

Ohashi H, Alanay Y, Sugahara K, Nishimura G, Ikegawa S. (*equal contribution) Clinical and radiographic features of the autosomal recessive form of brachyolmia caused by *PAPSS2* mutations. *Hum Mutat* 34(10): 1381–1386, 2013.

Course on Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets (2013, 9/27, Kos Island, Greece)

総説

1. Mizumoto S. Reduction of chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 expression causes Costello syndrome. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 25(142), 87-89, 2013.
2. Mizumoto S, Ikegawa S, Sugahara K. Human genetic disorders caused by mutations in the genes encoding biosynthetic enzymes for sulfated glycosaminoglycans (Minireview). *J Biol Chem* 288(16): 10953-10961, 2013.
3. 水本秀二：デルマトン硫酸合成不全によるエーラス・ダンロス症候群の創薬のシーズの開発. *秋山財団年報* 26: 73, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

学会報告

1. 水本秀二, 中島正宏, Thomas Müller, 三宅紀子, Indrajit Suresh, 古川諒, 小松由枝, 松本直通, Andreas R Janecke, 池川志郎, 菅原一幸. コンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸の生合成に関わる酵素の変異による骨・皮膚疾患の糖鎖生物学的研究 (総説講演). 日本生化学会北海道支部支部例会第 50 回記念大会 (平成 25 年 07 月 26 日, 北海道大学医学部フラテ会館, 札幌)
2. 水本秀二, 中島正宏, Thomas Müller, 三宅紀子, Indrajit Suresh, 古川諒, 小松由枝, 松本直通, Andreas R Janecke, 池川志郎, 菅原一幸. グリコサミノグリカンの生合成に関わる酵素の新規変異による脊椎骨端骨幹端異形成症とエーラス・ダンロス症候群の糖鎖生物学的研究. 第 32 回日本糖質学会年会 (平成 25 年 8 月 5 日, 大阪国際交流センター, 大阪)

講演

1. Kazuyuki Sugahara (Invited lecture): “Wobble chondroitin sulfate (CS) oligosaccharide motifs and mass production of GAG oligosaccharides” **The 21st GAG Symposium** (2013, 9/19, villa Vigoni, Italy)
2. Kazuyuki Sugahara (Invited lecture): “Mechanism of glycosaminoglycan-mediated tumor metastasis. Novel role for RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-products)” **FEBS Advanced Lecture**

平成25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 患者由来 iPS 細胞に関する研究

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：本分担研究においては、平成24年度に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を確認し、疾患モデルとしての妥当性を検証するとともに、神経細胞への分化誘導に成功した。平成25年度、前年度に分化誘導に成功した神経細胞を用いたマイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析、患者由来iPS細胞の性質についての詳細な検討、前年度に使用したのとは別の患者由来iPS細胞クローンを用いた神経細胞への分化誘導の検討、患者由来iPS細胞から心筋細胞への分化誘導、他の2患者由来培養皮膚線維芽細胞からのiPS細胞樹立を試みた。DDEDS患者由来iPS細胞から分化誘導した神経細胞では、健常人由来iPS細胞から分化誘導した神経細胞に比べて、神経細胞発達・分化調節に関わる遺伝子群などに発現の低下が見られた。DDEDS患者由来iPS細胞は、健常人由来iPS細胞に比べて、LamininおよびP-cadherinの発現が低下しており、細胞接着能が低い傾向にあった。さらに、他のiPS細胞クローンを用いても神経細胞への分化に成功するとともに、心筋細胞への分化へも成功した。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、様々な系統に分化させ、さらに詳細かつ包括的な病態解析を行う方向である。

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。

本分担研究の目的は、DDEDS患者由来皮膚線維芽細胞より樹立したiPS細胞を用いて、根治療法の開発を視野に入れた詳細な病態解析を推進す

ることである。平成24年度までの研究で、1患者の培養皮膚線維芽細胞由来のiPS細胞を樹立、未分化能、多能性を確認、神経細胞への分化誘導に成功し、DDEDS病態解析研究の適切なモデルとなる可能性が示された。

平成25年度、以下の検討を行った。

- 1) 平成24年度に分化誘導に成功した神経細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析
- 2) DDEDS患者由来iPS細胞の性質についての詳細な検討
- 3) 平成24年度に使用したのとは別のDDEDS患者由来iPS細胞クローンを用いて、神経細胞への分化誘導を検討
- 4) DDEDS患者由来iPS細胞から心筋細胞への分化誘導
- 5) 他の2患者由来培養皮膚線維芽細胞からのiPS細胞樹立

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、235G: 健常人より京都大学で樹立された iPS 細胞。

*Patient 番号は、「DDEDS 患者リスト」に準ずる。

平成 24 年度に分化誘導に成功した神経細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析

A108 および 210B7 から分化誘導した神経細胞に対して、Human HT-12 (v4) (Illumina 社) を用いたマイクロアレイ発現解析を行った。さらに、上記マイクロアレイ発現解析結果に基づくパスウェイ解析および iPS 細胞と分化誘導した神経細胞に対する TUNEL 染色により、apoptosis の状態を検討した。

DDEDS 患者由来 iPS 細胞の性質についての検討

抗デコリン抗体と抗 I 型コラーゲン抗体を用いた免疫染色分析

A108 および 201B7 の iPS 細胞コロニーに対し、抗デコリン抗体および抗 I 型コラーゲン抗体で染色した。

抗ラミニン抗体と抗 P-カドヘリン抗体を用いた免疫染色分析

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析の結果により、A108 細胞において発現低下を来していた細胞外マトリックス関係遺伝子のうち Laminin と Pan-cadherin (P-cadherin) 遺伝子に着目し、抗 Laminin 抗体および抗 P-cadherin 抗体を用いた免疫染色分析を行った。

iPS 細胞接着能力および増殖能力分析

A108 と 201B7 における細胞接着能や増殖能を MTT アッセイ (RI を使用せずに、僧坊続食、活性、および障害性を定量する方法) により分析した。

平成 24 年度に使用したのとは別の DDEDS 患者由来 iPS 細胞クローンを用いて、神経細胞への分

化誘導を検討

平成 24 年度に使用したのとは別な iPS 細胞クローン (同一患者、同時に樹立したもの) を用いて、神経細胞への分化誘導を試みた。

DDEDS 患者由来 iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導

A108 および 201B7 を用いて、心筋細胞への分化誘導を試みた。心筋細胞への分化の確認には、抗 Troponin I (cTnT) 抗体を用いた。また、Real-time PCR により、心筋分化効率および心筋線維収縮関連遺伝子発現について検討した。

他の 2 患者由来培養皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞樹立

P281L/Y293C を有する女性患者 (Patient 17) および M1? を有する男性患者 (Patient 30) 由来培養皮膚線維芽細胞から、iPS 細胞樹立を試みた。

C. 研究結果

平成 24 年度に分化誘導に成功した神経細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析

分化誘導された神経細胞を対象としてマイクロアレイ発現解析を施行、A108 では 201B7 に比べて、神経細胞発達に関わる 23 遺伝子、神経細胞分化の調節に関わる 11 遺伝子、神経細胞相互接着に関わる 4 遺伝子、軸索伸長の促進に関わる 4 遺伝子、樹状細胞形態形成に関わる 5 遺伝子、神経伝達物質の分泌調節に関わる 6 遺伝子、神経細胞の migration に関わる 9 遺伝子の発現が低下していた (図 1)。

パスウェイ解析の結果、apoptosis 促進遺伝子が up-regulate され、apoptosis 抑制遺伝子が down-regulate されている傾向が観察された (図 2)。TUNEL 染色では、apoptosis 陽性細胞は A108 由来神経細胞において 3.95%、201B7 由来神経細胞において 0.74% と増加していた (図 3)。

DDEDS 患者由来 iPS 細胞の性質についての検討

抗デコリン抗体と抗 I 型コラーゲン抗体を用いた免疫染色分析

A108 では、抗デコリン抗体に対する染色性も、

抗 I 型コラーゲン抗体に対する染色性も、弱かった (図 4)。

抗ラミニン抗体と抗 P-カドヘリン抗体を用いた免疫染色分析

未分化の iPS 細胞コロニーが緊密に充填し、高い核対細胞質比を持っていた。しかし、A108 の境界も、いくつかの細胞が融合したところを見つけた (図 5)。

抗 Laminin 抗体を用いた免疫染色分析において、201B7 では全ての細胞の周囲に Laminin 発現が観察されたが、A108 では Laminin 発現が確認されない細胞があった (図 6)。抗 P-cadherin 抗体を用いた免疫染色分析において、201B7 では全ての細胞の周囲に P-cadherin 発現が観察されたが、A108 では P-cadherin が発現していない細胞が観察された (図 7)。特に、細胞融合が見られる部位に Laminin および P-cadherin 発現は消失していた。

iPS 細胞接着能力および増殖能力分析

MTT アッセイで定量化された A108 の細胞接着能は、201B7 より低下していた (図 8)。

細胞増殖能は、両細胞で有意な差は認められなかった (図 9)。

平成 24 年度に使用したのとは別の DDEDS 患者由来 iPS 細胞クローンを用いて、神経細胞への分化誘導を検討

TujIII 抗体および抗 Cabidin 抗体にて、iPS 細胞から神経細胞への分化を確認した (図 10)。A108 における神経分化効率は、201B7 より低くなっていた。シナプスは A108 由来神経細胞においても、201B7 由来神経細胞においても、形成されていた (図 10)。

DDEDS 患者由来 iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導

235G においては分化誘導開始後 7 日目に (図 11)、A108 においては 12 日目に (図 12)、拍動心筋が観察された (拍動領域を線で示した)。

iPS 細胞から心筋細胞への分化は抗 Troponin I (cTnT) 抗体で確認、心筋細胞特異的な横紋も観察された (図 13)。

心筋への分化効率を調べるために、 β -actin を基

準として、Real-time PCR で Troponin I (cTnT) 遺伝子発現を検討したが、A108 と 235G では有意な差は認められなかった (図 14)。

