

201231174A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業

デルマタン4-O-硫酸基転移酵素-1欠損に基づく
エーラスダンロス症候群の病態解明と治療法の開発

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 古庄 知己

平成25(2013)年 3月

目 次

I. 平成 24 年度構成員名簿	1
II. 総括研究報告	
デルマトン 4-O- 硫酸基転移酵素 -1 欠損に基づく エーラスダンロス症候群 (DDEDS) の病態解明と治療法の開発	3
古庄知己 (信州大学医学部附属病院遺伝子診療部)	
III. 分担研究報告	
1. DDEDS の臨床的検討	24
古庄知己 (信州大学医学部附属病院遺伝子診療部)	
福嶋義光 (信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座)	
旗持 淳 (獨協医科大学皮膚科)	
2. DDEDS の遺伝子解析状況	29
三宅紀子、松本直通 (横浜市立大学医学研究科遺伝学)	
3. DDEDS の病理学的検討	35
小林身哉 (金城学院大学・生活環境学部食環境栄養学科)	
中山 淳 (信州大学大学院医学系研究科・分子病理学)	
古庄知己 (信州大学医学部附属病院遺伝子診療部)	
4. DDEDS の糖鎖医学的検討	43
水本秀二、菅原一幸 (北海道大学大学院先端生命科学研究院 プロテオグリカンシグナリング医療応用研究室)	
5. DDEDS 患者由来 iPS に関する研究	46
岳鳳鳴、佐々木克典 (信州大学医学部・組織発生学講座)	
江良拓実 (熊本大学発生医学研究所・幹細胞誘導分野)	
6. DDEDS のモデルマウスの作製および遺伝子治療の基盤研究	56
岡田尚巳、武田伸一、笠原優子 (国立精神・神経医療研究センター 神経研究所遺伝子疾患治療研究部)	
野村義宏 (東京農工大学農学部附属 硬蛋白質利用研究施設皮革研究部門)	
坂 翔太 (東京農工大学大学院農学府 応用生命化学専攻応用蛋白質化学研究室)	
積田奈々 (東京農工大学農学部 応用生物科学科応用蛋白質化学研究室)	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	99

I. 平成24年度構成員名簿

平成 24 年度構成員名簿

区分	氏名	所属等	職名
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	講師
研究分担者	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
	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
	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
	武田 伸一	独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・遺伝子疾患治療研究部	部長
	佐々木克典	信州大学医学部・組織発生学講座	教授
	中山 淳	信州大学大学院医学系研究科・分子病理学	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
	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
	岡田 尚巳	独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・遺伝子疾患治療研究部	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
	岳 鳳鳴	信州大学医学部・組織発生学講座	助教
	水本 秀二	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	博士研究員
研究協力者	江良 拓実	熊本大学発生医学研究所・幹細胞誘導分野	教授
	山本 和弘	独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・実験動物管理室	科研費研究員
	林 周次郎	獨協医科大学皮膚科	助教
	笠原 優子	独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所	研究員
	坂 翔太	東京農工大学農学部・硬蛋白質利用研究施設	大学院生
	積田 奈々	東京農工大学農学部・硬蛋白質利用研究施設	大学生

Ⅱ. 総括研究報告

デルマトン 4-O-硫酸基転移酵素-1 欠損に基づくエーラスダンロス症候群（DDEDS）の
病態解明と治療法の開発

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

エーラスダンロス症候群（Ehlers-Danlos Syndrome; 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、頻度は1/5000人とされる。研究代表者らは、平成21-23年度難治性疾患克服研究事業の支援を受けて、進行性結合組織脆弱性（皮膚過伸展・脆弱性、全身関節弛緩・脱臼・変形、巨大皮下血腫）、発生異常（顔貌の特徴、先天性多発関節拘縮）に特徴付けられるEDSの新病型を見出した（*Kosho et al., 2005; Kosho et al., 2010*）。さらに、原因遺伝子がデルマトン 4-O-硫酸基転移酵素-1（D4ST1）をコードする *CHST14* であること、本症における進行性結合組織脆弱性は「D4ST1の欠損→デコリンに付加するグリコサミノグリカン鎖の組成変化（正常ではデルマトン硫酸であるが、患者ではコンドロイチン硫酸に置換）→デコリンを介するコラーゲン細線維の assembly 不全」によることを明らかにした（*Miyake et al., 2010*）。ほぼ同時に、稀な多発関節拘縮症”Adducted thumb-clubfoot syndrome”および他のEDS患者において *CHST14* 変異が見出された（*Dündar et al., 2009; Malfait et al., 2010*）。研究代表者らは、詳細な臨床的検討から、これらを同一疾患と結論付け、デルマトン 4-O-硫酸基転移酵素-1 欠損に基づくエーラスダンロス症候群（D4ST1-deficient EDS ; DDEDS）と命名、その診療指針を提案した（*Shimizu et al., 2011; Kosho et al., 2011*）。

本研究班は、臨床遺伝、遺伝子解析、病理解析、糖鎖医学解析、再生医療、遺伝子治療の専門家の叡智を結集し、DDEDS の自然歴および健康管理指針の構築と根治療法の開発を目指すことにより、進行性の結合組織脆弱性病変に苦しむ患者の QOL を向上させることである。臨床的検討、遺伝子解析、病理解析、糖鎖医学的検討、iPS 細胞を用いた病態解析、モデルマウスを用いた病態解析、遺伝子治療の開発といったプロジェクトが有機的に連携しながら動いている。

臨床的に DDEDS が疑われる 5 患者において遺伝子解析が行われ、1 患者において病的変異が検出された。これまでに 22 家系の解析を終了し、14 家系で病的変異が見出されている。論文誌上の発表、研究会での報告を加え、現在までに合計 27 家系 37 患者が見出されており、DDEDS は、比較的頻度の高い重要な EDS の 1 病型と考えられる。

病理学的検討において、顕微鏡では、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、といった特徴が認められた。抗デコリン抗体を用いた免疫組織化学分析では、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沿って filamentous に染色された。Cupromeronic blue (CB) 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。

糖鎖医学的検討において、DDEDS 患者由来の尿中には、全く DS 鎖が検出されず、尿を用いた診断法の開発につながると期待された。興味深いことに、新規の *CHST14* 変異 (c.2_10TGTTCCCCdel (homo); p.Met1?) を有する軽症患者由来の線維芽細胞では、わずかに DS 鎖の合成が認められ、DS 合成状態と臨床症状との関係が注目される。

1 人の DDEDS 患者の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立した。iPS 細胞としての未分化能および多能性は、健康人由来 iPS 細胞と同等であった。患者 iPS 細胞を SKID マウスに移植することにより生じた奇

形種では、患者組織と同様に、デコリン染色状態が低下しており、「デコリンによるコラーゲン細線維の assembly 不全」という DEDS の病態の本質を再現していると考えられた。以上から、今回樹立した iPS 細胞は疾患モデルとして適切であると考えられた。さらに、患者由来 iPS 細胞の方が、神経系への分化誘導効率が低下している傾向が示され、患者の神経病態との関係が注目される。

