

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08745

研究課題名(和文) 新型エーラスダンロス症候群の皮膚症状の疾患モデル動物確立と病態メカニズム解明

研究課題名(英文) Development and analysis of an animal model of Musculocontractral Ehlers-Danlos syndrome

研究代表者

吉沢 隆浩 (Yoshizawa, Takahiro)

信州大学・学術研究院総合人間科学系・助教

研究者番号：40713392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群(mcEDS)は、CHST14遺伝子の変異によってデルマタン硫酸(DS)の欠損を生じる疾患で、重篤な皮膚症状を呈する。mcEDSの疾患モデル動物としてChst14遺伝子欠損マウス(Chst14 KO)を解析したところ、コラーゲン線維束や細線維の構造変化、力学的脆弱性、創傷治癒遅延などの患者と類似の皮膚の表現型を認めた。また、Chst14 KOの皮膚線維芽細胞では、増殖と遊走が低下した。以上の結果から、Chst14遺伝子は、細胞外マトリックスの構造や強度と、細胞の増殖や遊走といった皮膚機能に影響することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、Chst14 KOがmcEDSの皮膚症状の疾患モデル動物として有用であることが示された。また、Chst14遺伝子やDSが、細胞外マトリックスの構造と強度の維持や、皮膚線維芽細胞の増殖と遊走に関与することが示唆され、mcEDSの病態メカニズム解明の糸口となることが期待された。

研究成果の概要(英文)：Musculocontractural Ehlers-Danlos Syndrome (mcEDS) shows some serious cutaneous symptoms with dermatan sulfate (DS) deficiency caused by mutations in CHST14 gene. In this study, Chst14 gene-deleted mice (Chst14 KO) were used as an animal model of mcEDS. Chst14 KO showed some cutaneous phenotypes such as deformations of collagen bundles and fibrils, mechanical weakness, and delay of wound healing which were similar to patients with mcEDS. Cell migration and proliferation were depressed in skin fibroblast of Chst14 KO. These results suggest that Chst14 gene affects structure and strength of extracellular matrix and cell migration and proliferation.

研究分野：病態医化学

キーワード：疾患モデル動物 筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群 Chst14

1. 研究開始当初の背景

筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群(mcEDS)は、本学医学部の古庄らによって報告された新規疾患¹⁾で、*CHST14* 遺伝子もしくは *DSE* 遺伝子の病的変異を原因とする。それらの遺伝子にコードされる D4ST1 や DSE は、デルマトン硫酸(DS)の合成に関与する酵素で、mcEDS ではそれらいずれかの酵素活性が失われることで、全身のデルマトン硫酸(DS)が欠乏する。mcEDS 患者では、特に結合組織で多くの症状が現れることが知られており、皮膚の脆弱性や反復性巨大皮下血腫、多発関節拘縮や進行性の脊椎変形などは、患者の日常生活動作と生活の質を低下させる²⁾。これまでの研究から、DS はコラーゲン細線維の集合を介した組織強度の維持に重要であると考えられているが、mcEDS の詳細な病態メカニズムは不明で、治療法開発には至っていない³⁾。

mcEDS の病態メカニズムの詳細な解析のための疾患モデル動物の候補として *Chst14* 遺伝子欠損マウス(*Chst14* KO)や *Dse* 遺伝子欠損マウス(*Dse* KO)が考えられた。*Dse* 遺伝子には *Dsel* 遺伝子というアイソフォームあるため *Dse* KO では DS 消失には至らないことが知られていたため、研究代表者は *Chst14* KO を用いた解析を行った。*Chst14* KO では皮膚組織等での DS の消失が認められたが、研究開始当初は、その殆どが周産期致死で成獣を用いた解析が困難であった⁴⁾。研究代表者は、胎仔や新生仔の生存率に遺伝背景が影響することを見出し、離乳率が高い近交系として知られる BALB/c 系統への戻し交配(コンジェニック化; BALB.*Chst14* KO 樹立)によって、出生率改善に成功し安定的な解析を可能とした⁵⁾。また、周産期致死の問題を完全に回避するために、コンディショナルノックアウトマウスを樹立すべく、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて *Chst14* flox マウスを独自に作出した。本研究では、これらのマウスを用いて、以下の解析を行った。

2. 研究の目的

本研究は、mcEDS の皮膚症状の疾患モデル動物を確立し、病態メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

力学的負荷に対する皮膚の表現型解析

mcEDS 患者は、皮膚の易断裂性や、軽微な外圧による巨大皮下血腫等の症状を呈し、皮膚組織の力学的な脆弱性が知られている。このことから、麻酔下で BALB.*Chst14* KO に対してネオジウム磁石による短時間の皮膚圧迫を行い、その後の経過を処置後 12 日目まで観察した。

皮膚組織の再生(創傷治癒)に関する表現型解析

mcEDS 患者では、創傷治癒の遅延が知られているため、麻酔下で BALB.*Chst14* KO の背部皮膚に開放創を作成し、処置後 15 日目まで創傷治癒過程を観察した。

薬剤投与と依存的 *Chst14* 遺伝子欠損マウスの樹立

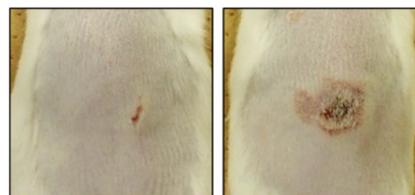
胎生致死の問題を完全に回避するために、研究代表者が独自に作出した *Chst14* flox マウスを、タモキシフェン投与と依存的 Cre (ROSA21-CreERT2) マウスと交配することで、タモキシフェン投与依存的に *Chst14* 遺伝子を欠損誘導可能なコンディショナルノックアウトマウスを作出した。

補足: 本研究は、信州大学動物実験等実施規程および信州大学遺伝子組換え実験等安全管理規程に従い、委員会による審査と学長承認を受けて適切に実施された。

4. 研究成果

皮膚の力学的負荷に対する表現型

BALB.*Chst14* KO では、発赤や痂皮形成等の症状が野生型よりも顕著に表れた(右図)。また、研究代表者らのグループでは、*Chst14* KO の皮膚コラーゲン細線維に集合不全等の mcEDS 患者と類似した病理像が認められることを報告している⁶⁾。圧迫後の皮膚は、野生型と BALB.*Chst14* KO 共に組織の挫滅様の病理像を認めたが、透過型電子顕微鏡で観察したところ、野生型ではコラーゲン細線維の形態は維持されているのに対して、BALB.*Chst14* KO ではその走行に乱れを認めた。これらのことから、BALB.*Chst14* KO では mcEDS 患者と類似した皮膚組織の脆弱性が生じていることと、組織強度の維持にはコラーゲン細線維の構造が重要であることが示唆された。



野生型

BALB.*Chst14* KO

皮膚組織の再生(創傷治癒)に関する表現型

BALB.*Chst14* KO の背部皮膚に開放創を作成したところ、野生型と比べて創傷治癒の有意な遅延が認められた。これまでの報告や研究代表者らによる実験結果から、生体の DS はコラーゲン

細線維の集合を介した皮膚組織の力学的強度の維持に重要であることが知られていたが、組織強度の違いだけでは創傷治癒の差がなぜ生じるのか説明がつかないと考えた。そのため、BALB.*Chst14* KOと野生型マウス皮膚の線維芽細胞の初代培養を行い、細胞機能への影響を検討した。その結果、BALB.*Chst14* KOの皮膚線維芽細胞では、スクラッチアッセイやMTTアッセイで、細胞の遊走や増殖が野生型と比べて低下していることが明らかになった。これらのことから、*Chst14* 遺伝子やDSは組織強度の維持だけでなく、細胞増殖を介した創傷治癒の促進にも関与することが示唆された。

薬剤投与依存的 *Chst14* 遺伝子欠損マウスの解析

研究代表者が作出した *Chst14* flox マウスと ROSA21-CreERT2 マウスとの交配により、タモキシフェン投与依存的 *Chst14* KO を樹立した。このマウスでは、生後にタモキシフェンを投与することで *Chst14* 遺伝子を欠損誘導可能なため、*Chst14* KO での胎生致死の問題を完全に回避可能ではないかと期待された。しかし、一般的に用いられるタモキシフェンの投与量(10~100mg/kg 腹腔内投与)では、最大で約40%の欠損効率しか得られず、*Chst14* 遺伝子の欠損による臓器や組織への影響を解析するためには不十分であった。一方で、*Chst14* flox マウスは、例えば他の臓器特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウスとの交配によって、特定の臓器や組織での *Chst14* 遺伝子やDSの機能の解析に有用と考えられるため、今後の研究に活用する予定である。

結語

以上の研究結果から、BALB.*Chst14* KO は mcEDS 患者と類似した皮膚の表現型を示すことが明らかになり、疾患モデル動物として有用であることが示唆された。また、*Chst14* 遺伝子の欠損とそれに伴うDS欠乏は、組織強度だけでなく細胞増殖にも影響を与えることが示唆され、mcEDSの病態メカニズム解明の一助となる知見が示された。

<引用文献>

- 1) Kosho T. 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. A* 2010, 152A, 1333-1346.
- 2) Minatogawa M. et al. Clinical and molecular features of 66 patients with musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome caused by pathogenic variants in CHST14 (mcEDS-CHST14). *J. Med. Genet.* 2022, 59, 865-877.
- 3) Kosho T. Yoshizawa T. et al. Recent Advances in the Pathophysiology of Musculocontractural Ehlers-Danlos Syndrome. *Genes* 2019, 11, 43.
- 4) Yoshizawa T. et al. Vascular abnormalities in the placenta of *Chst14*^{-/-} fetuses: Implications in the pathophysiology of perinatal lethality of the murine model and vascular lesions in human CHST14/D4ST1 deficiency. *Glycobiology* 2018, 28, 80-89.
- 5) Shimada S. Yoshizawa T. et al. Backcrossing to an appropriate genetic background improves the birth rate of carbohydrate sulfotransferase 14 gene-deleted mice. *Exp. Anim.* 2020, 69, 407-413.
- 6) Hirose T. Yoshizawa T. et al. Systematic investigation of the skin in *Chst14*^{-/-} mice: A model for skin fragility in musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome caused by CHST14 variants (mcEDS-CHST14). *Glycobiology* 2021, 31, 137-150.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Y. Nitahara-Kasahara, S. Mizumoto, Y. U Inoue, S. Saka, G. Posadas-Herrera, A. Nakamura-Takahashi, Y. Takahashi, A. Hashimoto, K. Konishi, S. Miyata, C. Masuda, E. Matsumoto, Y. Maruoka, T. Yoshizawa, T. Tanase, T. Inoue, S. Yamada, Y. Nomura, S. Takeda, A. Watanabe, T. Kosho, T. Okada	4. 巻 14(12)
2. 論文標題 A new mouse model of Ehlers-Danlos syndrome generated using CRISPR/Cas9-mediated genomic editing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dmm.048963	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirose Takuya, Mizumoto Shuji, Hashimoto Ayana, Takahashi Yuki, Yoshizawa Takahiro, Nitahara-Kasahara Yuko, Takahashi Naoki, Nakayama Jun, Takehana Kazushige, Okada Takashi, Nomura Yoshihiro, Yamada Shuhei, Kosho Tomoki, Watanabe Takafumi	4. 巻 31
2. 論文標題 Systematic investigation of the skin in Chst14 ^{-/-} mice: A model for skin fragility in musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome caused by CHST14 variants (mcEDS-CHST14)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 137 ~ 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/glycob/cwaa058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shin Shimada, Takahiro Yoshizawa, Yuki Takahashi, Yuko Nitahara-Kasahara, Takashi Okada, Yoshihiro Nomura, Hitoki Yamanaka, Tomoki Kosho, Kiyoshi Matsumoto	4. 巻 69
2. 論文標題 Backcrossing to an appropriate genetic background improves the birth rate of carbohydrate sulfotransferase 14 gene-deleted mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 407 ~ 413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.19-0150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tomoki Kosho, Shuji Mizumoto, Takafumi Watanabe, Takahiro Yoshizawa, Noriko Miyake, and Shuhei Yamada	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Recent Advances in the Pathophysiology of Musculocontractural Ehlers-Danlos Syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes11010043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahiro Yoshizawa, Tomoki Kosho	4. 巻 14(2)
2. 論文標題 Mouse Models of Musculocontractural Ehlers-Danlos Syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes14020436	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 吉沢 隆浩、嶋田 新、高橋 有希、岳 鳳鳴、山中 仁木、古庄 知己、松本 清司
2. 発表標題 Chst14遺伝子欠損マウスを用いた筋拘縮型エーラスダンロス症候群の皮膚病態モデル
3. 学会等名 第68回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 有希、吉沢 隆浩、水本 秀二、山田 修平、古庄 知己
2. 発表標題 1歳齢の疾患モデルマウス(Chst14-/-)を用いた筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群(mcEDS)の骨病変の解析
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第66回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 有希、吉沢 隆浩、嶋田 新、古庄 知己
2. 発表標題 筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群の疾患モデルマウス(Chst14-/-)の出生率に対するエンリッチメントの効果
3. 学会等名 第68回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉沢隆浩、嶋田新、高橋有希、水本秀二、山田修平、山中仁木、古庄知己、松本清司
2. 発表標題 筋拘縮型エーラスダンロス症候群の疾患モデル動物としてのChst14遺伝子欠損マウスの解析(Analysis of Chst14 Knockout Mice as an Animal Model of Musculocontractural Ehlers-Danlos Syndrome)
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takahiro Yoshizawa, Shuji Mizumoto, Yuki Takahashi, Shin Shimada, Kazuyuki Sugahara, Jun Nakayama, Shin'ichi Takeda, Yoshihiro Nomura, Yuko Nitahara-Kasahara, Takashi Okada, Kiyoshi Matsumoto, Shuhei Yamada, Tomoki Kosho
2. 発表標題 Skin and Vascular Abnormalities in Chst14 Gene-Deleted Mice, an Animal Model of Musculocontractural Ehlers-Danlos Syndrome
3. 学会等名 The Ehlers-Danlos Society, Scientific Meeting on the Rarer Types of Ehlers-Danlos Syndromes 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉沢隆浩、嶋田新、高橋有希、水本秀二、山田修平、古庄知己
2. 発表標題 Chst14遺伝子欠損マウスを用いた筋拘縮型エーラスダンロス症候群(mcEDS)の血管・皮膚症状の病態解析(Skin and Vascular Abnormalities in Chst14 Knockout Mice, an Animal Model of Musculocontractural Ehlers-Danlos Syndrome)
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第64回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋有希、吉沢隆浩、水本秀二、山田修平、古庄知己
2. 発表標題 筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群(mcEDS)疾患モデルマウスを用いた骨病態解明への取り組み
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第67回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

信州大学学術情報オンラインシステムSOAR
<http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.0CyUumkh.html>
研究紹介(吉沢 隆浩)
<https://www.shinshu-u.ac.jp/institution/kiban/i-animal/news/2013/04/post-2.php>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	古庄 知己 (Kosho Tomoki) (90276311)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	
研究分担者	水本 秀二 (Shuji Mizumoto) (40443973)	名城大学・薬学部・准教授 (33919)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------