

などに注意。

㊦ 頭蓋・顔

口蓋裂があれば Hotz 床を装着, 中耳炎の予防。

㊧ 眼科

屈折異常は早期から眼鏡を装用し矯正を開始。

㊨ 泌尿器・生殖器系

停留精巣があれば2歳までに精巣固定術(理想的には6~18か月)を行う。尿路感染症を繰り返すときは腎奇形の合併に注意。

エーラス-ダンロス症候群

Ehlers-Danlos syndrome (EDS)

古庄知己 信州大学医学部附属病院講師・遺伝子診療部

● 病態

エーラス-ダンロス (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もつ先天性疾患の総称であり, 古典型, 関節過動型, 血管型, 後側弯型, 多発関節弛緩型, 皮膚脆弱型の6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。

● 治療方針

㊦ 基本姿勢

医療者と患者・家族が疾患についてのあらゆる情報を共有し, 起こりうる合併症の早期発見・早期治療を行うというものである。診療科・医療者間の連携も重要である。

㊧ 治療の実際

1. 古典型(主症状: 皮膚過伸展性・脆弱性, 関節弛緩) 皮膚裂傷を予防するために, 前頭部, 膝, 脛部を保護する。裂傷の縫合は十分注意して行う。筋緊張低下, 運動発達遅滞を呈する場合, 理学療法を行う。大動脈拡張があればβ遮断薬を投与する。
2. 関節過動型(主症状: 重度の関節弛緩, 慢性難治性疼痛) 補装具の使用(関節補装具, 車椅子など)により関節への負荷を軽減し,

ADLの維持を図る。疼痛コントロールによりQOLを向上させる。大動脈拡張があればβ遮断薬を投与する。

3. 血管型(主症状: 動脈瘤・解離・破裂, 腸破裂, 子宮などの内臓破裂) 造影CTまたはMRIによる動脈病変スクリーニングを行う。瘤・解離などの病変が見出されれば, β遮断薬などによる血圧管理を行う。急性の動脈病変(瘤, 解離)に対しては可能なかぎり保存的に対処し, 病状が進行する場合, 塞栓やステントなどの血管内治療を考慮する。穏やかな緩下剤により排便コントロールを行う。腸破裂に対しては, 組織脆弱性および周術期の動脈破裂に留意しながら迅速に手術治療を行う。

歌舞伎症候群

Kabuki syndrome

石井拓磨 中川の郷療育センター・小児科医長(埼玉)

● 病態

特徴的顔貌(特に目と眉)と他の身体特徴(特に指先腹側の膨らみ)から臨床診断される先天奇形症候群。軽度から中程度の精神運動発達遅滞を伴う。現在のところ責任遺伝子は不明(8p22-8p23の微小重複説は否定された)。性差はなく日本での発生頻度は約32,000人に1人とされている。報告者の名を冠して新川-黒木症候群とも呼ばれる。

● 治療方針

根本的な治療法はないが, 個々の状態に応じた綿密な発達支援と健康管理が必要。

㊦ 新生児期から乳児期

特徴的顔貌が診断の決め手になるため多くは2歳以降に診断されることになるが, まずは生命予後や発達に影響する合併症の検索と治療が必要。特に, 先天性心疾患[心房中隔欠損症(ASD), 心室中隔欠損症(VSD), 大動脈縮窄症(CoA)など], 腎尿路系奇形, 斜視, 虹彩・網膜の部分欠損, 眼瞼下垂, 聴力障害, 口蓋裂, 歯牙欠損, 股関節形成異常や

1. 遺伝カウンセリングのポイント

1) 治療・予防方法のない成人発症疾患：

筋強直性ジストロフィー，エーラスダンロス症候群

関島良樹・古庄知己

筋強直性ジストロフィーやエーラスダンロス症候群などの遺伝性疾患に対する根本的な治療法・予防法は現在のところ存在しない。しかし、医師および患者が疾患を正確に理解し対応することで避けられる合併症も多く、患者の長期的な予後の改善に大きな影響を及ぼす。さらに、これらの疾患は障害が多数の臓器に及び、複数の診療科が関わることが多いという特徴がある。各臓器の専門医の診療が必要なのはもちろんであるが、患者の生活環境や心理的側面も含めた全体像を把握し、患者にとって今現在何が最も優先すべき治療なのか、長期的にどのように健康管理をするのかなど、大局的な見地に立った遺伝カウンセリングがたいへん重要である。

key words

遺伝カウンセリング，筋強直性ジストロフィー，ミオトニア，表現促進現象，トリプレットリピート病，出生前診断，発症前診断，着床前診断，エーラスダンロス症候群，コラーゲン

はじめに

治療・予防法のない成人の遺伝性疾患に対するカウンセリングをどのように行うべきであろうか？従来から、①クライアントの自己意思決定、②正確で偏りのない医学情報の提供および実践可能な選択肢の提示、③積極的傾聴および共感的理解、④クライアントに対する心理的な支援の重要性が指摘されているが、これらを実践しクライアントにとって有意義なカウンセリングを行うことは容易ではない。筆者らもいまだにどのような遺伝カウンセリングが望ましいか明確な解答は見出せていないが、これまでの経験から、筋強直性ジストロフィーとエーラスダンロス症候群を例に、治療・予防法のない成人の遺伝性疾患に対するカウンセリングのポイントについて解説する。

I. 筋強直性ジストロフィー

1. 筋強直性ジストロフィーの臨床像

筋強直性ジストロフィーは、骨格筋、平滑筋とともに眼、心臓、内分泌臓器、中枢神経系など多臓器を侵す常染色体優性遺伝の疾患である¹⁾。人口10万人あたりの患者数は約5,6人とされており、成人の筋ジストロフィーの中では最も頻度が高い。臨床所見は軽症から重症まで連続的に移行するが、便宜的に、軽症型、古典型、先天型の3つの病型に分類されている。軽症型は白内障と軽度のミオトニア(図①)が特徴であり、生命予後は良好である。古典型は筋力低下、筋萎縮、ミオトニア、白内障を呈し、しばしば心伝導障害、

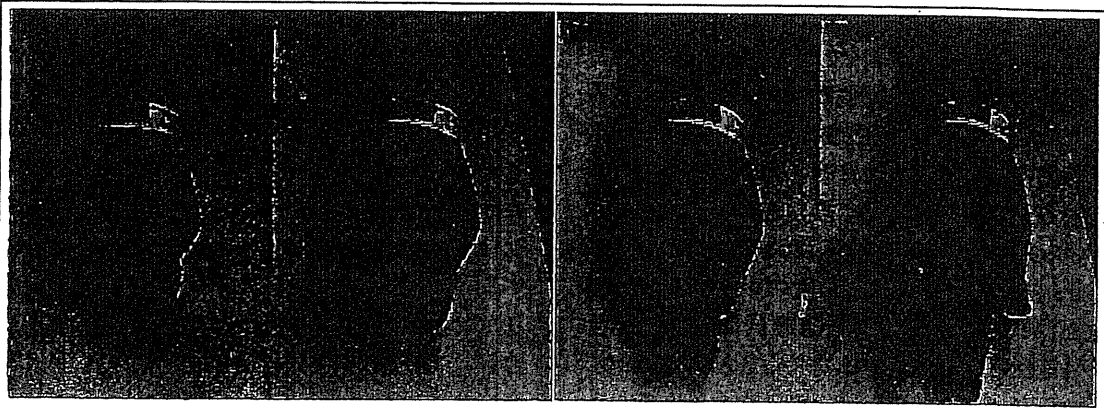
糖尿病、甲状腺機能低下症、脱毛などを合併する。患者は徐々に身体が自由が効かなくなり、生命予後も短くなる傾向がある。先天型は生下時より筋緊張の低下と全身の筋力低下がみられ、しばしば呼吸不全をきたして早期に死亡する。また精神発達遅滞もよくみられる。女性患者では、不妊、早産、流産、羊水過多などの産科的合併症の頻度が高く、妊娠や出産を契機に診断されることも少なくない。筋強直性ジストロフィーでは世代を経るごとに発症年齢が若年化し、臨床症状が重症化する「表現促進現象²⁾」が知られている。本症では特に母親から子供への遺伝の際に著明な表現促進現象が認められる(後述)。

2. 筋強直性ジストロフィーの分子病態

筋強直性ジストロフィーの原因遺伝子としては、DMPK 遺伝子と ZNF9 遺伝子が知られている。筋強直性ジストロフィーのほとんどを占める筋強直性ジストロフィー1型(DM1)は、DMPK 遺伝子の3'非翻訳領域に存在するCTG配列の延長が原因である²⁾(トリプレットリピート病³⁾)。CTGリピート数は正常では34以下であるが、DM1患者では50以上に延長し1000リピートを超えることも稀ではない。リピート数のみから予後を正確に予測することは困難であるが、一般にリピート数が多いほど発症年齢が早く症状が重篤化する傾向がある。35~49リピートは前変異(premutation)と呼ばれ、本人は発症しないが、さらに伸長したリピートを受け継いだ子供が発症するリスクが高い。

一方、筋強直性ジストロフィー2型(DM2)の原因は、

図① 筋強直性ジストロフィーにおける把握ミオトニア (grip myotonia)



ミオトニア (持続する過度の筋収縮のため速やかに弛緩しない現象) より, 手指を強く握りしめた後で速やかに手を開くことができない。特に母指球筋に強いミオトニアが認められる。

ZNF9 遺伝子のイントロン 1 における CCTG 配列のリピートの伸長である³⁾。DM1 と DM2 の臨床症状は非常に類似していることから, 両疾患には共通の発症メカニズムが存在すると推測される。しかし, DMPK 遺伝子と ZNF9 遺伝子がコードするタンパク質は互いに全く関連がないばかりか, ともに非翻訳領域内のリピートの伸長が原因であることから, CTG (RNA としては CUG) という 3 塩基のリピートの伸長それ自体が RNA を介して発症に関与しているのではないかと推測されるに至った。実際, 伸長した CUG リピートを有する RNA が RNA 結合タンパクに結合することにより, 様々な遺伝子のスプライシングの異常が起こることが報告されており⁴⁾, このため本症における多彩な症状が惹起されていると考えられている。これらの知見に基づき, RNA 結合タンパクと CUG リピート RNA の結合を阻害する薬剤など, 本症に対する根本的治療法の開発が進められている⁵⁾。

3. 筋強直性ジストロフィーに対するマネジメント

筋強直性ジストロフィーの主症状である進行性の筋力低下に対する根治的治療法は存在しないが, 足関節や足の整形術, 下肢の装具, 車椅子などの必要性につき評価を受けることは有用である。ミオトニアが持続性で日常生活上の支障が大きい場合は, フェニトイン, カルバマゼピン, メキシシチレンなどの経口投与が有効な場合がある。

筋以外の症状に対しては, 無症候性の心伝導障害を検出するため年に 1 回は心電図を施行することが推奨されている。失神, 動悸など心臓由来の症状と考えられる症状がある場合にはホルター心電図, 心臓超音波検査による精査を行い, 必要に応じて循環器専門医にコンサルトするのが望ましい。この他に, 糖尿病・甲状腺機能低下症のスクリーニングとして年 1 回の空腹

時血糖, HbA_{1c}, 甲状腺ホルモンの測定, 白内障のスクリーニングとして 2 年に 1 回の眼科的診察が推奨されている。これらの合併症が生じた場合は, 一般の患者と同様にそれぞれに対する治療を行う。

