

201324111B

厚生労働科学研究費補助金  
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

平成24年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 古庄 知己

平成26(2014)年 3月

# 目 次

## I. 総合研究報告書

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 .....	1
古庄知己	
(資料 1) 研究班組織と流れ図	
(資料 2) ロードマップ	
(資料 3) 疾患概要 (日本語)	
(資料 4) 疾患概要 (英語)	
(資料 5) 平成 24 年度統合班会議案内	
(資料 6) 平成 25 年度統合班会議案内	
(資料 7) 平成 24 年度日本遺伝カウンセリング学会プレゼンテーション	
(資料 8) 平成 24 年度日本人類遺伝学会プレゼンテーション	
(資料 9) 平成 25 年度日本小児遺伝学会プレゼンテーション (優秀演題賞)	
(資料 10) 平成 25 年度日本小児科学会プレゼンテーション (最優秀演題賞「広島県知事賞」)	
(資料 11) 平成 25 年度日本人類遺伝学会プレゼンテーション	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	135
--------------------------	-----

III. 研究成果の刊行物・別刷 .....	139
------------------------	-----

# I. 総合研究報告

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

研究代表者 古庄知己 信州大学医学部附属病院遺伝子診療部

### 研究要旨

エーラスダンロス症候群（Ehlers-Danlos Syndrome; 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、頻度は1/5000人とされる。研究代表者らは、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の新病型を見出した（*Kosho et al., 2005; Kosho et al., 2010*）。さらに、原因遺伝子がデルマトン4-O-硫酸基転移酵素-1（D4ST1）をコードするCHST14であること、本症における進行性結合組織脆弱性は「D4ST1の欠損→デコリンに付加するグリコサミノグリカン鎖の組成変化（正常ではデルマトン硫酸[DS]であるが、患者ではコンドロイチン硫酸[CS]に置換）→デコリンを介するコラーゲン細線維のassembly不全」によることを明らかにした（*Miyake et al., 2010*）。ほぼ同時に、稀な多発関節拘縮症”Adducted thumb-clubfoot syndrome”および他のEDS患者においてCHST14変異が見出された（*Diindar et al., 2009; Malfait et al., 2010*）。研究代表者らは、詳細な臨床的検討から、これらを同一疾患と結論付け、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（D4ST1-deficient EDS ; DDEDS）と命名、その診療指針を提案した（*Shimizu et al., 2011; Kosho et al., 2011*）。

本研究班は、臨床遺伝、遺伝子解析、病理解析、糖鎖医学解析、再生医療、遺伝子治療の専門家の叡智を結集し、DDEDSの自然歴および健康管理指針の構築と根治療法の開発を目指すことにより、進行性の結合組織脆弱性病変に苦しむ患者のQOLを向上させることである。臨床的検討、遺伝子解析、病理解析、糖鎖医学的検討、iPS細胞を用いた病態解析、ノックアウト（*Chst14<sup>-/-</sup>*）マウスを用いた病態解析、アデノ随伴ウイルス（AAV）を用いた遺伝子治療の開発といったプロジェクトが有機的に連携しながら動いている。

**臨床的検討：**平成24年度～25年度、本研究班においては、新たに3家系4患者が確定診断され、現時点で論文誌上の発表、研究会での報告を加え合計30家系41患者が見出されている。DDEDSは比較的頻度の高い重要なEDSの1病型と考えられる。患者のQOLまた時には生命を左右するきわめて重要な合併症である反復性巨大皮下血腫への予防対策としてDDAVP（デスマプレッシン）点鼻療法が3患者に試され、いずれもきわめて有用であった。3患者において系統的な聴覚評価が行われ、高音部の聴力低下が示された。今後、国内外での診断要請に応えられる臨床的遺伝子解析体制の構築が期待される。

**遺伝子解析：**本症と臨床的に診断されたが、CHST14変異が検出されなかった8患者について、第2の疾患遺伝子を同定するために全エクソームシーケンスを行った。EDSの既知遺伝子内に3家系においてそれぞれ1つのsequence variantsが認められたが、その病的意義は明らかでない。EDS関連既知遺伝子に変異を認めない5家系では、2家系以上に共通してsequence variantsの認められる遺伝子は認められず、遺伝的異質性が示唆された。

**病理解析：**平成 24 年度、患者皮膚の病理解析を施行、光顕では、表皮が薄く波打っている、表皮直下の真皮のコラーゲン線維束が繊細になっている、といった特徴が認められた。抗デコリン抗体を用いた免疫組織化学分析では、コントロールではコラーゲン線維束に不均一ながらべったりと抗デコリン抗体により染色されたが、患者ではコラーゲン線維束に沿って filamentous に染色された。Cupromeronic blue (CB) 染色を用いた電顕分析により、患者の真皮のコラーゲン細線維を束ねるデコリンの GAG 鎖を観察することに成功した。平成 25 年度、ノックアウト (*Chst14*<sup>-/-</sup>) マウスの皮膚病理解析を施行、ヘテロ (*Chst14*<sup>+/-</sup>) マウス、WT マウスと比較して、HE 染色では皮膚真皮膠原線維束の好酸性が低下し、抗デコリン免疫組織化学では粘膜固有層のデコリン陽性線維の分布が粗になっていた。Cupromeronic blue (CB) 染色を用いた電顕分析ではコラーゲン細線維に付着する GAG 鎖が不鮮明であり、コラーゲン細線維径の大小不同が目立っていた。また胃粘膜については粘膜固有層のデコリン陽性線維の分布が粗になっていた。

**糖鎖医学的検討：**尿中 CS/DS 分析を施行、健常人尿中には DS が検出されたが、患者では全く DS 鎖が検出されなかったことから、本所見は診断においても、治療効果の評価においても、無侵襲で有用な指標と考えられた。c.2\_10TGTTCCCCdel (homo); p.Met1? という変異を有する新規患者由来の線維芽細胞では、わずかに DS 鎖の合成が認められ、DS 合成状態と臨床症状との関係が注目された。ノックアウト (*Chst14*<sup>-/-</sup>) マウスの尿および皮膚においても、患者同様 DS が消失しており、同マウスが病態を再現していることが示された。

**iPS 細胞を用いた病態解析：**1 人の DDEDS 患者由来 iPS 細胞を樹立、さらに 2 人分を作成中である。iPS 細胞としての未分化能および多能性は、健常人由来 iPS 細胞と同等であった。患者 iPS 細胞を SKID マウスに移植することにより生じた奇形種では、患者組織と同様に、デコリン染色状態が低下しており、「デコリンによるコラーゲン細線維の assembly 不全」という DDEDS の病態の本質を再現していると考えられた。以上から、今回樹立した iPS 細胞は疾患モデルとして適切であると考えられた。神経細胞への分化誘導に成功、患者由来 iPS 細胞の方が、健常人由来 iPS 細胞に比べて、分化誘導効率が低下している傾向が示され、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。また、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、心筋細胞への分化へも成功した。