既に樹立された *Chst14*^{-/-}マウスの凍結精子を用いて凍結受精卵を作製、個体を復元した。ヘテロマウスを交配し、*Chst14*^{-/-}マウスを得る一方、スピードコンジュニク法により C57BL/6J 系統を遺伝的背景に持つ *Chst14*^{-/-}マウスの作出を急いでいる。既に得られた *Chst14*^{-/-}マウスの尿中に DS が検出されなかったことから、本マウスは疾患モデルとして妥当と考えられた。本マウスは、野生型マウスと比べて、発育の遅延や拘束ストレスに対する驚愕反応の増大が認められている。

遺伝子治療の基礎実験として、D4st-1 発現 AAV ベクターを構築し、患者由来不死化ヒト線維芽細胞および *Chst14*^{-/-}マウス線維芽細胞を用いた D4st-1 補充機能の確認を開始した。今後、さらに *Chst14*^{-/-}マウスの詳細な表現型解析を行った上で、AAV ベクターによる遺伝子治療実験を行い、有効性及び安全性を検証する予定である。

研究分担者

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）

菅原一幸（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・教授）

福嶋義光（信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座・教授）

旗持淳（獨協医科大学皮膚科・教授）

武田伸一（独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・遺伝子疾患治療研究部・部長）

佐々木克典（信州大学医学部・組織発生学講座・教授）

中山淳（信州大学大学院医学系研究科・分子病理学・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）

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）

岡田尚巳（独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・遺伝子疾患治療研究部・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）

岳鳳鳴（信州大学医学部・組織発生学講座・助教）

水本秀二（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・博士研究員）

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）。全病型を合わせた推定頻度は約 1/5000 人とされている。

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[DS]が消失し、コンドロイチン硫酸[CS]に置換する）→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

A. 研究目的

Ehlers-Danlos 症候群 (EDS) は、皮膚の過伸展性、

thumb-clubfoot syndrome (ATCS) ” (Dündar et al., *Am J Hum Genet* 85: 873-882, 2009)、および、後側彎型 EDS の皿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 21-23 年度 EDS 班 (研究代表者: 古庄知己) 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 D4ST1 欠損に基づく臨床的に同一の疾患であり、進行性結合組織脆弱性 (皮膚過伸展・脆弱性、全身関節弛緩・慢性脱臼・変形、巨大皮下血腫など) および発生異常 (顔貌の特徴、先天性多発関節拘縮など) に特徴付けられる EDS の新病型と結論付けた。さらに、D4ST1-deficient EDS (DDEDS) と命名するとともに以下の診療指針を提案した (Shimizu et al., *Am J Med Genet* 155A: 1949-1958, 2011; Koshi et al., *Hum Mutat* 32: 1507-1509, 2011; 古庄知己, *信州医学誌* 59: 305-319, 2011)。

<診療指針の構築>

診断	<p>新生児期、<u>顔貌上の特徴</u> (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)、<u>骨格症状</u> (内転母指、内反足を含む多発関節拘縮) で疑い、<u>CHST14 遺伝子解析</u>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。 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。</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。 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)。 (血) 気胸、憩室穿孔に対する治療。</p>
その他	<p>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 (幅広いゴムや徒手の駆血、手首式血圧計)。</p>

本研究班は、臨床遺伝、遺伝子解析、病理解析、糖鎖医学解析、再生医療、遺伝子治療の専門家の叡智を結集し、DDEDS の自然歴および健康管理指針の構築と根治療法の開発を目指すことにより、進行性の結合組織脆弱性病変に苦しむ患者の QOL を向上させることである。以下のプロジェクトが有機的に連携しながら動いている。

- ① 臨床的検討
- ② 遺伝子解析
- ③ 病理解析
- ④ 糖鎖医学的検討
- ⑤ iPS 細胞を用いた病態解析
- ⑥ モデルマウスを用いた病態解析
- ⑦ 遺伝子治療の開発

B. 研究方法

①臨床的検討

本研究班における解析状況および国内外の研究施設における解析状況を収集することにより、全患者のリストアップを試みた。

②遺伝子解析

本年度、臨床症状から DDEDS が疑われる 5 患者（5 家系）を見出した。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。

③病理解析

P281L/Y293C を有する 3 患者、P281L/C289S を有する 1 患者、および健常人の皮膚検体を対象とした。

顕微鏡分析：4 患者および健常人 1 人皮膚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。

Cupromeronic blue (CB) 染色を用いた電顕分析：3 患者由来皮膚検体をグルタルール固定後、洗浄し、GAG 鎖に特異的に反応する 0.05% (w/v) Cupronic 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 患者および健常人 1 人皮膚由来パラフィンブロックを抗ヒト・デコリン抗体（マウスモノクローナル抗体）で染色し、観察した。

④糖鎖医学的検討

患者の尿中のコンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸の定量と構造解析：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、次に細菌由来のコンドロチナーゼ ABC (CS、DS 両方を二糖単位にまで切断する)、コンドロチナーゼ AC (CS 部分を二糖単位にまで切断し、DS 部分には作用しない)、コンドロイチナーゼ B (DS

様構造部分のみを二糖単位にまで切断し、CS 様構造部分には作用しない)で消化後、陰イオン交換 HPLC で各二糖組成の分析と CS および DS 様構造の定量を行った。

EDS 患者の繊維芽細胞由来が産生するコンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸の定量と構造解析：新規の *CHST14* 変異 (c.2_10TGTTCCCCdel (homo); p.Met1?) EDS 患者および未分類型 EDS 患者由来の繊維芽細胞を培養後、80%コンフルエントに達した後、線維芽細胞用の完全無血清培地 (COSMEDIUM H001) で 3 日間培養し、コンディショニングメディウムを回収した。限外ろ過膜を利用した遠心濃縮カラム (AmiconUltra-4, 10k) で濃縮し、次に細菌由来のコンドロチナーゼ ABC、コンドロチナーゼ AC、コンドロイチナーゼ B で消化後、消化物の陰イオン交換 HPLC で各二糖組成の分析と CS および DS 鎖の定量を行った。

⑤iPS 細胞を用いた病態解析

P281L/Y293C を有する DDEDS 女性患者の皮膚線維芽細胞より熊本大学で樹立された iPS 細胞 (A108) および健常人より京都大学で樹立された iPS 細胞 (201B7) を対象とした。

A108 および 201B7 をマウス胚線維芽細胞 (MEF) 上に成長させ、iPS 細胞コロニーの形態を観察した。

A108 および 201B7 の iPS 細胞コロニーに対して TUNEL 染色を行い、アポトーシスを分析した。

A108 および 201B7 の iPS 細胞コロニーに対して、未分化状態のマーカーである Oct3/4、Nanog、SSEA-3、SSEA-4 の免疫染色を行い、未分化状態を分析した。

A108 の胚様体 (EB) を作成し、自然分化させ、免疫染色と RT-PCR により、三胚葉のマーカー（内胚葉：Foxa2, Pdx1；中胚葉：Nkx2.5, Brachyury；外胚葉：Nestin）について多能性を検討した。さらに、A108 の iPS 細胞を SKID マウスに移植し、奇形種発生の有無、発生していればその組織を検討した。