心筋線維収縮関連遺伝子発現を調べるために、Troponin I (cTnT) を基準として、SLC8A1 (calcium regulation in cardiac cell) および CNN (Calponin 1, Calcium binding protein) の発現を検討したが、A108 と 235G では有意な差は認められなかった (図 15)。

他の 2 患者由来培養皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞樹立

Patient 17 および Patient 30 由来培養皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞は未だ樹立されていない。

D. 考察

本分担研究では、平成 24 年度までに 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に成功した。根本治療の開発を視野に、本年度、樹立した iPS 細胞のさらなる特徴の検討、心筋細胞への分化誘導などを試みた。

マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析にて、DDEDS 患者由来 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞では、健常人由来 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞に比べて、神経細胞発達・分化調節に関わる遺伝子群などに発現の低下が見られた。DDEDS 患者の多くは最終的に正常範囲の知能レベルを有しているが、発達遅滞、画像上脳室拡大を呈する児が多いことが、こうした神経系の遺伝子発現状態とどのように関連しているか、さらなる精査が必要である。

患者由来 iPS 細胞は、健常人由来 iPS 細胞に比べて、Laminin および P-cadherin の発現が低下しており、実際細胞接着能が低い傾向にあった。全身性結合組織脆弱性とどのように関連しているか、今後も他系統の細胞に分化させたもので検証していく必要がある。

本年度初めて心筋細胞への分化誘導に成功した。DDEDS 患者では、心筋異常の報告はないが、上

行大動脈拡張、弁異常、また反復性巨大皮下血腫から推測される筋性動脈脆弱性が観察されており、今後は血管平滑筋細胞への分化誘導、機能解析を行っていく必要がある。

E. 結論

DDEDS 患者由来 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞では、健常人由来 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞に比べて、神経細胞発達・分化調節に関わる遺伝子群などに発現の低下が見られた。患者由来 iPS 細胞は、健常人由来 iPS 細胞に比べて、Laminin および P-cadherin の発現が低下しており、細胞接着能が低い傾向にあった。さらに、他の iPS 細胞クローンをを用いても神経細胞への分化に成功するとともに、心筋細胞への分化へも成功した。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、様々な系統に分化させ、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

Yue F, Shirasawa S, Ichikawa H, Yoshie S, Mogi A, Masuda S, Magai M, Yokohama T, Tomotsune D, Sasaki K. Regenerative Medicine and Tissue Engineering. In Tech.117-139, 2013.

Takizawa-Shirasawa S, Yoshie S, **Yue F**, Mogi A, Yokoyama T, Tomotsune D, Sasaki K. FGF7 and cell density are required for final differentiation of pancreatic amylase-positive cells from human ES cells. Cell Tissue Res. Cell Tissue Res. 354(3): 751-759, 2013.

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.

2. 学会発表

Yue F, Tomotsune D, Ichikawa H, Yoshie S, Mogi A, Takahashi Y, Masuda S, Shirasawa S, Yokoyama T, Nagai M, Sasaki K. Neural Model from iPS cells from DD-EDS patient. The 11th ISSCR Annual Meeting. June 13-16, 2013 (Boston, USA)

Yue F, Tomotsune D, Ichikawa H, Yoshie S, Mogi A, Takahashi Y, Masuda S, Shirasawa S, Yokoyama T, Nagai M, Sasaki K. DD-EDS patient specific iPS-derived neurons. 第 12 回日本再生医療学会総会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

☒ 1

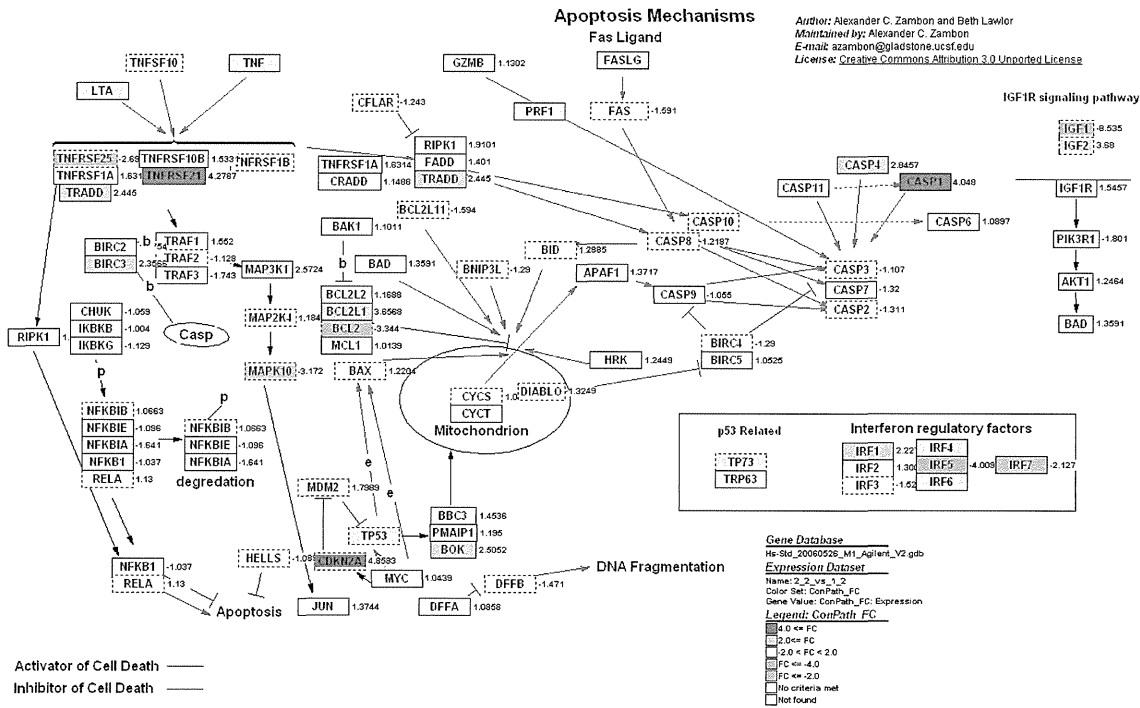
neuron development (GO:0048666)				regulation of neuron differentiation (GO:0045664)				dendrite morphogenesis (GO:0048813)			
GeneSymt Regulation [201B7] [A108]				GeneSymt Regulation [201B7] [A108]				GeneSymt Regulation [201B7] [A108]			
NCAM2	down	0.371	-1.891	NEFM	down	2.056	-0.288	TLX2	down	1.916	-1.552
DPYSL5	down	1.744	-2.272	NLGN1	down	1.451	-1.671	CACNA1A	down	0.292	-2.256
NEFL	down	1.933	-3.675	CDH4	down	1.329	-3.487	DCLK1	down	1.571	-4.181
NTF3	down	1.586	-2.327	NTRK3	down	2.009	-0.121	CELSR2	down	0.966	-1.432
CDH4	down	1.329	-3.487	SEMA3F	down	1.660	-1.775	DCX	down	4.613	-2.907
TLX2	down	1.916	-1.552	HOXA2	down	3.891	-0.906				
TH	down	0.936	-1.874	NGFR	down	3.289	-0.559				
DCLK1	down	1.571	-4.181	ROBO2	down	1.158	-1.406				
NFASC	down	1.529	-0.525	NTN1	down	0.514	-1.782				
NTNG1	down	4.750	-0.541	DLL1	down	2.817	-1.111				
IRX5	down	3.114	-3.390	ISL1	down	2.166	0.061				
SEMA3F	down	1.660	-1.775								
ONECUT2	down	4.131	-0.645								
HOXA2	down	3.891	-0.906								
NGFR	down	3.289	-0.559								
NFASC	down	-0.521	-2.969								
ROBO2	down	1.158	-1.406								
PTPRZ1	down	-0.584	-4.084								
RORB	down	1.095	-1.007								
BMP7	down	2.344	-2.335								
CDK5R1	down	1.091	-2.332								
ISL1	down	2.166	0.061								
BMP7	down	-0.705	-2.908								

neuron cell-cell adhesion (GO:0007158)				regulation of neurotransmitter secretion (GO:0046905)			
GeneSymt Regulation [201B7] [A108]				GeneSymt Regulation [201B7] [A108]			
NCAM2	down	0.371	-1.891	SNCA	down	2.131	-0.031
CTNND2	down	2.330	-0.616	EDN3	down	4.693	0.642
ASTN1	down	3.480	0.014	CACNA1A	down	0.292	-2.256
CDK5R1	down	1.091	-2.332	SNCG	down	1.404	-1.499
				EDN3	down	1.807	-0.950
				GRM8	down	3.494	-0.750

