

- Saito H, Murakami A, Miyake N, Nishimura G, Matsumoto N. Aortic aneurysm and raiosynostosis in a family with Cantu syndrome. **Am J Med Genet A**. 2014 Jan;164(1):231-6. doi: 10.1002/ajmg.a.36228. Epub 2013 Nov 25. PubMed PMID:24352916.
- 6: Ohba C, Okamoto N, Murakami Y, Suzuki Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Tanaka F, Kinoshita T, Matsumoto N, Saito H. PIGN mutations cause congenital anomalies, developmental delay, hypotonia, epilepsy, and progressive cerebellar atrophy. **Neurogenetics**. 2013 Nov 20. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24253414.
- 7: Kodera H, Nakamura K, Osaka H, Maegaki Y, Haginoya K, Mizumoto S, Kato M, Okamoto N, Iai M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, Sugahara K, Yuasa I, Wada Y, Matsumoto N, Saito H. De Novo Mutations in SLC35A2 Encoding a UDP-Galactose Transporter Cause Early-Onset Epileptic Encephalopathy. **Hum Mutat**. 2013 Dec;34(12):1708-14. doi: 10.1002/humu.22446. Epub 2013 Oct 15. PubMed PMID: 24115232.
- 8: Imagawa E, Osaka H, Yamashita A, Shiina M, Takahashi E, Sugie H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saito H, Ogata K, Matsumoto N, Miyake N. A hemizygous GYG2 mutation and Leigh syndrome: a possible link? **Hum Genet**. 2014 Feb;133(2):225-34. doi: 10.1007/s00439-013-1372-6. Epub 2013 Oct 8.
- 9: Ohba C, Osaka H, Iai M, Yamashita S, Suzuki Y, Aida N, Shimozawa N, Takamura A, Doi H, Tomita-Katsumoto A, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Eto Y, Tanaka F, Matsumoto N, Saito H. Diagnostic utility of whole exome sequencing in patients showing cerebellar and/or vermis atrophy in childhood. **Neurogenetics**. 2013 Nov;14(3-4):225-32. doi: 10.1007/s10048-013-0375-8. Epub 2013 Oct 4. PubMed PMID: 24091540.
- 10: Nakajima J, Okamoto N, Shiraishi J, Nishimura G, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saito H, Kawashima H, Matsumoto N, Miyake N. Novel FIG4 mutations in Yunis-Varon syndrome. **J Hum Genet**. 2013 Dec;58(12):822-4. doi: 10.1038/jhg.2013.104. Epub 2013 Oct 3.
- 11: Koshimizu E, Miyatake S, Okamoto N, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Matsumoto N. Performance comparison of bench-top next generation sequencers using microdroplet PCR-based enrichment for targeted sequencing in patients with autism spectrum disorder. **PLoS One**. 2013 Sep 16;8(9):e74167. doi:10.1371/journal.pone.0074167. PubMed PMID: 24066114; PubMed Central PMCID:PMC3774667.
- 12: Nishiguchi KM, Tearle RG, Liu YP, Oh EC, Miyake N, Benaglio P, Harper S, Koskineemi-Kuendig H, Venturini G, Sharon D, Koenekoop RK, Nakamura M, Kondo M, Ueno S, Yasuma TR, Beckmann JS, Ikegawa S, Matsumoto N, Terasaki H, Berson EL, Katsanis N, Rivolta C. Whole genome sequencing in patients with retinitis pigmentosa reveals pathogenic DNA structural changes and NEK2 as a new disease gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2013 Oct 1;110(40):16139-44. doi: 10.1073/pnas.1308243110. Epub 2013 Sep 16. PubMed PMID: 24043777; PubMed Central PMCID: PMC3791719.
- 13: Nakamura K, Kodera H, Akita T, Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Osaka H, Nakamura S, Tohyama J, Kumada T, Furukawa T,

- Iwata S, Shiihara T, Kubota M, Miyatake S, Koshimizu E, Nishiyama K, Nakashima M, Tsurusaki Y, **Miyake N**, Hayasaka K, Ogata K, Fukuda A, **Matsumoto N**, Saitsu H. De Novo mutations in GNAO1, encoding a Gαo subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. **Am J Hum Genet.** 2013 Sep 5;93(3):496-505. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.07.014. Epub 2013 Aug 29. PubMed PMID: 23993195; PubMed Central PMCID: PMC3769919.
- 14: Nakamura K, Kato M, Osaka H, Yamashita S, Nakagawa E, Haginoya K, Tohyama J, Okuda M, Wada T, Shimakawa S, Imai K, Takeshita S, Ishiwata H, Lev D, Lerman-Sagie T, Cervantes-Barragán DE, Villarroel CE, Ohfu M, Writzl K, Gnidovec Strazisar B, Hirabayashi S, Chitayat D, Myles Reid D, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, **Miyake N**, Hayasaka K, **Matsumoto N**, Saitsu H. Clinical spectrum of SCN2A mutations expanding to Ohtahara syndrome. **Neurology.** 2013 Sep 10;81(11):992-8. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182a43e57. Epub 2013 Aug 9. PubMed PMID:23935176.
- 15: Fukai R, Ochi N, Murakami A, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, **Matsumoto N**, **Miyake N**. Co-occurrence of 22q11 deletion syndrome and HDR syndrome. **Am J Med Genet A.** 2013 Oct;161(10):2576-81. doi: 10.1002/ajmg.a.36083. Epub 2013 Aug 5. PubMed PMID: 23918631.
- 16: **Miyake N**, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, Ito N, Ihara K, Hara T, Tonoki H, Ohta T, Saito K, Matsuo M, Urano M, Enokizono T, Sato A, Tanaka H, Ogawa A, Fujita T, Hiraki Y, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita Y, Taguri M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Yoshiura K, **Matsumoto N**, Niikawa N. MLL2 and KDM6A mutations in atients with Kabuki syndrome. **Am J Med Genet A.** 2013 Sep;161(9):2234-43. doi: 0.1002/ajmg.a.36072. Epub 2013 Aug 2. PubMed PMID: 23913813.
- 17: Doi H, Ohba C, Tsurusaki Y, Miyatake S, **Miyake N**, Saitsu H, Kawamoto Y, Yoshida T, Koyano S, Suzuki Y, Kuroiwa Y, Tanaka F, **Matsumoto N**. Identification of a novel homozygous SPG7 mutation in a Japanese patient with spastic ataxia: making an efficient diagnosis using exome sequencing for autosomal recessive cerebellar ataxia and spastic paraplegia. **Intern Med.** 2013;52(14):1629-33. Epub 2013 Jul 15. PubMed PMID: 23857099.
- 18: Tsurusaki Y, Yonezawa R, Furuya M, Nishimura G, Pooh R, Nakashima M, Saitsu H, **Miyake N**, Saito S, **Matsumoto N**. Whole exome sequencing revealed biallelic IFT122 mutations in a family with CED1 and recurrent pregnancy loss. **Clin Genet.** 2013 Jul 5. doi: 10.1111/cge.12215. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23826986.
- 19: Fujita A, Suzumura H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Harada N, **Matsumoto N**, **Miyake N**. A unique case of de novo 5q33.3-q34 triplication with uniparental isodisomy of 5q34-qter. **Am J Med Genet A.** 2013 Aug;161A(8):1904-9. doi: 10.1002/ajmg.a.36026. Epub 2013 Jul 4. PubMed PMID: 23824987.
- 20: Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Mizuno S, Matsumoto N, Makita Y, Fukuda M, Isidor B, Perrier J, Aggarwal S, Dalal A, Al-Kindy A, Liebelt J, Mowat D, Nakashima M, Saitsu H, **Miyake N**, **Matsumoto N**. Coffin-Siris syndrome is a SWI/SNF complex disorder. **Clin Genet.** 2013 Jul 1.

doi: 10.1111/cge.12225. [Epub ahead of print]
PubMed PMID: 23815551.

21: Ravenscroft G, Miyatake S, Lehtokari VL, Todd EJ, Vornanen P, Yau KS, Hayashi YK, **Miyake N**, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Osaka H, Yamashita S, Ohya T, Sakamoto Y, Koshimizu E, Imamura S, Yamashita M, Ogata K, Shiina M, Bryson-Richardson RJ, Vaz R, Ceyhan O, Brownstein CA, Swanson LC, Monnot S, Romero NB, Amthor H, Kresoje N, Sivadorai P, Kiraly-Borri C, Haliloglu G, Talim B, Orhan D, Kale G, Charles AK, Fabian VA, Davis MR, Lammens M, Sewry CA, Manzur A, Muntoni F, Clarke NF, North KN, Bertini E, Nevo Y, Willichowski E, Silberg IE, Topaloglu H, Beggs AH, Allcock RJ, Nishino I, Wallgren-Pettersson C, **Matsumoto N**, Laing NG. Mutations in KLHL40 are a frequent cause of severe autosomal-recessive nemaline myopathy. **Am J Hum Genet.** 2013 Jul 11;93(1):6-18. doi:10.1016/j.ajhg.2013.05.004. Epub 2013 Jun 6. PubMed PMID: 23746549; PubMed Central PMCID: PMC3710748.

