

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19396

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

研究課題名(英文) Analysis of Chst14 gene-deleted mice as a model of Musculocontractural 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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年発見された筋拘縮型エーラスダンロス症候群(mcEDS)は、軽微な外圧による巨大皮下血腫などの重篤な症状を呈する疾患で、病態メカニズム解明や治療法開発が急がれている。本研究では、mcEDSの原因遺伝子であるChst14遺伝子の欠損マウス(KO)を用いた検討を行った。しかし、Chst14 KO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ため、(1)胎仔や胎盤の解析と、(2)出生率改善方法の開発を行った。その結果、Chst14 KOで胎盤の毛細血管に構造異常が認められ、血管合併症との関連性が示唆された。また、遺伝背景をBALB/c系統に置換することで、出生率が改善されることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mcEDSは近年報告された新しいタイプの疾患であり、病態メカニズムの解明や治療法開発が急務である。そのためには、疾患モデル動物が必要であるため、本研究ではChst14 KOマウスを用いた検討を行った。その結果、Chst14が胎盤絨毛の毛細血管基底膜の構造維持に重要であることが明らかになり、mcEDSの血管合併症との関連が示唆された。また、従来のChst14 KOマウスは出生率が低く成獣での解析が困難であったが、本研究によって出生率改善方法が確立された。以上の研究成果は、mcEDSの病態メカニズム解明の糸口になるだけでなく、今後のmcEDS研究発展への寄与が期待される。

研究成果の概要(英文)： Musculocontractural Ehlers-Danlos Syndrome (mcEDS) is a new type of EDS caused by a defect of dermatan 4-O-sulfotransferase-1 resulting from mutations in carbohydrate sulfotransferase 14 gene (CHST14). This disorder is characterized by multiple congenital malformations and progressive multisystem fragility-related complications.

Chst14 gene-deleted mice (KO) were expected to be an animal model of mcEDS. However, most Chst14 homozygous KO (Chst14<sup>-/-</sup>) mice died in utero. First, we investigated embryo and placenta of Chst14<sup>-/-</sup>. The placenta of Chst14<sup>-/-</sup> fetal mice showed alterations in vascular structure and ischemic changes. Next, we found that backcrossing of the mice to BALB/c strain improved birth rate of Chst14<sup>-/-</sup>.

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(mcEDS) Chst14遺伝子欠損マウス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

エーラスダンロス症候群(Ehlers-Danlos Syndrome; EDS)は、皮膚や関節の過進展性と、各種組織の脆弱性を特徴とする先天性疾患の総称である。最近、本学医学部において、進行性結合組織脆弱性(皮膚脆弱性、巨大皮下血腫、全身関節弛緩など)や、発生異常(顔貌の特徴、先天性多発関節拘縮)に特徴付けられる新しいタイプのEDSが発見された。さらに、この疾患の原因が、*CHST14* 遺伝子変異によるデルマトタン 4-O-硫酸基転移酵素-1(D4ST1)欠損によることが示され、筋拘縮型エーラスダンロス症候群(mcEDS)と命名された。

mcEDS患者では、転倒やマッサージなどの軽微な外力で、巨大皮下血腫や皮膚の壊死を生じることがある。これは、しばしば急激に進行し、入院、輸血、外科的ドレナージを要する重篤な症状に至る。このような、生命の危機を伴う重篤な症状に対する治療法の確立が急務であるが、本症は疾患概念が確立されたばかりの疾患であり、病態メカニズムの解明や治療法の探索が急がれている。

より効率的な治療法開発のためには、実験的な疾患モデルの確立と、病態メカニズムの理解が重要となる。特に、疾患モデル動物の確立は、病態メカニズム解析や、治療薬スクリーニングなど、基礎医学研究から治療応用に至るまでの広範囲に亘り必要となる重要な課題である。

