



名城大学  
*Meijo University*



# グリコサミノグリカンと疾患

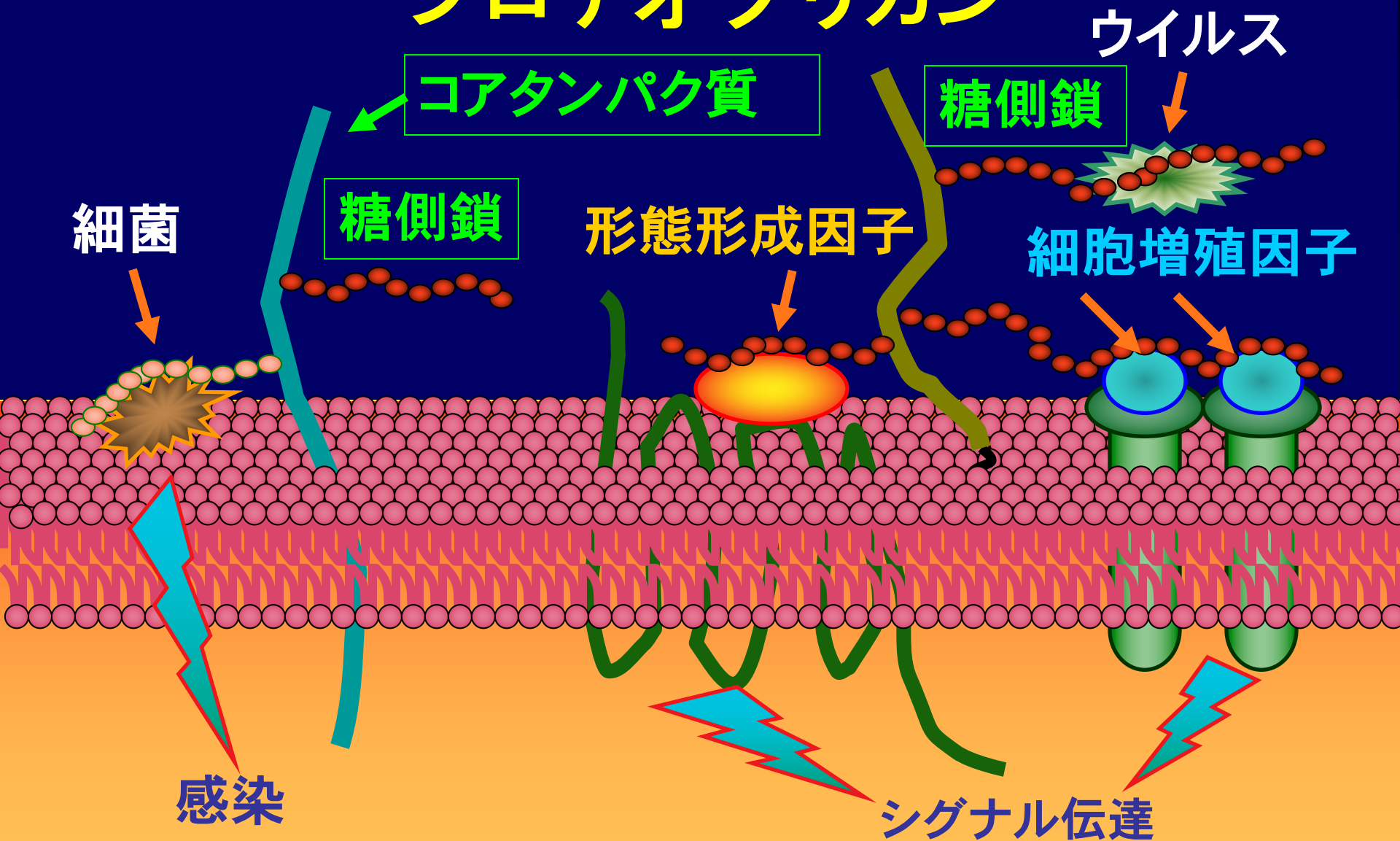
山田修平

名城大学・薬学部・病態生化学

# 今日の内容

- ・ イントロダクション
- ・ 癌とGAG
- ・ 脊髄損傷
- ・ GAGを介した病原体の感染
- ・ ムコ多糖症
- ・ 生合成酵素の欠損による遺伝病

# 動物細胞の細胞表面に存在する プロテオグリカン



# グリコサミノグリカン(ムコ多糖)の種類

- ・ コンドロイチン硫酸
- ・ デルマタン硫酸
- ・ ヘパリン
- ・ ヘパラン硫酸
- ・ ケラタン硫酸
- ・ ヒアルロン酸



# グリコサミノグリカン

アミノ糖を含む2種類の糖の  
繰り返しからなる多糖  
硫酸化修飾されている

コンドロイチン硫酸…軟骨の主要成分  
デルマトン硫酸…皮膚、大動脈など  
ヘパラン硫酸…基底膜など  
ヘパリン…抗血液凝固薬  
ケラタン硫酸…角膜など

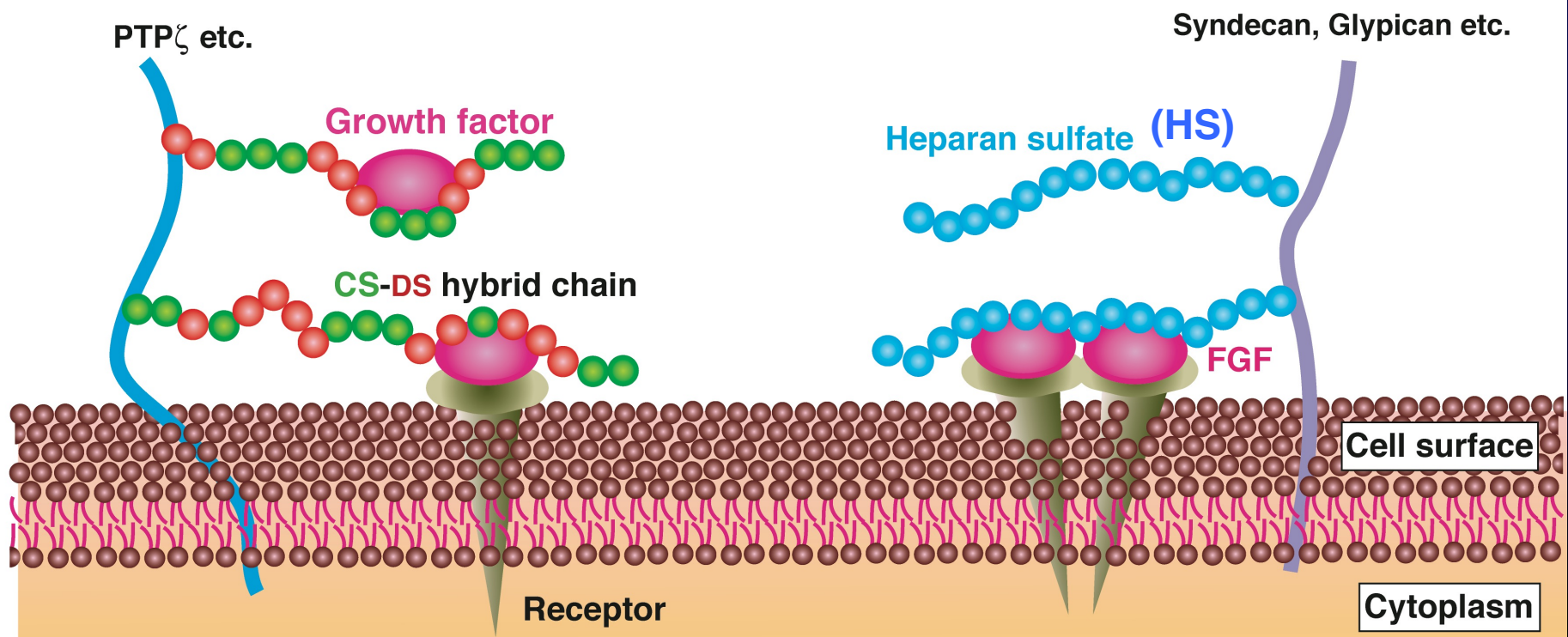
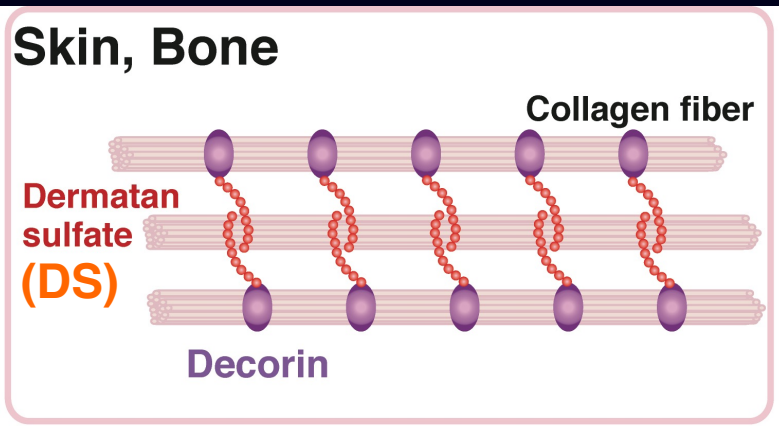
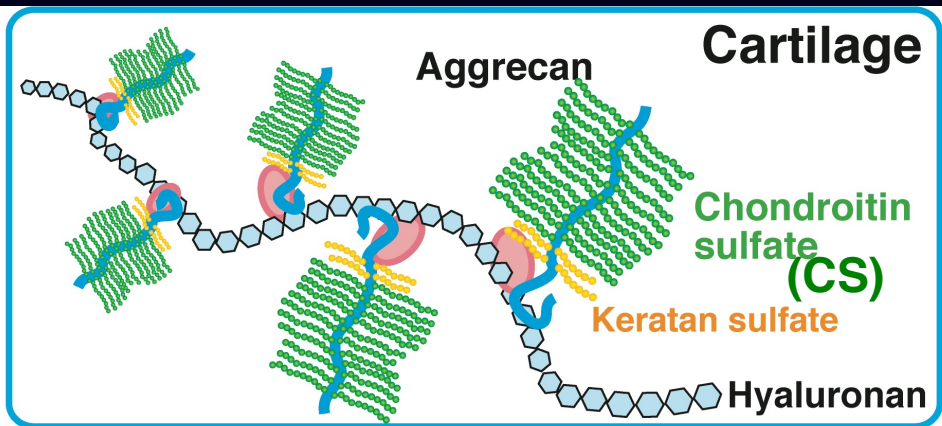
# プロテオグリカンの機能

細胞増殖因子、細胞分化因子、サイトカイン、  
細胞外マトリックス成分、神経栄養因子、  
血液凝固因子など  
多様な生理活性タンパク質と相互作用する



細胞増殖、細胞接着、細胞移動、  
血液凝固阻止、形態形成、組織再生など  
多様な機能を発揮する

# Various functions of CS, DS, and HS-proteoglycans at cell surfaces and in extracellular matrix



# GAGと相互作用するタンパク質因子(一部)

## Cell Adhesion Molecules

CD44  
L-Selectin  
P-Selectin  
RANTES  
von Willebrand factor  
MAC-1  
N-CAM

## Growth Factors/Morphogens

Fibroblast growth factors  
Hepatocyte growth factor  
Midkine/Pleiotrophin  
Platelet derived growth factor  
Vascular endothelial growth factor  
Transforming growth factor- $\beta$   
Glial-derived neurotrophic factor  
Brain-derived neurotrophic factor  
HB-EGF  
Amphiregulin  
Neuregulin  
Insulin-like growth factor  
Bone morphogenetic proteins  
Sonic hedgehog  
Wnts

## Virus protein

Glycoprotein C

## Coagulation

Heparin cofactor II  
Antithrombin III  
Factor Xa  
Leuserpin  
Thrombin

## ECM Components

Tenascin-X  
Opticin  
Fibronectin  
Collagens  
Laminins  
Tenascin  
Thrombospondin  
Vitronectin

## Proteinases

Elastases  
Cathepsin G

## Chemokines

Interferon- $\gamma$   
Interleukin-2, -3, -4, -5, -7, -8, -12  
Macrophage inflammatory peptides 1  
Monocyte chemoattractant protein-1  
Secondary lymphoid tissue chemokine  
Stromal cell-derived factor-1 $\beta$   
Platelet factor 4  
GM-CSF  
TNF-alpha

## Others

$\beta$ -Amyloid peptide  
Cardiotoxins from spitting cobra venom  
 $\alpha$ -Defensin  
EGF-TM7 receptors CD97 and EMR2  
Extracellular superoxide dismutase  
Lipoprotein lipase  
Thyroglobulin  
Tissue plasminogen activator  
Plasminogen activator inhibitor  
Follistatin  
Angiostatin  
Endostatin  
ApoB, ApoE

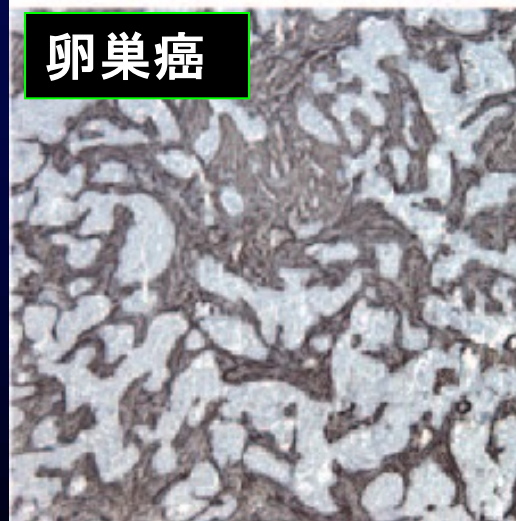
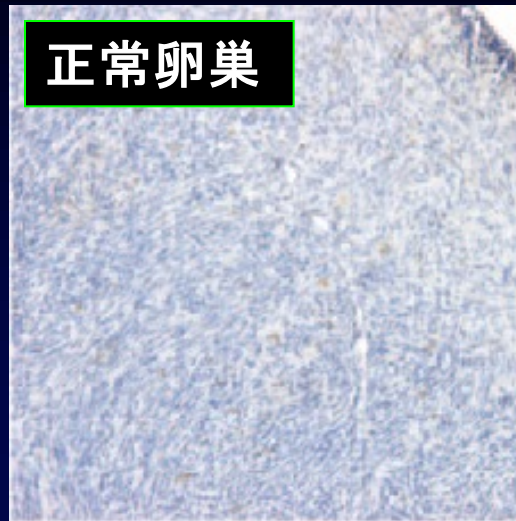
プロテオグリカン、  
グリコサミノグリカンの  
関与する疾患

# 癌とグリコサミノグリカン

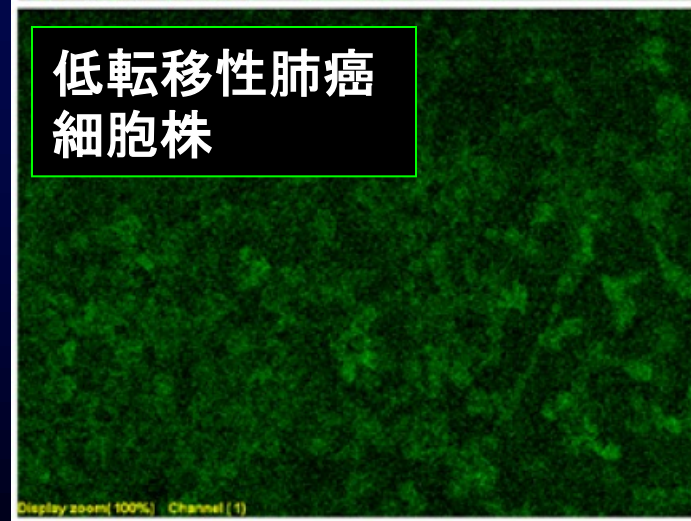
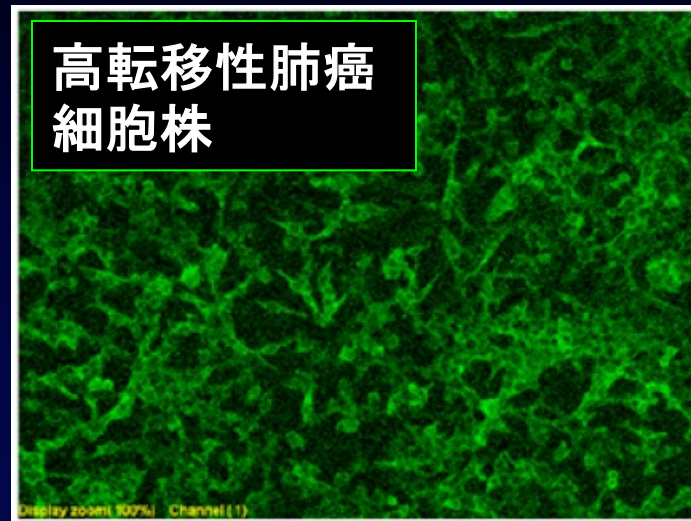




