

201128137B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

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

平成22年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者 古庄 知己

平成24（2012）年 5月

目 次

I. 総合研究報告	1
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 古庄知己（信州大学医学部附属病院遺伝子診療部）	
・(資料1) 古庄知己 講演実施報告書「エーラスダンロス症候群 基本から最先端まで！」遺伝性結合組織病 市民公開セミナー 大阪 『～エーラス・ダンロス症候群、マルファン症候群、ロイス・ディーツ症候群をご存じですか？～「いま・これから」をご一緒に考えましょう』（於 大阪府医師協同組合大ホール、平成23年12月10日）	
・(資料2) 古庄知己 日本人類遺伝学会奨励賞受賞講演記録「デルマタン4-O-硫酸基転移酵素(D4ST-1)欠損による新型Ehlers-Danlos症候群の発見と疾患概念の確立」日本人類遺伝学会第56回大会（於 幕張メッセ、平成23年11月11日）	
・(資料3) 古庄知己 第35回日本小児遺伝学会学術集会「D4ST1欠損に基づくEhlers-Danlos症候群の診断基準および健康管理指針の構築」（於 久留米大学筑水会館、平成24年4月19日）	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	111
III. 研究成果の刊行物・別刷	117

I. 総合研究報告

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

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。全病型を合わせた推定頻度は約 1/5000 人とされている。EDS は、特定疾患調査研究指定でないことから、これまで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）は全くわかっていない。そのため、診療現場での認知度はきわめて低く、病型に合った適切な診療指針も確立されていない。

本研究班では、血管型 EDS および新型 EDS (EDS, Kosho Type ; EDSKT) を中心に臨床的、基礎的研究を行ってきた。血管型 EDS は、Ⅲ型コラーゲン (*COL3A1*) 遺伝子変異に基づき、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診療上重要な疾患である。しかしながら、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は確立しておらず、診療上の大きい問題となっている。新型 EDS (EDS, Kosho Type ; EDSKT) 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。

本研究の目的は以下のとおりである。

- (1) 血管型 EDS：本邦初の診療に関する実態調査と遺伝子解析を行うことにより、その診療実態を把握し、診療指針を構築すること。従来の皮膚線維芽細胞～mRNA ベースの遺伝子解析よりも非侵襲的で精度の高い解析法を開発すること。
- (2) 新型 EDS：原因遺伝子単離、病態解明、臨床データの収集に基づき疾患概念を確立すること、それにより診療指針の構築すること。
- (3) その他の病型：症例の収集、自然歴および診療実態を調査し、診療指針の構築すること。新たな病型を発見すること。

(1) 血管型 EDS：研究代表者、分担者（籾持淳博士、森崎裕子博士、渡邊淳博士、福嶋義光博士）で協力し、本邦初の診療に関する実態調査を実施した。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 として論文発表した（古庄ら、*遺伝カウンセリング学会雑誌* 31:157-161, 2010）。また、一部の症例においては臨床症状と遺伝子変異との関係をまとめ、国際誌に報告した（Shimaoka et al., *Br J Dermatol* 163:704-710, 2010）。平成23年度までに58家系66人が確定診断された。初発症状の出現年齢は平均22.6歳（14-43歳）であり、呼吸器系が最も多かった。合併症の頻度は動脈系62%、呼吸器系47%、消化器系24%であった。*COL3A1* 変異は、ミスセンス変異45%、スプライス変異45%であった。診療上最も重要な動脈合併症に関して、最近心臓選択的なβ遮断作用および血管拡張をもたらすβ刺激作薬“celiprolol”の有用性を示す世界初のラ

ンダム化比較試験の結果が報告された (Ong et al., *Lancet* 2010; 376: 1476-84.) ことを受けて、動脈合併症の治療に関する二次調査を行った。情報を収集しえた 28 人中、celiprolol を使用していたのはわずか 2 人であり、本治療法の本邦での認知度の低さがうかがえた。14 人が侵襲的治療を受けており、大動脈分枝に対する手術および血管内治療 (塞栓術)、大動脈や腸骨動脈のステント術は問題なく実施されていた。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。本法は、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。NMD を来す COL3A1 遺伝子変異家系においては、従来のグリシン変異、スプライシング変異とは異なり、患者の重症度は様々であることが示された (重症度は COL3A1 タンパク量と相関する可能性がある、60 歳を超える未発症者もいる) (Banyar et al., *Biochem Biophys Res Commun* 405:368-372, 2011)。以上から、本症候群の診療指針を次のように提案した: 従来の培養皮膚線維芽細胞を用いた生化学分析および mRNA を用いた直接シーケンス法に加えて、ゲノム DNA を用いた hrMCA 法を含めた解析法を駆使して早期生化学または遺伝子診断をした後、血管病変スクリーニングを行い、celiprolol 投与による動脈合併症の予防を行う。ハイリスク動脈病変に対しては、血管内治療の可能性を探り、血管内治療では対応できない進行性病変に対しては、慎重に手術を行う。

