

at Seoul National University Hospital, Seoul, Korea.

3. 招聘講演

古庄 知己. 「デルマトン硫酸 4-O-硫酸基転移酵素 (D4ST-1) 欠損による新型エーラスダングロス症候群の発見および疾患概念の確立ー根治療法の開発をめざしてー」国立精神・神経医療研究センター神経研究所 所内セミナー (平成 24 年 4 月 20 日 於 研究所 3 号館セミナールーム、小平).

古庄 知己. 「整形外科疾患は遺伝性・先天性疾患の宝庫ー代表的疾患から古庄型 EDS までー」信州大学医学部整形外科学教室・整形外科セミナー (平成 24 年 9 月 3 日 於 信州大学医学部附属病院).

古庄 知己. 「デルマトン硫酸 4-O-硫酸基転移酵素 (D4ST-1) 欠損による新型エーラスダングロス症候群の発見および疾患概念の確立」第 36 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会・市民公開シンポジウム (平成 24 年 6 月 9 日ー10 日 於 信州大学医学部附属病院、松本)

古庄 知己. 「遺伝カウンセリングロールプレイ実習ー全人的医学教育としての取り組みー」第 36 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会・市民公開シンポジウム (平成 24 年 6 月 9 日ー10 日 於 信州大学医学部附属病院、松本)

古庄 知己. 「EDS の臨床ー基本的なこと、新しいことー」古庄知己 2012 年度 JEFA 総会 (2012/6/30、於 横浜市浦舟地域ケアプラザ)

Matsumoto N. 2012 Illumina Asica Pacific Scientific Summit [Exome analysis in mendelian disorders] (Invited speaker) (Sheraton Mirage Resort & Spa Gold Coast, Gold Coast, Australia, April 24, 2012) .

松本直通. 神戸大学大学院医学研究科講義「遺伝性疾患のエクソーム解析」・H24 年 5 月

29 日・神戸大学医学部.

松本直通. 第 5 回みやこ小児神経臨床懇話会 (特別講演)「小児神経疾患における遺伝子研究の新潮流」H24 年 6 月 9 日・メルパルク京都.

松本直通. 2012 イルミナ次世代シーケンサーユーザーフォーラム (招待講演)・「遺伝性疾患のエクソーム解析」・H24 年 6 月 20 日・東京国際フォーラム.

松本直通. 次世代シーケンス拠点班 (松本班) 講演会 松本直通 「次世代シーケンスを用いた遺伝性疾患へのアプローチ」H24 年 7 月 10 日・大宮ソニックシティ・大宮.

松本直通. 埼玉医科大学ゲノム医学研究センター学術セミナー「遺伝性疾患のエクソーム解析」・H24 年 7 月 13 日・埼玉医科大学.

松本直通. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業「次世代遺伝子解析装置を用いた難病研究」平成 24 年度第 1 回公開ワークショップ「遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築」H24 年 9 月 6 日京都大学医学研究科芝蘭会館.

松本直通. 第 34 回日本生物学的精神医学会・シンポジウム 1 (シンポジスト)「自閉症スペクトラムとてんかんに着目したゲノム解析」2012 年 9 月 28 日・神戸国際会議場.

松本直通. 厚生労働科学研究費・難治性疾患克服研究事業神経変性疾患に関する調査研究班・「病態に根ざした ALS の新規治療開発」分科班・平成 24 年度ワークショップ「次世代シーケンサーを活用した遺伝性疾患の網羅的エクソーム解析」平成 24 年 10 月 5 日 @東京(シェーンバツハサボー) .

Matsumoto N. Translational Genomics Conference 2012 (Keynote speaker) Exome sequencing in mendelian disorders. (Hyatt Reagency Jeju, Jeju, Korea, Oct 13, 2012) .

松本直通. 生命医薬情報学連合大会 2012 (招聘講演)「遺伝性疾患のエクソーム解析」平成 24 年 10 月 17 日 @東京(タワーホール船堀) .

人類遺伝学会第 57 回大会・ランチョンセミナー 1 松本直通「遺伝性疾患の効率的な次世代シーケンス解析」(アジレント共催)平成 24 年 10 月 25 日京王プラザホテル(東京)。

Matsumoto N. The 57th annual meeting, Japanese Society of Human Genetics. (Symposist) “Isolation of genes causative for genetic diseases by next generation sequencer” in Symposium 5 entitled “Next Generation Sequencing for disease-genome analysis”. Oct 25, 2012 at Keoi Plaza Hotel, Tokyo.