# 高硫酸化コンドロイチン硫酸(CS)に対する抗体による免疫染色

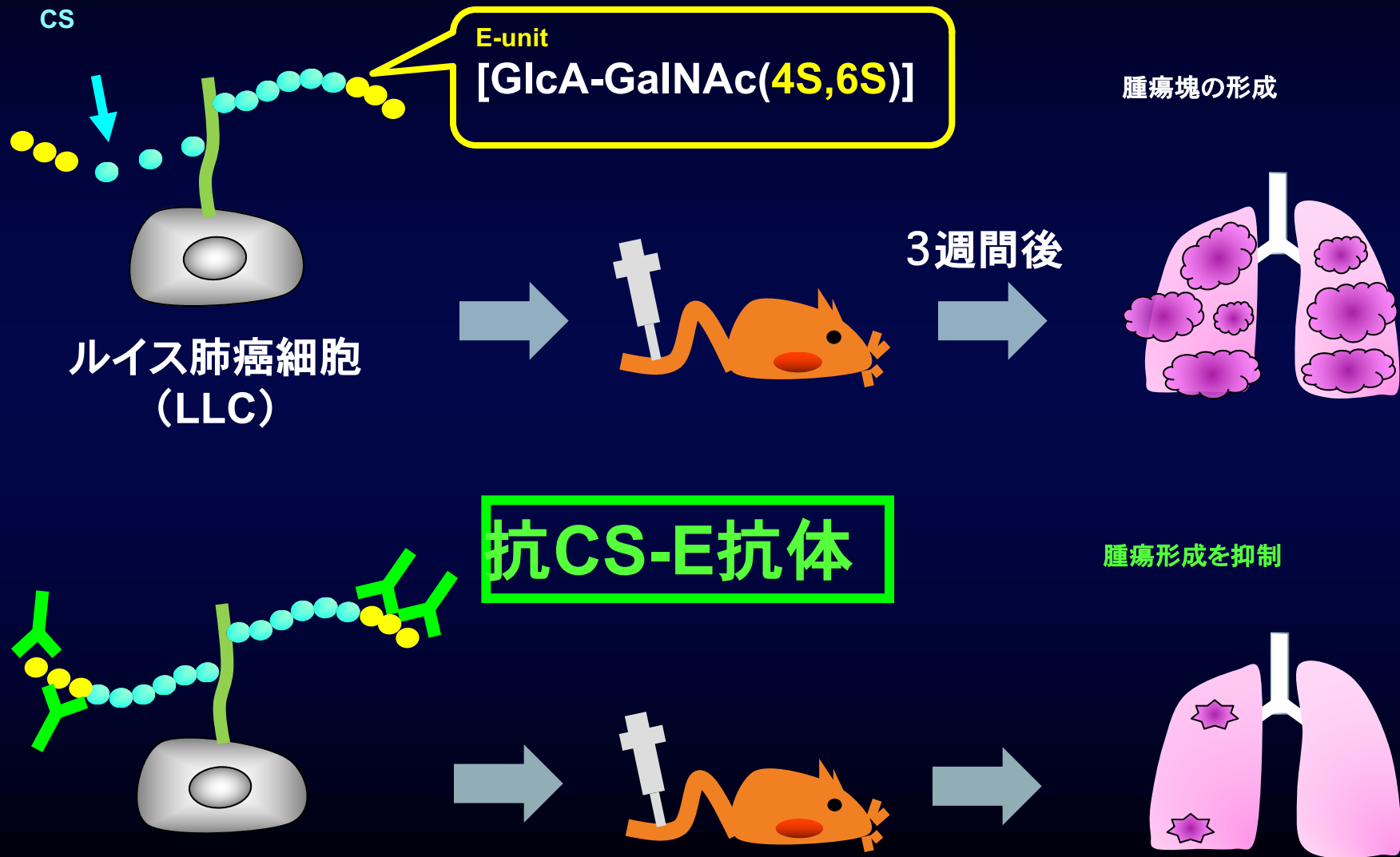


ten Dam *et al.*, *Am. J. Pathol.* (2007).



高転移性の癌細胞でより強く発現  
Li, *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2008).

# 高硫酸化コンドロイチン硫酸(CS)に対する抗体による腫瘍形成阻害





がん細胞

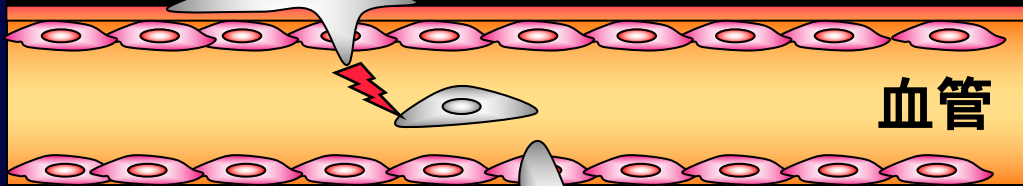
原発がん組織



① 原発巣からの離脱

タンパク質分解酵素や糖鎖分解酵素が組織を分解

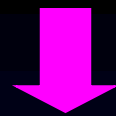
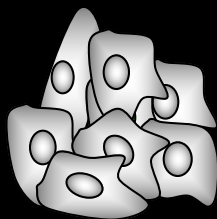
接着



浸潤

②

増殖



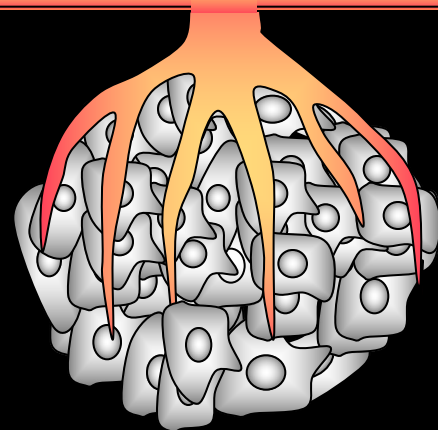
血管

③ 種々の増殖因子の関与

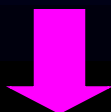


血管新生

(栄養補給)



がんの増殖



# MMPs: Matrix metalloproteinases

MMP1: コラゲナーゼ-1

MMP2: ゼラチナーゼA

MMP3: ストロメライシン-1

MMP7: マトリライシン-1

MMP8: コラゲナーゼ-2

MMP9: ゼラチナーゼB

MMP10: ストロメライシン-2

MMP11: ストロメライシン-3

MMP12: マクロファージ

メタロエラスターゼ

MMP13: コラゲナーゼ-3

MMP14: 膜型 (MT) 1-MMP

MMP15: MT2-MMP

MMP16: MT3-MMP

MMP17: MT4-MMP

MMP18: コラゲナーゼ-4

MMP19: ストロメライシン-4

MMP20: エナメライシン

MMP21: X-MMP

MMP23: CA-MMP

MMP24: MT5-MMP

MMP25: MT6-MMP

MMP26: マトリライシン-2

MMP27: C-MMP

MMP28: エピライシン

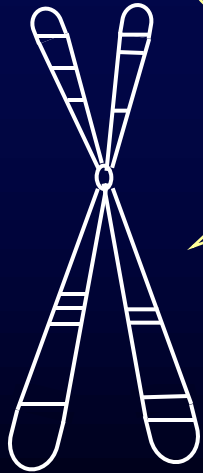
# Human heparanases

4q22

**HEPARANASE-1**

10q23-24

**HEPARANASE-2**



**chromosome**

# 脊髄損傷

- 国内年間発生数
  - 5,000人以上 (40人/100万人前後)
- 国内患者数: 約10万人以上
- 原因
  - 交通事故
  - 転落事故
  - スポーツ外傷

一度損傷を受けた哺乳類成獣の中樞神経系(脳・脊髄)は再生しない— Cajal, 1921

# コンドロイチン硫酸の分解除去によって 脊髄損傷後の機能回復が促進される

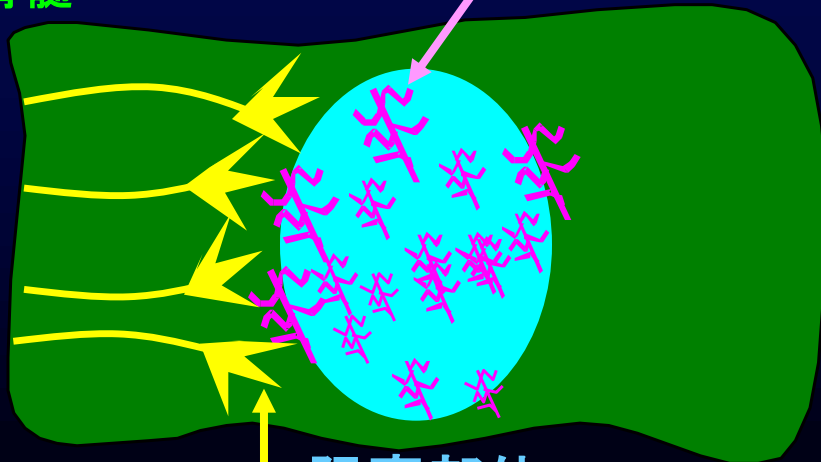
Bradbury et al., *Nature* 416, 636-640 (2002)

Alilain et al., *Nature* 475, 196-200 (2011)

グリア性瘢痕に存在するコンドロイチン硫酸が  
軸索再生を阻害する

脊髄

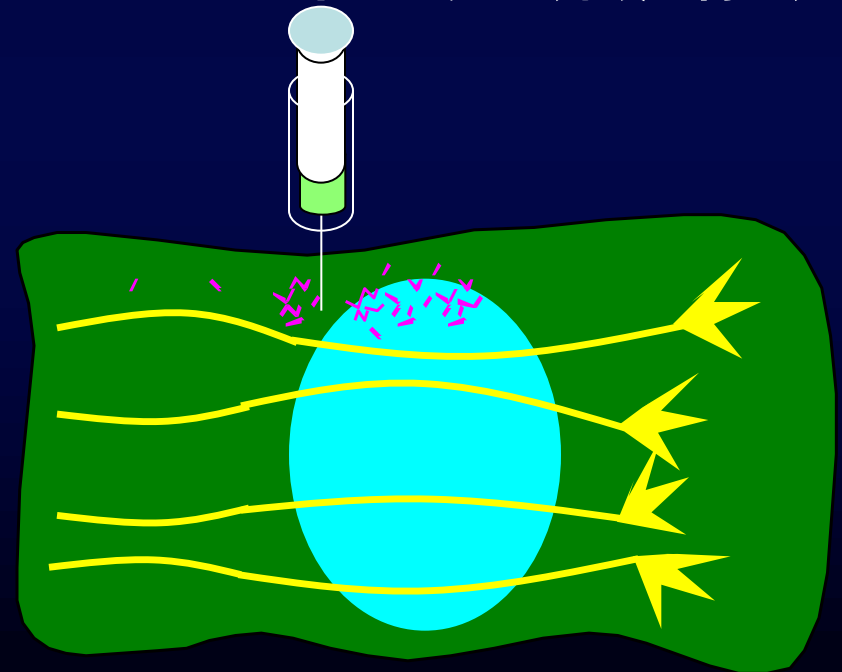
コンドロイチン硫酸



阻害部位

神経線維の先端

細菌由来の分解酵素で  
コンドロイチン硫酸を除去



# グリコサミノグリカンを介した病原体の感染

単純ヘルペスウイルス (HSV)

エイズウイルス (HIV)