(2) 新型 EDS (EDS, Kosho Type ; EDSKT) : 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)。研究分担者 (三宅紀子博士、松本直通博士) は、両親が血族結婚であった 2 症例から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)。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)。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)。これに対し研究代表者は、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)。さらに、研究代表者は、皮膚・関節の過伸展性、各種組織の脆弱性という EDS の中核症状を持つことから、多発関節拘縮症というカテゴリーより、臨床的に EDS とのカテゴリーの方が妥当であること、病因論的にも、進行性の結合組織脆弱性に関しては、デコリンを介するコラーゲンの生合成異常と位置づけられることにより EDS との分類が妥当であることを強調、「D4ST-1-deficient EDS (DD-EDS)」との疾患名を提案した (Kosho et al., *Hum Mutat* 32: 1507-1509, 2011)。確定診断例は、これまでに論文報告された症例および自験例を含め 24 家系 34 人となり (うち本邦患者は 16 家系 18 人)、研究代表者、分担者 (福嶋義光博士、鳴海洋子博士) らは、臨床データの集積から、本症候群の診療指針は次のように提案した: 新生児期、特徴的顔貌と骨格症状から疑い CHST14 遺伝子解析により確定診断する。乳幼児期、内反足などに対する整形外科治療や運動発達遅滞に対する理学療法などを考慮する。その後、眼科、耳鼻科、泌尿器科、循環器科を含めた包括的な健康管理を行うとともに、巨大皮下血腫に対する DDAVP 点鼻療法などの外傷予防対策を行う

(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)。重度進行性の脊椎変形に対する手術を行う場合には、巨大皮下血腫の予防を含めた入念な準備が必要である。また、巨大皮下血腫後には広範性皮膚壊死を呈する危険性があり、この場合には、人工真皮、自家培養皮膚線維芽細胞、自家分層網状皮膚、自家培養表皮シート移植療法など様々な形成外科的治療を駆使する必要がある。さらなる病態解明につながる基礎的検討を行い、患者尿中のDSが消失していること、デコリン染色が患者と健康人では有意な違いがあることを世界で初めて明らかにした。さらに、将来の根治療法の開発へ向けた疾患モデルの構築のため、iPS細胞を樹立し、ノックアウトマウスの作製に着手した。

(3) その他の病型：研究代表者、分担者（簗持淳博士、鳴海洋子博士）により、古典型、関節型、血管型以外のまれな病型および新規病型の抽出を行った。結果、多発関節弛緩型の本邦1、2家系目を見出し、また分類不能症例を見出した。皮膚・関節の過伸展性、組織脆弱性といったEDSの主要徴候を持つが、既知の大病型その他の病型には該当しない症例が少なくないことが明らかになってきた。今後、こうした症例の蓄積を通じて、新規病型の発見、原因遺伝子の探索を行っていく計画である。

研究分担者・協力者

平成22年度

<研究分担者>

福嶋義光（信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座・教授）
簗持淳（獨協医科大学皮膚科・教授）
渡邊淳（日本医科大学附属病院遺伝診療科・第二生化学・講師）
松本直通（横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学・教授）
森崎裕子（国立循環器病研究センター研究所分子生物学部・室長）
三宅紀子（横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学・准教授）
鳴海 洋子（信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座・助教）

<研究協力者>

菅原一幸（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・教授）
林周次郎（獨協医科大学皮膚科・大学院生）

平成23年度

<研究分担者>

福嶋義光（信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座・教授）
簗持淳（獨協医科大学皮膚科・教授）
渡邊淳（日本医科大学附属病院遺伝診療科・生化学・分子生物学・准教授）
松本直通（横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学・教授）

森崎裕子（国立循環器病研究センター研究所分子生物学部・室長）

三宅紀子（横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学・准教授）

鳴海 洋子（信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座・助教）

<研究協力者>

菅原一幸（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・教授）

野村義宏（東京農工大学農学部硬蛋白質利用研究施設・准教授）

小林身哉（金城学院大学生活環境学部食環境栄養学科・教授）

江良拓実（熊本大学発生医学研究所幹細胞誘導分野・教授）

林周次郎（獨協医科大学皮膚科・助教）

A. 研究目的

Ehlers-Danlos 症候群 (EDS)は、皮膚の過伸展性、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

(表 1、2)。全病型を合わせた推定頻度は約 1/5000 人とされている。EDS は、特定疾患調査研究指定でないことから、これまで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)は全くわかっていない。そのため、診療現場での認知度はきわめて低く、病型に合った適切な診療指針も確立されていない。

血管型 EDS は、型コラーゲン (*COL3A1*) 遺伝子のヘテロ接合性変異に基づき、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常染色体優性遺伝疾患であるが、合併症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を含めた包括的診療指針は確立していない。そのため、経験のある施設とない施設での医療格差は甚大であり、大きい診療上の問題となっている。その原因として、治療や予防的介入の効果を含めた詳細な自然歴が乏しいことがあげられる。最近、欧州のグループから、血管拡張作用を有するβ遮断薬 celiprolol が本症の動脈合併症に対して予防効果を持つとのランダム化比較試験の結果が報告され (*Ong et al., Lancet 376: 1476-1484, 2010*)、本症は正確な診断に基づき積極的予防対策をとるべき疾患へとシフトする重大な局面を迎えており、症例の蓄積に基づく診療指針の確立が急務である。

本症の 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る。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 を用いて行われたが、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という患者への負担や技術的な困難さ、さらに、nonsense mediated mRNA decay (NMD) を来すナンセンス変異、欠失変異を検出できないという問題点も指摘され、より非侵襲的で網羅的な解析法の開発が求められている。

新型 EDS (EDS, Kosho Type ; EDSKT) は、研究代表者が、後側彎型に類似した臨床症状に、特徴的な顔貌および骨格徴候を伴い、後側彎型の原因である lysyl hydroxylase の欠損が見出されない 2 患者を見出し、後側彎型の亜型として報告したものである (*Kosho et al., Am J Med Genet 138A: 282-287, 2005*)。その後、同様の症状を呈する 4 患者を見出し、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*)。本病型は、進行性で重度の皮膚・関節・血管脆弱性を呈し、患者・家族の負担がきわめて大きい重症型であり、その臨床的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、薄い上口唇、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、病態解明へ向け関連遺伝子解析を行ったが、原因遺伝子を同定することができなかった。