高脂血症に対して広く用いられているスタチン製剤は, 筋痛や筋力低下を増悪させるおそれがあるので, 本症では使用を避けるべきである。また, 本症では麻酔薬の投与による過剰な呼吸抑制, 無気肺, 肺炎, 悪性高熱などが起こりやすいことが知られており, 周術期には注意が必要である。

4. 筋強直性ジストロフィーに対するカウンセリングのポイント

筋強直性ジストロフィーは, 自分で罹患していることを認識していないような軽症者から先天型の重症まで臨床症状が非常に多彩である。よって, 発症者に対するカウンセリングもクライアントの状況によって異なったものとなる。上述したような臨床的マネジメントが患者の健康管理に重要であるが, 発症早期の比較的症状が軽い患者は, 確定診断がなされた後の定期的な通院を中断してしまい, 日常生活に重大な支障をきたすまで医療機関を受診しないことが多い。よって確定診断時に十分なカウンセリングを行い, 専門医による健康管理の重要性を患者に理解させる必要がある。

筋強直性ジストロフィーは浸透率 100% の常染色体優性遺伝性の疾患であり, 患者の子供は 50% の確率で変異アレルを受け継ぐ。病的な CTG リピートは生殖細胞形成の過程でさらに伸長することが多く, より伸長した CTG リピートが子供に伝わり臨床症状が重症化する (表現促進現象)。したがって, 発症者の子供が変異アレルを有していれば, 多くの場合, 比較的若年で症状が出現する。本症において, リスクを有する無症状の成人に対して発症前診断が考慮される場合

もあるが、検査後に生じうる当事者の健康、生活、雇用、社会や家庭内での人間関係の変化などに関する問題について十分にカウンセリングを行うべきである。また、他の家族の遺伝的リスクに関する配慮もしなくてはならない。本症における発症前診断が、ハンチントン病などの他の成人発症の疾患における発症前診断とは異なる点として、成人で無症状である時点で変異アレルを有している確率がかなり低下している点が挙げられる。Brunnerら⁹⁾の検討では、両親のいずれかが発症者である20～39歳の臨床的に無症状の子供が変異アレルを引き継いでいる確率は約8%であった。また、変異アレルを有していた場合は将来発症すると考えられるが、症状は比較的軽症であると予想される。しかし、このようなクライアントの子供が重症の筋強直性ジストロフィーを発症する可能性については十分に留意する必要がある。

上述したように、本症では母親から子供への遺伝の際に著明な表現促進現象が認められる。最重症型である先天型筋強直性ジストロフィーはほとんどが母親からの遺伝であり、母親が患者の場合は出生前診断も考慮される。先天型の子供が生まれる確率は母親の重症度(CTGリピート数)と関連があり、Coboら⁷⁾の報告では、CTGリピート数が300回より少ない女性が先天型の患児をもつリスクは5%であるのに対して、300回より多いCTGリピートをもつ女性の場合は29.5%である。本症に対する着床前診断も臨床研究として一部の施設で行われている。

II. エーラスダンロス症候群

エーラスダンロス症候群(EDS)は皮膚の伸展性、関節弛緩など結合組織の脆弱性を有する先天性疾患の総称であり、古典型、関節可動性亢進型、血管型、後側彎型、多発関節弛緩型、皮膚脆弱型の6つの主要な病型に分類される⁹⁾。いずれの病型もコラーゲン遺伝子あるいはコラーゲン分子の修飾酵素の遺伝子の変異が原因である(表1)。本稿では代表的な病型である、古典型、関節可動性亢進型、血管型の3病型の臨床像、マネジメントおよびカウンセリングのポイントを解説する。

表1 エーラスダンロス症候群の分類

病型	頻度	遺伝形式	原因遺伝子
古典型	1/20,000	常染色体優性	COL5A1, COL5A2
関節可動性亢進型	1/5,000～20,000	常染色体優性	TNXB (大多数は不明)
血管型	1/50,000～250,000	常染色体優性	COL3A1
後側彎型	1/100,000	常染色体劣性	PLOD
多発関節弛緩型	非常に稀	常染色体優性	COL1A1, COL1A2
皮膚脆弱型	非常に稀	常染色体劣性	ADAMTS-2

1. 古典型 EDS の臨床像とマネジメント

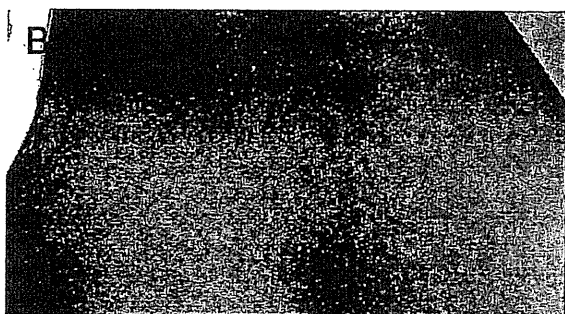
古典型 EDS は皮膚過伸展性、創傷治癒異常、ならびに関節可動性亢進で特徴づけられる常染色体優性遺伝の結合組織疾患である。V型コラーゲンをコードする COL5A1 と COL5A2 が原因遺伝子として同定されており、約 50% の家系でこれらの遺伝子の変異を認める。患者の約 50% は罹患した親から遺伝子変異を受け継ぎ、残りの約 50% は新生突然変異により発症する。患者の皮膚は滑らかでベルベット様の感触があり、過伸展性(図2 A) および脆弱性を有する。創傷治癒は遅れ、一次創傷治癒後の細かいしわの集まった癒痕が特徴的である。関節可動性の亢進がひどくなると肩関節、膝蓋骨、指関節、股関節、橈骨、鎖骨などに脱臼をきたすが、多くの場合は自然修復あるいは自力で修復可能である。運動発達遅延、筋緊張低下、倦怠感、筋のクランプ、内出血などもみられることがある。頻度は低いが、僧房弁逸脱、三尖弁逸脱、大動脈起始部の拡張、大血管の自然破裂といった心血管症状を伴う例がある。妊婦は会陰裂傷、会陰切開時の創伸展、分娩後の子宮・膀胱脱を生じうる⁹⁾。

このような症状に対する臨床的なマネジメントとして、小児では皮膚の裂傷を予防するために、前頭部、膝、脛部を保護することが推奨されており、裂傷の縫合の際には張力をかけずに2層で縫合するなどの特別な配慮が必要である。筋緊張低下や運動発達遅滞を呈する小児では理学療法が有用である。具体的には、関節に負担のかかる運動は避け、体重をかけない筋力トレーニングにより筋肉の発達や協調性を促す。アスコルビン酸(ビタミンC)により内出血が軽減できる可能性がある。関節痛に対して消炎鎮痛剤を投与する場合もあるが、アセチルサリチル酸(アスピリン)の使用は避ける(内出血を増悪させる危険があるため)。大動脈拡張や僧房弁逸脱を認める際には、定期的な心エコー検査を行い、大動脈拡張に対してはβ遮断薬を投与する。妊娠中、特に妊娠後期～産褥期は、注意深いモニタリングが必要である⁹⁾。

2. 関節可動性亢進型 EDS の臨床像とマネジメント

関節可動性亢進型 EDS の患者における関節の脱臼の頻度は高く、四肢、脊椎、肋骨、胸骨、鎖骨などあ

図② エーラスダンロス症候群 (EDS) 患者の皮膚



- A. 古典型 EDS 患者における皮膚の過伸展性。患者の皮膚は引っ張ると容易に進展し、離すとすぐに元に戻る。
- B. 血管型 EDS 患者の前胸部。皮膚は薄く静脈が透けて見える。

(グラビア頁参照)

らゆる関節に生じ疼痛を伴う。脱臼は軽微な外傷によって生じ(自然発症することもある)、多くの場合は自然整復あるいは自力で整復可能である。また、本症では若年から変形性関節症を生じることが多い。さらに、脱臼や変形性関節症による疼痛とは別の慢性疼痛が深刻な問題であり、身体的および精神的な障害となりうる。一部の家系で *TNXB* 遺伝子変異が確認されているが、大多数の家系では原因遺伝子は不明である¹⁰⁾。

関節可動性亢進型 EDS のマネジメントとしては、適切な理学療法(低負荷の運動)や装具の使用による関節の安定が重要である。使いやすい筆記用具を用いて手指の負担を軽減することも有用である。関節の過伸展、負荷の強い運動、上肢に負担のかかる杖や歩行器の使用は控える。古典型と同様に、疼痛に対する鎮痛剤の投与、大動脈拡張に対する β 遮断薬の投与など病態に合った薬物療法も考慮される¹⁰⁾。

3. 血管型 EDS の臨床像とマネジメント

血管型 EDS は薄く透けて見える皮膚、易出血性、動脈・腸管・子宮の脆弱性を特徴とする常染色体優性遺伝の結合組織疾患である(図②B)。Ⅲ型コラーゲ

ンをコードする *COL3A1* が原因遺伝子として同定されている。約 50% の患者は変異 *COL3A1* 遺伝子を罹患した親から受け継ぎ、約 50% の患者は新生突然変異により発症する。血管型 EDS に罹患している成人の約 70% で、血管の破裂や解離、消化管穿孔、臓器破裂の発症を認め、これらは突然死や重度の後遺症の原因となりうる。妊婦は分娩前後の動脈破裂や子宮破裂により死亡する危険性がある¹¹⁾。

血管型 EDS のマネジメントとしては、造影 CT または MRI による頭部、胸部、大腿部の動脈病変のスクリーニングが重要である。動脈瘤や解離などの病変が見出された場合、 β 遮断薬などによる血圧コントロールを厳密に行いながら慎重に経過観察する。急性の動脈病変に対しては安静や降圧剤の投与などで可能なかぎり保存的に対処することが望ましいが、病状が進行する場合は塞栓術やステント留置といった血管内治療を考慮する。血管内治療にも反応せず状況が切迫する場合には、血管および組織脆弱性を考慮した慎重な手術治療を行う¹¹⁾。腸管破裂の予防としては緩下剤を用いた排便コントロールが有効であるが、破裂時には組織脆弱性および周術期の動脈破裂に留意しながら迅速に手術を行う。妊婦はハイリスクであり、カップルに対し十分な情報提供を行ったうえで、心臓血管外科のバックアップができる施設において、陣痛開始前のコントロールされた分娩(帝王切開のほうが安全と考えられる)を行う。

4. EDS に対するカウンセリングのポイント

EDS の診療・カウンセリングにおいて重要な点は、医療者、患者および患者の家族が疾患についての情報を可能なかぎり共有し、起こりうる合併症の早期発見、早期治療を行うことである。EDS は複数の診療科が関わることが多く、医療者間の情報共有・連携も重要である。救急の場面での対応も非常に重要であり、血管型 EDS における動脈破裂・解離、腸管破裂は高度医療機関での疾患背景を考慮した迅速な対応が必須である。診断、疾患の概要、病歴、起こりうる合併症、推奨される検査や治療法などを記載したメモの携帯が推奨される。血管外科などの各臓器の専門医の診療が必要なのはもちろんであるが、患者の全体像を把握し、患者にとって今現在何が最も優先すべき治療なのか、長期的にどのように健康管理をするのかなど、大局的な見地に立った専門医(臨床遺伝専門医など)の診療およびカウンセリングがたいへん重要である。

おわりに

筋強直性ジストロフィーとエーラスダンロス症候群を例に、治療・予防法のない成人の遺伝性疾患に対す

るカウンセリングのポイントについて解説した。治療・予防法のない疾患の患者は、主治医からも見放されて疾患について相談する場も見出せないでいるケースも少なくない。根本的な治療・予防法がないといっても、医師および患者が疾患を正確に理解し対応することで避けられる合併症も多く、患者の長期的な予後の改善

に大きな影響を及ぼす。また、疾患に対する新規の療法の開発状況など最新の医療情報を提供することにより、クライアントが将来に対する希望を見出すことができる場合もある。そして何よりも、時間をかけてクライアントの話に耳を傾けることが重要であると省を込めて考えている。

◆ 参考文献 ◆

- 1) Bird TD (updated November 2007) : GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource [database online]. Copyright, University of Washington, 1993-2009.
- 2) Brook JD, McCurrach ME, et al : Cell 68, 799-808, 1992.
- 3) Ranum LP, Rasmussen PF, et al : Nat Genet 19, 196-198, 1998.
- 4) Savkur RS, Philips AV, et al : Nat Genet 29, 40-47, 2001.
- 5) Gareiss PC, Sobczak K, et al : J Am Chem Soc 130, 16254-16261, 2008.
- 6) Brunner HG, Smeets HJ, et al : Brain 114, 2303-2311, 1991.
- 7) Beighton P, De Paepe A, et al : Am J Med Genet 77, 31-37, 1998.
- 8) Wenstrup R, De Paepe A (updated July 2008) : GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource [database online]. Copyright, University of Washington, 1993-2009.
- 9) Lévy HD (updated May 2007) : GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource [database online]. Copyright, University of Washington, 1993-2009.
- 10) Pepin MG, Byers PH (updated June 2006) : GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource [database online]. Copyright, University of Washington, 1993-2009.
- 11) Oderich GS, Sullivan TM, et al : J Vasc Surg 46, 475-484, 2007.