C型肝炎ウイルス

デングウイルス

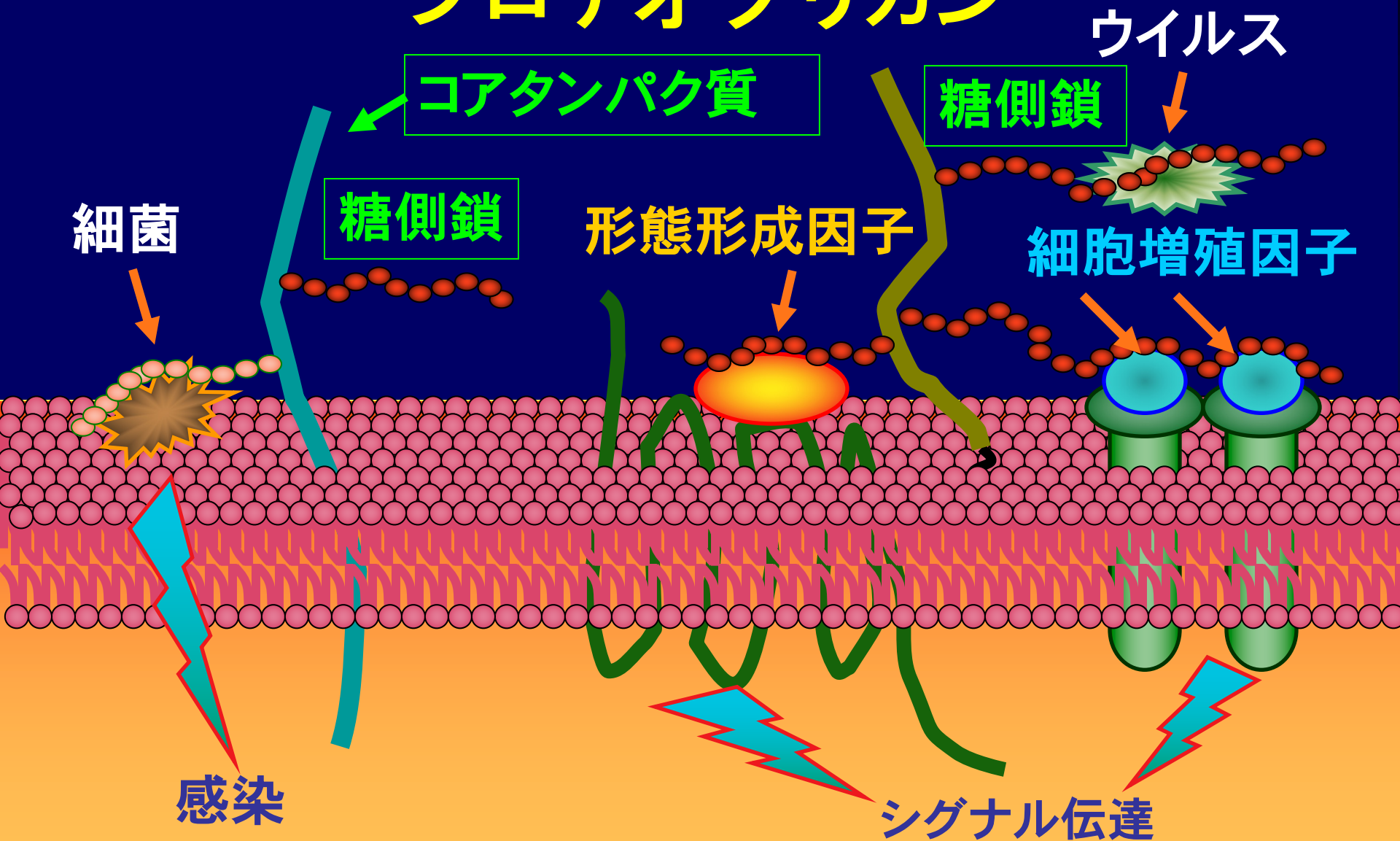
日本脳炎ウイルス

新型コロナウイルス

マラリア原虫

など多数

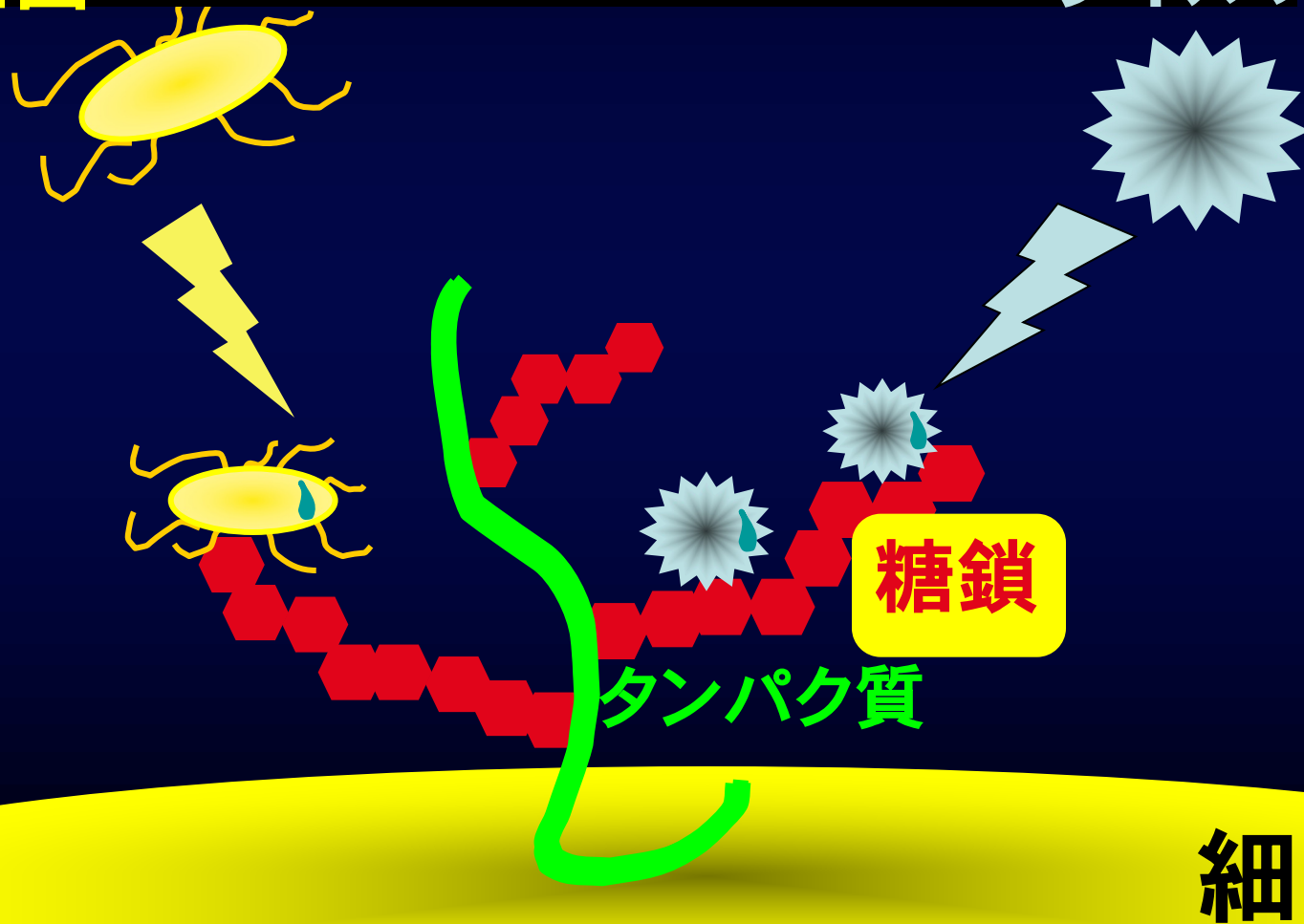
# 動物細胞の細胞表面に存在する プロテオグリカン



# 細菌やウイルス感染と糖鎖

## Glycoconjugates and infection

細菌 by bacteria and viruses ウィルス





# グリコサミノグリカンを介した病原体の感染

単純ヘルペスウイルス (HSV)

エイズウイルス (HIV)

C型肝炎ウイルス

デングウイルス

日本脳炎ウイルス

新型コロナウイルス

マラリア原虫

など多数

# リソソーム病

ライソゾーム病（リソソーム病、リソゾーム病、リソソーム蓄積症、lysosome disease、lysosomal storage disease）は、細胞内にある小器官の一つであるライソゾーム（lysosome）に関連した酵素が欠損しているために、分解されるべき物質が老廃物として体内に蓄積してしまいう先天代謝異常疾患の総称。

# リソソーム病の種類

ポンペ病

GM1ガングリオシドーシス

GM2ガングリオシドーシス

(テイ=サックス病, サンドホッフ病)

ファブリー病

ファーバー病

ゴーシェ病

ニーマン・ピック病

クラッペ病

ムコ多糖症

マルチプルサルファターゼ欠損症

シアリドーシス

ガラクトシアリドーシス

アイセル病 (I-cell disease)