松本直通. ゲノム解析懇話会(トランスジェニック共催)「次世代シーケンスを用いた疾患ゲノム解析」平成 24 年 10 月 25 日京王プラザホテル(東京)。

松本直通. 人類遺伝学会第 57 回大会・基本講座・いまさら聞けない「遺伝医学」(講師)「次世代シーケンサー入門」平成 24 年 10 月 26 日京王プラザホテル(東京)。

松本直通. 新学術領域研究「転写サイクル」平成 24 年度第 1 回領域会議「SWI/SNF 複合体異常が来す Coffin-Siris 症候群」平成 24 年 10 月 29 日・長崎大学医学部良順会館。

松本直通. 平成 24 年度脳科学戦略推進プログラム成果報告会「発達障害に関わる分子異常探索」平成 24 年 11 月 21 日京都リサーチパーク・京都。

松本直通. 平成 24 年度脳科学戦略推進プログラム課題 F 発達障害研究チーム第二回分科会「発達障害に関わる分子異常探索」平成 24 年 11 月 22 日京都リサーチパーク・京都。

松本直通. 第 152 回染色体研究会・特別講演「エクソーム解析」平成 24 年 12 月 1 日・東京医科大学病院・東京。

松本直通. 精神・神経疾患研究開発費 23-5「筋ジストロフィーおよび関連疾患の診断・治療開発を目指した基盤研究」平成 24 年度「西野班」班会議特別講演「遺伝性疾患のエクソーム解析」平成 24 年 12 月 8 日・JA 共済ビル・東京。

松本直通. 第 35 回日本分子生物学会年会ワークショップ・精神のオミックス(オーガナイザー内匠透・松本直通)「発達障害におけるゲノム解析:次世代技術を用いて」(シンポジスト)平成 24 年 12 月 13 日福岡国際会議場・福岡。

松本直通. Advans 研究会 2012・招聘講演「遺伝性疾患のエクソーム解析」平成 24 年 12 月 15 日ホテルグランドパレス・東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

松本直通、鶴崎美徳、三宅紀子「コフィン・シリリス症候群の検出方法」PCT/JP2012/83113、平成 24 年 12 月 20 日。

才津浩智、松本直通「孔脳症又は脳出血のリスクを予測する方法」PCT/JP2012/77903、平成 24 年 10 月 29 日。

松本直通、三宅紀子「ミトコンドリア複合体 III 欠乏症の確定診断法」特願 2012-180356、平成 24 年 8 月 16 日。

岡田尚巳、千代智子、武田伸一「薬剤取り込み増強剤」特願 2012-078035、平成 24 年 3 月 29 日出願。

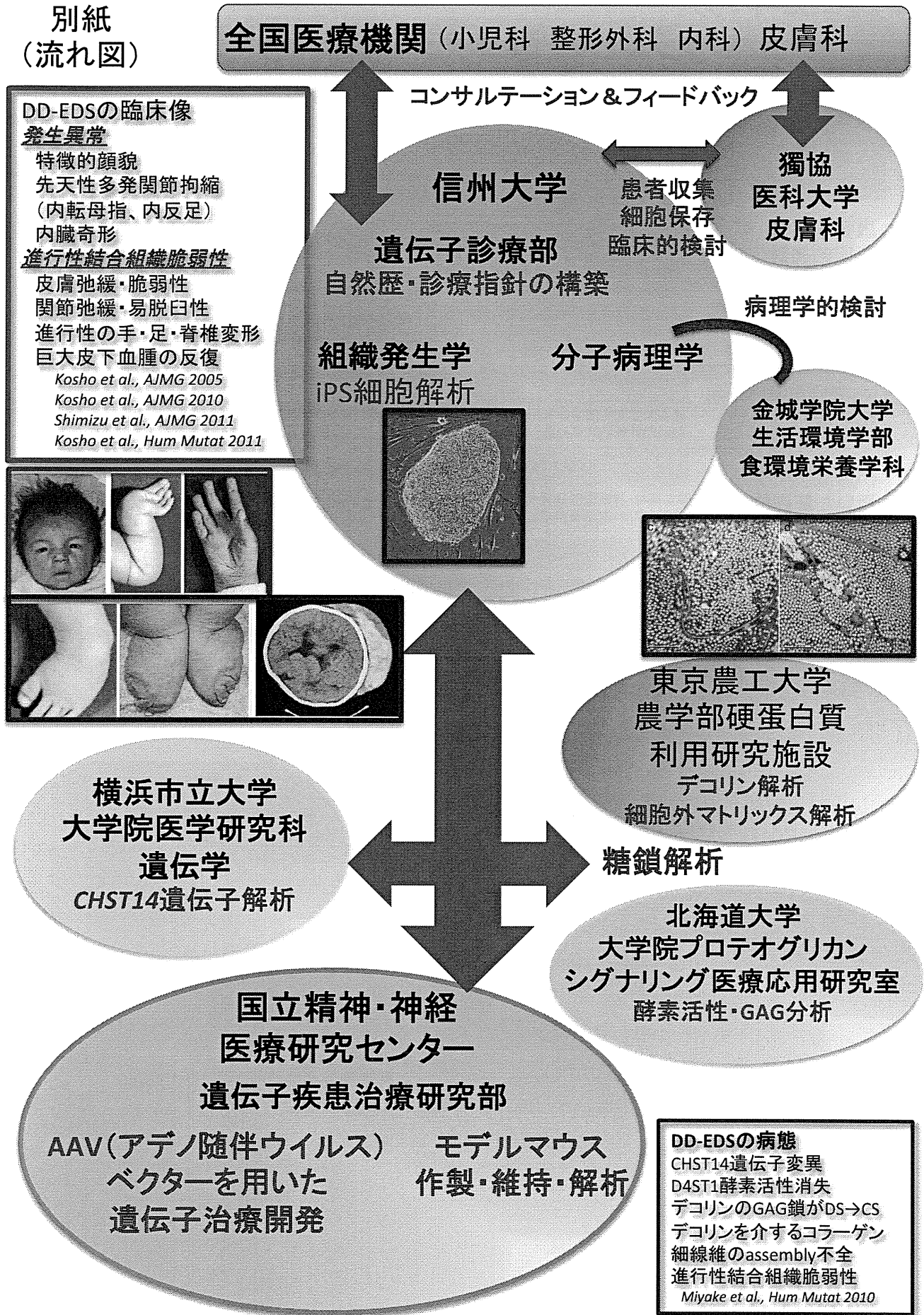
岡田尚巳、武田伸一、喜納裕美「薬剤送達粒子及びその製造方法」特願 2011-092252 PCT/JP2012/060229、平成 24 年 4 月 16 日出願。

