

Construction of the expression vectors of the wild-type DSE and the p.S268L mutant protein

The expression vector of the full-length open reading frame encoding human DSE (wild-type) was amplified by PCR using the specific primers (5'-GGG GTA CCG CCA CGA TGA GGA CT-3' and 5'-GGA CTA GTA CAC TGT GAT TGG GA-3'), pBluescriptR/human DSE (IMAGE clone #5272885, Open Biosystems, Huntsville, AL, USA) as a template, and KOD-Plus DNA polymerase (Toyobo, Tokyo, Japan) described previously with a slight modification (15). The amplified fragments were digested with *KpnI* and *SpeI*, and subcloned into of pEF6/V5-His-B (Invitrogen). The resultant expression vector, pEF6/hDSE (wild-type)-V5-His, was digested with *KpnI* and *PmeI*, and the cDNA fragments containing the open reading frame of DSE were inserted into the expression vector, pEBMulti-Neo (Wako, Osaka, Japan).

In addition, the expression vector containing a soluble form of DSE was also constructed as described previously (14). Briefly, a truncated form of DSE (wild-type), lacking the first 31 amino- and 58 carboxy-terminal amino acids, respectively, of the DSE, was amplified by PCR using a 5'-primer containing *ClaI* site (5'-CCA TCG ATA ATG ATT CCC TTC ACC-3') and a 3'-primer containing a *KpnI* site (5'-GGG GTA CCG AAT AGG AAG CAG ACA G-3') and pBluescriptR/human DSE as a template. The resultant DNA fragments were inserted into p3xFLAG-CMV13 (Sigma).

The vector of the mutant protein, S268L, was constructed according to the manufacturer's instructions using the Quick-Change II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) and the primers (5'-AGC TAC ACC ACT AGA TTA CTC TTC CAA TAC ATG-3' and 5'-CAT GTA TTG GAA GAG TAA TCT AGT GGT GTA GCT-3'), in which the underlined nucleotides indicate the point mutations.

Expression and western blotting of the recombinant enzymes

The expression plasmids (3 µg) were transiently transfected into COS-7 cells (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, Osaka, Japan) in a culture dish (100 mm in diameter) using 10 µl of FuGENE™ HD transfection reagent (Promega). After 3 days, the cells transfected with pEBMulti/hDSE-V5 were lysed with 200 µl of 25 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES)-NaOH, pH 5.5, containing 10 mM MnCl₂ and 0.25% NP-40.

On the other hand, after 3 days the culture medium (2 ml) from COS-7 cells transfected with p3xFLAG-CMV13/hDSE-FLAG was incubated with 15 µl of anti-FLAG affinity agarose resin (Wako) at 4°C overnight, the enzyme-bound affinity resin was washed with 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 150 mM NaCl and 0.05% Tween-20, and subjected to sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Western blotting was carried out using the horseradish peroxidase-conjugated anti-FLAG monoclonal antibody and the ImmunoStar LD detection Kit (Wako). The signals of the chemi-luminescence were detected by LAS-4000mini (Fuji-Film, Tokyo, Japan).

Determination of the DSE activity

DSE activity was assayed by the method described previously (14,15,45) with a modification summarized in Supplementary Material, Figure S3. Briefly, the enzyme-bound anti-FLAG resin (15 µl) or cell lysate (20 µl) as an enzyme source, partially desulfated DS (9 nmoles as disaccharides), which was prepared previously (21), as the acceptor substrate were mixed in a final volume of 30 µl of 25 mM MES-NaOH, pH 5.5, containing 10 mM MnCl₂ and 0.25% NP-40. The assay mixtures were incubated overnight at 37°C. An aliquot of the reaction products were individually incubated with a mixture of chondroitinases AC-I and AC-II (EC 4.2.2.5) (Seikagaku Biobusiness, Tokyo, Japan) in a total volume of 20 µl of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 60 mM CH₃COONa at 37°C for 60 min (76). Reactions were terminated by boiling for 5 min. Each digest was labeled with a fluorophore, 2-aminobenzamide (2AB), as described previously (77). Separation and quantification of 2AB-derivatized oligosaccharides were carried out as described previously with a slight modification (77). Briefly, the 2AB-labeled oligosaccharides were subjected to anion-exchange HPLC on an amine-bound silica PA-G column (4.6 × 150 mm, YMC Co., Kyoto, Japan) connected with a guard column, and eluted with 16 mM NaH₂PO₄ for 10 min followed by a linear gradient of NaH₂PO₄ from 16 to 530 mM over 60 min and then eluted with 1 M NaH₂PO₄ for 5 min at a flow rate of 0.5 ml/min at room temperature. The eluates were monitored using an RF-10AXL fluorometric detector (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) with excitation and emission wavelengths of 330 and 420 nm, respectively. Each oligosaccharide was identified by comparison of the retention time of the structure-defined oligosaccharide standards (21). The amount of di- and oligosaccharides in each sample was calculated on the basis of the peak area in the chromatogram. DSE activity as conversion of IdoUA to GlcUA was determined by the total amount of each oligosaccharide yielded by the treatment of the reaction products with chondroitinase AC.

Disaccharide and oligosaccharide composition analysis of CS/DS chains isolated from fibroblasts

After incubation for 2 days, the medium was replaced to serum-free medium for fibroblasts (Cosmobio H001, Tokyo, Japan). The medium was collected after 3 days, concentrated (Amicon Ultra-4 (10k) (Millipore) and a proteinase inhibitor cocktail (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) was added. Fibroblasts cultured for 3 days on 150 mm plates were collected using a scraper (BD Falcon), dried with acetone and GAGs were precipitated with 80% ethanol and sodium acetate as described (76). After being desalted using a centrifugal filter (Amicon Ultra-4; Ultracel-3k, Millipore Corp., Billerica, MA, USA), the samples were treated individually with a mixture of chondroitinases ABC (EC 4.2.2.20) and AC-II (EC 4.2.2.5) (Seikagaku Corp., Tokyo, Japan), a mixture of chondroitinases AC-I (EC 4.2.2.5) and AC-II (Seikagaku Corp.), or chondroitinase B (EC 4.2.2.19) (IBEX Technologies, Montreal, Canada) for analyzing the disaccharide composition of CS/DS, CS or DS, respectively. All three chondroitinases generate unsaturated uronic acid (ΔUA)-containing disaccharides. Chondroitinase AC degrades

CS, chondroitinase B degrades DS and chondroitinase ABC degrade both CS and DS (Supplementary Material, Fig. S4). The digests were labeled with a fluorophore 2-aminobenzamide (2AB) and aliquots of the 2AB-derivatives of CS/DS oligosaccharides were analyzed by anion-exchange HPLC on a PA-03 column (YMC Co., Kyoto, Japan) as previously described (77). The unsaturated CS/DS disaccharides observed in the digests were identified by comparison with the elution positions of authentic 2AB-labeled disaccharide standards. The amounts of di-, tetra-, hexa-, octa- and decasaccharides from chondroitinase B cleavage reactions were separated by gel/filtration chromatography on a Superdex peptide column.

Immunoblotting for decorin

The conditioned media from fibroblast cultures were digested and subjected to SDS-PAGE using a 10–20% SDS polyacrylamide gradient gel. Separated proteins were transferred to a PVDF membrane, and incubated for 2 h at 37°C. Decorin CS/DS proteoglycan from fibroblasts was detected using anti-human decorin antibody (clone 115402; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

WEB RESOURCES

The URLs for data presented herein are as follows:

National Center for Biotechnology Information [NCBI; for data on DSE, CHST14 and their orthologs (RefSeq, Pubmed, OMIM, Gene, Protein)], and a BLAST homology search: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Databases of DNA sequence variants: 1000genomes database (<http://www.1000genomes.org/>), dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) and the NHLBI Exome Sequencing Project (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>).

European Bioinformatics Institute Web site (for ClustalW), <http://www.ebi.ac.uk/index.html>.

PolyPhen-2: prediction of functional effect of human nsSNPs, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>.

The OPAL protein domain and functional annotation analysis tool at Oxford University, <http://www.opf.ox.ac.uk/opal/>.

The UniProtKB protein structure database, <http://www.uniprot.org/uniprot/?Query=reviewed%3Ayes>.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Ms Lyou Sunok, Hokkaido University, for her technical assistance.

Conflict of Interest statement. None declared.

FUNDING

This work was supported by grants from Jubiläumsfonds der Österreichischen Nationalbank (grant no. 14496 to T.M.), the Matching Program for Innovations in Future Drug Discovery

and Medical Care (to K.S.) from The Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan (MEXT); a Grant-in-aid for Young Scientists (B) 23790066 (to S.M.) from the Japan Society for the Promotion of Science, Japan (JSPS); the Drs Hiroshi Irisawa and Aya Irisawa Memorial Research Grant from the Japan Heart Foundation (to S.M.); and a Grant-in-aid for Encouragement from the Akiyama Life Science Foundation (to S.M.).

REFERENCES

- Bishop, J.R., Schuksz, M. and Esko, J.D. (2007) Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature*, **446**, 1030–1037.
- Garcia-Garcia, M.J. and Anderson, K.V. (2003) Essential role of glycosaminoglycans in Fgf signaling during mouse gastrulation. *Cell*, **114**, 727–737.
- Häcker, U., Nybakken, K. and Perrimon, N. (2005) Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 530–541.
- Bülow, H.E. and Hobert, O. (2006) The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **22**, 375–407.
- Taylor, K.R., Rudisill, J.A. and Gallo, R.L. (2005) Structural and sequence motifs in dermatan sulfate for promoting fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and FGF-7 activity. *J. Biol. Chem.*, **280**, 5300–5306.
- Li, F., Shetty, A.K. and Sugahara, K. (2007) Neurotogenic activity of chondroitin/dermatan sulfate hybrid chains of embryonic pig brain and their mimicry from shark liver. Involvement of the pleiotrophin and hepatocyte growth factor signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, **282**, 2956–2966.
- Trowbridge, J.M. and Gallo, R.L. (2002) Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology*, **12**, 117R–125R.
- Sugahara, K., Mikami, T., Uyama, T., Mizuguchi, S., Nomura, K. and Kitagawa, H. (2003) Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 612–620.
- Bao, X., Nishimura, S., Mikami, T., Yamada, S., Itoh, N. and Sugahara, K. (2004) Chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains from embryonic pig brain, which contain a higher proportion of L-iduronic acid than those from adult pig brain, exhibit neurotogenic and growth factor binding activities. *J. Biol. Chem.*, **279**, 9765–9776.
- Mitsunaga, C., Mikami, T., Mizumoto, S., Fukuda, J. and Sugahara, K. (2006) Chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains in the development of cerebellum. Spatiotemporal regulation of the expression of critical disulfated disaccharides by specific sulfotransferases. *J. Biol. Chem.*, **281**, 18942–18952.
- Rosenberg, L.C., Choi, H.U., Tang, L.H., Johnson, T.L., Pal, S., Webber, C., Reiner, A. and Poole, A.R. (1985) Isolation of dermatan sulfate proteoglycans from mature bovine articular cartilages. *J. Biol. Chem.*, **260**, 6304–6313.
- Purushothaman, A., Sugahara, K. and Faissner, A. (2012) Chondroitin sulfate 'wobble motifs' modulate maintenance and differentiation of neural stem cells and their progeny. *J. Biol. Chem.*, **287**, 2935–2942.
- Sugahara, K. and Kitagawa, H. (2000) Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 518–527.
- Pacheco, B., Malmström, A. and Maccarana, M. (2009) Two dermatan sulfate epimerases form iduronic acid domains in dermatan sulfate. *J. Biol. Chem.*, **284**, 9788–9795.
- Maccarana, M., Olander, B., Malmström, J., Tiedemann, K., Aebersold, R., Lindahl, U., Li, J.P. and Malmström, A. (2006) Biosynthesis of dermatan sulfate: chondroitin-glucuronate C5-epimerase is identical to SART2. *J. Biol. Chem.*, **281**, 11560–11568.
- Pacheco, B., Maccarana, M. and Malmström, A. (2009) Dermatan 4-O-sulfotransferase 1 is pivotal in the formation of iduronic acid blocks in dermatan sulfate. *Glycobiology*, **19**, 1197–1203.
- Yamauchi, S., Mita, S., Matsubara, T., Fukuta, M., Habuchi, H., Kimata, K. and Habuchi, O. (2000) Molecular cloning and expression of chondroitin 4-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.*, **275**, 8975–8981.
- Hiraoka, N., Nakagawa, H., Ong, E., Akama, T.O., Fukuda, M.N. and Fukuda, M. (2000) Molecular cloning and expression of two distinct human