22: Nakamura K, Kato M, Tohyama J, Shiohama T, Hayasaka K, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, **Miyake N**, **Matsumoto N**, Saitsu H. AKT3 and PIK3R2 mutations in two patients with megalencephaly-related syndromes: MCAP and MPPH. **Clin Genet.** 2013 Jun 10. doi: 10.1111/cge.12188. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23745724.

23: Kondo Y, Koshimizu E, Megarbane A, Hamanoue H, Okada I, Nishiyama K, Kodera H, Miyatake S, Tsurusaki Y, Nakashima M, Doi H, **Miyake N**, Saitsu H, **Matsumoto N**. Whole-exome sequencing identified a homozygous FNBP4 mutation in a family with a condition similar to microphthalmia with limb anomalies. **Am**

J Med Genet A. 2013 Jul;161A(7):1543-6. doi: 10.1002/ajmg.a.35983. Epub 2013 May 23. PubMed PMID: 23703728.

24: Nakajima M, Mizumoto S, **Miyake N**, Kogawa R, Iida A, Ito H, Kitoh H, Hirayama A, Mitsubuchi H, Miyazaki O, Kosaki R, Horikawa R, Lai A, Mendoza-Londono R, Dupuis L, Chitayat D, Howard A, Leal GF, Cavalcanti D, Tsurusaki Y, Saitsu H, Watanabe S, Lausch E, Unger S, Bonafé L, Ohashi H, Superti-Furga A, **Matsumoto N**, Sugahara K, Nishimura G, Ikegawa S. Mutations in B3GALT6, which Encodes a Glycosaminoglycan Linker Region Enzyme, Cause a Spectrum of Skeletal and Connective Tissue Disorders. **Am J Hum Genet.** 2013 Jun 6;92(6):927-34. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.04.003. Epub 2013 May 9. PubMed PMID: 23664117; PubMed Central PMCID: PMC3675233.

25: Kodera H, Kato M, Nord AS, Walsh T, Lee M, Yamanaka G, Tohyama J, Nakamura K, Nakagawa E, Ikeda T, Ben-Zeev B, Lev D, Lerman-Sagie T, Straussberg R, Tanabe S, Ueda K, Amamoto M, Ohta S, Nonoda Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, **Miyake N**, Hayasaka K, King MC, **Matsumoto N**, Saitsu H. Targeted capture and sequencing for detection of mutations causing early onset epileptic encephalopathy. **Epilepsia.** 2013 Jul;54(7):1262-9. doi: 10.1111/epi.12203. Epub 2013 May 10. PubMed PMID: 23662938.

26: Kosho T, Okamoto N, Ohashi H, Tsurusaki Y, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kawame H, Homma T, Tanabe S, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Ohta T, Niikawa N, Mizuno S, Kaname T, Naritomi K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Miyatake S, Mizuguchi T, Saitsu H, **Miyake N**, **Matsumoto N**. Clinical correlations of mutations affecting six components

- of the SWI/SNF complex: detailed description of 21 patients and a review of the literature. **Am J Med Genet A**. 2013 Jun;161A(6):1221-37. doi: 10.1002/ajmg.a.35933. Epub 2013 May 1. Review. PubMed PMID: 23637025.
- 27: Nakamura K, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, **Miyake N**, **Matsumoto N**, Saitsu H, Jinnou H, Ohki S, Yokochi K, Okanishi T, Enoki H. A de novo CASK mutation in pontocerebellar hypoplasia type 3 with early myoclonic epilepsy and tetralogy of Fallot. **Brain Dev**. 2013 Apr 24. pii: S0387-7604(13)00133-2. doi: 10.1016/j.braindev.2013.03.007. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23623288.
- 28: Kato M, Yamagata T, Kubota M, Arai H, Yamashita S, Nakagawa T, Fujii T, Sugai K, Imai K, Uster T, Chitayat D, Weiss S, Kashii H, Kusano R, Matsumoto A, Nakamura K, Oyazato Y, Maeno M, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, **Miyake N**, Saito K, Hayasaka K, **Matsumoto N**, Saitsu H. Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation. **Epilepsia**. 2013 Jul;54(7):1282-7. doi: 10.1111/epi.12200. Epub 2013 Apr 26. PubMed PMID:23621294.
- 29: Iida A, Okamoto N, **Miyake N**, Nishimura G, Minami S, Sugimoto T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Shiina M, Ogata K, Watanabe S, Ohashi H, **Matsumoto N**, Ikegawa S. Exome sequencing identifies a novel INPPL1 mutation in opsismodysplasia. **J Hum Genet**. 2013 Jun;58(6):391-4. doi: 10.1038/jhg.2013.25. Epub 2013 Apr 4. PubMed PMID: 23552673.
- 30: Miyatake S, Murakami A, **Okamoto N**, Sakamoto M, **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 A**. 2013 May;161A(5):1073-7. doi: 10.1002/ajmg.a.35661. Epub 2013 Mar 5. PubMed PMID: 23463723.
- 31: Kondo Y, Saitsu H, Miyamoto T, Lee BJ, Nishiyama K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Doi H, **Miyake N**, Kim JH, Yu YS, **Matsumoto N**. Pathogenic mutations in two families with congenital cataract identified with whole-exome sequencing. **Mol Vis**. 2013;19:384-9. Epub 2013 Feb 18. PubMed PMID: 23441109; PubMed Central PMCID: PMC3580970.
- 32: Saitsu H, Nishimura T, Muramatsu K, Kodera H, Kumada S, Sugai K, Kasai-Yoshida E, Sawaura N, Nishida H, Hoshino A, Ryujin F, Yoshioka S, Nishiyama K, Kondo Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, **Miyake N**, Arakawa H, Kato M, Mizushima N, **Matsumoto N**. De novo mutations in the autophagy gene WDR45 cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. **Nat Genet**. 2013 Apr;45(4):445-9, 449e1. doi: 10.1038/ng.2562. Epub 2013 Feb 24. PubMed PMID:23435086.
- 33: Higashiyama Y, Doi H, Wakabayashi M, Tsurusaki Y, **Miyake N**, Saitsu H, Ohba C, Fukai R, Miyatake S, Joki H, Koyano S, Suzuki Y, Tanaka F, Kuroiwa Y, **Matsumoto N**. A novel SCARB2 mutation causing late-onset progressive myoclonus epilepsy. **Mov Disord**. 2013 Apr;28(4):552-3. doi: 10.1002/mds.25296. Epub 2013 Jan 16. PubMed PMID: 23325613.
- 34: Takanashi JI, Osaka H, Saitsu H, Sasaki M, Mori H, Shibayama H, Tanaka M, Nomura Y, Terao Y, Inoue K, **Matsumoto N**, James Barkovich

A. Different patterns of cerebellar abnormality and hypomyelination between POLR3A and POLR3B mutations. **Brain Dev.** 2013 May 3. pii: S0387-7604(13)00132-0. doi:10.1016/j.braindev.2013.03.006. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23643445.

35: Nakayama T, Saitsu H, Endo W, Kikuchi A, Uematsu M, Haginoya K, Hino-Fukuyo N, Kobayashi T, Iwasaki M, Tominaga T, Kure S, **Matsumoto N**. RBPJ is disrupted in a case of proximal 4p deletion syndrome with epilepsy. **Brain Dev.** 2013 Aug 16. pii: S0387-7604(13)00230-1. doi: 10.1016/j.braindev.2013.07.009. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23958593.

36: Okamoto N, Yamagata T, Yada Y, Ichihashi K, **Matsumoto N**, Momoi MY, Mizuguchi T. Williams-Beuren syndrome with brain malformation and hypertrophic cardiomyopathy. **Brain Dev.** 2013 Jul 27. pii: S0387-7604(13)00208-8. doi:10.1016/j.braindev.2013.07.002. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23899771.