野村義宏「毛髪処理方法」特許 4931010 特許権者：東洋羽毛工業(株)、(国)東京農工大学、登録日：平成 24 年 2 月 24 日。

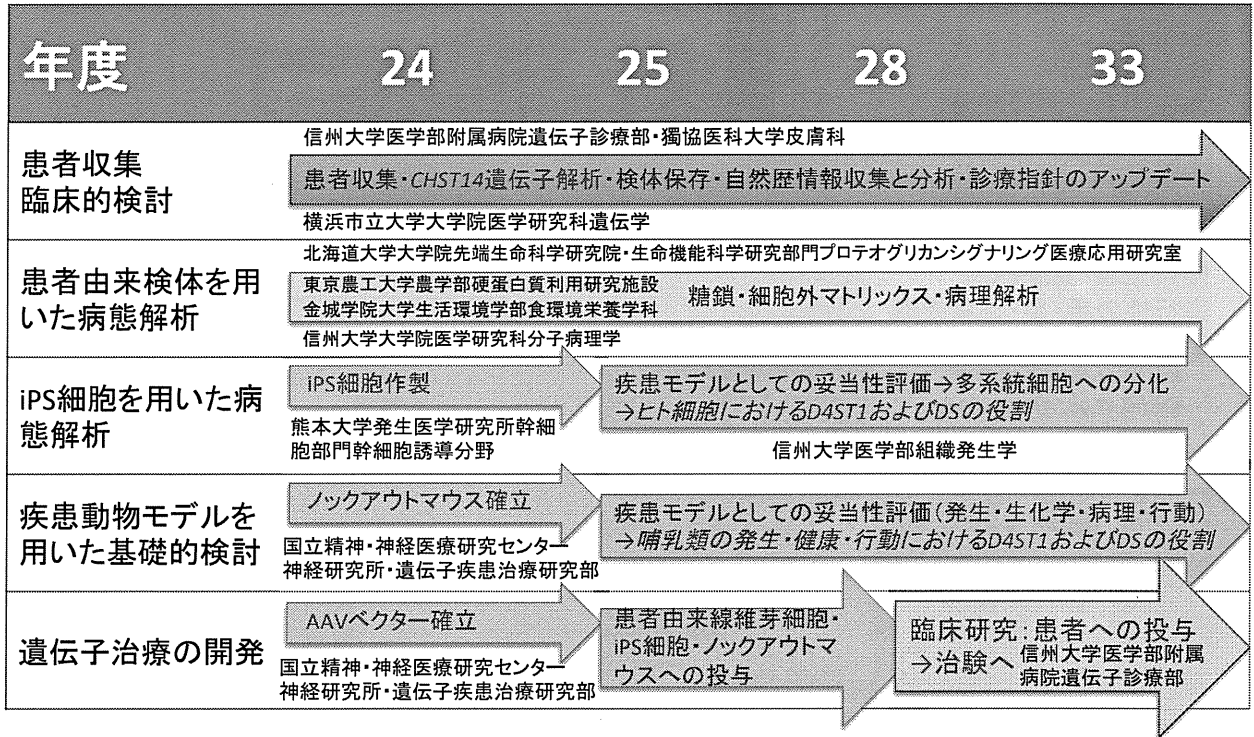
野村義宏「骨粗鬆症の予防又は改善剤」特許権者：農工大ティー・エル・オー(株)、登録日：平成 24 年 5 月 25 日。

