

図1a: 光顕所見(弱拡大)

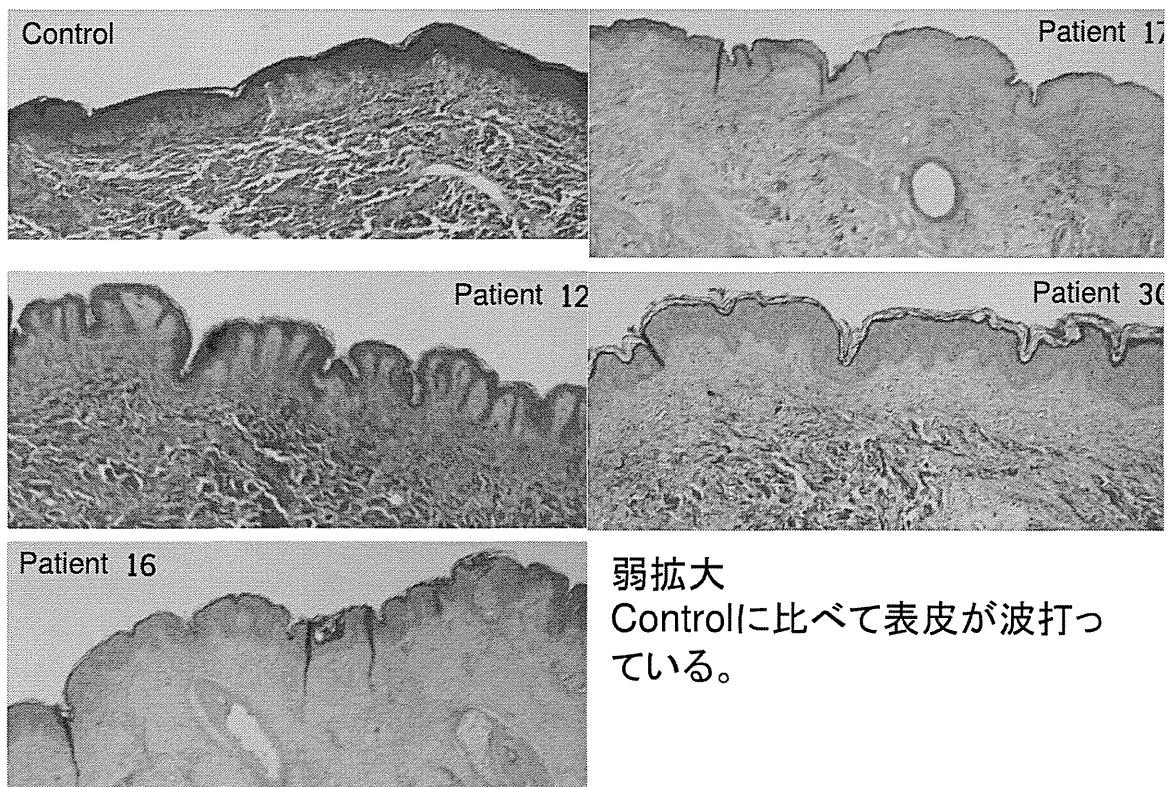


図1b: 光顕所見(強拡大)

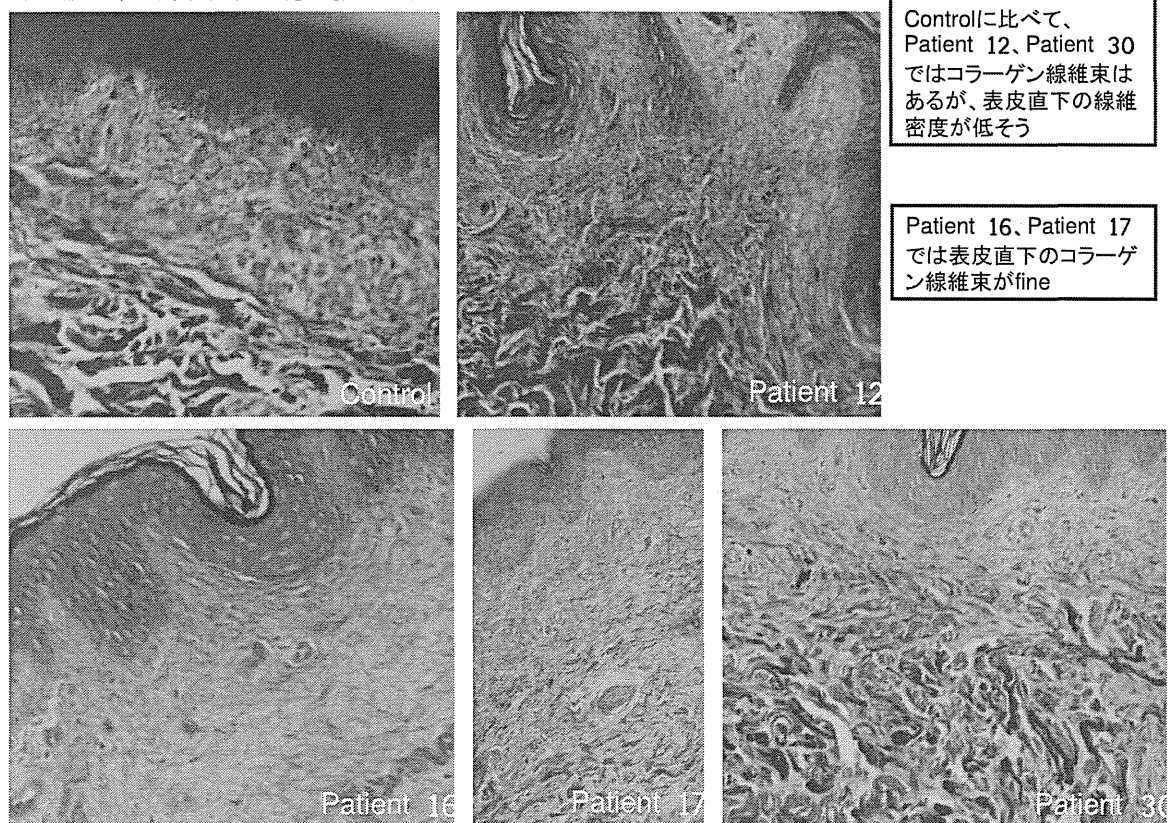
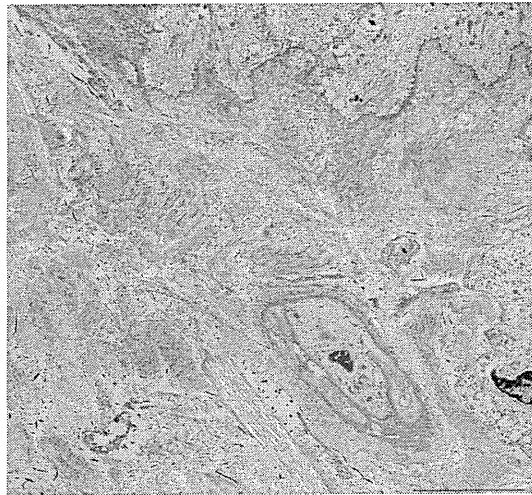
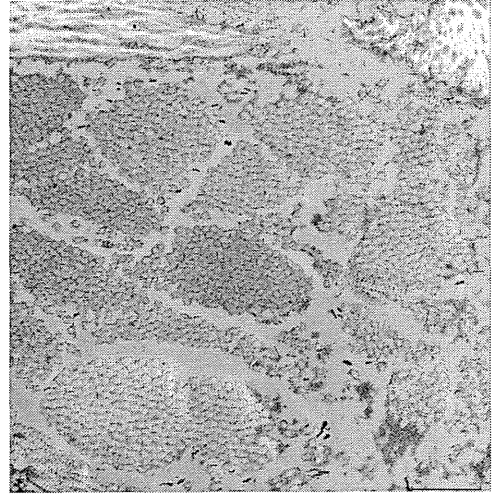


図2a: 電顕所見 (Patient 12)