◆ 参考ホームページ ◆

- GeneTests
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GeneTests/>
- GENETOPIA
<http://genetopia.md.shinshu-u.ac.jp/genetopia/index.htm>
- 日本エーラスダンロス症候群協会 (友の会)
<http://ehlersdanlos-jp.net/modules/EDS2/>

特集

種々の代謝異常

結合組織脆弱疾患 —Marfan症候群と Ehlers-Danlos症候群*

古庄 知己**

Key Words : Ehlers-Danlos syndrome, Marfan syndrome, connective tissue, collagen, fibrillin-1

はじめに

Ehlers-Danlos症候群(EDS)は、皮膚・関節の過伸展性、各種組織の脆弱性を特徴とする先天性疾患の総称であり、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¹⁾。近年、主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発見されている(表1)²⁾。

Marfan症候群(MFS)は、骨格・眼・心血管症状など多系統の合併症に特徴づけられる常染色体優性遺伝疾患であり、*FBNI*遺伝子の変異により発症する³⁾。Loeys-Dietz症候群をはじめとした類縁疾患が見出されている(表2)⁴⁾。

表1 Ehlers-Danlos症候群の分類

	頻度/患者数	遺伝形式	原因遺伝子
主病型			
古典型(Classical type)	1/20,000	AD	<i>COL5A1, COL5A2</i>
関節型(Hypermobility type)	1/5,000~20,000	AD	大多数は不明, 少数例で <i>TNXB</i>
血管型(Vascular type)	1/50,000~250,000	AD	<i>COL3A1</i>
後側彎型(Kyphoscoliosis type)	1/100,000	AR	<i>PLOD</i>
多発関節弛緩型(Arthrochalasia type)	約30人	AD	<i>COL1A1*, COL1A2*</i>
皮膚脆弱型(Dermatosparaxis type)	8人	AR	<i>ADAMTS-2</i>
その他の病型			
Brittle cornea syndrome	11人	AR	<i>ZNF469</i>
EDS-like syndrome due to tenascin-XB deficiency	10人	AR	<i>TNXB</i>
Progeroid form	3人	AR	<i>B4GALT7</i>
Cardiac valvular form	4人	AR	<i>COL1A2</i>
EDS-like spondylocheirodysplasia	8人	AR	<i>SLC39A13</i>
Kosho type(D4ST-1-deficient EDS)	22人	AR	<i>CHST14</i>

AD: 常染色体優性遺伝, AR: 常染色体劣性遺伝, *COL5A1*: V型プロコラーゲン α 1鎖遺伝子, *COL5A2*: V型プロコラーゲン α 2鎖遺伝子, *TNXB*: テナシンX遺伝子, *PLOD*: リジルヒドロキシラーゼ遺伝子, *: スプライス異常によるエクソン6のスキップ, *ADAMTS-2*: プロコラーゲンIN-プロテイナーゼ遺伝子, *ZNF469*: コラーゲン生合成・組織化にかかわる転写因子の遺伝子, *B4GALT7*: β 4ガラクトース転移酵素-7(GalT-I)遺伝子, *SLC39A13*: 亜鉛トランスポーター機能を持つ蛋白の遺伝子, *CHST14*: デルマタン4-O-硫酸基転移酵素(D4ST-1)遺伝子

* Weak connect tissue diseases—Marfan syndrome and Ehlers-Danlos syndrome.

** Tomoki KOSHO, M.D.: 信州大学医学部附属病院遺伝子診療部(☎390-8621 長野県松本市旭3-1-1); Department of Medical Genetics, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Nagano 390-8621, JAPAN

本稿では、EDSおよびMFSの症状、病態、臨床的マネジメントを概説する。EDSについては、主要病型である古典型、関節型、血管型、および最近われわれが疾患概念を確立した古庄型(暫定名称)について述べる。

症 状

1. 古典型EDS

皮膚は滑らかでベルベット様、過伸展性(図1-A)、脆弱性(膝、肘、前脛部、前頭部、下顎などの真皮が容易に裂ける)を有する。創傷治癒が遅れ、癍痕が薄く伸展する(萎縮性癍痕)(図1-B)。肩、膝蓋骨、指、股、橈骨、鎖骨などが容易に脱臼するが、自然整復または自力で整復できることが多い。妊婦は、前期破水・早産(罹患胎児の場合)、会陰裂傷、分娩後の子宮・膀胱脱を生じうる⁶⁾。

2. 関節型EDS

皮膚の過伸展性は正常もしくは軽度である。関節過伸展性は顕著であり(図1-C)、脱臼・亜脱臼の頻度も高い(四肢、脊椎、肋骨・椎骨、肋骨・胸骨、鎖骨など)。自然に、もしくはごく小さい外傷によって生じ、自然整復または自身・家族・友人により整復できることが多いが、疼

痛は数時間～数日持続する。若年より変形性関節症を生じることが多い。関節痛を含めた慢性疼痛が深刻であり、身体的・精神的な障害となりうる。しばしば胃炎、胃食道逆流、過敏性腸炎といった消化器合併症を呈する⁶⁾。

3. 血管型EDS

血管破裂・解離、腸破裂、臓器破裂は70%の成人例における初発症状となる。動脈破裂は、動脈瘤、動静脈ろう、解離が先行することもあるが、自然に生じることもある。皮膚は薄く、皮下静脈が透見される(図1-D)。新生児期、内反足、先天性股関節脱臼を呈することがある。小児期、そけいヘルニア、気胸、反復性関節脱臼・亜脱臼の頻度が高い。妊婦は、分娩前後の動脈・子宮破裂により、死亡する危険性がある(～12%)⁷⁾。

4. 古庄型EDS

皮膚過伸展・脆弱性、全身関節弛緩・慢性脱臼・変形、巨大皮下血腫などの進行性結合組織脆弱性および顔貌の特徴、先天性多発関節拘縮などの発生異常に基づく特徴的な症状を呈する(図1-E～M)(表3)²⁾⁸⁾⁹⁾。

5. MFS

体幹に対して長い四肢、長い手指(図2-A, B),

表2 Marfan症候群およびその類縁疾患

	原因遺伝子	Marfan症候群と鑑別すべき臨床所見
Marfan症候群(MFS)	<i>FBN1</i>	
Loeys-Dietz症候群(LDS)	<i>TGFBR1, TGFBR2</i>	二分口蓋垂/口蓋裂、動脈蛇行、眼間開離、広汎性大動脈/動脈瘤、頭蓋骨早期癒合症、内反足、頸椎不安定性、薄くピロード様の皮膚、易出血性
Shprintzen-Goldberg症候群(SGS)	<i>FBN1</i> , ほか	頭蓋骨早期癒合症、精神遅滞
Congenital contractural arachnodactyly(CCA)	<i>FBN2</i>	先天性関節拘縮、耳介変形
Weill-Marchesani症候群(WMS)	<i>FBN1, ADAMTS10</i>	小球状水晶体、短指症、固い関節
Ectopia lentis症候群(ELS)	<i>FBN1; LTBP2, ADAMTSL4</i>	大動脈根部拡張を伴わない
Familial thoracic aortic aneurysm (家族性胸部大動脈瘤)症候群(FTAA)	<i>TGFBR1, TGFBR2, ACTA2</i>	Marfan症候群の骨格系特徴を伴わない、網状皮斑(livedo reticularis)、虹彩囊胞(iris flocculi)
二尖大動脈弁(BAV)を伴うFTAA		
動脈管開存(PDA)を伴うFTAA	<i>MYH11</i>	
Arterial tortuosity(動脈蛇行)症候群(ATS)	<i>SLC2A10</i>	全般的な動脈蛇行、動脈狭窄、特徴的顔貌

FBN1: fibrillin-1遺伝子, *TGFBR1*: transforming growth factor beta receptor 1 遺伝子, *TGFBR2*: transforming growth factor beta receptor 2 遺伝子, *FBN2*: fibrillin-2遺伝子, *ADAMTS10*: A disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motif 10遺伝子, *ACTA2*: actin $\alpha 2$ 遺伝子, *SLC2A10*: Solute carrier family 2 member 10遺伝子