- chondroitin 4-*O*-sulfotransferases that belong to the HNK-1 sulfotransferase gene family. *J. Biol. Chem.*, **275**, 20188–20196.
19. Kang, H.G., Evers, M.R., Xia, G., Baenziger, J.U. and Schachner, M. (2002) Molecular cloning and characterization of chondroitin-4-*O*-sulfotransferase-3. A novel member of the HNK-1 family of sulfotransferases. *J. Biol. Chem.*, **277**, 34766–34772.
 20. Evers, M.R., Xia, G., Kang, H.G., Schachner, M. and Baenziger, J.U. (2001) Molecular cloning and characterization of a dermatan-specific *N*-acetylgalactosamine 4-*O*-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.*, **276**, 36344–36353.
 21. Mikami, T., Mizumoto, S., Kago, N., Kitagawa, H. and Sugahara, K. (2003) Specificities of three distinct human chondroitin/dermatan *N*-acetylgalactosamine 4-*O*-sulfotransferases demonstrated using partially desulfated dermatan sulfate as an acceptor: implication of differential roles in dermatan sulfate biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **278**, 36115–36127.
 22. Kusche-Gullberg, M. and Kjell n, L. (2003) Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 605–611.
 23. Cheng, F., Heineg rd, D., Malmström, A., Schmidtchen, A., Yoshida, K. and Fransson, L.A. (1994) Patterns of uronosyl epimerization and 4-/6-*O*-sulphation in chondroitin/dermatan sulphate from decorin and biglycan of various bovine tissues. *Glycobiology*, **4**, 685–696.
 24. Beighton, P., De Paepe, A., Steinmann, B., Tsipouras, P. and Wenstrup, R.J. (1998) Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997. Ehlers-Danlos National Foundation (USA) and Ehlers-Danlos Support Group (UK). *Am. J. Med. Genet.*, **77**, 31–37.
 25. De Paepe, A. and Malfait, F. (2012) The Ehlers-Danlos syndrome, a disorder with many faces. *Clin. Genet.*, **82**, 1–11.
 26. Dündar, M., M ller, T., Zhang, Q., Pan, J., Steinmann, B., Vodopituz, J., Gruber, R., Sonoda, T., Krabichler, B., Utermann, G. *et al.* (2009) Loss of dermatan-4-sulfotransferase 1 function results in adducted thumb-clubfoot syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, **85**, 873–882.
 27. Miyake, N., Kosho, T., Mizumoto, S., Furuichi, T., Hatamochi, A., Nagashima, Y., Arai, E., Takahashi, K., Kawamura, R., Wakui, K. *et al.* (2010) Loss-of-function mutations of *CHST14* in a new type of Ehlers-Danlos syndrome. *Hum. Mutat.*, **31**, 966–974.
 28. Malfait, F., Syx, D., Vlummens, P., Symoens, S., Nampoothiri, S., Hermans-Le, T., Van Laer, L. and De Paepe, A. (2010) Musculocontractural Ehlers-Danlos Syndrome (former EDS type VIB) and adducted thumb clubfoot syndrome (ATCS) represent a single clinical entity caused by mutations in the dermatan-4-sulfotransferase 1 encoding *CHST14* gene. *Hum. Mutat.*, **31**, 1233–1239.
 29. Dündar, M., Demiryilmaz, F., Demiryilmaz, I., Kumandas, S., Erkilic, K., Nagirci, M., Tuncel, M., Ozyazgan, I. and Tolmie, J.L. (1997) An autosomal recessive adducted thumb-club foot syndrome observed in Turkish cousins. *Clin. Genet.*, **52**, 61–64.
 30. Dündar, M., Kurtoglu, S., Elmas, B., Demiryilmaz, F., Candemir, Z., Ozkul, Y. and Durak, A.C. (2001) A case with adducted thumb and club foot syndrome. *Clin. Dysmorphol.*, **10**, 291–293.
 31. Janecke, A.R., Unsinn, K., Kreczy, A., Baldissera, I., Gassner, I., Neu, N., Utermann, G. and M ller, T. (2001) Adducted thumb-club foot syndrome in sibs of a consanguineous Austrian family. *J. Med. Genet.*, **38**, 265–269.
 32. Kosho, T., Takahashi, J., Ohashi, H., Nishimura, G., Kato, H. and Fukushima, Y. (2005) Ehlers-Danlos syndrome type VIB with characteristic facies, decreased curvatures of the spinal column, and joint contractures in two unrelated girls. *Am. J. Med. Genet. A*, **138A**, 282–287.
 33. Kosho, T., Miyake, N., Hatamochi, A., Takahashi, J., Kato, H., Miyahara, T., Igawa, Y., Yasui, H., Ishida, T., Ono, K. *et al.* (2010) A new Ehlers-Danlos syndrome with craniofacial characteristics, multiple congenital contractures, progressive joint and skin laxity, and multisystem fragility-related manifestations. *Am. J. Med. Genet. A*, **152A**, 1333–1346.
 34. Janecke, A.R., Baenziger, J.U., M ller, T. and Dündar, M. (2011) Loss of dermatan-4-sulfotransferase 1 (D4ST1/CHST14) function represents the first dermatan sulfate biosynthesis defect, ‘dermatan sulfate-deficient adducted thumb-clubfoot syndrome’. *Hum. Mutat.*, **32**, 484–485.
 35. Kosho, T., Miyake, N., Mizumoto, S., Hatamochi, A., Fukushima, Y., Yamada, S., Sugahara, K. and Matsumoto, N. (2011) 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’? *Hum. Mutat.*, **32**, 1507–1509.
 36. Mendoza-Londono, R., Chitayat, D., Kahr, W.H., Hinek, A., Blaser, S., Dupuis, L., Goh, E., Badilla-Porras, R., Howard, A., Mittaz, L. *et al.* (2012) Extracellular matrix and platelet function in patients with musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome caused by mutations in the *CHST14* gene. *Am. J. Med. Genet. A*, **158A**, 1344–1354.
 37. Shimizu, K., Okamoto, N., Miyake, N., Taira, K., Sato, Y., Matsuda, K., Akimaru, N., Ohashi, H., Wakui, K., Fukushima, Y. *et al.* (2011) Delineation of dermatan 4-*O*-sulfotransferase 1 deficient Ehlers-Danlos syndrome: observation of two additional patients and comprehensive review of 20 reported patients. *Am. J. Med. Genet. A*, **155A**, 1949–1958.
 38. Voermans, N.C., Kempers, M., Lammens, M., van Alfen, N., Janssen, M.C., Bonnemann, C., van Engelen, B.G. and Hamel, B.C. (2012) Myopathy in a 20-year-old female patient with D4ST-1 deficient Ehlers-Danlos syndrome due to a homozygous *CHST14* mutation. *Am. J. Med. Genet. A*, **158A**, 850–855.
 39. Voermans, N.C., van Alfen, N., Pillen, S., Lammens, M., Schalkwijk, J., Zwarts, M.J., van Rooij, I.A., Hamel, B.C. and van Engelen, B.G. (2009) Neuromuscular involvement in various types of Ehlers-Danlos syndrome. *Ann. Neurol.*, **65**, 687–697.
 40. Voermans, N.C., Bonnemann, C.G., Lammens, M., van Engelen, B.G. and Hamel, B.C. (2009) Myopathy and polyneuropathy in an adolescent with the kyphoscoliotic type of Ehlers-Danlos syndrome. *Am. J. Med. Genet. A*, **149A**, 2311–2316.
 41. Baumann, M., Giunta, C., Krabichler, B., Ruschendorf, F., Zoppi, N., Colombi, M., Bittner, R.E., Quijano-Roy, S., Muntoni, F., Cirak, S. *et al.* (2012) Mutations in *FKBP14* cause a variant of Ehlers-Danlos syndrome with progressive kyphoscoliosis, myopathy, and hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.*, **90**, 201–216.
 42. Nakao, M., Shichijo, S., Imaizumi, T., Inoue, Y., Matsunaga, K., Yamada, A., Kikuchi, M., Tsuda, N., Ohta, K., Takamori, S. *et al.* (2000) Identification of a gene coding for a new squamous cell carcinoma antigen recognized by the CTL. *J. Immunol.*, **164**, 2565–2574.
 43. Svanem, B.I., Strand, W.I., Ertesvag, H., Skjak-Braek, G., Hartmann, M., Barbeyron, T. and Valla, S. (2001) The catalytic activities of the bifunctional *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5-epimerase and alginate lyase AlgE7 probably originate from the same active site in the enzyme. *J. Biol. Chem.*, **276**, 31542–31550.
 44. Malmström, A., Bartolini, B., Thelin, M.A., Pacheco, B. and Maccarana, M. (2012) Iduronic acid in chondroitin/dermatan sulfate: biosynthesis and biological function. *J. Histochem. Cytochem.*, **60**, 916–925.
 45. Malmström, A. (1984) Biosynthesis of dermatan sulfate. II. Substrate specificity of the C-5 uronosyl epimerase. *J. Biol. Chem.*, **259**, 161–165.
 46. Maccarana, M., Kalamajski, S., Kongsgaard, M., Magnusson, S.P., Oldberg, A. and Malmström, A. (2009) Dermatan sulfate epimerase 1-deficient mice have reduced content and changed distribution of iduronic acids in dermatan sulfate and an altered collagen structure in skin. *Mol. Cell Biol.*, **29**, 5517–5528.
 47. Voermans, N.C. and van Engelen, B.G. (2008) Differential diagnosis of muscular hypotonia in infants: the kyphoscoliotic type of Ehlers-Danlos syndrome (EDS VI). *Neuromuscul. Disord.*, **18**, 906. author reply 907.
 48. Voermans, N.C., Jenniskens, G.J., Hamel, B.C., Schalkwijk, J., Guicheney, P. and van Engelen, B.G. (2007) Ehlers-Danlos syndrome due to tenascin-X deficiency: muscle weakness and contractures support overlap with collagen VI myopathies. *Am. J. Med. Genet. A*, **143A**, 2215–2219.
 49. Lampe, A.K. and Bushby, K.M. (2005) Collagen VI related muscle disorders. *J. Med. Genet.*, **42**, 673–685.
 50. Catlow, K.R., Deakin, J.A., Wei, Z., Delehedde, M., Fernig, D.G., Gherardi, E., Gallagher, J.T., Pav o, M.S. and Lyon, M. (2008) Interactions of hepatocyte growth factor/scatter factor with various glycosaminoglycans reveal an important interplay between the presence of iduronate and sulfate density. *J. Biol. Chem.*, **283**, 5235–5248.
 51. Casu, B., Petitou, M., Provasoli, M. and Sinay, P. (1988) Conformational flexibility: a new concept for explaining binding and biological properties of iduronic acid-containing glycosaminoglycans. *Trends Biochem. Sci.*, **13**, 221–225.
 52. Scott, J.E. (1996) Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen. *Biochemistry*, **35**, 8795–8799.
 53. Scott, J.E. (2003) Elasticity in extracellular matrix ‘shape modules’ of tendon, cartilage, etc. A sliding proteoglycan-filament model. *J. Physiol.*, **553**, 335–343.
 54. Danielson, K.G., Baribault, H., Holmes, D.F., Graham, H., Kadler, K.E. and Iozzo, R.V. (1997) Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J. Cell Biol.*, **136**, 729–743.

55. Scott, J.E. (1995) Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape. *J. Anat.*, **187**, 259–269.
56. Akatsu, C., Mizumoto, S., Kaneiwa, T., Maccarana, M., Malmström, A., Yamada, S. and Sugahara, K. (2011) Dermatan sulfate epimerase 2 is the predominant isozyme in the formation of the chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid structure in postnatal developing mouse brain. *Glycobiology*, **21**, 565–574.
57. Bartolini, B., Thelin, M.A., Rauch, U., Feinstein, R., Oldberg, A., Malmström, A. and Maccarana, M. (2012) Mouse development is not obviously affected by the absence of dermatan sulfate epimerase 2 in spite of a modified brain dermatan sulfate composition. *Glycobiology*, **22**, 1007–1016.
58. Rauch, U. and Kappler, J. (2006) Chondroitin/Dermatan sulfates in the central nervous system: their structures and functions in health and disease. *Adv. Pharmacol.*, **53**, 337–356.
59. Sugahara, K. and Mikami, T. (2007) Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **17**, 536–545.
60. Quentin, E., Gladen, A., Rodén, L. and Kresse, H. (1990) A genetic defect in the biosynthesis of dermatan sulfate proteoglycan: galactosyltransferase I deficiency in fibroblasts from a patient with a progeroid syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **87**, 1342–1346.
61. Almeida, R., Levery, S.B., Mandel, U., Kresse, H., Schwientek, T., Bennett, E.P. and Clausen, H. (1999) Cloning and expression of a proteoglycan UDP-galactose:beta-xylose beta1,4-galactosyltransferase I. A seventh member of the human beta4-galactosyltransferase gene family. *J. Biol. Chem.*, **274**, 26165–26171.
62. Okajima, T., Fukumoto, S., Furukawa, K. and Urano, T. (1999) Molecular basis for the progeroid variant of Ehlers-Danlos syndrome. Identification and characterization of two mutations in galactosyltransferase I gene. *J. Biol. Chem.*, **274**, 28841–28844.
63. Baasanjav, S., Al-Gazali, L., Hashiguchi, T., Mizumoto, S., Fischer, B., Horn, D., Seelow, D., Ali, B.R., Aziz, S.A., Langer, R. *et al.* (2011) Faulty initiation of proteoglycan synthesis causes cardiac and joint defects. *Am. J. Hum. Genet.*, **89**, 15–27.
64. Burch, G.H., Gong, Y., Liu, W., Dettman, R.W., Curry, C.J., Smith, L., Miller, W.L. and Bristow, J. (1997) Tenascin-X deficiency is associated with Ehlers-Danlos syndrome. *Nat. Genet.*, **17**, 104–108.
65. Eleftheriou, F., Exposito, J.Y., Garrone, R. and Lethias, C. (2001) Binding of tenascin-X to decorin. *FEBS Lett.*, **495**, 44–47.
66. Lethias, C., Carisey, A., Comte, J., Cluzel, C. and Exposito, J.Y. (2006) A model of tenascin-X integration within the collagenous network. *FEBS Lett.*, **580**, 6281–6285.
67. Vicente, C.P., He, L., Pavão, M.S. and Tollefsen, D.M. (2004) Antithrombotic activity of dermatan sulfate in heparin cofactor II-deficient mice. *Blood*, **104**, 3965–3970.
68. Hou, S., Maccarana, M., Min, T.H., Strate, I. and Pera, E.M. (2007) The secreted serine protease xHtrA1 stimulates long-range FGF signaling in the early *Xenopus* embryo. *Dev. Cell*, **13**, 226–241.
69. Hocking, A.M., Shinomura, T. and McQuillan, D.J. (1998) Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol.*, **17**, 1–19.
70. Loeys, B.L., Chen, J., Neptune, E.R., Judge, D.P., Podowski, M., Holm, T., Meyers, J., Leitch, C.C., Katsanis, N., Sharifi, N. *et al.* (2005) A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat. Genet.*, **37**, 275–281.
71. Tiedemann, K., Olander, B., Eklund, E., Todorova, L., Bengtsson, M., Maccarana, M., Westergren-Thorsson, G. and Malmström, A. (2005) Regulation of the chondroitin/dermatan fine structure by transforming growth factor-beta1 through effects on polymer-modifying enzymes. *Glycobiology*, **15**, 1277–1285.
72. Carmignac, V., Thevenon, J., Ades, L., Callewaert, B., Julia, S., Thauvin-Robinet, C., Gueneau, L., Courcet, J.B., Lopez, E., Holman, K. *et al.* (2012) In-frame mutations in exon 1 of SKI cause dominant Shprintzen-Goldberg syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, **91**, 950–957.
73. Thelin, M.A., Svensson, K.J., Shi, X., Bagher, M., Axelsson, J., Isinger-Ekstrand, A., van Kuppevelt, T.H., Johansson, J., Nilbert, M., Zaia, J. *et al.* (2012) Dermatan sulfate is involved in the tumorigenic properties of esophagus squamous cell carcinoma. *Cancer Res.*, **72**, 1943–1952.
74. Zhang, L., Müller, T., Baenziger, J.U. and Janecke, A.R. (2010) Congenital disorders of glycosylation with emphasis on loss of dermatan-4-sulfotransferase. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **93**, 289–307.
75. Gudbjartsson, D.F., Thorvaldsson, T., Kong, A., Gunnarsson, G. and Ingólfssdóttir, A. (2005) Allegro version 2. *Nat. Genet.*, **37**, 1015–1016.
76. Mizumoto, S. and Sugahara, K. (2012) Glycosaminoglycan chain analysis and characterization (glycosylation/epimerization). *Methods Mol. Biol.*, **836**, 99–115.
77. Kinoshita, A. and Sugahara, K. (1999) Microanalysis of glycosaminoglycan-derived oligosaccharides labeled with a fluorophore 2-aminobenzamide by high-performance liquid chromatography: application to disaccharide composition analysis and exosequencing of oligosaccharides. *Anal. Biochem.*, **269**, 367–378.