**ノックアウトマウスを用いた病態解析：**既に樹立されたヘテロ (*Chst14*<sup>+/-</sup>) マウスの凍結精子を用いて凍結受精卵を作製、個体を復元した。ヘテロマウスを交配し、ホモ (*Chst14*<sup>-/-</sup>) マウスを得る一方、スピードコンジェニック法により C57BL/6J 系統を遺伝的背景に持つホモ (*Chst14*<sup>-/-</sup>) マウスの作出を試みた。しかし、C57BL/6J への置換率が高くなるほど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、表現型、糖鎖医学的、生理学的検討を行った。DDEDS 患者同様尿や皮膚中 DS の著減を呈し、D4ST1 酵素活性喪失に基づく病態を再現していると考えられた。ホモ (*Chst14*<sup>-/-</sup>) マウスは、ヘテロ (*Chst14*<sup>+/-</sup>) マウス、WT 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、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*<sup>-/-</sup> 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。以上から、ホモ (*Chst14*<sup>-/-</sup>) マウスは DDEDS 患者で認められるような進行性全身結合組織脆弱性を再現しており、治療実験に利用できるモデル動物と位置付けられた。

**遺伝子治療研究：**ヒト *CHST14* 遺伝子またはマウス *Chst14* 遺伝子を組み込んだ AAV ベクターを感染させたヒト腎臓由来の 293 細胞およびヘテロ (*Chst14*<sup>+/-</sup>) マウス由来皮膚線維芽細胞においては、ネガティブコントロールと比較して、3 倍以上の有意な硫酸基転移活性上昇を示し、遺伝子導入した D4ST1 タンパクが機能性であることが示された。さらに、D4ST1 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。

## 研究分担者

小林身哉（金城学院大学・生活環境学部食環境栄養学科・教授）  
菅原一幸（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・教授）  
福嶋義光（信州大学医学部遺伝医学・予防医学講  
座・教授）  
籀持淳（獨協医科大学皮膚科・教授）  
武田伸一（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・部長）  
佐々木克典（信州大学医学部・組織発生学講座・  
教授）  
中山淳（信州大学大学院医学系研究科・分子病理  
学・教授）  
松本直通（横浜市立大学大学院医学研究科遺伝  
学・教授）  
野村義宏（東京農工大学農学部・硬蛋白質利用研  
究施設・准教授）  
岡田尚巳（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・室長）  
三宅紀子（横浜市立大学大学院医学研究科遺伝  
学・准教授）  
岳鳳鳴（信州大学医学部・組織発生学講座・助教）  
水本秀二（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・博士研究員、現・  
名城大学・薬学部・病態生化学研究室）

## A. 研究目的

**Ehlers-Danlos 症候群 (EDS)** は、皮膚の過伸展性、関節弛緩など結合組織の脆弱性を持つ先天性疾患の総称であり、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。最近、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。全病型を合わせた推定頻度は約 1/5000 人とされている。

**新型 EDS (EDS, Kosho Type)** は、EDS 班の活動

において発見した、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 である (Kosho et al., *Am J Med Genet* 138A: 282-287, 2005 ; Kosho et al., *Am J Med Genet* 152A: 1333-1346, 2010)。両親血族婚の 2 家系を対象としたホモ接合性マッピング、ハプロタイプ解析で候補領域を 6.3Mb まで狭め、この領域に存在する遺伝子 *CHST14* が本疾患の責任遺伝子であることを突き止めた。*CHST14* は、デルマタン 4-O-硫酸基転移酵素-1 (D4ST1) をコードする遺伝子であり、発症機構として「D4ST1 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 (デルマタン硫酸[DS]が消失し、コンドロイチン硫酸[CS]に置換する)→デコリンが媒介するコラーゲン細線維の assembly 不全」という病態を示した (Miyake et al., *Hum Mutat* 31: 966-974, 2010)。ほぼ同時に、D4ST-1 の欠損が、内転母指および内反足を特徴とする新しい多発関節拘縮症 “adducted thumb-clubfoot syndrome (ATCS)” (Dündar et al., *Am J Hum Genet* 85: 873-882, 2009)、および、後側彎型 EDS の亜型に分類されていた一部の患者 (Musculocontractural EDS ; MCEDS) (Malfait et al., *Hum Mutat* 31: 1233-1239, 2010) の原因であると報告された。そして、ATCS の発見グループからは、本症は「dermatan sulfate-deficient ATCS」と命名すべきであり、EDS との分類は不適切であるとの主張が展開された。その根拠は、本症においては先天性多発関節拘縮、顔貌上の特徴、口唇口蓋裂、腸・腎の異常、筋緊張低下など通常 EDS には見られない症状があること、分子病態が EDS とは異なることであった (Janecke et al., *Hum Mutat* 32: 484-485, 2011)。

平成 21-23 年度 EDS 班 (研究代表者：古庄知己) の活動において、新たに見出した EDSKT の 2 症例と既報告の EDSKT、ATCS、MCEDS 合計 20 症例の臨床像を包括的かつ詳細に分析し、これらが D4ST1 欠損に基づく臨床的に同一の疾患であり、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) に特徴付けられる EDS の新病型と結論付けた。さらに、D4ST1-deficient EDS (DDEDS) と命名するとともに以下の診療指針を提案した (Shimizu et al., *Am J Med Genet* 155A: 1949-1958, 2011; Kosho et al., *Hum Mutat* 32: 1507-1509, 2011;

<診療指針の構築>

診断	<p>新生児期、顔貌上の特徴（大きい大泉門、眼間開離、小さく、眼瞼裂斜下、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、内反足を含む多発関節拘縮）で疑い、<i>CHST14</i> 遺伝子解析を行う。</p> <p>診断時の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。</p>
乳幼児期	<p>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を行う。</p> <p>便秘に対して緩下剤投与、浣腸を行う。</p> <p>男児では停留精巣に対する固定術を行う。</p>
定期検診	<p>整形外科：足部変形、脊椎変形。</p> <p>眼科：斜視、屈折異常、緑内障。</p> <p>耳鼻科：滲出性中耳炎、難聴。</p> <p>泌尿器科：排尿障害、膀胱拡張。</p> <p>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。</p>
外傷対策	<p>転倒などの外傷により、皮膚裂傷、関節脱臼を生じやすい。</p> <p>巨大皮下血腫については、DDAVP 点鼻療法が有効。</p>
思春期以降	<p>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）。</p> <p>（血）気胸、憩室穿孔に対する治療。</p>
その他	<p>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）。</p>

本研究班は、臨床遺伝、遺伝子解析、病理解析、糖鎖医学解析、再生医療、遺伝子治療の専門家の叡智を結集し、DDEDS の自然歴および健康管理指針の構築と根治療法の開発を目指すことにより、進行性の結合組織脆弱性病変に苦しむ患者の QOL を向上させることである。以下のプロジェクトが有機的に連携しながら動いている。

- ① 臨床的検討
- ② 遺伝子解析
- ③ 病理解析
- ④ 糖鎖医学的検討
- ⑤ iPS 細胞を用いた病態解析
- ⑥ モデルマウスを用いた病態解析
- ⑦ 遺伝子治療の開発

B. 研究方法

①臨床的検討

本研究班における解析状況および国内外の研究施設における解析状況を収集することにより、全患者のリストアップを試みた。

②遺伝子解析

直接シーケンスによる *CHST14* 遺伝子解析を継続するとともに、臨床的に疑われたが変異陰性であった 8 患者に対して次世代シーケンサを用いた全エクソーム解析を行った。

SureSelect Human All Exon kit (Agient 社)を用いてゲノム分画を行い、HiSeq2000 および HiSeq2500 (Illumina 社) で大量塩基配列解読を行った。 novoalign (mapping), GATK (variant call), ANNOVAR (annotation) を用いた解析フローを使用し、In-house exome data, ESP6500, dbSNP135 (common), dbSNP137(common) に登録のある病的ではないと考えられる variants は候補から除外し、まず EDS の既知遺伝子に認められる variants を確認した。