37: Ichinose Y, Miwa M, Onohara A, Obi K, Shindo K, Saitsu H, **Matsumoto N**, Takiyama Y. Characteristic MRI findings in beta-propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN). **Neurol Clin Pract** (*in press*)

38: 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.** 2013 Mar;35(3):280-3. doi:10.1016/j.braindev.2012.05.002. Epub 2012 May 31. PubMed PMID: 22656320.

39: Yokoo N, Marumo C, Nishida Y, Iio J, Maeda S, Nonaka M, Maihara T, Chujoh S, Katayama T, Sakazaki H, **Matsumoto N**, Okamoto N. A case of Toriello-Carey syndrome with severe congenital tracheal stenosis. **Am J Med Genet A.** 2013 Sep;161(9):2291-3. doi: 10.1002/ajmg.a.35861. Epub 2013 Jul 19. PubMed PMID: 23873869.

40: Sun SL, Horino S, Itoh-Nakadai A, Kawabe T, Asao A, Takahashi T, So T, Funayama R, Kondo M, Saitsu H, **Matsumoto N**, Nakayama K, Ishii N. Y chromosome-linked B and NK cell deficiency in mice. **J Immunol.** 2013 Jun 15;190(12):6209-20. doi: 10.4049/jimmunol.1300303. Epub 2013 May 20. PubMed PMID: 23690476.

総説

“Progress in heritable soft connective tissue disorders” by Springer Volume 802, 2014, pp 145-159 「Ehlers-Danlos syndrome associated with glycosaminoglycan abnormalities」 **Noriko Mivake**, Tomoki Kosho, **Naomichi Matsumoto**

Vergano SS, Santen G, Wiczorek D, Wollnik B, **Matsumoto N**, Deardorff MA: Coffin-Siris Syndrome (April 2013) in: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource [database online]. Copyright, University of Washington, Seattle, 1997-2013. Available at <http://www.genetests.org>.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK131811/>)

2. 学会発表

【国内】

1. 三宅紀子、矢野正二、後藤雄一、松本直通¹ “*UQCRC2* ホモ接合性変異による新規ミトコンドリア呼吸鎖複合体 III 欠損症”第 58 回日本人類遺伝学会 (仙台)

2. The 10th International Workshop on Advanced Genomics. Naomichi Matsumoto "Mendelian Exome Analysis" @ National Center of Sciences, Tokyo, May 21, 2013

3. 第 17 回小児分子内分泌研究会特別講演・松本直通「次世代シーケンサーを用いてわかってきたこと」平成 25 年 7 月 7 日札幌北広島クラッセホテル

4. 次世代解析装置を用いた難病の原因究明、治療法開発研究プロジェクトの成果発表会・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」平成 25 年 7 月 13 日都市センターホテル・東京

5. 第 20 回日本遺伝子診療学会大会・シンポジウム 1・松本直通「疾患ゲノム解析における次世代シーケンサーの有用性」平成 25 年 7 月 19 日アクトシティー浜松コンgresセンター・浜松

6. CiRA genomics epigenomics and bioinformatics seminar series VIII. 松本直通「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析」平成 25 年 8 月 23 日@CiRA 京都大学

7. 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 25 年度第 1 回ワークショップ 松本直通「コントロールデータベースに関する話題」平成 25 年 8 月 24 日@京都大学(芝蘭会館)

8. 現場の会第三回研究会基調講演・松本直通「NGS がもたらしたヒト疾患ゲノム解析のパラダイムシフト」平成 25 年 9 月 4 日神戸国際会議場@神戸

9. 第 23 回遺伝医学セミナー講義・松本直通「遺伝性疾患の責任遺伝子単離法」平成 25 年 9 月 7 日三井ガーデンホテル千葉@千葉市

10. 第 22 回発達腎研究会・特別講演・松本直通「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析：現状と限界」平成 25 年 9 月 13 日高槻市生涯学習センター@高槻市

11. 第 18 回山形小児神経研究会・特別講演・松本直通「次世代シーケンス解析で分かってきたこと」平成 25 年 9 月 27 日パレスグランデル@山形市

12. 第 58 回日本人類遺伝学会大会・シンポジウム・松本直通「ヒト疾患エクソーム解析の現状と課題」平成 25 年 11 月 23 日@江陽グランドホテル仙台

13. 希少疾患・難病の全エクソーム解析 -現

状と課題- 松本直通「希少疾患・難病の全エクソーム解析-現状と課題-」平成 25 年 12 月 3 日日経バイオテック「希少疾患・難病の治療薬開発におけるゲノム活用」@秋葉原コンベンションホール

【海外】

1. The 13th Annual Meeting of East Asian Union of Human Genetics Societies (Harpin, China) 「Mutations of histone modification genes in Kabuki syndrome」Oral Communication. Miyake N

2. The 63th Annual Meeting of American Society of Human Genetics (Boston, USA) 「A homozygous *UQCRC2* mutation cause a neonatal onset metabolic decompensation due to complex III deficiency」Poster session. Miyake N, Yano S, Goto Y, Matsumoto N

3. 7th International Symposium of Rare Diseases (Seoul, Korea) 「NGS application for rare congenital diseases」Oral presentation. Miyake N

4. The European Human Genetics Conference 2013 (Paris, France) 「A homozygous *UQCRC2* mutation cause a neonatal onset metabolic decompensation due to complex III deficiency」Poster session. Miyake N, Yano S, Goto Y, Matsumoto N

5. The European Human Genetics Conference 2013 (Paris, France) 「De novo mutations in the autophagy gene encoding WDR45 (WIPI4) cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood」N. Matsumoto, T. Nishimura, K. Muramatsu, H. Kodera, S. Kumada, K. Sugai, E. Kasai-Yoshida, N. Sawaura, H. Nishida, A. Hoshino, F. Ryujin, S. Yoshioka, H. Arakawa, M. Kato, N. Mizushima, H. Saitsu.

3. 知的財産権の出願・登録状況
【特許取得】

特願 2013-252720・鶴崎美徳/松本直通・
Coffin-Siris 症候群の新規遺伝子診断法・平成
25年12月6日

PCT/JP2013/71620・松本直通/三宅紀子・ミ
トコンドリア複合体 III 欠乏症患者又は保因者
の検出方法・平成 25年 8月 9日

特願 2013-157339 号 松本直通/三宅紀子・ケ
トン血症を伴うリー脳症患者または保因者の
検出法。平成 25年 7月 31日

特願 2013-123660 才津浩智/松本直通・小児
期のてんかんおよび不随意運動をきたす疾患
の検出方法・平成 25年 6月 12日

4. 報道等

なし

平成25年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

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：DDEDS の病理学的検討ーノックアウトマウスの病理

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：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、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。本研究班では、ノックアウト（*Chst14*^{-/-}）マウスを作出し、詳細かつ包括的な病態解明を目指している。本分担研究では、*Chst14*^{-/-}マウスの皮膚病理解析を行った。HE 染色では、*Chst14*^{-/-}マウスの皮膚真皮膠原線維束は *Chst14*^{+/-}マウス、WT マウスと比べて好酸性が低下していた。抗デコリン免疫組織化学では、*Chst14*^{-/-}マウスは *Chst14*^{+/-}マウス、WT マウスと比べて、粘膜固有層のデコリン陽性線維の分布が粗になっていた。Cupromeronic blue（CB）染色を用いた電顕分析では、*Chst14*^{-/-}マウスの皮膚は WT マウス、*Chst14*^{+/-}マウスに比べてコラーゲン細線維に付着する GAG 鎖が不鮮明であり、コラーゲン細線維径の大小不同が目立っていた。また胃粘膜についても抗デコリン免疫組織化学を施行、*Chst14*^{-/-}マウスは *Chst14*^{+/-}マウス、WT マウスと比べて粘膜固有層のデコリン陽性線維の分布が粗になっていた。

A. 研究目的

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。

本研究班では、DDEDS の根治療法の開発を視野

に入れた詳細な病態解析を目指しており、動物モデルとしてノックアウト（*Chst14*^{-/-}）マウスを作出した。

本分担研究の目的は、抗デコリン抗体を用いた免疫組織化学および Cupromeronic blue（CB）染色を用いた電顕分析により、*Chst14*^{-/-}マウスの皮膚病理を明らかにすることである。

B. 研究方法

対象

一般光顕観察、抗デコリン抗体を用いた免疫組織化学解析においては、3 か月齢の *Chst14*^{-/-}マウス、*Chst14*^{+/-}マウス、WT マウスの背部皮膚および胃粘膜を解析した。