A108 の iPS 細胞由来の奇形種におけるデコリンおよび I 型コラーゲンの分布を免疫染色で

検討した。

A108 および 201B7 の iPS 細胞を用いて、表 1 の方法で、神経系への分化誘導を行った。神経形成を確認するために、神経前駆細胞マーカーである Nestin、Pax6 の発現を、RT-PCR と Real time-PCR により検討した。神経分化効率を確認するために、TujIII、MAP2 抗体を用いた免疫染色および Map2 遺伝子の Real time-PCR 分析を行った。

DDEDS 患者由来の iPS 細胞からゲノム DNA を抽出し、CHST14 遺伝子のタンパク質翻訳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。さらに、iPS 細胞樹立に際して獲得されたコピー数変異の有無を検証するため、同一患者の血液由来のゲノム DNA と iPS 細胞由来のゲノム DNA に対してコピー数解析を行った。アレイは CytoScan HD (Affymetrix 社) を使用し、Chromosome Analysis Suite Software (Affymetrix 社) を用いて解析を行った。

⑥モデルマウスを用いた病態解析

Chst14^{-/-}コンジェニック系統作出：米国の非営利的マウス供給センター（Mutant Mouse Regional Resource Centers；MMRRC）より提供された Chst14^{-/-}マウスの凍結精子を用いて凍結受精卵を作製(株式会社トランスジェニックに受託)後、(独)国立精神・神経医療研究センターにて個体を復元した。遺伝的背景を均一化するため C57BL/6J 系統への戻し交配を行った。戻し交配の期間を短縮するために、マイクロサテライトマーカー解析を用いたスピードコンジェニック法を行った。尻尾から抽出したゲノム DNA に特異的な 58 種類のマーカーに対応したプライマーを用いて PCR を行い、増幅産物のサイズを区別することで C57BL/6J 系統への置換率を評価した。

Chst14^{-/-}マウスの表現型解析：Chst14^{-/-}マウスの雌雄を交配させて Chst14^{-/-}マウスを作出し、経時的に体重測定および関節拘縮等の症状がみられるか否か観察を行った。また、情動機能を評価するために、5 秒間拘束の後、フリージング(驚愕反応)時間を測定した(5 分間)。さらに、運動機能への影響を検討するためのホイールケージを用いた運動量解析、結合組織の脆弱性を検討するための引張試験機を用いた背部皮膚および大腸の物性評価の解析条件

を検討した。

Chst14^{-/-}マウスの尿中のコンドロイチン硫酸／デルマタン硫酸の定量：Chst14^{-/-}マウス由来の尿を限外ろ過膜で遠心濃縮後、コンドロチナーゼ ABC、コンドロチナーゼ AC、コンドロイチナーゼ B で消化し、陰イオン交換 HPLC で各二糖組成の分析と CS および DS 鎖の定量を行った。

⑦遺伝子治療の開発

治療遺伝子導入 AAV ベクターの作製：治療遺伝子としてヒトおよびマウス Chst14 cDNA を AAV ベクタープラスミドに組み込んだ。

細胞レベルで遺伝子発現と機能を確認するため、D4st-1 欠損細胞を樹立した。患者 2 名 (P281L/Y293C が 1 名、P281L/P281L が 1 名) および健康人 1 名由来線維芽細胞の増殖能を改善するため、SV40 のラージ T 抗原を導入することで不死化させた。また、Chst14^{-/-}マウスおよび野生型マウスの尻尾を採取し線維芽細胞の初代培養を行った。

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 22～24 年は「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、平成 25 年 1 月以降は「D4ST1 欠損に基づくエーラスダンロス症候群の遺伝子解析および病態探索」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。糖鎖医学的検討については、「骨異形成症及び関節疾患におけるグリコサミノグリカンの機能解明」として、北海道大学の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、個人情報保護に留意した。

C. 研究結果

①臨床的検討

今年度、本研究班においては、臨床的に DDEDS が疑われる 5 患者において遺伝子解析が行われ、1 患者において病的変異が検出された。これまでに 22 家系の解析を終了し、14 家系で病的変異が見出されている。論文誌上の発表、研究会での報告を加え、以下に示すように現在までに合計 27 家系 37 患者が見出された。

論文報告例

患者	家系	出身	CHST14 変異	性別	初回報告時年齢
1	1	トルコ	V49X homo	F	3.5y
2				M	1.5y
3				F	6y
4	2	日本	Y293C homo	M	4y
5				M	7m
6	3	オーストリア	R213P homo	M	0d†
7				M	12m
8	4	トルコ	[R135G;L137Q] homo	F	1-4m†
9				M	1-4m†
10				M	1-4m†
11				M	3m
12	5	日本	P281L/Y293C	F	11y
13	6	日本	P281L homo	F	14y
14	7	日本	P281L homo	M	32y
15	8	日本	K69X/P281L	M	32y
16	9	日本	P281L/C289S	F	20y
17	10	日本	P281L/Y293C	F	4y
18	11	トルコ	V49X homo	F	22y
19				F	21y
20	12	インド	E334Gfs*107 homo	F	12y
21	13	日本	P281L/Y293C	M	2y
22	14	日本	F209S/P281L	M	6y

23	15	オランダ	V48X homo	F	20y
24	16	アフガニスタン	R274P homo	F	11y
25				F	0y
26	17	ミコウスキー	G228Lfs*13	F	16y

論文未報告例

患者	家系	出身	CHST14 変異	性別	初回報告時年齢
27	18	日本	P281L/W162X	F	18y
28	19	日本	P281L homo	F	?
29		日本		F	16y
30	20	日本	M1? Homo	M	11y
31	21	日本	F209S/P281L	F	41y
32	22	日本	F209S homo	M	18y
33	23	日本	F209S/P281L	M	15y
34	24	日本	compound hetero	F	34y
35	25	ベルギー	R29Gfs*113 homo	M	18y?
36	26	ベルギー	Q133Rfs*14 homo	M	34y?
37	27	ベルギー	M280L homo	M	4y?

②遺伝子解析

5 家系中 1 家系において、CHST14 遺伝子の複合ヘテロ接合性変異 c.[626C>T];[c.842C>T], p.[Phe209Ser];[Pro281Leu]を同定した。この 2 変異は既に、病的変異として報告のある変異であった。現在までに解析の完了した合計 22 家系において、変異の同定された家系は 14 家系 (63.6%) であった。

③病理解析

光顕分析：弱拡大では、患者の表皮は、コントロールに比べて、波打ち、薄い、という特徴があった。強拡大では、表皮直下の真皮のコラーゲン線維が繊細になっていた。真皮のコラーゲン線維束はコントロール並の太さで存在するものもあれば、コントロールに比べて、繊細になって存在するものもあった。

Cupromeronic blue (CB) 染色を用いた電顕分析：CB 染色により、コラーゲン細線維に付着した GAG 鎖が可視化された。P281L/Y293C を有する 1 患者において、通常の電子染色のみでは、表層はコラーゲン細線維が細く、ランダムに走行していた。深層ではコラーゲン細線維は太く束になって走行していた。CB 染色により、コラーゲン細線維に付着した GAG 鎖が可視化された。表層では GAG 鎖はランダムに描出され、深層では整然と描出されていた。P281L/Y293C を有する別の 1 患者においても、CB 染色により、コラーゲン細線維に付着した GAG 鎖が可視化された。表層では GAG 鎖はランダムに描出され、深層では整然と描出されていた。