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と疾患概念の確立

古庄知己

Discovery and Delineation of a New Type of Ehlers-Danlos Syndrome Caused by Dermatan 4-O-sulfotransferase 1 Deficiency

Tomoki Kosho

【要旨】

顔貌上の特徴, 先天性多発関節拘縮, 進行性の結合組織脆弱性 (皮膚弛緩, 関節弛緩・変形, 巨大皮下血腫など) を呈する全く新しいタイプの Ehlers-Danlos 症候群 (EDS, Kosho Type) を見出した。デルマトン硫酸の N-アセチルガラクトサミン残基の 4 位を硫酸化するデルマトン 4-O-硫酸基転移酵素 -1 (D4ST1) をコードする *CHST14* が原因遺伝子であることを突き止め, 本症の進行性結合組織脆弱性が「D4ST1 の欠損→DS を含有する代表的なプロテオグリカンであるデコリンに付加するグリコサミノグリカンの組成変化 (デルマトン硫酸が消失し, 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」という病態を明らかにした。その後, 症例を増やし, これらの疾患は EDS の一病型であると結論付け, “D4ST1-deficient EDS” と命名した。

キーワード: エーラスダンロス症候群 Ehlers-Danlos syndrome, デルマトン硫酸 4-O-硫酸基転移酵素欠損症 dermatan 4-O-sulfotransferase deficiency, デコリン decorin, 先天性多発関節拘縮 arthrogyrosis, 結合組織脆弱性 connective tissue fragility

1. エーラスダンロス症候群とは

エーラスダンロス症候群 (Ehlers-Danlos 症候群: EDS) は, 皮膚・関節の過伸展性, 各種組織の脆弱性を特徴とする先天性疾患の総称であり¹⁾, 古典型 (Classical type), 関節過動型 (Hypermobility type), 血管型 (Vascular type), 後側彎型 (Kyphoscoliosis type), 多発関節弛緩型 (Arthrochalasia type), 皮膚脆弱型 (Dermatosparaxis type) の 6 つの主病型に分類されている。いずれもコラー

ゲン分子そのもの, または修飾酵素の遺伝子変異により生じる²⁾³⁾。近年, 大病型に属さない新たな病型が, その生化学的, 遺伝学的基盤とともに相次いで発見されている (表 1)⁴⁾¹³⁾。最近我々は, 顔貌上の特徴, 先天性多発関節拘縮, 進行性の結合組織脆弱性 (皮膚弛緩, 関節弛緩・変形, 巨大皮下血腫など) を呈する全く新しいタイプの EDS を見出した。本稿では, 患者さんとの出会い, 原因遺伝子単離, 病態解明, そして疾患概念確立に至る経緯を紹介する¹⁴⁾。

2. 患者さんとの出会いと原因遺伝子探索の道のり

2000 年, 筆者は当時勤務していた埼玉県立小児医療センター遺伝科で, 皮膚関節の過伸展性・脆弱性といった EDS の特徴に加え, 顔貌上の特徴 (大きい大泉門, 眼間開離, 小眼瞼, 眼瞼裂斜下, 青色強膜, 短い鼻, 耳介変

信州大学医学部附属病院遺伝子診療部
Department of Medical Genetics, Shinshu University School
of Medicine

平成 24 年 10 月 1 日受理

表1 エーラスダンロス症候群の分類 (文献 14 より)

	頻度 / 患者数	遺伝形式	原因遺伝子
大病型			
古典型 (Classical type)	1/20,000	AD	<i>COL5A1, COL5A2</i>
関節可動性亢進型 (Hypermobility type)	1/5,000 ~ 20,000	AD	大多数は不明 少数例で <i>TNXB</i>
血管型 (Vascular type)	1/50,000 ~ 250,000	AD	<i>COL3A1</i>
後側彎型 (Kyphoscoliosis type)	1/100,000	AR	<i>PLOD</i>
多発関節弛緩型 (Arthrochalasia type)	約 30 人	AD	<i>COL1A1*, COL1A2*</i>
皮膚脆弱型 (Dermatosparaxis type)	8 人	AR	<i>ADAMTS-2</i>
その他の病型			
Brittle cornea syndrome	11 人	AR	<i>ZNF469</i>
EDS-like syndrome due to tenascin-XB deficiency	10 人	AR	<i>TNXB</i>
Progeroid form	3 人	AR	<i>B4GALT7</i>
Cardiac valvular form	4 人	AR	<i>COL1A2</i>
EDS-like spondylocheirodysplasia	8 人	AR	<i>SLC39A13</i>
EDS with progressive kyphoscoliosis myopathy, and hearing loss	7 人	AR	<i>FKBP14</i>
D4ST1-deficient EDS	22 人	AR	<i>CHST14</i>

AD: 常染色体優性遺伝, AR: 常染色体劣性遺伝

COL5A1: V型プロコラーゲン α 1 鎖遺伝子, *COL5A2*: V型プロコラーゲン α 2 鎖遺伝子, *TNXB*: テネascin X 遺伝子,

PLOD: リジリドロキシラーゼ遺伝子*; スプライス異常によるエクソン 6 のスキップ,

ADAMTS-2: プロコラーゲン I N-プロテイナーゼ遺伝子, *ZNF469*: コラーゲン生合成・組織化に関わる転写因子の遺伝子,

B4GALT7: β 4 ガラクトース転移酵素 7 (GalT-1) 遺伝子, *SLC39A13*: 亜鉛トランスポーター機能を持つタンパクの遺伝子,

FKBP14: FK506 結合タンパク 14, *CHST14*: デルマタン 4-O-硫酸基転移酵素 (D4ST-1) 遺伝子

形, 高口蓋・口蓋裂などの口蓋異常, 長い人中, 薄い上口唇, 小さい口, 小下顎 [思春期以降, 面長になり, 乳幼児期の特徴は薄れる]), 内転母指および内反足を含む先天性多発関節拘縮, 巨大皮下血腫の反復, 円筒様の独特な手指, 手掌の細かい皺など特異な症状を呈する EDS 患者さんに出会った (図 1)。原因検索として, 典型的ではないが出血症状から血管脆弱性の可能性を考え, まずは血管型 EDS の可能性を考えた。皮膚生検を行い, 培養皮膚線維芽細胞を用いた III 型コラーゲン蛋白分析を千葉大学皮膚科簗持淳助教授 (現獨協医科大学皮膚科教授) に依頼した。結果, III 型コラーゲンの産生は正常であり, 血管型 EDS は否定され, 病型を確定することはできなかった。

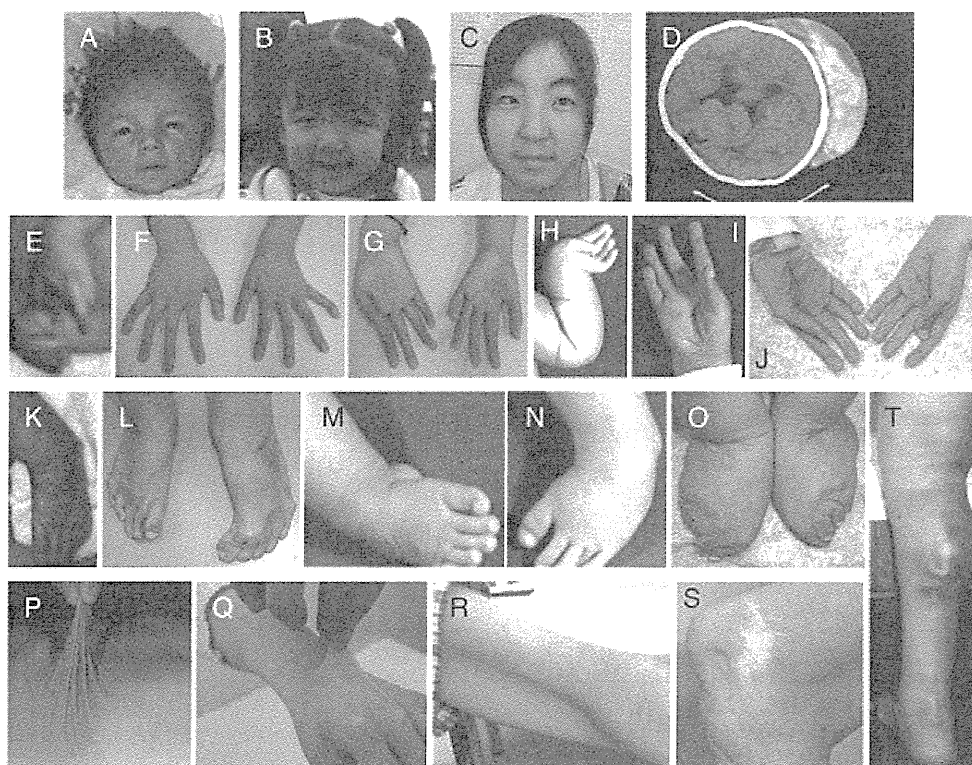
2003 年, 筆者が当院勤務になってから 2 人目の患者さんに出会った。福岡義光部長 (医学部遺伝医学・予防医学講座教授) より, 「外勤先の療育センターに EDS の患者さんがいる」と聞き, カルテを見ると, 出生直後から当院整形外科で手術を含めた加療をされていたことがわかった。当院の古いカルテ庫からカルテを取り出すと, 1 人目の患者さんと全く同様に出生時には内反足, 手指関節拘縮, 顔貌上の特徴を認め, その後, 皮膚裂傷, 関節脱臼, 巨大皮下血腫など進行性の結合組織脆弱性を呈していた (図 1)。

2 人は, 新しい型の EDS であると直感, 論文作成に着手した。文献検索をすると, 後側彎型 (旧分類では VI 型)

に類似した脊椎変形, 皮膚や動脈の脆弱性を呈しているものの, 後側彎型の病因である lysyl hydroxylase の欠損を認めない EDS VI B 型 (lysyl hydroxylase の欠損を伴う通常の後側彎型を EDS VI A と分類する場合) に分類されていた Pakistan 姉弟例¹¹³⁾に酷似した臨床像であった。1 人目の患者さんにおいて lysyl hydroxylase の欠損の有無をスクリーニング (尿デオキシピリジノリン / ピリジノリン比) し, 欠損がないことを確認した。そこで, 暫定分類を EDS VI B 型として American Journal of Medical Genetics 誌に報告した¹⁶⁾。2 人目の患者さんおよび Pakistan 姉弟例の両親が血族結婚であったことから, 常染色体劣性遺伝であり, コラーゲンを修飾する何らかの酵素の欠損ではないかと推測した。病態解明へ向け, 関連遺伝子解析を行ったが, 原因遺伝子を同定することはできなかった。

新規疾患としての確立および原因遺伝子の同定のためには, 新たな患者さんの収集が必要であった。そんな折, 遠方在住の EDS 患者さんから「自分の病状は他の病型のどれも違うので, 調べてほしい」と話を持ちかけられた。この患者さんは, 自身の病型診断のために獨協医科大学皮膚科簗持教授の外来に受診, 皮膚生検を受けたところであった。その後出会う機会があり, 新型 EDS であると確信, その両親が血族結婚であったことが, きわめて重要な意味を持つことになった。

図1 外表写真およびレントゲン写真(文献16, 29より)



1人目の患者さん:日齢23(A, E), 3歳(B), 6歳(D), 16歳(C, F, G)。2人目の患者さん:2か月(M, N), 3か月(H), 1歳2か月(P), 5歳(I), 28歳(J, O)。3人目の患者さん:新生児(K), 31歳(L, R, S)。5人目の患者さん:16歳(T), 19歳(Q)。