本研究では、mcEDSのモデル動物として、*Chst14* 遺伝子欠損(KO)マウスを用いた検討を行い、疾患モデル動物としての評価と、病態メカニズムの解明を行った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、mcEDSの疾患モデル動物の確立と、病態メカニズムの解析を行うことである。そのために、*Chst14* KOマウスを用いた検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) *Chst14* KOマウスの解析

mcEDS患者で重篤な症状が認められる毛細血管や皮膚の病態に着目し、以下の解析を行った。

#### ① 胎仔・胎盤の解析

本研究ではmcEDSの疾患モデル動物として *Chst14* KOマウスに着目したが、*Chst14* 遺伝子ホモ欠損マウス(-/-)の殆どが周産期致死となり、成獣を用いた解析が困難であった。そのため、後述の方法(2)で出生率改善方法の開発に取り組むと同時に、胎生後期の胎仔と胎盤を用いた解析を行った。胎仔や胎盤の評価には、外観や重量、病理学的評価(H&E染色、透過型電子顕微鏡[TEM]による組織観察、細胞外マトリクス関連分子の免疫染色)、分子生物学的解析(糖鎖解析、*Chst14* 関連遺伝子やコラーゲンのRT-リアルタイムPCRを用いた遺伝子発現の評価)等を行った。

#### ② 創傷治癒モデル

後述の方法(2)で *Chst14*<sup>-/-</sup>の出生率改善に成功したことから、成獣を用いた解析が可能になった。そこで、mcEDSの皮膚症状の疾患モデル動物として、*Chst14*<sup>-/-</sup>を用いた評価を行った。皮膚機能の評価を行うために、*in vivo*での創傷治癒モデルや、病理学的評価(H&E染色やTEMによる観察)、遺伝子発現の解析(マイクロアレイやRT-リアルタイムPCR)等を行った。

### (2) *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの出生率改善方法の開発

従来の *Chst14*<sup>-/-</sup>は、殆どが周産期致死となり成獣を用いた解析が困難であった。そこで、本研究では、体外授精と胚移植(IVF・ET)や、離乳率が高い近交系マウスとして知られるBALB/c系統への戻し交配などの方法によって、*Chst14*<sup>-/-</sup>の出生率が改善されるかを検討した。

補足：本研究における動物実験は、信州大学動物実験等実施規程に基づき、学長承認を受けて法令及び規程を遵守して行われた。また、遺伝子組換え動物を用いた実験は、信州大学遺伝子組換え実験等安全管理規程に基づき、学長承認を受けて法令及び規程を遵守して行われた。

## 4. 研究成果

### (1) *Chst14*<sup>-/-</sup>胎盤の毛細血管異常

本研究に取りかかった当初は、*Chst14* 遺伝子ホモ欠損マウス(-/-)の殆どが周産期致死であり、成獣を用いた解析が困難であった。そのため、まずは胎生後期の胎仔と胎盤を用いた解析を行った。胎生18.5日の胎仔は一定数が生存しており(全胎仔の14.8%が *Chst14*<sup>-/-</sup>)、*Chst14*<sup>-/-</sup>で頭腎長の有意な低下が認められたが、体重やその他の外観には有意な差を認めなかった。一方で、*Chst14*<sup>-/-</sup>胎仔の胎盤では、胎盤重量の有意な減少や、絨毛膜板血管の血管径減少が認められた。一部の *Chst14*<sup>-/-</sup>胎仔の胎盤では、虚血や壊死が認められた。胎盤径や、脱落膜・胎盤絨毛の面積比には差を認めなかったが、

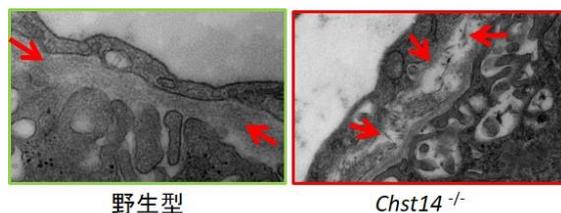


図1. *Chst14*<sup>-/-</sup>胎仔の胎盤絨毛の毛細血管基底膜(TEMによる観察)