単純電顕

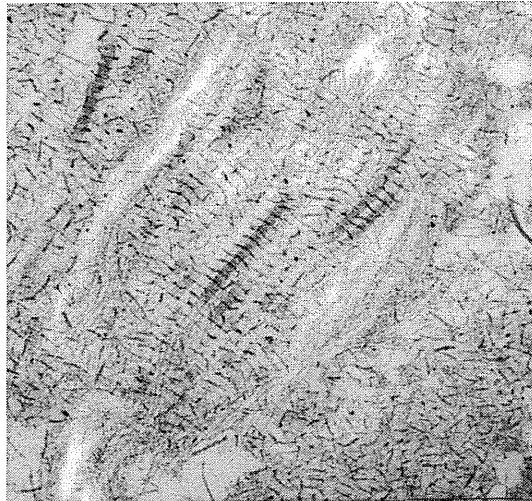


真皮表層(UAのみ)

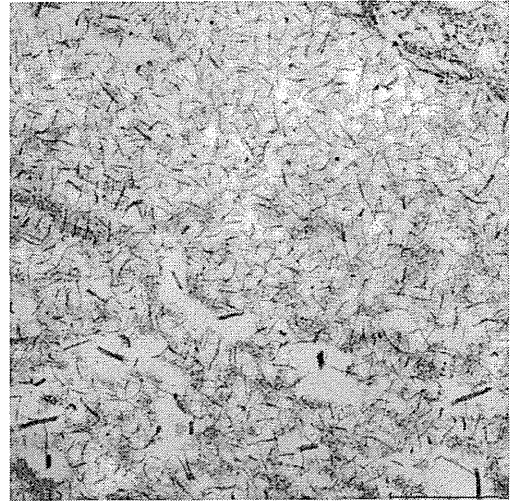


真皮深層(UAのみ)

真皮表層

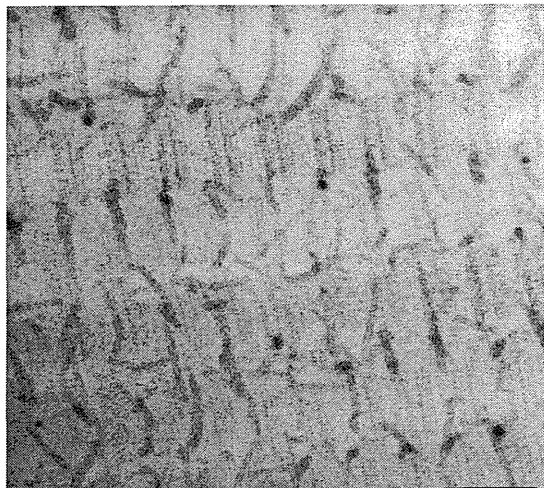


CB+UA(縦断像)

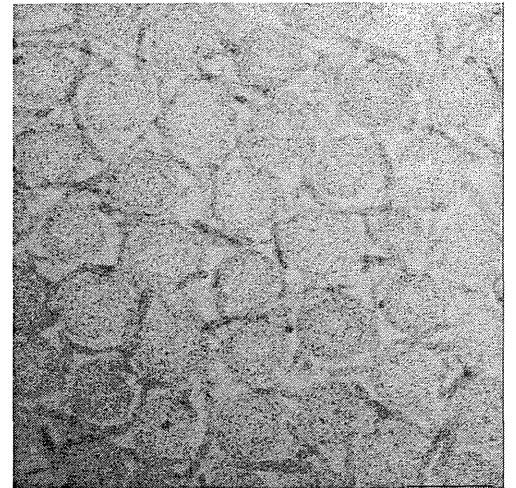


CB+UA(横断像)

真皮深層



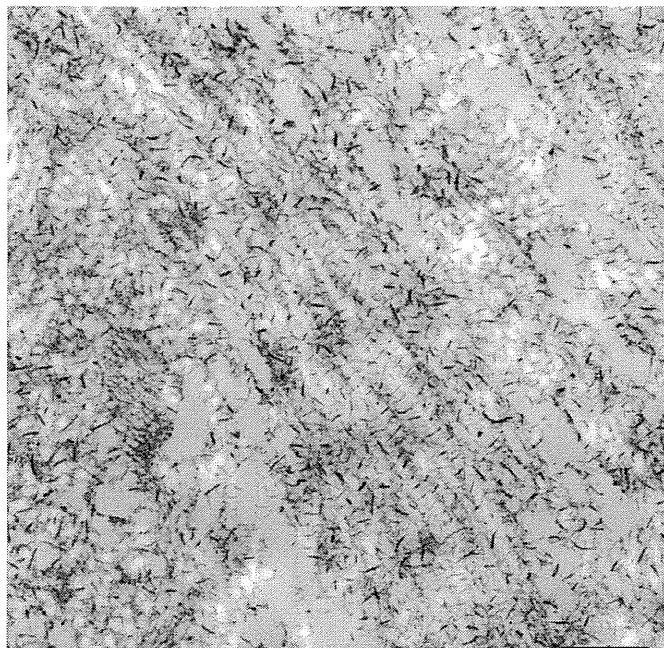
CB+UA(縦断像)



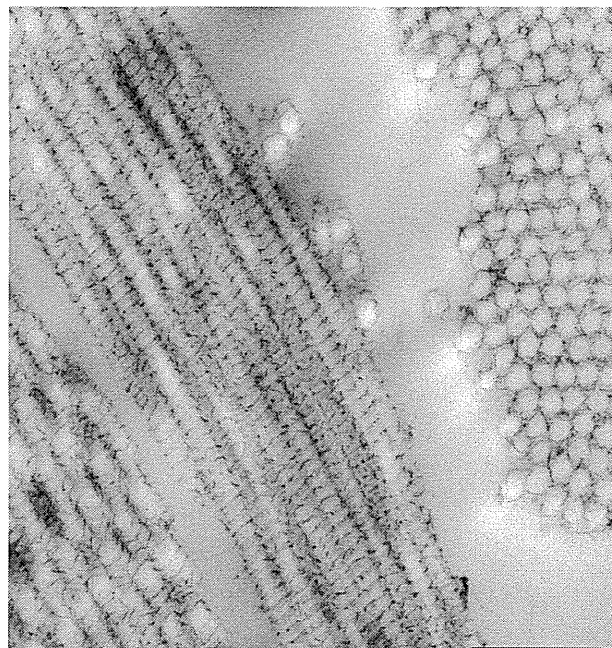
CB+UA(横断像)

図2b:電顕所見(Patients 21、30)