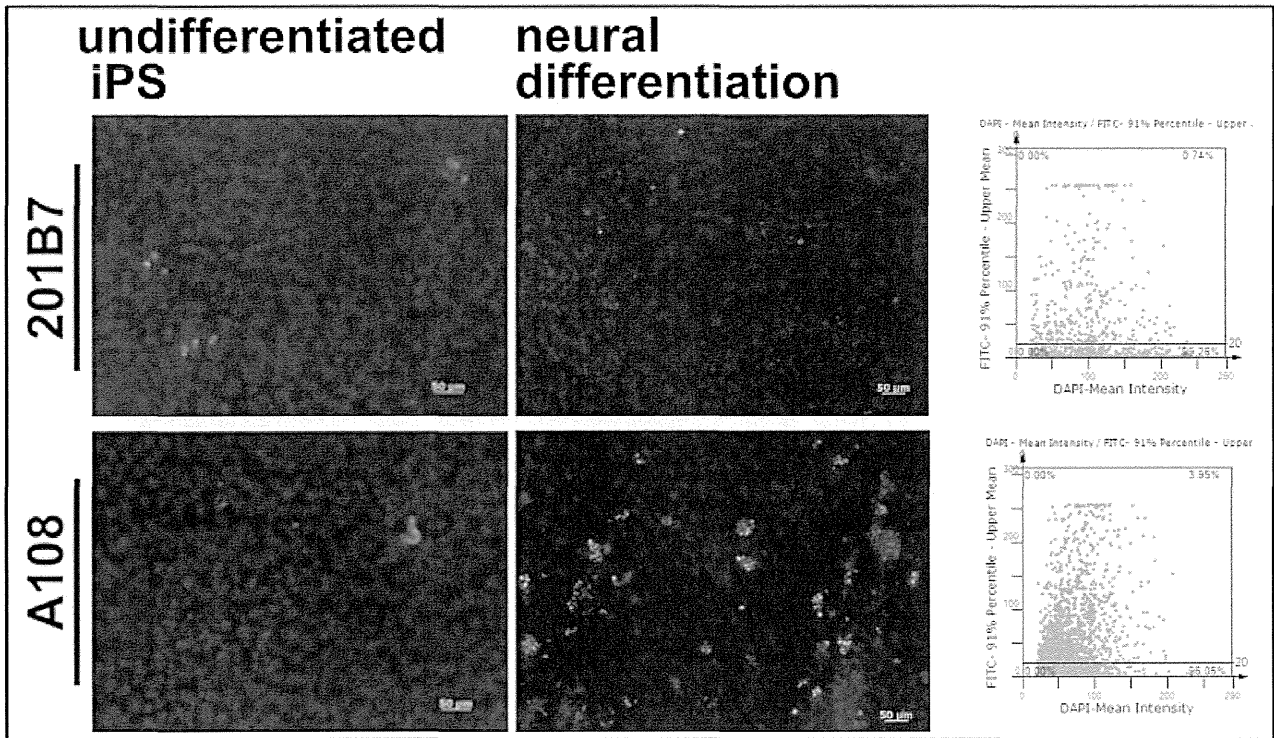
neuron migration (GO:0001764)			
GeneSymt Regulation [201B7] [A108]			
NR2F1	down	5.414	2.486
DCLK1	down	1.571	-4.181
Twist1	down	4.084	0.971
MDGA1	down	1.153	-1.444
DCX	down	4.613	-2.907
DCDC2	down	0.249	-2.092
NTN1	down	0.514	-1.782
Twist1	down	2.431	-1.782
CDK5R1	down	1.091	-2.332

positive regulation of axon extension (GO:0045773)			
GeneSymt Regulation [201B7] [A108]			
CDH4	down	1.329	-3.487
NTRK3	down	2.009	-0.121
MAPT	down	5.620	1.641
NTN1	down	0.514	-1.782