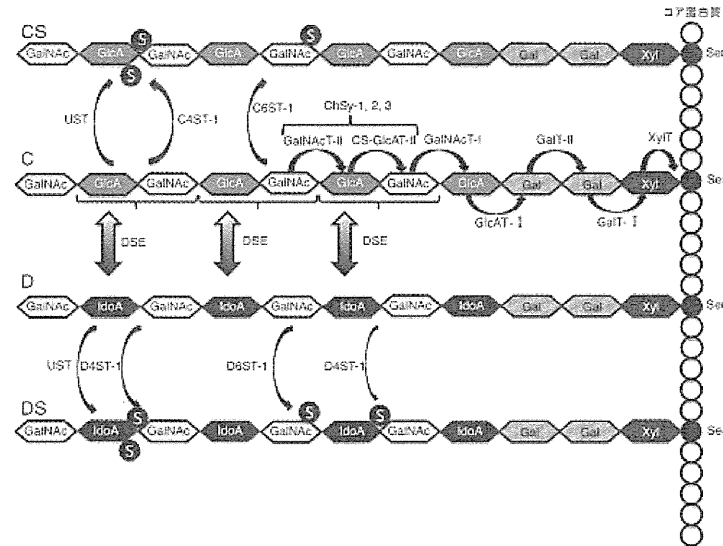
両親が血族結婚の2家系があれば、連鎖解析で遺伝子を単離できるのではないかと考え、先天異常症候群の解析に関して長く共同研究をしてきた横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学の松本直通教授、三宅紀子助教(現 准教授)に相談した。松本研では、高密度 SNP アレイの登場により、旧来のマイクロサテライトマーカーなどを用いた多型解析では原因遺伝子同定が困難とされていた少数の小家系でも遺伝子単離が可能になりつつあるところであり、快く解析を引き受けて下さった。両親血族結婚の2家系を利用した連鎖解析による原因遺伝子単離プロジェクトがここに動き始めた。

Affymetrix社のSNP 10Kアレイを用いたホモ接合体マッピングにより責任領域を15q15の8.1Mbに局限(Lod score 2.885)、さらに、その近傍のマイクロサテライトマーカー解析を用いたハプロタイプ解析により責任領域を7.3Mbにまで狭小化した。同領域に局在する109遺伝子の中から機能的に関連性の疑われる7つの遺伝子を選択し、変異解析を行った。2008年秋、ついに原因遺伝子 *CHST14* を突き止めることに成功した¹⁷⁾。予想どおり、2, 3人目の患者さんはミスセンス変異をホモ接合体で、1人目の患者さんはミスセンス変異を複合ヘテロ接合体で有していることがわかった¹⁷⁾。*CHST14*は、デルマトン4-O-硫酸基転移酵素-1(dermatan 4-O-sulfotransferase-1: D4ST1)をコー

ドする遺伝子である¹⁸⁾。D4ST1は、プロテオグリカンの側鎖であるグリコサミノグリカンを構成するデルマトン硫酸のN-アセチルガラクトサミン残基の4位に硫酸基を付加する酵素である(図2)¹⁸⁾⁻²⁰⁾。しかしながら、糖鎖修飾酵素であるD4ST1の異常がどのような機序で全身結合組織の顕著な脆弱性を惹起するのかは不明であった。

その後も新たな患者さんとの出会いが続いた。4人目の患者さんは、当科のwebsiteに相談を持ちかけていただいた札幌医科大学第一内科の石田禎夫准教授、安井寛助教より紹介された。すでに巨大皮下血腫を反復し、特異な骨格症状を有するEDSとして論文発表されていた32歳男性患者さんであった²¹⁾。5人目の患者さんとは、本症候群の皮膚病理に関する相談に、獨協医科大学皮膚科篠持教授を訪ねたときに出会った。当時19歳の彼女は、この日偶然篠持教授の外来に受診しており、待合室にたたずむその様子から、新型EDSと直感した。6人目の患者さんは当時4歳の女児である。2009年のEDS患者会に際し、篠持教授から、「今度の会に新型EDS疑いのお子さんが行くから、相談にのってあげてほしい」と伝えられていた。参加したところ、前を通り過ぎた女児の様子を見て新型EDSと確信した。そして、これら3人すべてに*CHST14*の変異が検出された。

図2 デルマタン硫酸 (DS) の生合成 (文献 20 より)



デルマタン硫酸 (DS) の生合成は、コンドロイチン硫酸 (CS)、ヘパラン硫酸、ヘパリンと同様、プロテオグリカンのコア蛋白質上にある特定のセリン残基 (Ser) にキシロース (Xyl) - ガラクトース (Gal) - ガラクトース (Gal) - グルクロン酸 (GlcA) の4糖が結合するところから始まる。これらの反応は、それぞれキシロース転移酵素 (XylT)、ガラクトース転移酵素 - I (GalT - I)、ガラクトース転移酵素 - II (GalT - II)、グルクロン酸転移酵素 - I (GlcAT - I) によって行われる。N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) が、GalNAc 転移酵素 - I (GalNAcT - I) によって GlcA に転移されると、次いでCS-グルクロン酸転移酵素 - II (CS-GlcAT - II) と GalNAc 転移酵素 - II (GalNAcT - II) により、GlcA と GalNAc が順次転移し、CS 特有の [GlcA-GalNAc] の2糖繰り返し領域が合成される。コンドロイチン合成酵素 (ChSy-1, 2, 3) は、CS-GlcAT - II と GalNAcT - II 両方の活性を持つ。ChSy ファミリーによって [GlcA-GalNAc]_n の糖鎖骨格が形成された後、または、その反応の途中で、DS エピメラーゼ (DSE) により、GlcA 残基の C5 位のカルボキシル基が異性化し、イズロン酸 (IdoA) となる。これにより、DS の2糖配列 [IdoA-GalNAc] が形成される。その後、主としてデルマタン 4-O-硫酸基転移酵素 - I (D4ST1) による GalNAc 残基の4位硫酸化 (一部はウロニル 2-O-硫酸基転移酵素 (UST) による IdoA の2位硫酸化も) による修飾を受けて、成熟した DS 鎖が合成される。C: コンドロイチン, D: デルマタン。

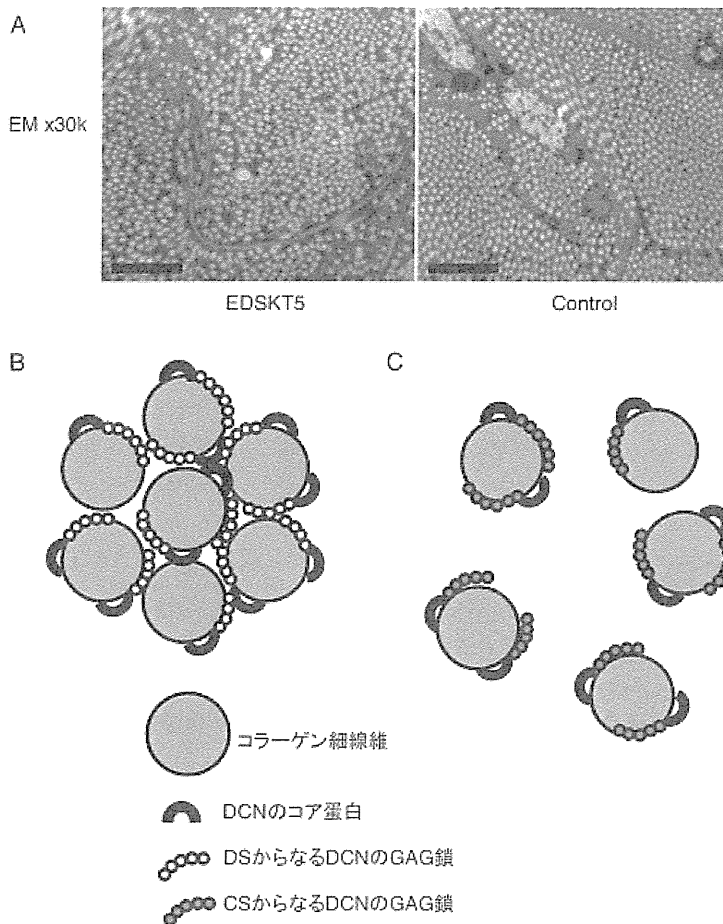
3. 病態の解明に向けて

D4ST1 のクローニングは米国 Washington 大学病理学の Baenziger 博士らの研究チームによって行われたが¹⁸⁾、熾烈なデッドヒートを演じていた¹⁹⁾のが北海道大学大学院先端生命科学研究所プロテオグリカンシグナリング医療応用研究室の菅原一幸教授 (当時は神戸薬科大学) らの研究チームであった。菅原教授に、新型 EDS 患者細胞の機能解析を依頼したところ、快く引き受けて下さり、菅原教授、山田修平准教授、そして水本秀二博士研究員による精緻な糖鎖分析が始まった。D4ST1 酵素活性を調べると、患者由来培養皮膚線維芽細胞ではコントロールに比べて著明に低下していること、保因者では半分程度に低下していることが明らかになった¹⁷⁾。次に、培養皮膚線維芽細胞に含まれるデルマタン硫酸とコンドロイチン硫酸の含有量を比較すると、コントロールではデルマタン硫酸、コンドロイチン硫酸ともに存在したが、患者由来細胞ではデルマタン硫酸が消失し、コンドロイチン硫酸のみとなっていた¹⁷⁾。さらに、デルマタン硫酸を含有する代表的なプロテオグリカンであるデコリンに着目した。デコリンはデルマタン硫酸からなる1本のグリコサミノグリカン鎖を有するが、患者細胞においてはデルマタン硫酸が消失し、全てコンドロイチン硫酸になっていた¹⁷⁾。デコリンは、グリコサミノグリカン鎖がコラーゲン細線維 (collagen fibrils) 間の距離を調節することによ

て、これを密に束ね (assembly)、細胞外マトリックスを形成するのに重要な役割を果たす^{22) 23)}。デコリンが、糖鎖修飾酵素異常とコラーゲン・ネットワークの構築異常とをつなぐリンクになっている可能性が高まったのである。これを裏付けるには、病理組織所見の解釈が必須と考えられた。旗持教授、三宅准教授と検討を重ね、患者皮膚の電子顕微鏡像において、コラーゲン細線維が正常人のように密に束ねられず、ばらけて存在することを突き止めた (図 3A)¹⁷⁾。以上から、少なくとも本症候群における進行性結合組織脆弱性の主たる発症機構は「D4ST1 欠損→デコリンに付加するグリコサミノグリカンの組成変化 (デルマタン硫酸が消失しコンドロイチン硫酸に置換) →デコリンが媒介するコラーゲン細線維の assembly 不全」 (図 3B, C) という病態である可能性が高いと考えた^{14) 17)}。

インパクトの高い研究成果であることを確信し、松本研と協力して投稿の準備をしていた2009年12月11日の朝のことであった。いつものようにアメリカ人類遺伝学会会員に毎月電子配信されてくる American Journal of Human Genetics 誌の目次に D4ST1 の文字を見つけた。CHST14 の変異に基づく D4ST1 の欠損が、内転母指および内反足の特徴とする新しい先天性多発関節拘縮症 (arthrogryposis) “adducted thumb-clubfoot syndrome (ATCS)” を引き起こすとの報告であった²⁴⁾。両親血

図3 病理所見と推定される進行性結合組織脆弱性の発症機構 (文献 14, 17より)



- A. 電顕所見 ($\times 30,000$)。EDSKT5 (5人目の患者さん) では、コントロールに比べ、コラーゲン細線維の径は同等であるが、ばらけて存在していることがわかる。スケールバーは $1 \mu\text{m}$ を示す。
- B. 正常人におけるコラーゲン細線維とデコリンとの関係。
- C. 本症において推定されるコラーゲン細線維とデコリンとの関係。

D4ST1欠損に基づきデコリン (DCN) に付加するグリコサミノグリカン鎖の組成変化 (デルマタン硫酸 (DS) が消失しコンドロイチン硫酸 (CS) に置換) が生じ、デコリンを介するコラーゲン細線維の assembly 不全が生じると考えられる。なお、デコリンを介するコラーゲン細線維の assembly モデルは、Nomura らが提唱するもの²⁵⁾を示す。

族結婚の3家系を用いたホモ接合体マッピングは全く同じ手法であった。筆頭著者は世界に先駆けて2家系を報告した^{25) 26)} トルコ Erciyes 大学遺伝学の Dündar 教授、遺伝子解析を行ったのは責任著者で1家系の報告をしていた²⁷⁾ オーストリア Innsbruck 医科大学小児科の Janecke 教授らのチーム、そして糖鎖解析を行ったのはまたもや Baenziger 教授らのチームであった²⁴⁾。新しい arthrogyryposis として報告されていた日本人兄弟例も含まれていた²⁸⁾。我々は、幼児から成人にかけての患者さんを見てきたが、診療において EDS との認識がゆらぐことはなかった。出生時には確かに特徴的な手指の内転と内反足を含む多発関節拘縮を呈しており、一時的に先天性多発関節拘縮症と診断された患者さん、先天性多発関節拘縮症の1つ Freeman-Sheldon 症候群と診断された患者さんはいたが、ATCS は全くノーマークであった。我々の発見した新型 EDS と ATCS が同一疾患か否か、これにより我々の発見の価値が決まると考えられた。Dündar 教授らの論文を精読したところ、加齢に伴い結合組織脆弱性が明らかになると言及されており、また全く同一の遺伝子変異もあり、同一疾患といずれは分類される予感があったが、縦断的な臨床情報が乏しいこと、皮膚病理組織を正常と解釈したこ

となどから、現時点で同一疾患とは結論できないと位置づけ、投稿を急ぐことにした。しかしながら、新型 EDS が臨床的にどのようなものかをアピールしきれないこと、そしてやはり先行論文があることが影響したのであろう、High impact journals からはことごとく reject された。松本教授、三宅准教授と話し合いを重ね、詳細な臨床像を古庄が、遺伝子単離および機能解析を三宅准教授が別々に投稿し、同一疾患であるかもしれないがまずは新型 EDS と位置づけ、その原因遺伝子を独立して単離したと位置づけた。そしてようやく 2010 年 4 月 14 日に臨床像が American Journal of Medical Genetics 誌に²⁹⁾、5 月 25 日に病態が Human Mutation 誌に¹⁷⁾ 受理された。まもなく奇形症候群の世界的データベースである London Dysmorphology Database (<http://www.lmdatabases.com/index.html>) および POSSUM (<http://www.possun.net.au/>) から掲載許可を求める問い合わせがあり、我々の報告した6人の患者さんは暫定的に「EDS, Kosho Type (EDSKT)」と称されることになった。