野村義宏「皮革改質剤」特許 5011471 特許権者：(国)東京農工大学、大阪化成(株)、東京都、登録日：平成 24 年 6 月 15 日。

別紙
(流れ図)



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



Ⅲ. 分担研究報告

平成24年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

デルマトタン 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（DDEDS）の
病態解明と治療法の開発
分担研究課題：DDEDS の臨床的検討

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
研究分担者	福嶋義光	信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座
研究分担者	旗持淳	獨協医科大学皮膚科

研究要旨：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、現在までに合計 27 家系 37 患者が見出されている。DDEDS は、比較的頻度の高い重要な EDS の 1 病型と考えられる。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。

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。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、デルマトタン 4-O-硫酸基転移酵素-1 (D4ST1) をコードする遺伝子であり、発症機構として「**D4ST-1 欠損**→デコリンに付加するグリ

コサミノグリカン (GAG) 鎖の組成変化 (デルマトタン硫酸[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 thumb-clubfoot syndrome (ATCS)” (Dündar et al., *Am J Hum Genet* 85: 873-882, 2009)、および、後側彎型 EDS の亜型に分類されていた一部の患者 (Musculocontractural EDS; MCEDS) (Malfait et al., *Hum Mutat* 31: 1233-1239, 2010) の原因であると報告された。そして、ATCS の発見グループからは、本症は「dermatan sulfate-deficient ATCS」と命名すべきであり、EDS との分類は不適切であるとの主張が展開された。その根拠は、本症においては先天性多発関節拘縮、顔貌上の特徴、口唇口蓋裂、腸・腎の異常、筋緊張低下など通常 EDS には見られない症状があること、分子病態が EDS とは異なることであった (Janecke et al., *Hum Mutat* 32: 484-485, 2011)。

平成 21-23 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; Koshio 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、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、<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。</p> <p>眼科：斜視、屈折異常、緑内障。</p> <p>耳鼻科：滲出性中耳炎、難聴。</p> <p>泌尿器科：排尿障害、膀胱拡張。</p> <p>循環器科：弁の異常（MVP などあれば、感染性心内膜炎の予防）、上行大動脈拡張。</p>
外傷対策	<p>転倒などの外傷により、皮膚裂傷、関節脱臼を生じやすい。</p> <p>巨大皮下血腫については、DDAVP 点鼻療法（STIMATETM）が有効。</p>
思春期以降	<p>二次性徴の観察（女性では乳房発育不全、男性では性腺機能低下の可能性）。</p>

	(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）。

本プロジェクトの目標は、本研究班および国内外の研究施設において見出された全患者の把握である。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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（研究分担者三宅博士の報告書を参照）。

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 患者が見出された。

上記全患者を表 1 にまとめる。

D. 考察

日本を中心に、新たな DDEDS 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。

F. 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。

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 *OFDI* 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.

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

古庄知己. 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.

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-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.

招待講演「デルマタン硫酸 4-O-硫酸基転移酵素 (D4ST-1) 欠損による新型エーラスダンロス症候群の発見および疾患概念の確立ー根治療法の開発をめざしてー」古庄知己 国立精神・神経医療研究センター神経研究所所内セミナー (平成 24 年 4 月 20 日 於 研究所 3 号館セミナールーム、小平).

招待講演「整形外科疾患は遺伝性・先天性疾患の宝庫ー代表的疾患から古庄型 EDS までー」古庄知己 信州大学医学部整形外科学教室・整形外科セミナー (平成 24 年 9 月 3 日 於 信州大学医学部附属病院).