Patients 21

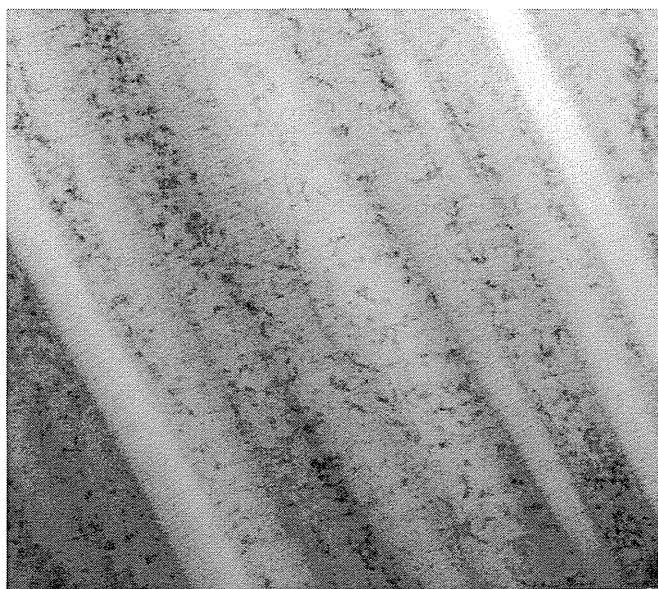


真皮表層:CB+UA

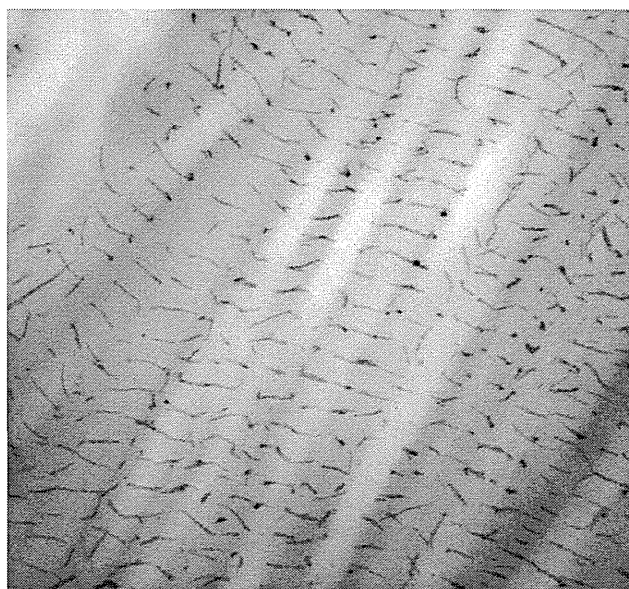


真皮深層:CB+UA

Patients 30

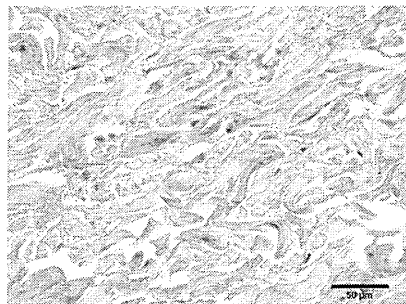


真皮深層:UAのみ

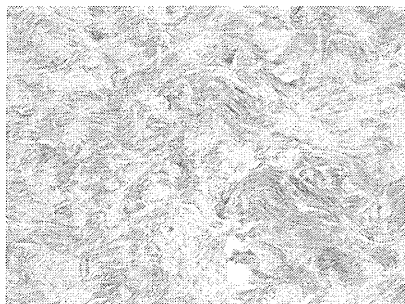


真皮深層:CBのみ

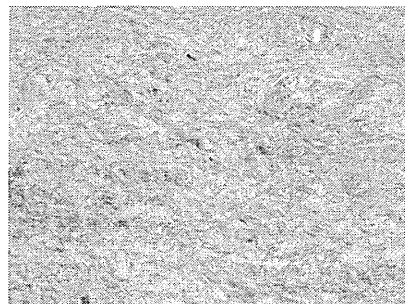
図3



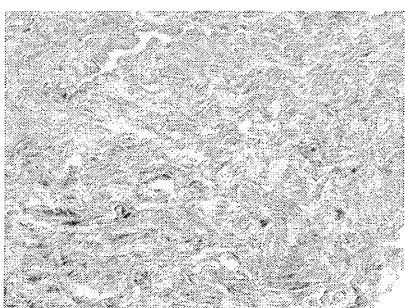
Control 14F upper arm



Patient 12 16F abdomen



Patient 16 19F upper arm



Patient 12 18F back



Patient 17 4F upper arm

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 の糖鎖医学的検討

研究分担者 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

研究要旨：デルマトタン硫酸（DS）は特定のコアタンパク質上のセリン残基に共有結合した DS-プロテオグリカン(DS-PG)として、主に細胞表面や細胞外マトリックスに普遍的に存在する。DS は特に皮膚、軟骨、大動脈に多く存在しており、その構造は L-イズロン酸 (IdoUA) と N-アセチル-D-ガラクトサミン (GalNAc) が交互に 50~200 回程度繰り返したものである。DS は細胞外マトリックスの構築、増殖因子を介したシグナル伝達、創傷治癒、抗血液凝固阻止などの多様な生理機能を発揮する。最近、DS の生合成に関わるデルマトタン 4-O-硫酸基転移酵素-1 (D4ST-1)の変異が皮膚の脆弱性や骨異形成を特徴とする新しいタイプのエーラス・ダンロス症候群(EDS)を引き起こすことが明らかになった [Miyake *et al.*, Hum Mutat. (2010) 31, 966-974]。D4ST-1 の変異によって、その硫酸基転移活性が低下し、その結果、DS-PG の一種でコラーゲンと会合するデコリンに付加する DS 鎖が合成されず、コンドロイチン硫酸(CS)に置換が起こっていることが判明した[Miyake *et al.*, Hum Mutat. (2010) 31, 966-974]。本分担研究では、発症機序のさらなる解明のため、1)上述した D4ST-1 変異 EDS 患者由来の尿中に含まれる DS 鎖の定量、2)新奇な D4ST-1 の変異を有する患者由来の繊維芽細胞の DS 鎖の定量、3)D4ST-1 ノックアウトマウスの尿中に含まれる DS 鎖の解析を試みた。

その結果、D4ST1 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かと期待された。さらに、新奇な D4ST-1 の変異の EDS 患者由来の繊維芽細胞では、DS 鎖の合成量が低下していたことから、EDS が発症すると考えられた。また、D4ST-1 ノックアウトマウス由来の尿においては、DS 鎖が全く検出されなかった。このように、ヒトの D4ST-1 変異 EDS 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から、モデルマウスの解析が今後の EDS の診断法や治療法の開発に有用であることが強く示唆された。

#### A. 研究目的

デルマトタン硫酸（DS）は特定のコアタンパク質上のセリン残基に共有結合した DS-プロテオグリカン(DS-PG)として、主に細胞表面や細胞外マトリックスに普遍的に存在する。DSは特に皮膚、軟骨、大動脈に多く存在しており、その構造は L-イズロン酸 (IdoUA) と N-アセチル-D-ガラクトサミン (GalNAc) が交互に 50~200 回程度繰り返したものである。DS は IdoUA 残基の 2 位と GalNAc 残基の 4 位の水酸基が不均一に硫酸化修飾を施されることにより、細胞外マトリックスの構築、増殖因子を介したシグナル伝達、創傷治癒、抗血液凝固などの多様な生理機能を発揮する。最近我々

は、DS の生合成に関わるデルマトタン 4-O-硫酸基転移酵素-1 (D4ST-1)の変異が皮膚の脆弱性や骨異形成を特徴とする新しいタイプのエーラス・ダンロス症候群(EDS)を引き起こすことを明らかにした [Miyake *et al.*, Hum Mutat. (2010) 31, 966-974]。そこで、本研究ではこの新規 EDS の糖鎖解析を通して、本疾患の病態の把握・発症メカニズムの解明・早期簡易診断法の確立を目的としている。

今年度は、1)D4ST-1 変異 EDS 患者の尿中の DS を定量することにより、早期診断法の確立を目指した；2) 新しく見出された EDS 患者由来の繊維芽細胞の DS の定量；3) D4ST-1 ノックアウトマウスが産生する DS の定量を行った。

## B. 研究方法

### 1. 患者の尿中のコンドロイチン硫酸/デルマタ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。

### 2. 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/デルマタン硫酸の定量と構造解析

D4ST-1変異(新奇)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、コンディションド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。

### 3. デルマタン 4-O-硫酸基転移酵素-1(D4ST-1)ノックアウト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

D4ST-1ノックアウト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。

なお、本研究は、「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行った。

## C. 研究結果

### 1. 患者の尿中のコンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸の定量と構造解析

健常人由来の尿では、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。一方、関節型および未分類型のEDS患者尿のsampleを用いて同様にCS/DSの二糖組成および二糖量の分析を行ったところ、未分類型のDSの二糖量は、減少傾向にあった。また、関節型EDS患者においては、6-O硫酸化構造( $\Delta$ HexUA-GalNAc(6S))がD4ST-1-EDS患者と同程度で、関節型EDS患者でも4-O硫酸化構造が減っているあるいは6-O硫酸化構造が増えている傾向が分った。また、未分類型EDSの尿においては、6-O硫酸化構造が減っているか、もしくは4-O硫酸化構造が増えている可能性が示唆された。

### 2. 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/デルマタ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(新奇のD4ST-1変異のEDS患者および未分類型EDS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、以前のD4ST-1変異EDS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]、今回の新奇のD4ST-1変異のEDS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。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D4ST-1変異EDS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、健常人と比較してCSの二糖量には大差がなかった。