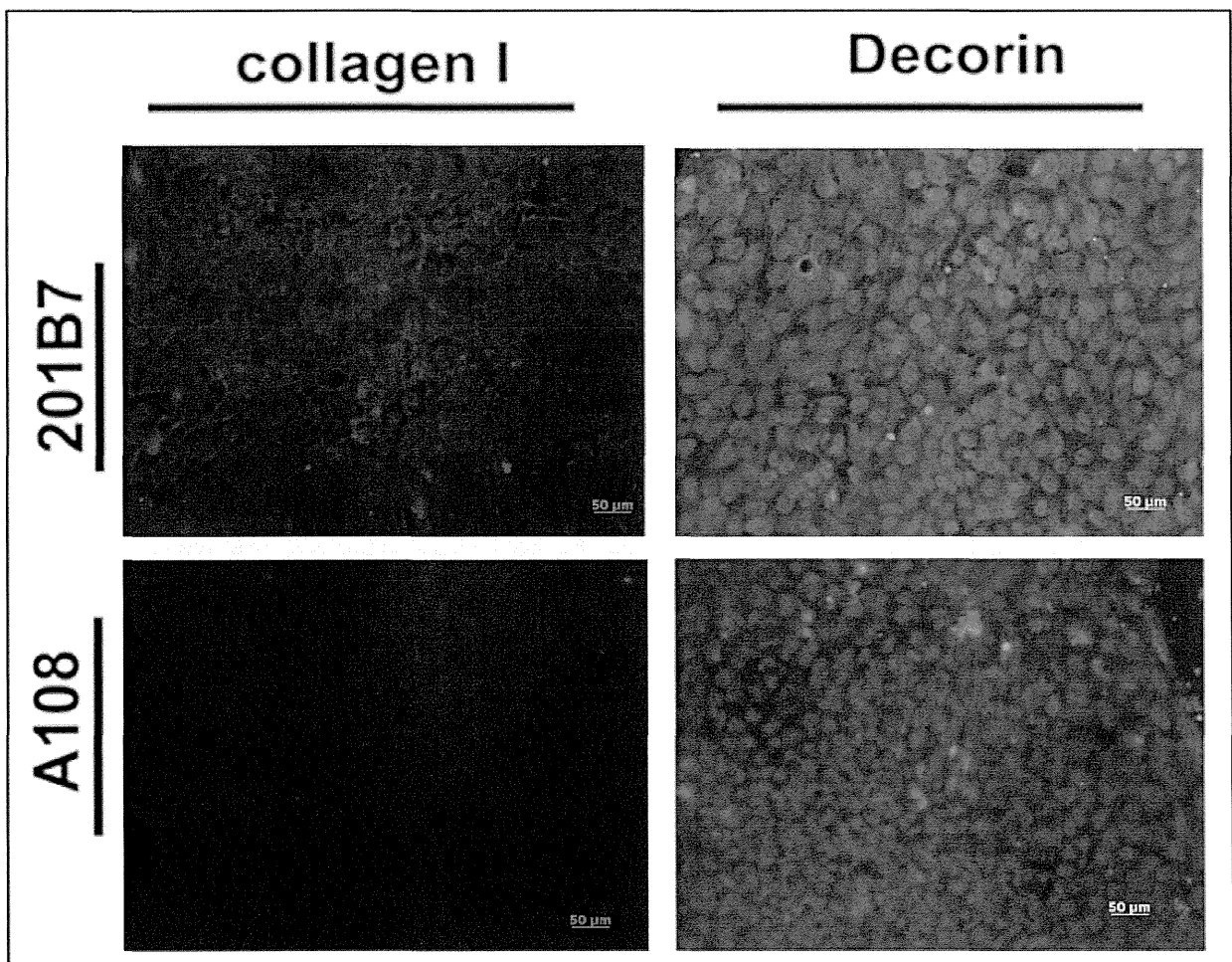
☒ 2



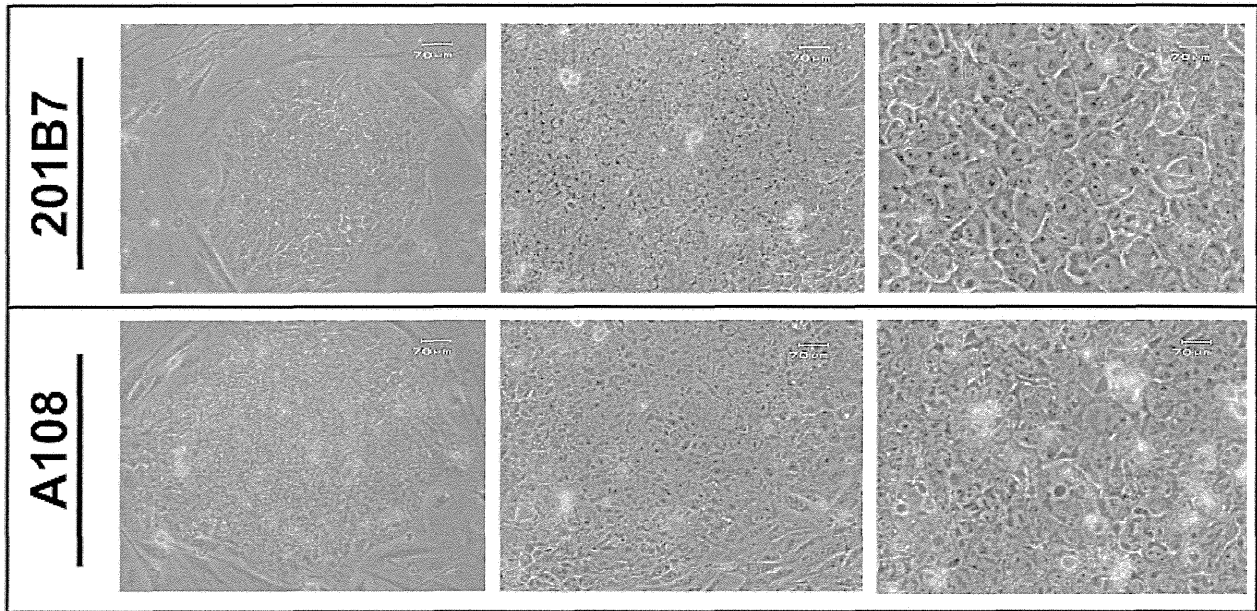
☒ 3



☒ 4



☒ 5



☒ 6

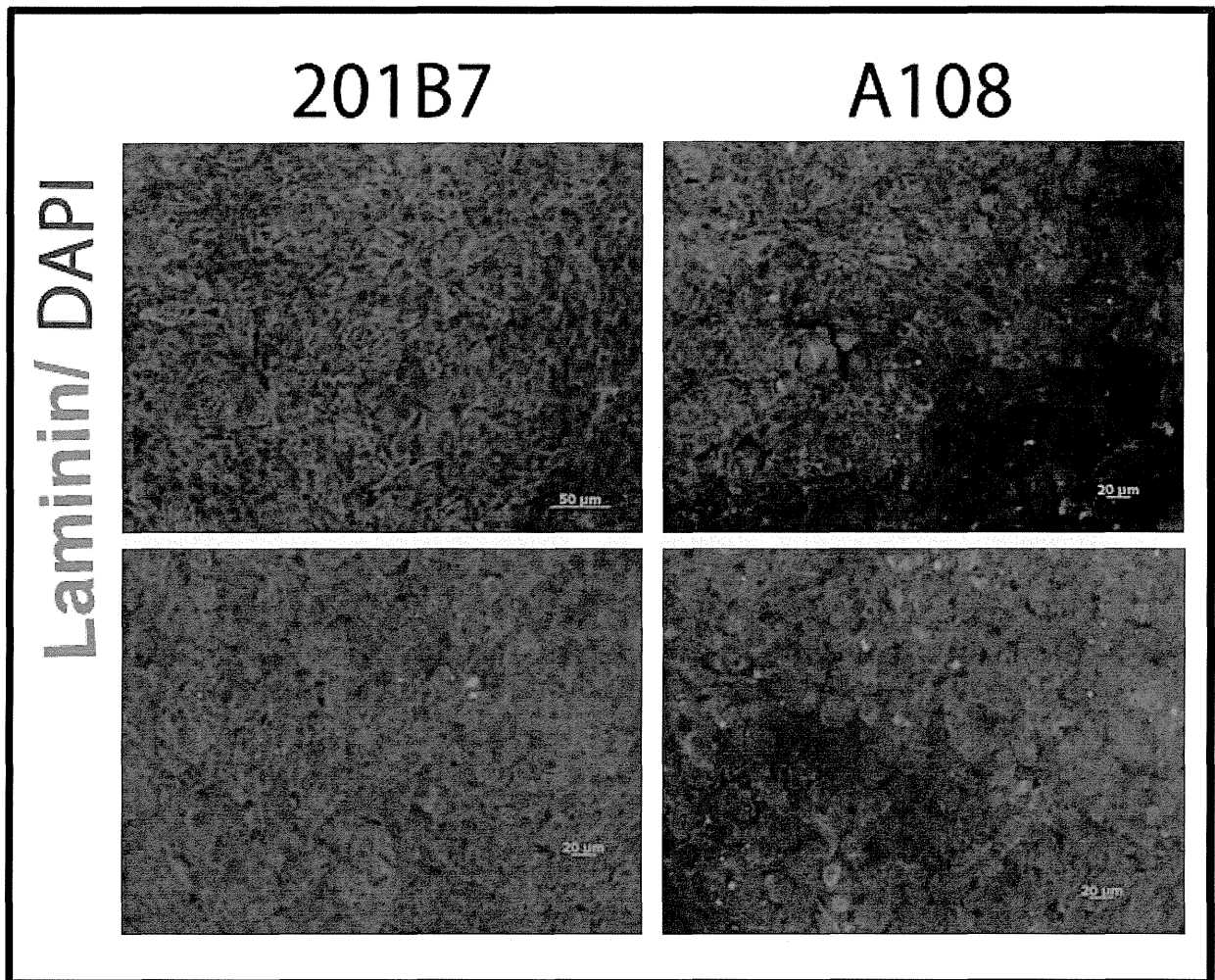