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

④糖鎖医学的検討

患者の尿中のコンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸の定量と構造解析：健康人由来の尿では、DS が検出されたのに対し、D4ST-1 変異 EDS 患者では予想通り、DS 様構造が全く検出されなかった。

EDS 患者の繊維芽細胞由来が産生するコンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸の定量と構造解析：無血清培地で培養した各繊維芽細胞(新規の CHST14 変異 (c.2_10TGTTCCCCdel (homo); p.Met1?) を有する DDEDS 患者)のコンディションドメディウムを用いて DS の定量を行った。その結果、これまでに検討した DDEDS 患者では、全く DS が検出されなかったのに対して[Miyake *et al.*, Hum Mutat. (2010) 31, 966-974]、今回の新規の CHST14 変異を有する DDEDS 患者由来の線維芽細胞では、ごく少量の DS 鎖が合成されていた。興味深いことに、以前の DS 鎖がまったく合成されていない DDEDS 患者と比較して、本患者の症状は若干軽症であることから、ごく少量合成されている DS 鎖が EDS の症状を軽減していると推察された。一方、健康人と比較して CS の二糖量には大差がな

かった。

⑤iPS 細胞を用いた病態解析

A108 および 201B7 の iPS 細胞コロニーの間には、光学顕微鏡分析において次のような相違点を確認された。(1) A108 の iPS 細胞のサイズは、201B7 の iPS 細胞より小さい。(2) A108 の iPS 細胞間境界は不明瞭であり、いくつかの細胞では融合していた。(3) A108 の iPS 細胞では、細胞質に多くの空胞が認められた。電子顕微鏡分析においては、A108 の iPS 細胞において多くの空胞が認められた。

A108 および 201B7 の iPS 細胞コロニーにおけるアポトーシス状態には差は認められなかった。

A108 および 201B7 の iPS 細胞コロニーいずれにおいても、Oct3/ 4、Nanog、SSEA-3、SSEA-4 は高発現であり、十分な未分化状態であることが確認された。

自然分化させた A108 の胚様体 (EB) において、免疫染色と RT-PCR いずれについても、三胚葉のマーカー (内胚葉：Foxa2, Pdx1；中胚葉：Nkx2.5, Brachyury；外胚葉：Nestin) は発現しており、多能性を有することが確認された。さらに、A108 の iPS 細胞を SKID マウスに移植して 4 週間後、奇形種が発生した。組織を検討すると、消化管様 (内胚葉)、平滑筋 (中胚葉)、色素細胞 (外胚葉) など三胚葉由来の組織が認められた (図 6)。脈絡叢のような構造も発見され、神経のマーカー TujIII でこの構造に神経が存在することが確認された。

A108 の iPS 細胞由来の奇形種では、201B7 の iPS 細胞由来の奇形種と比べて、デコリンおよび I 型コラーゲンの染色状態はいずれも弱かった。

A108 の iPS 細胞からの神経への分化誘導に関しては、201B7 の iPS 細胞からの神経への分化誘導と比べて、神経前駆細胞マーカー Nestin および Pax6 の発現はいずれも弱かった。成熟ニューロンへの分化誘導に関しては、A108 の iPS 細胞由来の神経系細胞において、201B7 の iPS 細胞由来の神経系細胞よりも、TujIII、MAP2 抗体を用いた免疫染色の染色状態は弱かった。また、Real time-PCR により測定された Map2 遺伝子の発現量は低かった。

iPS細胞由来のゲノムDNAの解析により、*CHST14* 遺伝子のコード領域内に新たな変異は同定されなかった。iPS細胞にのみに認められるコピー数変化として、4番染色体に1箇所の欠失が検出された。本欠失は *GRID2* 遺伝子(NM_001510.2) 内の 91 kb の欠失であり、protein coding exon である exon3 を含む。本欠失は q-PCR による検証でも確認された。

⑥モデルマウスを用いた病態解析

Chst14^{-/-}コンジェニック系統作出：C57BL/6J 系統への置換が一番進んだ個体を次世代の親として選出した。これまでに3世代交配を進めて、染色体の96.6%がC57BL/6J系統由来へ置換されたマウスを得た。

Chst14^{-/-}マウスの表現型解析：*Chst14*^{-/-}マウスの発育は野生型マウスと比べて遅延していた。関節拘縮等のヒトでみられる外見的特徴は現在(12週齢)までに観察されていない。また、フリージングテストでは、*Chst14*^{-/-}マウスにおいてフリージング時間が約80%増加することが認められた。野生型マウスおよび *Chst14*^{-/-}マウスを用いた予備的解析において自発運動量、走行速度および明暗時における行動量について測定条件を確立した。さらに、マウス背部皮膚および大腸における引張強度、伸び率および弾性率について安定した測定結果が得られることを確認した。これらの解析では野生型マウスと *Chst14*^{-/-}マウスに大きな違いは認められなかったが、今後 *Chst14*^{-/-}マウスにおいて同様の解析を行う予定である。

Chst14^{-/-}マウスの尿中のコンドロイチン硫酸／デルマトン硫酸の定量：*Chst14*^{-/-}マウスにおいてデルマトン硫酸(DS)鎖が欠損し、D4ST-1のノックアウトが確実に起きていることを確認するために、マウス尿中に含まれるコンドロイチン硫酸(CS)/DSを定量した。その結果、野生型およびヘテロ変異型マウス由来の尿においては、CS鎖もDS鎖も検出されたのに対し、ホモ変異型マウスにおいては、DS鎖が全く検出されなかったが、CS鎖は野生型・ヘテロ変異型と同様に合成していた。

⑦遺伝子治療の開発

治療遺伝子導入 AAV ベクターの作製：ヒトおよびマウス D4st-1 発現 AAV ベクタープラスミドの

構築を行った。このベクターによる D4st-1 タンパク質の発現および機能について確認するため、不活化処理を行った患者および健康人由来ヒト線維芽細胞株や、マウスの線維芽細胞初代細胞株(野生型1株、*Chst14*^{+/-}2株および *Chst14*^{-/-}2株)を得た。

D. 考察

①臨床的検討

日本を中心に、新たな DEDS 患者が見出されている。現状では Caucasian を背景とする患者が少ないが、罹患率に地域差があるのか、本症に関心を持つ専門家の有無によるバイアスなのか、現時点では結論付けられない。今後、国際共同研究により、全患者の把握、詳細かつ包括的な臨床像のデータベースを構築することが必要である。

②遺伝子解析

22家系中、変異の同定されなかった8家系は臨床的に非典型、もしくはは典型症例とは重症度が異なり、病型が異なる可能性がある。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必要があると考えられた。

③病理解析

今回得られた、光顕および抗デコリン抗体を用いた免疫組織学的解析結果は、明らかにコントロールとは異なるものであった。興味深いことに、光顕では一見正常形態に見えたコラーゲン線維束部においても、明らかに異なる抗デコリン抗体の反応であったことから、真皮深層においても、デコリン-GAG鎖複合体、すなわちデコリン・プロテオグリカンがコラーゲン細線維を packing している状態は異なっていることを示している。