Cupromeronic blue（CB）染色を用いた電顕分析に

においては、1歳齢の *Chst14*^{-/-}マウス、*Chst14*^{+/-}マウス、WTマウスの皮膚を解析した。

一般光顕・免疫組織化学解析

組織を20%中性緩衝ホルマリン液で固定した後、パラフィン切片を作成し、HE染色とデコリンに対する免疫染色を行った。

抗原賦活化としてクエン酸緩衝液 (pH 6.0) でマイクロウェーブ処理を行った。その後、一次抗体としてのビオチン化抗マウスデコリン抗体 (polyclonal goat IgG, R&D Systems) とパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Code No. P0397, Dako) を用いて、ストレプトアビジン-ビオチン法にて免疫染色を行った。

検鏡・標本観察はオリンパス社製の顕微鏡、AX80にて行った。

電顕分析 (Cupromeronic blue [CB] 染色)

グルタル固定後、洗浄し、GAG鎖に特異的に反応する0.05% (w/v) Cupromeronic blue液でブロック染色した。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)。

C. 研究結果

一般光顕・免疫組織化学解析

皮膚

HE染色において、*Chst14*^{-/-}マウスの皮膚真皮膠原線維束は*Chst14*^{+/-}マウス、WTマウスと比べて好酸性が低下していた (図1)。

デコリン免疫染色において、*Chst14*^{-/-}マウスでは*Chst14*^{+/-}マウス、WTマウスと比べて、デコリン陽性線維の分布は疎となっていた (図1)。

胃粘膜

HE染色においては、*Chst14*^{-/-}マウスでは*Chst14*^{+/-}マウス、WTマウスと比べて、明らかな相違は見出せなかった。

デコリン免疫染色において、*Chst14*^{-/-}マウスでは*Chst14*^{+/-}マウス、WTマウスと比べて、粘膜固有層のデコリン陽性線維の分布が粗になっていた

(図2)。

電顕分析 (CB 染色)

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。マウス皮膚においては、皮膚表層・皮膚深層で、コラーゲン細線維の走行に大きな差は見られないが、WTマウス、*Chst14*^{+/-}マウス、*Chst14*^{-/-}マウスの背部皮膚を表層・深層に分けて電子顕微鏡観察した。

Chst14^{-/-}マウスの皮膚では、WTマウス、*Chst14*^{+/-}マウスに比べ、コラーゲン細線維に付着するGAG鎖が不鮮明であった。横断像では、コラーゲン細線維の直径が、*Chst14*^{-/-}マウスではバラツキがあり、細いものも多かった (図3、4)。

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)。

平成24年度の本分担研究において、患者皮膚を用い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を行った。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が示唆された (図5)。

平成25年度の本分担研究では、ノックアウト (*Chst14*^{-/-}) マウスの病理観察を行った。皮膚のHE染色所見、抗デコリン免疫組織化学所見は、*Chst14*^{+/-}マウス、WTマウスと比べて相違はあったが、ヒト患者の所見よりは顕著でなかった。ヒト患者では、加齢に伴い皮膚の抗デコリン免疫組織化学所見が顕著になる傾向にあり (図5)、実際臨床的にも同様の傾向が見られたことから、マウ

スにおいても加齢による変化を観察する必要があると考えられた。現在、1歳齢のマウスの解析を進めている。

胃粘膜において HE 染色では明らかな変化は認められなかったが、抗デコリン免疫組織化学では粘膜固有層におけるデコリン分布に差があるようであった。ヒトでは1患者において特段のリスクファクターのない状況で、重篤な胃潰瘍を発症し、胃部分切除を要した。DDEDS 患者が実際胃粘膜の脆弱性を有するか、引き続き検討が必要である。

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。今回観察された *Chst14*^{-/-}マウスの GAG 鎖の不鮮明さ、コラーゲン細線維径の大小不同が疾患特異的な変化であるかどうか、引き続き解析数を増やして検討していく必要がある。

E. 結論

本研究は、健康人 (GAG 鎖はほぼデルマタン硫酸) と DDEDS 患者 (GAG 鎖はコンドロイチン硫酸) との間で、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どのような差があるのか、そしてそれがどのようにして組織脆弱性につながっているのかに迫るきわめて重要なアプローチである。*Chst14*^{-/-}マウスでは *Chst14*^{+/-}マウス、WT マウスと比べて異なる HE 染色および抗デコリン染色パターンを示していた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakayama J: α 1,4-*N*-acetylglucosaminyl-transferase. In Handbook of Glycosyl-transferases and Related Genes, 2nd ed. (edited by Taniguchi N, Honke K, Fukuda M, Narimatsu H, Yamaguchi Y, Angata T), Springer-Verlag (in press).

Kamigaito T, Okaneya T, Shimojo H, Nishizawa O, **Nakayama J** (corresponding author):

Overexpression of *O*-GlcNAc by prostate cancer cells is significantly associated with poor prognosis of patients. Prostate Cancer Prost Dis, (in press).

Shiratsu K, Higuchi K, **Nakayama J** (corresponding author): Loss of gastric gland mucin-specific *O*-glycan is significantly associated with progression of differentiated-type adenocarcinoma of the stomach. Cancer Sci (in press).

Iwaya Y, Hasebe O, Koide N, Kitahara K, Suga T, Shinji A, Muraki T, Yokosawa S, Yamada S, Arakura N, Tanaka E, **Nakayama J** (corresponding author): Reduced expression of α GlcNAc in Barrett's esophagus adjacent to Barrett's adenocarcinoma - Possible biomarker to predict the malignant potential of Barrett's esophagus -. Histopathology, (in press).

Kobayashi T, Yan H, Kurahashi Y, Ito Y, Maeda H, Tada T, Hongo K, **Nakayama J** (corresponding author): Role of GalNAc4S-6ST in astrocytic tumor progression. PLoS One 8, e54278, 2013.

Sugiyama R, Agematsu K, Migita K, **Nakayama J**, Mokuda S, Ogura F, Haraikawa K, Okumura C, Suehiro S, Morikawa S, Ito Y, Masumoto J. Defect of suppression of inflammasome-independent interleukin-8 secretion from SW982 synovial sarcoma cells by familial Mediterranean fever-derived pyrin mutations. Mol Biol Rep, (in press).

Nakahara A, Yoshida T, Yazawa M, Ehara T, **Nakayama J**, Kakita A, Ogura R, Asakawa M, Suzuki-Kouyama E, Oyanagi K: Gliomatosis encephali" as a novel category of brain tumors by the first autopsy case report of gliomatosis cerebelli. Neuropathology, (in press).

Ito Y, Vela JL, Matsumura F, Hoshino H, Tyznik A, Lee H, Girardi E, Zajonc DM, Liddington, Kobayashi M, Bao X, Bugaytsova J, Borén T, Jin R, Zong Y, Seeberger PH, **Nakayama J**, Kronenberg M, Fukuda M: Helicobacter pylori cholesteryl α -glucosides contribute to its pathogenicity and immune response by natural killer T cells. PLoS One 8, e78191,