图 7

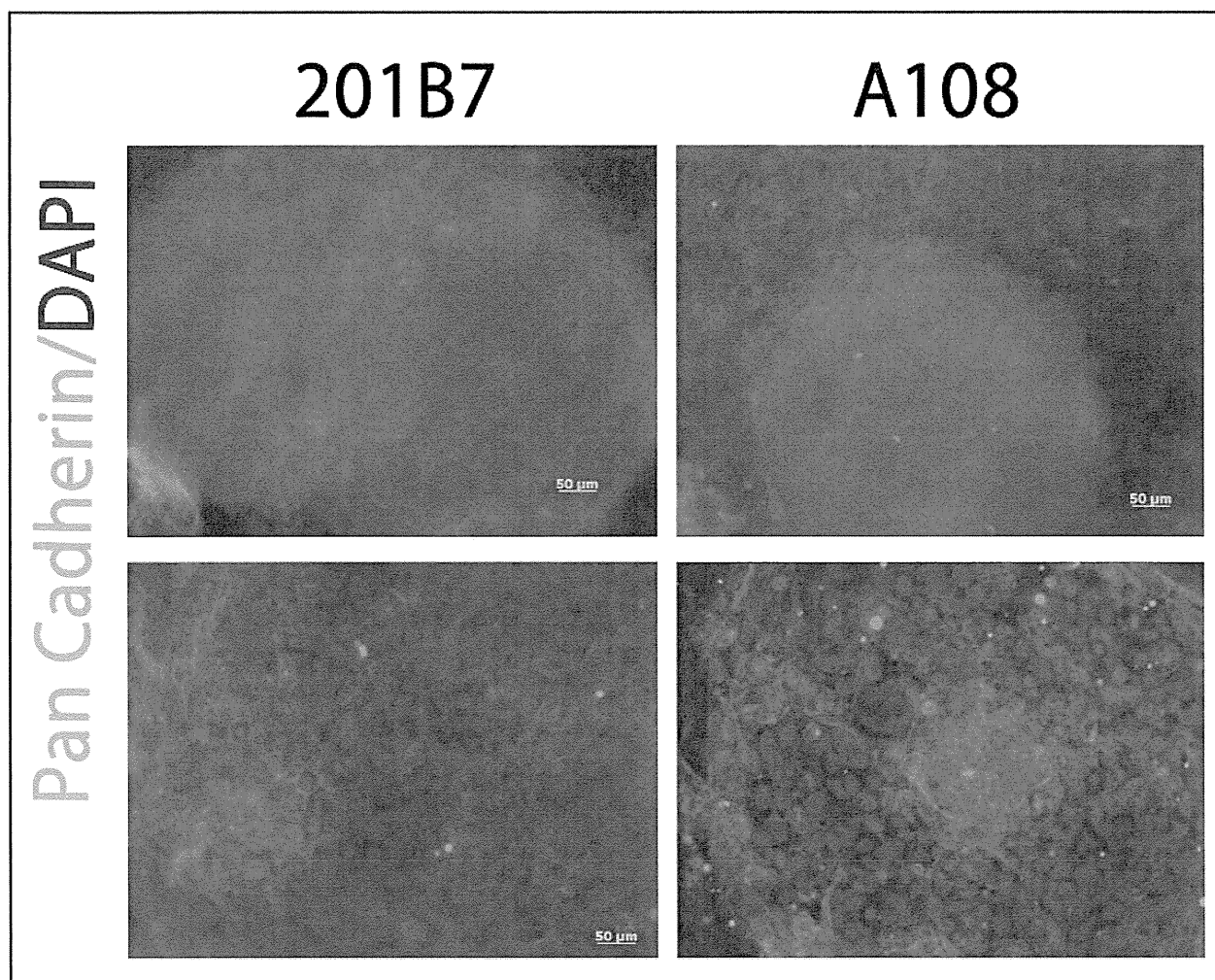
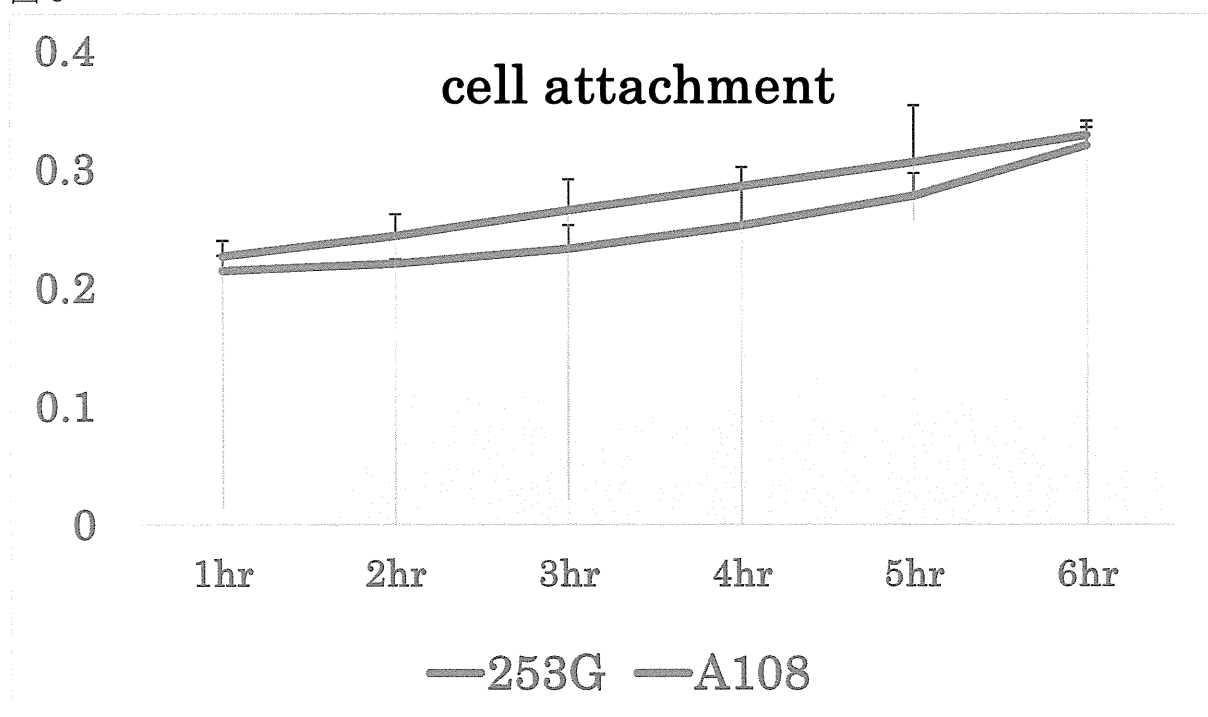
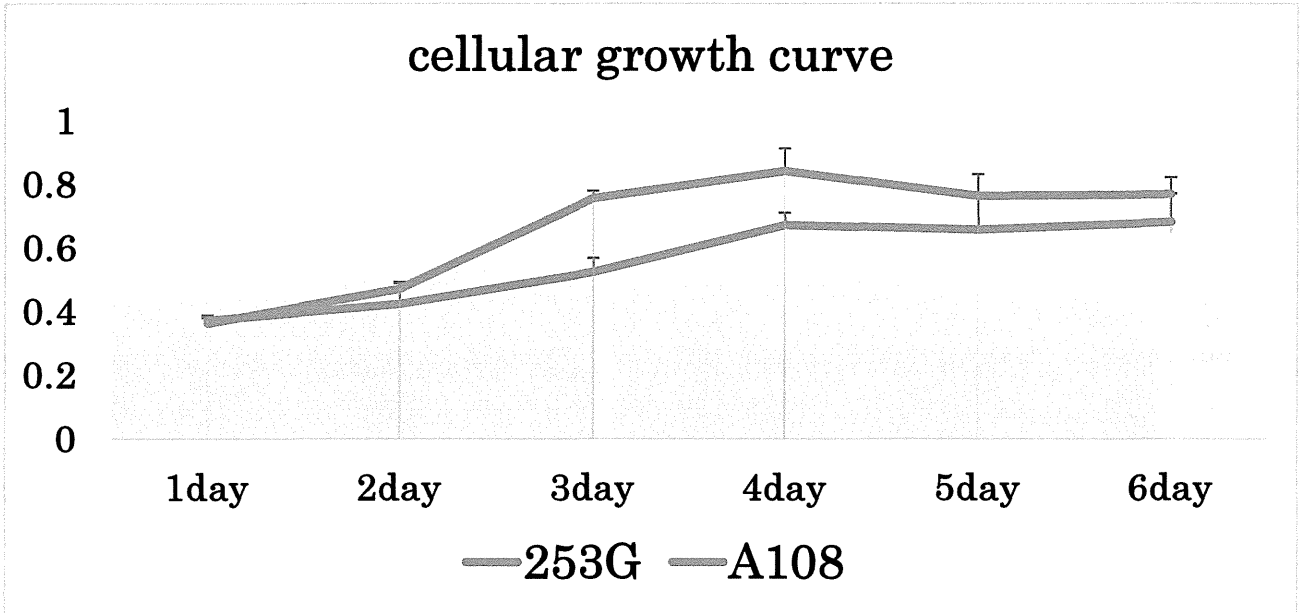