一方、未分類型EDS患者では健常人由来の繊維芽細胞と比較して、DSの二糖総量が2~4倍に増加していた。しかしながら、健常人由来の細胞の解析数が多くないので、統計学的な有意差があるかは不明である。したがって、未分類型EDS患者では、D4ST-1以外の遺伝子によってEDSが発症していることが推察され、加えてDSの合成が亢進もしくはDSプロテオグリカンのコアタンパク質の発現量の亢進の可能性もある。

### 3. D4ST-1ノックアウト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

デルマタン 4-O硫酸基転移酵素-1(D4ST-1)ノックアウトマウスにおいてデルマタン硫酸(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。

#### D. 考察

D4ST-1 変異 EDS 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ことを期待される。

新奇 D4ST1 変異の EDS 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、新奇の D4ST1 変異 EDS 患者は、D4ST-1 が正しく翻訳されていないか、D4ST-1 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 の合成不全を起し、EDS が発症すると考えられた。

未分類型および関節型 EDS 患者では、顕著な DS の減少が検出されないことから、D4ST-1 以外の遺伝子変異による可能性が示唆された。

D4ST-1 ノックアウトマウスの尿中の DS は全く検出されなかったことから、ヒトの D4ST1 変異 EDS 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。以上の結果から、今回作製した D4ST-1 ノックアウトマウスは、ヒトと同様に DS 鎖が欠損していることが判明し、今後の解析に有用であることが強く示唆された。

#### E. 結論

本研究から、D4ST-1 の変異によって、DS 鎖が合成できずに EDS が発症するメカニズムを明らかにした。また、尿中の DS の定量により、より簡便な診断法の確立が期待できる。さらに、D4ST-1 ノックアウトマウスにおいては、DS が欠損していることから、EDS のモデルになりうる可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

**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, 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.) Walter De Gruyter, Berlin, Germany, pp. 97-118, 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).

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

分担研究課題：患者由来 iPS に関する研究

研究分担者 岳鳳鳴（信州大学医学部・組織発生学講座）  
研究分担者 佐々木克典（信州大学医学部・組織発生学講座）  
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）

研究要旨：1人のDDEDS患者の皮膚線維芽細胞からiPS細胞を樹立し、iPS細胞としての未分化能および多能性、疾患モデルとしての妥当性を、健常人由来iPS細胞と比較検討した。さらに、神経系への分化誘導を試みた。iPS細胞としての未分化能および多能性は、健常人由来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DDEDS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。今後は、他患者からもiPS細胞を樹立し、神経系その他の系統に分化させるなかで、さらに詳細かつ包括的な病態解析を行うことが必要である。

#### A. 研究目的

山中伸弥教授が開発したiPS細胞（induced pluripotent stem cell）は、低侵襲に採取できる皮膚線維芽細胞を初期化することで得られ、様々な系統の細胞へ分化しうる多能性を有する（Takahashi et al., Cell 131: 861-872, 2007）。したがって、採取困難な臓器を含む多系統の異常を来す遺伝性・先天性疾患の病態解析において、きわめて有用なモデルと期待される。実際、iPS細胞を用いた遺伝性・先天性疾患の病態解析研究成果が発表され始めている（Quatro et al., PNAS 109: 215-220, 2012；Marfan症候群の骨格症状をiPS細胞を用いて解析した）。

デルマトン 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」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、DDEDS患者由来皮膚線維芽細胞より樹立したiPS細胞が、病態解析研究の適切なモデルとなりうるかを検証することである。その上で、神経細胞への分化誘導を試み、病態に関する基礎的検討を行うことを目指した。

#### B. 研究方法

##### 対象

A108:P281L/Y293Cを有するDDEDS女性患者（Patient 12）の皮膚線維芽細胞より熊本大学で樹立されたiPS細胞。

201B7：健常人より京都大学で樹立されたiPS細胞。

\*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。



## 形態学分析

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。

## アポトーシス分析

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。

## 未分化状態分析

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。

## 多能性分析

**In vitro** : 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) について検討した。

**In vivo** : 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。

## デコリンと I 型コラーゲン抗体を用いた免疫染色分析

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。

## iPS 細胞から神経の分化誘導

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。

**神経前駆細胞への分化誘導状態の検討** : 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。

**成熟ニューロンへの分化誘導状態の検討** : 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。

## C. 研究結果

### 形態学分析

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以下の相違点が認められた (図 1)。

(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 (図 2)。

### アポトーシス分析

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 (図 3)。

### 未分化状態分析

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 (図 4)。

### 多能性分析

**In vitro** : 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 (図 5)。

**In vivo** : 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 (図 7)。

### デコリンと I 型コラーゲン抗体を用いた免疫染色分析

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 (図 8)。

#### iPS 細胞から神経の分化誘導—神経前駆細胞への分化誘導状態の検討:

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 (図 9)

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 (図 10)。

#### D. 考察

本プロジェクトでは、DDEDS 患者由来 iPS 細胞を世界で初めて樹立し、その iPS 細胞としての未分化能および多能性の検証を行うとともに、奇形種組織におけるデコリン染色による疾患モデルとしての検証、そして、神経細胞への分化誘導を試みた。

結果として、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 (本研究班の成果、分担研究者小林博士の報告書を参照) 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 (分担研究者三宅博士の報告書を参照)。

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場所である。

#### E. 結論

本プロジェクトにおいて樹立された DDEDS 患者由来 iPS 細胞は、iPS 細胞として適切な未分化能および多能性を有しているとともに、患者組織と同様なデコリン分布を呈しており、疾患モデルとして適当である。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。現在、他の 2 患者から iPS 細胞の樹立を試みており、今回検討した iPS 細胞と合わせて、神経系その他の系統に分化させ、さらに詳細かつ包括的な病態解析を行う方向である。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.

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* 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.

## 2. 学会発表

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).

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

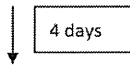
# Neural differentiation from iPS

## Methods

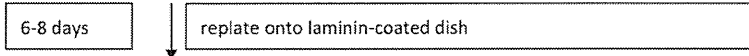
Undifferentiated iPS cells will be maintained on MEF (mouse embryonic fibroblast) feeder layer in DMEM/F12, 20% KSR



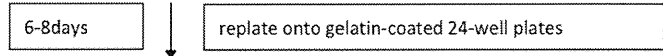
Embryoid body (EB) formation in suspension culture medium (DMEM/F12, 20% FBS)



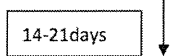
Nestin-positive cells will be initiated by replacing the medium with DMEM/F12 supplemented with ITS, fibronectin



Nestin-positive cells will be maintained in N2 supplemented with fibroblast growth factor (bFGF) (10 ng/mL), and B27



Neuron differentiation will be induced in N2 and B27 medium, (Generated spherical clusters of cells were collected and replated onto gelatin-coated 24-well plates and cultured in)



Assay (immunocytochemistry, RT-PCR or real-time PCR)