- 2013.
- Iwaya Y, Kobayashi M, Momose M, Hiraoka N, Sakai Y, Akamatsu T, Tanaka E, Ohtani H, Fukuda M, **Nakayama J**: High levels of FOXP3⁺ regulatory T cells in gastric MALT lymphoma predicts responsiveness to Helicobacter pylori eradication. *Helicobacter* 18, 356-362, 2013.
- Miyamoto T, Suzuki A, Asaka R, Ishikawa, Yamada Y, Kobara H, **Nakayama J**, Shiozawa T: Immunohistochemical expression of core2 β 1-6 N-acetylglucosaminyl transferase 1 (C2GnT1) in endometrioid type of endometrial carcinoma: a novel potential prognostic factor. *Histopathology* 62, 986-993, 2013.
- Kashima Y, Takahashi M, Shiba Y, Itano N, Izawa A, Koyama J, **Nakayama J**, Taniguchi S, Kimata K, Ikeda U: Crucial role of hyaluronan in neointimal formation after vascular injury. *PLoS One* 8, e58760, 2013.
- Suzuki-Anekoji M, Suzuki A, Wu S-W, Angata K, Murai K, Sugihara K, Akama TO, Khoo K-H, **Nakayama J**, Fukuda MN, Fukuda M: In vivo regulation of steroid hormones by the chst10 sulfotransferase in mouse. *J Biol Chem* 288, 5007-5016, 2013.
- Tateishi K, Ikeda M, Yokoyama T, Urushihata K, Yamamoto H, Hanaoka M, Kubo K, Sakai Y, **Nakayama J**, Koizumi T: Primary malignant sarcomatoid mesothelioma in the pericardium. *Intern Med* 52, 249-253, 2013.
- Ohya A, Kobayashi M, Sakai Y, Kawashima H, Kageyama S, **Nakayama J**: Lymphocyte recruitment via high endothelial venules in lymphoid stroma of Warthin's tumour. *Pathology* 45, 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, 53-59, 2013.
- Amano J, **Nakayama J**, Yoshimura Y, Ikeda U: Clinical classification of cardiovascular tumors and tumor-like lesions, and its incidences. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 61, 435-447, 2013.
- Kosho T (corresponding author)**, Mizumoto S, Sugahara K. Carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-O) sulfotransferase 14 (CHST14). In: *Handbook of glycosyltransferases and related genes* (Taniguchi N, Honke K, Fukuda M, Narimatsu H, Yamaguchi Y, Angata T, eds), Springer (in press).
- Shimizu K, Wakui K, **Kosho T (corresponding author)**, Okamoto N, Mizuno S, Itomi K, Hattori S, Nishio K, Samura O, Kobayashi Y, Kako Y, Arai T, Oishi T, Kawame H, Narumi Y, Ohashi H, Fukushima Y. Microarray and FISH-based genotype-phenotype analysis of 22 Japanese patients with Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet Part A* [Epub ahead of print].
- Nishi E, Takamizawa S, Iio K, Yamada Y, Yoshizawa K, Hatata T, Hiroma T, Mizuno S, Kawame H, Fukushima Y, Nakamura T, **Kosho T (corresponding author)**. Surgical intervention for esophageal atresia in patients with trisomy 18. *Am J Med Genet Part A* 164(2): 324-330, 2014.
- Kosho T (corresponding author)**, Kuniba H, Tanikawa Y, Hashimoto Y, Sakurai H. Natural history and parental experience of children with trisomy 18 based on a questionnaire given to a Japanese trisomy 18 parental support group. *Am J Med Genet Part A* 161A(7): 1531-1542, 2013.
- Kosho T (corresponding author)**, Okamoto N, Ohashi H, Tsurusaki Y, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kawame H, Homma T, Tanabe S, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Ohta T, Niikawa N, Mizuno S, Kaname T, Naritomi K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Miyatake S, Mizuguchi T, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Clinical correlations of mutations affecting six components of the SWI/SNF complex: detailed description of 21 patients and a review of the literature. *Am J Med Genet Part A* 161A(6): 1221-1237, 2013.
- Tsurusaki Y, **Kosho T (equal contribution, corresponding author)**, Hatahaki K, Narumi Y,

- Wakui K, Fukushima Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Exome sequencing in a family with an X-linked lethal malformation syndrome: clinical consequences of hemizygous truncating OFD1 mutations in male patients. *Clin Genet* 83(2): 135-144, 2013.
- 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, Croatia, pp73-86, 2013.
- Miyake N, **Kosho T**, Matsumoto N. Ehlers-danlos syndrome associated with glycosaminoglycan abnormalities. *Adv Exp Med Biol* 802:145-59, 2014.
- Sugiura K, Takeichi T, Tanahashi K, Ito Y, **Kosho T**, Saida K, Uhara H, Okuyama R, Akiyama M. Lamellar ichthyosis in a collodion baby caused by CYP4F22 mutations in a non-consanguineous family outside the Mediterranean. *J Dermatol Sci*, 2013 [Epub ahead of print].
- Nitta H, Unoki M, Ichiyangi K, **Kosho T**, Shigemura T, Takahashi H, Velasco G, Francastel C, Picard C, Kubota T, Sasaki H. Three novel ZBTB24 mutations identified in Japanese and Cape Verdean type 2 ICF syndrome patients. *J Hum Genet* 58(7): 455-460, 2013.
- Tanaka K, Sekijima Y, Yoshida K, Tamai M, **Kosho T**, Sakurai A, Wakui K, Ikeda S, Fukushima Y. Follow-up nationwide survey on predictive genetic testing for late-onset hereditary neurological diseases in Japan. *J Hum Genet*. 58(8): 560-563, 2013.
- Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, **Kosho T**, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, Ito N, Ihara K, Hara T, Tonoki H, Ohta T, Saito K, Matsuo M, Urano M, Enokizono T, Sato A, Tanaka H, Ogawa A, Fujita T, Hiraki Y, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita T, Taguri M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Yoshiura K, Matsumoto N, Niikawa N. MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet Part A* 161(9): 2234-2243, 2013.
- Higashimoto K, Jozaki K, **Kosho T**, Matsubara K, Fuke T, Yamada D, Yatsuki H, Maeda T, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Koseki H, Ogata T, Soejima H. A novel de novo point mutation of the OCT-binding site in the IGF2/H19-imprinting control region in a Beckwith-Wiedemann syndrome patient. *Clin Genet* [Epub ahead of print].
- 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。日本遺伝カウンセリング学会誌 34(1)：17-20, 2013.
- 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。日本遺伝カウンセリング学会誌 34(1): 21-29, 2013.
- 古庄知己**：信州大学医学部附属病院遺伝子診療部の取り組みー小児科出身の臨床遺伝科医として思うこと。日本遺伝カウンセリング学会誌 (in press)
- 古庄知己**：18 トリソミー児の調査を通じて。ネオネイタルケア 26(5), 2013.
- 古庄知己**：その他の遺伝性大動脈瘤・大動脈解離ー血管型エーラスダンロス症候群。最新医学別冊 新しい診断と治療のABC(42) 大動脈瘤・大動脈解離, 鈴木亨, 永井良三(編) 最新医学社, 大阪, 85-92, 2013.
- 古庄知己**：グリコサミノグリカンの異常と新型 Ehlers-Danlos 症候群 (古庄型)。病理と臨床 31(8): 852-860, 2013.
- 古庄知己**：18トリソミー症候群。小児科臨床増刊号『臨床医が知っておきたい先天異常』 66：55-60, 2013.
- 古庄知己**：4p-症候群, 5p-症候群。周産期医学特集『染色体異常と先天異常症候群の診療ガイド』 43(3): 363-367, 2013.

2. 学会発表

一般演題

- 古庄知己**, 三宅紀子, 福嶋義光, 松本直通: D4ST1 欠損に基づく Ehlers-Danlos 症候群の遺伝子解析状況. 第 36 回日本小児遺伝学会(平成 25 年 4 月 18 日 於 エソール広島, 広島).

古庄知己、三宅紀子、福嶋義光：デルマトン 4-O-硫酸基転移酵素-1 欠損に基づく新型エーラスダンロス症候群の発見。第116回日本小児科学会学術集会（平成 25 年 4 月 19 日 於 広島）。

古庄 知己、石川 真澄、黄瀬 恵美子、鳴海 洋子、関島 良樹、櫻井 晃洋、丸山 孝子、佐藤 瞳、水内 麻子、山下 浩美、玉井 真理子、河村 理恵、涌井 敬子、福嶋 義光：遺伝性・先天性疾患に関する横断的診療連携体制の構築：信州大学医学部附属病院遺伝子診療部の挑戦。第37回日本遺伝カウンセリング学会学術集会（平成 25 年 6 月 20 日～23 日 於 信州大学医学部附属病院、松本）。

古庄知己、岳鳳鳴、坂翔太、積田奈々、笠原優子、岡田尚巳、水本秀二、小林身哉、中山淳、三宅紀子、野村義宏、江良択実、籀持淳、石川真澄、涌井敬子、福嶋義光、松本直通、菅原一幸、佐々木克典、武田伸一：デルマトン 4-O-硫酸基転移酵素 (D4ST1) 欠損による Ehlers-Danlos 症候群 (DDEDS) の疾患モデルの構築と検証。日本人類遺伝学会第 58 回大会（2013/11/21-23 於：江陽グランドホテル）。

Kosho T, Yue F, Saka S, Tsumita N, Kasahara Y, Okada T, Mizumoto S, Kobayashi M, Nakayama J, Miyake N, Nomura Y, Era T, Hatamochi A, Fukushima Y, Matsumoto N, Sugahara K, Sasaki K, Takeda S: Establishment and Validation of iPS Cells and Knockout Mice for dermatan 4-O-sulfotransferase 1 (D4ST1)-deficient Ehlers-Danlos Syndrome (DDEDS). American Society of Human Genetics 63rd Annual Meeting, Boston, Oct 22-26, 2013.