$\alpha$ -マンノーシドーシス

$\beta$ -マンノーシドーシス

フコシドーシス

アスパルチルグルコサミン尿症

シンドラー病 / 神崎病

ウォルマン病

ダノン病

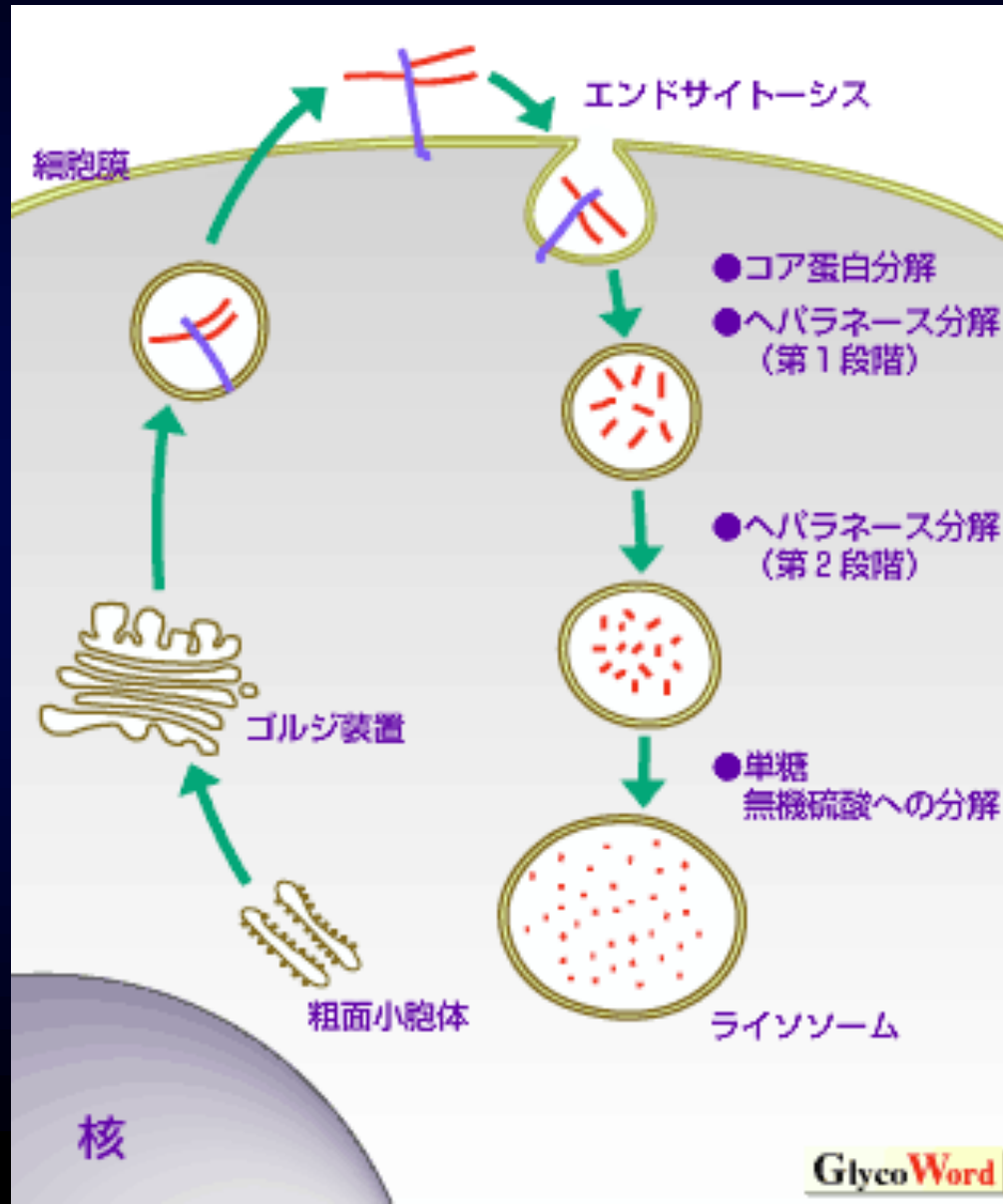
遊離シアル酸蓄積症

セロイドリポフスチノーシス

など

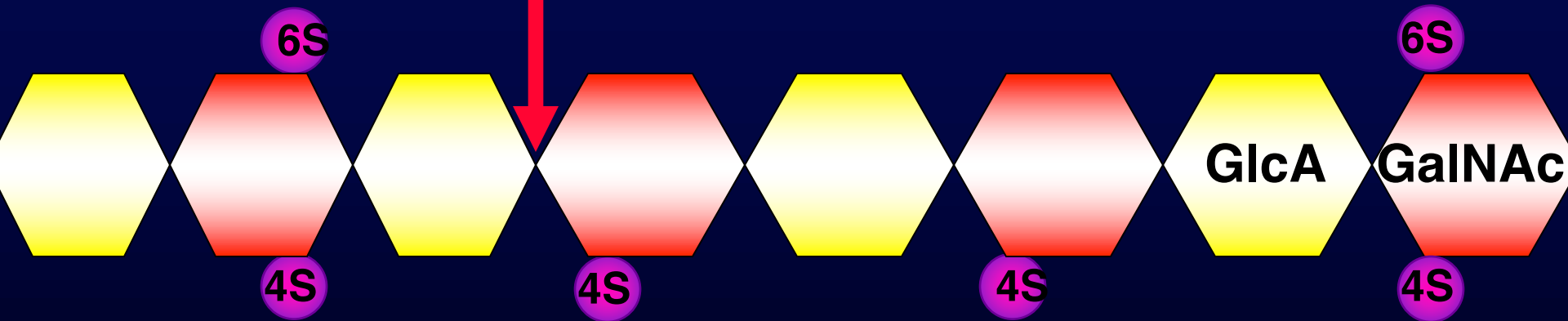
# 糖タンパク質の細胞内での分解

## Cellular catabolism of glycoproteins

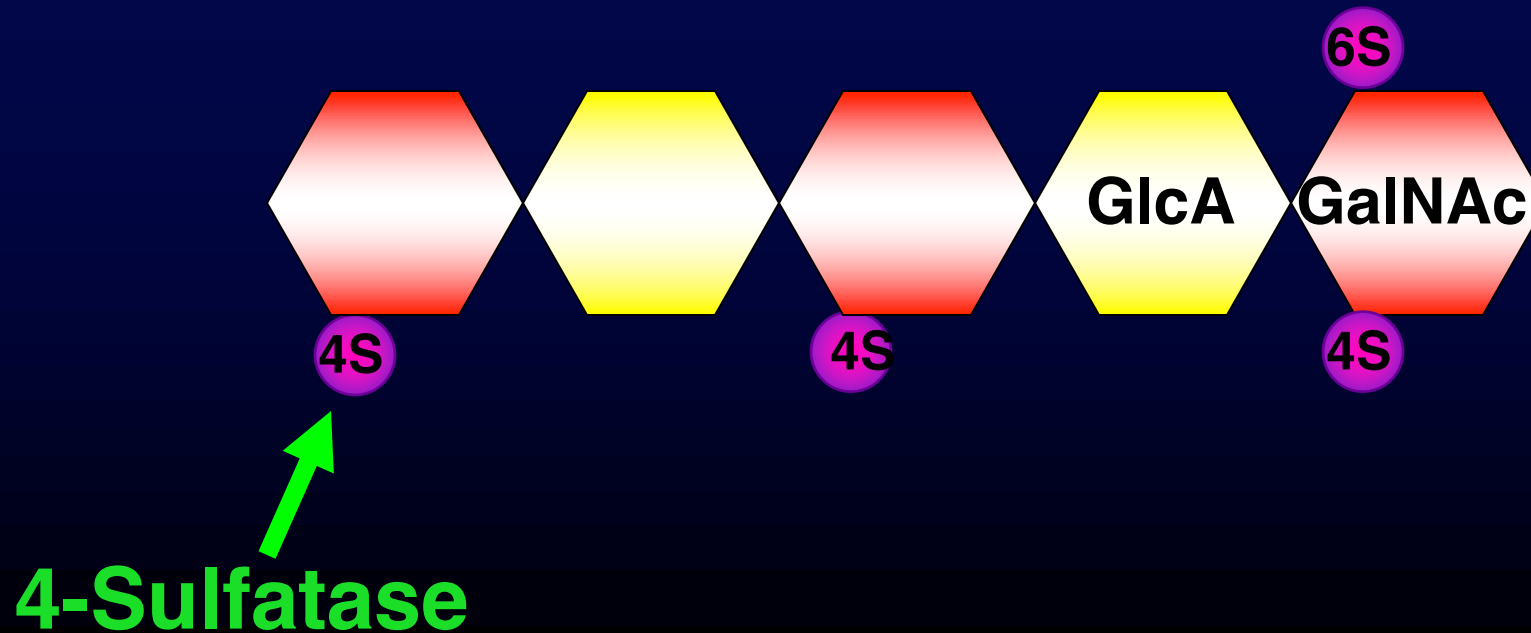


# DEGRADATION OF CS/DS

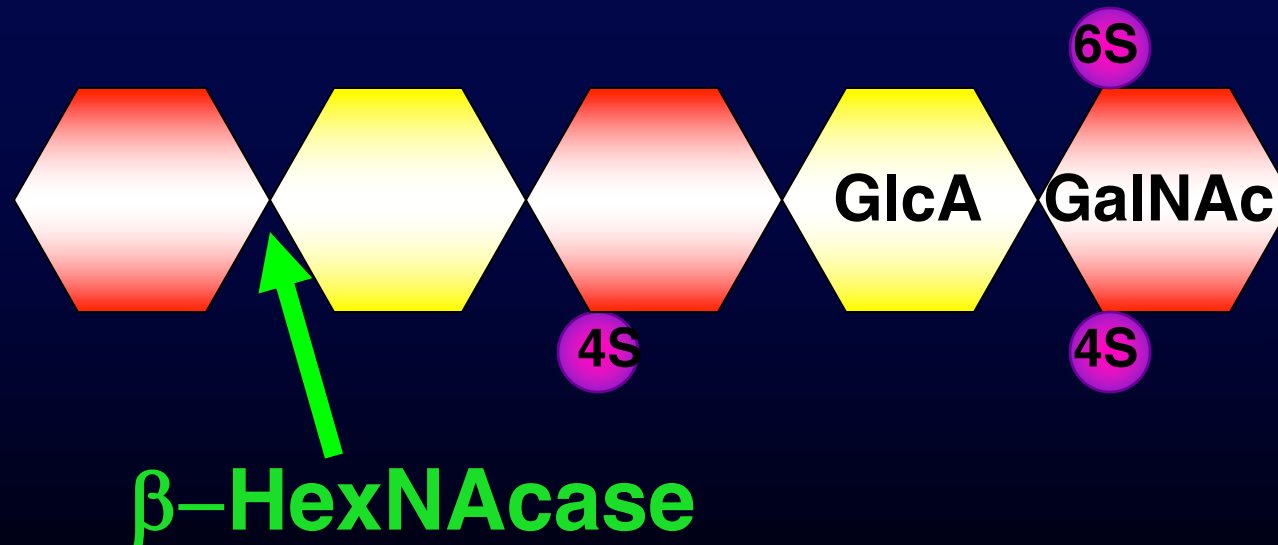
**ENDO-TYPE  
ENZYME**



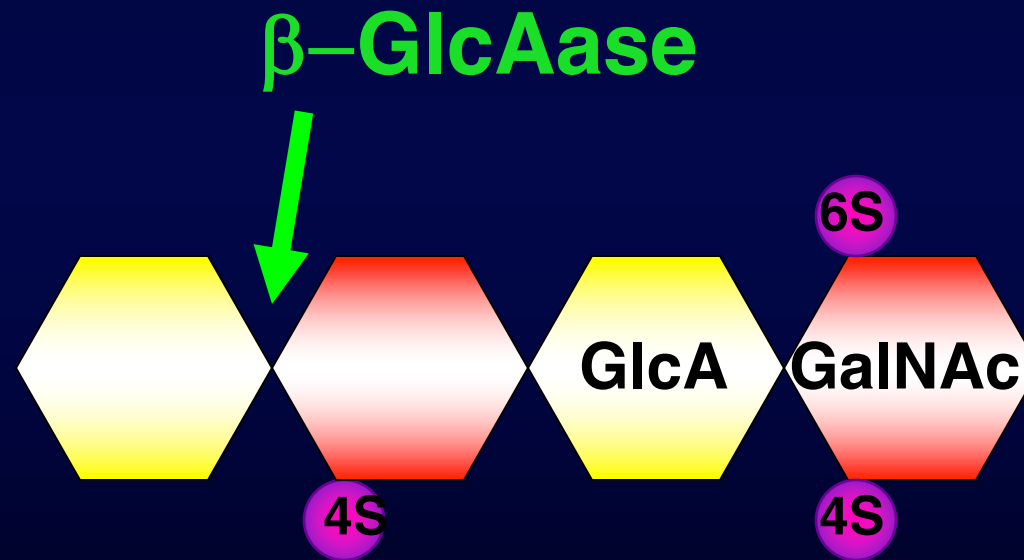
# DEGRADATION OF CS/DS



# DEGRADATION OF CS/DS

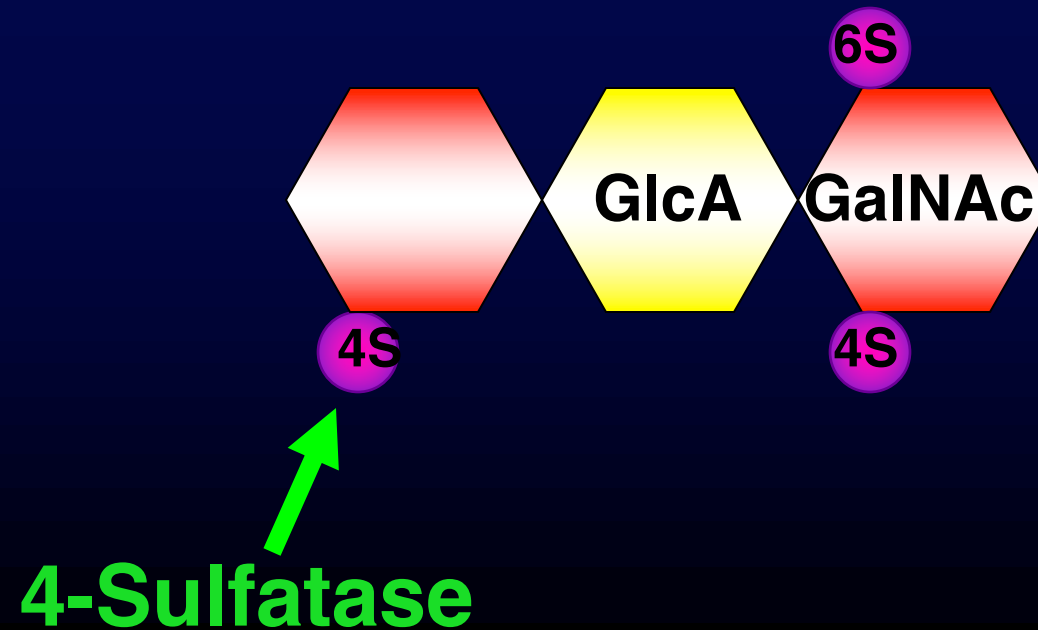


# DEGRADATION OF CS/DS

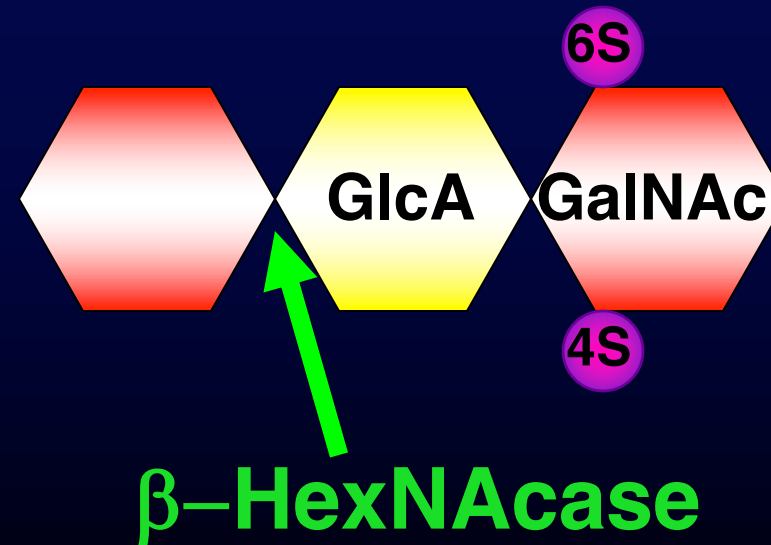




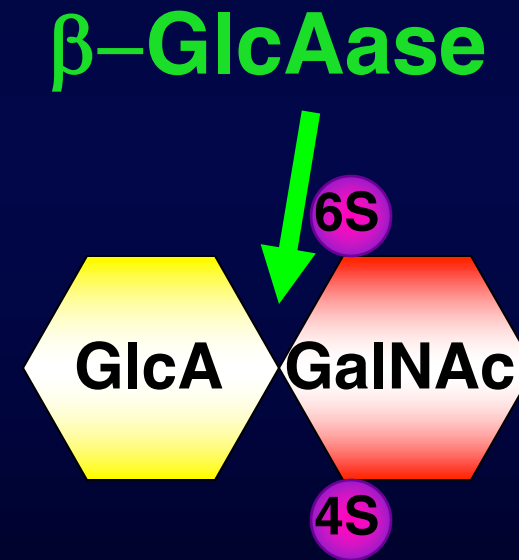
# DEGRADATION OF CS/DS



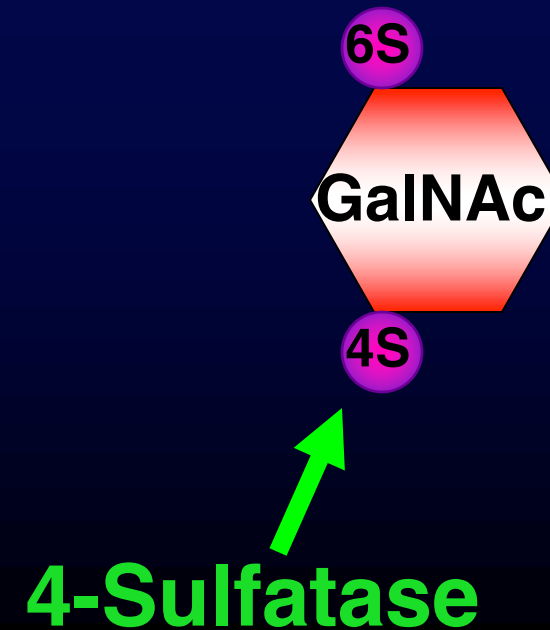
# DEGRADATION OF CS/DS



# DEGRADATION OF CS/DS



# DEGRADATION OF CS/DS



# DEGRADATION OF CS/DS

6-Sulfatase



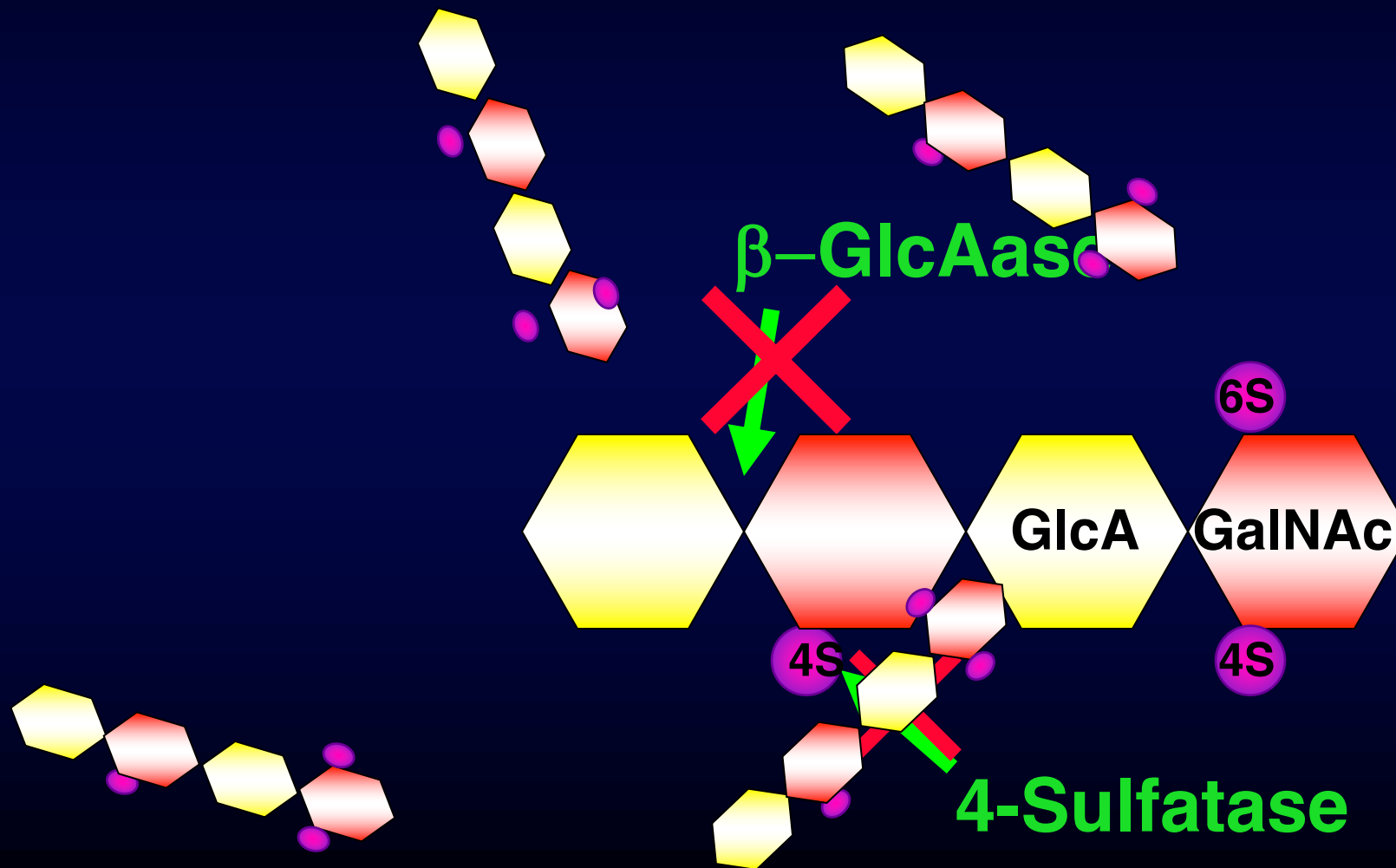
6S

GalNAc

# DEGRADATION OF CS/DS



# DEGRADATION OF CS/DS



# ムコ多糖症(MPS)

Type	Eponym	Enzyme deficiency	Stored substrates
MPS I	Hurler	$\alpha$ -Iduronidase	DS, HS
	Scheie		
MPS II	Hunter	Iduronate 2-sulfatase	DS, HS
MPS III	Sanfilippo	Heparan sulfate degrading enzymes	HS
MPS IV	Morquio	Galactose-6-sulfatase	CS, DS, KS
MPS VI	Maroteaux-Lamy	<i>N</i> -Acetyl- <i>D</i> -galactosamine-4-sulphatase	DS
MPS VII	Sly	$\beta$ - <i>D</i> -Glucuronidase	DS, HS

※ HS :Heparan sulfate



名称		欠損酵素	蓄積物質	病態
MPS I	Hurler	$\alpha$ -L-イズロニダーゼ	HS, DS	知能障害、特異顔貌、肝脾腫、骨変化、関節拘縮、角膜混濁、難聴、低身長