4. 疾患概念の確立へ向けて

筆者らの報告にわずかに遅れる形で、EDS を含めた結

合組織疾患の研究を長年引っ張ってきたベルギー Ghent 大学病院遺伝学 De Paepe 教授と Malfait 先生らのチームから、D4ST1 の欠損が、EDS VI B に分類されていた 2 家系（トルコ人、インド人）3 症例の原因であると Human Mutation 誌に報告された。ATCS、EDSKT を含めて同一疾患と位置づけられ、Musculocontractural EDS (MCEDS) との名称が提案された（現在、この疾患名が OMIM 登録されている [#601776]）³⁰⁾。

ATCS、EDSKT、MCEDS は同一遺伝子の変異に基づくが臨床的には異なる allelic diseases なのか、同一疾患の家族間または年齢による variability といえるのかを結論付けるためには、ATCS 患者において情報の乏しい学童以降の状況、また EDSKT 患者において情報の乏しい乳幼児期の状況を把握することが不可欠と考えられた。ちょうどその折、埼玉県立小児医療センター遺伝科清水健司先生、大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科岡本伸彦部長から、それぞれ 2 歳、6 歳の新たな EDSKT 患者さんがいることをうかがった。そこで、この 2 人の臨床経過および身体所見に関する詳細な記載と、これらを含めこれまで EDSKT、ATCS、MCEDS として報告された全 22 症例の包括的レビューからなる論文を作成、疾患概念を確立するものとして American Journal of Medical Genetics 誌に発表した³¹⁾。

比較的重症例が多く含まれ、また観察時期が出生時から幼少期に集中していた ATCS は、先天性多発関節拘縮症のカテゴリーとしてとらえられていた。他方、MCEDS は思春期以降の臨床像から EDS のカテゴリーとしてとらえられていた。我々の見出した EDSKT は年齢の幅が広く（2 歳～32 歳）、かつ詳細な情報を入手できたことから、出生時、小児期から成人期に至る臨床像の変化を克明に示しており、D4ST1 欠損に基づくこれらの症例が、臨床的にも同一疾患とすることを結論付けるものであった。皮膚・関節の過伸展性、各種組織の脆弱性という EDS の中核症状を持つことから、先天性多発関節拘縮症との分類より、EDS との分類の方が妥当と考えられた。病因論的にも、進行性の結合組織脆弱性に関しては、「D4ST1 欠損→デコリンに付加するグリコサミノグリカンの組成変化（デルマタン硫酸の消失）→デコリンが媒介するコラーゲン細線維の assembly 不全」といったコラーゲンの生合成異常と位置づけられ、EDS との分類が妥当と考えられた。以上から、「D4ST1-deficient EDS」との疾患名を提唱した³¹⁾。

本論文を投稿した 5 日後、Human Mutation 誌 online 版の Letter to the Editors に Janecke 教授らの意見が掲載された³²⁾。Janecke 教授らは、ATCS、EDSKT、MCEDS は D4ST1 欠損に基づく臨床的にも同一疾患であること、しかし EDS との分類は臨床医にとっても研究者にとっても混乱をまねくものであると主張した。その根拠

は、先天性多発関節拘縮、顔貌上の特徴、口唇口蓋裂、腸の異常、腎の異常、腎結石、筋緊張低下など EDS において通常見られない症状があること、および分子病態が EDS と異なることであった。そして、「Dermatan sulfate-deficient adducted thumb-clubfoot syndrome」という疾患名が妥当であると結論付けた³³⁾。

これに対し我々は、同じく Human Mutation 誌の Letter to the Editors にて、本症の臨床症状を整理するとともに（表 2）、本症が EDS に分類されることの妥当性を改めて主張した³³⁾。その根拠として、臨床的には、①本疾患は EDS の中核症状を有すること、② ATCS は出生後早期に診断するキーワードとしてはわかりやすいが、生涯を通じた診療においては EDS として結合組織脆弱性に留意することが最も重要であること、③中核症状以外の症状を有することが EDS を否定することにはならないこと、を示した。病因論的にも、「デコリンを介するコラーゲン細線維の assembly 不全」が本症における進行性結合組織脆弱性の主病態であることから、糖鎖修飾酵素欠損に基づく本症を、コラーゲン代謝異常を根本病態と考える EDS に分類することは妥当であると述べた。以上から、現時点では「D4ST1-deficient EDS (adducted thumb-clubfoot syndrome)」との疾患名が妥当であると結論付けた³³⁾。

その後、欧米より症例報告が続き^{34) 36)}、本症は比較的頻度の高い EDS の一病型であるとの認識が高まっている。我々も国内で新たな患者さんを次々に見出し、以下のような本症の診断基準および健康管理指針を提案している。

①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する。

1) 顔貌上の特徴（大きい大泉門、眼間開離、小眼瞼、眼瞼裂斜下、青色強膜、短い鼻、耳介変形、高口蓋・口蓋裂などの口蓋異常、長い人中、薄い上口唇、小さい口、小下顎）

2) 骨格症状（内転母指、内反足）

②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、難聴の有無を評価する。

2) 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。

便秘に対する緩下剤投与、浣腸。

男児では停留精巣に対する固定術。

3) 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）。

表 2 D4ST1-deficient EDS の臨床症状 (文献 33 より)

頭蓋顔面	泉門開大 (乳幼児期) 眼間開離 小眼瞼, 眼瞼裂斜下 青色強膜 鼻柱低形成を伴った短い鼻 耳介異形成 (大きい, 後傾, 低位) 口蓋異常 (高口蓋, 口蓋裂) 長い人中, 薄い上嘴唇 小さい口 / 下顎低形成・後退 (乳児期) 下顎突出し面長となる (学童期以降) 非対称な顔 (学童期以降)	胃腸	便秘 憩室穿孔
骨格	Marfan 症候群様体型 先天性多発関節拘縮 (指, 手首, 股関節, 足) 反復性 / 慢性関節脱臼 胸郭変形 (平坦, 漏斗胸) 脊椎変形 (側彎, 後側彎) 独特な形態の手指 (先細り, 細い, 円筒状) 進行性の足変形 (外反, 扁平, 凹)	呼吸器	(血) 気胸
皮膚	過伸異性 / 弛緩 易出血性 脆弱性 / 萎縮性皰瘡 細かい / 早老症様の手掌の皺 圧迫に対する過敏性 反復性皮下感染症 / 膿瘍	泌尿生殖器	腎 / 膀胱結石 水腎症 膀胱拡張 / 弛緩 そけいヘルニア 停留精巣 乳房発育不全
心臓血管	先天性心疾患 (ASD) 弁の異常 (MVP, MR, AR, ARD) 巨大皮下血腫	眼	斜視 屈折異常 (近視, 乱視) 緑内障 / 眼内圧亢進 小角膜 / 小眼球 網膜剥離
		耳	聴力低下
		中枢神経	脳室拡大 / 非対称
		発達	筋緊張低下 / 粗大運動発達遅滞

ASD: 心房中隔欠損, MVP: 僧帽弁逸脱, MR: 僧帽弁閉鎖不全, AR: 大動脈弁閉鎖不全, ARD: 上行大動脈拡張

泌尿器科 (排尿障害, 膀胱拡張)。

循環器科 (弁の異常, 僧帽弁逸脱などがあれば感染性心内膜炎の予防を考慮, 上行大動脈拡張の評価)。

4) 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 (STIMATE™) を考慮。

5) 思春期以降

二次性徴の観察 (女性では乳房発育不全, 男性であれば性腺機能低下の可能性)。(血) 気胸, 憩室穿孔に対する救急医療。

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)。

おわりに

我々を含む世界 3 グループが独立に見出した ATCS, EDSKT, MCEDS は, D4ST1 欠損に基づく臨床的に同一の疾患であり, EDS の比較的頻度の高い新病型「D4ST1-

deficient EDS」であると結論付けられる。本症の進行性結合組織脆弱性に関する症状 (皮膚過伸展・脆弱性, 全身関節弛緩・慢性脱臼・変形, 巨大皮下血腫など) は, 「デルマタン硫酸欠乏による, デコリンを介するコラーゲン細線維の assembly 不全」により説明可能であるが, 顔貌の特徴, 先天性多発関節拘縮, 先天性心疾患, 脳神経異常など発生異常と位置づけられる症状もある。このことは, D4ST1 欠損に基づくデルマタン硫酸の欠乏が, 結合組織の維持のみならず胎児発生においても影響を及ぼしている可能性を示唆している。本症は, デルマタン硫酸生合成経路において唯一同定されている欠損症であり, デルマタン硫酸がヒト発生および細胞外マトリックス維持にどのような役割を果たすのかを初めて示すモデル疾患であるとして脚光を浴びている³⁷⁾。

筆者は, 小児科をバックグラウンドとする clinical geneticist である。clinical genetics の醍醐味は, 1 人の患者さんとの出会いを大切に, その人生や家族とじっくり向き合いながら, 同時に疾患の本質を臨床的に, また病因論的につきつめ, 新たな疾患概念を構築し, 普遍的な生物学的

意義を見出し、そして根本的治療の可能性を探ることにあ
る。筆者は幸運にも、1人の患者さんとの出会いに始まり、
約10年間の歳月をかけて様々な専門家との共同研究のな
かで症例を集積し、そして病態を解明することができた。
今後も、学内外の共同研究者・医療者の方々とともに、患
者さんの健康状態や生活の質が少しでもよくなるよう、本症
の病態解明および治療法の開発に力を尽くしていきたい¹⁴⁾。

謝辞

研究に協力して下さった患者さん、ご家族の方々、多く
の共同研究者の方々、そして、ともに患者さんを診療して
いる医療者の方々に心より感謝申し上げます。本研究は、
信州医学振興会医学研究助成(2005年度)、信州若手研
究者萌芽研究支援事業(2007年度)、および厚生労働科
学研究費補助金・難治性疾患克服研究事業(2009～2013
年度)の支援を得て行われた。

文献

- Steinmann B, Royce PM, Superti-Furga A : The Ehlers-Danlos syndrome. In Royce PM, Steinmann B. (Eds.) : *Connective tissue and its heritable disorders*. 431-523, Wiley-Liss, New York, 2002.
- Beighton P, De Paepe A, Steinmann B, et al : Ehlers-Danlos syndromes : revised nosology, Villefranche, 1997. *Am J Med Genet*, 77 : 31-37, 1998.
- Mao JR, Bristow J : The Ehlers-Danlos syndrome: on beyond collagens. *J Clin Invest*, 107: 1063-1069, 2001.
- Kresse H, Rosthoj S, Quentin E, et al : Glycosaminoglycan-free small proteoglycan core protein is secreted by fibroblasts from a patient with a syndrome resembling progeroid. *Am J Hum Genet*, 41 : 436-453, 1987.
- Quentin E, Gladen A, Roden L, et al : A genetic defect in the biosynthesis of dermatan sulfate proteoglycan : galactosyltransferase I deficiency in fibroblasts from a patient with a progeroid syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87 : 1342-1346, 1990.
- Okajima T, Fukumoto S, Furukawa K, et al : Molecular basis for the progeroid variant of Ehlers-Danlos syndrome : identification and characterization of two mutations in galactosyltransferase I gene. *J Biol Chem*, 274 : 28841-28844, 1999.
- Almeida R, Levery SB, Mandel U, et al : Cloning and expression of a proteoglycan UDP-galactose:beta-xylose beta-1,4-galactosyltransferase I : a seventh member of the human beta4-galactosyltransferase gene family. *J Biol Chem*, 274 : 26165-26171, 1999.
- Schalkwijk J, Zweers MC, Steijlen PM, et al : A recessive form of the Ehlers-Danlos syndrome caused by tenascin-X deficiency. *N Engl J Med*, 345 : 1167-1175, 2001.
- Schwarze U, Hata R, McKusick VA, et al : Rare autosomal recessive cardiac valvular form of Ehlers-Danlos syndrome results from mutations in the COL1A2 gene that activate the nonsense-mediated RNA decay pathway. *Am J Hum Genet*, 74 : 917-930, 2004.
- Abu A, Frydman M, Marek D, et al : Deleterious mutations in the zinc-finger 469 gene cause brittle cornea syndrome. *Am J Hum Genet*, 82 : 1217-1222, 2008.
- Fukuda T, Civic N, Furuichi T, et al : The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development ; its involvement in BMP/TGF- β signaling pathways. *Plos ONE*, 3 : e3642, 2008.
- Giunta C, Elçioglu NH, Albrecht B, et al : Spondylocheiro dysplastic form of the Ehlers-Danlos syndrome-an autosomal recessive entity caused by mutations in the zinc transporter gene SLC39A13. *Am J Hum Genet*, 82 : 1290-1305, 2008.
- Baumann M, Giunta C, Krabichler B, et al : Mutations in FKBP14 cause a variant of Ehlers-Danlos syndrome with progressive kyphoscoliosis, myopathy, and hearing loss. *Am J Hum Genet*, 90 : 201-216, 2012.
- 古庄知己 : デルマタン 4-O- 硫酸基転移酵素-1 欠損に基づく新型エーラスダンロス症候群の発見と疾患概念の確立. *信州医学雑誌*, 59 : 305-319, 2011.
- Steinmann B, Gitzelmann R, Vogel A, et al : Ehlers-Danlos syndrome in two siblings with deficient lysyl hydroxylase activity in cultured skin fibroblasts but only mild hydroxylysine deficit in skin. *Helv Paediat Acta*, 30 : 255-274, 1975.
- Kosho T, Takahashi J, Ohashi H, et al : Ehlers-Danlos syndrome type VIB with characteristic facies, decreased curvatures of the spinal column, and joint contractures in two unrelated girls. *Am J Med Genet Part A*, 138A : 282-287, 2005.
- Miyake N, Kosho T, Mizumoto S, et al : Loss-of-function mutations of *CHST14* in a new type of Ehlers-Danlos syndrome. *Hum Mutat*, 31 : 966-974, 2010.
- Evers MR, Xia G, Kang HG, et al : Molecular cloning and characterization of a dermatan-specific *N*-acetylgalactosamine 4-O-sulfotransferase. *J Biol Chem*, 276 : 36344-36353, 2001.
- Mikami T, Mizumoto S, Kago N, et al : Specificities of three distinct human chondroitin/dermatan *N*-acetylgalactosamine 4-O-sulfotransferases demonstrated using partially desulfated dermatan sulfate as an acceptor : implication of differential roles in dermatan sulfate biosynthesis. *J Biol Chem*, 278 : 36115-36127, 2003.
- 水本秀二, 菅原一幸 : グリコサミノグリカン合成の微調節メカニズム. 古川綱一, 遠藤玉夫, 岡昌吾, 本家孝一, 加藤晃一 (編), *糖鎖情報の独自性と普遍性, 蛋白質核酸酵素増刊*, 1448-1455, 共立出版, 東京, 2008.
- Yasui H, Adachi Y, Minami T, et al : Combination