表 1 : 神経系への分化誘導プロトコール

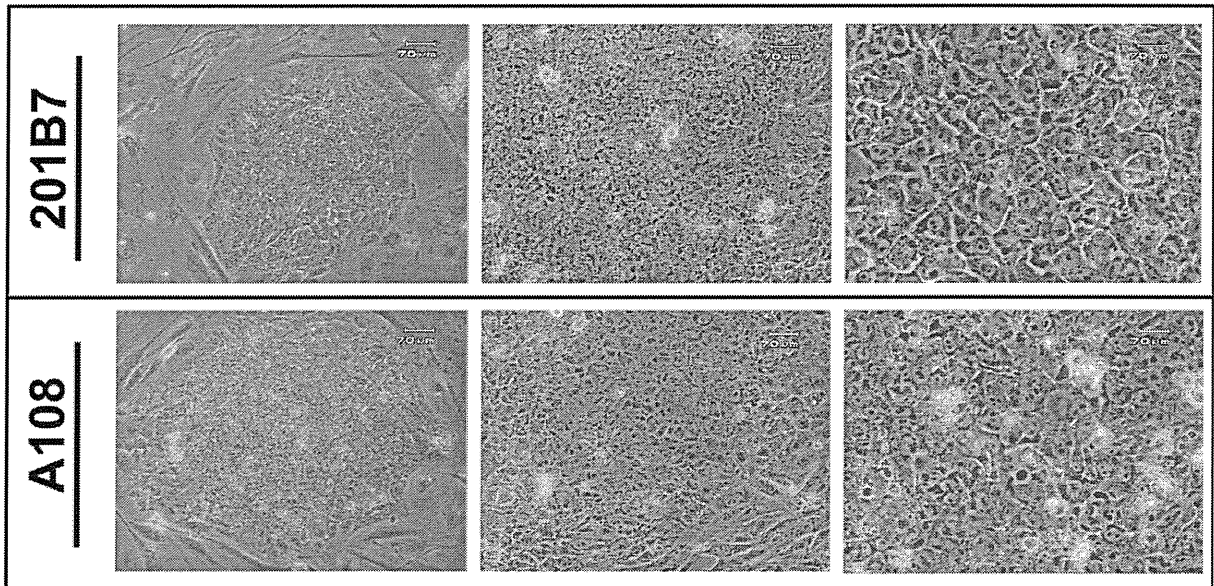
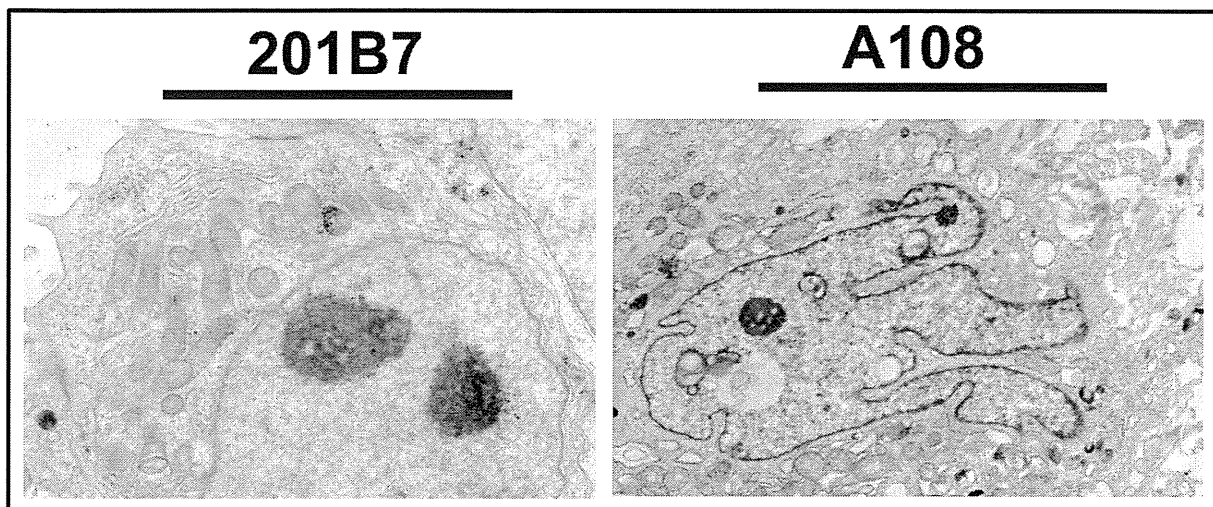
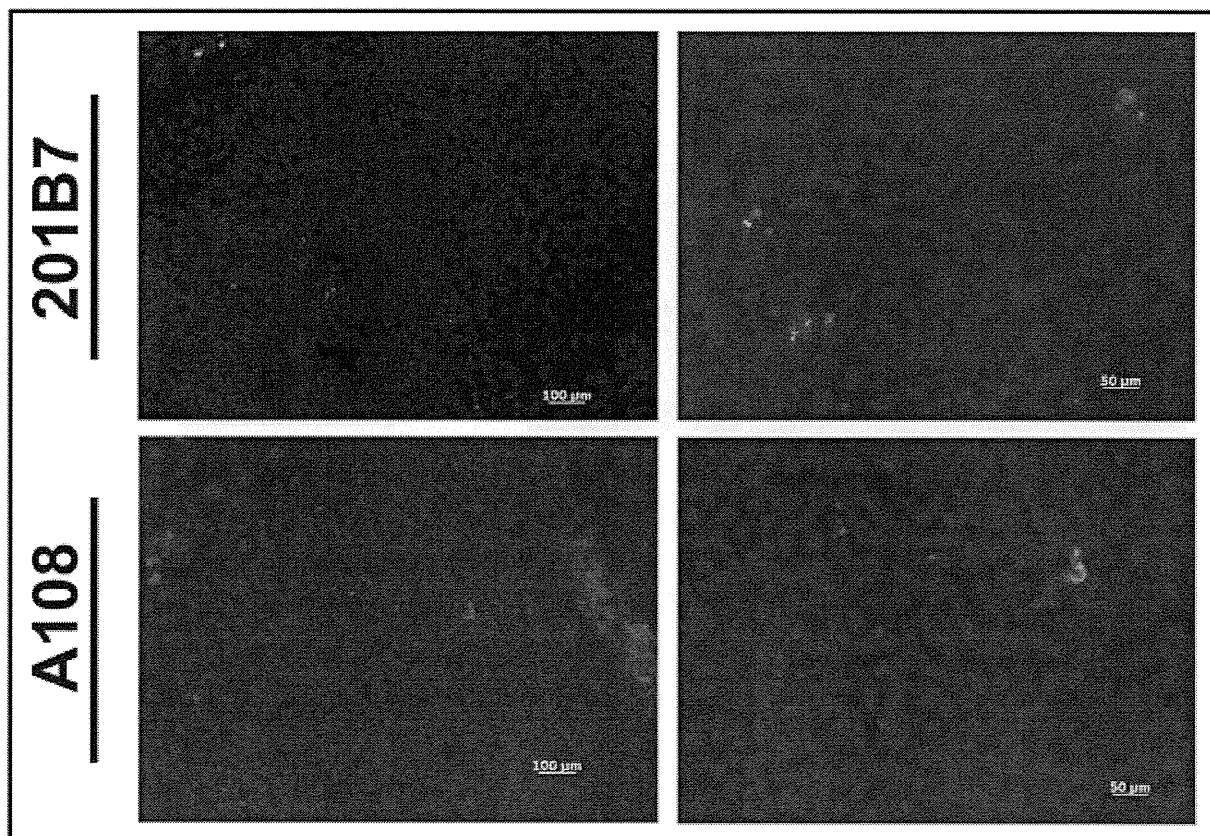


図 1 : Undifferentiated iPS cells grown on mouse embryonic fibroblasts (MEF) were tightly packed in the colony and had a high nucleus-to-cytoplasm ratio. However, some differences were shown between patient-iPS and normal iPS: (i) the size of A108 is smaller than 201B7; (ii) the boundary of A108 is obscure, even some cells

were fused; (iii) some nuclei of A108 is different from that of 201B7, and more vacuoles were found in A108.