	Scheie			硬い関節、角膜混濁、大動脈閉鎖
MPS II (伴性劣性遺伝)	Hunter	イズロン酸 - 2 - スルファターゼ	HS, DS	(重症) 知能障害、特異顔貌、肝脾腫、骨変化 (軽症) 関節拘縮
MPS III	Sanfilippo (A型) (B型) (C型) (D型)	ヘパラン硫酸 - N - スルファターゼ $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ アセチルCoA:a-グルコサミニドN-アセチルとランスフェラーゼ $\alpha$ -N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼ	HS	骨格異常などの身体症状は比較的軽い 知能障害
MPS IV	Morquio (A型)	ガラクトース - 6 - スルファターゼ	KS, C6S KS	骨格異常(胸部前方突出、脊椎後側弯)、角膜混濁、大動脈弁口逆流
	(B型)	$\beta$ -ガラクトシダーゼ		
MPS VI	Maroteaux - Lamy	N-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ	DS	骨格異常、角膜混濁、肝脾腫、心臓障害
MPS VII	Sly	$\beta$ -D-グルクロニダーゼ	HS, DS	骨格異常、角膜混濁、知能障害

名称		欠損酵素	蓄積物質	病態
MPS I	Hurler	$\alpha$ -L- イズロニダーゼ	HS, DS	知能障害、特異顔貌、肝脾腫、骨変化、関節拘縮、角膜混濁、難聴、低身長
	Scheie			硬い関節、角膜混濁、大動脈閉鎖
MPS II (伴性劣性遺伝)	Hunter	イズロン酸 - 2 - スルファターゼ	HS, DS	(重症) 知能障害、特異顔貌、肝脾腫、骨変化 (軽症) 関節拘縮
MPS III	Sanfilippo (A型) (B型) (C型) (D型)	ヘパラン硫酸 - N - スルファターゼ $\alpha$ - N - アセチルグルコサミニダーゼ アセチルCoA:a - グルコサミニド N - アセチルとランスフェラ ーゼ $\alpha$ - N - アセチルグルコサミン-6-スルファターゼ	HS	骨格異常などの身体症状は比較的軽い 知能障害
MPS IV	Morquio (A型)	ガラクトース - 6 - スルファターゼ	KS, C6S KS	骨格異常(胸部前方突出、脊椎後側弯)、角膜混濁、大動脈弁口逆流
	(B型)	$\beta$ - ガラクトシダーゼ		
MPS VI	Maroteaux - Lamy	N - アセチルガラクトサミン-4 - スルファターゼ	DS	骨格異常、角膜混濁、肝脾腫、心臓障害
MPS VII	Sly	$\beta$ - D - グルクロニダーゼ	HS, DS	骨格異常、角膜混濁、知能障害

# MPS IX

欠損酵素: ヒアルロニダーゼ1

蓄積物質: 血漿中のHA

症状: マイルドな症状(関節周囲の軟組織塊、若干の低身長)

# リソソーム病の治療法

## Treatment of lysosome disease

1. 対症療法
2. 酵素補充療法
3. 骨髄移植・造血幹細胞移植
4. 遺伝子治療

# 酵素補充法

(Enzyme Replacement Therapy,  
ERT)

