

謝辞 Collaborators



国立精神・神経医療研究センター神経研
究所加齢伝子疾患治療研究室
武田伸一部長
岡田尚巳室長
立原麻子研究員
北海道大学大学院先端生命科学研
究院-生命機能科学研究部門プロテオグ
リカンシグナリング医療応用研究室
菅原一幸教授
水本秀二博士研究員
東京農工大学硬蛋白質利用研究施設
野村豊宏准教授
坂翔太君
精田奈々さん
獨協医科大学皮膚科
飯持淳教授

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
信州大学医学部組織発生学講座
佐々木克典教授
岳鳳鳴助教
金城学院大学生活環境学部食環境
栄養学科
小林身哉教授
信州大学大学院医学研究科分子病
理学
中山淳教授
熊本大学発生医学研究所・幹細胞
誘導分野
江良祐実教授

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

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

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

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

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

日本人類遺伝学会第58回大会(2013/11/21-23 於:江陽グランドホテル)

日本人類遺伝学会第57回大会 利益相反状態の開示

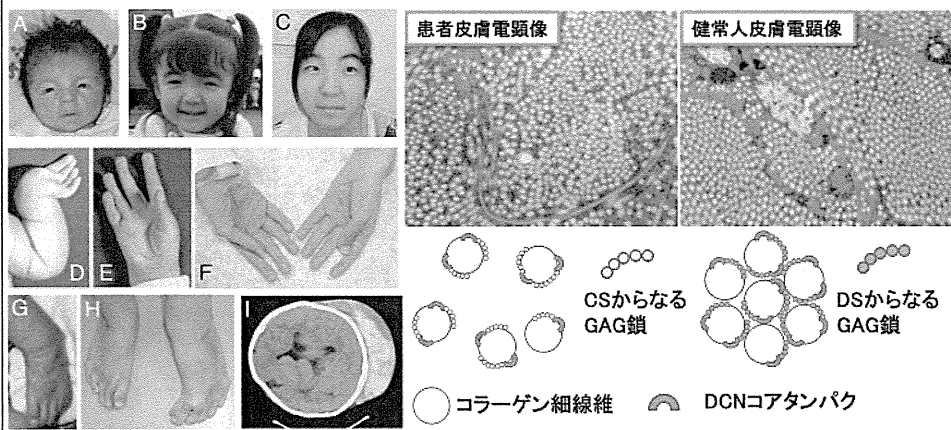
筆頭演者氏名:古庄知己

所属:信州大学医学部附属病院遺伝子診療部

開示すべき利益相反状態はありません。

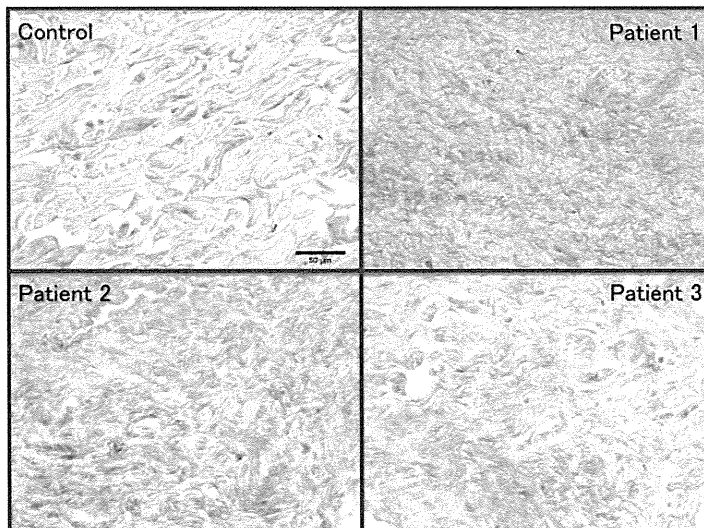
D4ST1-deficient EDS (DDEDS)

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



デコリン免疫染色

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



(Koshi et al., in preparation)