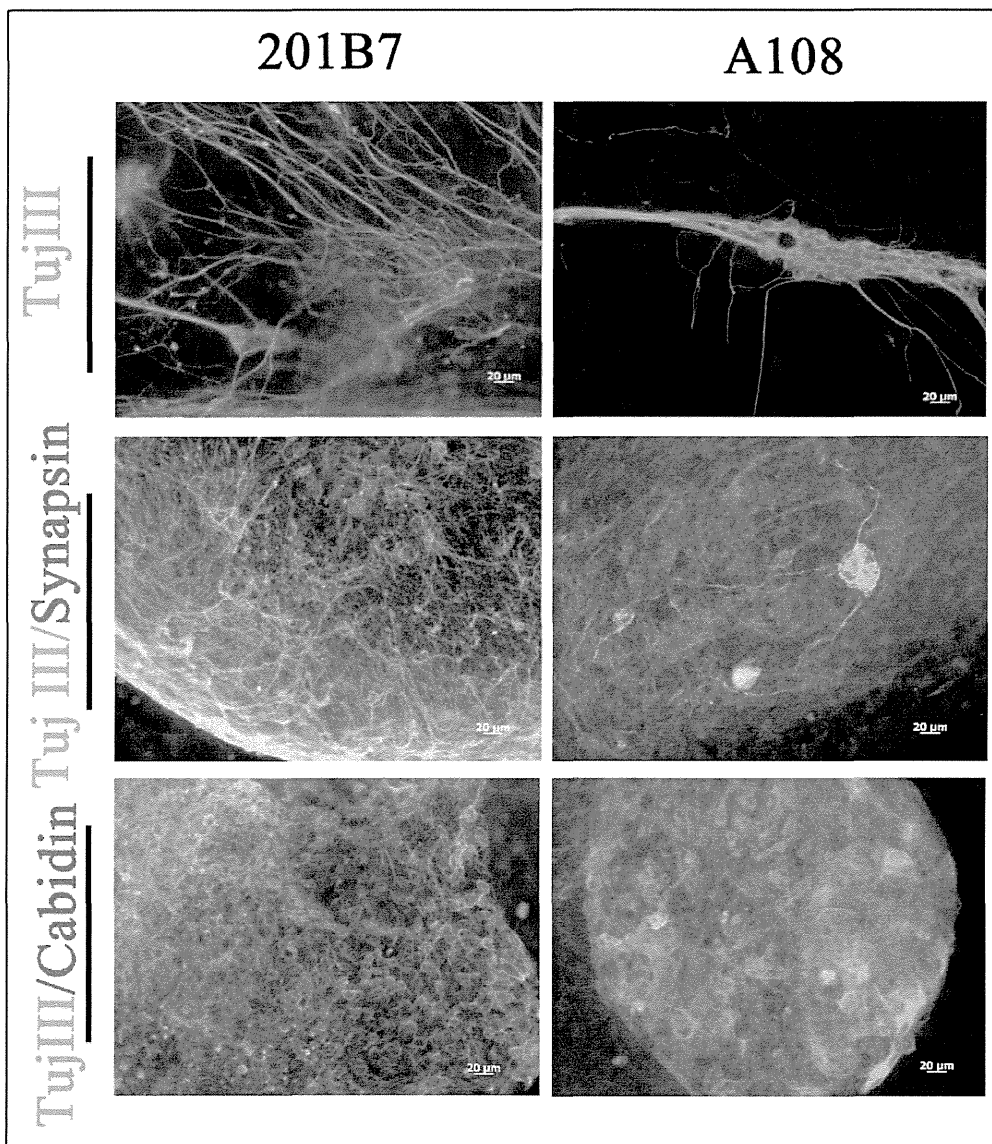
图 8



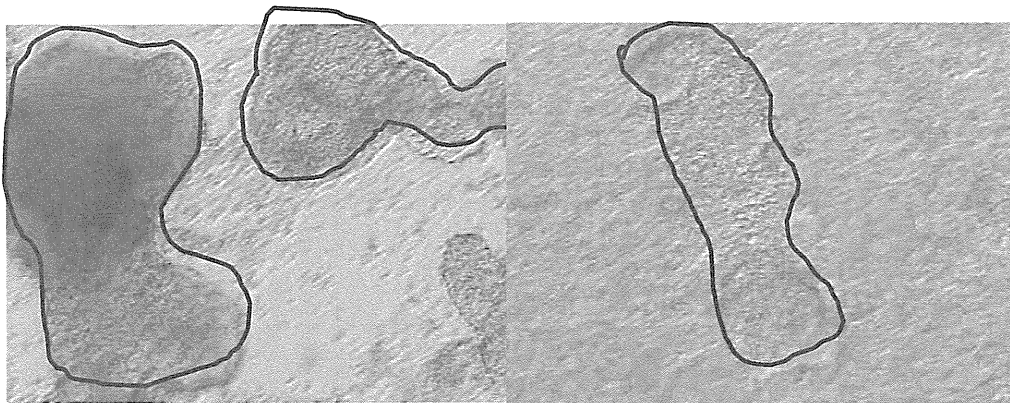
☒ 9



☒ 10



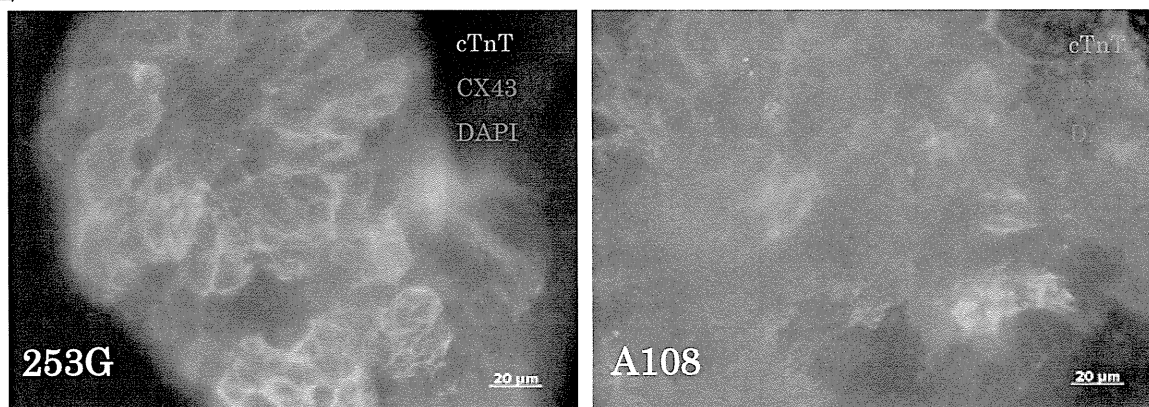
☒ 11



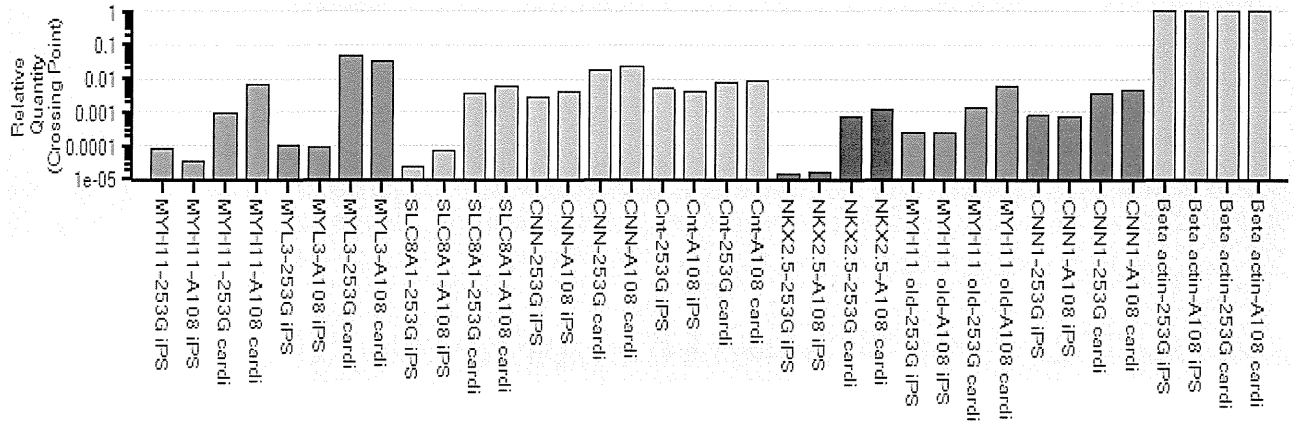
☒ 12



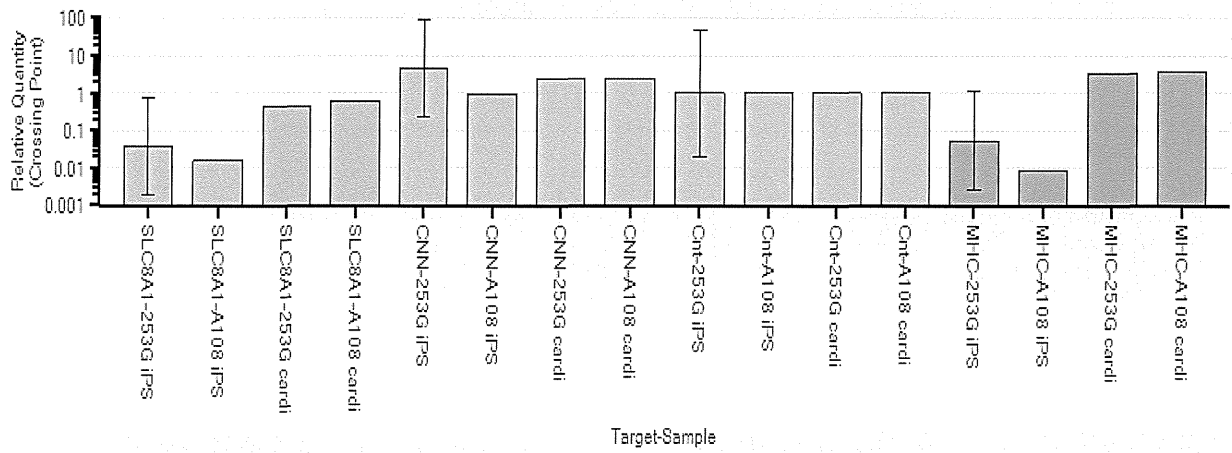
☒ 13



14



15



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 欠損型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 のモデルマウスの作出および表現型解析

研究分担者 岡田 尚巳¹、野村 義宏²、武田 伸一¹

研究協力者 坂 翔太^{1,3}、積田 奈々^{1,4}、笠原 優子¹

- 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: これまでに DDEDS に対する有効な治療法は確立されておらず、新たな治療法の開発が望まれている。本研究では、*Chst14*^{-/-}マウスの詳細な表現型を解析し、治療研究のモデル動物としての有用性を検討し、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた遺伝子治療研究の準備を行った。はじめに、C57BL/6J 系統への遺伝的背景の均一化を行った *Chst14*^{-/-}マウスの作出を進めてきたが、C57BL/6J への置換率が高くなる程 *Chst14*^{-/-}マウスの出生率が低下したため、129/C57BL/6J ハイブリッドマウスの繁殖・維持を行い、以下の解析に用いた。*Chst14*^{-/-}マウスは、尿や皮膚中のデルマタン硫酸の顕著な減少が認められ、D4ST-1 酵素活性を欠失していることが示唆された。*Chst14*^{-/-}マウスは野生型マウスと比べて低体重、強い後彎、顔貌の左右非対称を認めた。*Chst14*^{-/-}マウスは、病理組織解析や張力解析において皮膚や筋組織の脆弱化が示唆された。衰弱した高齢 *Chst14*^{-/-}マウスにおいては、自発行動量の低下、骨格筋病理所見による機能低下が認められた。以上の結果から、*Chst14*^{-/-}マウスは DDEDS 患者で認められるような全身性の結合組織の脆弱性を示唆する表現型を示しており、治療実験に用いるモデル動物としての有用性が示唆された。また、酵素活性を示す D4ST-1 発現 AAV ベクターの大量調製に成功し、モデル動物を用いた治療実験の準備が整った。

A. 研究目的

デルマタン 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* 遺伝子変異のため、この遺伝子がコードする D4ST-1 の酵素活性が失われていることが原因で、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。これまでに、*Chst14* 遺伝子欠損マウスの報告があるものの、治療研究に必要な病態の知見は十分ではなかった。また、DDEDS 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手段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。そこで我々は、安全性が高く、導入遺伝子の長期発現が可能なアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた遺伝子治療に着目した。

本課題においては、*Chst14*^{-/-}マウスの表現型を詳細に解析することで、今後の治療研究におけるモデル動物としての有用性を検討した。さらに、このマウスを用いて、D4ST-1 発現 AAV ベクターによる遺伝子治

療実験の有用性や安全性、生体での発現を検討することを目的とした。

B. 研究方法

① *Chst14*^{-/-}マウスの復元および系統維持

Chst14^{-/-}マウスの遺伝的背景を均一化するため C57BL/6J 系統との交配を行った。マウス尻尾から抽出したゲノム DNA に対し、58 種類のマイクロサテライトマーカーを標的として PCR 解析を行い、増幅産物のサイズを区別することにより C57BL/6J 系統への置換率を評価した。

遺伝的背景の均一化による出生率への影響を検討するため、*Chst14*^{+/-}マウス雌雄を交配させ、各遺伝子型の出生率を世代ごとに算出した。また、胎生致死かどうかを検討するため、妊娠 14.5 日目のマウスを解剖し、胎児の遺伝子型を PCR により解析した。

② *Chst14*^{-/-}マウスの表現型解析

・形態観察

Chst14^{+/-}マウスの雌雄を交配させて作出した *Chst14*^{-/-}マウスの経時的な体重測定、CT 画像解析による骨格ならびに形態の観察を行った。

・病理組織学的解析

15 週齢および 55 週齢マウスを解剖後、前脛骨筋の凍結切片を作製した。これを用いて、H&E 染色および免疫染色を行った。抗ラミニン抗体を用いて筋線維基底膜の免疫染色を行い、その断面積を測定した。抗 Myosin heavy chain-Ia, IIa, IIb 抗体を用いて免疫染色し、筋線維タイプの割合を産出した。

・皮膚の機能解析

結合組織の機能評価として、コラーゲン膜などの物性を測定する引張試験機（島津製作所, EZ-S 500N）を用いてマウス皮膚の引張強度を測定した。マウス背部皮膚を物理的に除去し、4 cm×1 cm に裁断して解析

に用いた。皮膚片の両端を固定して縦方向に引っ張り、皮膚が切断する直前の張力を引張強度とした。

・行動解析

行動評価としてホイールケージを用いて自発行動量解析を行った。マウスをホイールケージ内で飼育し、1 週間の予備飼育後、1 日あたりの自発走行距離および最高走行速度を測定した。

・握力測定

齋藤式マウス用握力測定装置を用いて解析を行った。尾部をつかみ両手足で金網をつかませ、前肢が金網の端に到達するまで引っ張り、機械に内蔵されたバネに対する抵抗値を測定することでマウスの金網を握る力の最大値を測定した。測定は 5 秒間のインターバルをはさみながら 5 回行い、平均を各個体の値とした。

・CT 撮像

イソフルラン麻酔下でマウスの骨格を CT（島津製作所、Clairvivo CT）で撮影した。撮影条件は Clairvivo CT 専用ソフトウェア（島津製作所）で設定を行った。撮影後は Oxirix ソフトウェアで画像解析を行い、角度を算出し、後彎の評価を行った。

③ 治療遺伝子発現 AAV ベクターの作製

ヒト *CHST14* およびマウス *Chst14* cDNA を組み込んだ AAV ベクタープラスミド DNA を構築し、HEK293 細胞に遺伝子導入後、抗 D4ST-1 抗体を用いたウエスタンブロッティングおよび酵素活性測定を行って、D4ST-1 の機能発現を確認した。このベクタープラスミドを用いて、ヒトおよびマウス D4ST-1 発現 1 型 AAV ベクターを作製した (rAAV1-CAG-hD4ST1-WPRE, および rAAV1-CAG-mD4ST1-WPRE)。細胞内でのベクターによる D4ST-1 機能発現は、マウス胎児由来線維芽細胞（野生型、*Chst14*^{+/-}および *Chst14*^{-/-}各 1 株）およびヒト皮膚由来線維芽細胞に遺伝子