CB染色を施した電顕観察は、デコリン・プロテオグリカンとコラーゲン細線維との関係を決定しうるきわめて有効な手段であると期待される。GAG鎖がコラーゲン細線維のバンドのどの位置にリンクするのかを明らかにする必要がある。さらに、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、詳細に比較検討することが必須である。

④糖鎖医学的検討

DDEDS 患者由来の尿中の DS の定量を行ったところ、本患者では、DS が全く検出されなかったことから、尿の DS を定量することによって、診断出来る可能性が示唆され、今後の簡易測定キットの開発につながる事が期待される。

新規の *CHST14* 変異 (c.2_10TGTTCCCCdel (homo); p.Met1?) を有する DDEDS 患者由来の繊維芽細胞では、ごく少量の DS 鎖が合成されていた。したがって、本患者では、D4ST1 が正しく翻訳されていないか、D4ST1 の酵素活性が低下しているか、細胞内局在が攪乱されているか、タンパク質発現量が少ない等が考えられ、その結果として、大部分の DS の合成不全を起こし、EDS が発症すると考えられた。

⑤ iPS 細胞を用いた病態解析

世界で初めて樹立した DDEDS 患者由来 iPS 細胞は、十分な未分化能および多能性を有しており、iPS 細胞としての本質的機能が確認された。

患者皮膚組織での検討結果と同様、SKID マウスに発生させた奇形種におけるデコリン染色状態は、患者では明らかに低下しており、「デコリンによるコラーゲン細線維の assembly 不全」という DDEDS の病態を反映したモデルとして矛盾はないと考えられた。

さらに、患者由来 iPS 細胞においては、神経細胞系への分化誘導効率が低下していることが明らかになり、これまであまり指摘されていなかった DDEDS 患者における神経系の特徴、合併症を再検討する必要があると考えられた。

なお、本研究班では、iPS 細胞のゲノム構成が末梢血由来ゲノム DNA から変化を来しているかを高密度 SNP アレイで検証し、iPS 細胞由来のゲノム DNA のみに *GRID2* 遺伝子内に 91 kb の欠失を認めた。これは本 iPS 細胞の樹立過程において獲得されたコピー数異常であり、今後本 iPS 細胞を用いた病態解析を展開していく際には、慎重に解釈する必要があると考えられた。

患者 iPS 細胞由来の奇形種において、通常認められない脳脈絡叢様の組織が認められた。DDEDS 患者においては、脳室拡大を伴う場合が少なくなく、今回の所見との関係が注目されることである。

⑥ モデルマウスを用いた病態解析

Chst14^{-/-}マウスの表現型を検討するにはコンジュニク系統の確立と安定した動物の供給が必要である。これまでの結果から、マイクロサテライトマーカー解析を用いた個体選別により、通常 10 世代以上交配を重ねなければならないのに対し、5 世代で置換率が目標値の 99%を超えると考えられ、残り 2 世代で目標に達する見込みである。

Chst14^{-/-}マウスの発育は野生型マウスと比べて遅延していた。引き続き観測を行い、成長遅滞であるのか、あるいは成長停滞であるのか検討を行う。また、ヒト症例では痛み刺激に対する過敏性が指摘されているが、*Chst14*^{-/-}マウスでも拘束ストレスに対する驚愕反応が増大したことから、D4st-1 の欠損が高次認知・情動機能に影響している可能性が示唆された。さらに、皮膚やコラーゲンに関する研究を専門とする東京農工大学での皮膚機能解析や、筋疾患治療に関する研究を行っている(独)国立精神・神経医療研究センターでの筋病理解析など、それぞれの研究機関において解析の準備も進めており、さらなる解析が期待される。

Chst14^{-/-}マウスの尿中の DS は全く検出されなかったことから、DDEDS 患者で観察された DS の欠損が本ノックアウトマウスにおいても観察されたことになる。以上の結果から、今回作製した *Chst14*^{-/-}マウスは、ヒトと同様に DS 鎖が欠損していることが判明し、妥当な疾患モデルであると考えられた。

⑦ 遺伝子治療の開発

DDEDS は、*CHST14* 機能喪失型変異に基づき、DS を合成する酵素 D4ST1 の欠損を来し、発生異常と進行性結合組織脆弱性を呈し、多系統臓器の合併症に至る難治性疾患である。治療戦略として、D4ST1 の補充が考えられるが、D4ST1 はゴルジ膜上に局在する酵素であり、現時点では細胞外からゴルジ膜に酵素を送達する方法が確立されていないこと、また、血管確保の困難さから長期間にわたる頻回の経静脈投与が困難であること、から現実的でない。以上から、安全性が高く、導入遺伝子の長期間の発現が可能なアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターによる遺伝子治療を第一候補として考えている。

患者への治験を視野に入れて、以下のような課題を一つ一つ克服していく必要がある。

① どの血清型の AAV ベクターを選択するか。

- ② 標的臓器の決定とそれに準じた適切な *CHST14* 遺伝子の発現カセットの構築。
- ③ *Chst14*^{-/-}マウス由来細胞での治療実験。
- ④ 患者由来皮膚線維芽細胞での治療実験。
- ⑤ *Chst14*^{-/-}マウスを用いた治療実験。

E. 結論

本研究班の活動および国内外の他施設の報告より 27 家系 37 患者が見出された。DDEDS は、比較的頻度の高い重要な EDS の 1 病型と考えられる。

遺伝子解析研究、病理解析研究、および糖鎖医学的検討により、*CHST14* 変異によって、DS 鎖が合成できないことが、コラーゲン細線維の assembly 不全を来し、EDS が発症するメカニズムが明らかになってきた。

本研究班にて樹立された DDEDS 患者由来 iPS 細胞、*Chst14*^{-/-}マウスは本症の病態解析研究において妥当なモデルであることが確認された。これらのモデルを詳細かつ包括的に分析し、患者より得られる臨床所見と有機的に関連付けることで、本症の病態生理の全貌が明らかになることが期待される。このことは治療標的を検討する上でもきわめて有意義なことである。

最適な AAV ベクターを構築し、各種治療モデル (*Chst14*^{-/-}マウス由来細胞、患者由来皮膚線維芽細胞、*Chst14*^{-/-}マウス) に対する治療実験を積み重ね、根治療法の開発を目指したい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kosho T. Discovery and delineation of dermatan 4-O-sulfotransferase-1 (D4ST1)-deficient Ehlers-Danlos syndrome. In: Current Genetics in Dermatology (Oiso N, Kawada A, eds),

InTech.

Miyake N, Kosho T, Matsumoto N. Ehlers-Danlos syndrome associated with glycosaminoglycan abnormalities. In: Progress in heritable soft tissue disease, Springer (in press).

Tsurusaki Y[#], ***Kosho T[#]** (# denotes equal contribution), Hatasaki K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Doi H, Saito H, **1 Miyake N, *Matsumoto N** (*: co-correspondence). Exome sequencing identifies an *OFD1* mutation in a family of X-linked lethal congenital malformation syndrome: delineation of male Oral-facial-digital syndrome type 1. Clin Genet 83(2): 135-144, 2012.