尿中CS/DS組成分析

- DDEDS患者では、DSは尿中に全く検出されなかった

DDEDS患者

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

関節型EDS患者

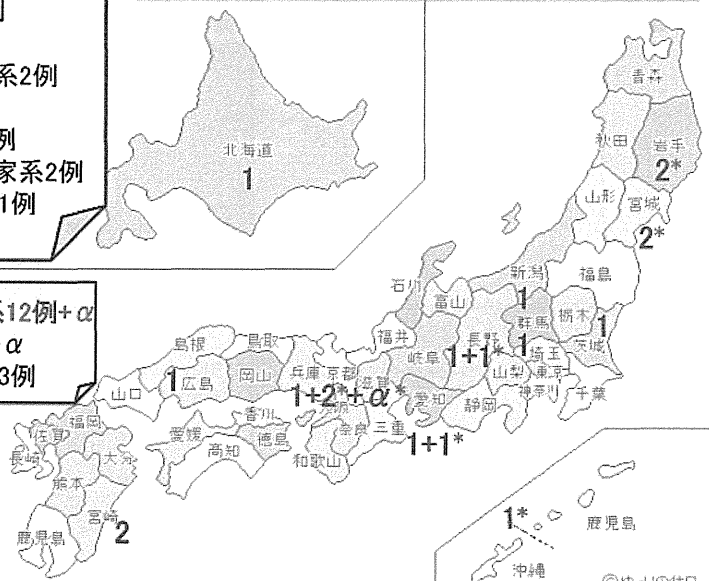
	pmol/mg creatinine (mol%)					平均
	尿#1	尿#2	尿#3	尿#4	尿#5	
ΔHexUA-GalNAc	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	—
ΔHexUA-GalNAc(6S)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	—
ΔHexUA-GalNAc(4S)	1,142 (86.4)	252 (82.8)	838 (79.6)	377 (82.2)	290 (80.8)	580 ± 1758 (82.4 ± 1.2)
ΔHexUA(2S)-GalNAc(6S)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	—
ΔHexUA(2S)-GalNAc(4S)	149 (11.3)	52 (17.2)	162 (15.4)	68 (17.8)	58 (16.2)	98 ± 24 (15.0 ± 1.0)
ΔHexUA-GalNAc(4S,6S)	30 (2.3)	N.D.	52 (5.0)	14 (2.9)	11 (3.0)	21 ± 9 (2.6 ± 0.8)
ΔHexUA(2S)-GalNAc(4S,6S)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	—
Total DS disaccharide	1,321 (100)	304 (100)	1,053 (100)	459 (100)	359 (100)	699 ± 205 (100)

(Mizumoto et al., in preparation)

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

確定診断 28家系39例～

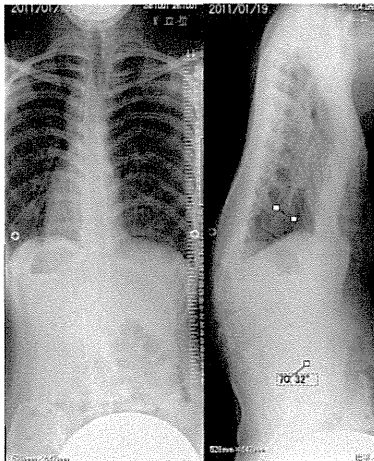
未報告例*: 11家系12例+α
 日本: 8家系9例+α
 ベルギー: 3家系3例



