

**A Response to: Loss of Dermatan-4-sulfotransferase 1 (D4ST1/CHST14) Function Represents the First Dermatan Sulfate Biosynthesis Defect, "Dermatan Sulfate-Deficient Adducted Thumb-Clubfoot Syndrome". Which Name is Appropriate, "Adducted Thumb-Clubfoot Syndrome" or "Ehlers-Danlos Syndrome"?**

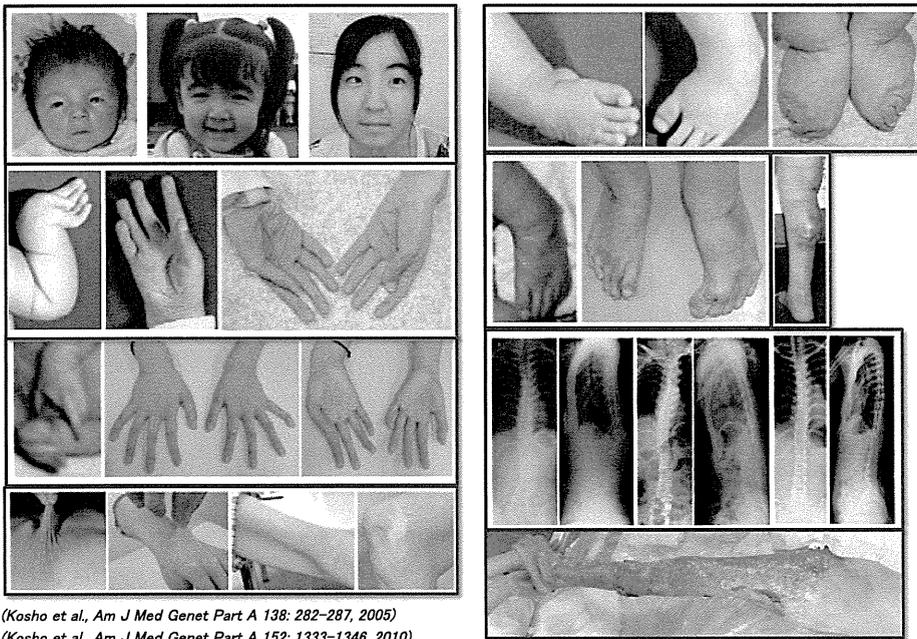
have been found to cause EDS [Mao and Bristow, 2001]. In a revised nosology, EDS was classified into six major types [Reighton et al., 1998] and several other forms have also been identified based on the molecular and biochemical abnormalities [Abu et al., 2008; Giunta et al., 2008; Keese et al., 1987; Schalkwijk et al., 2001; Schwarze et al., 2004].

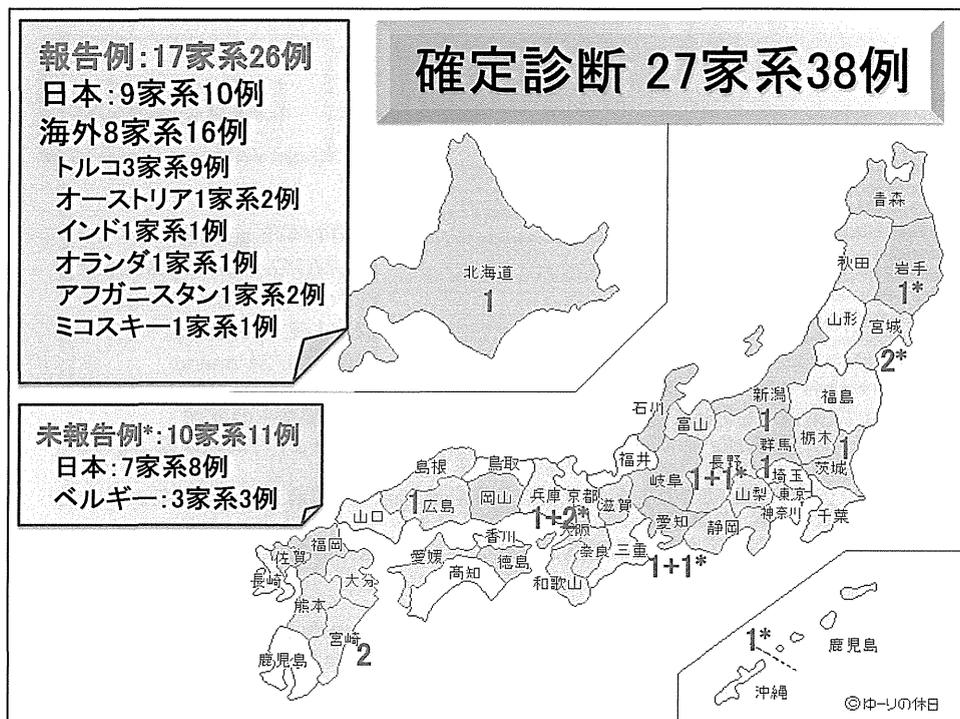
Homozygous or compound heterozygous *CHST14* mutations have been found in 11 patients aged 0 day to 6 years at the initial publication (from four families) with ATCS [Dündar et al., 1997; 2001, 2009; Janeske et al., 2001; Sonoda and Kosano, 2006], in six patients aged 2–32 years (from six families) with EDSKT [Kosho et al., 2005, 2010; Miyake et al., 2010; Yama et al., 2003], and in three patients aged 12–22 years (from two families) with MCEDS [Malfait et al., 2010]. Lack of detailed clinical information from later childhood to adulthood in ATCS and lack of detailed clinical information from birth to early childhood in EDSKT and MCEDS have made it difficult to determine whether the three conditions would be distinct clinical entities or a single clinical entity with variable expressions