表 EDS を引き起こす既知遺伝子

遺伝子名	EDS 病型 (遺伝形式)
<i>ADAMTS2</i>	Type VIIc (AR)
<i>B3GALT6</i>	Progeroid type (AR)
<i>B4GALT7</i>	Progeroid type (AR)
<i>CHST14</i>	D4ST1 deficient EDS, Kosho type (AR)
<i>COL1A1</i>	Arthrochalasia type (AD)
<i>COL1A2</i>	Arthrochalasia type (AD)
//	Cardiac valvular form (AR)
<i>COL3A1</i>	Vascular-type (AD)
<i>COL5A1</i>	Classical type (AD)
<i>COL5A2</i>	Classical type (AD)
<i>DSE</i>	Musculocontractural (AR)
<i>FKBP14</i>	Variant type (AR)
<i>FLNA</i>	EDS with heterotopia, periventricular (XR)
<i>MTHFR</i>	Type IV (AR)
<i>PLOD1</i>	Kyphoscoliosis type (AR)
<i>SLC39A13</i>	Spondylocheiro dysplastic form (AR)
<i>TNXB</i>	EDS like due to tenascin-XB deficiency (AR)

### ③病理解析

#### 【患者組織の病理解析】

#### 対象

P281L/Y293C を有する 3 患者、P281L/C289S を有する 1 患者、および健常人の皮膚検体を対象とした。

#### 光顕分析

4 患者および健常人 1 人皮膚由来パラフィンブロックを用いて、AZAN 染色を行い観察した。

#### 抗デコリン抗体を用いた免疫組織化学分析

3 患者および健常人 1 人皮膚由来パラフィンブロックを抗ヒト・デコリン抗体 (マウスモノクローナル抗体) で染色し、観察した。

#### Cupromeronic blue (CB) 染色を用いた電顕分析

3 患者由来皮膚検体をグルタルール固定後、洗浄し、GAG 鎖に特異的に反応する 0.05% (w/v) Cupronic blue 液で染色した。洗浄後、0.034M sodium tungstate で後染色した。洗浄、脱水、包埋し、観察した。

#### 【ノックアウトマウスの病理解析】

#### 対象

一般光顕観察、抗デコリン抗体を用いた免疫組織化学解析においては、3 か月齢のホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) マウス、ヘテロ (*Chst14<sup>+/-</sup>*) マウス、WT マウス

の背部皮膚および胃粘膜を解析した。

Cupromeronic blue (CB) 染色を用いた電顕分析においては、1 歳齢の *Chst14<sup>-/-</sup>* マウス、*Chst14<sup>+/-</sup>* マウス、WT マウスの皮膚を解析した。

#### 一般光顕・免疫組織化学分析

組織を 20% 中性緩衝ホルマリン液で固定した後、パラフィン切片を作成し、HE 染色とビオチン化抗マウスデコリン抗体 (polyclonal goat IgG, R&D Systems) を用いた免疫染色を行った。

#### 電顕分析 (Cupromeronic blue[CB] 染色)

グルタルール固定後、洗浄し、GAG 鎖に特異的に反応する 0.05% (w/v) Cupronic blue 液で染色した。洗浄後、0.034M sodium tungstate で後染色した。洗浄、脱水、包埋し、観察した。

#### ④糖鎖医学的検討

#### 患者の尿中のコンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸の定量と構造解析

5 人の患者 (P281/Y293C が 2 人、P281L/homo が 2 人、P281L/C289S が 1 人) 由来の尿を、限外濾過膜を用いて遠心濃縮後、次に細菌由来のコンドロチナーゼ ABC (CS、DS 両方を二糖単位にまで切断する)、コンドロチナーゼ AC (CS 部分を二糖単位にまで切断し、DS 部分には作用しない)、コンドロチナーゼ B (DS 様構造部分のみを二糖単位にまで切断し、CS 様構造部分には作用しない) で消化後、陰イオン交換 HPLC で各二糖組成の分析と CS および DS 様構造の定量を行った。

尿検体が得られた DDEDS 患者と同姓で年齢が同一もしくは近い 5 人の健常人由来の尿を、限外濾過膜を用いて遠心濃縮後、次にコンドロチナーゼ ABC、コンドロチナーゼ AC、コンドロチナーゼ B で消化し、陰イオン交換 HPLC で各二糖組成の分析と CS および DS 鎖の定量を行った。

#### EDS 患者の繊維芽細胞由来が産生するコンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸の定量と構造解析

c.2\_10TGTTCCCCCdel (homo); p.Met1? という変異を有する EDS 患者および未分類型 EDS 患者由来の繊維芽細胞を培養後、80% コンフルエントに達した後、繊維芽細胞用の完全無血清培地

(COSMEDIUM H001)で3日間培養し、コンディションドメEDIUMを回収した。限外ろ過膜を利用した遠心濃縮カラム(AmiconUltra-4, 10k)で濃縮し、次に細菌由来のコンドロチナーゼ ABC、コンドロチナーゼ AC、コンドロイチナーゼ B で消化後、消化物の陰イオン交換 HPLC で各二糖組成の分析と CS および DS 鎖の定量を行った。

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

研究分担者の国立精神・神経医療研究センター神経研究所・武田伸一博士、岡田尚巳博士らによって作製された *CHST14* 遺伝子または *Chst14* 遺伝子導入アデノ随伴ウイルス (AAV) を感染させたヒト腎臓由来 293 細胞とヘテロ (*Chst14*<sup>+/−</sup>) マウス由来皮膚線維芽細胞を用いて、D4ST 活性を測定した。それらのホモジェネートを酵素源とし、<sup>35</sup>S 標識した活性硫酸 (<sup>35</sup>S-PAPS) を硫酸基供与体、脱硫酸化 DS を受容体基質として、37°C で数時間反応させ、ゲルろ過により、反応生成物 (<sup>35</sup>S-デルマタン) を分離した。得られた画分を液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定し、硫酸基の転移活性とした。

#### ノックアウトマウスの皮膚・尿中のコンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸の定量

ホモ (*Chst14*<sup>−/−</sup>) マウス由来皮膚から、アクチナーゼ処理、トリクロロ酢酸処理、エタノール沈殿、限外ろ過膜による濃縮・脱塩によって、グリコサミノグリカン抽出・精製した。得られた DS、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸を含むグリコサミノグリカン画分を、細菌由来のコンドロチナーゼ ABC、コンドロチナーゼ AC、コンドロイチナーゼ B で消化後、陰イオン交換 HPLC で各二糖組成の分析と CS および DS 様構造の定量を行った。

ホモ (*Chst14*<sup>−/−</sup>) マウス由来の尿を限外ろ過膜で遠心濃縮後、コンドロチナーゼ ABC、コンドロチナーゼ AC、コンドロイチナーゼ B で消化し、陰イオン交換 HPLC で各二糖組成の分析と CS および DS 鎖の定量を行った。

#### ⑤iPS 細胞を用いた病態解析

##### 対象

P281L/Y293C を有する DDEDS 女性患者

(Patient 12、表 1 に準じる) の皮膚線維芽細胞より熊本大学で樹立された iPS 細胞 (A108) および健常人より京都大学で樹立された iPS 細胞 (201B7、235G) を対象とした。さらに、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 細胞樹立を試みている。