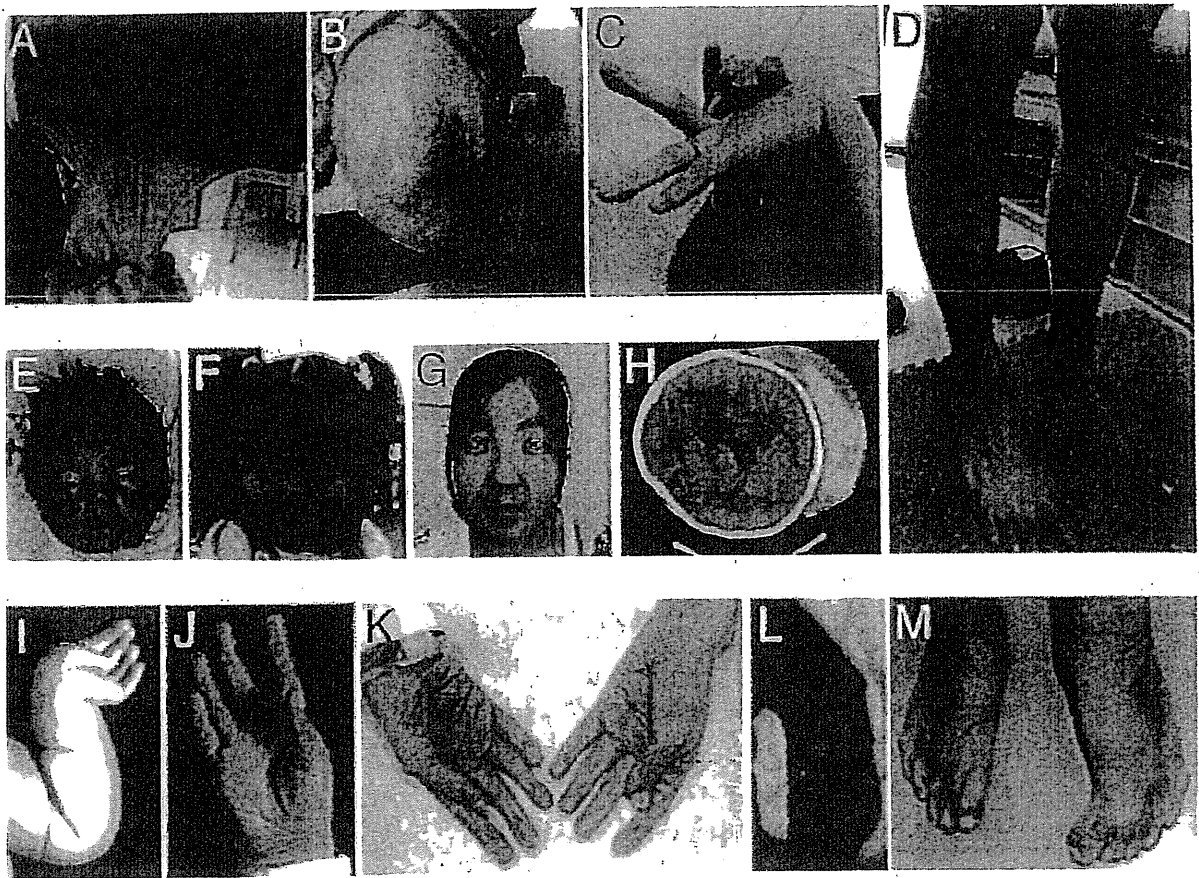


図1 Ehlers-Danlos症候群の各病型の臨床写真

A, B: 古典型EDS, 同一男性患者(30歳代). A: 皮膚過伸展性. B: 萎縮性瘢痕. C: 関節型EDS, 女性患者(27歳)における関節過伸展性. D: 血管型EDS, 女性患者(47歳)における皮下静脈透見. E~H, L, M: 古庄型EDS, 同一女性患者. E: 日齢23, 眼間開離, 小眼瞼, 眼瞼裂斜下, 短い鼻, 長い人中; 小さい口, 小下顎を認める. F: 3歳, 特徴は自立たなくなっている. G: 16歳, 面長になっている. I~K: 古庄型EDS, 別な女性患者. I: 3か月時, 内転母指を含む手指および手首の拘縮. J: 5歳, 拘縮は軽快し, 指は円筒型となる. K: 28歳, 皮膚の皺が多くなり, 早老症様の外観となる.

漏斗胸(図2-C)・鳩胸, 軽度~重度側彎, 扁平足(図2-D)などの骨格症状を呈する. 最も頻度が高い眼症状は近視であり, 本症の顕著な特徴である水晶体偏位は60%にみられる. ほかに, 網膜剥離, 緑内障, 早期発症白内障のリスクがある. 生命予後に影響する最も重要な症状は心血管症状であり, 大動脈解離に繋がるValsalva洞部の上行大動脈拡張, 僧帽弁逸脱などを呈する³⁾.

病 態

1. 古典型EDS

V型コラーゲンは, 通常 $\alpha 1$ 鎖2本と $\alpha 2$ 鎖1本からなる3本鎖構造を持ち, さまざまな組織に分布している量的には少ない線維コラーゲンである. I型コラーゲンとともに線維を構成し, そ

の線維の径を調節している. 最も頻度の高い病態は(約1/3), *COL5A1*遺伝子のナンセンス変異またはフレームシフト変異によるハプロ不全である. これにより, 正常なV型コラーゲンの量は半減すると推測されている. そのほか, *COL5A1*または*COL5A2*遺伝子のスプライス部位の変異によるexon skippingおよび3本鎖領域のグリシン残基のアミノ酸置換に基づくdominant negative効果によっても発症する⁵⁾.

2. 血管型EDS

III型コラーゲンは $\alpha 1$ 鎖のみの3本鎖構造を持ち, 皮膚, 血管, 管腔臓器の主要構成成分である. 多くは3本鎖領域のグリシン残基のアミノ酸置換に基づいて, 約1/3の例ではスプライス部位の変異によるexon skippingに基づいてdominant negative効果をきたし発症する⁷⁾.

表3 古庄型EDSの臨床症状

頭蓋顔面 泉門開大(乳幼児期) 眼間開離 小眼瞼, 眼瞼裂斜下 青色強膜 鼻柱低形成を伴った短い鼻 耳介異形成(大きい, 後傾, 低位) 口蓋異常(高口蓋, 口蓋裂) 長い人中, 薄い上口唇 小さい口/下顎低形成・後退(乳児期) 下顎突出し面長となる(学童期以降) 非対称な顔(学童期以降)	胃腸 便秘 憩室穿孔 呼吸器 (血)気胸 泌尿生殖器 腎/膀胱結石 水腎症 膀胱拡張/弛緩 そけいヘルニア 停留精巣 乳房発育不全
骨格 Marfan症候群様体型 先天性多発関節拘縮(指, 手首, 股関節, 足) 反復性/慢性関節脱臼 胸郭変形(平坦, 漏斗胸) 脊椎変形(側彎, 後側彎) 独特な形態の手指(先細り, 細い, 円筒状) 進行性の足変形(外反, 扁平, 凹)	眼 斜視 屈折異常(近視, 乱視) 緑内障/眼内圧亢進 小角膜/小眼球 網膜剥離
皮膚 過伸展性/弛緩 易出血性 脆弱性/萎縮性瘢痕 細かい/早老症様の手掌の皺 圧迫に対する過敏性 反復性皮下感染症/膿瘍	耳 聴力低下 中枢神経 脳室拡大/非対称 発達 筋緊張低下/粗大運動発達遅滞
心臓血管 先天性心疾患(ASD) 弁の異常(MVP, MR, AR, ARD) 巨大皮下血腫	

ASD: 心房中隔欠損, MVP: 僧帽弁逸脱, MR: 僧帽弁閉鎖不全, AR: 大動脈弁閉鎖不全, ARD: 上行大動脈拡張

3. 古庄型EDS

原因遺伝子 $CHST14$ は, デルマタン4-O-硫酸基転移酵素-1(D4ST-1)をコードする. 本症における進行性結合組織脆弱性は「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」に基づく(図3)²⁾¹⁰⁾.

4. MFS

$FBN1$ 遺伝子は, 細胞外マトリックスの主要な構成要素である微小線維の主たる構成蛋白fibrillin-1をコードする. 最近, fibrillin-1の持つ調節作用の異常がその病態により深くかかわっていることが明らかにされてきた. マウスモデルの検討か

ら, MFSの肺, 心臓血管, 骨格, 骨格筋病変の多くは, TGF- β の異常活性化に基づくことが示された³⁾. TGF- β は, 細胞の増殖・分化, アポトーシス, 免疫, 組織修復, 細胞外マトリックスの形成に重要な役割を持つサイトカインである. 不活性なlarge latent complex (TGF- β +latency-associated peptide+latent TGF- β binding protein)として細胞から分泌され, latent TGF- β binding proteinと相同性を有するfibrillin-1と結合し, 細胞外マトリックスにおいて不活化状態のまま貯蔵される. このプロセスがTGF- β 活性の調節にはきわめて重要である. Fibrillin-1の変異によりこの調節が異常をきたし, TGF- β の異常活性化をひき起こす³⁾. TGF- β の異常活性化は, 1型アンギ

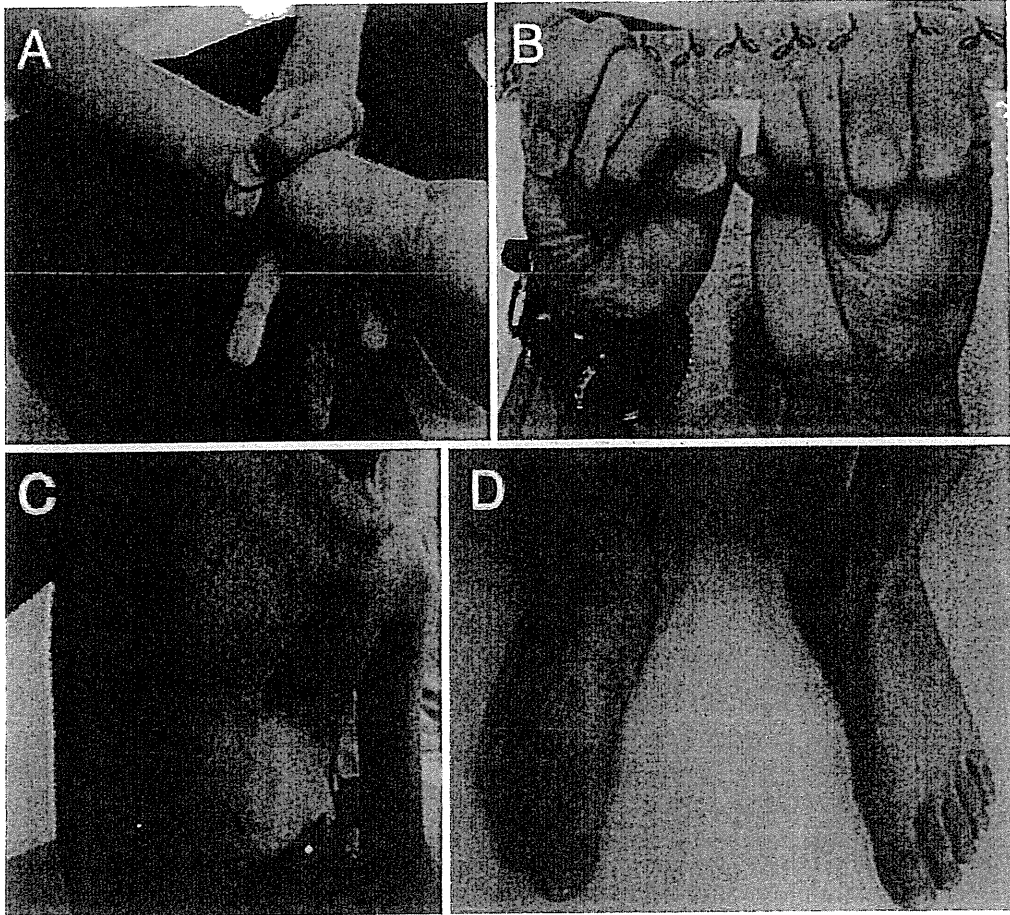


図2 Marfan症候群の臨床写真

A, C, D : 同一男児(11歳). A : Wrist sign. C : 漏斗胸. D : 扁平足. B : 男性患者(22歳), thumb sign.

オテンシン II 受容体(AT₁R)を介した経路により細胞外マトリックスの脆弱性をきたし、動脈病変に至る(図4)⁹⁾. 2型アンジオテンシン II 受容体(AT₂R)を介した経路も関与している可能性が示唆されていたが、最近の研究では動脈病変を軽減する方向で作用していることが明らかになった(図4)¹¹⁾.

臨床的マネジメント

EDS, MFSに共通している診療の要諦は、医療者(関係各科, 救急)と患者・家族が疾患についてのあらゆる情報を共有し、起こりうる合併症の早期発見・早期治療を行うことである¹²⁾.

1. 古典型EDS

診断は臨床症状に基づいて行われる(表4)¹⁾. 小児では皮膚裂傷を予防するために、前頭部、膝、脛部を保護する。裂傷の縫合は十分注意して行う。筋緊張低下、運動発達遅滞を呈する小

児では理学療法を行う。負担のかかる運動は避け、体重をかけない筋力トレーニングにより筋肉の発達・協調性を促す。妊娠中(特に後期～産褥期)は慎重に観察する。ビタミンC投与で内出血が軽減される可能性がある⁵⁾.