- therapy of DDAVP and conjugated estrogens for a recurrent large subcutaneous hematoma in Ehlers-Danlos syndrome. *Am J Hematol*, 72 : 71-72, 2003.
- 22) Trowbridge JM, Gallo RL : Dermatan sulfate : new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology*, 12 : 117R-125R, 2002.
- 23) Nomura Y : Structural change in decorin with skin aging. *Connect Tissue Res*, 47 : 249-255, 2006.
- 24) Dündar M, Müller T, Zhang Q, et al : Loss of dermatan-4-sulfotransferase 1 function results in adducted thumb-clubfoot syndrome. *Am J Hum Genet*, 85 : 873-882, 2009.
- 25) Dündar M, Demiryilmaz F, Demiryilmaz I, et al : An autosomal recessive adducted thumb-club foot syndrome observed in Turkish cousins. *Clin Genet*, 51 : 61-64, 1997.
- 26) Dündar M, Kurtoglu S, Elmas B, et al : A case with adducted thumb and club foot syndrome. *Clin Dysmorphol*, 10 : 291-293, 2001.
- 27) Janecke AR, Unsinn K, Kreczy A, et al : Adducted thumb-club foot syndrome in sibs of a consanguineous Austrian family. *J Med Genet*, 38 : 265-269, 2001.
- 28) Sonoda T, Kouno K : Two brothers with distal arthrogyriposis, peculiar facial appearance, cleft palate, short stature, hydronephrosis, retentio testis, and normal intelligence : a new type of distal arthrogyriposis?. *Am J Med Genet*, 91 : 280-285, 2000.
- 29) Kosho T, Miyake N, Hatamochi A, et al : A new Ehlers-Danlos syndrome with craniofacial characteristics, multiple congenital contractures, progressive joint and skin laxity, and multisystem fragility-related manifestations. *Am J Med Genet Part A*, 152A : 1333-1346, 2010.
- 30) Malfait F, Syx D, Vlummens P, et al : Musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome (former EDS type VIB) and adducted thumb clubfoot syndrome (ATCS) represent a single clinical entity caused by mutations in the dermatan-4-sulfotransferase 1 encoding *CHST14* gene. 2010. *Hum Mutat*, 31 : 1233-1239, 2010.
- 31) Shimizu K, Okamoto N, Miyake N, et al : Delineation of dermatan 4-O-sulfotransferase 1 deficient Ehlers-Danlos syndrome: observation of two additional patients and comprehensive review of 20 reported patients. *Am J Med Genet Part A*, 155A : 1949-1958, 2011.
- 32) Janecke AR, Baenziger JU, Müller T, et al : Letter to the Editors. Loss of dermatan-4-sulfotransferase 1 (*D4ST1/CHST14*) function represents the first dermatan sulfate biosynthesis defect, "Dermatan sulfate-deficient adducted thumb-clubfoot syndrome" . *Hum Mutat*, 32 : 484-485, 2011.
- 33) Kosho T, Miyake N, Mizumoto S, et al : 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" ? . *Hum Mutat*, 32 : 1507-1509, 2011.
- 34) Voermans NC, Kempers M, Lammens M, et al : Myopathy in a 20-year-old female patient with *D4ST1* deficient Ehlers-Danlos syndrome due to a homozygous *CHST14* mutation. *Am J Med Genet Part A*, 158A : 850-855, 2012.
- 35) Mendoza-Londono R, Chitayat D, Kahr WH, et al : Extracellular matrix and platelet function in patients with musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome caused by mutations in the *CHST14* gene. *Am J Med Genet A*, 158A : 1344-1354, 2012.
- 36) Winters KA, Jiang Z, Xu W, et al : Re-assigned diagnosis of *D4ST1*-deficient Ehlers-Danlos syndrome (adducted thumb-clubfoot syndrome) after initial diagnosis of Marden-Walker syndrome. *Am J Med Genet Part A*, 158A : 2935-2940, 2012.
- 37) Zhang L, Müller T, Baenziger JU, et al : Congenital disorders of glycosylation with emphasis on loss of dermatan-4-sulfotransferase?. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 93 : 289-307, 2010.

グリコサミノグリカンの異常と新型 Ehlers-Danlos 症候群 (古庄型)

古庄知己*

I. デルマタン硫酸およびその生合成経路

グリコサミノグリカン glycosaminoglycan (GAG) は、プロテオグリカン proteoglycan (PG) のコアタンパク質に付加される直線状の多糖構造であり、細胞表面や細胞外マトリックスに輸送され、細胞分化・細胞接着・器官形成・形態形成など PG の有する多彩な生理機能の発現に寄与している。GAG は、ウロン酸とアミノ酸の2糖が交互に50~100回程度繰り返し重合した構造をしており、コンドロイチン硫酸 chondroitin sulfate (CS)、デルマタン硫酸 dermatan sulfate (DS)、ヘパラン硫酸、ヘパリンに分類される。CS は GlcA と GalNAc の2糖から、DS は GlcA の C5 位のカルボキシル基が異性化した IdoA と GalNAc の2糖からなる¹⁾。

DS の生合成経路を図1に示す。PG のコアタンパク質上にある特定のセリン残基 (Ser) に Xyl-Gal-Gal-GlcA の4糖が結合する反応から始まる。これらの反応は、それぞれ Xyl 転移酵素 (XylT)、Gal 転移酵素-I (GalT-I)、Gal-II (GalT-II)、GlcA 転移酵素-I (GlcAT-I) によって行われる。GalNAc が GalNAc 転移酵素-I (GalNAcT-I) によって GlcA に転移されると、次いで CS-GlcA 転移酵素-II (CS-GlcAT-II) と GalNAc 転移酵素-II (GalNAcT-II) により、GlcA と GalNAc が順次転移し、CS 特有の [GlcA-GalNAc] の2糖繰り返し領域が合成される。コンドロイチン合成酵素 (ChSy-1, 2, 3) は、CS-GlcAT-II と GalNAcT-II 両方の活性をもつ。ChSy ファミリーによって [GlcA-GalNAc]_n の糖鎖骨格が形成された後、または、その反応の途中で、DS エピメラーゼ (DSE) により、GlcA 残基の C5 位のカルボキシル基が異性化し、IdoA となる。これにより、DS の2糖配列 [IdoA-Gal-

NAc]_n が形成される。その後、主としてデルマタン4-O-硫酸基転移酵素-1 (D4ST1) による GalNAc 残基の4位硫酸化 (一部はウロノシル2-O-硫酸基転移酵素 (UST) による IdoA の2位硫酸化も) による修飾を受けて、成熟した DS 鎖が合成される¹⁾。

II. Ehlers-Danlos 症候群 (EDS) とは

EDS は、皮膚・関節の過伸展性、各種組織の脆弱性を特徴とする先天性疾患の総称であり、古典型 classical type、関節可動性亢進型 hypermobility type、血管型 vascular type、後側彎型 kyphoscoliosis type、多発関節弛緩型 arthrochaliasia type、皮膚脆弱型 dermatosparaxis type の6つの主病型に分類されている。いずれもコラーゲン分子そのもの、または修飾酵素の遺伝子変異により生じる。近年、大病型に属さない新たな病型が、その生化学的、遺伝学的基盤とともに相次いで発見されている²⁾ (表1)。最近我々は、顔貌上の特徴、先天性多発関節拘縮、進行性の結合組織脆弱性 (皮膚弛緩、関節弛緩・変形、巨大皮下血腫など) を呈する全く新しいタイプの EDS (EDS, Kosho type: EDSKT) を見出し、その原因遺伝子が D4ST1 をコードする *CHST14* (carbohydrate sulfotransferase 14) であることを明らかにした。本稿では、発見から疾患概念確立への経緯、臨床病理学的特徴を概説する。

III. 患者との出会い

2000年、筆者は1人目の患者に出会った。当時7歳の女兒は両親他人婚、顔貌上の特徴、内反足、内転母指を含む先天性多発関節拘縮を有し、年齢とともに皮膚関節の過伸展性・脆弱性、巨大皮下血腫の反復、独特な手足の変形や手掌の皺が目立ってきていた (図2)。原因検索として、典型的ではないが出血症状から

*信州大学医学部附属病院 遺伝子診療部

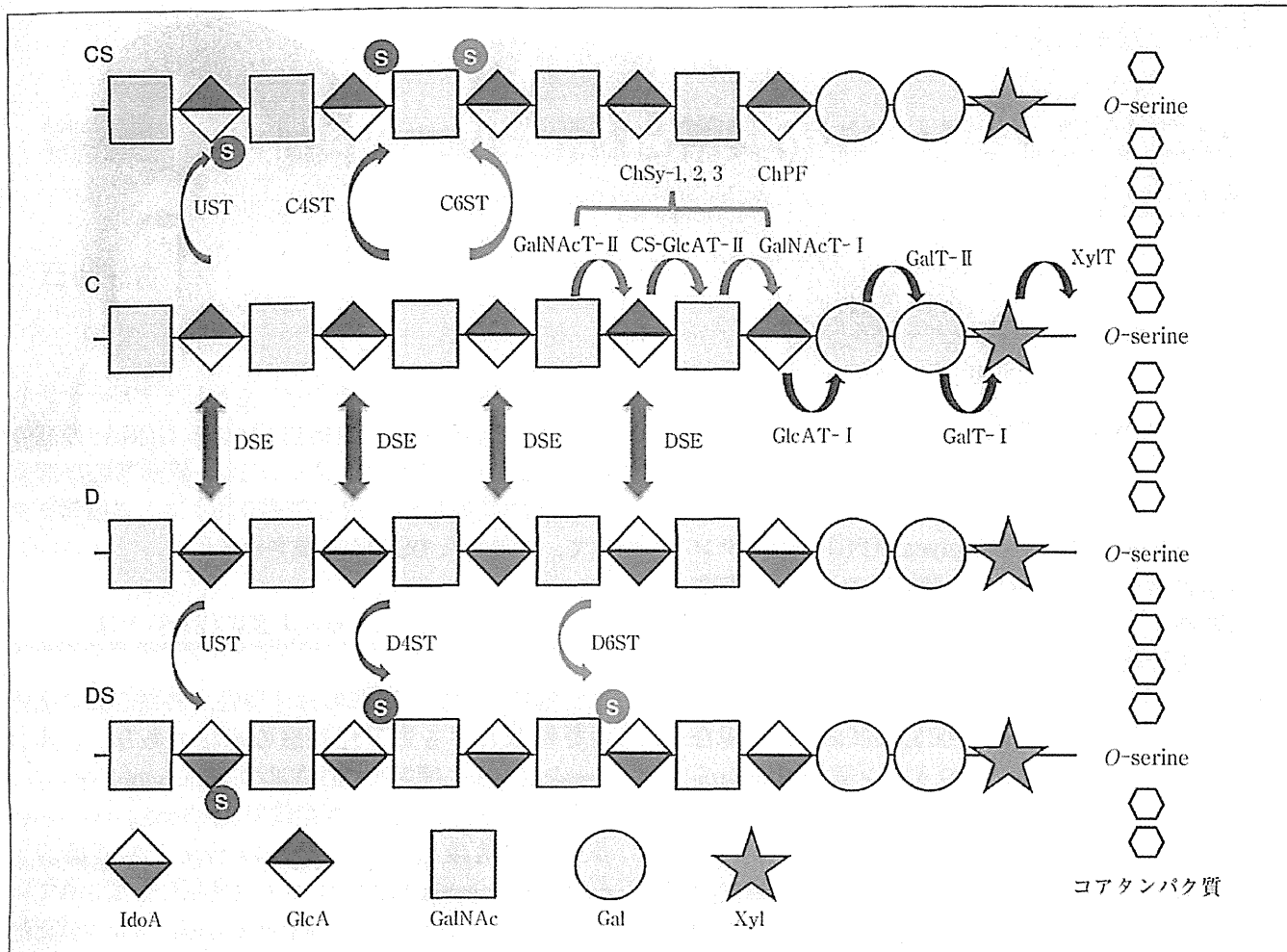


図1 デルマタン硫酸の生合成経路 C:コンドロイチン, D:デルマタン, ChPF:コンドロイチン重合因子, C4ST:コンドロイチン4-O-硫酸基転移酵素, C6ST:コンドロイチン6-O-硫酸基転移酵素, D6ST:デルマタン6-O-硫酸基転移酵素, 他の略語は本文参照。