##### ゲノム異常の検証

DDEDS 患者由来の iPS 細胞からゲノム DNA を抽出し、*CHST14* 遺伝子のタンパク質翻訳領域をカバーするよう PCR プライマーを設計し PCR-ダイレクトシーケンスを行った。さらに、iPS 細胞樹立に際して獲得されたコピー数変異の有無を検証するため、同一患者の血液由来のゲノム DNA と iPS 細胞由来のゲノム DNA に対してコピー数解析を行った。アレイは CytoScan HD (Affymetrix 社) を使用し、Chromosome Analysis Suite Software (Affymetrix 社) を用いて解析を行った。

##### DDEDS 患者由来 iPS 細胞の性質についての検討

形態：A108 および 201B7 をマウス胚線維芽細胞 (MEF) 上に成長させ、iPS 細胞コロニーの形態を観察した。

アポトーシス解析：A108 および 201B7 の iPS 細胞コロニーに対して TUNEL 染色を行い、アポトーシスを分析した。

未分化能の検討：A108 および 201B7 の iPS 細胞コロニーに対して、未分化状態のマーカーである Oct3/4、Nanog、SSEA-3、SSEA-4 の免疫染色を行い、未分化状態を分析した。

多能性の検討：A108 の胚様体 (EB) を作成し、自然分化させ、免疫染色と RT-PCR により、三胚葉のマーカー (内胚葉：Foxa2, Pdx1；中胚葉：Nkx2.5, Brachyury；外胚葉：Nestin) について多能性を検討した。さらに、A108 の iPS 細胞を SKID マウスに移植し、奇形種発生の有無、発生していればその組織を検討した。

A108 の iPS 細胞由来の奇形種におけるデコリンおよび I 型コラーゲンの分布を免疫染色で検討した。

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。

### 神経細胞への分化誘導

A108 および 201B7 の iPS 細胞を用いて、神経系への分化誘導を行った (表 1)。神経形成を確認するために、神経前駆細胞マーカーである Nestin、Pax6 の発現を、RT-PCR と Real time-PCR により検討した。神経分化効率を確認するために、TujIII、MAP2 抗体を用いた免疫染色および Map2 遺伝子の Real time-PCR 分析を行った。

A108 および 201B7 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。

さらに、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。

### 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。

## ⑥モデルマウスを用いた病態解析

### *Chst14*<sup>-/-</sup>コンジェニック系統作出

米国の非営利的マウス供給センター (Mutant Mouse Regional Resource Centers ; MMRRC) より提供されたヘテロ (*Chst14*<sup>+/-</sup>) マウスの凍結精子を用いて凍結受精卵を作製 (株式会社トランスジェニックに受託) 後、国立精神・神経医療研究センター神経研究所にて個体を復元した。遺伝的背景を均一化するため C57BL/6J 系統への戻し交配を行った。戻し交配の期間を短縮するために、マイクロサテライトマーカー解析を用いたスピードコンジェニック法を行った。尻尾から抽出したゲノム DNA に特異的な 58 種類のマーカーに対応したプライマーを用いて PCR を行い、増幅産物のサイズを区別することで C57BL/6J 系統への置換率を評価した。

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*<sup>+/-</sup>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。

### ホモ (*Chst14*<sup>-/-</sup>) マウスの表現型解析

**形態観察**：ヘテロ (*Chst14*<sup>+/-</sup>) マウスの雌雄を交配させて作出したホモ (*Chst14*<sup>-/-</sup>) 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、HE 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。

### ⑦遺伝子治療の開発

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 D4ST1 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、D4ST1 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 D4ST1 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*<sup>+/+</sup> および *Chst14*<sup>-/-</sup> 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。

### 倫理面への配慮

本研究は、(1) 人を対象とした遺伝子解析研究、臨床研究、患者由来検体を用いた病態解析研究、(2) iPS 細胞を用いた病態解析研究、(3) 疾患動物モデルを用いた基礎的研究、(4) 遺伝子治療の開発研究からなる。

人を対象とした遺伝子解析研究、臨床研究、患者細胞を用いた病態解析研究は、信州大学医学部附属病院遺伝子診療部 (研究代表者)、獨協医科大学皮膚科 (研究分担者：簗持淳博士、研究協力者：林周次郎博士)、横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学 (研究分担者：松本直通博士、三宅紀子博士)、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ニングナリ

ング医療応用研究室 (菅原一幸博士、水本秀二博士)、東京農工大学農学部硬蛋白質利用研究施設 (野村義宏博士)、金城学院大学生生活環境学部食環境栄養学科 (小林身哉博士)、信州大学大学院医学研究科分子病理学 (中山淳博士) において、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) および臨床研究に関する倫理指針 (平成 20 年厚生労働省告示第 415 号) を遵守して行う。研究代表者は、平成 19 年～22 年には「新型エーラスダンロス症候群の遺伝子解析 (受付番号 214)」として、平成 22～24 年は「D4ST1 欠損症 (エーラスダンロス症候群、古庄型) の遺伝子解析 (受付番号 304)」として、平成 25 年 1 月以降は「D4ST1 欠損に基づくエーラスダンロス症候群の遺伝子解析および病態探索」として、信州大学医学部医倫理委員会の承認を得ている。また、遺伝子解析を実施する共同研究施設においても、倫理委員会の承認を得ている。糖鎖医学的検討については、「骨異形成症及び関節疾患におけるグリコサミノグリカンの機能解明」として、北海道大学の倫理委員会の承認を得ている。新たに遺伝子解析を行う患者・家族に対しては、研究代表者・分担者またはそのガイダンスを受けた患者主治医により、患者・家族に十分な説明を行い、同意を得ることを原則とした。また、診療施設から臨床情報を収集する際には、個人情報保護に留意した。

iPS 細胞を用いた病態解析研究は、主に信州大学医学部組織発生学 (佐々木克典博士、岳鳳鳴博士) において、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針 (平成 18 年厚生労働省告示第 425 号) を遵守して行う。

疾患動物モデルを用いた基礎的研究は、主に国立精神・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 (武田伸一博士、岡田尚巳博士) において、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18 年 6 月 1 日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知) を遵守して行う。実施にあたっては、動物実験の 3 原則「代替法の利用」、「使用数の削減」、「苦痛の軽減」を遵守する。

遺伝子治療の開発研究は、主に国立精神・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 (武田伸一博士、岡田尚巳博士) において、遺伝子治療臨床研究に関する指針 (平成 16 年文部

科学省・厚生労働省告示第2号)を遵守して行う。

### C. 研究結果

#### ①臨床的検討

平成 24 年度～25 年度、本研究班においては、3 家系 4 患者（国内 2 家系 2 患者、国外 1 家系 2 患者）において、臨床症状から疑われ、*CHST14* 遺伝子解析で診断が確定した。論文誌上の発表、研究会での報告を加え、現在までに合計 30 家系 41 患者が見出された。

#### 論文報告例

患者	家系	出身	<i>CHST14</i> 変異	性別	初回報告年齢
1	1	トルコ	V49X homo	F	3.5y
2				M	1.5y
3				F	6y
4	2	日本	Y293C homo	M	4y
5				M	7m
6	3	オーストリア	R213P homo	M	0d†
7				M	12m
8	4	トルコ	[R135G;L137Q] homo	F	1-4m†
9				M	1-4m†
10				M	1-4m†
11				M	3m
12	5	日本	P281L/Y293C	F	11y
13	6	日本	P281L homo	F	14y
14	7	日本	P281L homo	M	32y
15	8	日本	K69X/P281L	M	32y
16	9	日本	P281L/C289S	F	20y
17	10	日本	P281L/Y293C	F	4y
18	11	トルコ	V49X homo	F	22y
19				F	21y
20	12	インド	E334Gfs*107 homo	F	12y
21	13	日本	P281L/Y293C	M	2y