Kondo E, Nishimura T, **Kosho T** (corresponding author), Inaba Y, Mitsuhashi S, Ishida T, Baba A, Koike K, Nishino I, Nonaka I, Furukawa T, Saito K. Recessive RYR1 mutations in a patient with severe congenital nemaline myopathy with ophthalmoplegia identified through massively parallel sequencing. Am J Med Genet A. 2012 Apr;158A(4):772-8

Motobayashi M, Nishimura-Tadaki A, Inaba Y, **Kosho T** (corresponding author), Miyatake S, Niimi T, Nishimura T, Wakui K, **Fukushima Y, Matsumoto N**, Koike K. Neurodevelopmental features in 2q23.1 microdeletion syndrome: Report of a new patient with intractable seizures and review of literature. Am J Med Genet Part A 158 (4): 861-868, 2012.

Kashizaki F, **Hatamochi A**, Kamiya K, Yoshizu A, Okamoto H. Vascular-type Ehlers-Danlos syndrome caused by a hitherto unknown genetic mutation: a case report. J Med Case Rep 7(1): 35, 2013.

Shimaoka Y, Hayashi S, Hamasaki Y, Terui K, **Hatamochi A.** Patient with the vascular type of Ehlers-Danlos syndrome, with a novel point-mutation in the COL3A1 gene. J Dermatol 40(3): 226-228, 2013.

- Hayashi S, Ikeda M, Kitamura Y, Hamasaki Y, **Hatamochi A**. UVA irradiation following treatment with topical 8-methoxypsoralen improves bleomycin-induced scleroderma in a mouse model, by reducing the collagen content and collagen gene expression levels in the skin. *J Dermatol Sci* 67(1): 20-25, 2012.
- Mizumoto S, Sugahara K**. Bone and skin disorders caused by a disturbance in the bioynthesis of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. In *Extracellular matrix: Pathobiology and signaling* (N. Karamanos ed.) De Gruyter, Berlin, Germany, pp. 97-118, 2012.
- Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, **Kosho T**, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kaname T, Naritomi K, Kawame H, Wakui K, Fukushima Y, Homma T, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Mizuno S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Shiina M, Ogata K, Ohta T, Niiikawa N, Miyatake S, Okada I, Mizuguchi T, Doi H, Saitsu H, ***Miyake N**, ***Matsumoto N** (*: co-corresponding). Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet* 44(4):376-378, 2012.
- ***Miyake N**[#], Yano S[#] (# denotes equal contribution), Sakai C, Hatakeyama H, Shiina M, Watanabe Y, Bartley J, Abdenur JE, Wang RY, Chang R, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Ogata K, Goto Y, ***Matsumoto N**. Mitochondrial complex III deficiency caused by a homozygous *UQCRC2* mutation presenting with neonatal-onset recurrent metabolic decompensation. *Hum Mut* (in press).
- ***Miyake N**, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu H, ***Matsumoto N** (*: co-corresponding). *KDM6A* point mutations cause Kabuki syndrome. *Hum Mut* 34 (1): 108-110, 2012.
- Miyake N**[#], Elcioglu NH[#] (# denotes equal contribution), Iida A, Isguven P, Dai J, Murakami N, Takamura K, Cho T-J, Kim O-H, Nagai T, Ohashi H, Nishimura G, **Matsumoto N**, Ikegawa S. *PAPSS2* mutations cause autosomal recessive brachyolmia. *J Med Genet* 49(8): 533-538, 2012.
- Yamashita S, **Miyake N**, **Matsumoto N**, Osaka H, Iai M, Aida N, Tanaka Y. Neuropathology of Leukoencephalopathy with Brainstem and Spinal Cord Involvement and High Lactate caused by a homozygous mutation of *DARS2*. *Brain Dev* (in press).
- Tsurusaki Y, Kobayashi Y, Hisano M, Ito S, Doi H, Nakashima M, Saitsu H, **Matsumoto N**, **Miyake N**. The diagnostic utility of exome sequencing in Joubert syndrome related disorders. *J Hum Genet* (in press).
- Miyatake S, **Miyake N**, Doi H, Ogata K, Kawai M, **Matsumoto N**. A novel SACS mutation in a Japanese family with atypical phenotype of autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *Intern Med* 51: 2221-2226, 2012.
- Sakai H, Suzuki S, Mizuguchi T, Imoto K, Doi H, Kikuchi M, Tsurusaki T, Saitsu H, **Miyake N**, Masuda M, **Matsumoto N**. Rapid detection of gene mutations responsible for non-syndromic aortic aneurysm and dissection using two different methods: resequencing microarray technology and next-generation sequencing. *Hum Genet* 131: 591-599, 2012.
- Miyatake S, **Miyake N**, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawauchi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, **Matsumoto N**. Homozygous c.14576G>A Variant of *RNF213* Predicts Early-Onset and Severe Form of Moyamoya Disease. *Neurology* 78: 803-810,