平成 22-23 年度 EDS 班の研究目的は以下のとおりである。

(1) 血管型 EDS

- ① 診療実態の概要調査：平成 22 年度、国内で生化学分析および遺伝子解析を行っている 3 施設において、これまでに確定診断された全患者の診療実態に関する情報を収集しまとめる。平成 23 年度、新規確定診断患者の収集を継続し、診療実態の概要をまとめる。
- ② 動脈合併症に関する二次調査：celiprolol の有用性に関する報告 (*Ong et al., Lancet 376: 1476-1484, 2010*) を受け、平成 23 年度、動脈合併症に関する二次調査を行い、確定診断患者がどのような治療を受け、その効果はどうであったかをまとめる。その上で、動脈合併症に関する診療指針を提案する。
- ③ 新しい遺伝子解析法の開発：平成 22-23 年度を通して、従来の皮膚線維芽細胞～mRNA ベースの遺伝子解析よりも非侵襲的で精度の高いゲノム DNA ベースの遺伝子解析法を開発

する。

(2) 新型 EDS (EDS, Kosho Type ; EDSKT)

- ① 原因遺伝子を単離し、病態を解明する。
- ② 遺伝子解析に基づき患者を収集し、臨床データの集積による疾患概念および自然歴を確立し、診療指針を提案する。
- ③ 将来の根治療法に向けて、疾患モデルを作製する。

(3) その他の病型

稀な病型の患者を収集する。既存の病型にあてはまらない患者の収集し、新たな病型を探索する。

B. 研究方法

血管型 EDS

診療実態の概要調査

<患者収集>

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（籾持淳教授、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。生化学分析は、患者皮膚の生検により得られた皮膚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後、フィルムに感光してI型、III型コラーゲンを解析した。遺伝子解析は、培養皮膚線維芽細胞由来の mRNA を用いて COL3A1 の RT-PCR およびダイレクトシーケンスを行った (Shimaoka et al., *Br J Dermatol* 163:704-710, 2010 ; 古庄知己ら, *日本遺伝カウンセリング学会誌* 31:157-161, 2010)。

<実態調査>

確定診断患者の概要調査：平成 22 年度、これら 3 施設がこれまで確定診断した全患者の抽出を行い、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）において診療実態の概要を分析した。平成 23 年度、新規患者

を加え、改めて分析を行った。

動脈合併症に関する二次調査

確定診断された患者の担当医に対し、動脈合併症の治療状況に関する調査票（文書 1、文書 2）を送付し、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）において集計、分析した。

新たな遺伝子解析法の開発

より非侵襲的かつ効率的な遺伝子解析法を追求するため、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）を中心に、hrMCA 法による検討を行った (Banyar et al., *Biochem Biophys Res Commun* 405:368-372, 2011)。

平成 22 年度、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 を疑われた患者の末梢血由来ゲノム DNA を用いて、本法による COL3A1 遺伝子変異スクリーニングについて検討した (Banyar et al., *Biochem Biophys Res Commun* 405:368-372, 2011)。

平成 23 年度、臨床的に血管型 EDS、Marfan 症候群（類縁疾患）など結合組織脆弱性疾患が疑われる新規患者に対して、末梢血由来ゲノム DNA を用いた hmMCA 解析と培養皮膚線維芽細胞由来 mRNA を用いた RT-PCR-ダイレクトシーケンス法とを併用し、有効であった。患者は 35 歳男性、腸骨動脈破裂、難治性気胸の既往あり、父が 33 歳時に、兄が 15 歳時に突然死している。本患者の解析状況について検討した。

新型 EDS (EDS, Kosho Type)

原因遺伝子の単離、病態解明

<原因遺伝子単離>

平成 22 年度、両親が血族婚であった 2 家系に於いて、ホモ接合性マッピングを行って責任遺伝子座を限局し、さらに情報性の高いマイクロサテライトマーカ解析を追加し責任領域を狭めた。特定された責任遺伝子座内に局在する候補遺伝子

群の変異スクリーニングを行った。

<病態説明>

責任遺伝子 *CHST14* が同定された後は、*CHST14* のコードするデルマタン 4-O-硫酸基転移酵素-1 (D4ST-1) の機能解析を行い変異のもたらし影響を調査した。

糖鎖 (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所・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。

平成 22 年度、患者培養皮膚線維芽細胞を用いた D4ST-1 酵素活性測定を行った。また、同細胞における conditioned medium 中のデルマタン硫酸 (dermatan sulfate ; DS) とコンドロイチン硫酸 (chondroitin sulfate ; CS) の分析を、コンドロイチナーゼ AC、B による消化および陰イオン交換 HPLC により行った。

次に、DS を含有する代表的プロテオグリカン (proteoglycan ; 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。デコリングリコサミノグリカン (glycosaminoglycan ; GAG) 鎖における CS/DS 分析を、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 により行った。

平成 23 年度、新規患者において上記分析を継続した。さらに、5 人の患者由来の尿の CS/DS 分析を、コンドロイチナーゼ ABC、AC、B による消化および陰イオン交換 HPLC により行った。

病理学的分析

研究分担者の籾持淳教授 (獨協医科大学皮膚科) の研究室、研究協力者の小林身哉教授 (金城学院大学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所・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。

平成 22 年度

光顕分析 : 2 患者と 1 健康人由来の皮膚組織を用いて、HE 染色による観察を行った (Miyake et al., *Hum Mutat* 31: 966-974, 2010)。

電顕分析 : 2 患者と 1 健康人由来の皮膚組織を用いて、電顕標本を作製、透過型電子顕微鏡 (JEM-1011, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) にて観察した (Miyake et al., *Hum Mutat* 31: 966-974, 2010)。