欠損している酵素を薬剤として体外から投与することにより、細胞内に欠損酵素を補充し、リソソーム内に蓄積している物質の分解を促進する方法です。

# ERTの問題点

## Problems on ERT

1. DDS上の問題(脳、骨、心臓)
2. 細胞内に取り込まれる効率
3. 血中半減期
4. 病状が進行した患者に対する効果
5. 免疫応答
6. 費用

# リソソーム病の治療法

## Treatment of lysosome disease

1. 対症療法
2. 酵素補充療法
3. 骨髄移植・造血幹細胞移植
4. 遺伝子治療

# 先天性糖鎖合成異常 congenital disorder of glycosylation (CDG)

タンパク質に糖鎖を結合させる糖転移酵素の欠損による。

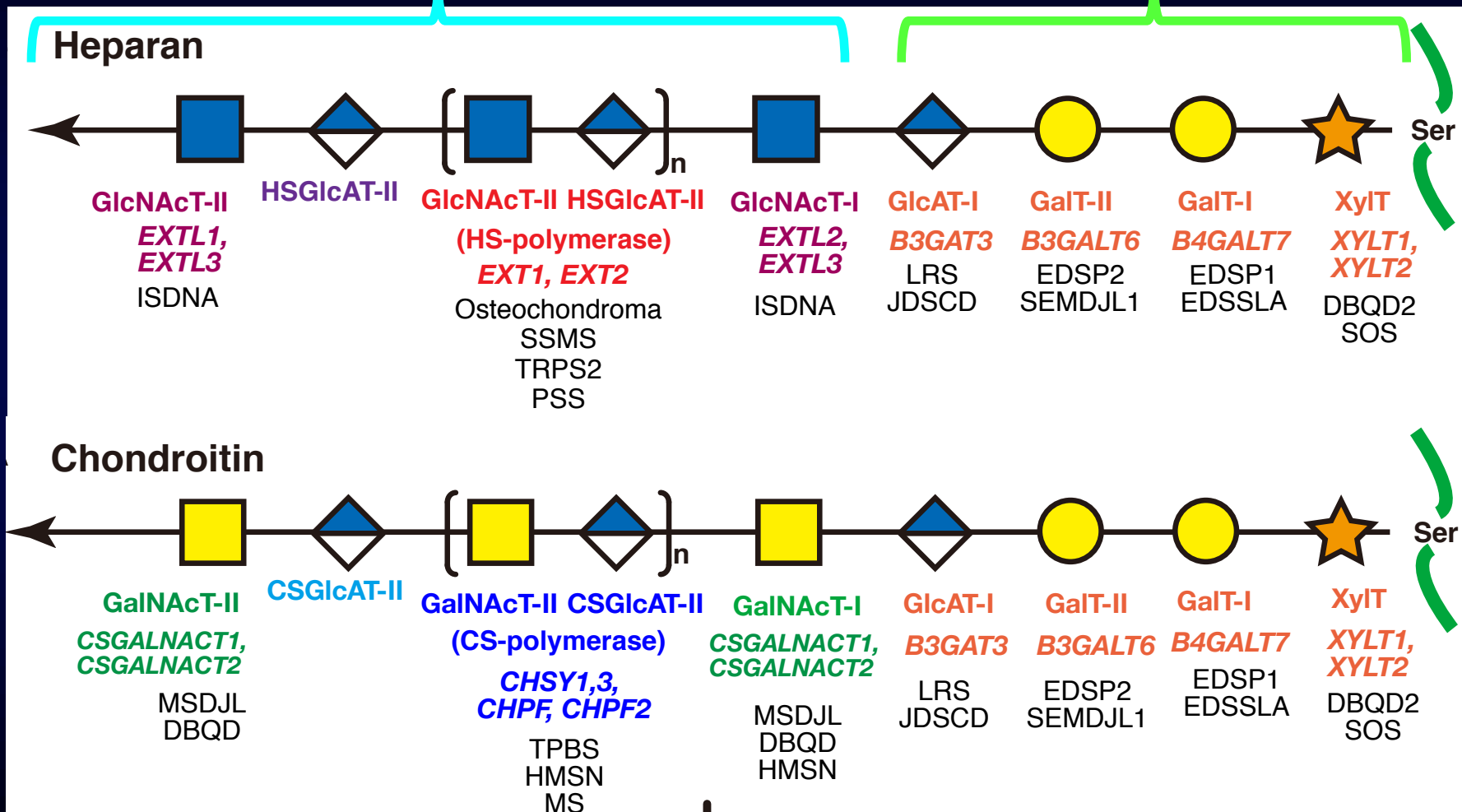
共通の症状としては、乳児期筋緊張低下、体重増加不良、重度精神運動発達遅滞、特徴的顔貌、てんかん、内斜視などの眼科異常、臀部脂肪沈着・乳頭陥没などの皮膚症状、心嚢液貯留・心筋症、肝機能障害、血液凝固因子異常など。



# Biosynthesis of HS and CS backbones

## Repeating disaccharide region

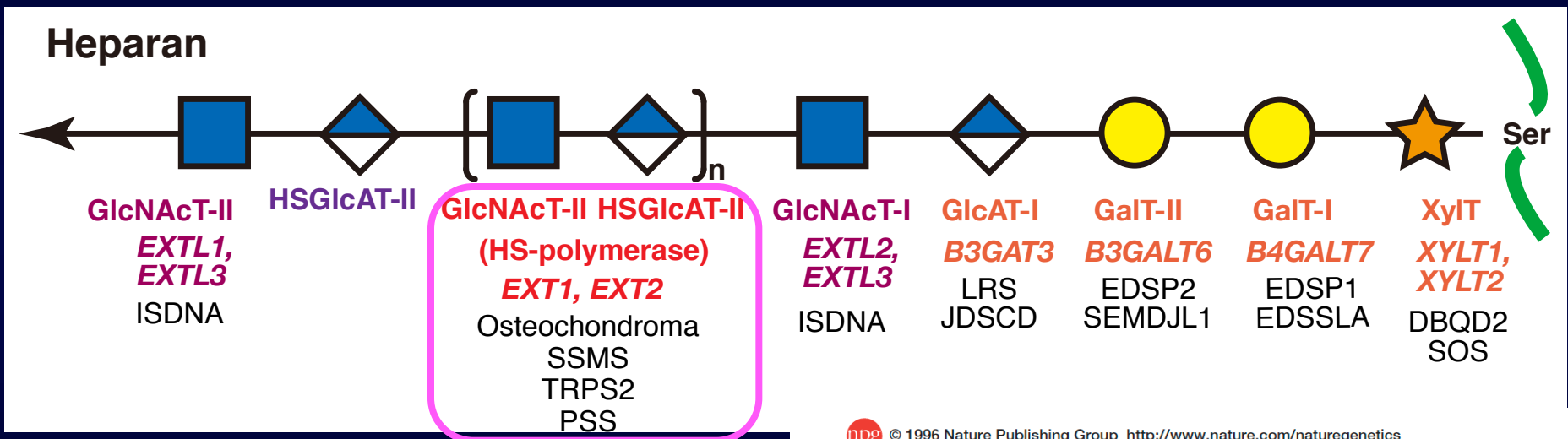
## Linker tetra-saccharide region



# Human genetic disorders caused by mutations in *EXT1* or *EXT2*

Repeating disaccharide region of HS

Linker tetra-saccharide region



npg © 1995 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturegenetics>

article

## Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (*EXT1*)

Jung Ahn<sup>\*1</sup>, Hermann-Josef Lüdecke<sup>\*2</sup>, Steffi Lindow<sup>2</sup>, William A. Horton<sup>3</sup>, Brendan Lee<sup>3</sup>, Michael J. Wagner<sup>1</sup>, Bernhard Horsthemke<sup>2</sup> & Dan E. Wells<sup>1</sup>

npg © 1996 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturegenetics>

article

## The *EXT2* multiple exostoses gene defines a family of putative tumour suppressor genes

Dominique Stickens<sup>1\*</sup>, Gregory Clines<sup>1\*</sup>, David Burbee<sup>1,3</sup>, Purita Ramos<sup>1</sup>, Sylvia Thomas<sup>1</sup>, Deborah Hogue<sup>4</sup>, Jacqueline T. Hecht<sup>4</sup>, Michael Lovett<sup>1,3</sup> & Glen A. Evans<sup>1,2,3</sup>

## **Hereditary multiple exostosis is caused by mutations in HS biosynthetic enzymes EXT1/EXT2**

**Hereditary multiple exostosis is an autosomal dominant skeletal disorder characterized by the presence of cartilage capped bony outgrowths mainly located at the juxtaepiphyseal region of the long bones.**

**It is caused by mutations in EXT1 and EXT2.**

**The heterooligomeric complex of EXT1 and EXT2 represents the biologically relevant form of the HS polymer modification**

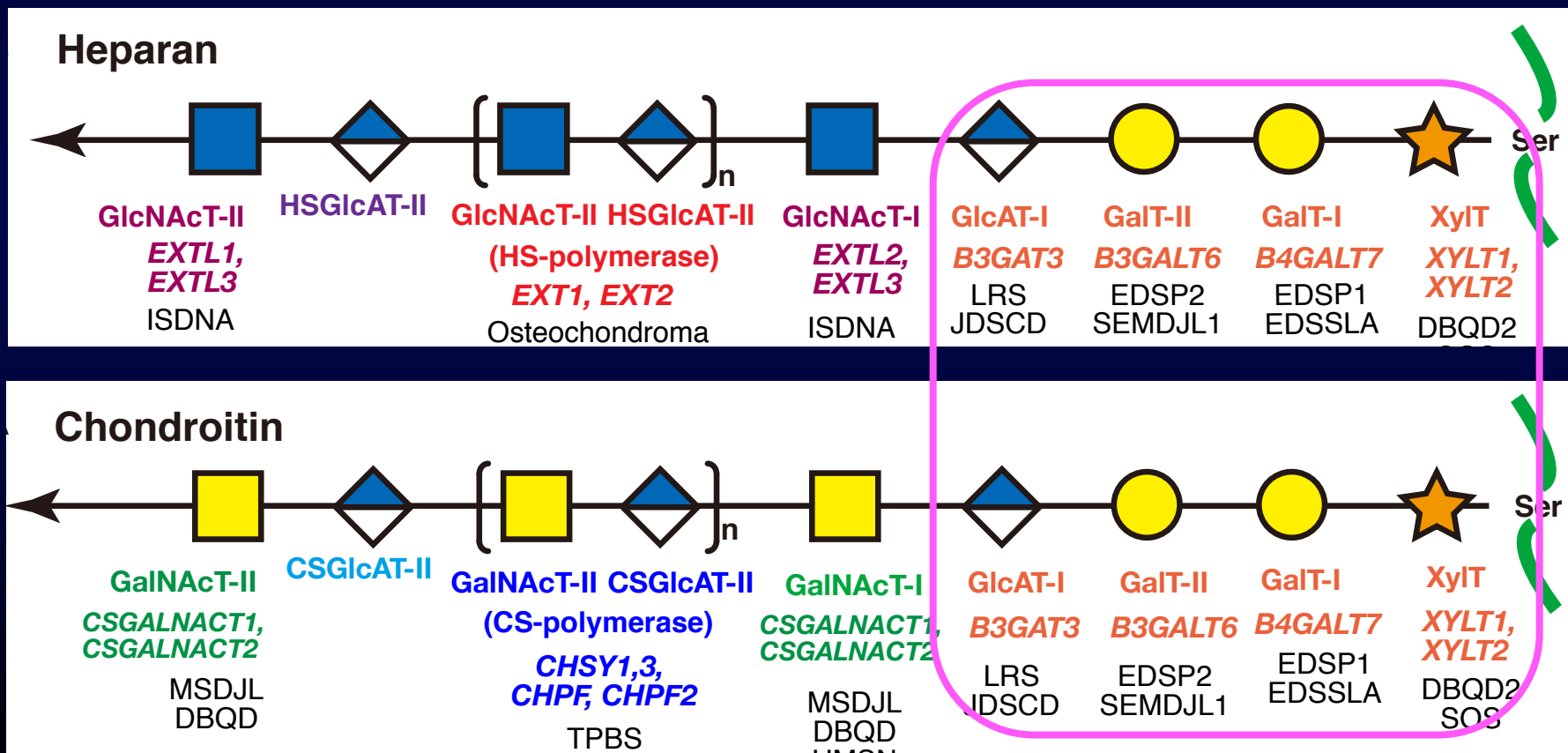
**Hereditary multiple osteochondroma is caused by mutations in HS biosynthetic enzymes EXT1/EXT2**

遺伝性多発性骨軟骨腫  
以前は  
遺伝性多発性外骨腫

# Proteoglycan Linkeropathy caused by the mutations in the biosynthetic enzymes of the linker region

Repeating disaccharide region

Linker tetra-saccharide region



## Proteoglycan Linkeropathy

•Proteoglycan Linkeropathy is a collective term for diverse connective tissue disorders caused by mutations in the glycosyltransferases responsible for the biosynthesis of the linker region tetrasaccharide, which is characterized by bone, skin, connective tissue, and heart defects.

---

### Genetic disorders

### Affected genes

Desbuquois dysplasia type 2

*XYLT1*

Spondyloocular syndrome

*XYLT2*

Spondylodysplastic

*B4GALT7,*

Ehlers-Danlos syndrome

*B3GALT6*

Larsen-like syndrome

*GlcAT-I*

---

# Human genetic disorders caused by mutations in enzymes responsible for biosynthesis of CS, DS, and HS

<b>Genetic disorders</b>	<b>Affected genes</b>	<b>Refs.</b>
Spondyloepiphyseal dysplasia, Omani type	<b><i>C6ST-1</i></b>	Am. J. Med. Genet. 2008
Severe osteopenia and fractures	<b><i>GlcAT-I</i></b>	BMC Med. Genet. 2016; J. Med. Genet. 2020
A mild skeletal dysplasia and joint laxity	<b><i>GalNAcT1</i></b>	Hum. Mutat. 2017; 2020
Musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome	<b><i>D4ST-1</i></b> <b><i>DSE</i></b>	Hum. Mutat. 2010; Clin. Biochem. 2017; BBA 2019 Mol. Genet. Genomic Med. 2020; Hum. Mutat. 2022
A novel type of spondylo-epi-metaphyseal dysplasia	<b><i>EXTL3</i></b>	J. Hum. Genet. 2017
Pseudodiastrophic dysplasia	<b><i>CANT1</i></b>	J. Med. Genet. 2020
Desbuquois dysplasia type 2 Pseudotorsion dysplasia	<b><i>XYLT1</i></b> <b><i>XYLT2</i></b>	In preparation

**① Ehlers-Danlos syndrome caused by mutations in D4ST-1**

**② A novel type of spondylo-epi-metaphyseal dysplasia caused by mutations in EXTL3**



**① Ehlers-Danlos syndrome caused by mutations in D4ST-1**

**② A novel type of spondylo-epi-metaphyseal dysplasia caused by mutations in EXTL3**

# エーラス・ダンロス症候群とは

- ・皮膚、関節、血管などの結合組織の脆弱性に基づく遺伝性疾患。  
(5,000人に1人)
- ・主な症状には、皮膚や関節が伸びやすく、切れやすい、皮膚や血管がもろい、出血しやすいなどが挙げられる。
- ・症状の特徴や原因遺伝子によって主に6つに分類されていた。

分類	原因遺伝子
古典型	<i>COL5A1, COL5A2</i>
関節可動性亢進型	<i>TenascinXB</i> , (大多数は不明)
血管型	<i>COL3A1</i>
後側彎型 (VIa型)	<i>Lysyl hydroxylase</i>
(VIb型)*	<i>D4ST-1**</i>
多発関節弛緩型	<i>COL1A1, COL1A2</i>
皮膚脆弱型	<i>ADAMTS2</i>

\*, Kosho et al., 2010

\*\* , Miyake et al., 2010

# 新型のエーラス・ダンロス症候群の臨床症状



その他の臨床症状：  
皮膚の過伸展  
早老症（しわ）  
心臓弁の形成異常  
皮下血腫

# Identification of the mutations in Ehlers-Danlos syndrome

P281L  
Y293C

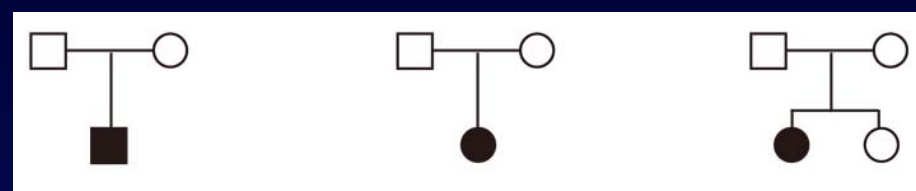
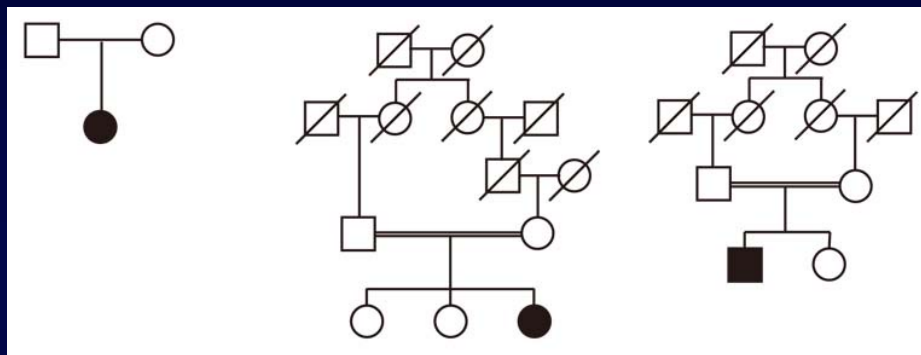
P281L  
(homo)

P281L  
(homo)

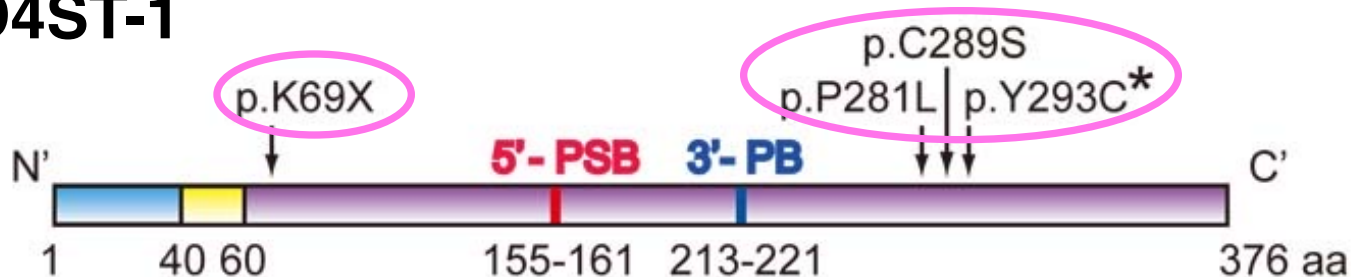
K69X  
P281L

P281L  
C289S

P281L  
Y293C



## D4ST-1



5'-PSB, 5'-phosphosulfate binding motif  
3'-PB, 3'-phospho binding motif

# Ehlers-Danlos syndrome

- **A heritable connective tissue disorder characterized by joint and skin laxity as well as tissue fragility.**  
(aged appearance, hypermobile joints, short stature, craniofacial dysmorphism etc.)