- 2012.
- Yoneda Y, Haginoya K, Arai H, Tsurusaki Y, Doi H, **Miyake N**, Osaka H, Kato M, **Matsumoto N**, Saitsu H. *De novo* and inherited mutations in the gene encoding a type IV collagen $\alpha 2$ chain (*COL4A2*) cause porencephaly. *Am J Hum Genet* 90 (1):86-90, 2012.
- Kondo Y, Saitsu H, Miyamoto T, Nishiyama K, Tsurusaki T, Doi H, **Miyake N**, Ryoo N-K, Kim JH, Yu KS, ***Matsumoto N**. A family of oculofaciocardiodental syndrome (OFCD) with a novel *BCOR* mutation and genomic rearrangements involving *NHS*. *J Hum Genet* 57(3): 197-201, 2012.
- Saitsu H, Kato M, **Matsumoto N**. Haploinsufficiency of *STXBPI* and Ohtahara syndrome. *Jasper's basic mechanism of the epilepsies*, 4th edition, edited by Noebels J, Avoli M, Rogawski M, Olsen RW, and Delgado-Escueta AV. Oxford University Press Page 824-834, 2012.
- Yoneda Y, Saitsu H, Touyama M, Makita Y, Miyamoto A, Hamada K, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, **Miyake N**, Ogata K, Naritomi K, **Matsumoto N**. Missense mutations in the DNA-binding/dimerization domain of *NFIX* cause Sotos-like syndrome. *J Hum Genet* 50(3): 207-211, 2012.
- Tsurusaki Y, *Saitoh S, Tomizawa K, Sudo A, Asahina N, Shiraiishi H, Ito J, Tanaka H, Doi H, Saitsu H, **Miyake N**, ***Matsumoto N** (* denotes co-corresponding). A *DYNC1H1* mutation causes a dominant spinal muscular atrophy with lower extremity predominance. *Neurogenet* (in press)
- Saitsu H, Osaka H, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, **Miyake N**, **Matsumoto N**. A girl with early-onset epileptic encephalopathy associated with microdeletion involving *CDKL5*. *Brain Dev* 34(5): 364-367, 2012
- Hamdan FF[#], Saitsu H[#] (# denotes equal contribution), Masuko K, Gauthier J, Dobrzyniecka S, Spiegelman D, Lacaille JC, Décarie JC, **Matsumoto N**, Rouleau GA, Michaud JL. Mutations in *SPTANI* in intellectual disability and pontocerebellar atrophy. *Eur J Hum Genet* 20 (7): 796-800, 2012.
- Saitsu H[#], Kato M[#] (# denotes equal contribution), Shimono M, Senju A, Tanabe S, Kimura T, Nishiyama K, Yoneda Y, Kondo Y, Tsurusaki Y, Doi H, **Miyake N**, Hayasaka K, **Matsumoto N**. Association of genomic deletions in the *STXBPI* gene with Ohtahara syndrome. *Clin Genet* 81(4): 399-402, 2012.
- Osaka H, Takagi A, Tsuyusaki Y, Wada T, Iai M, Yamashita S, Shimbo H, Saitsu H, Salomons GS, Jakobs C, Aida N, Shinka T, Kuhara T, **Matsumoto N**. Contiguous deletion of *SLC6A8* and *BAP31* in a patient with severe dystonia and sensorineural deafness. *Mol Genet Metab* 106(1): 43-47, 2012.
- Writzl K, Primec ZR, Stražičar BG, Osredkar D, Pečarič-Meglič N, Kranjc BS, Nishiyama K, **Matsumoto N**, Saitsu H. Early onset West syndrome with severe hypomyelination and coloboma-like optic discs in a girl with *SPTANI* mutation. *Epilepsia* 53(6): e106-110, 2012.
- Saitsu H, Kato M, Koide A, Goto T, Fujita T, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, **Miyake N**, Hayasaka K, **Matsumoto N**. Whole exome sequencing identifies *KCNQ2* mutations in Ohtahara syndrome. *Ann Neurol* 72(2): 298-300, 2012.
- Saitsu H, Kato M, Osaka H, Moriyama N, Horita H, Nishiyama K, Yoneda Y, Kondo Y, Tsurusaki Y, Doi H, **Miyake N**, Hayasaka K, **Matsumoto N**. *CASK* aberrations in males with Ohtahara syndrome and cerebellar hypoplasia. *Epilepsia* 53(8): 1441-1449, 2012.

- Terao Y, Saitsu H, Segawa M, Kondo Y, Sakamoto K, **Matsumoto N**, Tsuji S, Nomura Y. Diffuse central hypomyelination presenting as 4H syndrome caused by compound heterozygous mutations in POLR3A encoding the catalytic subunit of polymerase III. *J Neurol Sci* 320(1-2): 102-105, 2012.
- Nonoda Y, Saito Y, Nagai S, Sasaki M, Iwasaki T, **Matsumoto N**, Ishii M, Saitsu H. Progressive diffuse brain atrophy in West syndrome with marked hypomyelination due to SPTAN1 gene mutation. *Brain Dev* (in press).
- Yoneda Y, Haginoya K, Kato M, Osaka H, Yokochi K, Arai H, Kakita A, Yamamoto T, Otsuki Y, Shimizu S, Wada T, Koyama N, Mino Y, Kondo N, Takahashi S, Hirabayashi S, Takanashi J, Okumura A, Kumagai T, Hirai S, Nabetani M, Saitoh S, Hattori F, Yamazaki A, Subo Y, Nishiyama K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, **Miyake N**, **Matsumoto N**, Saitsu H. Phenotype spectrum of *COL4A1* mutations: porencephaly to schizencephaly. *Ann Neurol* (in press).
- Miyatake S, Murakami A, Okamoto N, **Miyake N**, Saitsu H, ***Matsumoto N**. A De Novo Deletion at 16q24.3 Involving ANKRD11 in a Japanese Patient With KBG Syndrome. *Am J Med Genet Part A* (in press).
- Miyatake S, Touho H, **Miyake N**, Ohba C, Doi H, **Matsumoto N**. Sibling cases of Moyamoya disease with different *RNF213* genotypes and varying clinical course and severity. *J Hum Genet* (in press).
- Higashiyama Y, Doi H, Wakabayashi M, Tsurusaki Y, **Miyake N**, Saitsu H, Ohba C, Fukai R, Miyatake S, Koyano S, Suzuki Y, Kuroiwa Y, **Matsumoto N**. A novel homozygous *SCARB2* mutation causes late-onset progressive myoclonus epilepsy without renal failure. *Mov Disord* (in press).
- Kimura-Ohba S, Kagitani-Shimono K, Hashimoto N, Nabatame S, Okinaga T, Murakami A, **Miyake N**, **Matsumoto N**, Osaka H, Hojo K, Tomita R, Taniike M, *Ozono K. A case of cerebral hypomyelination with spondylo-epi-metaphyseal dysplasia. *Am J Med Genet Part A* (in press).
- Ikegawa S, Nakashima M, **Matsumoto N**. TGF- β and Genetic Skeletal Diseases. "TGF β in Human Disease" edited by Moustakas A and Miyazawa K. Springer (submitted).
- Saitsu H, Kato M, **Matsumoto N**. Haploinsufficiency of *STXBPI* and Ohtahara syndrome. Jasper's basic mechanism of the epilepsies, 4th edition, edited by Noebels J, Avoli M, Rogawski M, Olsen RW, and Delgado-Escueta AV. Oxford University Press Page 824-834, 2012.
- Mizumoto S**, **Sugahara K**. Glycosaminoglycan chain analysis and characterization (Glycosylation /Epimerization) (Chapter 7) In *Methods in Molecular Biology*, "Proteoglycans: Methods and Protocols" (Rédini, Françoise, ed.), Humana Press, Springer, New York, vol.836, 99-115, 2012.
- Mizumoto S**. Reduction of Chondroitin 4-O-Sulfotransferase-1 Expression Causes Costello Syndrome (Glycotopic) *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, in press, 2013 年 (March) (doi: 10.4052/tigg.25.00).
- Mizumoto S**, Ikegawa S, **Sugahara K**. Human genetic disorders caused by defective genes encoding biosynthetic enzymes for sulfated glycosaminoglycans. *J Biol Chem* (Minireview), in press, (March 1, 2013 as doi:10.1074/jbc.R112.437038).
- Ichikawa H, Kanoh Y, Shirasawa S, Yokoyama T, **Yue F**, Tomotsune D, **Sasaki K**. Unique kinetics of Oct3/4 microlocalization following dissociation of human embryonic stem cell colonies. *Ann Anat* 195(1): 50-56, 2013.