2. 関節型EDS

診断は臨床症状に基づいて行われる(表4)¹⁾. 適切な理学療法、補装具の使用(頸部, 肘, 手首, 手指, 膝, 足首などの関節を安定させる装具, 車椅子, 日常生活補助具の工夫), 鎮痛薬投与(重症例では麻薬の使用を含めた疼痛コントロールを考慮), 胃腸症状があればその対応, 疼痛への負担に配慮した心理カウンセリングといった対応を行う。関節の過伸展, 負荷の強い運動, 上肢に負担のかかる杖・歩行器の使用は控える⁶⁾.

3. 血管型EDS

臨床症状から疑い, 診断は培養皮膚線維芽細胞を用いたIII型コラーゲン生化学検査または遺伝子

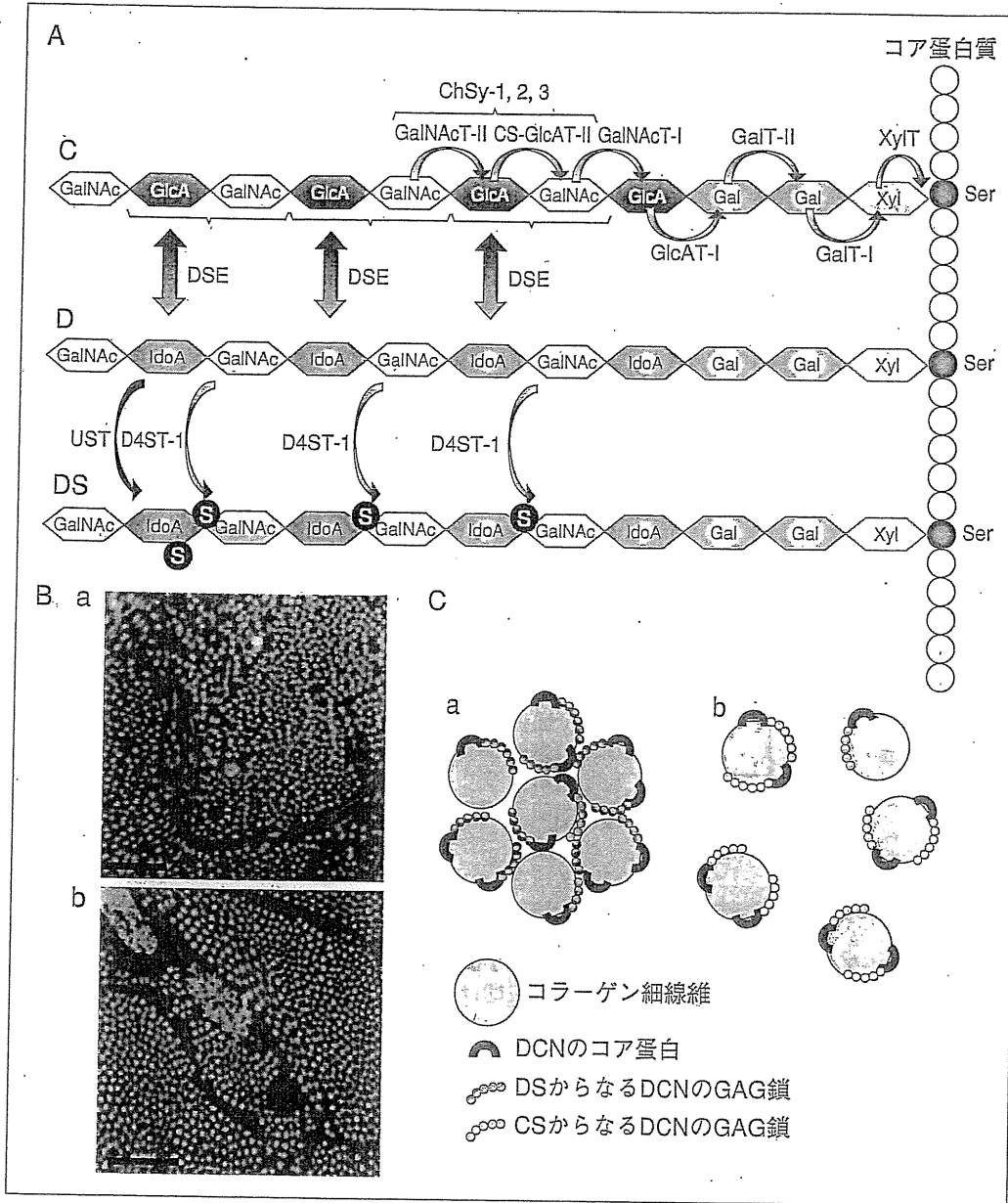


図3 古庄型EDSの病態

A: デルマトン硫酸(DS)の生合成。DSは、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリンと同様、プロテオグリカンのコア蛋白質上にある特定のセリン残基(Ser)にキシロース(Xyl)-ガラクトース(Gal)-ガラクトース(Gal)-グルクロン酸(GlcA)の4糖が結合するところから始まる。これらの反応は、それぞれキシロース転移酵素(XylT)、ガラクトース転移酵素-I(GalT-I)、ガラクトース転移酵素-II(GalT-II)、グルクロン酸転移酵素-I(GlcAT-I)によって行われる。N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)が、GalNAc転移酵素-I(GalNAcT-I)によってGlcAに転移されると、次いでCS-グルクロン酸転移酵素-II(CS-GlcAT-II)とGalNAc転移酵素-II(GalNAcT-II)により、GlcAとGalNAcが順次転移し、コンドロイチン(C)特有の[GlcA-GalNAc]₂の2糖繰り返し領域が合成される。コンドロイチン合成酵素(ChSy-1, 2, 3)は、CS-GlcAT-IIとGalNAcT-II両方の活性を持つ。ChSyファミリーによって[GlcA-GalNAc]_nの糖鎖骨格が形成された後、または、その反応の途中で、DSエピメラーゼ(DSE)により、GlcA残基のC5位のカルボキシル基が異性化し、イズロン酸(IdoA)となる。これにより、デルマトン(D)の2糖配列[IdoA-GalNAc]_nが形成される。その後、主としてデルマトン4-O-硫酸基転移酵素-1(D4ST-1)によるGalNAc残基の4位硫酸化(一部はウロノシル2-O-硫酸基転移酵素(UST)によるIdoAの2位硫酸化も)による修飾を受けて、成熟したDS鎖が合成される。古庄型ではこの硫酸化不全により、DSとして安定化せず、すべてDSEを経てCSに変換されてしまう。B: 電顕所見(×30,000)。患者(a)では、コントロール(b)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る。スケールバーは1mmを示す。C: 正常(a)、古庄型EDS(b)。D4ST-1欠損に基づきデコリン(DCN)に付加するグリコサミノグリカン(GAG)鎖の組成変化[デルマトン硫酸(DS)が消失しコンドロイチン硫酸(CS)に置換]が生じ、DCNが媒介するコラーゲン細線維のassembly不全をきたすと考えられる。

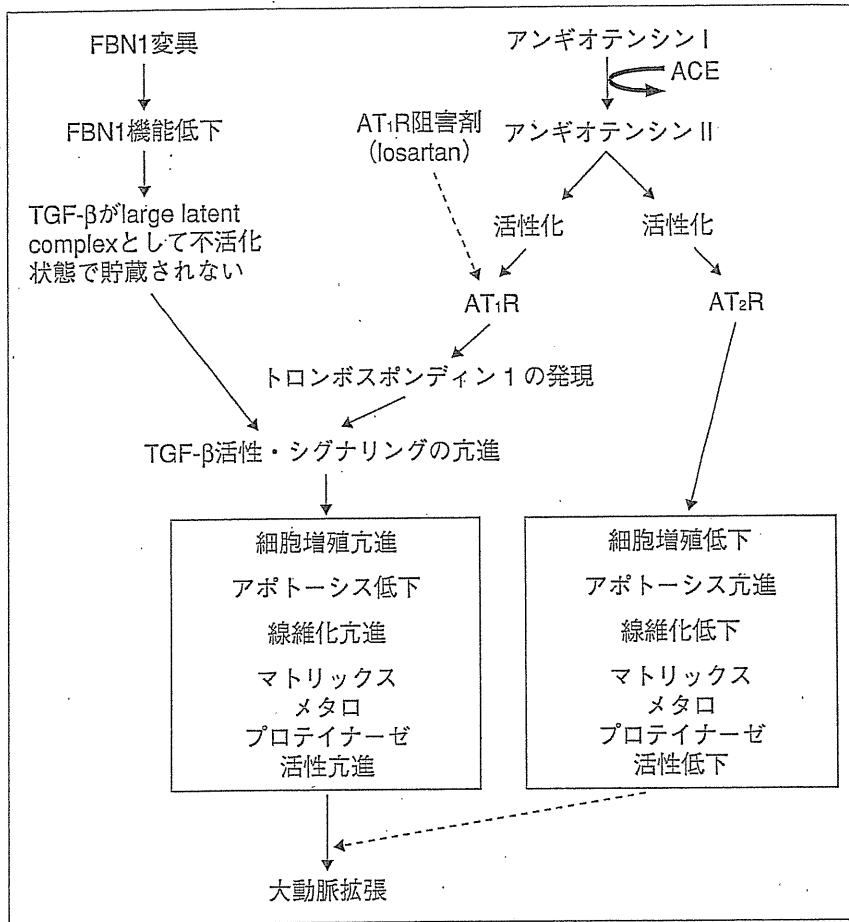


図4 Marfan症候群の病態

ACE：アンギオテンシン変換酵素. AT₁R：1型アンギオテンシンII受容体. AT₂R：2型アンギオテンシンII受容体. 点線矢印は阻害作用を示す.

検査により行われる(表4)¹⁾. 疑われたとき, 診断がついたとき, および診断後定期的に, 造影CTまたはMRIによる頭頸部, 胸部, 腹部, 下肢の動脈病変スクリーニングを行う. 瘤, 解離などの病変が見出された場合, 血圧コントロールを厳密に行う. 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刺激作用を有するceliprololの有効性に関するランダム化比較試験の結果が報告された. 投与群(100mg/日から最大400mg/日まで増量)25例と非投与群28例に無作為に分けられ, 投与群の5例, 非投与群14例が動脈病変を発症, エンドポイントに達したことから, 動脈合併症の予防効果を有すると結論づけられた¹³⁾. 急性の動脈病変(瘤, 解離)が生じた場合, 可能な限り保存的に対処する(安静, 降圧剤投与). 保存的治療によっても病状が進行する場合は塞栓やステントといった血管内治療を考慮する. 血管内治療にも反応せず, 状況が切迫する場合には, 血管お

よび組織脆弱性を考慮し慎重に手術を行う. 腸破裂の予防としては, 穏やかな緩下剤により排便をコントロールし, 破裂した場合は組織脆弱性および周術期の動脈破裂に留意しながら迅速に手術する. 妊娠はハイリスクであり, カップルに対し十分な情報提供を行った上で, 心臓血管外科のバックアップができる施設において, 陣痛開始前のコントロールされた分娩(おそらくは帝王切開の方が安全)を行う¹²⁾.