平成 23 年度

光顕分析 : 3 患者と 1 健康人由来の皮膚組織を用いて、AZAN 染色による観察を行った。

電顕分析 (Cupromeronic blue 染色) : 1 患者と別型の EDS 患者の皮膚組織を用いて、Cupromeronic blue 染色によるコラーゲン GAG 鎖の観察を行った。

抗デコリン抗体を用いた免疫組織化学分析 : 4 患者と 1 健康人の皮膚組織を用いて、抗ヒト・デコリン抗体 (マウスモノクローナル抗体) による免疫組織学的観察を行った。1 患者の皮膚組織を用いて、同抗体による免疫電顕観察を行った。

発現解析

4 患者と 2 健康人由来の培養皮膚線維芽細胞を用いて、マイクロアレイ (Illumina Human HT-12 ver.4) による発現解析を行った。

疾患概念、自然歴、診療指針の構築

<疾患概念の構築>

平成 22 年度

責任遺伝子 *CHST14* の同定後、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 (Shimizu et al., *Am J Med Genet* 155A: 1949-1958, 2011)。

平成 23 年度

<*CHST14* 遺伝子解析に基づく患者収集>

臨床症状から疑われる患者から、適切なインフォームドコンセントを取得後、末梢血を採取、DNA を抽出した。*CHST14* 遺伝子のタンパク質翻訳領

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を行った。解析は、横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学（松本直通教授、三宅紀子准教授、研究分担者）において行われた。

<診療指針の構築>

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）を中心に、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。周術期における巨大皮下血腫の予防と治療において、DDAVP（デスマプレッシン）点鼻療法が実施され、その有用性を検討した。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った。これに対し、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（ジェイス™）による治療を試み、その有用性を検討した。

疾患モデルの作製

<iPS 細胞の樹立>

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、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、*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。

<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。

その他の病型

EDS および類縁結合組織疾患患者が多く受診する信州大学医学部附属病院遺伝子診療部、獨協医科大学皮膚科を中心に症例の収集を行った。

後側彎症例の収集においては、尿中の lysylpyridinoline/hydroxylysylpyridinoline 比によるスクリーニングを行った。

多発関節弛緩型症例の収集においては、培養皮膚線維芽細胞を用いた I 型コラーゲン生化学分析によるスクリーニングを行った。

倫理面への配慮

遺伝子解析研究としての配慮

(1) 血管型 EDS の確定診断としての生化学分析および遺伝子解析、そして、(2) 新型 EDS の遺伝子解析および病態解析を含む。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（受付番号 304）」として信州大学医学部医倫理委員会の承認を得ている。また、遺伝子解析を実施する共同研究施設においても、倫理委員会の承認を得ている。新たに遺伝子解析を行う患者・家族に対しては、研究代表者・分担者またはそのガイダンスを受けた患者主治医により、患者・家族に十分な説明を行い、同意を得ることを原則とした。また、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。

臨床研究としての配慮

臨床研究に関する倫理指針（厚生労働省）などを遵守する必要があり、研究代表者は、平成 21 年、「血管型エーラスダンロス症候群の実態把握および治療指針の確立（受付番号 1350）」との課題名で、信州大学医学部医倫理委員会の承認を得た。

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。

診療研究としての配慮

新型 EDS における巨大皮下血腫への治療として
の DDAVP 点鼻薬は輸入製品であり、「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)」として信州大
学医学部医倫理委員会の承認を得た。また、同症
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は世界初の
試みであり (自家培養表皮シートは保険外使用)、
「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
て同倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

血管型 EDS

診療実態の概要調査

平成 22 年度

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。

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 (平均値 21.9 歳、中央
値は 20 歳) であった。

動脈系合併症は 26 人 (63%) に認められた。動脈
瘤は 17 人に、解離は 13 人に、破裂は 11 人に認
められた。また、頸動脈海綿静脈洞瘻が 5 人に認
められた

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。

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。

以上の一次調査の結果をまとめ、preliminary
data として論文発表することができた (表 3)

(古庄知己ら、日本遺伝カウンセリング学会誌
31:157-161, 2010)。また、一部の症例におい
ては臨床症状と遺伝子変異との関係をまとめ、国際
誌に報告した (Shimaoka et al., Br J Dermatol
163:704-710, 2010)。その後新たに、スプライス変
異 2 症例 (20 歳、37 歳)、ミスセンス変異 2 症例
(33 歳、42 歳) を見出した。

平成 23 年度

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、58 家系 66 人となった (表 4)。男性 38
人、女性 28 人であり、家族例 30 人、孤発例 21
人、不明 15 人であった。家族検索で 3 人を見出
されていた (54 歳、易出血性と骨格異常を呈す
る; 59 歳、60 歳、無症状)。初発症状の出現年
齢は平均 22.6 歳 (14-43 歳) であり、呼吸器系
が最も多かった。合併症の頻度は動脈系 62%、
呼吸器系 47%、消化器系 24% であった。
COL3A1 変異は、ミスセンス変異 45%、スプラ
イス変異 45% であり、3 家系において nonsense
medicated mRNA decay (NMD) のため cDNA で
は検出できないナンセンス変異、1 塩基欠失変
異が見出された。

動脈合併症に関する二次調査

動脈合併症の治療状況に関する調査: 情報を入手
しえた 28 人中、13 人が β 遮断薬、 α 遮断薬、Ca
遮断薬、AT 受容体遮断薬 (ARB)、利尿剤とい
った内科的降圧療法を受けていた。このうち
celiprolol が投与されていたのは 2 人のみであった。