☒ 2 : Lots of vacuoles were found in A108



☒ 3: No significant difference of Apoptosis were shown between A108 and 201B7

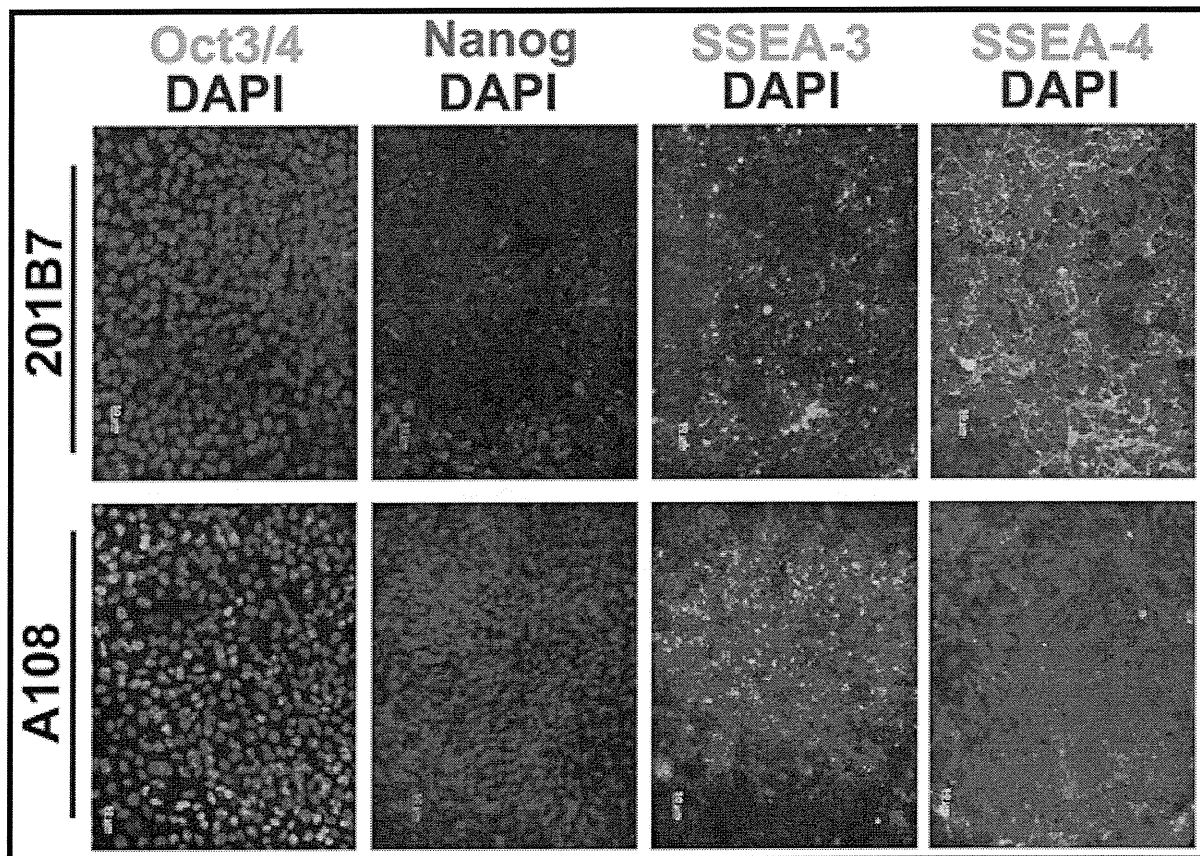


Figure 4: The colonies expressed high levels of undifferentiated cell markers such as Oct3/4, Nanog, SSEA-3 and SSEA-4.

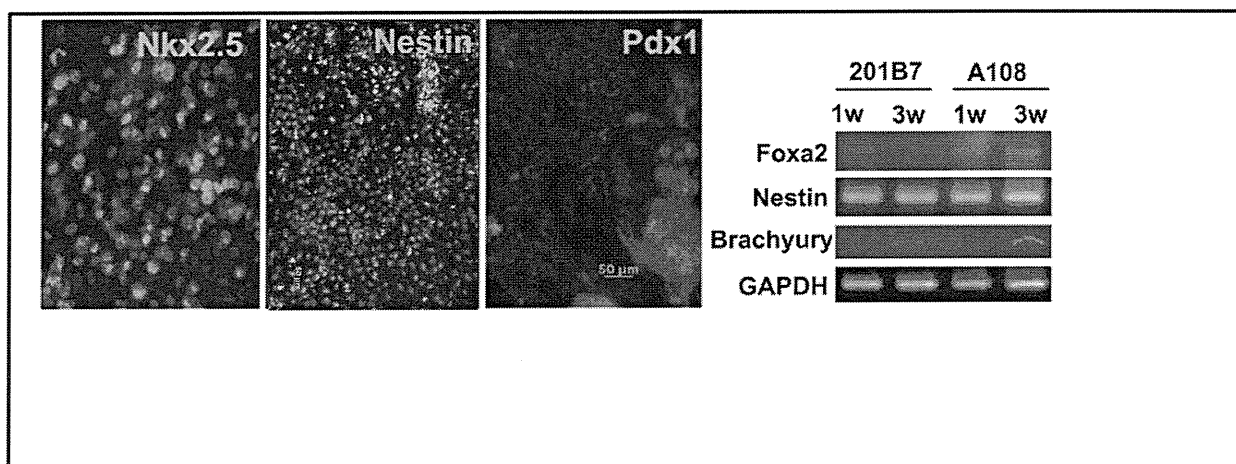
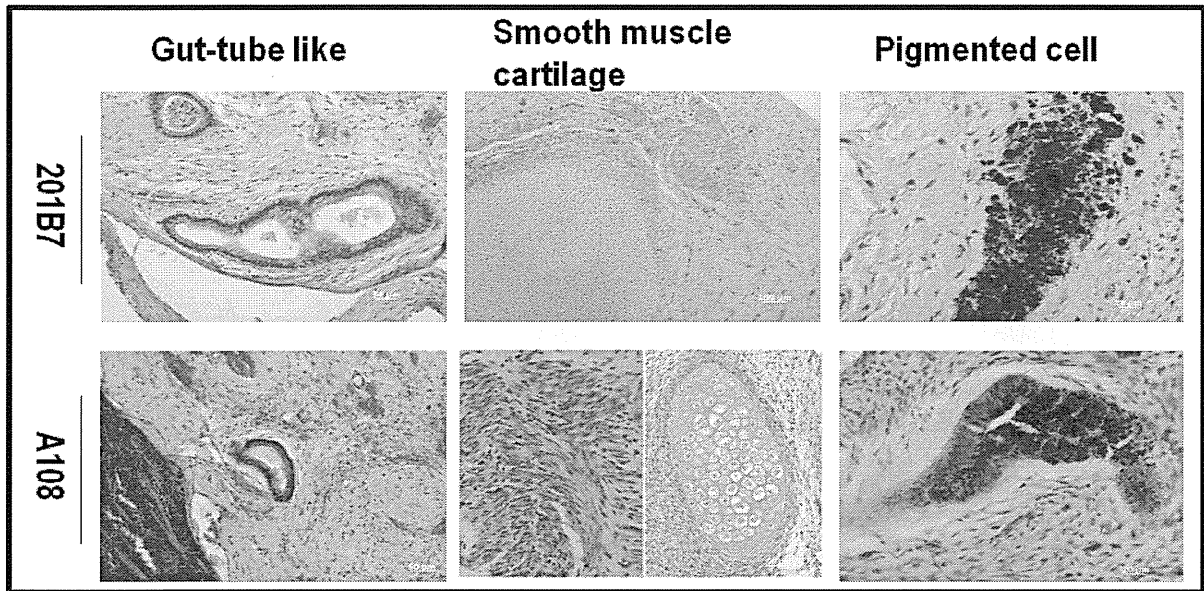
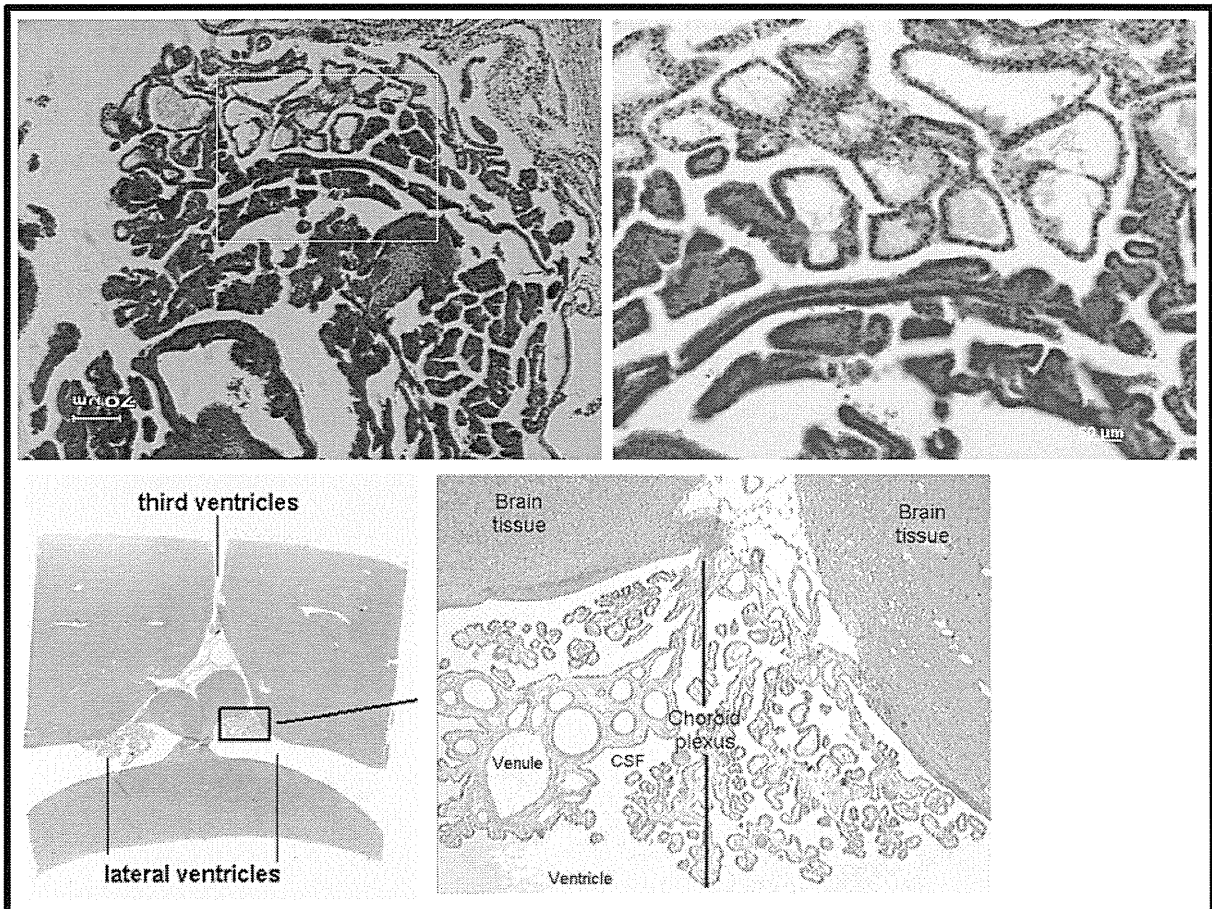