22	14	日本	F209S/P281L	M	6y
23	15	オランダ	V48X homo	F	20y
24	16	アフガニスタン	R274P homo	F	11y
25				F	0y
26	17	ミコウスキー	G228Lfs*13	F	16y

#### 論文未報告例

患者	家系	出身	<i>CHST14</i> 変異	性別	初回報告年齢
27	18	日本	P281L/W162X	F	18y
28	19	日本	P281L homo	F	?
29		日本		F	16y
30	20	日本	M1? Homo	M	11y
31	21	日本	F209S/P281L	F	41y
32	22	日本	F209S homo	M	18y
33	23	日本	F209S/P281L	M	15y
34	24	日本	compound hetero	F	34y
35	25	日本	P281L homo	M	13y
36	26	日本	F209S/P281L	M	11y
37	27	ベルギー	R29Gfs*113 homo	M	18y?
38	28	ベルギー	Q133Rfs*14 homo	M	34y?
39	29	ベルギー	M280L homo	M	4y?
40	30	メキシコ	E262K homo	M	4y
41		メキシコ		F	2y

DDEDS における反復性巨大皮下血腫に対する予防対策としてこれまでに 1 患者において DDAVP (デスマプレッシン) 点鼻療法が導入されていた (Kosho *et al.*, *Am J Med Genet* 138A: 282-287,

2005; Koshio et al., *Am J Med Genet* 152A: 1333-1346, 2010)。平成 25 年度新たに巨大皮下血腫の反復のために QOL の低下を招いている 2 患者において同療法が導入された。使用した薬剤は、Fehring Pharmaceuticals 社の Octostim nasal spray である。両患者において安全に同療法は導入され、重大な出血予防に役立っている。

平成 25 年度 3 患者に対して、信州大学医学部附属病院耳鼻咽喉科難聴専門外来において、詳細な聴覚評価を行った。12 歳男児では、難聴の自覚ははっきりしないが健診で時々 4kHz の異常を指摘されていた。聴力検査では両耳ともに 2-4kHz に軽度感音難聴を認め、DPOAE は 3-6kHz の DP レベルの低下を認めた。20 歳女性では、聴力検査で右に 8kHz の軽度閾値上昇を認め、DPOAE で 3-6kHz の DP レベルの低下を認めた。7 歳女児では、自覚症状はないが、聴力検査にて両耳の 8kHz 軽度閾値上昇と DPOAE で DP レベルの低下を認めた。

謝辞：聴力評価を行っていただきました信州大学医学部附属病院耳鼻咽喉科・人工聴覚器講座・岩崎聡教授（現 国際医療福祉大学教授）に感謝いたします。

## ②遺伝子解析

全エクソーム解析により、全コード領域の 91.6% 以上は x20 の read depth で読まれていた。8 家系全例で *CHST14* 遺伝子に variant call はなかった。3 家系においては別の EDS 病型の疾患遺伝子内にそれぞれ 1 variant を認めた。

更に、新規責任遺伝子を同定するため、これら以外の家系で 2 家系以上に共通してバリエーションの認められる遺伝子を検索したが、今のところその条件を満たす遺伝子の同定には至っていない。

## ③病理解析

### 【患者組織の病理解析】

#### 光顕分析

弱拡大では、患者の表皮は、コントロールに比べて、波打ち、薄い、という特徴があった（図 1a）。

強拡大では、表皮直下の真皮のコラーゲン線維が繊細になっていた。真皮のコラーゲン線維束はコントロール並の太さで存在するものもあれば、コ

ントロールに比べて、繊細になって存在するものもあった（図 1b）。

#### Cupromeronic blue (CB) 染色を用いた電顕分析

通常のエレクトロ染色（Uranyl acetate [UA]のみ）では、コラーゲン細線維のまわりに電子密度の高い線維状物質がまとわりついている様子が観察された（図 2b、Patient 30）。CB 染色により、コラーゲン細線維に付着した GAG 鎖が可視化された（図 2b）。

P281L/Y293C を有する 1 患者（Patient 12）において、通常のエレクトロ染色のみでは、表層はコラーゲン細線維が細く、ランダムに走行していた。深層ではコラーゲン細線維は太く束になって走行していた。CB 染色により、コラーゲン細線維に付着した GAG 鎖が可視化された。表層では GAG 鎖はランダムに描出され、深層では整然と描出されていた（図 2a）。

P281L/Y293C を有する別の 1 患者（Patient 21）においても、CB 染色により、コラーゲン細線維に付着した GAG 鎖が可視化された。表層では GAG 鎖はランダムに描出され、深層では整然と描出されていた（図 2b）。

#### 抗デコリン抗体を用いた免疫組織化学分析

光顕では、コントロールではコラーゲン線維束に不均一ながらべったりと抗デコリン抗体により染色されたが、患者ではコラーゲン線維束に filamentous に染色された（図 3）。

### 【ノックアウトマウスの病理解析】

#### 一般光顕・免疫組織化学分析

皮膚：ホモ（*Chst14*<sup>-/-</sup>）マウスでは、ヘテロ（*Chst14*<sup>+/-</sup>）マウス、WT マウスと比べて、HE 染色における皮膚真皮膠原線維束の好酸性が低下していた（図 4）。

また、デコリン免疫染色におけるデコリン陽性線維の分布は疎となっていた（図 4）。

胃：ホモ（*Chst14*<sup>-/-</sup>）マウスでは、ヘテロ（*Chst14*<sup>+/-</sup>）マウス、WT マウスと比べて、HE 染色における所見に明らかな相違は見出せなかったが、デコリン免疫染色では粘膜固有層のデコリン陽性線維の分布が粗になっていた（図 5）。

## 電顕分析 (Cupromeronic blue[CB] 染色)

CB 染色により、コラーゲン細線維に付着した GAG 鎖が可視化された。ホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) マウスの皮膚では、ヘテロ (*Chst14<sup>+/-</sup>*) マウス、WT マウスと比べて、コラーゲン細線維に付着する GAG 鎖が不鮮明であった。横断像では、コラーゲン細線維の直径が、ホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) マウスではバラツキがあり、細いものも多かった (図 6, 7)。

## ④糖鎖医学的検討

### 患者の尿中のコンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸の定量と構造解析

健常人由来の尿では、DS が検出されたのに対し、DDEDS 患者では、DS が全く検出されなかった。

### EDS 患者の線維芽細胞由来が産生するコンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸の定量と構造解析

無血清培地で培養した c.2\_10TGTTCCCCCdel (homo); p.Met1? という変異を有する患者由来皮膚線維芽細胞のコンディションドメディウムを用いて DS の定量を行った。その結果、これまでに検討した DDEDS 患者では、全く DS が検出されなかったのに対して [Miyake *et al.*, *Hum Mutat.* (2010) 31, 966-974]、本患者由来の線維芽細胞では、ごく少量の DS 鎖が合成されていた。興味深いことに、以前の DS 鎖がまったく合成されていない DDEDS 患者と比較して、本患者の症状は若干軽症である (内反足がない) ことから、ごく少量合成されている DS 鎖が EDS の症状を軽減していると推察された。一方、健常人と比較して CS の二糖量には大差がなかった。