招待講演

古庄知己：「デルマトン 4-O-硫酸基転移酵素-1 欠損に基づく新型エーラスダンロス症候群 (DDEDS) の発見」第 11 回東北小児成長フォーラム (2014/1/30 於 ホテルメトロポリタン仙台)。

古庄知己：「小児科領域における遺伝学の進歩」松本市小児科医会 (2014/1/25 於 松本館丸ノ内ホール)。

古庄知己：「遺伝性・先天性疾患を持つ人たちを

診療し、支援する側から日本の出生前診断を考える～18 トリソミーの臨床研究と信州 NIPT ワーキングの取り組みを通じて～」第 156 回染色体研究会 (2013/12/14 於 東京医科大学病院)。

古庄知己：「新型出生前検査の実際と問題点～18 トリソミーに関する最新の知見を含めて～」第 249 回長野県周産期カンファレンス (2013/11/6 於 信州大学医学部附属病院)。

古庄知己：「信州での PWS ケア～信州 PWS プロジェクト～」Meet the Specialists (2013/9/15 於 六本木アカデミーヒルズ)。

古庄知己：「18 トリソミーの会アンケート調査結果論文文化までの道のり」18 トリソミーの会公開シンポジウム in 滋賀 (2013/7/14 於 ピアザ淡海 滋賀県立県民交流センター)。

古庄知己：「信州大学医学部附属病院遺伝子診療部の取り組み～小児科出身の遺伝科医としての関わりと思い」古庄知己 シンポジウム 2「出生前診断新時代を迎えて」第 37 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 (平成 25 年 6 月 22 日 於 川崎市産業振興会館、川崎)。

古庄知己：「EDS 研究の現状」2013 年度 JEFA 総会 (2013/5/25 於 日本医科大学)。

受賞

中山淳：平成 25 年度信州大学医学部医学科顕彰 (平成 26 年 3 月 24 日)。

中山淳：日本病理学賞「糖鎖遺伝子：クローニングから機能解析,そして病理学へ- α 1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素を中心に-」

中山淳：日本組織細胞化学会学会賞 (高松賞)「胃粘膜における腺粘液糖鎖の機能」

古庄知己：平成 25 年度信州大学医学部医学科顕彰 (平成 26 年 3 月 24 日)。

古庄知己：平成 25 年度日本医師会医学研究奨励賞「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の病態解明と治療法の開発」(平成 25 年 11 月 1 日 於 日本医師会館)。

古庄知己、三宅紀子、福嶋義光：第 116 回日本小児科学会学術集会最優秀演題賞 (広島県知事賞)「デルマトン 4-O-硫酸基転移酵素-1

欠損に基づく新型エーラスダンロス症候群
の発見」(平成 25 年 4 月 19 日 於 広島)

古庄知己、三宅紀子、福嶋義光、松本直通 : D4ST1

欠損に基づく Ehlers-Danlos 症候群の遺伝
子解析状況. 第 36 回日本小児遺伝学会 (平
成 25 年 4 月 18 日 於 エソール広島、広
島).

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

图 1

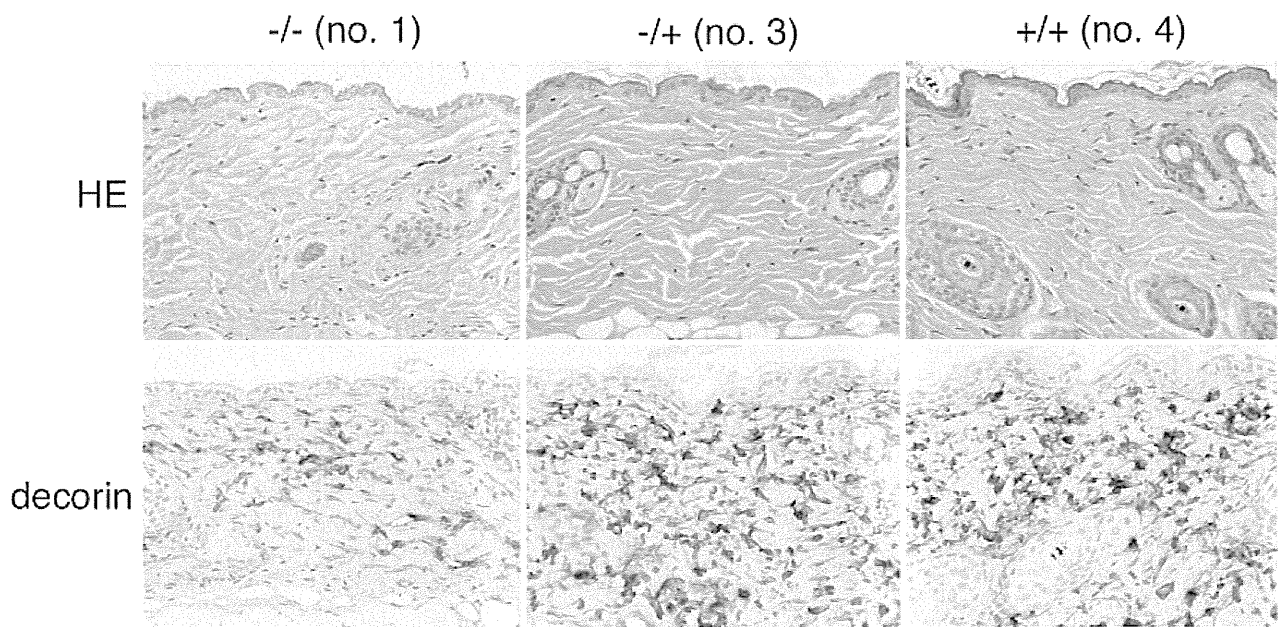


图 2

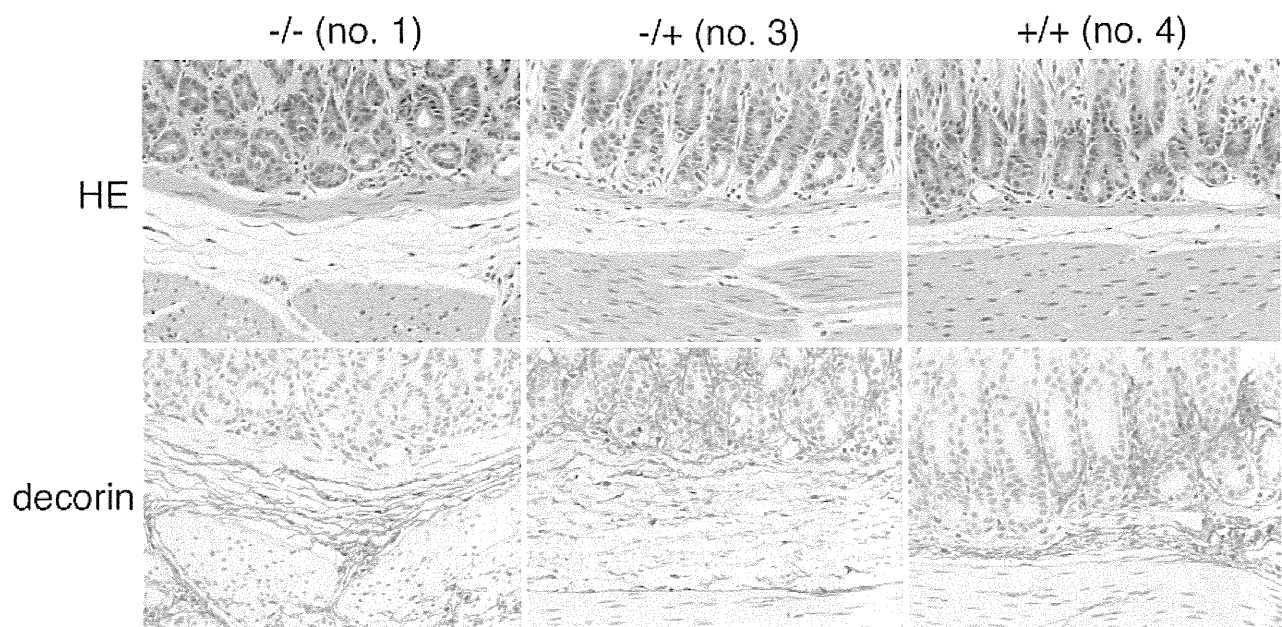
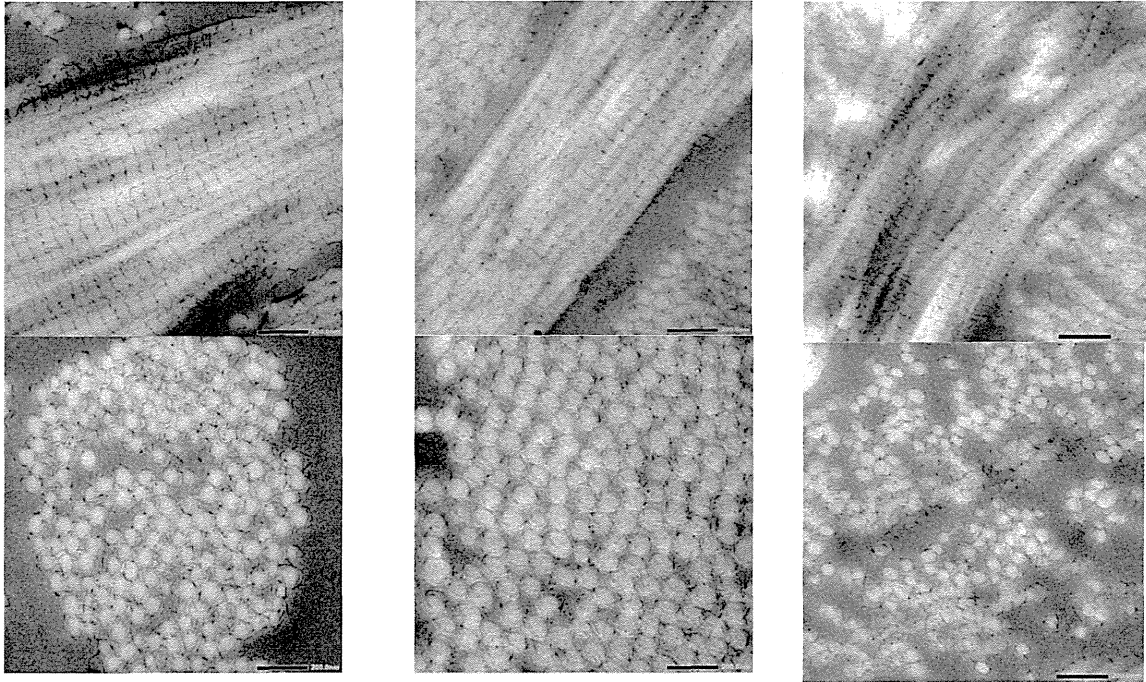


