>3)</sup>、松本直通<sup>2)</sup>. 1) 信州大学医学部附属病院遺伝子診療部 2) 横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学 3) 北海道大学大学院先端生命科学研究所・生命科学院・生命情報分子科学コース・細胞膜分子科学分野プロテオグリカンシグナリング医療応用研究室 4) 獨協医科大学皮膚科 5) 信州大学医学部運動機能学講座. デルマタン 4-O 硫酸基転移酵素欠損に基づく新型エーラスダンロス症候群. 第3回

日本小児科学会長野地方会(平成23年6月5日 於 長野県佐久勤労者福祉センター，佐久)

古庄知己、鳴海洋子、関島良樹、福嶋義光、水内麻子、山下浩美、玉井真理子、櫻井晃洋(信州大学医学部附属病院遺伝子診療部)、渡邊淳(日本医科大学付属病院 遺伝診療科・ゲノム先端医療部). 下肢の痙性で発症、広汎性発達障害を伴い急速進行性の経過をたどる重症関節型エーラスダンロス症候群. 第35回日本遺伝カウンセリング学会(遺伝医学合同学術集会)(平成23年6月16-19 於 京都大学、京都)

古庄知己<sup>1)</sup>、鳴海洋子<sup>1)</sup>、三宅紀子<sup>2)</sup>、関島良樹<sup>1)</sup>、渡邊淳<sup>3)</sup>、松本直通<sup>2)</sup>、福嶋義光<sup>1)</sup>. 1) 信州大学医学部附属病院 遺伝子診療部、2) 横浜市立大学大学院医学研究科 遺伝学、3) 日本医科大学付属病院 遺伝診療科・ゲノム先端医療部. 下肢の痙性で発症、発達障害を伴い急速進行性の経過をたどる重症関節型エーラスダンロス症候群. 第34回日本小児遺伝学会学術集会(平成23年8月11日 於 パシフィコ横浜、横浜)

古庄知己<sup>1)</sup> 水内麻子<sup>1)</sup> 鳴海洋子<sup>1)</sup> 玉井真理子<sup>1)</sup> 山下浩美<sup>1)</sup> 涌井敬子<sup>1)</sup> 高津亜希子<sup>2)</sup> 田中恭子<sup>2)</sup> 菊地範彦<sup>2)</sup> 大平哲史<sup>2)</sup> 岡賢二<sup>2)</sup> 塩沢丹里<sup>2)</sup> 金井誠<sup>3)</sup> 福嶋義光<sup>1)</sup>. 1) 信州大学医学部附属病院遺伝子診療部，2) 産科婦人科学，3) 保健学科小児・母性看護学. 出生前遺伝カウンセリングを起点とする遺伝性疾患のフォローアップ. 第13回遺伝性疾患に関する甲信越・北陸出生前診断研究会(平成23年10月1日 於 信州大学医学部附属病院遺伝子診療部、松本)

古庄知己<sup>1,2)</sup>、鳴海洋子<sup>1,2)</sup>、関島良樹<sup>1)</sup>、坂本明