侵襲的治療 (血管内治療、外科的治療) を受けて
いたのは 14 人であった。

1 女性	左腎動脈瘤破裂に対する塞栓術、腎梗塞 (42 歳)
---------	------------------------------

2 男性	S 状結腸間膜動脈破裂、手術、軽快 (31 歳)
	横行結腸間膜動脈破裂、手術、軽快 (33 歳)
	横行結腸動脈破裂、血管内治療、軽快 (37 歳)
3 男性	左尺骨動脈瘤、手術、不明 (25 歳)
	右尺骨動脈仮性動脈瘤、手術、不明 (29 歳)
4 女性	胸部大動脈解離、ステント、軽快 (32 歳)
5 女性	左頸動脈海綿静脈洞ろう、塞栓術、軽快 (41 歳)
6 男性	脾動脈断裂、脾動脈結紮・脾摘、軽快 (26 歳)
7 男性	急性大動脈解離 (Stanford A)、人工血管置換術、進行 (21 歳)
	胸腹部大動脈解離、人工血管置換術、肺出血により左肺全摘 (23 歳)
8 男性	腹部急性大動脈瘤、ステント・左総腸骨動脈閉塞術・右大腿動脈—左大腿動脈バイパス術、良好 (20 歳)
9 男性	脾動脈瘤、外科的結紮術、軽快 (41 歳)
10 女性	右頸動脈海綿静脈洞ろう、血管造影時に攣縮、軽快 (27 歳)
11 女性	左頸動脈海綿静脈洞ろう、バルーン閉塞術・コイル閉塞術、不十分 (26 歳)
	左頸動脈海綿静脈洞ろう、内頸動脈結紮術、軽快 (26 歳)
12 男性	腸閉塞術後の内腸骨動脈破裂、塞栓術、軽快 (28 歳)
13	左外腸骨動脈解離・偽腔拡張、カバード・

男性	ステント、軽快 (38 歳)
14 男性	肝腎動脈瘤の進行、両側肝動脈塞栓・左腎動脈塞栓、軽快 (25 歳)

新たな遺伝子解析法の開発

平成 22 年度

高解像度融解曲線分析法により既知の COL3A1 遺伝子のグリシン変異 3 種類とスプライシング変異 3 種類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。これらはは nonsense mediated mRNA decay (NMD) を来す変異と考えられた。そこで、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 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 (Banyar et al., *Biochem Biophys Res Commun* 405:368-372, 2011)。

本法で検出された 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 (20 歳で死亡した男性～60 歳代の無症状の女性まで)

平成 23 年度

臨床的に血管型 EDS、Marfan 症候群 (類縁疾患) など結合組織脆弱性疾患が疑われる新規患者に対して、末梢血由来ゲノム DNA を用いた hmMCA 解析を行い、COL3A1 の intron 15 の 3'側-10 において既知の SNP には報告がない塩基置換がヘテロ接合体で検出された。培養皮膚線維芽細胞由来 total RNA を用いた RT-PCR シーケンス法で exon 16 の前に 9 塩基挿入がヘテロ接合体で検出された。新たに生じたタンパクは、3 アミノ酸挿入の in-frame であるが、コラーゲン 3 量体ができないため病的変異と考えられた。

新型 EDS (EDS, Kosho Type ; EDSKT)

原因遺伝子の単離、病態解明

平成 22 年度

< 遺伝子単離 >

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 8.1 Mb 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 6.3 Mb にまで狭小化した。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た (図 1)。以上から、*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 (Miyake et al., *Hum Mutat* 31: 966-974, 2010)。

< 病態解明 >

糖鎖 (生化学) 分析

CHST14 はデルマトン 4-O 硫酸転移酵素 (D4ST1) をコードする。D4ST1 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) を構成するデルマトン硫酸 (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 (図 2)。

- ① 患者皮膚由来培養線維芽細胞では、コントロールに比べて D4ST-1 酵素活性が著明に低下していること、保因者では半分程度に低下していることが明らかになった (Miyake et al., *Hum Mutat* 31: 966-974, 2010)。
- ② 患者皮膚由来培養線維芽細胞中に含まれる DS と CS の含有量を比較すると、コントロールでは DS, CS とともに存在したが、患者由来細胞では DS が消失し、CS のみとなっていた (Miyake et al., *Hum Mutat* 31: 966-974, 2010)。
- ③ DCN の GAG 鎖の CS/DS 組成はコントロールではほぼ DS のみであったが、患者皮膚由来培養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 (Miyake et al., *Hum Mutat* 31: 966-974, 2010)。

病理学的分析

- ① HE 染色による光顕所見：患者 (EDSKT5) (a) では、コントロール (b) に比べ、真皮のコラーゲン線維束が繊細に観察された (図 3) (Miyake et al., *Hum Mutat* 31: 966-974, 2010 ; 古庄知己, *信州医学誌* 59: 305-319, 2011)。
- ② 電顕所見：患者 (EDSKT5) (c) では、コントロール (d) に比べ、コラーゲン細線維の径は同等であるが、ばらけて存在していた (図 3c, d) (Miyake et al., *Hum Mutat* 31: 966-974, 2010 ; 古庄知己, *信州医学誌* 59: 305-319, 2011)。

平成 23 年度

< 病態解明 >

糖鎖 (生化学) 分析

- ① 新規患者培養皮膚線維芽細胞において、CS 鎖は合成されていたが、DS 鎖は合成されていなかった。デコリン上の GAG 鎖においても DS が含まれていないことが確認された。
- ② 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。

病理学的分析

- ① AZAN 染色による光顕分析：患者では、健康人に比べて、表皮が波打っている、表皮直下のコラーゲン線維密度が低い、または、コラーゲン線維束が繊細である、という所見が見られた (図 4)。
- ② 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与するデコリンの 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 5)。
- ③ 抗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6)。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。

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。

iPS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。

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。

疾患概念、自然歴、診療指針の構築

<疾患概念の構築>

平成22年度

本研究班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、本研究班の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)。