图 3

皮膚表層



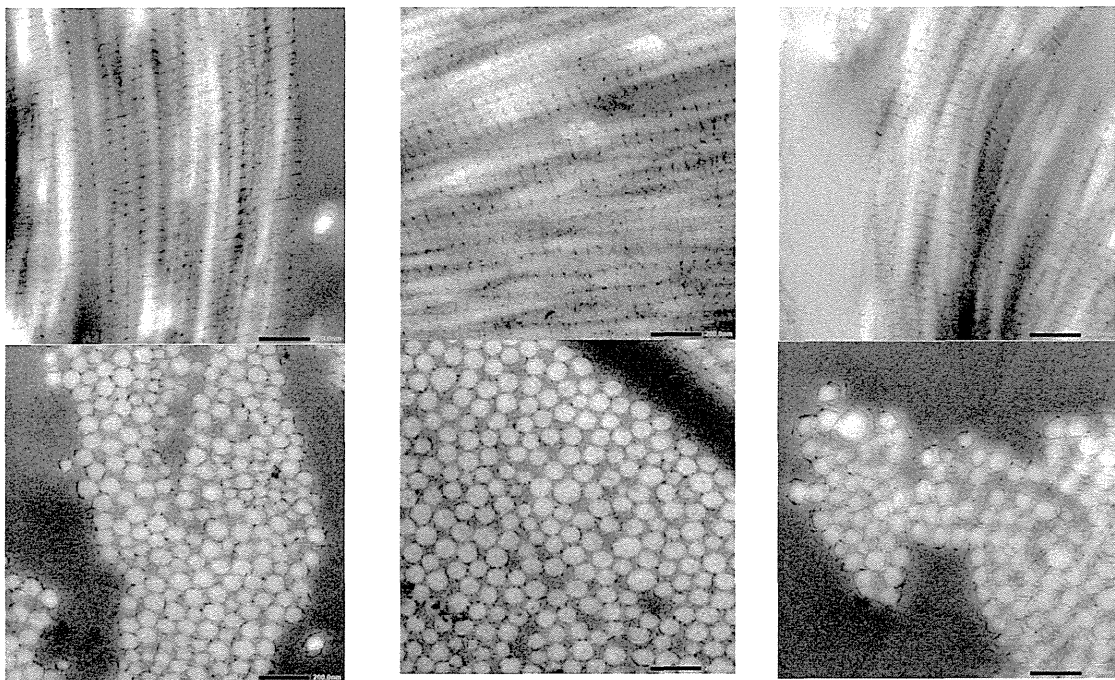
WT

Chst14^{+/-}

Chst14^{-/-}

图 4

皮膚深層

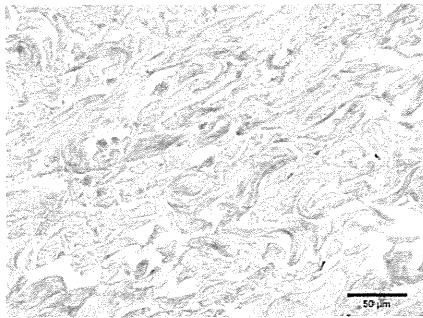


WT

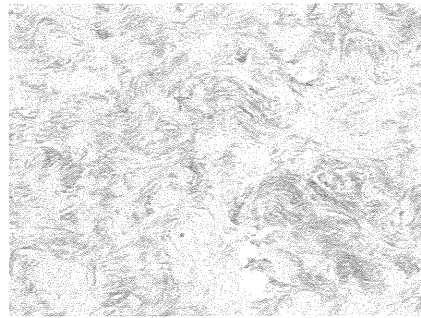
Chst14^{+/-}

Chst14^{-/-}

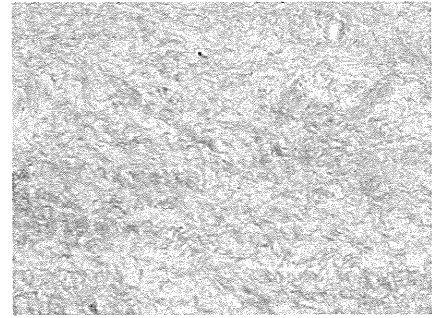
患者皮膚を用いた抗デコリン免疫組織化学解析



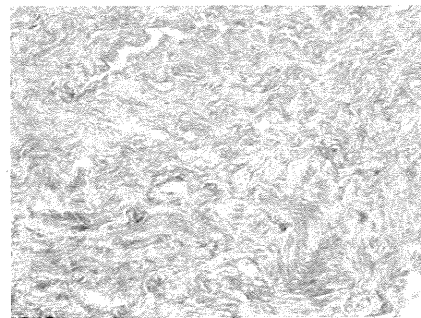
健常14歳女兒、上腕



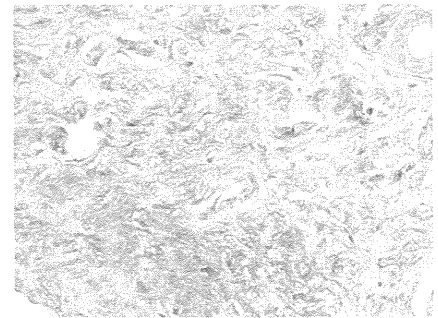
DDEDS16歳女兒、腹部



DDEDS19歳女性、上腕



DDEDS18歳女性、背部



DDEDS4歳女兒、上腕

平成25年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
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（DEDS）の
病態解明と治療法の開発
分担研究課題：DEDS 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

*現所属：名城大学・薬学部・病態生化学研究室

研究要旨：デルマタン硫酸（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-PG は特に皮膚、軟骨、大動脈に多く存在しており、その側鎖である DS 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 の生合成に関わるデルマタン 4-O-硫酸基転移酵素-1 (D4ST-1)の変異は硫酸基転移活性を低下させ、その結果、コラーゲンと会合するデコリン上の DS 鎖が合成されずに、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[Miyake *et al.*, Hum Mutat. (2010) 31, 966-974]。本分担研究では昨年度の成果をふまえ、H25 年度では、遺伝子治療と簡易診断法の確立のため、1) D4ST-1 遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルスを感染させた細胞の酵素活性測定による組換え型 D4ST-1 タンパク質の機能評価; 2) D4ST-1 ノックアウト(KO)マウスの皮膚由来の DS 鎖の定量; 3) 健常人由来の尿中の DS 鎖の定量解析を行った。