2011/4/9 submit  
*AJMG*のonline publicationを  
 待ってRevision submit  
 2011/8/3 accept  
 2011/8/24 online

- 生きた臨床情報を握っており、これまでの全例をまとめた立場からの反論  
 – *Kosho T, Miyake N, Mizumoto S, Hatamochi A, Fukushima Y, Yamada S, Sugahara K, Matsumoto N. Hum Mutat [Early View]*
- D4ST-1欠損症は、EDSの主要症状である皮膚過伸展性、関節過可動性、および皮膚・靭帯・関節・血管・内臓など組織脆弱性を全て有する
- 先天性多発関節拘縮など通常EDSでは見られない症状があることはEDSを否定することにならない
- 健康管理上もEDSの診断が妥当
- 病因論的にも、デコリンを介したコラーゲン細線維のassembly不全が示された
- ATCSは患者発見上は助かる名称であるので、"D4ST1-Deficient EDS (Adducted Thumb-Clubfoot Syndrome)"との暫定診断名を提唱

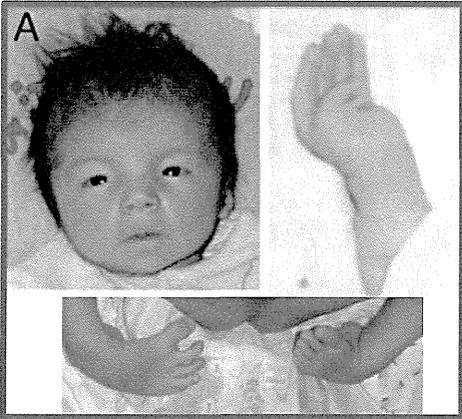
## 多彩な臨床症状





## 診断基準

- 新生児期、以下の症状により本症を疑い、*CHST14*遺伝子解析により確定
  - 顔貌上の特徴
    - 大きい大泉門
    - 眼間開離
    - 眼瞼裂小さく、斜下
    - 青色強膜
    - 短い鼻、低形成の鼻柱
    - 低位かつ後傾した耳介
    - 高口蓋
    - 長い人柱
    - 薄い上口唇
    - 小さい口
    - 小さく後退した下顎
  - 骨格症状
    - 内転母指
    - 内反足



(Shimizu et al., Am J Med Genet Part A 155: 1949–1958, 2011)  
 (古庄.信州医学誌 59: 305–319, 2011)  
 (古庄.内分泌・糖尿病・代謝内科 34: 210–220, 2012)  
 (古庄.病理と臨床, 2013)

## 健康管理指針1

- 診断時:スクリーニングとして、先天性心疾患、眼奇形、泌尿生殖器奇形、難聴の有無を評価
- 乳幼児期:
  - 内反足に対する整形外科的治療(装具、手術)
  - 運動発達遅滞に対する理学療法
  - 便秘に対して緩下剤投与、浣腸
  - 男児では停留精巣に対する固定術
- その後の定期検診:
  - 整形外科(足部変形、脊椎変形)、眼科(斜視、屈折異常、緑内障)、耳鼻科(滲出性中耳炎、難聴)、泌尿器科(排尿障害、膀胱拡張)、循環器科(弁の異常[MVPなどあれば、感染性心内膜炎の予防]、上行大動脈拡張)

(Shimizu et al., Am J Med Genet Part A 155: 1949-1958, 2011)

(古庄.信州医学誌 59: 305-319, 2011)

(古庄.内分泌・糖尿病・代謝内科 34: 210-220, 2012)

(古庄.病理と臨床, 2013)

## 健康管理指針2

- 外傷対策:
  - 安定した靴、車椅子の利用による転倒予防
  - 巨大皮下血腫の予防として、DDAVP点鼻療法(STIMATE™)を考慮
- 思春期以降:
  - 二次性徴の観察(女性では乳房発育不全、男性では性腺機能低下の可能性)
  - (血)気胸、憩室穿孔に対する治療
  - 皮膚の過敏性のため、採血時のゴム駆血、上腕での血圧測定が著しい苦痛を伴うので、配慮する(幅広いゴムや徒手的駆血、手首式血圧計)

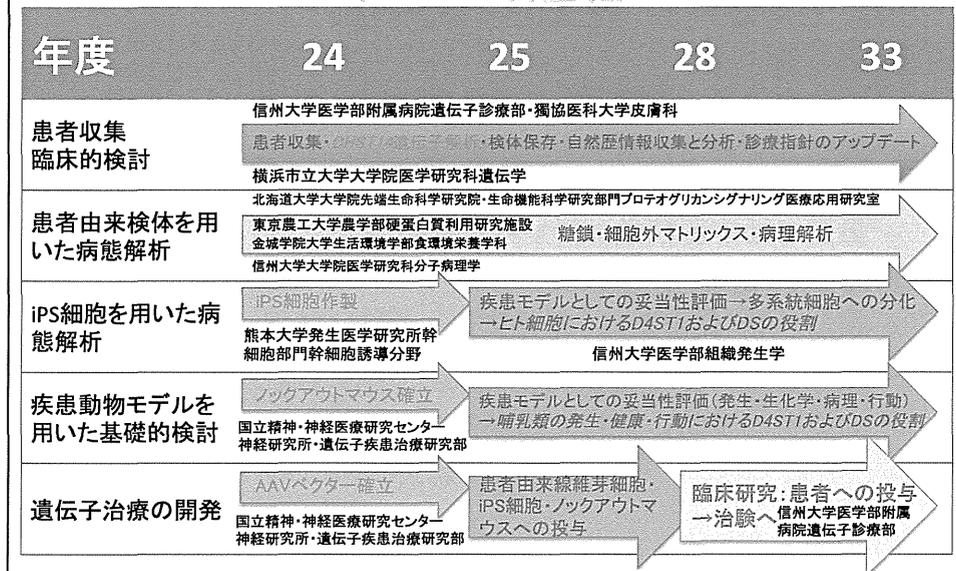
(Shimizu et al., Am J Med Genet Part A 155: 1949-1958, 2011)