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(Shimizu et al., *Am J Med Genet* 155A: 1949-1958, 2011) (表5)。

顔貌上の特徴：ATCS、EDSKT、MCEDSともに、

出生時～乳児早期、大きい大泉門、眼間開離、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、薄い上口唇、小さい口、小さく後退した下顎が認められた。学童期以降、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(Shimizu et al., *Am J Med Genet* 155A: 1949-1958, 2011)。

骨格系の特徴：ATCS、EDSKT、MCEDSともに、先天性多発関節拘縮、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。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(Shimizu et al., *Am J Med Genet* 155A: 1949-1958, 2011)。

皮膚の特徴：EDSKT、MCEDSにおいて、皮膚過伸展性～弛緩、内出血しやすい、脆弱性(容易に離開し、萎縮性瘢痕を形成)、末端早老症ともいえる手掌の深い皺、圧迫への過敏性(上腕での血圧測定が疼痛のためできない)、皮下感染(膿瘍)の反復と瘻孔形成といった皮膚症状を呈していた(Shimizu et al., *Am J Med Genet* 155A: 1949-1958, 2011)。

心臓血管症状：EDSKTの7症例が、巨大皮下血腫を経験していた。ATCSの2症例、EDSKTの2症例が先天性心疾患を有していた(Shimizu et al., *Am J Med Genet* 155A: 1949-1958, 2011)。

呼吸器症状：EDSKTの成人症例が、(血)気胸を発症した(Shimizu et al., *Am J Med Genet* 155A: 1949-1958, 2011)。

消化器症状：EDSKT、MCEDSにおいて便秘、腹痛を認めた。ATCSでは共通腸管膜、胃結腸ひだの欠損が見られ、EDSKTでは急性胃潰瘍を、MCEDSでは軸捻転を呈する症例があった(Shimizu et al., *Am J Med Genet* 155A: 1949-1958, 2011)。

泌尿生殖器症状：ATCS、EDSKT、MCEDSの一部症例において、腎・膀胱結石が認められた。ATCS、MCEDSの一部において、水腎症が認められた。EDSKTでは、拡張し、収縮しない膀胱を呈し、尿路感染症を反復した。多くの男性症例(ATCS、

EDSKT) において、停留精巢が認められた。成人例では、男性の性腺機能低下、女性の乳房發育不全が認められた (Shimizu et al., Am J Med Genet 155A: 1949-1958, 2011)。

眼症状：ATC、EDSKT において斜視が、EDSKT、MCEDS において屈折異常が認められた。ATCS、EDSKT、MCEDS において緑内障・眼圧上昇が認められた。EDSKT、MCEDS において小角膜、小眼球症が認められ、EDSKT、MCEDS において網膜剥離が認められた (Shimizu et al., Am J Med Genet 155A: 1949-1958, 2011)。

耳症状：EDSKT、MCEDS において聴覚低下が認められた (Shimizu et al., Am J Med Genet 155A: 1949-1958, 2011)。

成長：D4ST1 欠損症全般において、軽度の子宮内成長遅延、および、出生後にはやせ型で相対的頭圍拡大を伴う軽度の成長遅延を呈した (Shimizu et al., Am J Med Genet 155A: 1949-1958, 2011)。

発達・脳神経症状：ATCS、EDSKT の 7 症例、MCEDS において粗大運動発達遅延が認められた。独歩ができた症例では、開始年齢の中央値は 2 歳 1 か月であった。ATCS、EDSKT において、脳室拡大または左右差が認められた (Shimizu et al., Am J Med Genet 155A: 1949-1958, 2011)。

平成 23 年度

<CHST14 遺伝子解析に基づく患者収集>

合計 17 家系の遺伝子解析を終了した。症状の典型的な 13 家系においてはホモ接合性変異または複合ヘテロ接合性変異が同定された。他方、症状が非典型的な 4 家系において、変異は同定されなかった。変異アレルの出現頻度を以下に示す。

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

確定診断例は、これまでに論文報告された症例および自験例を含め 24 家系 34 人となった (うち本邦患者は 16 家系 18 人)。

<疾患概念の確立>

本症は、皮膚・関節の過伸展性、各種組織の脆弱性という EDS の中核症状を持つことから、多発関節拘縮症というカテゴリーより、臨床的に EDS とのカテゴリーの方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 (図 7)、EDS との分類が妥当と考えられた。以上から、「D4ST-1-deficient EDS (DD-EDS)」との疾患名を提案した (Kosho et al., Hum Mutat 32: 1507-1509, 2011)。

<診療指針の構築>

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>男児では停留精巢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>

	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 (MVP などあれば、感染性心内膜炎の予防)、上行大動脈拡張。
外傷対策	転倒などの外傷により、皮膚裂傷、関節脱臼を生じやすい。 巨大皮下血腫については、DDAVP 点鼻療法 (STIMATE™) が有効。
思春期以降	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)。 (血) 気胸、憩室穿孔に対する治療。
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、その整復後、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。

その他の病型

後側彎型を見出すことはできなかった。

多発関節弛緩型を、2家系4症例見出すことができた。これは本邦1、2家系目にあたる。

その他、血管型類似の臨床症状を呈するが、Ⅲ型コラーゲン生化学分析で異常を認めない2症例、関節症状の強い古典型類似の2症例、皮膚弛緩様症例、外胚葉形成異常を伴う症例が見出された。

D. 考察

血管型 EDS

本研究班 (平成21-22年度) で実施した調査においては、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。しかしながら、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 (Shimaoka et al., *Br J Dermatol* 163:704-710, 2010; 遺伝カウンセリング学会雑誌 第31巻: 157-161, 2010)。