Types	Affected genes
Classic type (古典型)	<i>COL5A1, COL5A2</i>
Vascular type (血管型)	<i>COL3A1</i>
Arthrochalasia type (多発関節弛緩型)	<i>COL1A1, COL1A2</i>
Dermatosparaxis type (皮膚脆弱型)	<i>ADAMTS2</i>
Hypermobility type (関節過稼働型)	<i>TenascinXB</i>
Kyphoscoliosis type (後側彎型)	<i>Lysyl hydroxylase</i>

# Ehlers-Danlos syndrome

- The International EDS Consortium proposes a revised EDS classification, which recognizes 13 subtypes. (Malfait *et al.* American Journal of Medical Genetics, 2017)

---

## New Types

## Affected genes

---

Classical-like type (類古典型)

*TenascinXB*

Cardiac-valvular type (心臓弁型)

*COL1A2*

Brittle Corbea Syndrome  
(脆弱角膜症候群)

*ZNF469, PRDM5*

Spondylodysplastic type  
(脊椎異形成型)

*B4GALT7, B3GALT6,  
SLC39A13*

Musculocontractural type (筋拘縮型)

*DSE, D4ST-1*

Myopathic type (ミオパチ一型)

*COL12A1*

Periodontal type (歯周型)

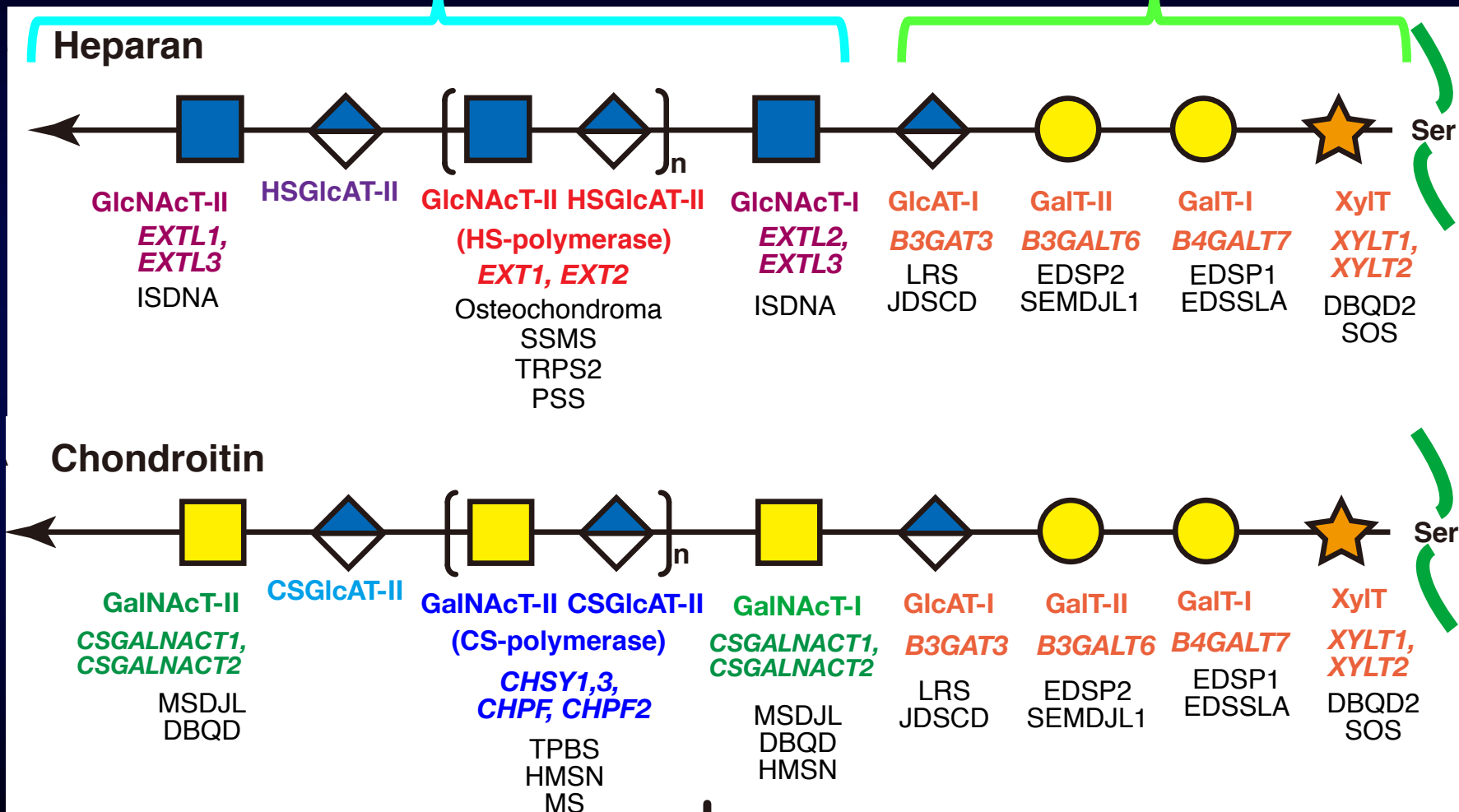
*C1R*

---

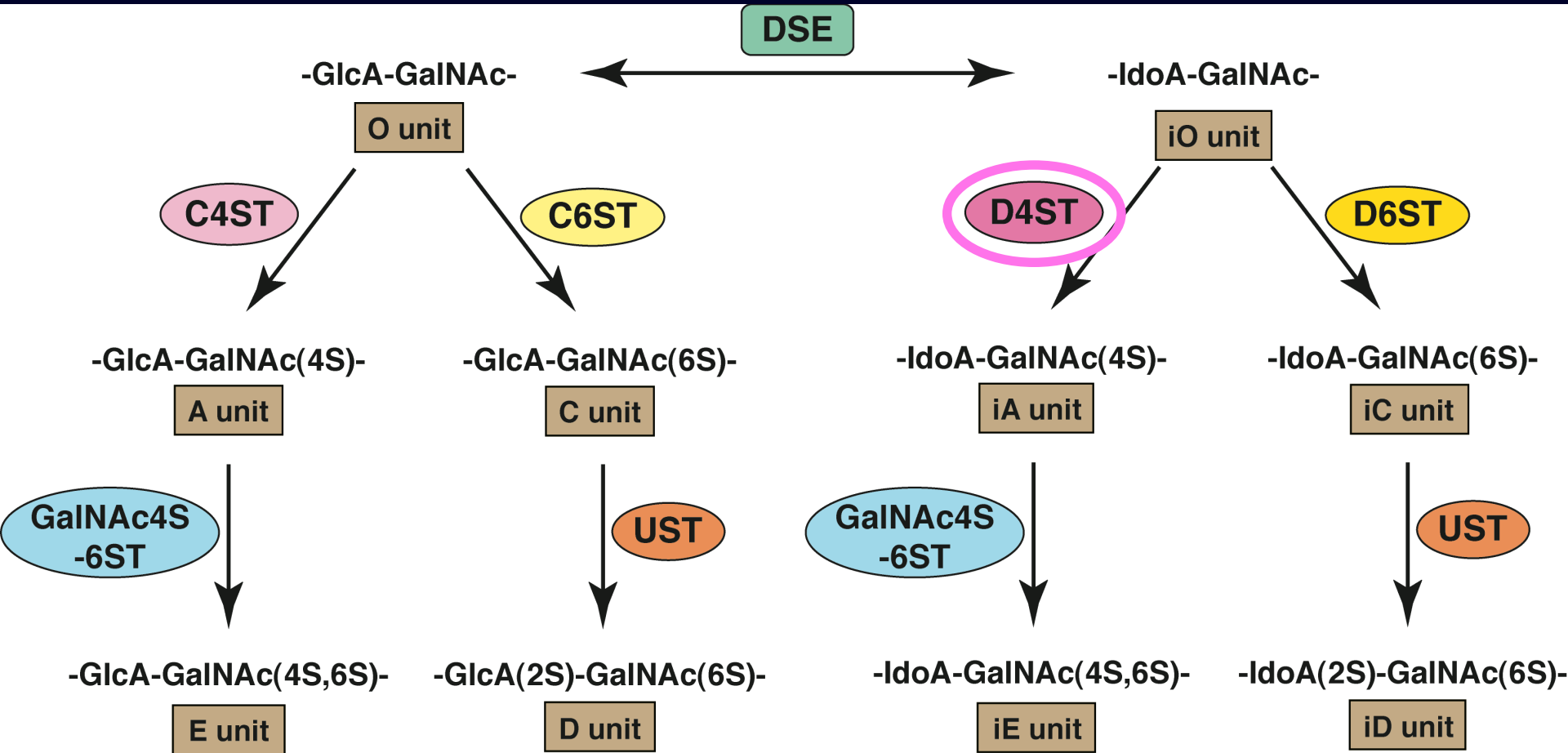
# Biosynthesis of HS and CS backbones

## Repeating disaccharide region

## Linker tetra-saccharide region

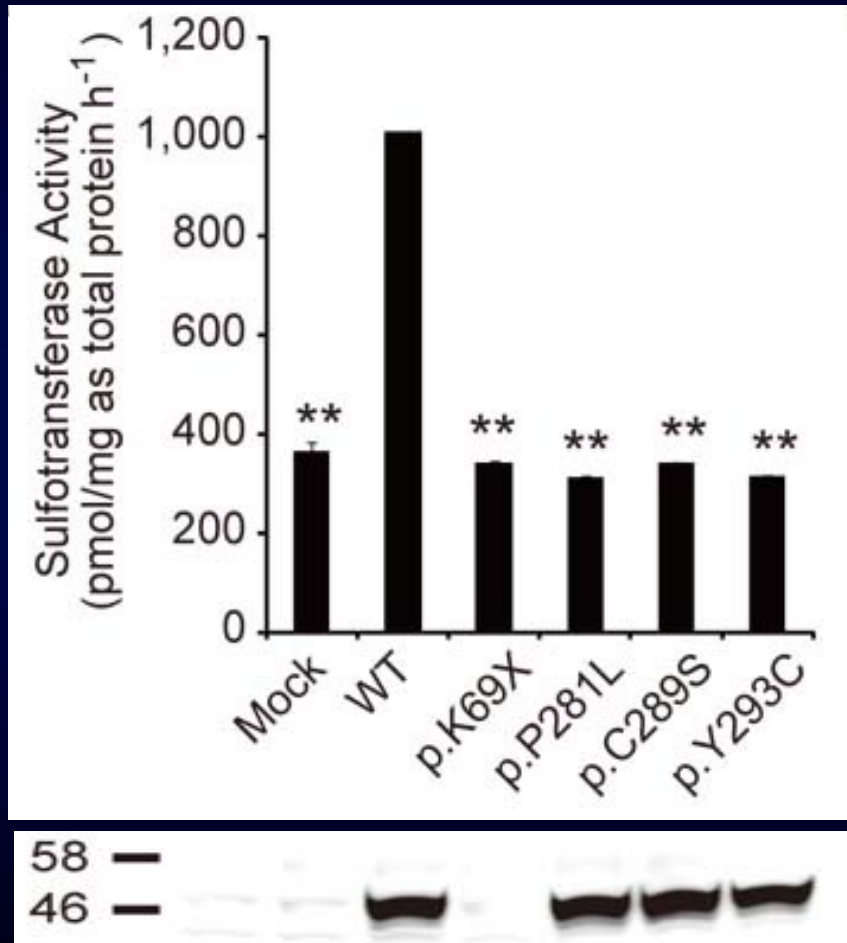


# コンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸の 異性化および硫酸化修飾の経路

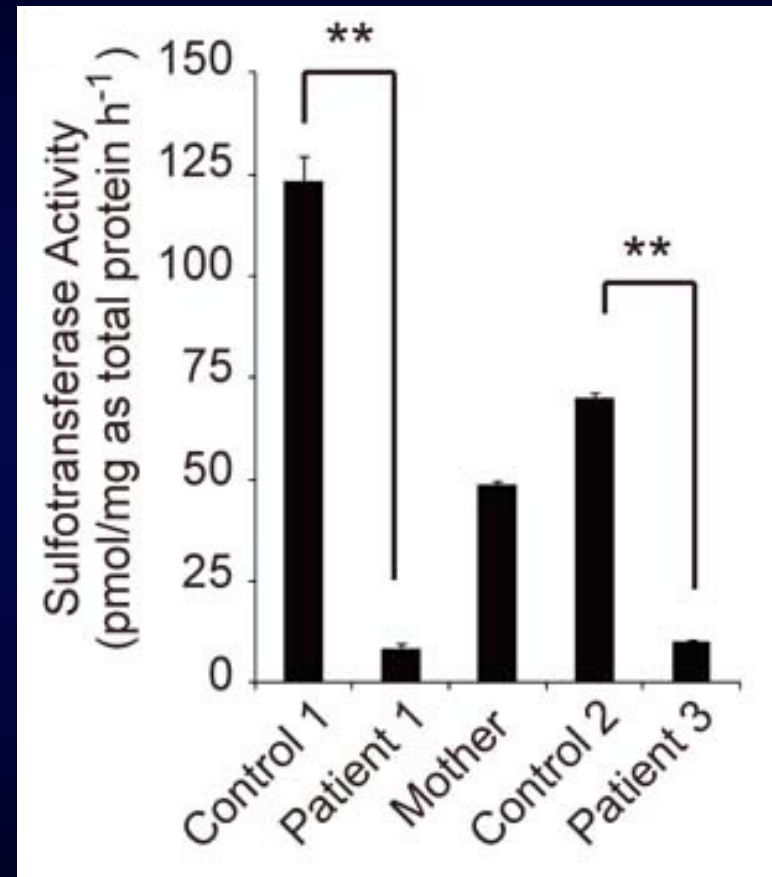




# 組換え型D4ST-1 および患者繊維芽細胞の 硫酸基転移活性



\*\*  $P < 0.001$



Patient 1, P281L/Y293C

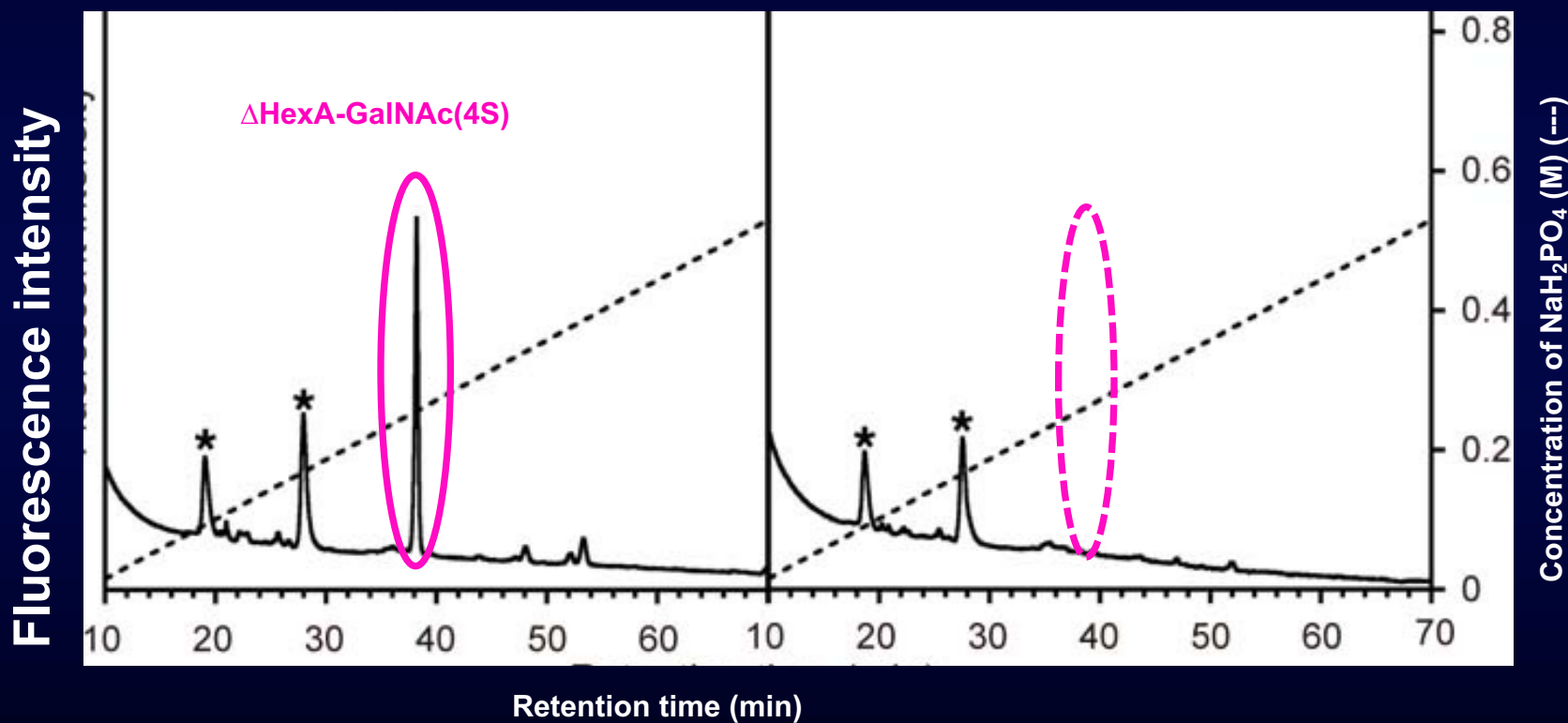
Patient 3, P281L (homo)

\*\*  $P < 0.001$

# D4ST-1変異患者由来繊維芽細胞の デルマタン硫酸鎖の解析

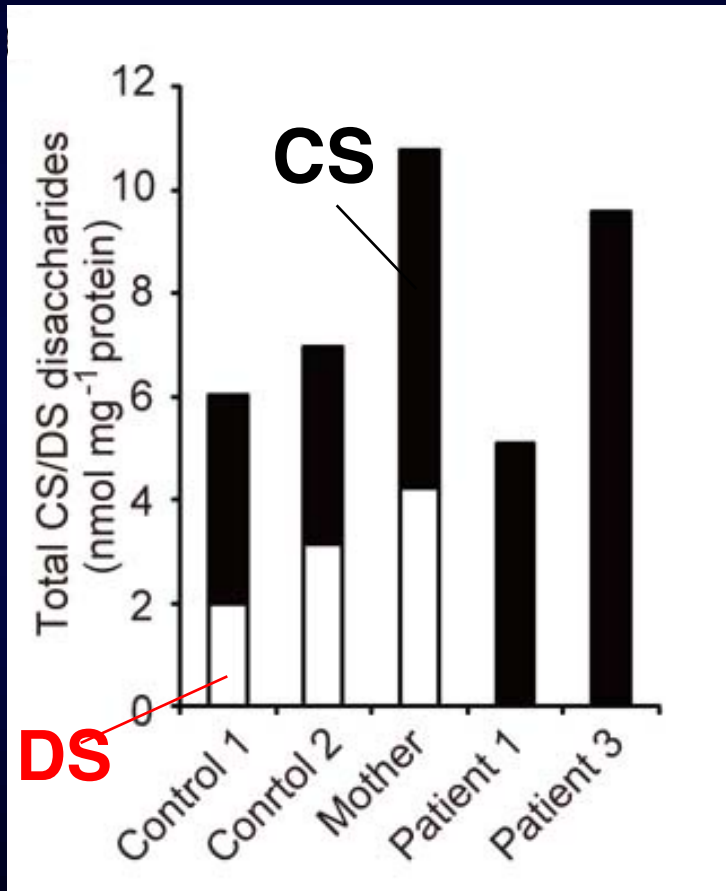
Control 2

Patient 3 (P281L)



\* impurity

# D4ST-1変異患者由来繊維芽細胞の コンドロイチン硫酸およびデルマトン硫酸の総量



コンドロイチン  
硫酸



コンドロイチン



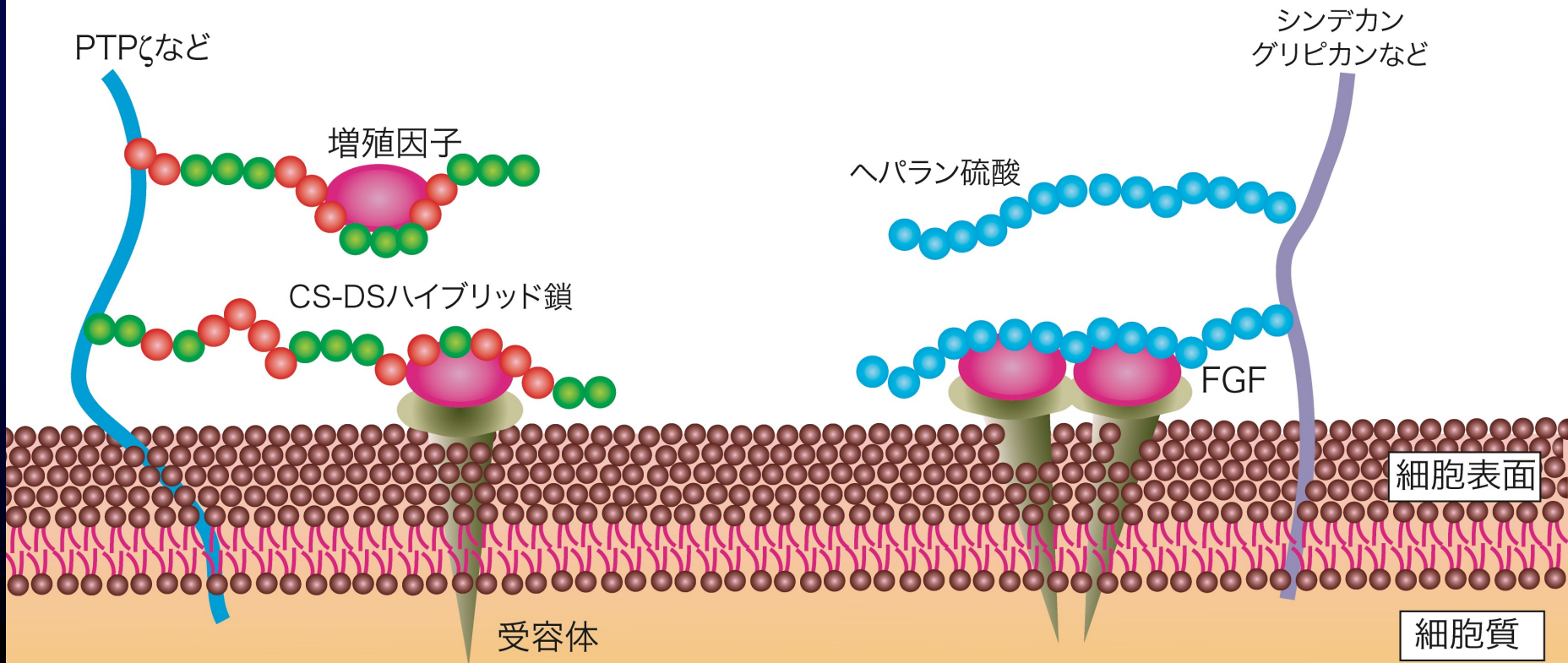
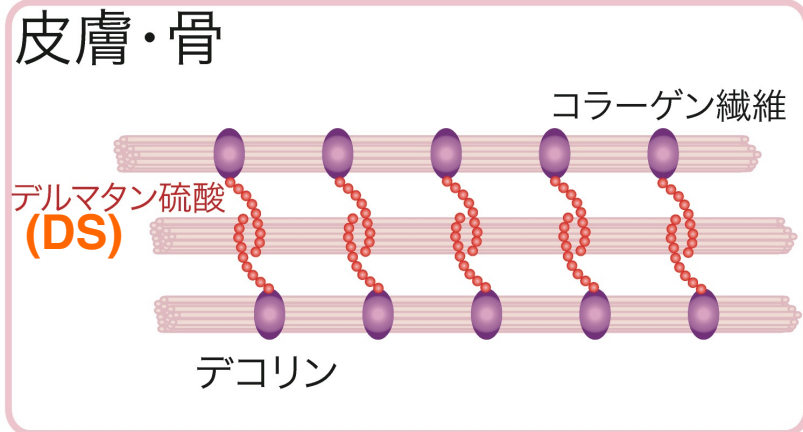
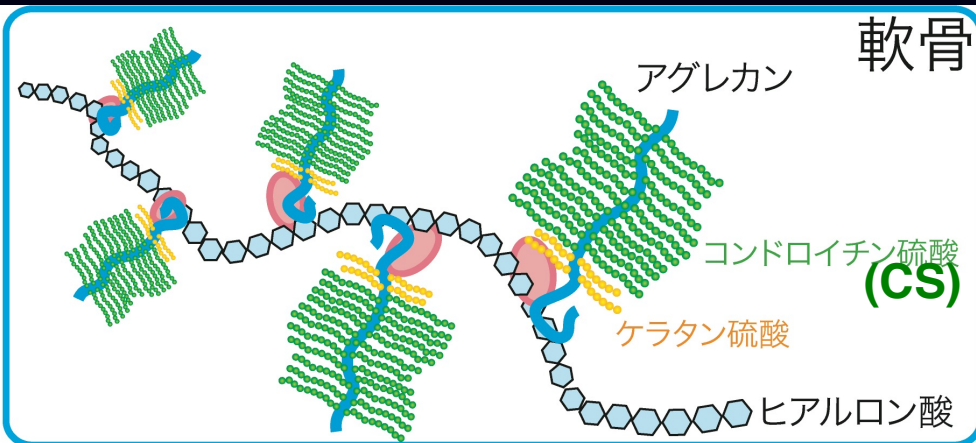
デルマトン