(古庄.信州医学誌 59: 305-319, 2011)

(古庄.内分泌・糖尿病・代謝内科 34: 210-220, 2012)

(古庄.病理と臨床, 2013)

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



## 謝辞

- 研究へご協力いただいた患者様、ご家族、検体の提供をいただいた先生方に深謝いたします。
- 以下の支援を受けて行われた。
  - 信州医学振興会医学助成(2005年度)
  - 信州若手萌芽研究支援事業(2007年度)
  - 平成21-23年度厚生労働省難治性疾患克服研究事業「エーラスダンロス症候群(主に血管型および新型)の実態把握および診療指針の確立」(代表者:古庄知己)
  - 平成24-25年度厚生労働省難治性疾患等克服研究事業「デルマタン4-O-硫酸基転移酵素-1欠損に基づくエーラスダンロス症候群の病態解明と治療法の開発」(代表者:古庄知己)

## 謝辞 Collaborators



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室  
武田伸一部長  
岡田尚巳室長  
笠原慶子研究員  
北海道大学大学院先端生命科学研  
究院 生命機能科学研究部門プロテオグ  
リカンシグナリング医療応用研究室  
菅原一幸教授  
水本秀二博士研究員  
東京農工大学硬盤土質利用研究施設  
野村義宏准教授  
坂翔太君  
積田奈々さん  
獨協医科大学皮膚科  
旗持淳教授

横浜国立大学大学院医学研究科遺  
伝学  
松本直通教授  
三宅紀子准教授  
信州大学医学部組織発生学講座  
佐々木克典教授  
岳鳳鳴助教  
金城学院大学生活環境学部食環境  
栄養学科  
小林身哉教授  
信州大学大学院医学研究科分子病  
理学  
中山淳教授  
熊本大学発生医学研究所・幹細胞  
誘導分野  
江良拓実教授

信州大学医学部附属病院  
整形外科  
加藤博之教授  
高橋淳講師  
形成外科  
松尾清教授  
杠俊介准教授  
矢野志春助教  
遺伝子診療部  
福岡義光教授  
関島良樹准教授  
浦井敬子講師

# デルマタン4-O-硫酸基転移酵素1 (D4ST1)欠損によるEhlers-Danlos症候群 (DDEDS)の疾患モデルの構築と検証

○古庄知己<sup>1,2)</sup> 岳鳳鳴<sup>3)</sup> 坂翔太<sup>2,4)</sup> 積田奈々<sup>2,4)</sup> 笠原優子<sup>2)</sup>  
岡田尚巳<sup>2)</sup> 水本秀二<sup>5)</sup> 小林身哉<sup>6)</sup> 中山淳<sup>7)</sup> 三宅紀子<sup>8)</sup>  
野村義宏<sup>4)</sup> 江良沢実<sup>9)</sup> 篁持淳<sup>10)</sup> 石川真澄<sup>1)</sup> 涌井敬子<sup>1)</sup>  
福嶋義光<sup>1)</sup> 松本直通<sup>8)</sup> 菅原一幸<sup>5)</sup> 佐々木克典<sup>3)</sup> 武田伸一<sup>2)</sup>

- 1) 信州大学医学部附属病院・遺伝子診療部
- 2) 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
- 3) 信州大学医学部・組織発生学
- 4) 東京農工大学農学部・硬蛋白質利用研究施設
- 5) 北海道大学大学院先端生命科学研究所・生命科学院・生命情報分子科学コース・細胞膜分子科学分野プロテオグリカンシグナリング医療応用研究室
- 6) 金城学院大学・生活環境学部食環境栄養学科
- 7) 信州大学大学院医学研究科・分子病理学
- 8) 横浜市立大学大学院医学研究科・遺伝学
- 9) 熊本大学発生医学研究所 幹細胞誘導分野
- 10) 獨協医科大学・皮膚科

平成24-25年度難治性疾患等克服研究事業「デルマタン4-O-硫酸基転移酵素-1欠損に基づくエーラスダンロス症候群の病態解明と治療法の開発（H24-難治等（難）一般-073）」（DDEDS/古庄班）

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)