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。従来の報告に比べて、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%)。これらの結果は、肺病変の根本は特発性の肺組織裂傷に基づく血腫や線維性結節の形成であるとした最近の報告 (Kawabata et al., *Histopathology* 56: 944-950, 2010) と合致していた (Shimaoka et al., *Br J Dermatol* 163:704-710, 2010; 遺伝カウンセリング学会雑誌 第31巻: 157-161, 2010)。

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。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。タンパク量の減少が見られるものの遺伝子変異を同定できない症例においては、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（Shimaoka et al., *Br J Dermatol* 163:704-710, 2010；遺伝カウンセリング学会雑誌 第 31 巻：157-161, 2010）。

平成 23 年度までの研究結果も同様の傾向であった。呼吸器系合併症（気胸、喀血）が初発症状となる場合が多く、若年者の反復性気胸や喀血の鑑別診断として本症候群を想起する必要があると考えられた。興味深い結果として、家族検索で見出された成人例は、無症状 2 人（59 歳、60 歳）、内反足術後と易出血性（54 歳）と重大な合併症を呈していなかった。本症候群において同一家族内罹患者（変異を有する者）のなかで表現型の大きな幅があることが示された。

動脈合併症の治療に関する調査において、情報を入力しえた 28 人のうち 13 人が内科的治療（降圧剤投与）を受けていた。そのうち celiprolol の投与を受けていたのは 2 人のみであり、Ong らの画期的なランダム化比較試験の認知度が低いことがうかがえた（Ong et al., *Lancet* 2010; 376: 1476-84）。他にエビデンスがない現状では、確定診断された全例において celiprolol が投与され、その上で腎梗塞などで高血圧を呈する例では ARB などの併用を考慮するという治療戦略が妥当ではないかと考えられる。

14 人が侵襲的治療（血管内治療、外科的治療）を受けていた。脾動脈破裂・瘤に対する結紮術、腸管膜動脈破裂に対する手術は問題なく行われていたが、大動脈瘤に対する人工血管置換術ではトラブルがあった。頸動脈海綿静脈洞ろうに対する血管内治療は十分な効果は得られなかったが、大動脈分枝の塞栓術、大動脈や腸骨動脈のステント術は比較的安全で有効である可能性が考えられた。

以上から、本症候群の診療指針を下記のごとく提案する。

- ・ 若年者の動脈瘤・解離、腸管破裂にて（可能であれば、家族歴と呼吸器合併症からより若年で）本症候群を疑い、生化学分析および遺伝子解析で確定診断を行う。

- ・ 確定診断された全例において celiprolol の予防内服を考慮する。
- ・ 腎血管性高血圧などで降圧効果が得られにくい場合には、ARB などの併用を考慮する。
- ・ 内科的治療でコントロール困難な動脈病変に対しては、まず血管内治療の可能性を探る（大動脈分枝病変に対する塞栓療法や大動脈・腸骨動脈病変に対するステント療法など）。
- ・ 血管内治療にてもコントロール困難な動脈病変に対しては、慎重な準備のもと外科的治療を考慮する。

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 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、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、臨床的に血管型 EDS 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（Banyar et al., *Biochem Biophys Res Commun* 405:368-372, 2011）。

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 NMD を来す変異では、血管型 EDS 発症において新たな因子の存在が推定された。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策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

(Banyar et al., *Biochem Biophys Res Commun* 405:368-372, 2011)。

本症におけるスプライス変異は 5'側に集中しており、これによりスプライス部位の消失が起こり、発症に至るといったものであった。平成 23 年度の研究において intron の 3'側のスプラインス変異が検出された。これにより intron 上に新たなスプライス部位が生じるものであった。こうした変異では、mRNA からのスプライス異常の検証が必要であり、ゲノム DNA のみからの解析ではなく、ゲノム DNA および RNA 双方から解析アプローチができる体制を維持することが必要と考えられた。

新型 EDS (EDS, Kosho Type ; EDSKT)

ATCS、EDSKT、MCEDS は、それぞれ独立して発見された D4ST1 欠損症である。比較的重症例が多く含まれ、また観察時期が出生時から幼少期に集中していた ATCS は、arthrogryposis syndrome すなわち多発関節拘縮症のカテゴリーとしてとらえられていた。他方、MCEDS は思春期以降の臨床像から EDS のカテゴリーとしてとらえられていた。研究代表者らの見出した EDSKT は年齢の幅が広く (2 歳~32 歳)、かつ詳細な情報を入手できたことから、出生時、小児期から成人期に至る臨床像の変化を克明に示しており、D4ST1 欠損に基づくこれらの症例が、臨床的にも同一疾患とすることを支持している (Shimizu et al., *Am J Med Genet* 155A: 1949-1958, 2011)。

皮膚・関節の過伸展性、各種組織の脆弱性という EDS の中核症状を持つことから、arthrogryposis syndrome というカテゴリーより、EDS とのカテゴリーの方が妥当と考えられる。基礎研究のデータが示唆する病態「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」からは、コラーゲンの生合成異常に基づく疾患と位置づけられ、こうした病因論的観点からも EDS との分類が妥当と考えられる。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)。

本症の進行性結合組織脆弱性に関する症状 (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) は、「デルマタン硫酸欠乏による、デコリンが媒介するコラーゲン細線維の assembly 不全」により説明可能であるが、顔貌の特徴、先天性多発関節拘縮、先天性心疾患、脳神経異常など発生異常と位置づけられる症状もある。このことは、D4ST-1 欠損に基づくデルマタン硫酸の欠乏状態が、結合組織の維持のみならず発生においても影響を及ぼしている可能性を示唆している (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)。

ATCS、EDSKT、MCEDS を含めた D4ST1 欠損症は、デルマタン硫酸生合成経路において唯一同定されている欠損症であり、デルマタン硫酸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であるとして脚光を浴びている (Zhang et al., *Prog Mol Biol Transl Sci* 93: 289-307, 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、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。

本研究において、患者由来 iPS 細胞の樹立に成功し、また、ノックアウトマウスの作製の準備段階に入ることができた。今後、iPS 細胞を本症候群患者において症状を呈する種々の細胞系裂に分化誘導させること、また、ノックアウトマウスの詳細な表現型、自然歴、病理所見を調査することにより、根治療法の評価に使用できる適切な疾患モデルを構築していくことが必要である。

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と考えられる。EDS 班のこれまでの検討から、上記のように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することができた。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る）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。

その他の病型

本邦 1、2 家系目の多発関節弛緩型症例、また、

既存の大分類にはあてはまらない症例を見出した。

多発関節弛緩型家系は、古典型と類似した皮膚脆弱性、関節過伸展性および反復性脱臼に加えて、罹患者（発端者、長男、次男）すべてに両側先天性股関節脱臼および顔貌上の特徴が認められたことが、臨床診断の決め手となった。I-III 型コラーゲン生化学分析は、通常 III 型コラーゲン異常症である血管型 EDS の診断に用いられ、この場合の I 型コラーゲンはコントロールとして利用されている。本分析は、本病型における I 型コラーゲンのスクリーニングとしても有用であることが示された。

血管型類似の 2 症例は、III 型コラーゲンの質的異常による非典型的な血管型 EDS である可能性、別な分子機序を持つ新規疾患である可能性がある。今後、III 型コラーゲン mRNA およびゲノム DNA を用いた遺伝子解析を行う計画である。

皮膚弛緩症様症例は、早期発症の重症例であり、糖鎖異常症なども視野に入れて解析を行う計画である。

外胚葉形成異常を伴う症例は、既知の大病型、その他の病型に該当しない特徴を有している。ゲノムコピー数異常の可能性もあり、アレイ CGH 解析によるスクリーニングを考慮している。

E. 結論

血管型 EDS

これまでに 58 家系 66 人が生化学分析または遺伝子解析により確定診断された。初発症状の出現年齢は平均 22.6 歳（14-43 歳）であり、呼吸器系が最も多かった。合併症の頻度は動脈系 62%、呼吸器系 47%、消化器系 24%であった。COL3A1 変異は、ミスセンス変異 45%、スプライス変異 45%であった。動脈合併症の治療に関しては、情報を収集しえた 28 人中、celiprolol を使用していたのはわずか 2 人であり、本治療法の本邦での認知度の低さがうかがえた。14 人が侵襲的治療を受けており、大動脈分枝に対する手術および血管内治療（塞栓術）、大動脈や腸骨動脈のステント術は問題なく実施されていた。

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、hrMCA 法を基盤とした手法で開発した。本法は、RNA で同定できない NMD を来すナンセンス変異、欠失変異も同定可能とした。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。

以上から、本症候群の診療指針としては、hrMCA 法を含めた解析法を駆使して早期生化学または遺伝子診断をした後、血管病変スクリーニングを行い、celiprolol 投与による動脈合併症の予防を行う。ハイリスク動脈病変に対しては、血管内治療の可能性を探り、血管内治療では対応できない進行性病変に対しては、慎重に手術を行う。

新型 EDS (EDS, Kosho Type ; EDSKT)

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 の新病型である。進行性結合組織脆弱性における病態は、「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」と考えられる。

現在までに論文発表例および自験例を含め、24 家系 34 人となった（うち本邦患者は 16 家系 18 人）。これまでに報告された臨床的・基礎的データに基づき、「D4ST-1-deficient EDS」との疾患名を提案した。診療情報を詳細に検討し、縦断的な診療指針を作成した。新生児期、特徴的顔貌と骨格症状から疑い *CHST14* 遺伝子解析により確定診断する。乳幼児期、内反足などに対する整形外科治療や運動発達遅滞に対する理学療法などを考慮する。その後、眼科、耳鼻科、泌尿器科、循環器科を含めた包括的な健康管理を行うとともに、巨大皮下血腫に対する DDAVP 点鼻療法などの外傷予防対策を行う。重度進行性の脊椎変形に対する手術を行う場合には、巨大皮下血腫の予防を含めた入念な準備が必要である。また、巨大皮下血腫後には広範性皮膚壊死を呈する危険性があり、この場合には、人工真皮、自家培養皮膚線維芽細胞、自家分層網状皮膚、自家培養表皮シート移植療法など

様々な形成外科的治療を駆使する必要がある。

さらなる病態解明につながる基礎的検討を行い、患者尿中の DS が消失していること、デコリン染色が患者と健康人では有意な違いがあることを世界で初めて明らかにした。さらに、将来の根治療法の開発へ向けた疾患モデルの構築のため、iPS 細胞を樹立し、ノックアウトマウスの作製に着手した。

その他の病型

皮膚・関節の過伸展性、組織脆弱性といった EDS の主要徴候を持つが、既知の大病型その他の病型には該当しない症例が少なくないことが明らかになってきた。現状で、EDS 斑としてスクリーニングが可能なのは、血管型、後側彎型、多発関節弛緩型、および新型（D4ST1 欠損症）である。今後、こうした症例の蓄積を通じて、新規病型の発見、原因遺伝子の探索を行っていく必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kosho T (corresponding author), Miyake N, Hatamochi A, Takahashi J, Kato H, Miyahara T, Igawa Y, Yasui H, Ishida T, Ono K, Kosuda T, Inoue A, Kohyama 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 Part A* 152A: 1333-1346, 2010.

Miyake N, Kosho T (equal contribution), Mizumoto S, Furuichi T, **Hatamochi A,**