*Chst14*<sup>-/-</sup>胎仔の胎盤では胎盤絨毛の有意な密度低下が観察された。さらに、TEMによる観察を行ったところ、胎盤絨毛の毛細血管基底膜の有意な菲薄化や断裂(図1)が認められ、毛細血管の構造や機能維持における *Chst14* の重要性が示唆された。

*Chst14* は 4-O-硫酸基転移酵素-1(D4ST1)をコードする遺伝子である。D4ST1 は、デルマトン硫酸(DS)の硫酸基を付加する糖鎖修飾酵素であり、コラーゲン細線維のアセンブリに重要であることが mcEDS 患者皮膚の観察から示唆されている(引用文献①、②)。胎盤は母体(*Chst14*ヘテロ欠損マウス)の子宮内膜と胚(*Chst14*<sup>-/-</sup>)が融合して形作られる組織であるが、*Chst14*<sup>-/-</sup>胎仔の胎盤では、*Chst14* 遺伝子の発現と DS 含量に有意な低下が認められた。胎盤における各種コラーゲンの遺伝子発現には、変化を認められなかった。また、本モデルの胎盤絨毛の毛細血管における重要なプロテオグリカンを検討するために、IV型コラーゲン、XV型コラーゲン、ビグリカン、デコリンを免疫染色で確認したところ、毛細血管ではVI型コラーゲンとビグリカンの発現が認められた。従来のmcEDS患者の皮膚の観察ではデコリンへのDS付加が重要とされてきたが、胎盤絨毛の毛細血管ではデコリンは検出されず、組織によって関与するプロテオグリカンの種類が異なる可能性が示唆された。

以上の結果から、*Chst14* が毛細血管基底膜の構造維持に重要であることが明らかになり、mcEDSの血管合併症との関連が示唆された。これらの成果は、2018年 *Glycobiology* 誌に掲載された(引用文献③)。

### (2) *Chst14*<sup>-/-</sup>の出生率改善方法の確立

胎仔や胎盤での表現型解析によって、血管合併症と *Chst14* の関与が示唆され、*Chst14*<sup>-/-</sup>胎仔の胎盤の解析が、mcEDSの病態解明研究に有用である可能性が示唆されたが、mcEDSの病変の好発部位である皮膚とは組織の性質が異なるため、実際の病態を再現しているかは不明であった。そこで、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの出生率を改善し、mcEDS患者の病態により近いモデルとして成獣での解析が必要と考えた。本研究では、IVF・ETと、BALB/c系統への戻し交配の2つの方法を検討した。その結果、IVF・ETでは出生率は改善しなかったが、BALB/c系統への戻し交配により従来は全産仔の1.9%であった *Chst14*<sup>-/-</sup>の出生率を8.1%(約4倍)まで改善することに成功した。また、それと同時に、遺伝背景がB6;129(雑種)からBALB/c(近交系)に置き換えられたことも、マイクロサテライトマーカーを用いた解析で確認している。これらのことから、今後の *Chst14*<sup>-/-</sup>マウスを用いた mcEDS 研究の効率化と、再現性向上への寄与が期待できる。これらの成果は、2020年 *Experimental Animals* 誌に accept された(2020年6月10日 web 先行掲載予定；引用文献④)。

また、出生率改善方法の確立と同時に、CRISPR/Cas9による受精卵でのゲノム編集を行い、*Chst14* flox マウスの作出にも成功した。現在、*Chst14* flox マウスと CreERT2 発現マウスとの交配により、薬剤投与依存性 *Chst14* 遺伝子欠損マウスを樹立し、解析を開始したところである。