- Tsuchiya H, Matsunaga T, Aikawa K, Kamada N, Nakamura K, Ichikawa H, **Sasaki K**, Ohmori S. Evaluation of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells for detection of CYP1A inducers. *Drug Metab Pharmacokinet* 27(6): 598-604, 2012.
- Yoshie S, Ito J, Shirasawa S, Yokoyama T, Fujimura Y, Takeda K, Mizuguchi M, Matsumoto K, Tomotsune D, **Sasaki K**. Establishment of novel detection system for embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells based on nongenetic manipulation with indocyanine green. *Tissue Eng Part C Methods* 18: 12-20, 2012.
- Ichikawa H, Nakata N, Abo Y, Shirasawa S, Yokoyama T, Yoshie S, **Yue F**, Tomotsune D, **Sasaki K**. Gene pathway analysis of the mechanism by which the Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 inhibits apoptosis in isolated thawed human embryonic stem cells. *Cryobiology* 64: 12-22, 2012.
- Nitahara-Kasahara Y**, Hayashita-Kinoh H, Ohshima-Hosoyama S, Okada H, Wada-Maeda M, Nakamura A, **Okada T**, **Takeda S**. Long-term engraftment of multipotent mesenchymal stromal cells that differentiate to form myogenic cells in dogs with Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther.* 20(1): 168-177, 2012.
- Ito M, Suzuki Y, **Okada T**, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, **Takeda S**, Krejci E, Ohno K. Protein-anchoring strategy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. *Mol Ther.* 20(7): 1384-1392, 2012.
- Baba Y, Satoh S, Otsu M, Sasaki E, **Okada T**, Watanabe S. In vitro cell subtype-specific transduction of adeno-associated virus in mouse and marmoset retinal explant culture. *Biochimie.* 94(12): 2716-2722, 2012.
- Okada H, Ishibashi H, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, **Nitahara-Kasahara Y**, Baba Y, Watanabe S, **Takeda S**, **Okada T**. Robust long-term transduction of common marmoset neuromuscular tissue with rAAV1 and rAAV9. *Mol Ther Nucleic Acids* [in press]
- Okada T**. Efficient AAV vector production system: Towards gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. In *Gene Therapy - Tools and Potential Applications* (ed. by Francisco Martin), InTech [in press]
- Tsuda Y, **Nomura Y**. Direct observation of hair components involved in formation of permanent waves. *繊維学会誌*, in press.
- Kawada C, Hasegawa T, Watanabe M, **Nomura Y**. Dietary Glucosylceramide Enhances Tight Junction Function in Skin Epidermis via Induction of Claudin-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press.
- Sato Y, Arai KY, Nishiyama T, **Nomura Y**, Kishimoto Y, Aizawa S, Maruyama N, Ishigami A. Ascorbic acid deficiency leads to epidermal atrophy and UVB-induced skin pigmentation in SMP30/GNL knockout hairless mice. *J. Invest. Dermatol* 132: 2112-2115, 2012.
- Ohya A, Kobayashi M, Sakai Y, Kawashima H, Kageyama S, **Nakayama J**. Lymphocyte recruitment via high endothelial venules in lymphoid stroma of Warthin's tumor. *Pathology* 45(2): 150-154, 2013
- Maruyama M, Kobayashi M, Sakai Y, Hiraoka N, Oya A, Kageyama S, Tanaka E, **Nakayama J**, Morohoshi T. Periductal induction of high endothelial venule-like vessels in type 1 autoimmune pancreatitis. *Pancreas* 42(1): 53-59, 2013.
- Kobayashi M, Hoshino H, Suzawa K, Sakai Y, **Nakayama J**, Fukuda M. Two distinct

lymphocyte homing systems involved in the pathogenesis of chronic inflammatory gastrointestinal diseases. *Semin Immunopathol* 34, 401-413, 2012.

Fujiwara M, Kobayashi M, Hoshino H, Uchimura K, Nakada T, Masumoto J, Sakai Y, Fukuda M, **Nakayama J**. Expression of long-form N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase 1 in human high endothelial venules. *J Histochem Cytochem* 60, 397-407, 2012.

Karasawa F, Shiota A, Goso Y, Kobayashi M, Sato Y, Masumoto J, Fujiwara M, Yokosawa S, Muraki T, Miyagawa S, Ueda M, Fukuda MN, Fukuda M, Ishihara K, **Nakayama J**. Essential role of gastric gland mucin in preventing gastric cancer in mice. *J Clin Invest* 122, 923-934, 2012.

古庄知己. 結合組織疾患-Marfan 症候群と Ehlers-Danlos 症候群. 内分泌・糖尿病・代謝内科 34 (3) : 210-220, 2012.

古庄知己. Marfan 症候群, Ehlers-Danlos 症候群. 小児内科増刊号・小児疾患の診断治療基準第 4 版 (編集:『小児内科』『小児外科』編集委員会), 東京医学社(東京) 44: 850-853, 2012.

古庄知己. エーラスダンロス症候群. 別冊日本臨牀・新領域別症候群シリーズ No.20・先天異常症候群第 2 版(下), 日本臨牀社, 721-726, 2012.

古庄知己, **福嶋義光**. 遺伝カウンセリングのノウハウ. *臨牀と研究* 89(5): 635-640, 2012.

2. 学会発表

古庄知己, 清水健司, 岡本伸彦, 三宅紀子, 大橋博文, 松本直通, 福嶋義光. 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. 第 35 回日本小児遺伝学会 (平成 24 年 4 月 19 日 於 久留米大学筑水会館, 久留米).

古庄知己, 福嶋義光, 三宅紀子, 松本直通, 水本

修二, 菅原一幸, 坂翔太, 野村義宏, 岳鳳鳴, 佐々木克典, 中山淳, 岡田尚巳, 武田伸一. デルマタン 4-O-硫酸基転移酵素-1 の欠損による新型 Ehlers-Danlos 症候群の発見, 疾患概念の確立, 遺伝子治療の開発. 第 110 回信州整形外科懇談会 (平成 24 年 8 月 18 日 於 信州大学医学部附属病院).

岳鳳鳴, **古庄知己**, 滝澤 佐季子, 吉江 進, 増田 章子, 森崎 美圭, 横山 忠幸, 友常 大八郎, **佐々木 克典**. Patient-specific iPSC cell-derived neurons of DD-EDS syndrome. 第 12 回日本再生医療学会総会 (平成 24 年 3 月 21-23 日 於 パシフィコ横浜).

Kosho T, Mizumoto S, Kobayashi M, Fujita Y, Nakayama J, Miyake N, Nomura Y, Hatamochi A, Fukushima Y, Sugahara K, Matsumoto N. Pathophysiological features of dermatan 4-O-sulfotransferase 1 (D4ST1)-deficient Ehlers-Danlos syndrome (DD-EDS). *American Society of Human Genetics 62nd Annual Meeting, San Francisco, Nov 6-10, 2012.*

三宅紀子. 人類遺伝学会第 57 回大会・一般口演・臨床遺伝学 3・「X連鎖性を疑われたがミトコンドリア遺伝病であった一難聴家系の解析」平成 24 年 10 月 27 日京王プラザホテル(東京) .

Matsumoto N. European Human Genetics Conference 2012 “Genetic abnormalities in Coffin-Siris syndrome”(poster) (Nuremberg Conference Center, Nuremberg, Germany, June 24-24, 2012).

Matsumoto N, Tsurusaki Y, **Miyake N**. American Society of Human Genetics Meeting 2012. Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome November 8, 2012 at Moscone Center, San Francisco, CA, USA.

Matsumoto N. The 12th annual meeting of East Asian Union of Human Genetics Societies (oral presentation) “Medelian exome” Nov 29, 2012