表1 Ehlers-Danlos症候群の分類

大病型	古典型 classical type	1/20,000	AD	<i>COL5A1</i> , <i>COL5A2</i>
	関節可動性亢進型 hypermobility type	1/5,000~20,000	AD	大多数は不明, 少数例で <i>TNXB</i>
	血管型 vascular type	1/50,000~250,000	AD	<i>COL3A1</i>
	後側彎型 kyphoscoliosis type	1/100,000	AR	<i>PLOD</i>
	多発関節弛緩型 arthrochalasia type	約30人	AD	<i>COL1A1*</i> , <i>COL1A2*</i>
	皮膚脆弱型 dermatosparaxis type	8人	AR	<i>ADAMTS-2</i>
その他の病型	brittle cornea syndrome	11人	AR	<i>ZNF469</i>
	EDS-like syndrome due to tenascin-XB deficiency	10人	AR	<i>TNXB</i>
	progeroid form	3人	AR	<i>BIGALT7</i>
	cardiac valvular form	4人	AR	<i>COL1A2</i>
	EDS-like spondylocheirodysplasia	8人	AR	<i>SLC39A13</i>
	Kosho type (D4ST1-deficient EDS)	22人	AR	<i>CHST14</i>

AD:常染色体優性遺伝, AR:常染色体劣性遺伝。

COL5A1: V型プロコラーゲン α 1鎖遺伝子, *COL5A2*: V型プロコラーゲン α 2鎖遺伝子, *TNXB*: テナシン X 遺伝子, *PLOD*: リジルヒドロキシラーゼ遺伝子, *ADAMTS-2*: プロコラーゲン I N-プロテイナーゼ遺伝子, *ZNF469*: コラーゲン生合成・組織化に関わる転写因子の遺伝子, *BIGALT7*: β 4ガラクトース転移酵素-7 (GalT-1) 遺伝子, *SLC39A13*: 亜鉛トランスポーター機能をもつタンパク質の遺伝子, *CHST14*: デルマタン4-O-硫酸基転移酵素-1 (D4ST1) 遺伝子, *: スプライス異常によるエクソン6のスキップ。

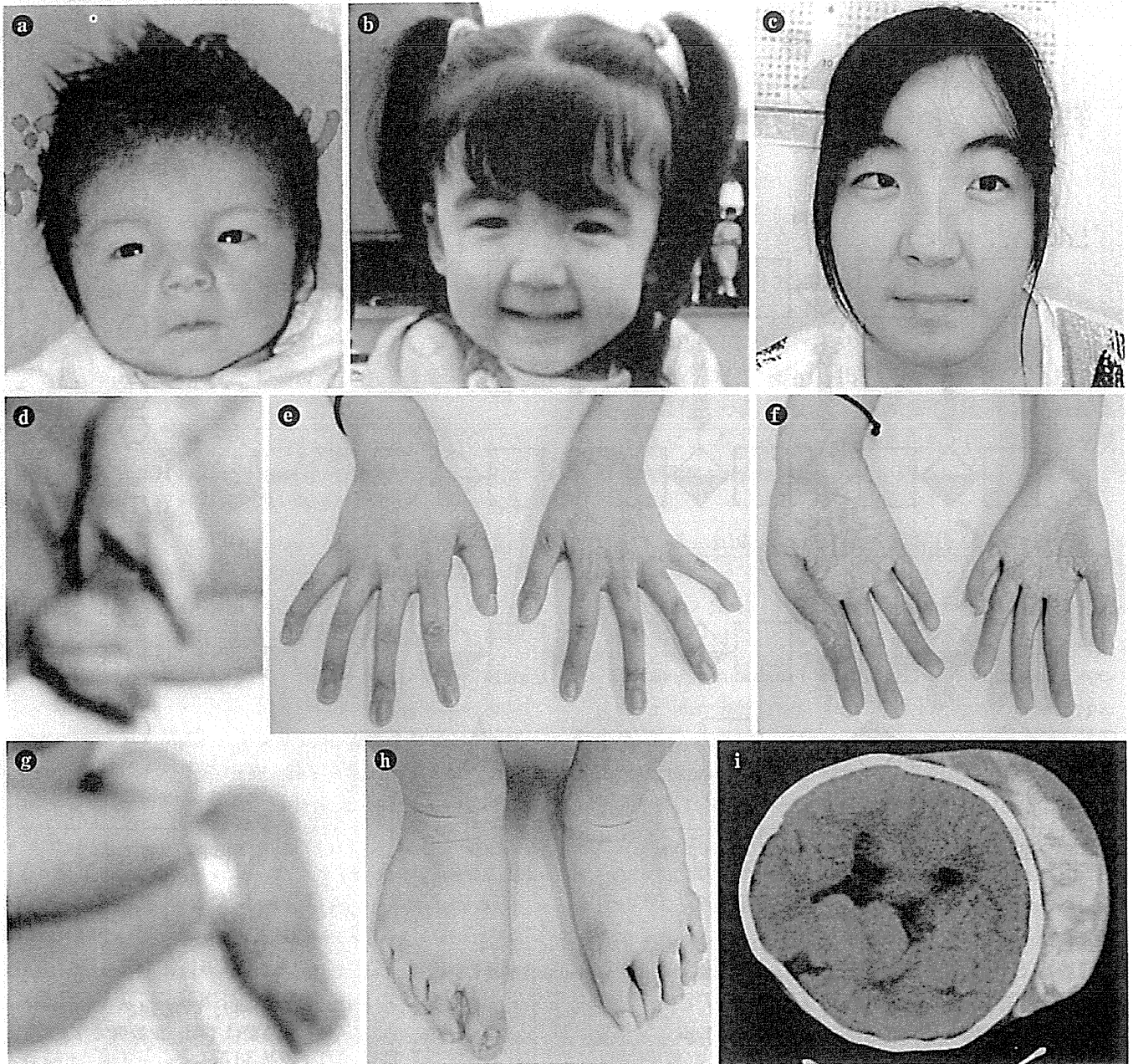


図2 1人目の患者における臨床写真 顔貌の変化, 日齢23 (a), 3歳 (b), 16歳 (c). 出生時~乳児早期には, 大きい大泉門, 眼間開離, 小さく垂れ下がった眼瞼裂, 青色強膜, 短い鼻, 低形成の鼻柱, 低位かつ後傾した耳介, 高口蓋, 長い人柱, 薄い上口唇, 小さい口, 小さく後退した下顎が認められ, 学童期以降, 下顎が突出した細長い顔になり, 左右非対称さを伴っていた. 手の変化, 出生時 (d), 16歳時 (e, f). 出生時, 内転母指を含む手指の拘縮が認められ, その後円筒状の特異な指形態を呈するとともに, 手掌の特異な皺が目立ってきた. 足の変化, 出生時 (g), 16歳時 (h). 出生時, 内反足が認められ, その後外反扁平足へと進展した. 巨大皮下血腫, 6歳時 (i). 転倒により, 頭部を打撲, 数時間で出血性ショックを伴う巨大皮下血腫に進展した.

血管型 EDS の可能性を考え, 培養皮膚線維芽細胞を用いた III 型コラーゲンタンパク分析を行ったが, III 型コラーゲンの産生は正常であった. 2 人目の患者に出会ったのは 2003 年である. 当時 26 歳の女性は両親血族婚, 1 人目と全く同様に出生時には内反足, 手指関

節拘縮, 顔貌上の特徴を認め, その後, 皮膚裂傷, 関節脱臼, 巨大皮下血腫など進行性の結合組織脆弱性を呈していた. これら 2 人は, これまでの分類には当てはまらない全く新しい型の EDS であると直感し, 論文文化を試みた. 文献検索をすると, 後側彎型 (旧分類

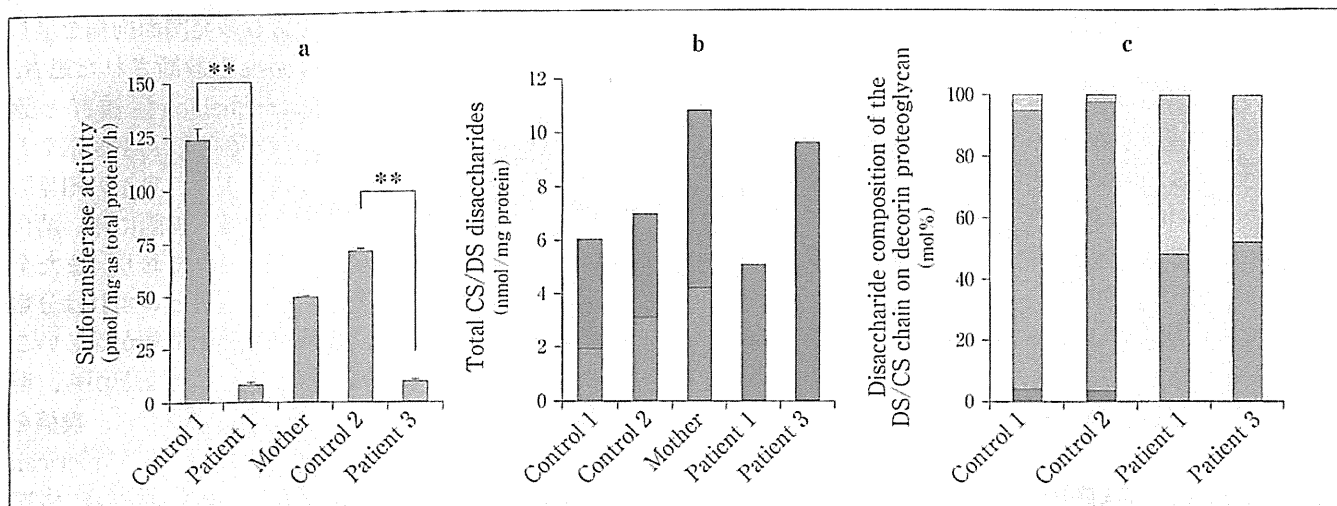


図3 糖鎖分析 Patient 1は1人目の患者を、Motherはその母親を、Patient 3は3人目の患者を示す。a: 培養皮膚線維芽細胞におけるデルマトンに対する硫酸基転移酵素活性。Patient 1, Patient 3の酵素活性は著明に減少し、Motherではコントロールの半分程度に減少している。b: 培養皮膚線維芽細胞中に含まれる全CS/DS量。CSを赤色で、DSを青色で示す。Patient 1およびPatient 3では全てCSになっている。c: DCNのGAG鎖に含まれるCS/DS組成。CS分画の[GlcA-GalNAc (4S)]をピンク色で、[GlcA-GalNAc (6S)]をオレンジ色で示し、DS分画の[IdoA-GalNAc (4S)]を青色で、[IdoA (2S)-GalNAc (4S)]を緑色で示す。正常コントロールではほぼDSであるが、Patient 1およびPatient 3では全てCSとなっている。

ではVI型)に類似した脊椎変形、皮膚や動脈の脆弱性を呈しているものの、後側彎型の病因である lysyl hydroxylase の欠損を認めない EDS VI B型 (lysyl hydroxylase の欠損を伴う通常の後側彎型は EDS VI A) に分類されていた Pakistan 姉弟例に酷似した臨床像であることを見出した²⁾。lysyl hydroxylase の欠損の有無をスクリーニング (尿デオキシピリジノリン/ピリジノリン比) したが、予想どおり正常パターンであり欠損はなかった。そこで、暫定分類を EDS VI B型として American Journal of Medical Genetics 誌に報告した³⁾。

IV. 原因遺伝子の単離

コラーゲン代謝に関わる酵素異常による常染色体劣性遺伝疾患を想定し、候補遺伝子スクリーニングを行ったが、原因遺伝子は見出せなかった。そんな中、2007年に3人目の患者と出会った。当時32歳の男性は両親血族婚、1, 2人目と同様の症状を有するとともに、成人してからは小腸憩室破裂、緑内障、気胸を呈していた。横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学松本直通教授、三宅紀子准教授との共同研究により、Affymetrix社の SNP 10K アレイを用いたホモ接合体マッピングを行ったところ、責任領域を15q15の8.1Mbに限

局 (Lod score 2.885) することができた。さらに、近傍のマикроサテライトマーカー解析を用いたハプロタイプ解析により責任領域を7.3Mbにまで狭小化した。同領域に局在する109遺伝子の中から機能的に関連性の疑われる7つの遺伝子を選択、変異解析を実施し、2008年秋、ついに原因遺伝子がD4ST1をコードするCHST14であることを突き止めた。その後、症状の酷似した3人の患者さん(32歳男性、19歳女性、4歳女兒)を見出し、CHST14変異スクリーニングを施行、全員に変異を同定した⁴⁾。しかしながら、糖鎖修飾酵素であるD4ST1の異常がどのような機序で全身結合組織の顕著な脆弱性を惹起するのかは、不明であった。

D4ST1のクローニングは米国 Washington 大学病理学の Baenziger 博士らの研究チームによって行われたが⁵⁾、熾烈なデッドヒートを演じていたのが北海道大学大学院先端生命科学研究所プロテオグリカンシグナリング医療応用研究室の菅原一幸教授、水本秀二博士研究員(当時は神戸薬科大学)らのチームであった⁶⁾。同研究室との共同研究により、患者由来培養皮膚線維芽細胞におけるD4ST1酵素活性は、コントロールに比べて著明に低下していること、保因者では半分程度に低下していることを明らかにした(図3a)。次に、培養皮膚線維芽細胞中に含まれるDSとCSの含有量を比較すると、コントロールではDS、CSともに存在

したが、患者由来細胞ではDSが消失し、CSのみとなっていた(図3b)。さらに、DSを含有する代表的なPGであるデコリン decorin (DCN) に着目した。DCNはDSからなる1本のGAG鎖を有するが、患者細胞においてはDSが消失し、全てCSになっていた⁵⁾(図3c)。DCNは、GAG鎖がコラーゲン細線維 collagen fibrils間の距離を調節することによって、これを密に束ね assembly, 細胞外マトリックスを形成するのに重要な役割を果たす。DCNが、糖鎖修飾酵素異常とコラーゲン・ネットワークの構築とをつなぐリンクになっている可能性が高まったのである。