招待講演「デルマタン硫酸 4-O-硫酸基転移酵素 (D4ST-1) 欠損による新型エーラスダンロ

ス症候群の発見および疾患概念の確立」古庄知己 第 36 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会・市民公開シンポジウム (平成 24 年 6 月 9 日-10 日 於 信州大学医学部附属病院、松本)

招待講演「EDS の臨床ー基本的なこと、新しいことー」古庄知己 2012 年度 JEFA 総会 (2012/6/30、於 横浜市浦舟地域ケアプラザ)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1: これまでに本研究班、論文誌上および研究会で報告されたDDEDS患者リスト

患者	家系	出身	CHST14変異	性別	初回報告時年齢	参考文献
DDEDS論文報告例						
1	1	トルコ	V49X homo	F	3.5y	Dündar et al., 1997; Dündar et al., 2010
2				M	1.5y	
3				F	6y	
4	2	日本	Y293C homo	M	4y	Sonoda and Kouno, 2000; Dündar et al., 2010
5				M	7m	
6	3	オーストリア	R213P homo	M	0d†	Janecke et al., 2001; Dündar et al., 2010
7				M	12m	
8	4	トルコ	[R135G;L137Q] homo	F	1-4m†	Dündar et al., 2001; Dündar et al., 2010
9				M	1-4m†	
10				M	1-4m†	
11				M	3m	
12	5	日本	P281L/Y293C	F	11y	Kosho et al., 2005; Kosho et al., 2010; Miyake et al., 2010
13	6	日本	P281L homo	F	14y	Kosho et al., 2005; Kosho et al., 2010; Miyake et al., 2010
14	7	日本	P281L homo	M	32y	Kosho et al., 2010; Miyake et al., 2010
15	8	日本	K69X/P281L	M	32y	Kosho et al., 2010; Miyake et al., 2010
16	9	日本	P281L/C289S	F	20y	Kosho et al., 2010; Miyake et al., 2010
17	10	日本	P281L/Y293C	F	4y	Kosho et al., 2010; Miyake et al., 2010
18	11	トルコ	V49X homo	F	22y	Malfait et al., 2010
19				F	21y	Malfait et al., 2010
20	12	インド	E334Gfs*107 homo	F	12y	Malfait et al., 2010
21	13	日本	P281L/Y293C	M	2y	Shimizu et al., 2011
22	14	日本	F209S/P281L	M	6y	Shimizu et al., 2011
23	15	オランダ	V48X homo	F	20y	Voermans et al., 2012
24	16	アフガニスタン	R274P homo	F	11y	Mendoza-Londono et al., 2012
25				F	0y	
26	17	ミコウスキー	G228Lfs*13	F	16y	Winters et al., 2012
DDEDS論文未報告例						
27	18	日本	P281L/W162X	F	18y	解析時
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?	

homo, homozygous mutation; /, compound heterozygous mutation; F, female; M, male; y, years old; m, months old; †, dead at the time of publication

平成24年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

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（DDEDS）の
病態解明と治療法の開発
分担研究課題：DDEDSの遺伝子解析状況

研究分担者 三宅紀子 横浜市立大学医学研究科遺伝学

研究分担者 松本直通 横浜市立大学医学研究科遺伝学

研究要旨：我々は、新型エーラスダンロス症候群（新型EDS；EDS, Kosho Type）の遺伝学的解析により責任遺伝子である *CHST14* 遺伝子を同定した。本年度は、臨床学的に新たに本症候群と診断された国内外の合計5症例に関してサンガー法を用いた塩基配列解読を行い、うち1症例において *CHST14* 遺伝子の複合ヘテロ接合性変異を同定した。本年度までの解析により、合計22家系中14家系において *CHST14* 遺伝子に変異を同定した。変異検出率は（63.6%）であった。今後、変異陽性例と陰性例の詳細な臨床像を比較検討することにより診断基準の確立を進める。また、患者由来のiPS細胞の *CHST14* 遺伝子の変異解析および、コピー数解析を行い、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iPS樹立に際して獲得されたコピー数異常であると考えられ、今後の解析に注意を要する。

A. 研究目的

エーラスダンロス症候群（EDS）は関節と皮膚の弛緩ならびに組織脆弱性を特徴とする多様な結合織疾患である。少なくとも6つのタイプに分類され、さらに亜型が複数存在する。研究代表者・古庄は、いずれのタイプにも属さない新たなタイプのEDSを2家系に見出し(Kosho et al. AJMG 2005)、さらに4家系を加えた計6家系で新型EDS (EDS, Kosho Type) の疾患概念を提唱した (Kosho et al. AJMG 2010)。さらに我々は、この6家系において責任遺伝子である *CHST14* 遺伝子を同定するに至った (Miyake et al. Hum Mutat 2010)。本年度は、新たに本症候群を疑われた5家系の遺伝学的検索を行った。また、患者1名 (P281L/Y293C) の皮膚線維芽細胞から樹立されたiPS細胞に関して、*CHST14* 遺伝子内の獲得変異、およびゲノムのコピー数獲得の有無を検証した。