導入して確認した。

C. 研究結果

① *Chst14*^{-/-}マウスの復元および系統維持

C57BL/6J 系統への遺伝的背景の均一化を行うため、C57BL/6J との交配を 4 世代進めて、常染色体の 98.3% および性染色体が C57BL/6J 系統へ置換されたマウスが得られた。しかしながら、この世代の *Chst14*^{+/-} マウスから *Chst14*^{-/-} マウスの産出は得られなかった(図 1)。出生率低下の原因として胎生致死の可能性を検討するため、胎児のジェノタイピングを行ったところ、胎生 14.5 日目に *Chst14*^{-/-} マウスは 28.6% の割合で存在したため、出生前に死に至ることが示唆された。そこで、129/C57BL/6J ハイブリッド(C57BL/6J への置換率 40-65%) の *Chst14*^{-/-} マウスの繁殖・維持を行い、解析に用いた。

② *Chst14*^{-/-}マウスの表現型解析

Chst14^{-/-}マウスの尿および皮膚において、デルマトン硫酸の顕著な減少、コンドロイチン硫酸の蓄積が確認され、*Chst14*^{-/-}マウスにおける D4ST-1 酵素活性が失われていることが示唆された。

Chst14^{-/-}マウスは野生型マウスに比べ、幼若期から成長期にかけて低体重であり、発育不良が示唆された(図 2)。また、DDEDS 患者で認められる様に、このマウスにおいても顔貌の左右非対称を認めた(図 3)。DDEDS に特徴的な顕著な関節拘縮は、*Chst14*^{-/-}マウスの外見上の観察および CT 撮像においては認められなかったものの、高齢 *Chst14*^{-/-}マウス (55 週齢) では、強い後彎を示す個体が CT 撮像にて確認された(図 4)。

皮膚病理組織学的解析では、若年期 *Chst14*^{-/-}マウス (15 週齢雄) においてもデコリン陽性線維の分布が疎であり、コラー

ゲン線維形成不全が認められた。また、*Chst14*^{-/-}マウス (15 および 55 週齢) は、皮膚の引張強度が低下していた(図 5)。

次に、ホームケージ内の自発行動量を測定したところ、高齢 *Chst14*^{-/-}マウス (雌) において行動量の低下(図 6)、および走行速度の減少が認められた(図 7)。本解析における行動量は、情動および筋機能の影響を受けることが考えられる。そこで我々はまず、一部のエーラスダンロス患者で骨格筋萎縮の報告 (Voermans N.C. *et al.*, *Am. J. Med. Genet. A.*, 2012) があることから、筋機能評価を行った。

幼少期から経時的に握力を測定した結果、*Chst14*^{-/-}マウスでは常に野生型や *Chst14*^{+/-}マウスと比較して弱い傾向にあった(図 8)。また、衰弱した高齢 *Chst14*^{-/-}マウスでは、間質の広がりとともに筋線維の大小不同が認められ(図 9)、前脛骨筋における筋線維断面積は野生型マウスに比べ、平均値が約 2 分の 1 に減少していた(図 10)。さらに、遅筋線維の割合が野生型マウスに比べ、10 倍以上増加していた(図 11)。なお、これらの異常所見は若年 *Chst14*^{-/-}マウス (15 週齢雄) では認められなかった。

③ 治療遺伝子発現 AAV ベクターの作製

ヒトおよびマウス D4ST-1 発現 AAV ベクターを大量調製し、各々 1.7×10^{14} v.g. および 1.8×10^{13} v.g. を回収することができた。このベクターを用いて遺伝子導入を行った細胞抽出液において、D4ST-1 活性の増加が認められた。

D. 考察

C57BL/6J 系統への遺伝的背景の均一化を試みたが、置換率増加とともに *Chst14*^{-/-}マウスの出生率が低下した。*Chst14* と同様に神経発生に関わる遺伝子である神経接着分子 L1 のノックアウトマウスにおいても C57BL/6J の遺伝的背景を持つ場合に重症化を

示すという報告 (Guseva, D. *et al.*, *Brain : a journal of neurology*, 2009) があることから、*Chst14*^{-/-}マウスにおいても、C57BL/6J 系統に置換されることにより、出生前後で死亡率が高くなると考えられた (Akyuz, N. *et al.*, *Glycobiology*, 2012)。そのため、C57BL/6J 系統への置換率の低い *Chst14*^{-/-}マウスを繁殖維持し、研究を遂行することとした。

Chst14^{-/-}マウスでは発育不良、特徴的な顔貌を示し、高齢個体では強い後彎が認められた。さらに、皮膚および筋組織においては、病理所見および引張強度の低下や握力低下を示した。これらの表現型より、デルマトン硫酸の欠損によるコラーゲン線維束形成不全が原因とする、組織の脆弱化が示唆された。

また、握力低下は一般的には筋力低下を裏付けるものであるが、DDEDS 患者では重度の関節拘縮が認められるため、*Chst14*^{-/-}マウスにおいては関節の異常形成などの関与も考えられる。本解析においては、*Chst14*^{-/-}マウスにおける顕著な関節拘縮は認められず、マウスとヒトでの骨格形成の違いが示唆されたが、今後は骨密度など詳細な解析も必要であると考えられた。

Chst14^{-/-}マウスの産出数が低く、解析例が少ないため、引き続き解析を行う必要があるが、本課題において明らかとなった表現型は患者の病態に近いことから、治療研究の評価項目となる可能性が示唆された。

今年度作製した D4ST-1 発現 AAV ベクターによる D4ST-1 の強制発現と機能が確認できたため、次年度からの治療研究における有効性の評価が期待される。

E. 結論

1. *Chst14*^{-/-}マウスの遺伝的背景を C57BL/6J 系統へ均一化すると、出生率が著しく低下し、繁殖が困難であったため、129/C57BL/6J ハイブリッドマウスの繁殖維持が必要であ

った。

2. *Chst14*^{-/-}マウスは、発育不良、特徴的な顔貌、デルマトン硫酸の顕著な減少、皮膚の脆弱化、筋機能低下など DDEDS 患者の病態に近い表現型を示した。

3. 衰弱した高齢 *Chst14*^{-/-}マウスにおいては、自発運動量の低下、骨格筋における間質の広がりおよび筋線維の細径化、遅筋化を伴う筋力低下といった筋機能障害が認められた。

4. 高力価の D4ST-1 発現 AAV ベクターが作製できたため、マウスを用いた治療実験の準備が整った。

次年度では、さらに情動解析、易出血性の評価および骨格形成異常の解析を加え、治療項目をより明確にした上で、AAV ベクターを用いたマウスでの治療研究を開始する予定である。

F. 研究発表

① 論文発表

Okada H, Ishibashi H, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Baba Y, Watanabe S, Takeda S, and Okada T. Robust long-term transduction of common marmoset neuromuscular tissue with rAAV1 and rAAV9. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2:e95, 2013.

Kanagawa M, Yu C, Ito C, Fukada S, Hozoji-Inada M, Chiyo T, Kuga A, Matsuo M, Sato K, Yamaguchi M, Ito T, Katanosaka Y, Miyagoe-Suzuki Y, Naruse K, Kobayashi K, Okada T, Takeda S, and Toda T. Impaired viability of muscle precursor cells in muscular dystrophy with glycosylation defects and amelioration of its severe phenotype by limited gene expression. *Human Molecular Genetics*, 22(15):3003-15, 2013.

Nakamura, A., Kobayashi, M., Kuraoka, M., Yuasa, K., Yugeta, N., Okada, T. and Takeda, S. Initial pulmonary respiration causes massive diaphragm damage and hyper-CKemia in Duchenne muscular dystrophy dog. *Sci Rep.*, 3:2183., 10.1038/srep02183, 2013.

Ishibashi H, Motohashi HH, Kumon M, Yamamoto K, Okada H, Okada T, Seki K. Efficient embryo transfer in the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) with a reduced transfer volume: a non-surgical approach with cryo-preserved late-stage embryos. *Biology of Reproduction*, 88(5):115, 2013.

Ishibashi H, Motohashi HH, Kumon M, Yamamoto K, Okada H, Okada T, Seki K. Ultrasound-guided non-surgical embryo collection in the common marmoset. *Reproductive Biology*, 13(2):139-44, 201, 2013.

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, pp429-440, 2013.

Okada T, Takeda S. Current challenges and future directions in recombinant AAV-mediated gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Pharmaceuticals* 6(7), 813-836, 2013.

Kasahara Y, Takeda S, Okada T. Cell therapeutic approaches using multipotent mesenchymal stromal cells for muscular dystrophy. *Inflammation and Regeneration*. In press.

Kawada C, Hasegawa T, Watanabe M, and Nomura Y. Dietary Glucosylceramide Enhances Tight Junction Function in Skin Epidermis via Induction of Claudin-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 867-869, 2013.

Tsuda Y, Nomura Y. Direct observation of hair components involved in formation of permanent waves. *Seni gakkaiishi*, 69, 65-72, 2013.

Tsuda Y, Nomura Y. Properties of alkaline-hydrolyzed waterfowl feather keratin. *Animal Science J.*, In press.

Okabe M, Kitagawa K, Yoshida T, Suguki T,

Waki H, Koike C, Furuichi E, Katou K, Nomura Y, Uji Y, Hayashi A, Saito S and Nikaido T. Hyperdry human amniotic membrane (HD-AM) is useful material for tissue engineering: Morphological, physical properties and safety as the new biological material. *J. Bio. Mat. Res.*, Part A, In press.

Hara M, Fujii T, Hashizume R, and Nomura Y. Effect of strain on human dermal fibroblasts in a three-dimensional collagen sponge, *Cytotechnology*. In press.

Uehara K, Hara M, Matsuo T, Namiki G, Watanabe M, and Nomura Y. Hyaluronic acid secretion by synoviocytes alters under cyclic compressive load in contracted collagen gels. *Cytotechnology*. In press.

Hara M, Nakashima M, Fujii T, Uehara K, Yokono C, Hashizume R, and Nomura Y. Construction of collagen gel scaffold is for mechanical stress analysis, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, In press.