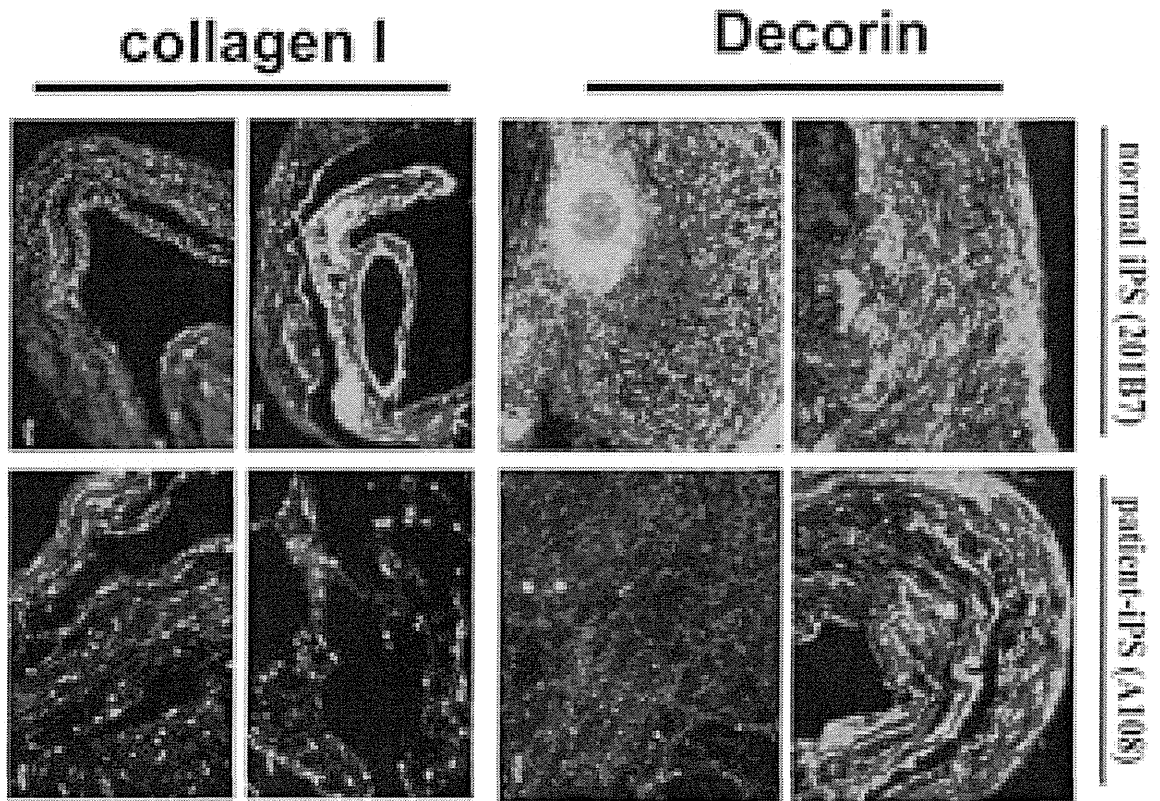
Figure 5: Expression of germ layer markers in EB outgrowths. Endoderm: Foxa2, Pdx1; Ectoderm: Nestin; Mesoderm: Nkx2.5, Brachyury



⊠ 6: Teratoma was formed within 4 weeks after the transplantation of iPS. Tissues from three germ layer were found in teratoma



⊠ 7: Choroid plexus-like structure was found in teratoma formed from DD-EDS derived iPS



☒ 8: Decorin and collagen I fiber in DD-EDS iPS-derived teratoma is slimer than that in normal iPS-derived teratoma



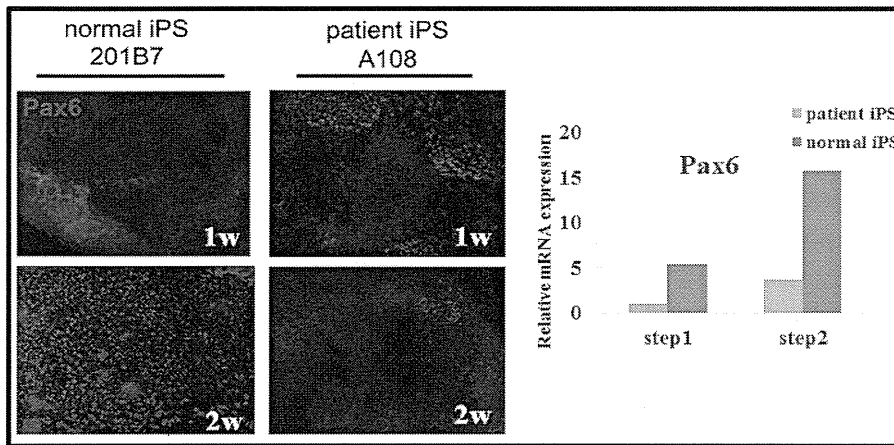
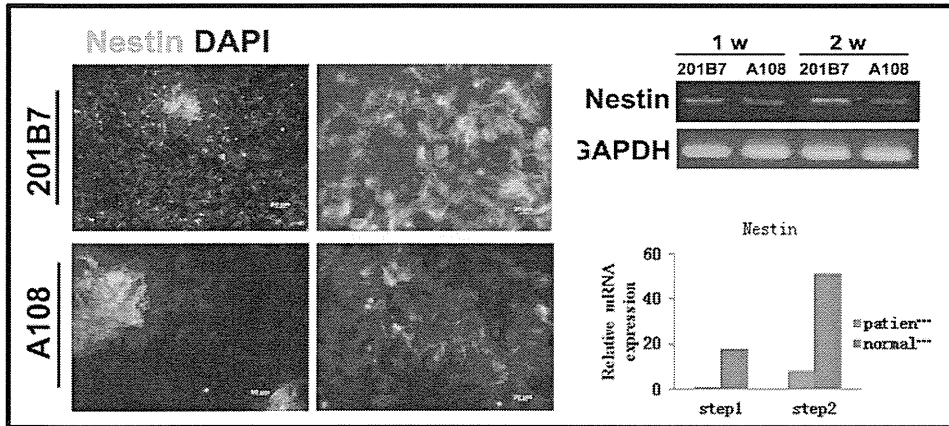


Figure 9: Protein expression of Nestin and Pax6 (neural progenitor marker) confirmed the neural formation in iPS colony. RT-PCR and Real-time PCR analysis of neural precursors at 1- and 2-week. Gene expression of Nestin and Pax6 in 201B7 is higher than that in A108.