B. 研究方法

CHST14 遺伝子の変異解析

CHST14 遺伝子のタンパク質翻訳領域をカバーす

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。常染色体劣性遺伝形式であるため、ホモ接合性変異もしくは複合ヘテロ接合性変異の有無を確認した。

患者由来iPS細胞の遺伝学的解析

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。更に、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為、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。以下の条件により、コピー数変化を検出した。

重複： marker count : 20 probes

Size: 100 kb

Confidence: 90

欠失： marker count: 20 probes

Size: 10 kb

Confidence: 88

C. 研究結果

CHST14 遺伝子の変異解析

5 家系 (5 症例) に対して、サンガー法によるダイレクトシーケンス解析を行った。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。変異の種類は、8 種類でその内訳はミスセンス変異 3 種類、ナンセンス変異 4 種類、欠失 1 種類であった。

患者由来 iPS 細胞の遺伝学的解析

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。

D. 考察

CHST14 遺伝子の変異解析

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。

患者由来 iPS 細胞の遺伝学的解析

iPS 細胞は、GRID2 遺伝子の exon3 を含む欠失を獲得しており、今後の実験の継続には注意を要すると考えられる。GRID2 遺伝子は哺乳類の脳での発現が知られており、特に神経系の病態解析には注意を要すると考えられる。

E. 結論

新型エーラスダンロス症候群 (EDS) 患者と診断された 22 家系を解析し、14 家系においてホモ合性もしくは複合ヘテロ接合性の病的変異を認められた。CHST14 変異による臨床像は非常に特異的であり、今後も非典型症例も含めて解析を継続することで、明確な診断基準を確立できると考える。今回樹立された iPS 細胞は、GRID2 遺伝子を含む欠失を獲得していることが確認された。今後の解析については検討が必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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 *NFLX* cause Sotos-like syndrome. *J Hum Genet* 50(3): 207-211, 2012
- Tsurusaki Y[#], *Kosho T[#] (# denotes equal contribution), Hatahaki K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, *Matsumoto N (*: co-correspondence). Exome sequencing identifies an *OFDI* mutation in a family of X-linked lethal congenital malformation syndrome: delineation of male Oral-facial-digital syndrome type 1. *Clin Genet* (in press)
- Tsurusaki Y, *Saitoh S, Tomizawa K, Sudo A, Asahina N, Shiraishi 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, Dobrzeniecka S, Spiegelman D, Lacaille JC, Décarie JC, Matsumoto N, Rouleau GA, Michaud JL. Mutations in *SPTAN1* 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 *STXBP1* gene with Ohtahara syndrome. *Clin Genet* 81(4): 399-402, 2012
- Motobayashi M, Nishimura-Tadaki A, Inaba Y, Kosho T, 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
- 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
- Witzl 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 *SPTAN1* 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 *STXBP1* 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.
2. 学会発表
- 人類遺伝学会第 57 回大会・一般口演・臨床遺伝学 3・三宅紀子・「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)
- 2012 Illumina Asica Pacific Scientific Summit [Exome analysis in mendelian disorders]Naomichi Matsumoto (Invited speaker) (Sheraton Mirage Resort & Spa Gold Coast, Gold Coast, Australia, April 24, 2012)
- 神戸大学大学院医学研究科講義・松本直通「遺伝性疾患のエクソーム解析」・H24 年 5 月 29 日・神戸大学医学部
- 第 5 回みやこ小児神経臨床懇話会 (特別講演)・松本直通・「小児神経疾患における遺伝子研究の新潮流」H24 年 6 月 9 日・メルパルク京都
- 2012 イルミナ次世代シーケンサーユーザーフォーラム・松本直通 (招待講演)・「遺伝性疾患のエクソーム解析」・H24 年 6 月 20 日・東京国際フォーラム
- European Human Genetics Conference 2012 Naomichi Matsumoto "Genetic abnormalities in Coffin-Siris syndrome"(poster) (Nuremberg Conference Center, Nuremberg, Germany, June 24-24, 2012)
- 次世代シーケンス拠点班 (松本班) 講演会 松本直通「次世代シーケンスを用いた遺伝性疾患へのアプローチ」H24 年 7 月 10 日・大宮ソニックシティ・大宮
- 埼玉医科大学ゲノム医学研究センター学術セミナー 松本直通「遺伝性疾患のエクソーム解析」・H24 年 7 月 13 日・埼玉医科大学
- 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業「次世代遺伝子解析装置を用いた難病研究」平成 24 年度第 1 回公開ワークショップ・松本直通「遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築」H24 年 9 月 6 日京都大学医学研究科芝蘭会館
- 第 34 回日本生物学的精神医学会・シンポジウム 1・松本直通 (シンポジスト)「自閉症スペクトラムとてんかんに着目したゲノム解析」2012 年 9 月 28 日・神戸国際会議場
- 厚生労働科学研究費・難治性疾患克服研究事業神経変性疾患に関する調査研究班・「病態に根ざした ALS の新規治療開発」分科班・平成 24 年度ワークショップ・松本直通「次世代シーケンサーを活用した遺伝性疾患の網羅的エクソーム解析」平成 24 年 10 月 5 日@東京(シェーンバッハサボー)
- Translational Genomics Conference 2012 Naomichi Matsumoto (Keynote speaker) Exome sequencing in mendelian disorders. (Hyatt Reagency Jeju, Jeju, Korea, Oct 13, 2012)