DDEDS

病態解明・治療法開発が急がれる理由

- 進行性結合組織脆弱性→QOLの低下

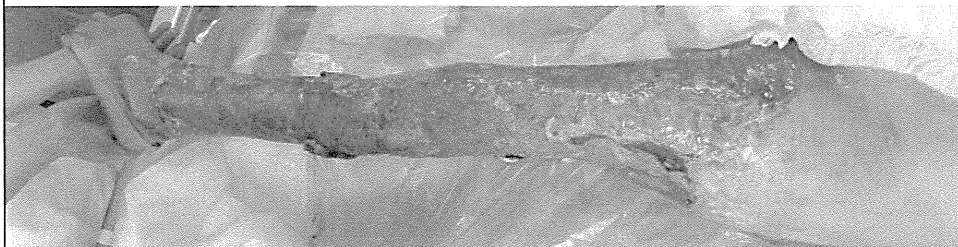


From Dr. Takahashi, Dept. of Orthopedic Surgery,
Shinshu Univ. School of Med

DDEDS

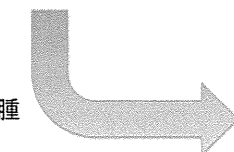
病態解明・治療法開発が急がれる理由

- 進行性結合組織脆弱性→生命に関わるイベント



交通事故

下肢巨大皮下血腫



重症広範性皮膚壊死



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

目的

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

対象

iPS細胞

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

ノックアウトマウス

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

方法

iPS細胞

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

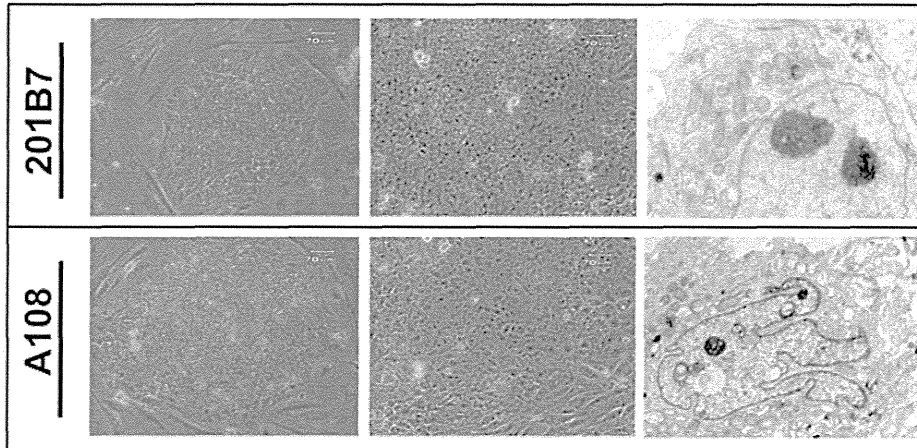
ノックアウトマウス

- 形態観察
- 成長観察
- 糖鎖医学的解析
- 病理学的解析

iPS細胞の検討

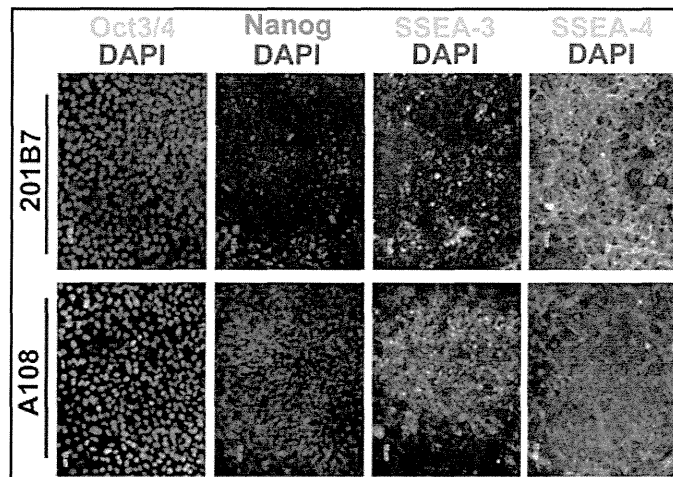
iPS細胞の形態

- 患者由来iPS細胞の方が小さく、空胞が目立っていた。



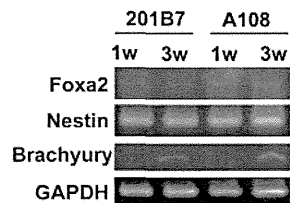
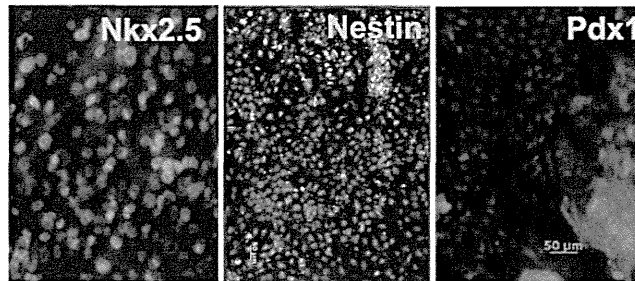
iPS細胞の未分化能

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



iPS細胞の多能能: *in vitro*

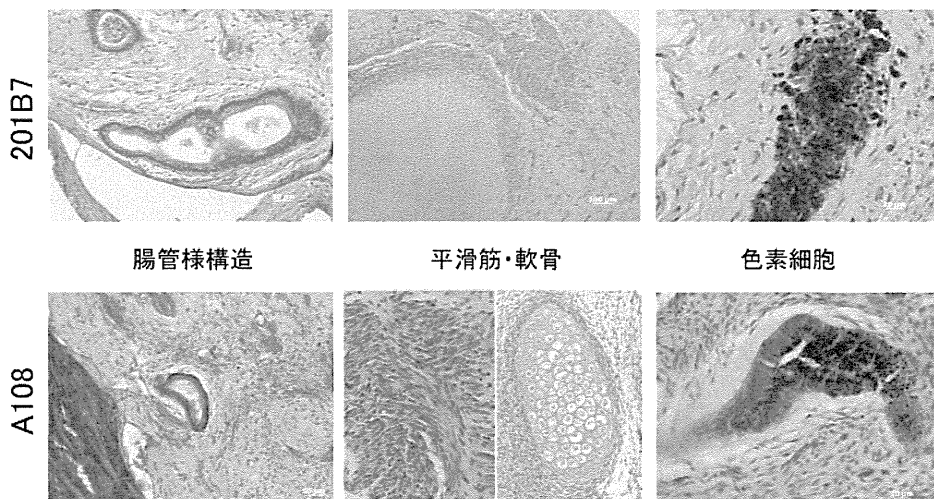
- いずれのiPS細胞から形成される胚様細胞塊においても、内胚葉マーカー(Foxa2、Pdx1)、外胚葉マーカー(Nestin)、中胚葉マーカー(Nkx2.5、Brachyury)は同様に発現していた。



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

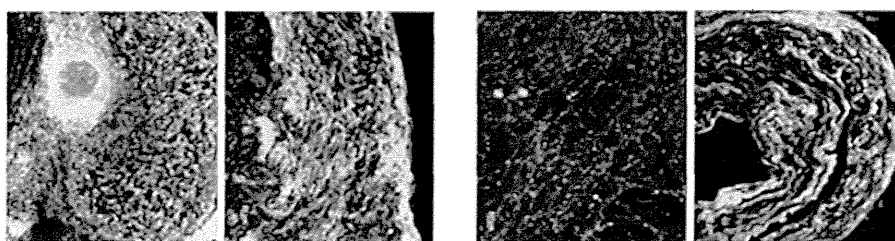
iPS細胞の多能能: *in vivo*

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



奇形腫のデコリン免疫染色

- 健常人由来iPS細胞により生じた奇形腫に比べて、患者由来iPS細胞により生じた奇形腫の方がデコリン染色状態は弱かった。

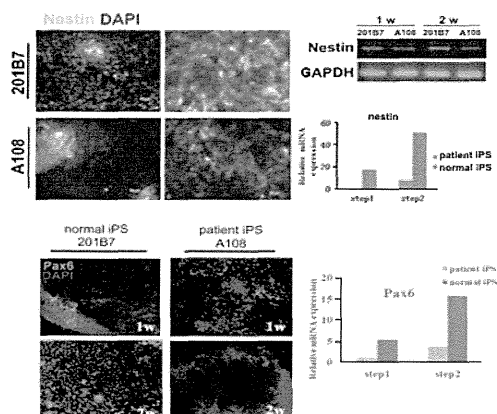


201B7

A108

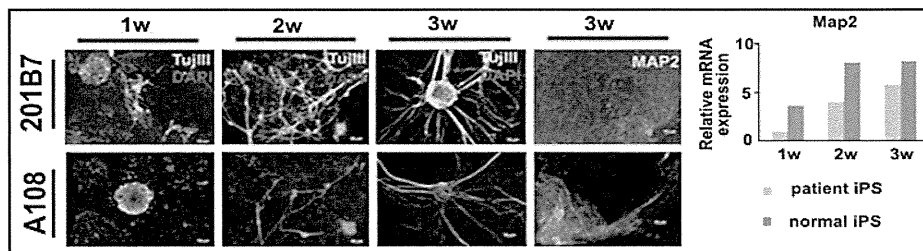
神経細胞への分化1

- 神経前駆細胞マーカーであるNestinおよびPax6の発現を免疫染色およびReal-time PCRで検討、患者由来iPS細胞を分化誘導した細胞では、健常人由来iPS細胞を分化誘導した細胞に比べて弱かった。



神経細胞への分化2

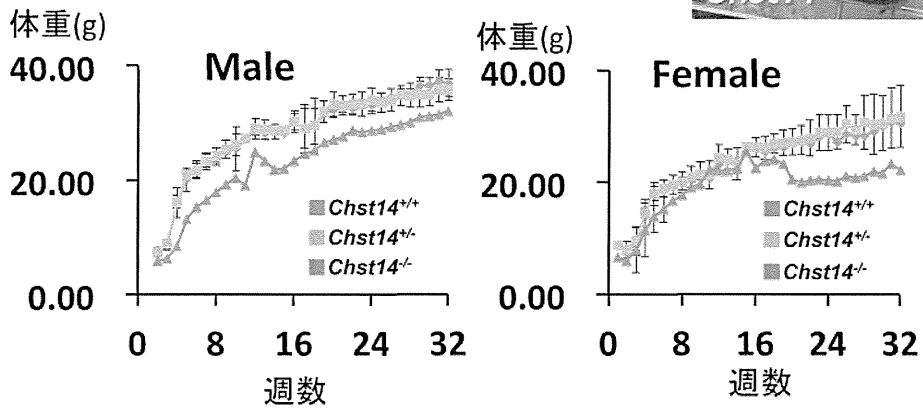
- 神経細胞への分化状態を示すTujiⅢおよびMAP2の発現を免疫染色およびReal-time PCRで検討、患者由来iPS細胞を分化誘導した細胞では、健常人由来iPS細胞を分化誘導した細胞に比べて弱かった。



ノックアウトマウスの検討

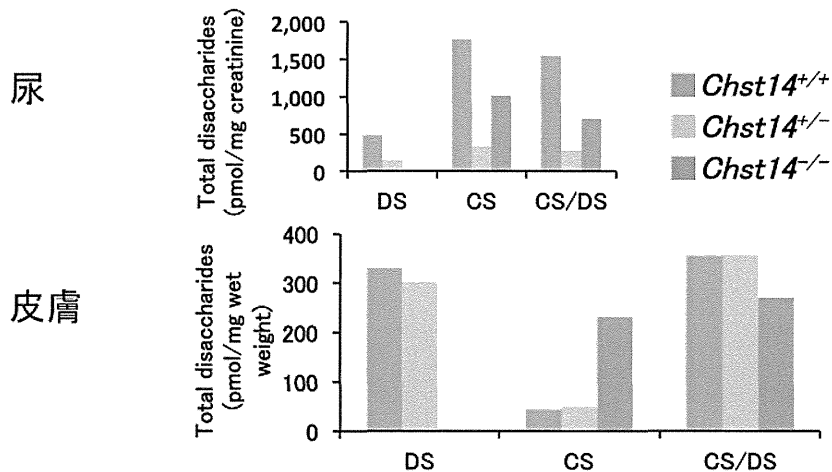
形態および成長

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



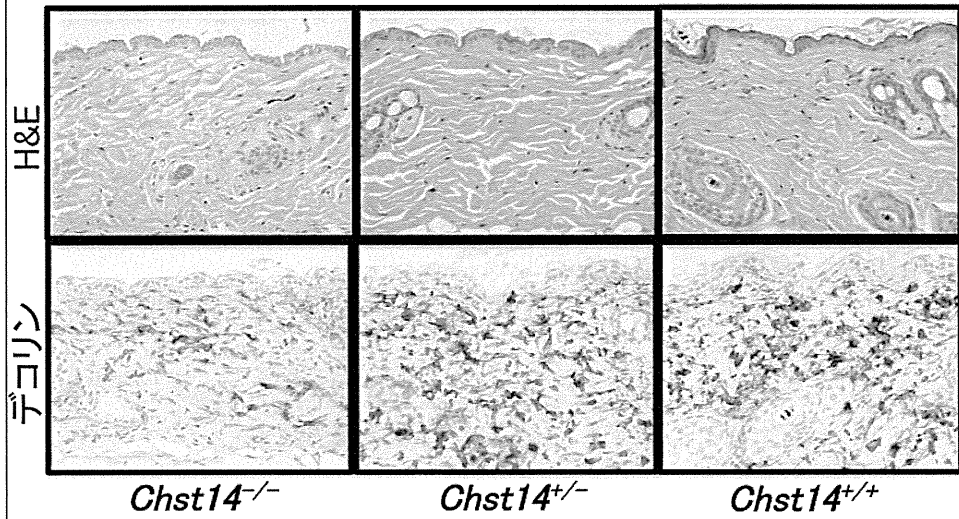
糖鎖医学的解析

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



病理学的解析

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



考察1:iPS細胞

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

考察2: ノックアウトマウス

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

デルマタン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 (DD-EDS/古庄班)



謝辞

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

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>Kosho T</u> <u>(corresponding author)</u> , Mizumoto S, Sugahara K	Carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-O) sulfotransferase 14 (CHST14)	Taniguchi N, Honke K, Fukuda M, Narimatsu H, Yamaguchi Y, Angata T	Handbook of glycosyltransferases and related genes	Springer		In press	
<u>Kosho T</u>	Discovery and delineation of dermatan 4-O-sulfotransferase-1 (D4ST1)-deficient Ehlers-Danlos syndrome	Oiso N, Kawada A	Current Genetics in Dermatology	InTech	Croatia	2013	73-86
<u>古庄知己</u>	Marfan症候群, Ehlers-Danlos症候群	『小児内科』『小児外科』編集委員会	小児内科増刊号・小児疾患の診断治療基準第4版	東京医学社	東京	2012	850-853
<u>古庄知己</u>	エーラスダンロス症候群		別冊日本臨牀・新領域別症候群シリーズNo.20・先天異常症候群第2版(下)	日本臨牀社		2012	721-726

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
*Muller T, *Mizumoto S, *Suresh I, Komatsu Y, Vodopiutz J, Dundar M, Straub V, Lingenhel A, Melmer A, Lechner S, Zschocke J, <u>Sugahara K</u> , Janecke AR (*equal contribution)	Loss of dermatan sulfate epimerase (DSE) function results in musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome.	Hum Molec Genet	22(18)	2013	3761-37 72
<u>古庄知己</u>	デルマトタン4-O-硫酸基転移 酵素-1欠損に基づく新型エー ラスダンロス症候群の発見 と疾患概念の確立.	日本遺伝カウンセ リング学会誌	34(1)	2013	21-29
<u>古庄知己</u>	グリコサミノグリカンの異 常と新型Ehlers-Danlos症候群 (古庄型).	病理と臨床	31(8)	2013	852-860
<u>古庄知己</u>	結合組織疾患-Marfan症候群 とEhlers-Danlos症候群	内分泌・糖尿病・ 代謝内科	34(3)	2012	210-220

作成上の留意事項

研究成果の刊行に関する一覧表は、別紙4「研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト」を参考に作成すること。

- (1) 日本工業規格A列4番の用紙を用いること。
- (2) 文字の大きさは、10～12ポイント程度とする。

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

Metadata of the chapter that will be visualized online

Chapter Title	Carbohydrate (<i>N</i> -Acetylgalactosamine 4-0) Sulfotransferase 14 (CHST14)	
Copyright Year	2014	
Copyright Holder	Springer Japan	
Corresponding Author	Family Name	Kosho
	Particle	
	Given Name	Tomoki
	Suffix	
	Division/Department	School of Medicine
	Organization/University	Department of Medical Genetics, Shinshu University
	City	Matsumoto
	Country	Japan
	Email	ktomoki@shinshu-u.ac.jp
Author	Family Name	Mizumoto
	Particle	
	Given Name	Shuji
	Suffix	
	Division/Department	Laboratory of Proteoglycan Signaling and Therapeutics
	Organization/University	Hokkaido University Graduate School of Life Science
	Street	West-11, North-21
	Postcode	001-0021
	City	Kita-ku
	State	Sapporo
	Country	Japan
	Phone	81-11-706-9054
	Fax	81-11-706-9056
	Email	mizumoto@sci.hokudai.ac.jp
Author	Family Name	Sugahara
	Particle	
	Given Name	Kazuyuki
	Suffix	
	Division/Department	Laboratory of Proteoglycan Signaling and Therapeutics
	Organization/University	Hokkaido University Graduate School of Life Science