## 日本人類遺伝学会第57回大会 利益相反状態の開示

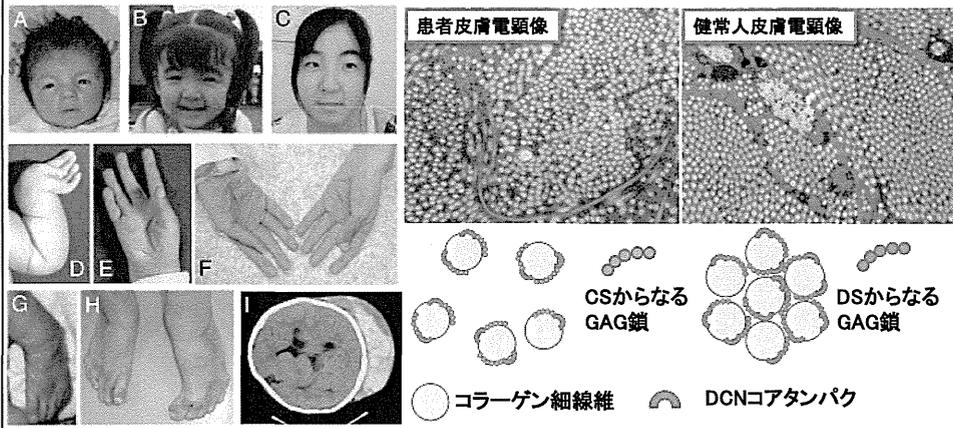
筆頭演者氏名:古庄知己

所属:信州大学医学部附属病院遺伝子診療部

開示すべき利益相反状態はありません。

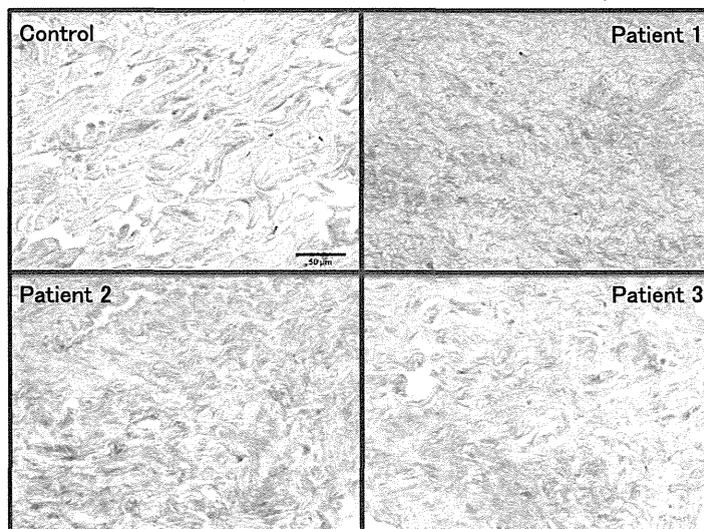
## D4ST1-deficient EDS (DDEDS)

- CHST14遺伝子の機能喪失型変異に基づく常染色体劣性遺伝・結合組織脆弱性疾患 (Adducted Thumb-clubfoot Syndrome [Dündar et al., 2009]; EDS, Koshi Type [Koshi et al., 2010; Miyake et al., 2010]; EDS VIB, Musculocontractural EDS [Malfait et al., 2010])
- CHST14変異→デルマトン4-O-硫酸基転移酵素-1 (D4ST1)欠損→デコリンのグリコサミノグリカン (GAG)鎖がほぼデルマトン硫酸のみ (DS)から全てコンドロイチン硫酸 (CS)に変化 (皮膚線維芽細胞の解析)→デコリン (DCN)が介するコラーゲン細線維のassembly不全→結合組織脆弱性
- 症状 [Koshi et al., 2010; Shimizu et al., 2011; Koshi et al., 2011]
  - 進行性結合組織脆弱性: 皮膚過伸展・脆弱性、全身関節弛緩・慢性脱臼・変形、巨大皮下血腫
  - 発生異常: 顔貌の特徴、先天性多発関節拘縮、内臓・目の先天異常



## デコリン免疫染色

- コントロールでは、コラーゲン線維束に沿って均一に染色
- 患者では、コラーゲン線維束に沿いつつ細かい線維状に染色



(Koshi et al., in preparation)

# 尿中CS/DS組成分析

• DDEDS患者では、DSは尿中に全く検出されなかった

DDEDS患者

	pmol/mg creatinine (mol%)				
	尿#6	尿#7	尿#8	尿#9	尿#10
ΔHexUA-GalNAc	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ΔHexUA-GalNAc(6S)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ΔHexUA-GalNAc(4S)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ΔHexUA(2S)-GalNAc(6S)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ΔHexUA(2S)-GalNAc(4S)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ΔHexUA-GalNAc(4S,6S)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ΔHexUA(2S)-GalNAc(4S,6S)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Total DS disaccharide	—	—	—	—	—