V. 臨床病理学的特徴の解明

DCNのもつコラーゲン細線維の assembly 能と本症の結合組織脆弱性との関係を検討するために、三宅准教授、獨協医科大学皮膚科 旗持淳教授と協力し、病理学的検討を行った。HE染色による光顕観察では、患者においてはコントロールに比べ、コラーゲン線維束が繊細であった(図4a)。電顕観察では、患者においてはコントロールに比べ、コラーゲン細線維の径は同等であるが、ばらけて存在していた⁴⁾(図4a)。以上から、本症の結合組織脆弱性は、「D4ST1欠損→DCNに付加するGAG鎖の組成変化(DSが消失しCSに置換)→DCNが媒介するコラーゲン細線維の assembly 不全」により生じると結論づけた²⁾(図4b)。

VI. 疾患概念の確立へ向けて

インパクトの高い研究成果であることを確信し、松本研と協力して投稿の準備をしていた2009年12月11日、American Journal of Human Genetics 誌の online 版に、*CHST14*の変異に基づくD4ST1の欠損が、内転母指および内反足を特徴とする新しい先天性多発関節拘縮症 (arthrogryposis) “adducted thumb-club-foot syndrome (ATCS)” を引き起こすとの論文が発表された⁷⁾。臨床的検討は世界に先駆けてATCSの2家系を報告したトルコ Erciyes 大学遺伝学の Dündar 教授、両親血族婚の3家系を用いたホモ接合体マッピングで遺伝子を単離したのは1家系の報告をしていたオーストリア Innsbruck 医科大学小児科の Janecke 教授らのチーム、そして糖鎖解析を行ったのはまたもや Baenziger 教授らのチームであった。我々は、幼児～成人にかけての患者さんを見てきた中で、EDSとの臨床分類に確信をもっていたが、出生時には確かに特

徴的な手指の内転と内反足を含む多発関節拘縮を呈しており、一時的に arthrogryposis と診断された患者、arthrogryposis の1つ Freeman-Sheldon 症候群と診断された患者はいた。我々の発見したEDSKTとATCSが同一疾患か否か、これにより、我々の知見の価値が決まると考えられた。ATCSも加齢に伴い結合組織脆弱性が明らかになると言及されており、また全く同一の遺伝子変異もあり、同一疾患といずれは分類される予感があったが、縦断的な臨床情報が乏しいこと、皮膚病理組織を正常と解釈したことなどから、現時点で同一疾患とは結論できないと位置づけ、投稿を急いだ。そして2010年4月14日に臨床像が American Journal of Medical Genetics 誌に⁸⁾、5月25日に病態が Human Mutation 誌に⁴⁾受理された。

筆者らの報告にわずかに遅れる形で、EDSを含めた結合組織疾患の研究を長年引っ張ってきたベルギー Ghent 大学病院遺伝学 De Paepe 教授と Malfait 先生らのチームから、*CHST14*の変異に基づくD4ST1の欠損が、EDSVIBに分類されていた2家系(トルコ人、インド人)3患者の原因であると報告された。ATCS、EDSKTを含めて同一疾患と位置づけられ、musculo-contractural EDS (MCEDS) との名称が提案された⁹⁾。EDSKT、ATCS、MCEDSは同一遺伝子変異に基づくが臨床的には異なる allelic diseases なのか、同一疾患の家族間または年齢による variability といえるのかを結論づけるためには、ATCS患者において情報の乏しい学童以降の状況、またEDSKT患者において情報の乏しい乳幼児期の状況を把握することが不可欠と考えられた。ちょうどその折、埼玉県立小児医療センター 遺伝科 清水健司先生、大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療科 岡本伸彦部長から、それぞれ2歳、6歳の新たなEDSKT患者の紹介を受けた。この2人の臨床経過および身体所見に関する詳細な記載と、それまでEDSKT、ATCS、MCEDSとして報告された14家系22患者の包括的レビューを行い、これらが同一疾患であることを結論づけた¹⁰⁾。

この論文を投稿した5日後、Human Mutation 誌 online 版の Letter to the Editors に Janecke 教授らの意見が掲載された。Janecke 教授らは、ATCS、EDSKT、MCEDSはD4ST1欠損に基づく臨床的にも同一疾患であるが、EDSとの分類は臨床医にとっても、研究者にとっても混乱を招くものであると主張した。その根拠は、先天性多発関節拘縮、顔貌上の特徴、口唇口蓋裂、腸の異常、腎の異常、腎結石、筋緊張低下などEDSにおいて通常みられない症状があること、

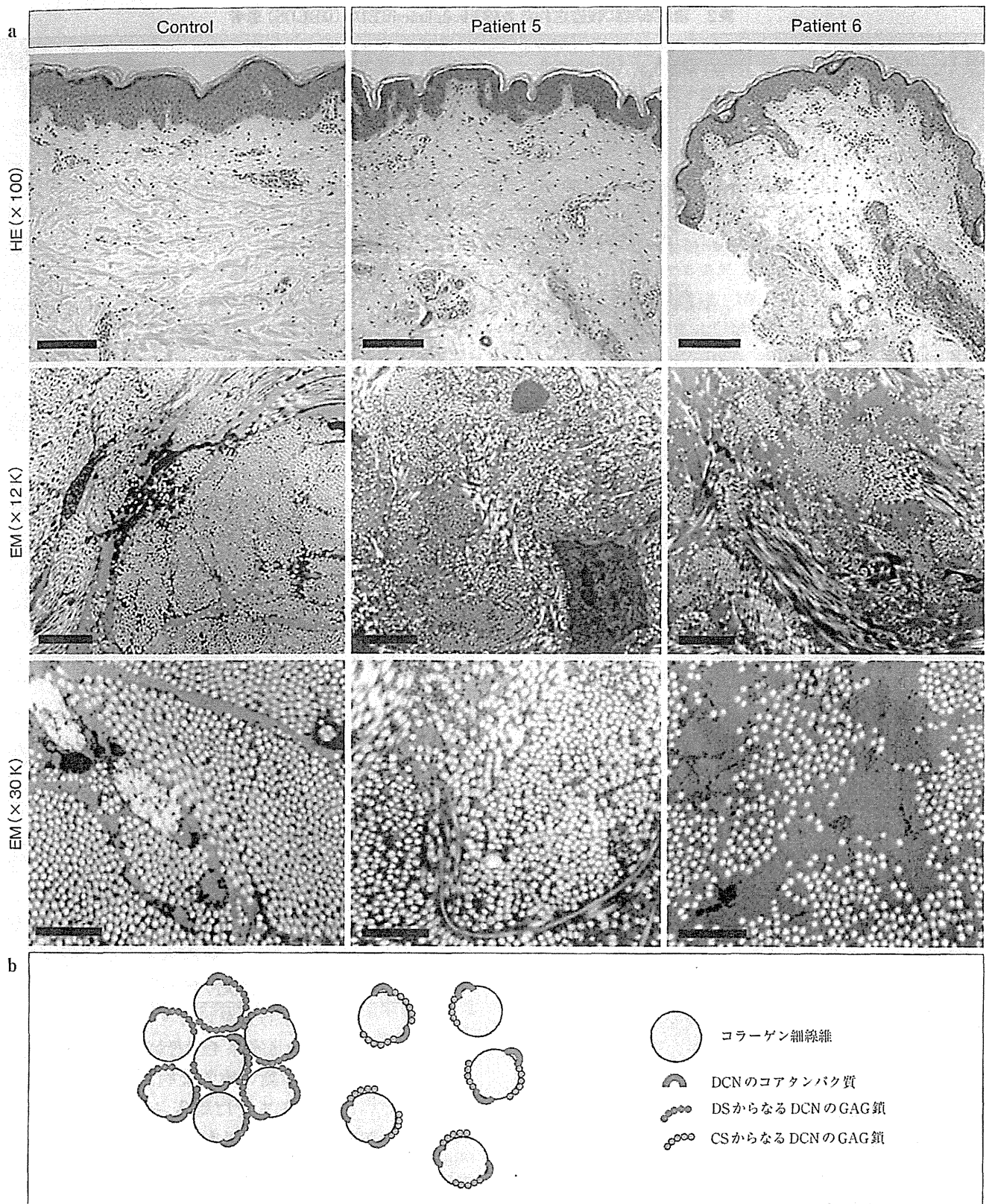


図4 臨床病理所見と想定される病態 a: 臨床病理所見. Patient 5は5人目, Patient 6は6人目の患者. 1段目はHE染色による光顕所見(スケールバーは500 μ m)である. 患者では, Controlに比べ, コラーゲン線維束が繊細に見える. 2段目, 3段目は電顕所見である(スケールバーは $\times 12$ Kが2 μ m, $\times 30$ Kが1 μ m). 患者では, コントロールに比べ, コラーゲン細線維の径は同等であるが, ばらけて存在している. b: 推定される皮膚脆弱性の病態. 左はコントロールで, 右が患者を示す. D4ST1欠損に基づきDCNに付加するGAG鎖の組成変化, すなわちDSが消失しCSに置換が生じ, DCNが媒介するコラーゲン細線維のassembly不全をきたす.

表2 現在までに報告された D4ST1-deficient EDS (DDEDS) 患者

患者	家系	出身	CHST14変異	性別	論文発表時年齢	文献
1	1	トルコ	V49X homo	女	3.5歳	Dündar et al. 1997
2				男	1.5歳	
3				女	6歳	
4	2	日本	Y293C homo	男	4歳	Sonoda and Kouno 2000
5				男	7ヵ月	
6	3	オーストリア	R213P homo	男	0日 [†]	Janecke et al. 2001
7				男	12ヵ月	
8	4	トルコ	[R135G;L137Q] homo	女	1~4ヵ月 [†]	Dündar et al. 2001
9				男	1~4ヵ月 [†]	
10				男	1~4ヵ月 [†]	
11				男	3ヵ月	
12	5	日本	P281L/Y293C	女	11歳	Kosho et al. 2005
13	6	日本	P281L homo	女	14歳	Kosho et al. 2005
14	7	日本	P281L homo	男	32歳	Kosho et al. 2010
15	8	日本	K69X/P281L	男	32歳	Yasui et al. 2003
						Kosho et al. 2010
16	9	日本	P281L/C289S	女	20歳	Kosho et al. 2010
17	10	日本	P281L/Y293C	女	4歳	Kosho et al. 2010
18	11	トルコ	V49X homo	女	22歳	Malfait et al. 2010
19				女	21歳	
20	12	インド	E334Gfs*107 homo	女	12歳	Malfait et al. 2010
21	13	日本	P281L/Y293C	男	2歳	Shimizu et al. 2011
22	14	日本	F209S/P281L	男	6歳	Shimizu et al. 2011
23	15	オランダ	V48X homo	女	20歳	Voermans et al. 2012
24	16	アフガニスタン	R274P homo	女	11歳	Mendoza-Lodondo et al. 2012
25				女	0歳	
26	17	ミッコスキー	G228Lfs*13	女	16歳	Winters et al. 2012

homo: ホモ接合性変異, †: 論文発表時には死亡.

Yasui, H., Adachi, Y., Minami, T. et al.: Combination therapy of DDAVP and conjugated estrogens for a recurrent large subcutaneous hematoma in Ehlers-Danlos syndrome. *Am J Hematol* 2003, 72: 71-72

Voermans, N.C., Kempers, M., Lammens, M. et al.: Myopathy in a 20-year-old female patient with D4ST-1 deficient Ehlers-Danlos syndrome due to a homozygous CHST14 mutation. *Am J Med Genet Part A* 2012, 158A: 850-855

Mendoza-Lodondo, R., Chitayat, D., Kahr, W.H. et al.: Extracellular matrix and platelet function in patients with musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome caused by mutations in the CHST14 gene. *Am J Med Genet Part A* 2012, 158A: 1344-1354

Winters, K.A., Jiang, Z., Xu, W. et al.: Re-assigned diagnosis of D4ST1-deficient Ehlers-Danlos syndrome (adducted thumb-clubfoot syndrome) after initial diagnosis of Marden-Walker syndrome. *Am J Med Genet Part A* 2012, 158A: 2935-2940

および分子病態がEDSと異なること、であった。そして、「Dermatan sulfate-deficient adducted thumb-clubfoot syndrome」という疾患名が妥当であると結論づけた¹¹⁾。これに対し、我々は、先の論文を引用しながら、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・関節・靭帯・血管・内臓など組織脆弱性を全て有する点、先天性多発関節拘縮など通常EDSではみられない症状があることはEDSを否定することにはならない点、健康管理上もEDSの診断が妥当である点、そして病因論的にも、DCNを介したコラーゲン細線維のassembly不全が示されている点から、本症はEDSに臨床分類するのが妥当であることを主張し、D4ST1-deficient EDS (DDEDS) との疾患名が妥当であるとした¹²⁾。

Ⅶ. DDEDSの症状, 自然歴, 健康管理

その後、海外より3家系4患者が相次いで報告され、本症が比較的頻度の高い重要な病型である可能性が示唆されている。現在までに報告された17家系26患者の概要を表2に示す¹³⁾。日本人が9家系10患者で最多であり、男女比はほぼ均等(男12人, 女14人)、発表時年齢は1~4ヵ月から30歳代前半までと幅広かった。症状は、進行性結合組織脆弱性(皮膚過伸展・脆弱性、全身関節弛緩・慢性脱臼・変形、巨大皮下血腫など)および発生異常(顔貌の特徴、先天性多発関節拘縮など)からなる多彩で特徴的なものである¹²⁾(表3)。これらの症状、自然歴を踏まえ、我々は以下のような健