Uehara K, Takahashi A, Watanabe M, and Nomura Y. Shark protein improves bone mineral density in ovariectomized rats and inhibits osteoclast differentiation, *Nutrition*, In press.

Murata M, Satoh T, Wakabayashi H, Yamauchi K, Abe F, and Nomura Y. Oral administration of bovine lactoferrin attenuates UVB-induced skin photodamage in hairless mice, *Journal of Dairy Science*, In press.

②知的財産権の出願・登録状況

岡田尚巳、笠原優子、武田伸一「移植用幹細胞及びその製造方法」特願 2013-108408、平成 25 年 5 月 22 日出願

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、PCT/JP2013/059470、平成 25 年 3 月 29 日出願(PCT)

野村義宏、北浦敏彦 「熱可塑性樹脂」特許 5305320, 特許権者：農工大ティー・エル・オー(株), 登録日：平成 25 年 7 月 5 日

③学会発表

【国外】

Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Okada H, Okada T, and Takeda S. Engraftment of mesenchymal stromal cells that can differentiate to form myogenic cells is enhanced by expressing IL-10 in dog with Duchenne muscular dystrophy. American society of gene & cell therapy 16th Annual meeting, Salt lake city, USA, 5.16, 2013

Okada H, Ishibashi H, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Takeda S. Effective transduction of common marmoset with rAAV1 and 9 to generate NHP model of muscular dystrophy. American society of gene & cell therapy 16th Annual meeting, Salt lake city, USA, 5.16, 2013

Hayashita-Kinoh H, Okada H, Nitahara-Kasahara Y, Chiyo T, Yugeta N, Okada T, Takeda S. Immune tolerance induction in canine X-linked muscular dystrophy with trans-placental rAAV9-microdystrophin transduction. American society of gene & cell therapy 16th Annual meeting, Salt lake city, USA, 5.18, 2013

K. Uehara, A. Takahashi, M. Watanabe, and Y. Nomura. Shark (*Prionace glauca*) protein improves bone mineral density in ovariectomized rats and inhibits osteoclast differentiation. 10th Asian Fisheries and Aquaculture Forum, Yeosu, Korea, 4.30, 2013

Kawada C, Watanabe W, Kurihara H, Furuki S, Kimura M, Kanemitsu T, Kunou M, Nomura Y. Oral administration of hyaluronic acid improves the skin condition in UV-irradiated hairless mice. Jun. 2013, ヒアルロン酸国際学会

【国内】

坂翔太、笠原優子、積田奈々、野村義宏、武田伸一、岡田尚巳、他、「デルマタン 4-O-硫酸基転移酵素 1 欠損型エーラスダンロス症候群モデルマウスの病態解析」

日本生化学会 2013 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜

Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Okada H, Okada T, and Takeda S. Anti-inflammatory therapeutic approach using multipotent mesenchymal stromal cells for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. Japan Society of Gene Therapy 19th Annual meeting, Okayama, 7. 4, 2013

Okada H, Ishibashi H, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Takeda S. Generation of muscular dystrophy NHP model with rAAV1 and 9-mediated transduction of common marmoset. Japan Society of Gene Therapy 19th Annual meeting, Okayama, 7. 4, 2013

Hayashita-Kinoh H, Okada H, Nitahara-Kasahara Y, Chiyo T, Yugeta N, Okada T, Takeda S. Immune tolerance induction by transplacental transmission of rAAV-microdystrophin in canine X-lined muscular dystrophy. Japan Society of Gene Therapy 19th Annual meeting, Okayama, 7. 4, 2013

笠原(仁田原)優子、喜納(早下)裕美、千代智子、岡田 浩典、岡田 尚巳、武田 伸一、

「骨髄間質細胞を用いた筋ジストロフィーに対する細胞移植治療法の基盤研究」

第34回日本炎症・再生医学会年会 2013年7月3日 京都

喜納 裕美、笠原 優子、弓削田 直子、千代 智子、増田 千明、岡田 尚巳、武田 伸一、「AAVベクターを用いたDMDに対する遺伝子治療と免疫寛容誘導」

第8回 筋ジストロフィー治療研究合同発表会 2013年11月3日 兵庫

野村義宏、膠の温故知新」

膠文化研究会 第3回公開研究会 2013年6月23日 東京芸術大学

野村義宏、「食材（特に動物性の）の未利用資源の有効利用」

食材細胞推進シンポジウム 2013年9月6日 東京都中小企業 秋葉原庁舎

野村義宏、「サメの丸ごと活用による東日本大震災からの復興支援 ～気仙沼での取り組み～」

食品膜・分離技術研究会 第25回秋季研究例会 2013年11月8日 川口総合文化センター リリア

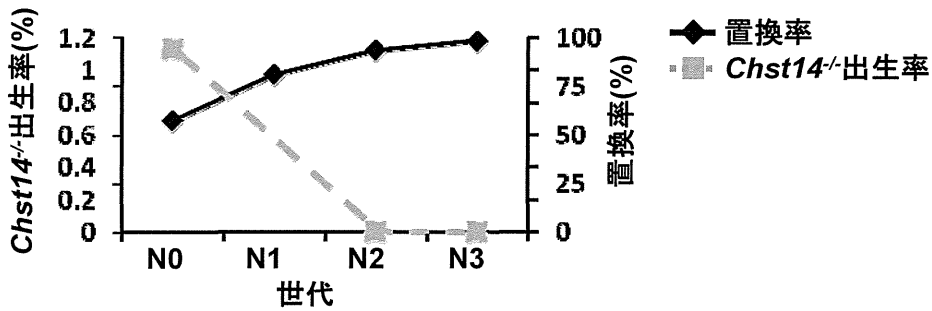


図1. C57BL/6Jへの置換率と出生率

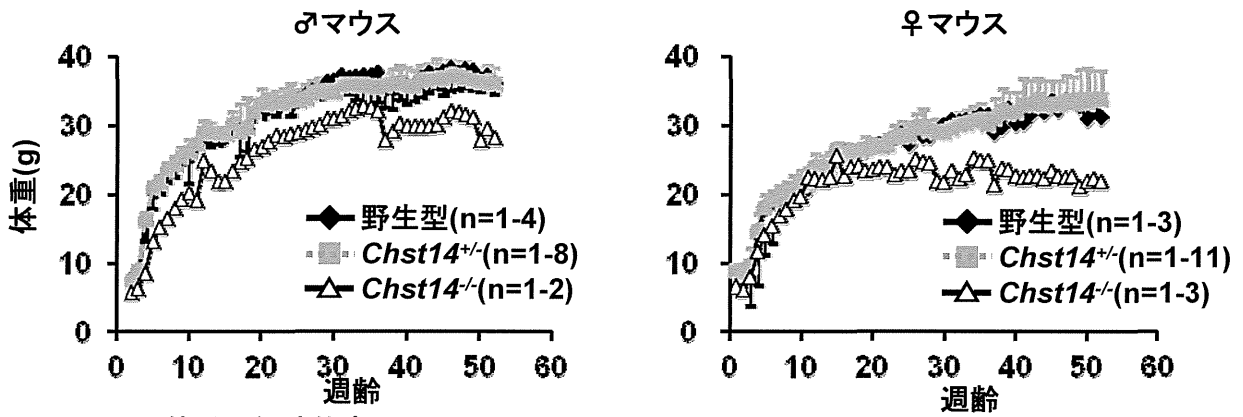


図2. 体重の経時的変化

野生型(11ヶ月) Chst14^{+/-}(11ヶ月)



眼間線及び鼻先から眼間線に下した垂線 鼻先から眼間の中心点を通る線

図3. 顔貌の左右非対称

野生型(11ヶ月齢) Chst14^{-/-}(11ヶ月齢)

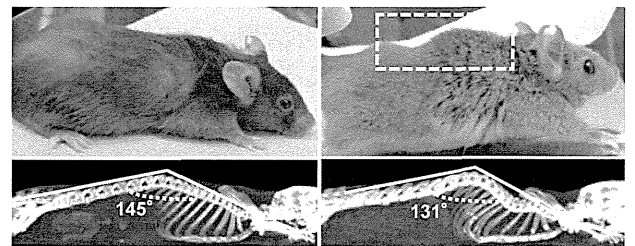


図4. 強い後彎

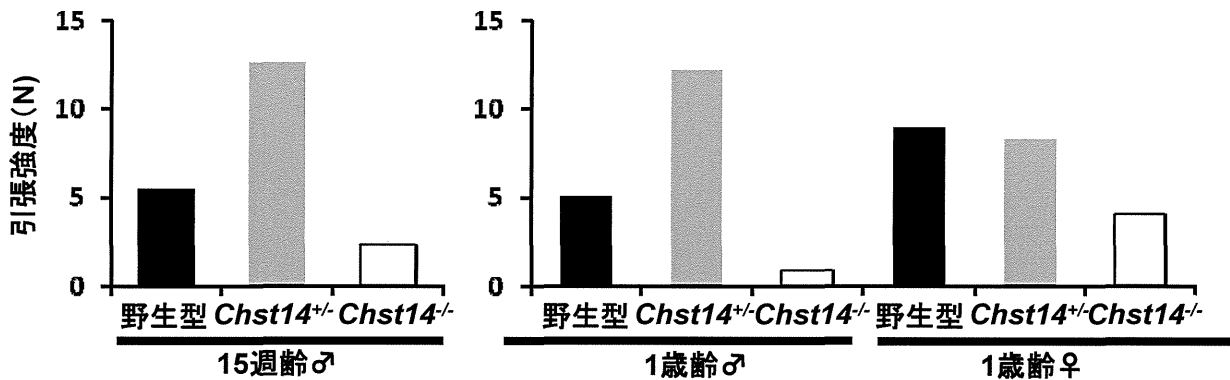


図5. 皮膚引張強度の低下