### D4ST1 を組み込んだアデノ随伴ウイルス感染細胞の D4ST 活性測定

ネガティブコントロールである GFP 発現細胞と比較して、293 細胞で発現させたヒト D4ST-1 およびマウス D4st-1 は、3 倍以上の有意な硫酸基転移活性上昇を示した。ヘテロ (*Chst14<sup>+/-</sup>*) マウス由来皮膚線維芽細胞に発現させたヒト D4ST-1 およびマウス D4st-1 も、ネガティブコントロールと比較して、10 倍高い活性が検出された。

### ノックアウトマウスの皮膚・尿中のコンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸の定量

ホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) マウスでは、ヘテロ (*Chst14<sup>+/-</sup>*) マウス、WT マウスと比べて、皮膚の DS の 4-O-

硫酸化構造が 0.6% と著減し、CS の 4-O-硫酸化構造が 5~7 倍に著増、6-O-硫酸化構造も 2~8 倍に増加していた。また、尿中 DS は全く検出されなかった。

## ⑤iPS 細胞を用いた病態解析

### ゲノム異常の検証

iPS 細胞由来のゲノム DNA の解析により、*CHST14* 遺伝子のコード領域内に新たな変異は同定されなかった。iPS 細胞にのみに認められるコピー数変化として、4 番染色体に 1 箇所の欠失が検出された。本欠失は *GRID2* 遺伝子 (NM\_001510.2) 内の 91 kb の欠失であり、protein coding exon である exon3 を含む。本欠失は q-PCR による検証でも確認された。

### DDEDS 患者由来 iPS 細胞の性質についての検討

形態: A108 および 201B7 の iPS 細胞コロニーの間には、光学顕微鏡分析において次のような相違点を確認された。(1) A108 の iPS 細胞のサイズは、201B7 の iPS 細胞より小さい。(2) A108 の iPS 細胞間境界は不明瞭であり、いくつかの細胞では融合していた。(3) A108 の iPS 細胞では、細胞質に多くの空胞が認められた (図 8)。電子顕微鏡分析においては、A108 の iPS 細胞において多くの空胞が認められた (図 9)。

アポトーシス解析: A108 および 201B7 の iPS 細胞コロニーにおけるアポトーシス状態には差は認められなかった (図 10)。

未分化能の検討: A108 および 201B7 の iPS 細胞コロニーいずれにおいても、Oct3/4、Nanog、SSEA-3、SSEA-4 は高発現であり、十分な未分化状態であることが確認された (図 11)。

多能性の検討: 自然分化させた A108 の胚様体 (EB) において、免疫染色と RT-PCR いずれについても、三胚葉のマーカー (内胚葉: *Foxa2*, *Pdx1*; 中胚葉: *Nkx2.5*, *Brachyury*; 外胚葉: *Nestin*) は発現しており、多能性を有することが確認された (図 12)。さらに、A108 の iPS 細胞を SKID マウスに移植して 4 週間後、奇形種が発生した。組織を検討すると、消化管様 (内胚葉)、平滑筋 (中胚葉)、色素細胞 (外胚葉) など三胚葉由来の組織が認められた (図 13)。脈絡叢のような構造も発見され、神経のマーカー *TujIII* でこの構造に神経が存在することが確認された (図

14)。

A108 の iPS 細胞由来の奇形種では、201B7 の iPS 細胞由来の奇形種と比べて、デコリンおよび I 型コラーゲンの染色状態はいずれも弱かった (図 15)。

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 16)。

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 17)。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 18)。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 19)。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 より軽度低下していた (図 20)。他方、細胞増殖能は、両細胞で有意な差は認められなかった (図 21)。

### 神経細胞への分化誘導

A108 の iPS 細胞からの神経への分化誘導に関しては、201B7 の iPS 細胞からの神経への分化誘導と比べて、神経前駆細胞マーカー Nestin および Pax6 の発現はいずれも弱かった (図 22)。

成熟ニューロンへの分化誘導に関しては、A108 の iPS 細胞由来の神経系細胞において、201B7 の iPS 細胞由来の神経系細胞よりも、TujIII、MAP2 抗体を用いた免疫染色の染色状態は弱かった。また、Real time-PCR により測定された Map2 遺伝子の発現量は低かった (図 23)。

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 23)。

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 24)。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 25)。

同一患者由来の別の iPS 細胞クローンを用いて、神経細胞への分化誘導を検討した結果、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。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 26)。

### DEEDS 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 27)、A108 においては 12 日目に (図 28)、拍動心筋が観察された。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 29)。心筋への分化効率を調べるために、 $\beta$ -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 30)。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 31)。

### ⑥モデルマウスを用いた病態解析

ホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) 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、この世代のヘテロ (*Chst14<sup>+/-</sup>*) マウスから

ホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) マウスの産出は得られなかった (図 32)。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、胎児のジェノタイプピングを行ったところ、胎生 14.5 日目にホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) 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%) のホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) マウスの繁殖・維持を行い、解析に用いた。

#### ホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) マウスの表現型解析

ホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) 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 33)。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 34)。DDEDS に特徴的な顕著な関節拘縮は、ホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) 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、高齢ホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) 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 35)。

皮膚病理組織学的解析では、若年期ホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) 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、ホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) 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 36)。

ホームケージ内の自発行動量を測定したところ、高齢ホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) マウス (雌) において行動量の低下 (図 37)、および走行速度の減少が認められた (図 38)。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、ホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) マウスでは常にヘテロ (*Chst14<sup>+/-</sup>*) マウスや WT マウスと比較して弱い傾向にあった (図 39)。また、衰弱した高齢ホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) 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 40)、前脛骨筋における筋線維断面積は WT マウスに比べ、平均値が約 2 分の 1 に減少していた (図 41)。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 42)。な

お、これらの異常所見は若年ホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) マウス (15 週齢雄) では認められなかった。

#### ⑦遺伝子治療の開発

ヒトおよびマウス D4ST1 発現 AAV ベクターを大量調製し、各々  $1.7 \times 10^{14}$  v.g. および  $1.8 \times 10^{13}$  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、D4ST1 活性の増加が認められた。

#### D. 考察

##### ①臨床的検討

日本を中心に、新たな DDEDS 患者が見出されている。今後は、国内外からの遺伝子診断要請に持続的に応じられる検査体制の構築が必要である。研究代表者らは、遺伝子解析担当の分担研究者である松本直通博士、三宅紀子博士の協力を得て、臨床的遺伝子解析体制の構築に着手している。症状の共通性を有する他疾患との鑑別や新規症候群の存在も視野に入れた段階的な次世代シーケンス体制である。一次スクリーニングとして、信州大学医学部附属病院遺伝子診療部において ion PGM<sup>TM</sup> のプラットフォームを利用した EDS を中心とした遺伝性結合組織疾患関連遺伝子の網羅的解析を行う。陰性例に対しては、二次スクリーニングとして、横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学において、ハイエンド機種を用いたエクソーム解析を行う、というものである。さらに長期的には、保険収載化を目標とした検査体制の整備も必要と考える。

DDEDS における反復性巨大皮下血腫は、患者の QOL また時には生命を左右するきわめて重要な合併症であり、このマネジメントは急務である。平成 25 年度までに 3 患者において導入した DDAVP 点鼻療法は、(1) リスクある外傷時に現場で速やかに対応できる、(2) 一般に患者は血管確保が困難であるため点鼻療法は苦痛なく確実に投与できるというアドバンテージがある、といった点で有用性が高い。問題は、国内で採用されていないために、医師個人輸入に頼っており、また高額なため、安定的な供給に不安が残ることである。今後は、国内で安定的に使用できるよう、国内での保険収載となるよう手続きを進めていく必要がある。