関節型EDS患者

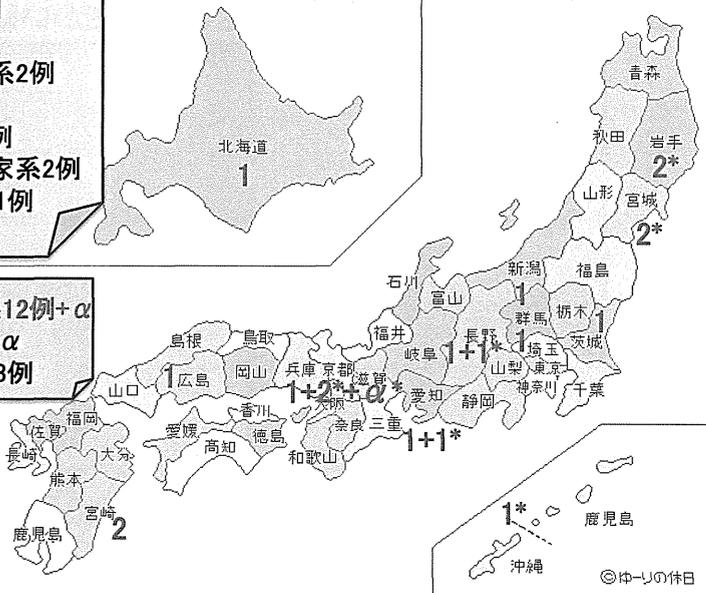
	pmol/mg creatinine (mol%)					平均
	尿#1	尿#2	尿#3	尿#4	尿#5	
ΔHexUA-GalNAc	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	—
ΔHexUA-GalNAc(6S)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	—
ΔHexUA-GalNAc(4S)	1,142 (66.4)	252 (82.8)	838 (79.6)	377 (82.2)	290 (80.8)	580 ± 1758 (82.4 ± 1.2)
ΔHexUA(2S)-GalNAc(6S)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	—
ΔHexUA(2S)-GalNAc(4S)	149 (11.3)	52 (17.2)	162 (15.4)	68 (17.8)	58 (16.2)	98 ± 24 (13.0 ± 1.0)
ΔHexUA-GalNAc(4S,6S)	30 (2.3)	N.D.	52 (5.0)	14 (2.9)	11 (3.0)	21 ± 9 (2.6 ± 0.8)
ΔHexUA(2S)-GalNAc(4S,6S)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	—
Total DS disaccharide	1,321 (100)	304 (100)	1,053 (100)	459 (100)	359 (100)	699 ± 205 (100)

(Mizumoto et al., in preparation)

報告例: 17家系26例  
 日本: 9家系10例  
 海外8家系16例  
 トルコ3家系9例  
 オーストリア1家系2例  
 インド1家系1例  
 オランダ1家系1例  
 アフガニスタン1家系2例  
 ミコスキー1家系1例

確定診断 28家系39例～

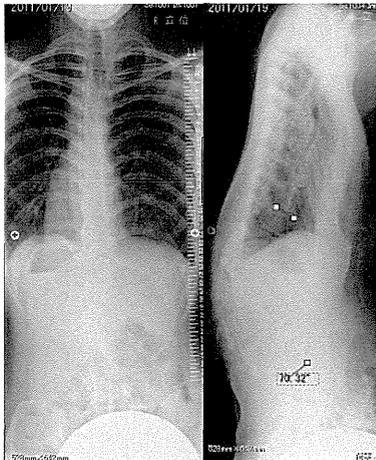
未報告例\*: 11家系12例+α  
 日本: 8家系9例+α  
 ベルギー: 3家系3例



## DDEDS

### 病態解明・治療法開発が急がれる理由

- 進行性結合組織脆弱性→QOLの低下

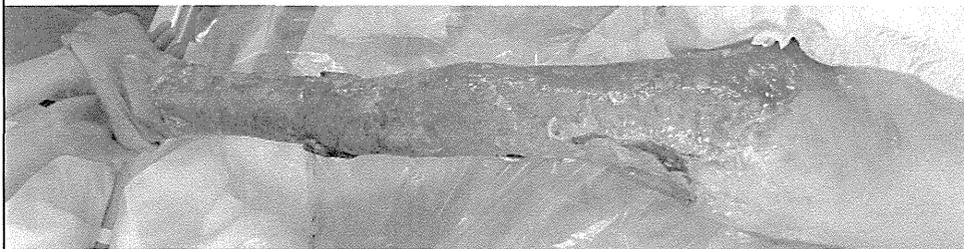


From Dr. Takahashi, Dept. of Orthopedic Surgery,  
Shinshu Univ. School of Med

## DDEDS

### 病態解明・治療法開発が急がれる理由

- 進行性結合組織脆弱性→生命に関わるイベント



交通事故  
↓  
下肢巨大皮下血腫  
↓  
重症広範性皮膚壊死



From Dr. Yano, Dept. of Plastic Surgery,  
Shinshu Univ. School of Med

## 目的

- 根治療法の開発(AAVベクターを用いた遺伝子治療)を視野に入れ、病態を反映する疾患モデルの作成は必須である。
- 今回、ノックアウトマウスを作製、また、患者由来iPS細胞を樹立、疾患モデルとしての妥当性を検証した。

## 対象

### iPS細胞

- 患者(P281L/Y293C)由来培養皮膚線維芽細胞から山中因子(*Oct3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-Myc*)を導入したセンドアイ・ウイルスを用いてiPS細胞を作製(A108)
- 正常iPS細胞は京都大学iPS細胞研究所(CiRA)より供与(201B7)

### ノックアウトマウス

- The Mutant Mouse Regional Resource Center(MMRRC)よりヘテロ(*Chst14*<sup>+/-</sup>)雄マウスの凍結精子を入手(B6; 129S5-*Chst14*<sup>tm1Lex/Mmod</sup> [ID: 031629-UCD]、Lexicon GeneticsよりMMRRCに寄託)
- *Chst14*<sup>+/-</sup>マウスを作成
- *Chst14*<sup>+/-</sup>マウスの交配により*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスを作成