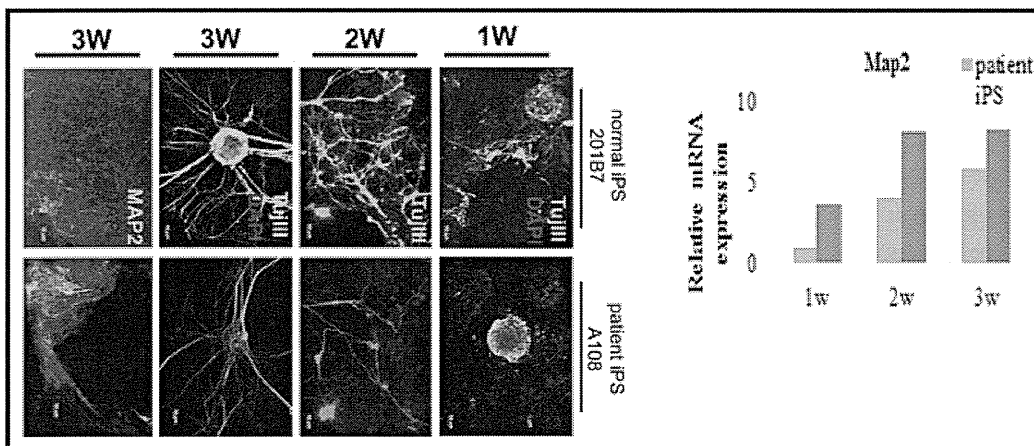


Figure 10: Neuron-derived from iPS were confirmed using with TujIII and Map2 antibody. Neural differentiation efficiency in A108 is lower than that in 201B7. Real-time PCR analysis of neural differentiation in A108 and 201B7 using with Map2 gene.

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

分担研究課題：デルマトン 4-O-硫酸基転移酵素-1 欠損型エーラスダンロス症候群の  
モデルマウスの作製および遺伝子治療の基盤研究

研究分担者 岡田 尚巳<sup>1</sup>、野村 義宏<sup>2</sup>、武田 伸一<sup>1</sup>  
研究協力者 坂 翔太<sup>1,3</sup>、積田 奈々<sup>1,4</sup>、笠原 優子<sup>1</sup>

- 1)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
- 2)国立大学法人 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
- 3)国立大学法人 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
- 4)国立大学法人 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

研究要旨：デルマトン 4-O-硫酸基転移酵素-1(D4ST-1)欠損型エーラスダンロス症候群(DDEDS)は *CHST14* 遺伝子がコードする D4ST-1 の欠損を原因とする疾患である。DDEDS に対する治療法として酵素補充療法が考えられるが、酵素のゴルジ膜への送達が困難であることや、長期間の投与が必要であることなどが課題となる。これらを克服する新規治療法として、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターによる遺伝子治療が期待される。本研究では、AAV ベクターによる遺伝子治療法の開発に向けてモデルマウスの作出および表現型解析を行うこと、さらにこのモデルマウスを用いた治療実験を行うことを目的とした。モデルマウスの作出において、スピードコンジェニック法を利用することにより、短期間で C57BL/6J 系統を遺伝的背景に持つ *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスを得ることが見込まれた。これまでに得られた *Chst14*<sup>-/-</sup>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た。さらに、ヒトで表れる皮膚の脆弱性について解析することで、皮膚強度の低下などの表現型の違いを検討する予定である。また、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*<sup>-/-</sup>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*<sup>-/-</sup>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、有効性や安全性を検証する予定である。

#### A. 研究目的

デルマトン 4-O-硫酸基転移酵素-1(D4ST-1)欠損型エーラスダンロス症候群(DD-EDS)は *CHST14* 遺伝子がコードする D4ST-1 の欠損を原因とし、先天性多発関節拘縮や、進行性かつ重度の結合組織脆弱性を呈する疾患である。DD-EDS の病態解析および治療法の開発を推進するため、ヒトの病態を再現したモデルマウスを確立することが求められる。DD-EDS に対する治療法として酵素補充療法が考えられるが、D4ST-1 はゴルジ膜上で機能する酵素であり、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や、長期間の投与が必要となることが課題としてあげられる。これらの課題を克服するため、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が期待さ

れている。

そこで本課題では *Chst14* を欠損させたマウスの系統を樹立し、病態を詳細に解析することでモデルマウスの表現型を明らかにする。さらに、このマウスを用いて、AAV ベクターによる遺伝子治療実験の有用性や安全性を検討することを目的とした。

#### B. 研究方法

##### ① *Chst14*<sup>-/-</sup>コンジェニック系統作出

米国の非営利のマウス供給センター（Mutant Mouse Regional Resource Centers ; MMRRC）より提供された *Chst14*<sup>-/-</sup>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。

### ② *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの表現型解析

*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの雌雄を交配させて *CHST14*<sup>-/-</sup>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。

### ③ 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*<sup>-/-</sup>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。

## C. 研究結果

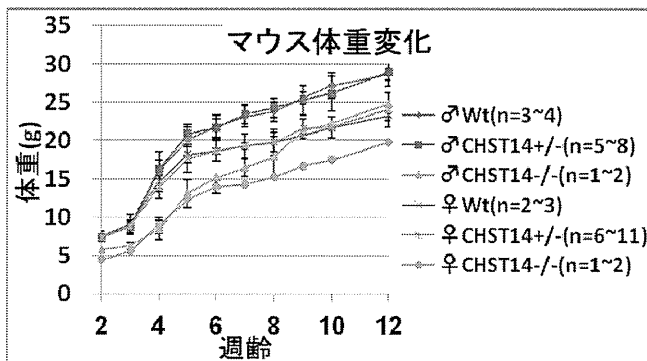
### ① *Chst14*<sup>-/-</sup>コンジェニック系統作出

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。

### ② *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの表現型解析

*Chst14*<sup>-/-</sup>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*<sup>-/-</sup>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*<sup>-/-</sup>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*<sup>-/-</sup>マウスに大きな違いは認められなかったが、今後 *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスにおいて同様の解析を行う予定である。

### ③ 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、不死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*<sup>+/-</sup> 2 株および *Chst14*<sup>-/-</sup> 2 株)を得た。

## D. 考察

*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの表現型を検討するにはコンジェニッ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*<sup>-/-</sup>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*<sup>-/-</sup>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。

#### E. 結論

コンジェニック系統の作出はスピードコンジェニック法を利用することにより、短期間でC57BL/6J 系統を遺伝的背景に持つ *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスを得ることが見込まれた。マウスの表現型解析のための準備を進め、これまでに *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの発育遅延および拘束ストレスに対する感受性の増大を確認した。また、治療遺伝子導入 AAV ベクターの構築および発現確認を行うため、ヒトおよびマウス線維芽細胞株を樹立した。本年度までに遺伝子治療実験のための準備が整ったため、次年度より、モデルマウスの表現型の解析を詳細に進めた上で、AAV ベクターを用いた治療研究を進める予定である。

F. 健康危険情報  
特になし。

#### G. 研究発表

**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): 168-77, 2012.

Itou 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): 1384-92, 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): 2716-22, 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.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

**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