生命医薬情報学連合大会 2012・松本直通（招聘講演）「遺伝性疾患のエクソーム解析」平成 24 年 10 月 17 日@東京(タワーホール船堀)

人類遺伝学会第 57 回大会・ランチョンセミナー 1 「遺伝性疾患の効率的な次世代シーケンス解析」（アジレント共催）平成 24 年 10 月 25 日京王プラザホテル(東京)

The 57th annual meeting, Japanese Society of Human Genetics · Naomichi Matsumoto (Symposist)“Isolation of genes causative for genetic diseases by next generation sequencer”in Symposium 5 entitled “Next Generation Sequencing for disease-genome analysis”. Oct 25, 2012 at Keoi Plaza Hotel, Tokyo

ゲノム解析懇話会(トランスジェニック共催)・松本直通「次世代シーケンスを用いた疾患ゲノム解析」平成 24 年 10 月 25 日京王プラザホテル(東京)

人類遺伝学会第 57 回大会・基本講座・いまさら聞けない「遺伝医学」・松本直通（講師）「次世代シーケンサー入門」平成 24 年 10 月 26 日京王プラザホテル(東京)

新学術領域研究「転写サイクル」平成 24 年度第 1 回領域会議・松本直通「SWI/SNF 複合体異常が来す Coffin-Siris 症候群」平成 24 年 10 月 29 日・長崎大学医学部良順会館

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

平成 24 年度脳科学戦略推進プログラム成果報告会・松本直通「発達障害に関わる分子異常探索」平成 24 年 11 月 21 日京都市サーチパーク・京都

平成 24 年度脳科学戦略推進プログラム課題 F 発達障害研究チーム第二回分科会・松本直通「発達障害に関わる分子異常探索」平成 24 年 11 月 22 日京都市サーチパーク・京都

The 12th annual meeting of East Asian Union of

Human Genetics Societies. Matsumoto Naomichi (oral presentation) “Medelian exome”Nov 29, 2012 at Seoul National University Hospital, Seoul, Korea.

第 152 回染色体研究会・特別講演・松本直通「エクソーム解析」平成 24 年 12 月 1 日・東京医科大学病院・東京

精神・神経疾患研究開発費 23-5「筋ジストロフィーおよび関連疾患の診断・治療開発を目指した基盤研究」平成 24 年度「西野班」班会議特別講演・松本直通「遺伝性疾患のエクソーム解析」平成 24 年 12 月 8 日・JA 共済ビル・東京

第 35 回日本分子生物学会年会ワークショップ・精神のオミックス(オーガナイザー内匠透・松本直通)松本直通「発達障害におけるゲノム解析：次世代技術を用いて」（シンポジスト）平成 24 年 12 月 13 日福岡国際会議場・福岡

Advans 研究会 2012・招聘講演・松本直通「遺伝性疾患のエクソーム解析」平成 24 年 12 月 15 日ホテルグランドパレス・東京

3. 知的財産権の出願・登録状況
PCT/JP2012/83113 松本直通／鶴崎美德／三宅紀子・コフィン・シリス症候群の検出方法・平成 24 年 12 月 20 日

PCT/JP2012/77903 才津浩智／松本直通・孔脳症又は脳出血のリスクを予測する方法・平成 24 年 10 月 29 日

特願 2012-180356・松本直通／三宅紀子・ミトコンドリア複合体 III 欠乏症の確定診断法・平成 24 年 8 月 16 日

4. 報道等

短体幹症

2012 年 8 月 10 日科学新聞・難治性骨疾患「短体幹症」・理研原因遺伝子を発見

平成24年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

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（DDEDS）の
病態解明と治療法の開発
分担研究課題：DDEDS の病理学的検討