## 方法

### iPS細胞

- iPS細胞の形態観察
- 未分化能の検討
- 多能性の検討
- 神経細胞への分化誘導

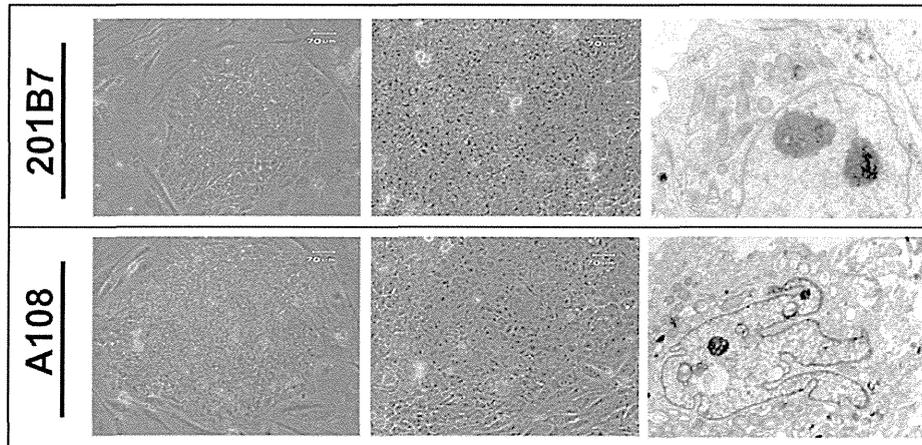
### ノックアウトマウス

- 形態観察
- 成長観察
- 糖鎖医学的解析
- 病理学的解析

## iPS細胞の検討

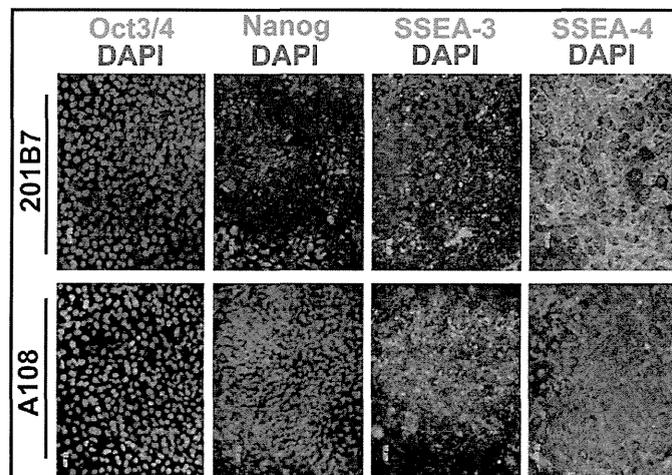
## iPS細胞の形態

- 患者由来iPS細胞の方が小さく、空胞が目立っていた。



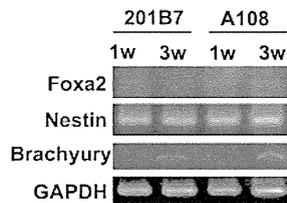
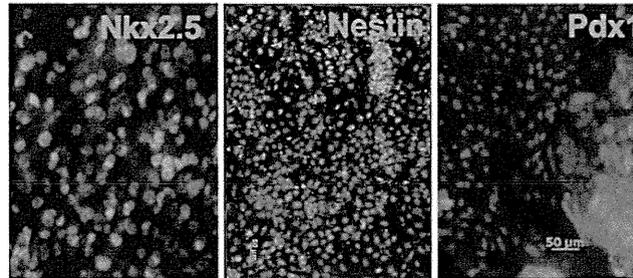
## iPS細胞の未分化能

- 患者由来iPS細胞、健常人由来iPS細胞いずれのコロニーにおいても未分化細胞のマーカー(Oct3/4、Nanog、SSEA-3、SSEA-4)は高発現だった。



## iPS細胞の多能能: *in vitro*

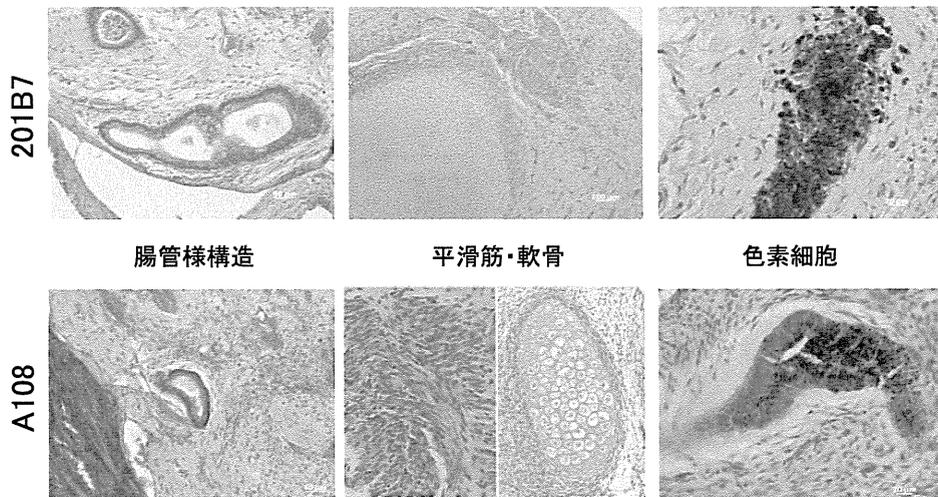
- いずれのiPS細胞から形成される胚様細胞塊においても、内胚葉マーカー (Foxa2、Pdx1)、外胚葉マーカー (Nestin)、中胚葉マーカー (Nkx2.5、Brachyury) は同様に発現していた。