その結果、ネガティブコントロールと比較して、ヒト腎臓由来の 293 細胞で発現したヒト D4ST-1 およびマウス D4ST-1 は、3 倍以上の硫酸基転移活性を示し、有意な差が検出された。したがって、今回発現した D4ST1 は、酵素活性を保持した機能性 D4ST-1 を産生していることが強く示唆された。また、D4ST-1 KO マウスでは、野生型およびヘテロマウスと比較して、DS の 4-O-硫酸化構造が劇的に減少していた(野生型およびヘテロマウスの 0.6%)ことから、今回作製した D4ST-1 KO マウスは確かに DS 鎖がほぼ欠損しており、ヒトの EDS 患者の糖鎖と同様であることが結論づけられた。D4ST-1 変異患者の尿中の DS 鎖を健常人由来の尿と比較するため、健常人由来の尿の DS を定量したところ、健常人由来の尿の DS は顕著に検出されたのに対し、D4ST-1 の変異による EDS 患者は、尿中に DS が検出されなかったことから、本遺伝病の確定診断等への応用が期待される。

A. 研究目的

デルマタン硫酸プロテオグリカン (DS-PG)は特定のコアタンパク質上のセリン残基に DS とよばれる多糖鎖がし、主に細胞表面や細胞外マトリックスに普遍的に存在している。DS-PG は生体内において、特に皮膚・軟骨・大動脈に豊富に含まれ、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している。DS 糖側鎖の構造は N-アセチル-D-ガラクトサミン (GalNAc)と L-イズロン酸 (IdoUA)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、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。

平成 24 年度は、1) D4ST-1 変異 EDS 患者の尿中

の DS を定量したところ、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 患者では予想どおり、DS 様構造が全く検出されなかった。2) 新奇の EDS 患者由来の繊維芽細胞の DS の定量を行ったところ、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た。3) D4ST-1 ノックアウトマウスの尿中に排泄される DS の定量を行った結果、野生型およびヘテロ変異型マウス由来の尿においては、DS 鎖が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。したがって、このマウスはヒトの D4ST-1 変異型 EDS のモデルマウスになりうる可能性が強く示唆された。

今年度は、遺伝子治療を目指し、1) D4ST-1 遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルスを感染させたヒト腎臓由来 293 細胞および D4ST-1 ヘテロマウス由来繊維芽細胞の酵素活性測定による組換え型 D4ST-1 タンパク質の機能評価; 2) D4ST-1 ノックアウトマウスの皮膚由来の DS 鎖の定量; 3) 健常人由来の尿中の DS 鎖の定量解析を行った。

B. 研究方法

1. D4ST-1 を組み込んだアデノ随伴ウイルス感染細胞の D4ST 活性測定

共同研究者である国立精神・神経医療研究センター神経研究所の武田伸一博士、岡田尚巳博士らによって作製された D4ST-1 遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルスを感染させたヒト腎臓由来 293 細胞と D4ST-1 欠損ヘテロマウス由来皮膚繊維芽細胞を用いて、D4ST 活性を測定した。具体的には、それらのホモジェネートを酵素源とし、³⁵S 標識した活性硫酸 (³⁵S-PAPS) を硫酸基供与体、脱硫酸化 DS (デルマトタン) を受容体基質として、37°C で数時間反応させ、ゲルろ過により、反応生成物 (³⁵S-デルマトタン) を分離した。得られた画分を液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定し、硫酸基の転移活性とした。

2. D4ST-1 ノックアウトマウスの皮膚のデルマトン硫酸の定量

D4ST-1 ノックアウトマウス由来の皮膚から、アクチナーゼ処理、トリクロロ酢酸処理、エタノール沈殿、限外ろ過膜による濃縮・脱塩によって、グリコサミノグリカン抽出・精製した。得られた DS、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸を含むグリコサミノグリカン画分を、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。

3. 健常人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

D4ST-1 変異 EDS 患者と同姓で年齢が同一もしくは近い 5 人の健常人由来の尿を、限外ろ過膜を用いて遠心濃縮後、次にコンドロチナーゼ ABC、コンドロチナーゼ AC、コンドロチナーゼ 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. D4ST-1 を組み込んだアデノ随伴ウイルス感染細胞の D4ST 活性測定

ネガティブコントロールである GFP 発現細胞と比較して、293 細胞で発現させたヒト D4ST-1 およびマウス D4ST-1 は、3 倍以上の硫酸基転移活性を示し、有意な差が検出された。一方、D4ST-1 欠損ヘテロマウスに発現させた D4ST-1 も、ネガティブコントロールと比較して、10 倍高い活性が検出された。したがって、293 細胞およびマウス繊維芽細胞で発現した D4ST-1 は、酵素活性を保持した機能性 D4ST-1 を産生していることが強く示唆された。

2. D4ST-1 ノックアウトマウスの皮膚のデルマト

ン硫酸の定量

D4ST-1 KO マウスでは、野生型およびヘテロマウスと比較して、DS の 4-O 硫酸化構造が劇的に減少していた(野生型およびヘテロマウスの 0.6%)。一方で、D4ST-1 KO マウスでは、野生型およびヘテロマウスと比較して、コンドロイチン硫酸(CS)の 4-O 硫酸化構造が飛躍的に(およそ 5-7 倍)増加し、さらに 6-O 硫酸化構造が 2-8 倍増加していた。これらの知見は、ヒトの D4ST-1 変異 EDS 患者由来の皮膚の線維芽細胞の糖鎖解析の結果と一致することから、今回作製した D4ST-1 KO マウスは確かに DS 鎖がほぼ欠損しており、ヒトの EDS 患者の糖鎖と同様であることが結論づけられる。

3. 健常人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

昨年度、D4ST-1 変異患者の尿中の DS 鎖は全く検出されなかったが、健常人由来の尿が入手できていなかったため、DS の尿の定量比較が困難であった。そこで、今年度健常人由来の尿を用いて、DS を定量し、患者との比較を行った。

健常人由来の尿の DS は顕著に検出されたのに対し、D4ST-1 の変異による EDS 患者は、尿中に DS が検出されなかったことから、本遺伝病の確定診断等への応用が期待される。

D. 考察

アデノ随伴ウイルスに組み込んだ D4ST-1 は、ヒトの細胞あるいはマウス由来の細胞に感染させ、組換え型 D4ST-1 を発現させたところ、酵素活性を発揮することが分かった。したがって、本疾患の遺伝子治療を指向した基盤が構築できたことから、治療へ向けた研究開発が加速すると期待される。

D4ST-1 欠損マウスの皮膚の DS の定量を行ったところ、DS が検出されず、ヒトの D4ST-1 変異による EDS 患者と同様の傾向であったことから、このマウスは EDS のモデルになりうる可能性が強く示唆された。

D4ST-1 変異による EDS 患者の簡便な確定診断法の確立のため、これまで検体がなかった健常人由来の尿中の DS の定量を行った。今後の患者の

コントロールとなりうる。

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

原著論文

1. Mizumoto S, Fongmoon D, Sugahara K. Interaction of chondroitin sulfate and dermatan sulfate from various biological sources with heparin-binding growth factors and cytokines. *Glycoconjugate J* 30(6): 619-632, 2013.
2. *Nakajima M, *Mizumoto S, *Miyake N, Kogawa R, Iida A, Ito H, Kitoh H, Hirayama A, Mitsubuchi H, Miyazaki O, Kosaki R, Horikawa R, Lai A, Mendoza-Londono R, Dupuis L, Chitayat D, Howard A, Ferraz-Leal G, Cavalcanti D, Tsurusaki Y, Saitsu H, Watanabe S, Lausch E, Unger S, Bonafe L, Ohashi H, Superti-Furga A, Matsumoto N, Sugahara K, Nishimura G, Ikegawa S. (*equal contribution) Mutations in *B3GALT6*, which encodes a glycosaminoglycan linker region enzyme, cause a spectrum of skeletal and connective tissue disorders. *Am J Hum Genet* 92(6): 927-934, 2013.
3. *Muller T, *Mizumoto S, *Suresh I, Komatsu Y, Vodopituz J, Dundar M, Straub V, Lingenhel A, Melmer A, Lechner S, Zschocke J, Sugahara K, Janecke AR. (*equal contribution) Loss of dermatan sulfate epimerase (DSE) function results in musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome. *Hum Mol Genet* 22(18): 3761-3772, 2013.
4. *Iida A, *Simsek-Kiper PO, *Mizumoto S, Hoshino T, Elcioglu N, Horemuzova E, Geiberger S, Yesil G, Kayserili H, Unite GE, Boduroglu K, Watanabe S,