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）
研究分担者 中山淳（信州大学大学院医学系研究科・分子病理学）
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：DDEDS 患者における病理学的検討を進めた。光顕においては、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においては、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。今後は、正常コントロールを含めた、CB 染色を用いた詳細な電顕観察を行い、健常人と本症患者におけるデコリン・プロテオグリカンとコラーゲン細線維との相互位置関係を明らかにする。

A. 研究目的

デルマタン 4-O-硫酸基転移酵素-1 (D4ST1) 欠損に基づくエーラスダンロス症候群 (DDEDS) は、研究代表者らが、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 の新病型として発見した疾患である（Kosho et al., 2005; Kosho et al., 2010）。本症の、少なくとも皮膚脆弱性に関する病態の概要は、「D4ST1 の欠損→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（正常ではデルマタン硫酸であるが、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」であると考えられるが（Miyake et al., 2010）、その詳細は不明である。

本プロジェクトの目的は、病理学的検討により、本症患者の各種組織における形態的特徴を明らかにすることである。

B. 研究方法

対象

Patient 12：P281L/Y293C を有する女性。

Patient 16：P281L/C289S を有する女性。

Patient 17：P281L/Y293C を有する女児。

Patient 21：P281L/Y293C を有する男児。

Patient 30：c.[2_10TGTTCCCCdel]による p.M1? を有する男児。

*Patient 番号は、「臨床的検討」に関する報告書に付記した表に準ずる。

光顕分析

4 人の患者 (Patients 12、16、17、30) および正常コントロール (1 人) 由来パラフィンブロックを用いて、AZAN 染色を行い観察した。

電顕分析 (Cupromeronic blue[CB]染色)

3 人の患者 (Patients 12、21、30) より検体を得た。グルタール固定後、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 (Scott and Thomlinson, J Anatomy 192: 391-405, 1998)。

抗デコリン抗体を用いた免疫組織化学分析

3人の患者 (Patient 12、16、17) および正常コントロール人 (1人) の光顕用パラフィン切片を抗ヒト・デコリン抗体 (マウスモノクローナル抗体) で染色した。

C. 研究結果

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 (図 1a)。

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 (Patients 12、30)、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 (Patients 16、17) (図 1b)。

電顕分析 (CB 染色)

通常の電子染色 (Uranyl acetate [UA]のみ) では、コラーゲン細線維のまわりに電子密度の高い線維状物質がまとわりついている様子が観察された (図 2b、Patient 30)。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 (図 2b)。

Patient 12 においては、UA 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 (図 2a)。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 (図 2a)。

Patient 21 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 (図 2a)。

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 3)。

D. 考察

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。

また、細胞外マトリックスの他の成分であるエラスチン線維の構造変化を調べることも重要と考えられた。

E. 結論

本研究は、デコリン・プロテオグリカンとコラーゲン細線維との相互位置関係において、健康人 (GAG 鎖はほぼデルマタン硫酸) と本症患者 (GAG 鎖はコンドロイチン硫酸) との間でどのような差があるのかに迫るきわめて重要なアプローチである。真皮表層においても、深層においても、明らかな相互位置関係上の相違があることが示された。

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), Hatahaki K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Doi H, Saitsu H, **Miyake N, *Matsumoto N** (*: co-correspondence). Exome sequencing identifies an *OFDI* 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.
- 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, Niikawa 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.
- 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 iPS 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.

古庄 知己. 「デルマタン硫酸 4-O-硫酸基転移酵素 (D4ST-1) 欠損による新型エーラスダンロス症候群の発見および疾患概念の確立ー根治療法の開発をめざしてー」国立精神・神経医療研究センター神経研究所 所内セミナー (平成24年4月20日 於 研究所3号館セミナールーム、小平).

古庄 知己. 「整形外科疾患は遺伝性・先天性疾患の宝庫ー代表的疾患から古庄型 EDS までー」信州大学医学部整形外科学教室・整形外科セミナー (平成24年9月3日 於 信州大学医学部附属病院).

古庄 知己. 「デルマタン硫酸 4-O-硫酸基転移酵素 (D4ST-1) 欠損による新型エーラスダンロス症候群の発見および疾患概念の確立」第36回日本遺伝カウンセリング学会学術集会・市民公開シンポジウム (平成24年6月9日-10日 於 信州大学医学部附属病院、松本)

古庄 知己. 「遺伝カウンセリングロールプレイ実習ー全人的医学教育としての取り組みー」第36回日本遺伝カウンセリング学会学術集会・市民公開シンポジウム (平成24年6月9日-10日 於 信州大学医学部附属病院、松本)

古庄 知己. 「EDS の臨床ー基本的なこと、新しいことー」古庄知己 2012 年度 JEFA 総会 (2012/6/30、於 横浜市浦舟地域ケアプラザ)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし