

機関番号：22701

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790341

研究課題名 (和文) 新型エーラス・ダンロス症候群の疾患責任遺伝子の単離研究

研究課題名 (英文) Disease gene identification of a new type of Ehlers-Danlos syndrome

研究代表者

三宅 紀子 (MIYAKE NORIKO)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：40523494

研究成果の概要 (和文)：常染色体劣性遺伝形式の新規エーラス・ダンロス症候群責任遺伝子である *CHST14* を同定した。本遺伝子にコードされる D4ST1 は活性硫酸をデルマタンに付加する酵素活性を持つ。変異型ではその酵素活性がほぼ完全に消失し、コラーゲン線維束の形成に必要なデコリンの糖鎖部分であるコンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸ハイブリッド鎖がコンドロイチン鎖に置き換わる。その結果、柔軟性のないコンドロイチン鎖が外圧に耐えられずコラーゲン線維束が崩壊することが疾患病態であると推測された。

研究成果の概要 (英文)：We identified *CHST14* as a disease gene for the novel autosomal recessive Ehlers-Danlos syndrome (EDS). *CHST14* encodes dermatan 4-*O*-sulfotransferase 1 (D4ST1), which transfers active sulfate to dermatan. In the mutants observed in the patients, its enzyme activity was almost completely lost and dermatan sulfate of decorin proteoglycan, a key regulator of collagen fibril assembly, was completely lost and replaced by chondroitin sulfate (CS) in the patients' fibroblasts. This may suggest that the replacement to inflexible CS, which intolerant to the mechanical compression, resulted in the impaired collagen bundle formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：人類遺伝学

キーワード：分子遺伝学、単一遺伝子疾患

## 1. 研究開始当初の背景

エーラス・ダンロス症候群はマルファン症候群と並ぶ代表的な先天性結合組織疾患で、皮膚過伸展性・脆弱性、関節の過可動性、血管の破綻による出血傾向などを主徴とする。現在、その臨床症状・遺伝様式・生化学的所見

在、その臨床症状・遺伝様式・生化学的所見により 11 種類以上に亜型分類され、これまでに *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A1*, *COL5A2*, *POLD*, *TNXB*, *SLC39A13* がその疾患責任遺伝子として同定された。その類似した臨床症状や組織学的変化から、一連のコラーゲン合成過程のいずれかの異常により惹起

されると考えられ、本症候群の発症メカニズムの解明によりコラーゲンの生合成・成熟過程が明らかにされてきた経緯がある。本症候群の根本治療は未だ確立されておらず、病状は進行性で患者の QOL は経時的に低下する。その病態の解明により、適切な亜型診断・遺伝カウンセリングが可能になり、さらには発症予防や治療法に関する研究進展への期待は大きい。

本症候群の亜型のうち常染色体劣性遺伝形式を呈するものとして type VI (kyphoscoliosis type)、type X [OMIM#225310]、cardiac valve form [OMIM#225320] (7q22.1), spondylocheiro dysplastic form [OMIM#608735] (11p11, *SLC39A13* gene) の四型のみである。そのうち type VI は Lysyl hydroxylase 活性に異常がある (VI-A type) [OMIM#225400] (1p36.3-p36.2, *POLDI* gene) ものと、異常のないもの (VI-B type、疾患責任遺伝子および遺伝子座不明) に分類される (Steinmann et al. Connective tissue and its heritable disorders, 2002)。今回、皮膚脆弱性、関節弛緩、進行性側彎、筋緊張低下を特徴とする常染色体劣性遺伝疾患である type VI に臨床的類似点があるが、同型において欠損する Lysyl hydroxylase 活性に異常がないと考えられる 2 家系 (VI-B type) (Kosho et al. Am J Med Genet 138A:282-287, 2005) と、さらに臨床的に同一疾患と診断された 1 症例 (孤発例) を解析する機会を得た。我々は、近親婚の家族歴が明らかな前述の 2 家系 (Kosho et al. Am J Med Genet 138A:282-287, 2005) を用いて、責任遺伝子候補領域を同定するために Affymetrix 社 GeneChip Mapping 10K SNP array を使用し、homozygosity mapping を行ったところ、前述の既知の領域にはマップされなかった。また Allegro version 2 を用いた全ゲノム連鎖解析により、最大で Lod score 2.8851 の領域が既知の遺伝子とは別の領域に同定された。よって、今回の症例は VI-B type もしくは新規の亜型であり、コラーゲン生合成に関連する新規の疾患責任遺伝子の異常により発症していることが強く示唆された。

## 2. 研究の目的

常染色体劣性遺伝形式が想定された近親婚の 2 家系を対象に行ったホモ接合性マッピングにより同定された候補領域内に存在する遺伝子を候補としスクリーニングを行い、疾患責任遺伝子を同定する。その遺伝子機能解析を行い疾患発症のメカニズムを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 解析対象

新型 EDS と診断された 6 症例。解析に当たっては患者および非罹患の家系構成員よりインフォームドコンセントを得た。この解析は横浜市立大学医学部、信州大学医学部、北海道大学大学院生命科学院の倫理委員会の承認を得て行われた。また、本症候群は新しい疾患概念であることから、症例を収集し、臨床的に疾患概念を確立する。

### (2) SNP 解析結果に基づく候補領域の選出と候補遺伝子のスクリーニング及び単離・同定

Affymetrix 社 GeneChip Mapping 10K SNP array を用いたホモ接合性マッピング及び連鎖解析の結果により Lod score が高く、領域の広い領域からを優先にマイクロサテライトマーカー (*D15S1002*, *D15S1007*, *D15S118*, *D15S1044*, *D15S214*, *D15S978*, *D15S117*) で家族性とホモ接合体であることを再確認した。その領域内に含まれる既知の遺伝子をダイレクトシーケンス法により候補遺伝子 (*THBS*, *FSIP1*, *VSP39*, *MEIS2*, *DLL4*, *CHAC1*, *CHST14*) のスクリーニングを行った。

## 4. 研究成果

### (1) 責任遺伝子の同定

新型 EDS と診断された 3 家系のうち、2 家系が近親婚家系であったことから常染色体劣性遺伝形式をとると想定した。この 2 家系を用いた連鎖解析およびホモ接合性マッピングにより、15q14-q15.3 に maximum LOD score 2.885 の 7.3Mb の候補領域を同定した。この候補領域に含まれる 109 の既知の遺伝子のうち、*THBS*, *FSIP1*, *VSP39*, *MEIS2*, *DLL4*, *CHAC1*, *CHST14* の 7 遺伝子をスクリーニングし、6 家系中 6 家系全てにバイアレリックな変異を同定した (図 1)。

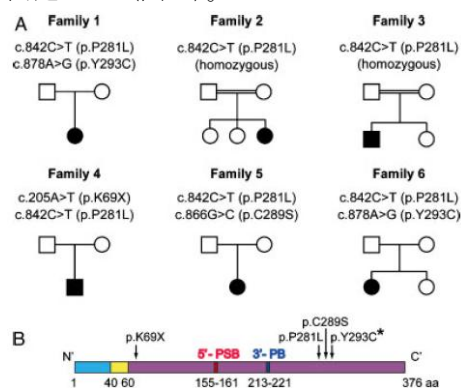


図 1 *CHST14* 変異とその位置

(2) 酵素活性の測定

CHST14 遺伝子は、デルマタンに活性硫酸を転移する酵素活性を有する 1 回膜貫通型タンパク質である D4ST1 (dermatan 4-O-sulfotransferase 1) をコードする。ゴルジ膜に存在し、小胞体で産生される糖タンパク質であるデルマトンプロテオグリカンに活性硫酸基を転移し、デルマタン硫酸を作る。我々は、COS7 細胞を用いた一過性強制発現系 (図 2) と、罹患者由来の線維芽細胞を用いた系 (図 3) で、変異タンパク質のデルマタンに対する硫酸基転移酵素活性が消失していることを明らかにした。

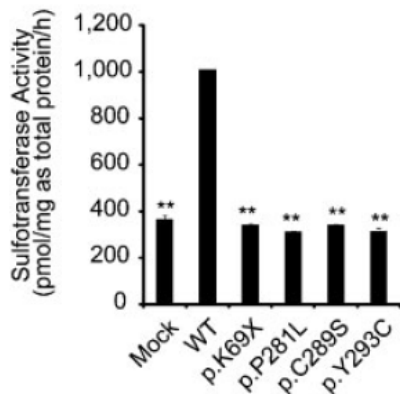


図 2 COS7 細胞を用いて一過性発現系における硫酸基転移酵素活性

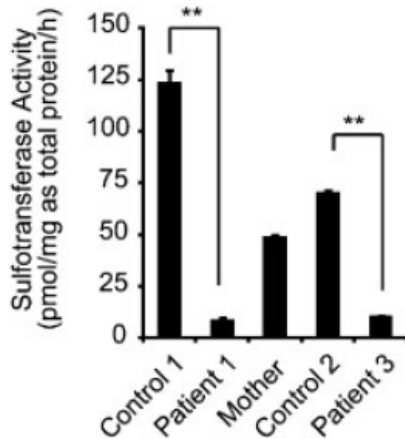


図 3 患者由来線維芽細胞を用いた硫酸基転移酵素活性

(3) グリコサミノグリカン鎖の解析

患者および性別・年齢を合わせたコントロールの線維芽細胞におけるデルマタン硫酸 (DS) およびコンドロイチン硫酸 (CS) の構成を調べた。図 4 に示すように、患者では DS が完全に消失していた。

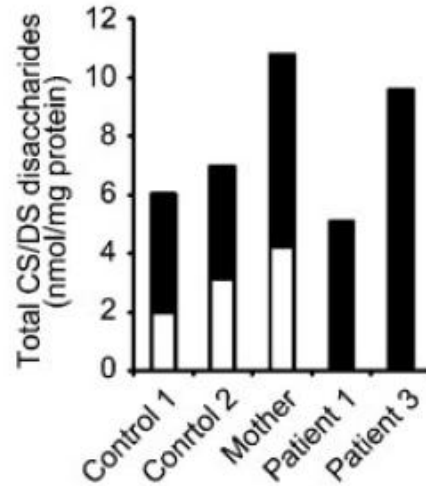


図 4 患者および対象コントロールにおけるグリコサミノグリカンの組成。デルマタン硫酸 (DS : □) およびコンドロイチン硫酸 (CS : ■)

(4) デコリンのグリコサミノグリカン鎖解析

我々はデルマトンプロテオグリカンの中でも皮膚に多く存在しているデコリン (decorin) に注目した。コラーゲン線維束はコラーゲン線維がデコリンにより束を形成したものである。デコリンは、U字型のコアタンパク質に一本のコンドロイン硫酸 (CS) ・デルマタン硫酸 (DS) ハイブリッド鎖が結合した構造を取っている。デコリンはコラーゲン線維同士を結合する役割を持ち、デコリンの糖鎖部分である CS/DS ハイブリッド鎖はサスペンションのような働きを持ち、コラーゲン線維束の伸縮性を保っている (図 5)。

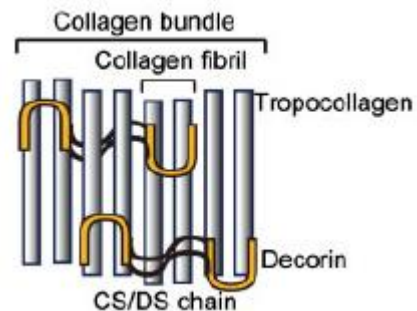


図 5 コラーゲン線維・コラーゲン線維束およびデコリン (コアタンパク質を黄色、CS/DS 鎖を黒線で表現) の模式図

そこでデコリンのグリコサミノグリカン部の解析を行ったところ、DS(IdoUA-GalNAc(4S), IdoUA(2S)-GalNAc(4S))は完全に消失していた(図6)

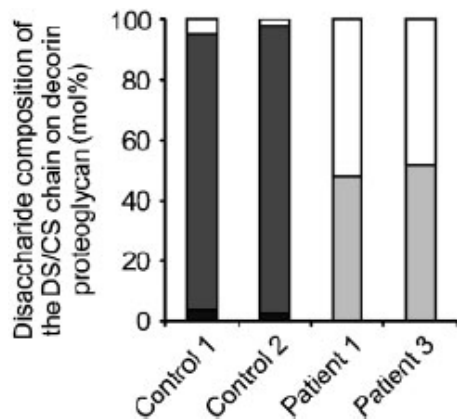


図6 デコリンのCS/DS鎖の構成。白色(GlcUA-GalNAc(4S)), 淡灰色(Glu-UA-GalNAc(6S)), 濃灰色(IdoUA-GalNAc(4S)), 黒(IdoUA(2S)-GalNAc(4S))

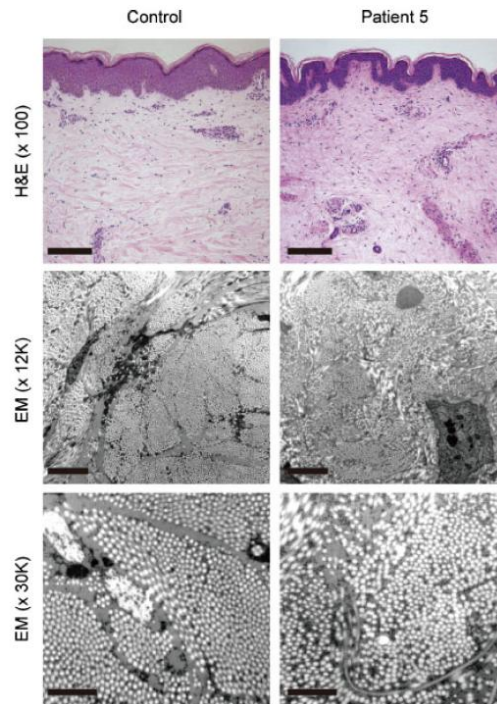


図7 患者および対象コントロールにおける皮膚の病理学的検索

(5) TGF-βシグナル系への影響

デコリンプロテオグリカンはTGF-β1シグナルを抑制することが知られていた。今回デコリンの糖鎖部分がCS/DS鎖からCS鎖に置き換わることでTGF-βシグナル系に影響が出るかを調べた。患者由来の線維芽細胞にCHST14の野生型もしくは変異型を一過性強制発現させた系で、TGF-βシグナルの直接の下流因子であるPAI1およびSMAD7の発現、及びSMAD2のリン酸化を調べたが、野生型と変異型の間に差を認めなかった。

(6) 病理学的検索

①H&E染色

性別・年齢・採取場所を同じにした対象コントロール皮膚と比較したところ、患者皮膚組織においてコラーゲン線維束形成が障害されていた(図7、上段)

②電子顕微鏡による所見

性別・年齢・採取場所を同じにした対象コントロール皮膚と比較したところ、コラーゲン線維自体の大きさ、形は保たれているものの、コラーゲン線維束の形成が障害され、コラーゲン線維がパラパラと散在しているのが明らかである。(図7、中・下段)

(7) 疾患発症モデルの提唱

本研究により、本症がD4ST1酵素欠損を本態とする新型の先天性結合組織疾患であることを明らかにした。臨床症状は全身の皮膚・骨・関節・血管を中心に結合組織全体が侵され、かつ重症で進行性である。今回の研究により、D4ST1欠損によりコラーゲン線維束をつなぐCS/DS鎖がCS鎖に置き換わることが明らかになった。ここで重要なことは、デルマタン硫酸が柔軟性のある構造体であるのに対し、コンドロイチン硫酸は柔軟性を持たないことである。つまり、通常外力(図中赤印)に対して伸縮自在なサスペンションのような働きがあるCS/DSハイブリッド鎖(図8)が、変異によってCS鎖に置き換えられるため外圧に耐えられなくなり、束形成が崩壊する(図9)と推測された。このモデルは、罹患者における進行性の皮膚脆弱性をうまく説明できる。

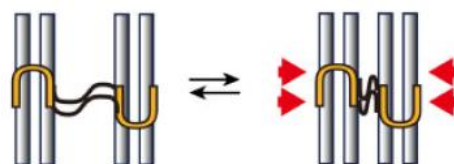


図8 正常のコラーゲン線維とCS/DS鎖を持つデコリン。外圧(赤矢印)により伸縮可能である。

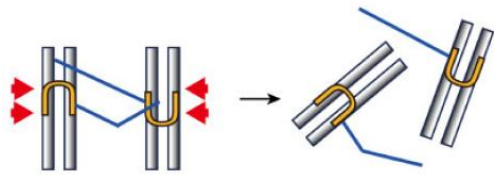


図9 D4ST1欠損におけるコラーゲン線維とCS鎖(青線)を持つデコリン。外圧(赤矢印)に耐えられずコラーゲン線維同士の結合が外れ、線維束形成が崩壊すると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

全て査読有り

1. Miyake N, Kosho T, Mizumoto S, Furuichi T, Hatamochi A, Nagashima Y, Arai E, Takahashi K, Kawamura R, Wakui K, Takahashi J, Kato H, Yasui H, Ishida T, Ohashi H, Nishimura G, Shiina M, Saito H, Tsurusaki Y, Doi H, Fukushima Y, Ikegawa S, Yamada S, Sugahara K, Matsumoto N. Loss-of-function mutations of CHST14 in a new type of Ehlers-Danlos syndrome. *Human Mutation* 2010 (8) 966-974

2. Kosho T, Miyake N, Hatamochi A, Takahashi J, Kato H, Miyahara T, Igawa Y, Yasui H, Ishida T, Ono K, Kosuda T, Inoue A, Kohyama M, Hattori T, Ohashi H, Nishimura G, Kawamura R, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N. A New Ehlers-Danlos Syndrome With Craniofacial Characteristics, Congenital Multiple Contractures, and Progressive Joint and Skin Laxity and Multisystem Fragility related Manifestations. *American Journal of Medical Genetics A* 2010 (152) 1333-1346

3. Shimizu K, Okamoto N, Miyake N, Taira K, Sato Y, Matsuda K, Akimaru N, Ohashi H, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Kosho T. Delineation of Dermatan 4-O-sulfotransferase 1 Deficient Ehlers-Danlos Syndrome: Observation of Two Additional Patients and Comprehensive Review of 20 Reported Patients. *American Journal of Medical Genetics A* (in press)

[学会発表] (計2件)

1. Miyake N. Carbohydrate sulfotransferase 14 abnormality in human. 日本人

類遺伝学会 (招待講演), 2010年10月28日, 埼玉県大宮市

2. Miyake N, Kosho T, Mizumoto S, Furuichi T, Hatamochi A, Ikegawa S, Yamada S, Sugahara K, Matsumoto N. Loss-of-function mutations of CHST14 cause a new type of autosomal recessive Ehlers-Danlos syndrome. American Society of Human Genetics (oral presentation), 2010年11月3日, アメリカ・ワシントンDC

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: エーラス・ダンロス症候群患者又は保因者の検出方法

発明者: 松本直通、三宅紀子

権利者: 公立大学法人 横浜市立大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-219304 (P200-219304)

出願年月日: 平成 21 年 9 月 24 日

国内外の別: 国内

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 紀子 (MIYAKE NORIKO)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号: 40523494

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

松本 直通 (MATSUMOTO NAOMICHI)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号: 80325638

古庄 知己 (KOSHO TOMOKI)

信州大学・医学部・講師

研究者番号: 90276311