### (3) *Chst14*<sup>-/-</sup>成獣を用いた皮膚機能評価

前述の研究成果(2)によって、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウス成獣を用いた解析が可能となった。本研究では、mcEDSの皮膚症状の病態メカニズムを解析し、将来的な治療研究に役立つ疾患モデル動物を樹立するための検討を行った。*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスの皮膚をTEMで観察したところ、mcEDS患者皮膚と同様にコラーゲン細線維のアセンブリ不全が認められた。次に、創傷治癒モデルを作成し、皮膚創部の治癒過程を観察したところ、*Chst14*<sup>-/-</sup>マウスでは野生型と比べて有意な創傷治癒の遅延が認められた。現在、マイクロアレイやRT-リアルタイムPCRによって、創傷治癒遅延の原因となる因子を探索しているところである。

#### <引用文献>

- ① Miyake N, Kosho T, Matsumoto N. et al. *Hum Mutat* (2010).
- ② Hirose T, Kosho T, Watanabe T. et al. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* (1019).
- ③ Yoshizawa T, Kosho T. et al. *Glycobiology* (2018).
- ④ Shimada S, Yoshizawa T, Kosho T. et al. *Experimental Animals* (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshizawa Takahiro, Mizumoto Shuji, Takahashi Yuki, Shimada Shin, Sugahara Kazuyuki, Nakayama Jun, Takeda Shin'ichi, Nomura Yoshihiro, Nitahara-Kasahara Yuko, Okada Takashi, Matsumoto Kiyoshi, Yamada Shuhei, Kosho Tomoki	4. 巻 28(2)
2. 論文標題 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	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 80~89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/glycob/cwx099	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 Shin Shimada, Takahiro Yoshizawa, Yuki Takahashi, Yuko Nitahara-Kasahara, Takashi Okada, Yoshihiro Nomura, Hitoki Yamanaka, Tomoki Kosho, Kiyoshi Matsumoto	4. 巻 69(4)
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 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 2019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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

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 Pathophysiological investigation of Musculocontractural Ehlers-Danlos Syndrome caused by mutations in CHST14 (mcEDS-CHST14) using knockout mice
3. 学会等名 International Symposium on the Ehlers-Danlos Syndromes 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嶋田 新、吉沢 隆浩、山中 仁木、古庄 知己、松本 清司
2. 発表標題 Chst14遺伝子欠損マウスの出生率改善方法の検討
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嶋田 新、吉沢 隆浩、松本 清司
2. 発表標題 遺伝背景の違いによるChst14遺伝子欠損マウスの出生率の違い
3. 学会等名 信州実験動物研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahiro Yoshizawa, Shuji Mizumoto, Jun Nakayama, Takuya Hirose, Kazushige Takehana, Fengming Yue, Nana Tsumita, Chiaki Masuda, Yuko Kasahara, Yuki Takahashi, Shin-ichi Takeda, Takashi Okada, Kiyoshi Matsumoto, Tomoki Kosho
2. 発表標題 Placental phenotypes of Chst14 -/- fetal mice: a model for vascular manifestations in Ehlers-Danlos syndrome caused by CHST14/D4ST1 deficiency
3. 学会等名 The 13th International Congress of Human Genetics (ICHG2016) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Tomoki Kosho, Nana Tsumita, Chiaki Masuda, Takahiro Yoshizawa, et al.
2. 発表標題 Pathophysiological investigation of Ehlers-Danlos syndorome caused by CHST14/D4ST1 deficiency using iPS cell and knockout mice
3. 学会等名 The 13th International Congress of Human Genetics (ICHG2016) (国際学会)
4. 発表年 2016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 Musculocontractual 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 Musculocontractual Ehlers-Danlos Syndrome)
3. 学会等名 日本人類遺伝学会 , 日本人類遺伝学会第64回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Yoshizawa, Yuki Takahashi, Shin Shimada, Shuji Mizumoto, Kiyoshi Matsumoto, Tomoki Kosho
2. 発表標題 新型エーラスダンロス症候群のモデル動物としてのChst14遺伝子欠損マウス胎盤の解析(Analysis of Placenta of Chst14 Gene-deleted Mice as the Model of DDEDS, a New Type of Ehlers-Danlos Syndrome)
3. 学会等名 第64回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2017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>  
<http://www.shinshu-u.ac.jp/institution/hito/i-animal/index.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----