4. 古庄型EDS

新生児期, 多発関節拘縮(特に内転母指と内反足)と顔貌上の特徴から疑い, CHST14遺伝子解析で診断する. 乳幼児期, 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. その後, 整形外科, 眼科, 泌尿器科, 循環器科検診を行う. 皮膚裂傷, 関節脱臼, 巨大皮下血腫を生じやすいので, 転倒などの外傷には細心の注意を払う. 思春期以降,

表4 Ehlers-Danlos症候群各病型の診断基準

病型	大基準	小基準
古典型	皮膚過伸展性 広い萎縮性瘢痕 関節過動性	スムーズでベルベット様の皮膚 軟属腫様偽腫瘍(肘・膝など圧力のかかる部位に生じる瘢痕に付随する肉質の隆起病変) 皮下球状物(四肢骨の皮下に生じる可動性の小さく固い結節) 関節過動性による合併症(捻挫, 脱臼, 亜脱臼, 扁平足) 筋緊張低下・運動発達遅滞 内出血しやすい 組織過伸展・脆弱性による合併症(裂孔ヘルニア, 脱肛, 頸椎不安定性) 外科的合併症(術後ヘルニア) 家族歴
関節型	全身性関節過動性 皮膚症状(やわらかいが, 過伸展性はないか, あってもごく軽度) 皮膚, 軟部組織の脆弱性その他の異常(皮膚過伸展性が強い, 薄い, 萎縮性瘢痕がある. 皮膚, 臍, 靭帯, 血管, 内臓が容易に裂ける)はない	家族歴 反復性関節脱臼, 亜脱臼 慢性関節, 四肢, 背部痛 内出血しやすい 機能的腸疾患(機能的胃炎, 過敏性腸炎) 神経因性低血圧, 起立性頻脈 高く狭い口蓋 歯芽の密生
血管型	動脈破裂 腸管破裂 妊娠中の子宮破裂 家族歴	薄く, 透けた皮膚(胸部, 腹部) 内出血しやすい 特徴的顔貌(薄い口唇・人中, 細い鼻, 大きい眼) 末端早老症 小関節過動性 臍・筋肉破裂 若年発症静脈瘤 内頸動脈・海綿静脈洞ろう (血)気胸 慢性関節脱臼・亜脱臼 先天性股関節脱臼 先天性内反足 歯肉後退
後側彎型	脆弱で過伸展性のある皮膚, 薄い瘢痕, 内出血しやすい 全身性関節弛緩 出生時の重度の筋緊張低下 進行性側彎(出生時または1歳までに出現) 強膜の脆弱性, 眼球破裂	広い瘢痕性萎縮 マルファン症候群様の体型 中程度のサイズの動脈破裂 運動発達マイルストーンの軽度~中等度遅滞
多発関節弛緩型	反復性亜脱臼を伴う重度全身性関節過動性 先天性両側股関節脱臼	皮膚過伸展性 組織脆弱性(瘢痕性萎縮を含む) 内出血しやすい 筋緊張低下 後側彎 X線上軽度の骨密度低下
皮膚脆弱型	重度の皮膚脆弱性 垂れ下がりゆるんだ皮膚	柔らかくたるんだ皮膚の触感 内出血しやすい 前期破水 大きいヘルニア(臍, そけい)

(血)気胸や憩室穿孔を発症すればその治療を行う²⁾⁹⁾.

5. MFS

従来, Ghentの診断基準¹⁴⁾(表5)に基づいて臨床診断が行われてきた. しかし, 項目の妥当性,

表5 Marfan症候群の診断におけるGhentの基準

系統	大基準	小基準	関与
家族歴	1度近親がMarfan症候群の診断基準を満たす患者 既知のFBNI変異を有する 家族内の診断が明らかなMarfan症候群患者が FBNI近傍のハプロタイプを共有	なし	
骨格	以下の4項目を満たす 鳩胸 手術を要する漏斗胸 上節-下節比の減少またはarm span/身長 > 1.05 wrist sign (図 2-A), thumb sign (図 2-B) 側彎 (>20°) または脊椎すべり症 肘関節伸展制限 (<170°) 扁平足 (内踝の内側変位による) 寛骨臼突出	中等度の漏斗胸 関節可動性亢進 高口蓋 (歯芽の密生を伴う) 顔貌上の特徴 (長頭症, 頬部低形成, 眼球陥没, 下顎後退, 眼裂斜下)	大基準 2項目 大基準 1項目 および 小基準 2項目
眼	水晶体変位	平坦な角膜 (角膜鏡で測定) 眼軸長増加 (>23.5mm, 超音波検査で測定) 虹彩または毛様体筋低形成 (縮瞳制限をきたす)	小基準 2項目
心血管	上行大動脈拡張 (少なくともValsalva洞部, 大動脈弁逆流はあってもなくてもよい) 上行大動脈解離	僧帽弁逸脱 (僧帽弁逆流はあっても なくてもよい) 肺動脈拡張 (<40歳, 肺動脈弁狭窄や末梢性肺 動脈狭窄などの原因がない) 僧帽弁輪石灰化 (<40歳) 下行または腹部大動脈拡張または解離 (<50歳)	小基準 1項目
肺	なし	自然気胸 肺尖部のbleb	小基準 1項目
皮膚	なし	体重増加, 妊娠, 反復性外力と関係のない 皮膚線条 反復性または切開痕ヘルニア	小基準 1項目
硬膜	腰仙部硬膜拡張 (CTまたはMRIで観察)	なし	

発端者の診断: 2系統臓器が大基準を満たし, ほかに1系統臓器の関与. 既知の遺伝子変異が検出された場合, 1系統臓器が大基準を満たし, ほかに1系統臓器の関与.

発端者の血縁者の診断: 家族の中に1系統臓器の大基準を満たす者がいて, 本人の1系統臓器の大基準, ほかに1系統臓器の関与あり.

臨床症状の幅や鑑別すべき類縁疾患の存在, さらに診断に伴う弊害 (保険加入, 将来の人生設計における制限) などの問題が指摘され, 最近改訂版が示された (表6)⁴⁾. 最も重要な大動脈病変の対応については, β 遮断薬投与はMFSと診断されたすべての患者に行われるべき標準的治療である³⁾. Atenololがよく使われ, 心拍数を最大に近い運動後に100/分 (5歳以上) 未満になるよう微調整する³⁾. 病態の解明に基づく新たな治療戦略として, マウスモデルの検討によりAT₁R阻害作用を持つ降圧剤losartanが, 出生前からの投与で大動脈拡張を予防し, ヒトの思春期に相当する2か月からの投与で大動脈病変を改善させた¹⁵⁾. 中等度から重度の大動脈拡張を有する小児18例

に対して, β 遮断薬に加えてAT₁R阻害薬 (多くはlosartan 1.4mg/kg/日) が投与され, 大動脈根部径の拡張率が有意に減少した¹⁶⁾. 現在, losartanの有効性に関する多施設共同ランダム化コントロール試験 (米国ではlosartan対atenololの比較¹⁷⁾, 欧州では β 遮断薬が投与されている患者におけるlosartan対placeboの比較¹⁸⁾) が行われている. Valsalva洞部の径が5cmに達したら, 急性大動脈解離を予防するため手術 (拡張部を弁つきgraftで置換するBentall術) を行う. 早期発症大動脈解離の家族歴; 拡張の進行度, 大動脈弁閉鎖不全の重症度, 心室機能, 女性患者の場合には妊娠の希望, また自己弁温存術を希望する場合はより早い段階での手術を考慮する³⁾.

表 6 Marfan症候群(MFS)および類縁疾患に関する改訂Ghentの診断基準

家族歴がない場合

- (1) 上行大動脈拡張 (Valsalva洞部での径の Z score ≥ 2 または大動脈根部解離) および水晶体偏位があれば MFS と診断*。
- (2) 上行大動脈拡張 (Valsalva洞部での径の Z score ≥ 2 または大動脈根部解離) および *FBNI* 変異^b があれば MFS と診断。
- (3) 上行大動脈拡張 (Valsalva洞部での径の Z score ≥ 2 または大動脈根部解離) および多系統症状[#] (7 点以上) があれば MFS と診断*。
- (4) 水晶体偏位, *FBNI* 変異^b, および, 上行大動脈拡張[#] があれば MFS と診断。
 - ・水晶体偏位があり (多系統症状はあってもなくても), *FBNI* 変異^b はあっても上行大動脈拡張 (Valsalva洞部での径の Z score ≥ 2 または大動脈根部解離) の有無が不明, または, *FBNI* 変異^b がない場合, 水晶体偏位症候群 (Ectopia lentis syndrome ; ELS) と診断。
 - ・上行大動脈径の軽度拡張 (Valsalva洞部での径の Z score < 2 または大動脈根部解離) があり, 多系統症状[#] (少なくとも 1 つの骨格症状を含み合計 5 点以上) があるが, 水晶体偏位がない場合, 近視・僧帽弁逸脱・ボーダーライン大動脈根部拡張・皮膚線条・骨格症状を含む表現型 (myopia, mitral valve prolapse, borderline (Valsalva洞部での径の Z score < 2) aortic root dilatation, striae, skeletal findings phenotype ; MASS) と診断。
 - ・僧帽弁逸脱, 上行大動脈径の軽度拡張 (Z score < 2 または大動脈根部解離), 多系統症状[#] (5 点未満) があるが, 水晶体偏位がない場合, 僧帽弁逸脱症候群 (mitral valve prolapse syndrome ; MVPS) と診断。

家族歴がある場合

- (5) 水晶体偏位および上記で診断された MFS の家族歴があれば MFS と診断。
- (6) 多系統症状[#] (7 点以上) および上記で診断された MFS の家族歴があれば MFS と診断*。
- (7) 上行大動脈拡張 (20 歳以上で Valsalva洞部での径の Z score ≥ 2 , 20 歳未満で Valsalva洞部での径の Z score ≥ 3) および上記で診断された MFS の家族歴があれば MFS と診断*。

* Shprintzen-Goldberg 症候群, Loey-Dietz 症候群, 血管型 EDS の臨床的特徴がない, または, 必要に応じて *TGFBR1* および *TGFBR2* 遺伝子検査や III 型コラーゲン生化学検査または *COL3A1* 遺伝子検査を行った後に診断。

[#] 多系統症状のスコアリング

- ・ Wrist sign および thumb sign → 3 点 (どちらか → 1 点)
- ・ 鳩胸 → 2 点 (漏斗胸または胸郭左右差 → 1 点)
- ・ 足変形 → 2 点 (単純な扁平足 → 1 点)
- ・ 気胸 → 2 点
- ・ 硬膜拡張 → 2 点
- ・ 寛骨臼突出 → 2 点
- ・ 上節/下節比の減少および arm span/身長比の増加および重度側彎がないこと → 1 点
- ・ 側彎または胸腰椎後彎 → 1 点
- ・ 肘関節進展制限 → 1 点
- ・ 顔貌上の特徴 (長頭, 眼球陥凹, 眼瞼裂斜下, 頬部低形成, 下顎後退のうち 3 項目以上) → 1 点
- ・ 皮膚線条 → 1 点
- ・ 近視 (3 ジオプトリを超える) → 1 点
- ・ 僧帽弁逸脱 (あらゆるタイプ) → 1 点

すべてを満たすと 20 点, 7 点以上で多系統症状の関与ありと判断。

^b *FBNI* 変異の判断基準

- ・ Marfan 症候群家系において過去に認められている変異
- ・ de novo (新規の) 変異 (社会的父親が遺伝学的父親であると確認されていること, 両親に症状がないこと, 変異が下記のカテゴリーに属すること)
- ・ ナンセンス変異
- ・ 欠失または挿入変異 (フレームシフトがあっても, なくても)
- ・ スプライス変異 (標準的な GT-AG ルールを障害するもの, または, mRNA/cDNA レベルでスプライス異常が示されたもの)
- ・ ミスセンス変異 (システイン残基を置換するもの, または, 新たにシステイン残基が生じるもの)
- ・ ミスセンス変異 [進化的に保存されている EGF のコンセンサス配列 "(D/N)X(D/N)(E/Q)Xm(D/N)Xn(Y/F)" を障害するもの. m および n はさまざまな数のアミノ酸残基を示す. D はアスパラギン酸を, N はアスパラギン酸を, E はグルタミン酸を, Q はグルタミンを, Y はチロシンを, F はフェニルアラニンを示す].
- ・ その他のミスセンス変異
- ・ 6 回以上の減数分裂において *FBNI* 遺伝子と連鎖

文 献

- 1) Beighton P, De Paepe A, Steinmann B, et al. Ehlers-Danlos syndrome : revised nosology, Villefranche, 1997. Ehlers-Danlos National Foundation (USA) and Ehlers-Danlos Support Group (UK). *Am J Med Genet* 1998 ; 77 : 31.
- 2) 古庄知己. デルマトン4-O-硫酸基転移酵素-1欠損に基づく新型エーラスダロス症候群の発見と疾患概念の確立. *信州医学雑誌* 2011 ; 59 : 305.
- 3) Dietz HC (Dec 2011). Marfan syndrome. In : GeneReviews at GeneTests : Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle, 1993-2006. Available from : URL : <http://www.genetests.org>. Accessed Dec 26, 2011.
- 4) Loeys BL, Dietz HC, Braverman AC, et al. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *J Med Genet* 2010 ; 47 : 476.
- 5) Malfait F, Wenstrup R, De Paepe A (Aug 2011). Ehlers-Danlos syndrome, Classic type. In : GeneReviews at GeneTests : Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle, 1993-2006. Available from : URL : <http://www.genetests.org>. Accessed Dec 28, 2011.
- 6) Levy HP (Dec 2010). Ehlers-Danlos syndrome, Hypermobility type. In : GeneReviews at GeneTests : Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle, 1993-2006. Available from : URL : <http://www.genetests.org>. Accessed Dec 28, 2011.
- 7) Pepin MG, Byers PH (May 2011). Ehlers-Danlos syndrome, Vascular type. In : GeneReviews at GeneTests : Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle, 1993-2006. Available from : URL : <http://www.genetests.org>. Accessed Dec 28, 2011.
- 8) Kosho T, Miyake N, Mizumoto S, et al. 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 ; 32 : 1507.
- 9) Shimizu K, Okamoto N, Miyake N, et al. 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 A* 2011 ; 155 : 1949.
- 10) Miyake N, Kosho T, Mizumoto S, et al. Loss-of-function mutations of *CHST14* in a new type of Ehlers-Danlos syndrome. *Hum Mutat* 2010 ; 31 : 966.
- 11) Habashi JP, Doyle JJ, Holm TM, et al. Angiotensin II type 2 receptor signaling attenuates aortic aneurysm in mice through ERK antagonism. *Science* 2011 ; 332 : 361.
- 12) 古庄知己. Ehlers-Danlos症候群の臨床・疫学. *日本胸部臨床* 2011 ; 70 : 329.
- 13) Ong KT, Perdu J, De Backer J, et al. Effect of celiprolol on prevention of cardiovascular events in vascular Ehlers-Danlos syndrome : a prospective randomized, open, blinded-endpoints trial. *Lancet* 2011 ; 376 : 1476.
- 14) De Paepe AM, Devereux RB, Dietz HC, et al. Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome. *Am J Med Genet* 1996 ; 62 : 417.
- 15) Habashi JP, Judge DP, Holm TM, et al. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science* 2006 ; 312 : 117.
- 16) Brooke BS, Habashi JP, Judge DP, et al. Angiotensin II receptor blockade and aortic-root dilation in Marfan's syndrome. *N Engl J Med* 2008 ; 358 : 2787.
- 17) Larco RV, Dietz HC, Wruck LM, et al. Rationale and design of a randomized clinical trial of beta blocker therapy (atenolol) vs. angiotensin II receptor blocker therapy (losartan) in individuals with Marfan syndrome. *Am Heart J* 2007 ; 154 : 624.
- 18) Müberg K, de Nobele S, Devos D, et al. The Ghent Marfan Trial—A randomized, double-blind placebo controlled trial with losartan in Marfan patients treated with β -blockers. *Int J Cardiol* 2011 Jan 14 [Epub ahead of print].

Loss-of-Function Mutations of *CHST14* in a New Type of Ehlers-Danlos Syndrome

Noriko Miyake,^{1*†} Tomoki Kosho,^{2†} Shuji Mizumoto,^{3†} Tatsuya Furuichi,⁴ Atsushi Hatamochi,⁵ Yoji Nagashima,⁶ Eiichi Arai,⁷ Kazuo Takahashi,⁸ Rie Kawamura,² Keiko Wakui,² Jun Takahashi,⁹ Hiroyuki Kato,⁹ Hiroshi Yasui,¹⁰ Tadao Ishida,¹⁰ Hirofumi Ohashi,¹¹ Gen Nishimura,¹² Masaaki Shiina,¹³ Hiroto Saitsu,¹ Yoshinori Tsurusaki,¹ Hiroshi Doi,¹ Yoshimitsu Fukushima,² Shiro Ikegawa,⁴ Shuhei Yamada,³ Kazuyuki Sugahara,³ and Naomichi Matsumoto^{1*}

¹Department of Human Genetics, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Yokohama, Japan; ²Department of Medical Genetics, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Japan; ³Laboratory of Proteoglycan Signaling and Therapeutics, Hokkaido University Graduate School of Life Science, Sapporo, Japan; ⁴Laboratory for Bone and Joint Disease, Center for Genomic Medicine, RIKEN, Tokyo, Japan; ⁵Department of Dermatology, Dokkyo Medical University, School of Medicine, Tochigi, Japan; ⁶Department of Molecular Pathology, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Yokohama, Japan; ⁷Department of Pathology, Saitama Medical University, Saitama, Japan; ⁸Department of Environmental Immuno-Dermatology, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Yokohama, Japan; ⁹Department of Orthopedics, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Japan; ¹⁰First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University, Sapporo, Japan; ¹¹Division of Medical Genetics, Saitama Children's Medical Center, Saitama, Japan; ¹²Department of Radiology, Tokyo Metropolitan Kiyose Children's Hospital, Tokyo, Japan; ¹³Department of Biochemistry, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Yokohama, Japan

Communicated by Jürgen Horst

Received 17 March 2010; accepted revised manuscript 24 May 2010.

Published online 8 June 2010 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/humu.21300

ABSTRACT: Ehlers-Danlos syndrome (EDS) is a heterogeneous connective tissue disorder involving skin and joint laxity and tissue fragility. A new type of EDS, similar to kyphoscoliosis type but without lysyl hydroxylase deficiency, has been investigated. We have identified a homozygous *CHST14* (carbohydrate sulfotransferase 14) mutation in the two familial cases and compound heterozygous mutations in four sporadic cases. *CHST14* encodes dermatan 4-O-sulfotransferase 1 (D4ST1), which transfers active sulfate from 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate to position 4 of the *N*-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) residues of dermatan sulfate (DS). Transfection experiments of mutants and enzyme assays using fibroblast lysates of patients showed the loss of D4ST1 activity. *CHST14* mutations altered the glycosaminoglycan (GAG) components in patients' fibroblasts. Interestingly, DS of decorin proteoglycan, a key regulator of collagen fibril assembly, was completely lost and replaced by chondroitin sulfate (CS) in the patients' fibroblasts, leading to decreased flexibility of GAG chains. The loss of the decorin DS proteoglycan due to *CHST14* mutations may preclude proper collagen bundle formation or maintenance of collagen bundles while the sizes and shapes of collagen fibrils are unchanged as observed in the patients' dermal tissues. These findings indicate the important role of decorin DS

in the extracellular matrix and a novel pathomechanism in EDS.

Hum Mutat 31:966–974, 2010. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: Ehlers-Danlos syndrome; EDS; *CHST14*; dermatan sulfate; dermatan 4-O-sulfotransferase 1; D4ST1; collagen bundle formation; decorin

Introduction

Ehlers-Danlos syndrome (EDS) is a heterogeneous connective tissue disorder characterized by joint and skin laxity and tissue fragility [Steinmann et al., 2002], affecting as many as 1 in 5,000 individuals. The pathomechanisms of EDS consist of dominant-negative effects of mutant procollagen α -chains, α -chain haploinsufficiency, and deficiency of collagen-processing enzymes [Mao and Bristow, 2001]. In a revised nosology [Beighton et al., 1998], EDS was classified into six major types as well as additional minor forms. We previously described two unrelated patients showing characteristic facial and skeletal features with partial similarity to kyphoscoliosis type EDS but without lysyl hydroxylase deficiency (EDS-VIB) [Kosho et al., 2005]. Through long-term clinical evaluation of them as well as additional four unrelated patients including one reported previously [Yasui et al., 2003], we confirmed that these patients represent a new type of EDS [Kosho et al., 2010]. The evidence that two of six probands were born between consanguineous parents (Fig. 1A) suggests that this disease is inherited in an autosomal recessive fashion. Thus, we performed homozygosity mapping to find the disease-causative gene and successfully identified pathological mutations in the carbohydrate sulfotransferase 14 (*CHST14*: GenBank reference sequence, NM_130468.3) gene, in all six probands. *CHST14* encodes dermatan 4-O-sulfotransferase 1 (D4ST1), which transfers active sulfate to the *N*-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) residues of dermatan sulfate (DS). Furthermore, we

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

[†]The first three authors contributed equally to this article.

*Correspondence to: Noriko Miyake, Department of Human Genetics, Yokohama City University Graduate School of Medicine, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan. E-mail: nmiyake@yokohama-cu.ac.jp or Naomichi Matsumoto, Department of Human Genetics, Yokohama City University Graduate School of Medicine, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan. E-mail: naomat@yokohama-cu.ac.jp

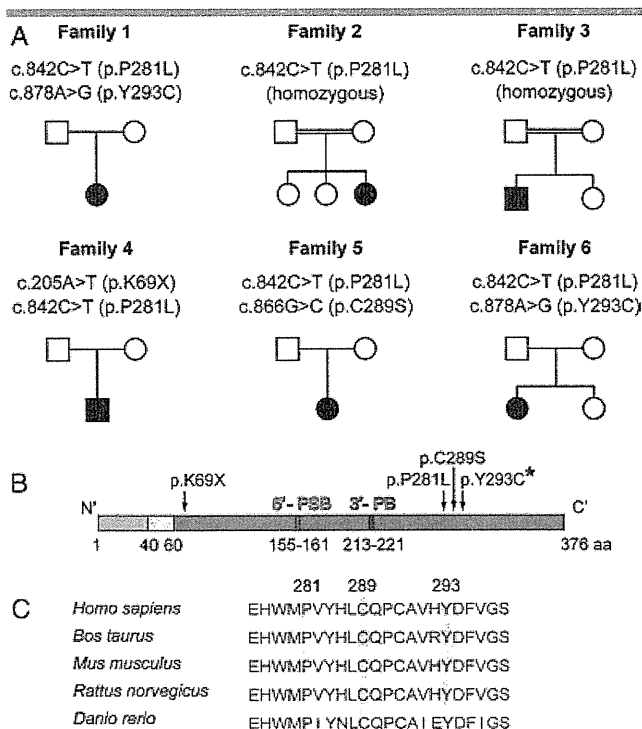


Figure 1. *CHST14* mutations in the patients. **A:** Pedigrees of the patients. Mutations in both alleles were found in all. **B:** A schematic representation of D4ST1 encoded by *CHST14*. Arrows indicate the position of mutations found in the patients. The red and blue boxes indicate a 5'-phosphosulfate binding site (5'-PSB) and a 3'-phosphate binding site (3'-PB), respectively. Light blue, yellow, and purple boxes denote cytoplasmic, transmembrane, and luminal regions, respectively. *p.Y293C (c.878A>G) is the same missense mutation identified in the Japanese ATCS sibs reported [Dünder et al., 2009]. **C:** D4ST1 amino acid alignment for three missense mutations evolutionally conserved.

conducted pathological and glyco-biological investigations to reveal the pathomechanism of this disease.

Materials and Methods

Subjects

We analyzed six Japanese patients clinically diagnosed as showing a specific type of EDS [Kosho et al., 2005, 2010] in this study. Briefly, they clinically resemble the kyphoscoliosis type EDS characterized by joint laxity, progressive scoliosis, tissue fragility with atrophic scars, easy bruising, arterial rupture, and Marfanoid habitus. However, the lysyl hydroxylase deficiency, which is the reliable diagnostic test for the kyphoscoliosis type, was not observed in the probands [Kosho et al., 2005, 2010]. One of the authors (T.K.) evaluated all cases. This study was approved by the institutional review boards of Yokohama City University School of Medicine, Shinshu University School of Medicine, and Hokkaido University Graduate School of Advanced Life Science. Informed consent was obtained from all subjects involved in this study.

Mapping and Mutation Analysis

We performed the whole genome linkage analysis using Affymetrix Human Mapping single nucleotide polymorphism (SNP) 10K XbaI 142 2.0 array (Affymetrix, St. Clara, CA) in two affected probands (patients 2 and 3) and six unaffected

members from two consanguineous families. Haplotype analysis was performed using seven microsatellite markers (*D15S1002*, *D15S1007*, *D15S118*, *D15S1044*, *D15S214*, *D15S978*, and *D15S117*) purchased from Applied Biosystems (Bedford, MA). These markers were designed based on the Marshfield genetic map (<http://research.marshfieldclinic.org/genetics>). We screened three affected individuals (patients 1, 2, and 3) for mutations in seven genes (*THBS1*, *FSIPI*, *VSP39*, *MEIS2*, *DLA*, *CHAC1*, and *CHST14*) among 109 known genes within the 7.3-Mb candidate locus. After identifying a mutation, we only screened *CHST14* (NM_130468.3) in the remaining individuals (patients 4, 5, and 6). We amplified genomic DNA by PCR using four primer sets (sequences available on request). Nucleotide changes found in the patients were checked in 376 Japanese control samples (752 alleles). Compound heterozygosity was confirmed by direct sequencing of the patients' parents or allele specific sequencing after cloning of respective regions covering two different mutation sites of *CHST14*. Nucleotide numbering reflects cDNA numbering with +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon in the reference sequence, according to journal guidelines (www.hgvs.org/mutnomen). The initiation codon is codon 1.

Primary Fibroblast Culture

We obtained skin fibroblasts from patient 1 at age 6 years, her mother at 27 years, and patient 3 at 29 years. Their age- and sex-adjusted normal controls (a 6-year-old girl: control 1 and a 36-year-old man: control 2) were purchased from Japan Health Sciences Foundation (<http://www.jhsf.or.jp/>). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Sulfotransferase Assays

COS-7 cells transiently transfected with the N'-V5-D4ST1 vectors using FuGENE™ 6 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) and human fibroblasts were lysed with 200 µl of M-PER[®] mammalian protein extraction reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). Sulfotransferase activities of each cell lysate toward dermatan, chemically desulfated DS were assayed as described before [Mikami et al., 2003]. The [³⁵S]sulfate incorporation was quantified by determination of the radioactivity in the flow-through fractions of the gel filtration chromatography by liquid scintillation counting.

Disaccharide Composition Analysis of Chondroitin (CS)/DS Chains Isolated from Fibroblasts

Cell lysates of fibroblasts cultured on 100-mm plates were digested with actinase E (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) and GAG-peptides were recovered by 80% ethanol as described [Uyama et al., 2006]. After being desalted using a centrifugal filter, Amicon[®] Ultra-4 (Ultracel-3k, Millipore Corp., Billerica, MA), the GAG-peptides were digested with CSase ABC from *Proteus vulgaris* (EC 4.2.2.20) (Seikagaku Corp., Tokyo, Japan) [Yamagata et al., 1968], a mixture of CSase AC-I from *Flavobacterium heparinum* (EC 4.2.2.5) (Seikagaku Corp.) [Yamagata et al., 1968], and AC-II from *Arthrobacter aurescens* (EC 4.2.2.5) (Seikagaku Corp.) [Hiyama and Okada, 1975], or CSase B from *Flavobacterium heparinum* (EC 4.2.2.19) (IBEX Technologies, Kawasaki, Japan) [Michelacci and Dietrich, 1974]. The digests were labeled with a fluorophore 2-aminobenzamide (2AB) and aliquots

of the 2AB-derivatives of CS/DS oligosaccharides were analyzed by anion-exchange HPLC on a PA-03 column (YMC Co., Kyoto, Japan) as previously described [Kinoshita and Sugahara, 1999].

Immunoblotting

Each cell lysate of COS-7 cells expressing the recombinant N'-V5-D4ST1 was subjected to SDS-PAGE using a 10–20% SDS-polyacrylamide gradient gel. The serum-free conditioned medium from fibroblast cultures was collected and concentrated using Amicon Ultra-4 filters (Ultracel-30k). An aliquot of the sample was digested with CSase ABC, CSase AC, CSase B, or buffer alone, and each digest was subjected to SDS-PAGE using a 7.5% SDS-polyacrylamide gel. Immunoblotting was carried out using anti-V5 antibody (Invitrogen) for D4ST1-transfected cells or antihuman decorin antibody (clone 115402; R&D Systems, Minneapolis, MN) for secreted decorin DS proteoglycan from fibroblasts.

PAI1 and SMAD7 Expression Analysis with TGF- β 1 Stimulation

Fibroblasts were grown to 70–80% confluence in 24-well multiplates and transfected with 200 ng of empty, wild-type, or mutant *CHST14* expression vector, using FuGENE 6. At 24 hr after transfection, cells were transferred to low serum medium (0.2% FBS) and, after 8 hr treated with TGF- β 1 (1 ng/ml; PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ) for 24 hr. Total RNA was extracted using the SV-Total RNA Isolation system (Promega, Madison, WI). Randomly primed cDNA was synthesized using the Taqman Multiscribe Reverse Transcriptase kit (Applied Biosystems). Real-time PCR was carried out on the StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems) using the QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen, Tokyo, Japan). The following primers were used for amplification: *CHST14*, 5'-CTATGAGAGGCTGGAGGCTG-3' and 5'-AGGCAAAGAGGGAGAAGTCC-3'; *PAI1*, 5'-CAGACCAAGAGCCTCTCCAC3' and 5'-GACTGTTCC-TGTGGGGTTGT-3'; *SMAD7*, 5'-TTGCTGTGAATCTTACGGGA-3' and 5'-CCAGATAATTCGTTCCCCCT-3'; and *GAPDH*, 5'-ACCA-CAGTCCATGCCATCAC-3' and 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'.

Reporter Gene Assay

Fibroblasts were grown to 70–80% confluence in 24-well multiplates and transfected with plasmid DNA mixtures using FuGENE 6. The DNA mixture involved 100 ng of SBE4-luc vector, 200 ng of empty, wild-type, or mutant *CHST14* expression vector, and 25 ng of a reference vector, pRL-TK. The SBE4-Luc vector is a TGF- β -responsive reporter containing four tandem copies of a SMAD-binding element (SBE) linked to luciferase [Zawel et al., 1998]. At 24 hr after transfection, cells were transferred to low serum medium (0.2% FBS) and, after 8 hr, treated with TGF- β 1 (1 ng/ml) for a further 24 hr. Luciferase activities were measured using the PG-DUAL-SP reporter assay system (Toyo Ink., Tokyo, Japan) and a Lumat LB 9507 luminometer (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Germany). Relative luciferase activity was calculated by normalizing the transfection efficiency of Renilla luciferase activity against the reference vector.

SMAD2 Phosphorylation with TGF- β 1 Stimulation

Fibroblasts were grown to 70–80% confluence in six-well multiplates and were transfected with 1.5 μ g of empty, wild-type, or mutant *CHST14* expression vector, using FuGENE 6. At 24 hr after transfection, cells were transferred to low serum medium

(0.2% FBS) and, after 8 hr, were treated with TGF- β 1 (1 ng/ml) for 30 min. Cells were lysed using M-PER protein extraction kits (Pierce, Rockford, IL) containing a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Proteins in the cell lysate were separated on SDS-PAGE gels and electrophoretically transferred to PVDF membranes. After blocking with 5% nonfat dry milk in PBS-Tween, the membranes were incubated first with antibodies against phospho-SMAD2 or SMAD2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) and then with goat polyclonal antibodies against rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase (Cell Signaling Technology). Band intensities were measured using ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Pathology

Skin specimens were obtained from the upper arms of patients 5 and 6. For light microscopy using a BX51 microscope (Olympus, Tokyo, Japan), skin specimens were fixed with 20% buffered neutral formalin solution and 3–5- μ m sections were stained with H&E. For transmission electron microscopy, skin specimens were fixed in 2.5% glutaraldehyde for 2 hr, postfixed in 1% osmium tetroxide for 2 hr, dehydrated in a graded ethanol series, and embedded in epoxy resin (Epon 812, TAAB, Berks, UK). Semithin sections (4 μ m) were stained with toluidine blue. Ultrathin sections (100 nm) were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a transmission electron microscope (JEM-1011, JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

Statistical Analyses

All values are described as mean \pm SEM. Where appropriate, we assessed between-groups effects by unpaired *t* tests for two groups and ANOVA with Dunnett's adjustment for more than two groups using GraphPad Prism 5 for Windows, version 5.02 (www.graphpad.com).

The detailed methods are described in the Supp. Methods.

Results

Genetic Analysis

We performed homozygosity mapping of two independent consanguineous families (families 2 and 3) and identified the largest 8.15-Mb homozygous region at chromosome 15q14–q15.3 with the maximum LOD Score 2.885, and by using additional microsatellite markers narrowed it down to a 7.3-Mb region (Supp. Fig. S1). Among 109 known genes within this region, the *CHST14* gene (encoding D4ST1) harbored the same homozygous missense mutation (c.842C>T: p.P281L) in the two families and compound heterozygous mutations in the other four (Fig. 1A and B). Mutations include one nonsense (c.205A>T: p.K69X) and three missense mutations (c.842C>T: p.P281L, c.866G>C: p.C289S, and c.878A>G: p.Y293C) occurring at evolutionally conserved amino acids (Fig. 1C). They were absent in 376 Japanese normal controls.

Sulfotransferase Activity

D4ST1 transfers a sulfate group from 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate to position 4 of the *N*-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) residues of DS, which is abundantly expressed in skin, aortic wall, tendon, and bone [Penc et al., 1998]. Mutant D4ST1 proteins showed significantly decreased sulfotransferase activity towards dermatan (Fig. 2A) regardless of similar expression levels (Fig. 2B). The sulfotransferase activity was also measured in the