DDEDS 患者においては高音部の聴力低下などが指摘されていたが、系統的に聴覚評価が行われたことはなかった。今回3患者全てに高音部の聴力低下が確認された。今後、聴力低下の機序を解明していく必要がある。

## ②遺伝子解析

臨床的に DDEDS が疑われたが、*CHST14* 遺伝子に変異を認めなかった8患者を対象に全エクソーム解析を行った。その結果、3症例にEDSの他の病型の既知遺伝子内に sequence variants を検出した。この病的意義に関しては、家系内 segregation の確認等、両親検体を用いた検証が必要である。

変異の認められなかった5家系に関しては、新規遺伝子が原因である可能性があり、2家系以上に共通して変異を持つ遺伝子を検索しているが、今のところこの条件を満たす遺伝子は同定されていない。複数に遺伝子異常が類似の臨床像を呈していると推測される。

## ③病理解析

### 患者検体を用いた病理解析

光顕および抗デコリン抗体を用いた免疫組織学的解析結果は、明らかにコントロールとは異なるものであった。興味深いことに、光顕では一見正常形態に見えたコラーゲン線維束部においても、明らかに異なる抗デコリン抗体の反応であったことから、真皮深層においても、デコリン-GAG鎖複合体、すなわちデコリン・プロテオグリカンがコラーゲン細線維を packing している状態は異なっていることを示している。

CB染色を施した電顕観察は、デコリン・プロテオグリカンとコラーゲン細線維との関係を決定しうるきわめて有効な手段であると期待される。GAG鎖がコラーゲン細線維のバンドのどの位置にリンクするのかを明らかにする必要がある。さらに、今後、患者検体と年齢、性別、採取部位をマッチさせた正常コントロールを入手し、詳細に比較検討することが必須である。

### ノックアウトマウス検体を用いた病理解析

ノックアウト (*Chst14*<sup>-/-</sup>) マウスの皮膚 HE 染色所見、抗デコリン免疫組織化学所見は、*Chst14*<sup>+/-</sup> マウス、WT マウスと比べて相違はあったが、ヒト患者の所見よりは顕著でなかった。ヒト患者では、

加齢に伴い皮膚の抗デコリン免疫組織化学所見が顕著になる傾向にあり、実際臨床的にも同様の傾向が見られたことから、マウスにおいても加齢による変化を観察する必要があると考えられた。現在、1歳齢のマウスの解析を進めている。

胃粘膜において、抗デコリン免疫組織化学では粘膜固有層におけるデコリン分布に差があるようであった。ヒトでは1患者において特段のリスクファクターのない状態で、重篤な胃潰瘍を発症した。DDEDS 患者が実際胃粘膜の脆弱性を有するか、引き続き検討が必要である。

CB染色を施した電顕観察は、デコリン・プロテオグリカンとコラーゲン細線維との関係を決定しうるきわめて有効な手段であると期待される。今回観察された *Chst14*<sup>-/-</sup> マウスの GAG 鎖の不鮮明さ、コラーゲン細線維径の大小不同が疾患特異的变化であるかどうか、引き続き解析数を増やして検討していく必要がある。

## ④糖鎖医学的検討

### 患者検体を用いた糖鎖解析

DDEDS 患者において尿中 DS は検出されないのに対して、健常人由来の尿において確実に検出されたことから、DDEDS 診断につながる簡便なスクリーニング方法としての有用性が示された。

c.2\_10TGTTCCCCCdel (homo); p.Met1?という変異を有する DDEDS 患者由来の線維芽細胞では、ごく少量の DS 鎖が合成されていた。したがって、本患者では、D4ST1 が正しく翻訳されていないか、D4ST1 の酵素活性が低下しているか、細胞内局在が攪乱されているか、タンパク質発現量が少ない等が考えられ、その結果として、大部分の DS の合成不全を起こし、EDS が発症すると考えられた。

### ノックアウトマウス検体を用いた糖鎖解析

AAV に組み込んだヒト D4ST-1 およびマウス D4st-1 は、ヒトの細胞 (293 細胞) にもヘテロ (*Chst14*<sup>+/-</sup>) マウス由来皮膚線維芽細胞に導入され、酵素活性を発揮することが分かった。したがって、AAV を用いた遺伝子治療を目的とした研究の基盤が構築できたといえる。

ノックアウト (*Chst14*<sup>-/-</sup>) マウスの皮膚においても、DDEDS 患者と同様に DS がほとんど検出されず、尿中には完全欠損であったことから、このマ

ウスは適切な DDEDS のモデルになりうると考えられた。

### ⑤iPS 細胞を用いた病態解析

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た。十分な未分化能および多能性を有しており、iPS 細胞としての本質的機能が確認された。患者皮膚組織での検討結果と同様、SKID マウスに発生させた奇形種におけるデコリン染色状態は、患者では明らかに低下しており、「デコリンによるコラーゲン細線維の assembly 不全」という DDEDS の病態を反映したモデルとして矛盾はないと考えられた。

iPS 細胞のゲノム構成が末梢血由来ゲノム DNA から変化を来しているかを高密度 SNP アレイで検証し、iPS 細胞由来のゲノム DNA のみに *GRID2* 遺伝子内に 91 kb の欠失を認めた。これは本 iPS 細胞の樹立過程において獲得されたコピー数異常であり、今後本 iPS 細胞を用いた病態解析を展開していく際には、慎重に解釈する必要があると考えられた。

さらに、神経細胞への分化誘導に成功、DDEDS 患者由来 iPS 細胞では健常人由来 iPS 細胞に比べて、神経細胞系への分化誘導効率が低下していること、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ることが明らかになった。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。また、患者 iPS 細胞由来の奇形種において、通常認められない脳脈絡叢様の組織が認められた。DDEDS 患者においては、脳室拡大を伴う場合が少なくなく、今回の所見との関係が注目される場所である。

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。

### ⑥モデルマウスを用いた病態解析

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ホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) マウスの出生率が低下した。同ノックアウトマウスに関する先行論文においても同様に結果であることをふまえ (Akyuz, N. *et al.*, *Glycobiology*, 2012)、C57BL/6J 系統への置換率の低い *Chst14<sup>-/-</sup>* マウスを繁殖維持し、研究を遂行することとした。

ホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) 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。これらはヒト患者における表現型に類似するものであった。

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 患者では先天性関節拘縮の影響もあると推測される。しかし、ホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) マウスにおいては先天性関節拘縮は認められなかったため、primary な筋肉の異常に関係している可能性が考えられた。

ホモ (*Chst14<sup>-/-</sup>*) 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、本分担研究において明らかとなった表現型は DDEDS 患者の症状に近く、治療研究の評価項目となる可能性が示唆された。

### ⑦遺伝子治療の開発

平成 25 年度作製した D4ST1 発現 AAV ベクターのヒト細胞 (293 細胞) およびヘテロ (*Chst14<sup>+/-</sup>*) マウスの培養皮膚線維芽細胞に対する感染実験により、D4ST1 の強制発現が確認できたことから、次年度以降本ベクターの改良を図りながら治療実験を行っていく基盤ができたといえる。

患者への治験を視野に入れて、次年度以降、以下のような課題を一つ一つ克服していく必要がある。

- ① どの血清型の AAV ベクターを選択するか。
- ② 標的臓器の決定とそれに準じた適切な *CHST14* 遺伝子の発現カセットの構築。

- ③ *Chst14*<sup>-/-</sup>マウス由来細胞での治療実験。
- ④ 患者由来皮膚線維芽細胞での治療実験。
- ⑤ *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスを用いた治療実験。