内胚葉マーカー: Foxa2、Pdx1  
 外胚葉マーカー: Nestin  
 中胚葉マーカー: Nkx2.5、Brachyury

## iPS細胞の多能能: *in vivo*

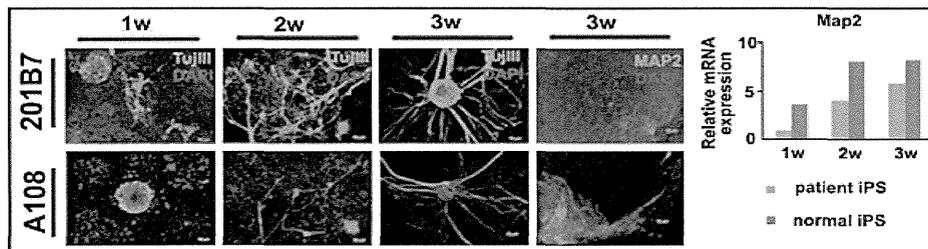
- いずれのiPS細胞によっても、ヌードマウスへの移植後4週間で同様に、3胚葉を有する奇形腫が生じた。





## 神経細胞への分化2

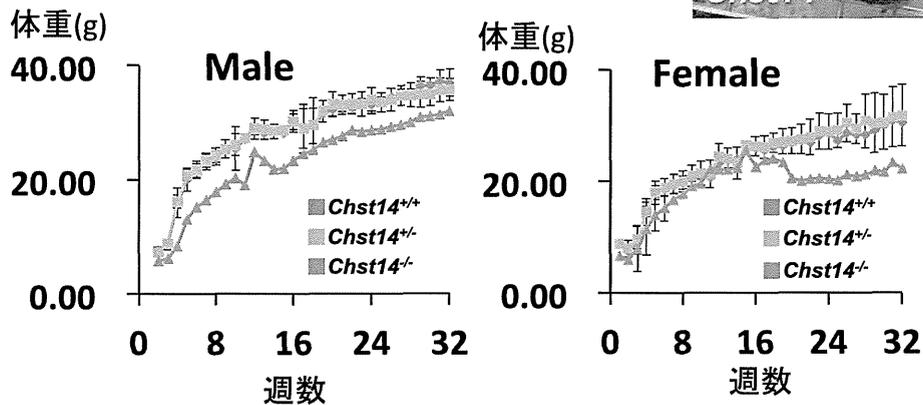
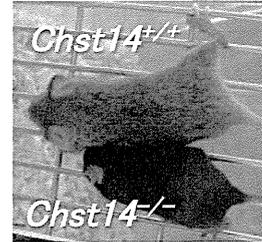
- 神経細胞への分化状態を示すTujiⅢおよびMAP2の発現を免疫染色およびReal-time PCRで検討、患者由来iPS細胞を分化誘導した細胞では、健常人由来iPS細胞を分化誘導した細胞に比べて弱かった。



## ノックアウトマウスの検討

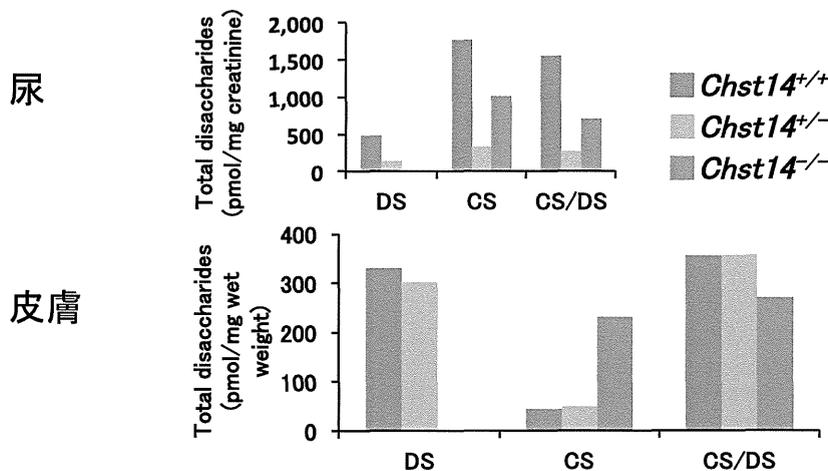
## 形態および成長

- 先天性多発関節拘縮、明らかな皮膚・関節など結合組織脆弱性を示唆する症状なし。
- 出生後の成長はホモマウス ( $Chst14^{-/-}$ ) の方がヘテロマウス ( $Chst14^{+/-}$ )、野生型マウス ( $Chst14^{+/+}$ ) より小柄であった。



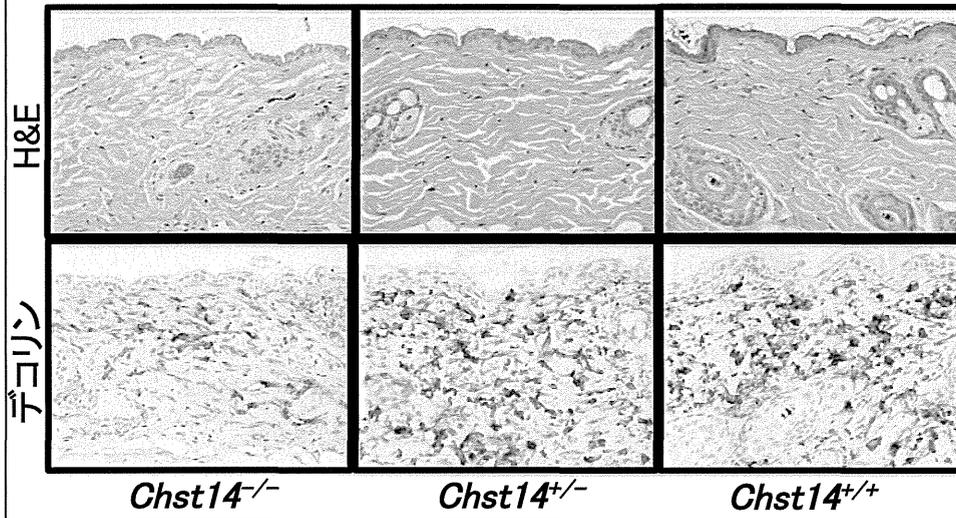
## 糖鎖医学的解析

- ホモマウス ( $Chst14^{-/-}$ ) では、尿においても皮膚においても、DSが完全に喪失していた。



## 病理学的解析

- ホモマウス ( $Chst14^{-/-}$ ) では、デコリン染色性は減弱していた。



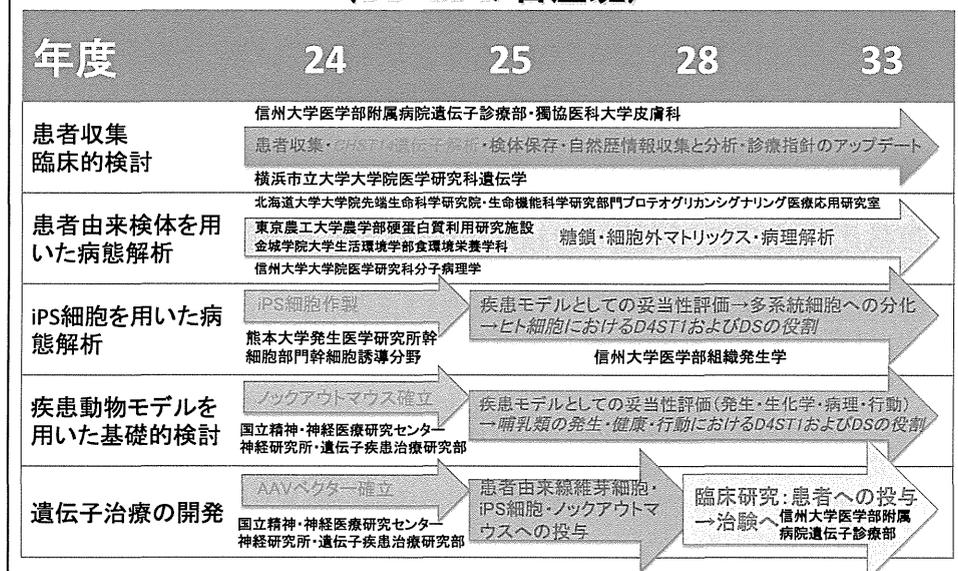
## 考察1: iPS細胞

- 患者由来iPS細胞は、適切な未分化能および多能性を有していた。
- 患者由来iPS細胞より生じた奇形腫では、デコリンの染色性が減弱していたことから、DDEDSの病態を反映していることが示された。
- 本iPS細胞は、DDEDSの疾患モデルとして妥当であることが示唆された。
- 複数患者由来iPS細胞での検証が必要である(現在2患者からのiPS細胞を樹立中)。
- 神経細胞への分化が十分に進まないようであるが、このことがノックアウトマウスの所見、患者の神経学的表現型とどのように関係づけられるか?
  - ノックアウトマウスでは、ニューロン新生、神経幹細胞の増殖が低下するとの報告もあれば [Bian et al., 2011]、神経発生への影響は少ないとの報告もある [Akyüz et al., 2013]。
  - 患者においては、必ずしも知的障害を含めた顕著な神経学的異常が認められない。

## 考察2: ノックアウトマウス

- 今回作出したノックアウトマウスは、皮膚においても尿中においてもDSが欠乏していたこと、かつ、皮膚のデコリン染色性が減弱していたことから、患者の糖鎖医学的異常を再現していた。
- 本ノックアウトマウスは、DDEDSの疾患モデルとして妥当であることが示唆された。
- DDEDSの主要症状である、進行性結合組織脆弱性、発生異常が明らかでない。
- サンプル数を増やし、表現型に関するより詳細な検討が必要である。
  - 多系統臓器におけるマクロ、ミクロの異常の有無
  - 多系統臓器における加齢に伴う異常の有無
  - 行動・情動面の異常の有無

## 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 (DD-EDS/古庄班)



## 謝辞

- 各施設での研究を支えて下さった全てのスタッフの方々に深謝いたします。
- 以下の支援を受けて行われた。
  - 平成21-23年度厚生労働省難治性疾患克服研究事業「エーラスダンロス症候群(主に血管型および新型)の実態把握および診療指針の確立」(代表者:古庄知己)
  - 平成24-25年度厚生労働省難治性疾患等克服研究事業「デルマタン4-O-硫酸基転移酵素-1欠損に基づくエーラスダンロス症候群の病態解明と治療法の開発」(代表者:古庄知己)

#### IV. 研究成果の刊行に関する一覧表