## E. 結論

本研究班の活動および国内外の他施設の報告より、これまでに30家系41患者が見出され、DDEDSが比較的頻度の高い重要なEDSの1病型であることが示された。DDAVPが反復性巨大皮下血腫のマネジメントに有効であること、高音部の聴力低下があることが明らかにされた。

臨床的には疑われるがCHST14変異の検出されなかった8患者において全エクソーム解析が行われたが、原因遺伝子同定には至っていない。

患者皮膚組織の抗デコリン染色パターンは疾患特異的であった。ノックアウト (*Chst14*<sup>-/-</sup>) マウスでは、患者ほど顕著でないものの特徴を有しており、D4ST1欠損症におけるデコリン・プロテオグリカンとコラーゲン細線維との相互位置関係異常を再現している。

患者においても、ノックアウト (*Chst14*<sup>-/-</sup>) マウスにおいても、皮膚および尿中DSはほぼ完全に欠損していた。ヒトCHST14およびマウス*Chst14*を組み込んだAAVの感染により、ヒト細胞(293細胞)およびヘテロ (*Chst14*<sup>+/-</sup>) マウス由来皮膚線維芽細胞におけるD4ST1およびD4st1酵素活性は著増した。

患者由来iPS細胞はiPS細胞として十分な未分化能、多能性を有しており、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、分化誘導効率が不良で、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、心筋細胞への分化へも成功した。

ホモ (*Chst14*<sup>-/-</sup>) 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たため、C57BL/6Jへの置換率の低いハイブリッドマウスを安定的に作出する必要がある。出生後の成長障害、顔貌の非対称性、DSの欠乏状態、皮膚の脆弱化、筋力低下、衰弱高齢

マウスでの後彎など患者の似た症状を呈した。筋力低下の背景として、骨格筋における間質の広がりおよび筋線維の細径化、遅筋化が関与している可能性が考えられた。

高力価のD4ST1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。

平成26年度以降、遺伝子解析体制を維持して患者を収集し臨床的検討を行い、iPS細胞やノックアウトマウスを利用した病態解析研究を推進するとともに、高力価のD4ST1発現AAVベクターを用いた治療実験にとりかかる計画である。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 平成25年度

**Kosho T (corresponding author)**, Mizumoto S, Sugahara K. Carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-O) sulfotransferase 14 (CHST14). In: Handbook of glycosyltransferases and related genes (Taniguchi N, Honke K, Fukuda M, Narimatsu H, Yamaguchi Y, Angata T, eds), Springer (in press).

Shimizu K, Wakui K, **Kosho T (corresponding author)**, Okamoto N, Mizuno S, Itomi K, Hattori S, Nishio K, Samura O, Kobayashi Y, Kako Y, Arai T, Oishi T, Kawame H, Narumi Y, Ohashi H, Fukushima Y. Microarray and FISH-based genotype-phenotype analysis of 22 Japanese patients with Wolf-Hirschhorn syndrome. Am J Med Genet Part A [Epub ahead of print].

Nishi E, Takamizawa S, Iio K, Yamada Y, Yoshizawa K, Hatata T, Hiroma T, Mizuno S, Kawame H, Fukushima Y, Nakamura T, **Kosho T (corresponding author)**. Surgical intervention for esophageal atresia in

- patients with trisomy 18. *Am J Med Genet Part A* 164(2): 324-330, 2014.
- Kosho T (corresponding author)**, Kuniba H, Tanikawa Y, Hashimoto Y, Sakurai H. Natural history and parental experience of children with trisomy 18 based on a questionnaire given to a Japanese trisomy 18 parental support group. *Am J Med Genet Part A* 161A(7): 1531-1542, 2013.
- Kosho T (corresponding author)**, Okamoto N, Ohashi H, Tsurusaki Y, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kawame H, Homma T, Tanabe S, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Ohta T, Niikawa N, Mizuno S, Kaname T, Naritomi K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Miyatake S, Mizuguchi T, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Clinical correlations of mutations affecting six components of the SWI/SNF complex: detailed description of 21 patients and a review of the literature. *Am J Med Genet Part A* 161A(6): 1221-1237, 2013.
- Tsurusaki Y, **Kosho T (equal contribution, corresponding author)**, Hatasaki K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Exome sequencing in a family with an X-linked lethal malformation syndrome: clinical consequences of hemizygous truncating OFD1 mutations in male patients. *Clin Genet* 83(2): 135-144, 2013.
- Kosho T**. Discovery and delineation of dermatan 4-O-sulfotransferase-1 (D4ST1)-deficient Ehlers-Danlos syndrome. In: *Current Genetics in Dermatology* (Oiso N, Kawada A, eds), InTech, Croatia, pp73-86, 2013.
- Miyake N, **Kosho T**, Matsumoto N. Ehlers-danlos syndrome associated with glycosaminoglycan abnormalities. *Adv Exp Med Biol* 802:145-59, 2014.
- Sugiura K, Takeichi T, Tanahashi K, Ito Y, **Kosho T**, Saida K, Uhara H, Okuyama R, Akiyama M. Lamellar ichthyosis in a collodion baby caused by CYP4F22 mutations in a non-consanguineous family outside the Mediterranean. *J Dermatol Sci*, 2013 [Epub ahead of print].
- Nitta H, Unoki M, Ichiyangi K, **Kosho T**, Shigemura T, Takahashi H, Velasco G, Francastel C, Picard C, Kubota T, Sasaki H. Three novel ZBTB24 mutations identified in Japanese and Cape Verdean type 2 ICF syndrome patients. *J Hum Genet* 58(7): 455-460, 2013.
- Tanaka K, Sekijima Y, Yoshida K, Tamai M, **Kosho T**, Sakurai A, Wakui K, Ikeda S, Fukushima Y. Follow-up nationwide survey on predictive genetic testing for late-onset hereditary neurological diseases in Japan. *J Hum Genet*. 58(8): 560-563, 2013.
- Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, **Kosho T**, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, Ito N, Ihara K, Hara T, Tonoki H, Ohta T, Saito K, Matsuo M, Urano M, Enokizono T, Sato A, Tanaka H, Ogawa A, Fujita T, Hiraki Y, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita T, Taguri M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Yoshiura K, Matsumoto N, Niikawa N. MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet Part A* 161(9): 2234-2243, 2013.
- Higashimoto K, Jozaki K, **Kosho T**, Matsubara K, Fuke T, Yamada D, Yatsuki H, Maeda T, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Koseki H, Ogata T, Soejima H. A novel de novo point mutation of the OCT-binding site in the IGF2/H19-imprinting control region in a Beckwith-Wiedemann syndrome patient. *Clin Genet* [Epub ahead of print].
- Fujita A, Ochi N, Fujimaki H, Muramatsu H, Takahashi Y, Natsume J, Kojima S, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, **Matsumoto N**, **Miyake N**. A novel WTX mutation in a female patient with osteopathia striata with cranial sclerosis and hepatoblastoma. *Am J Med Genet A*. 2014 Jan 23. doi: 10.1002/ajmg.a.36369. [Epub ahead of print].
- Fukai R, Hiraki Y, Nishimura G, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, **Matsumoto N**, **Miyake N**. A de novo 1.4-Mb deletion at 21q22.11 in a boy with developmental delay. *Am J Med Genet A*. 2014 Jan 23. doi: 10.1002/ajmg.a.36377. [Epub ahead of