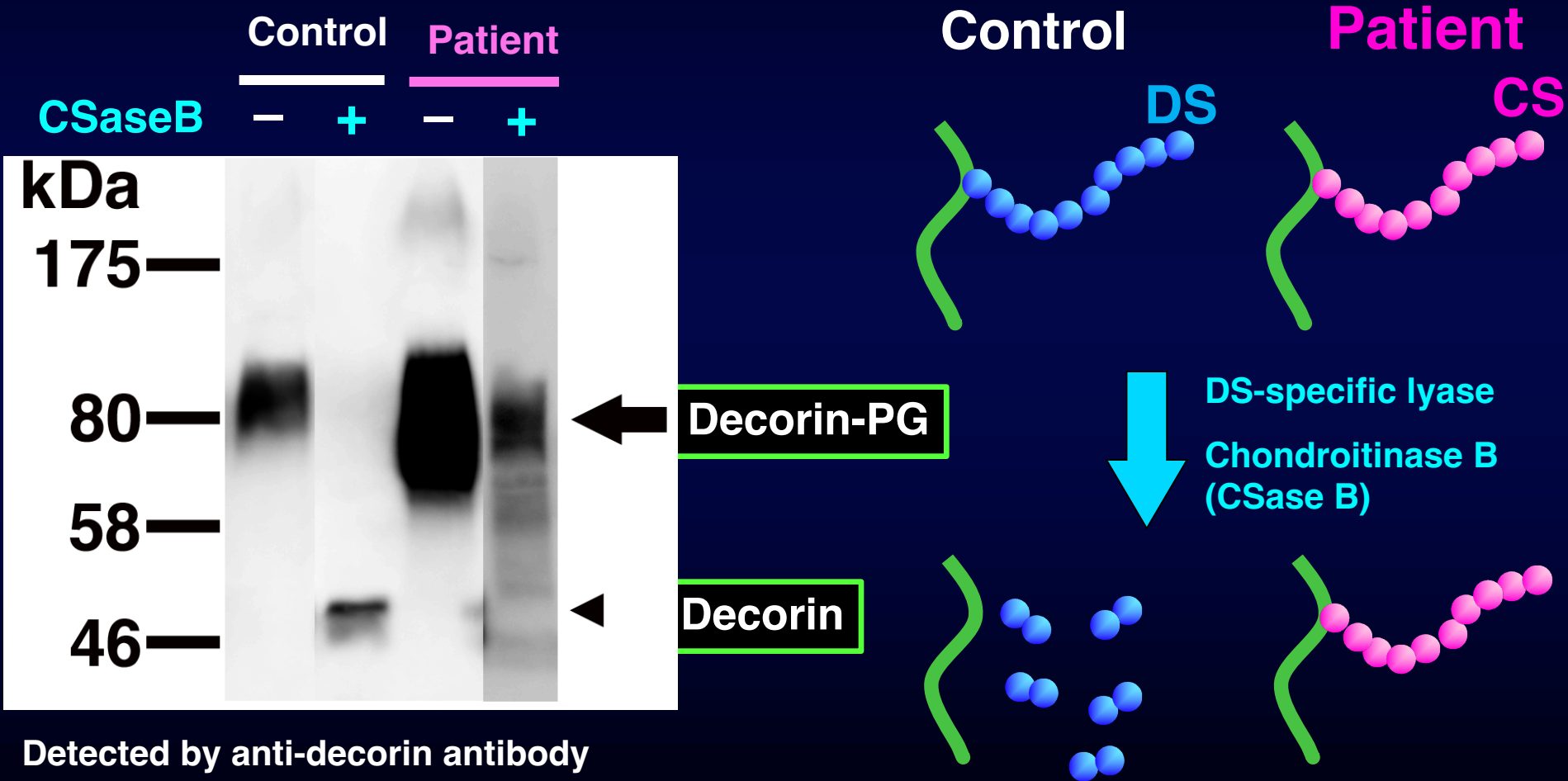
デルマトン硫酸



# 細胞表面や細胞外マトリックスに存在するCS/DS



# Western blotting of decorin proteoglycan (PG) secreted by fibroblasts from a patient

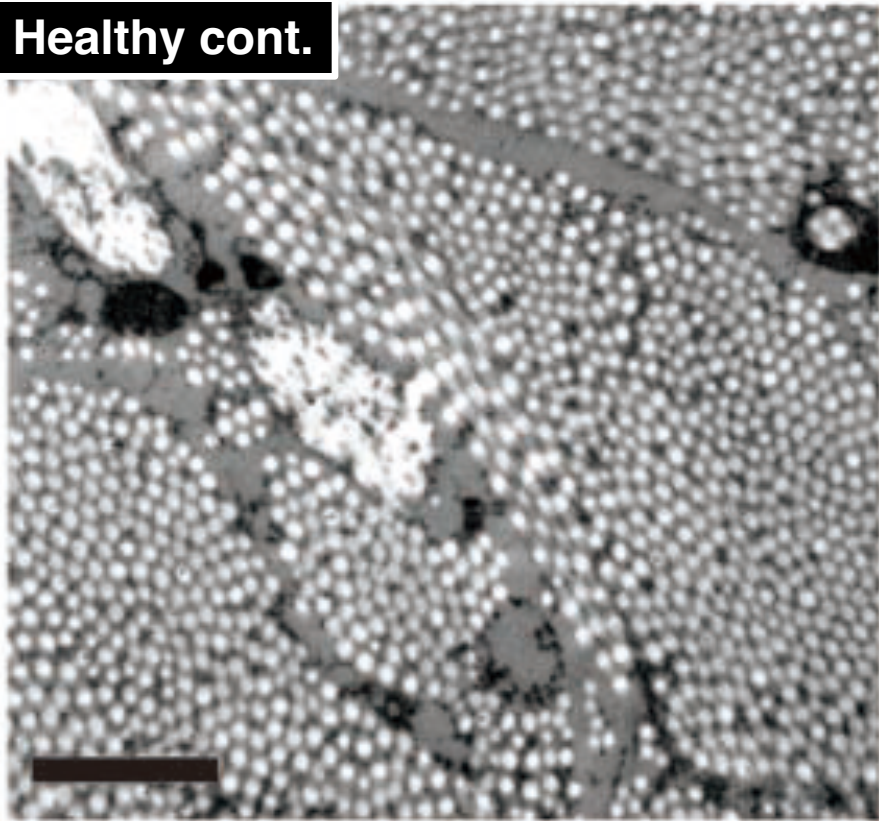




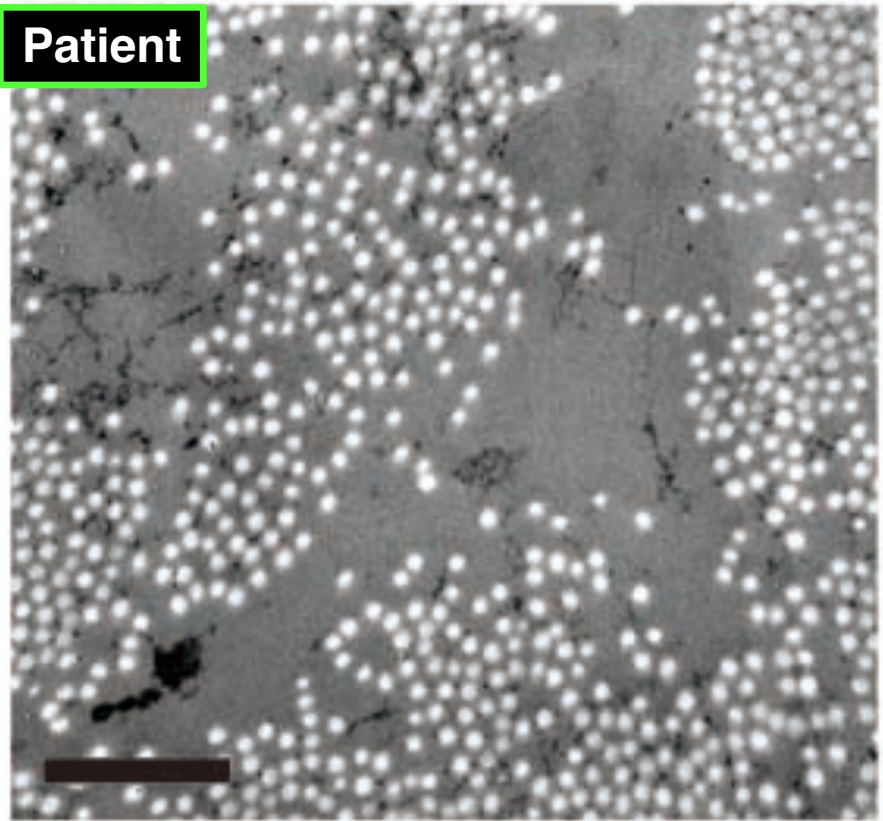
# The collagen fibers in the patient

## Electron microscopy

Healthy cont.



Patient

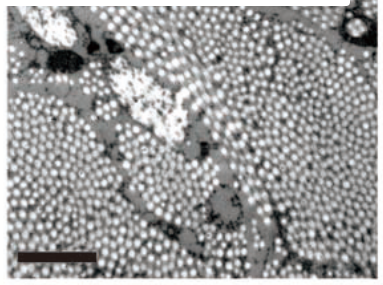


# The collagen fibers in the patient

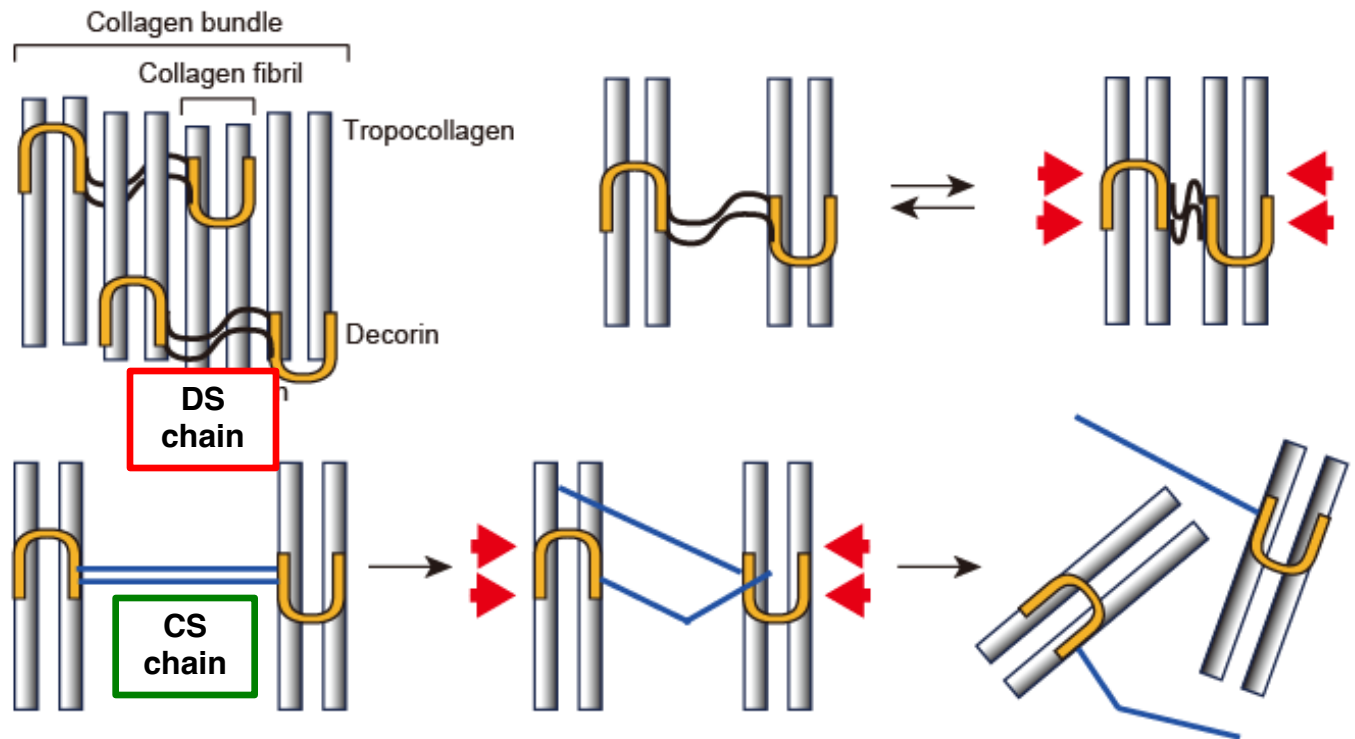
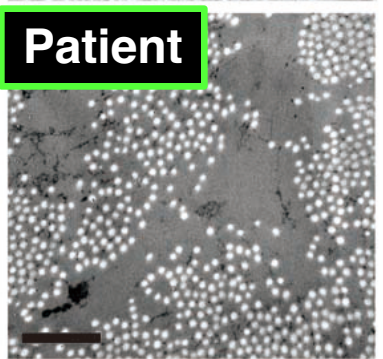
Electron  
microscopy

The structural alterations of collagen fibers  
by mechanical compression in normal and affected states

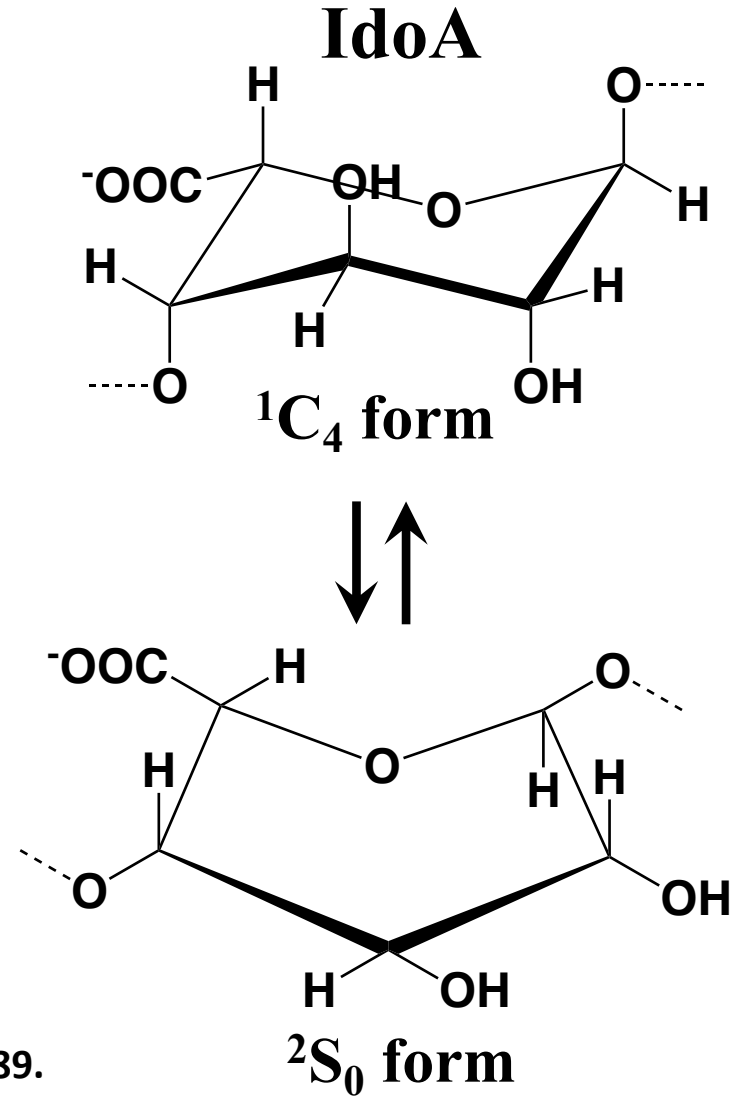
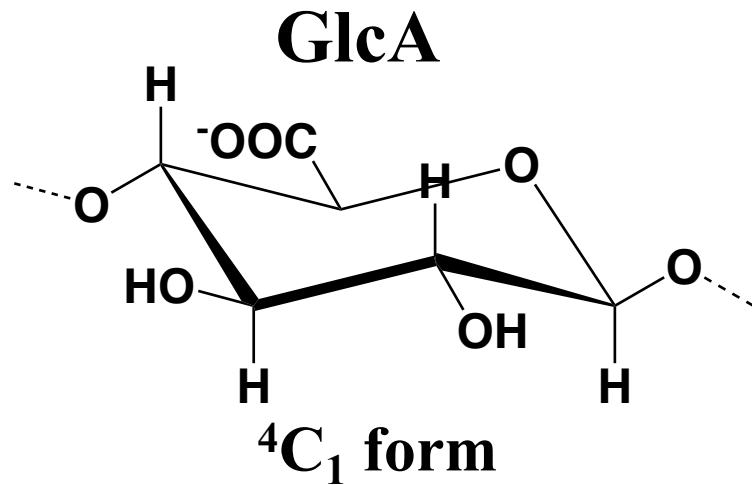
Healthy cont.



Patient



# Conformation of GlcA and IdoA



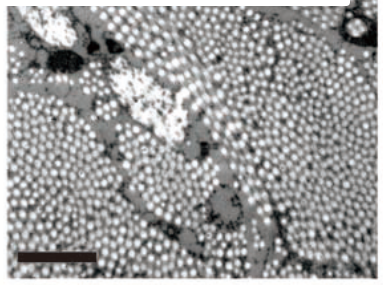
"Heparin" (Lane and Lindahl eds.) , 1989.



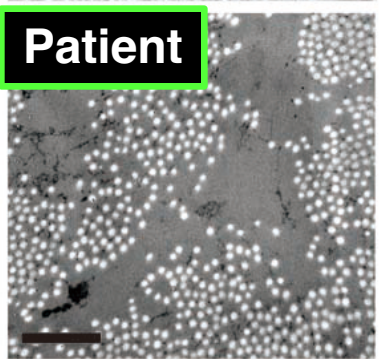
# The collagen fibers in the patient

Electron  
microscopy

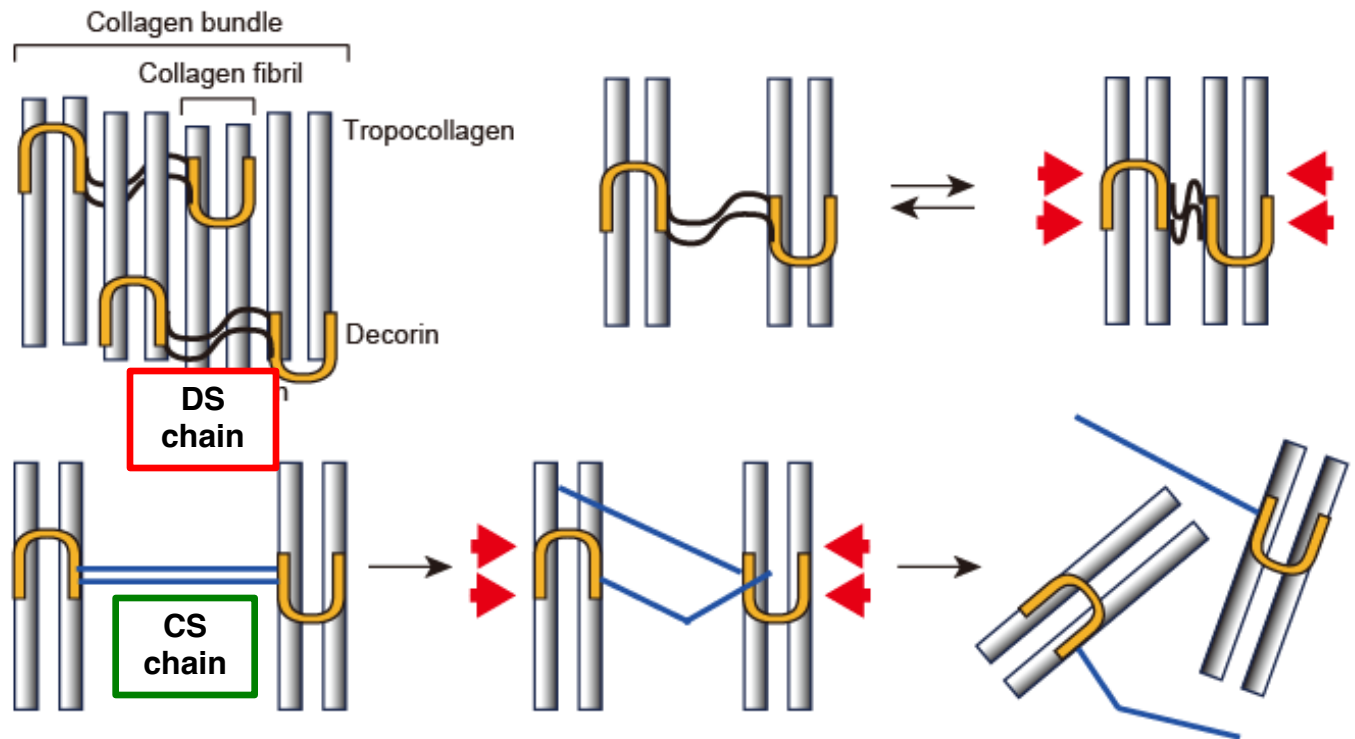
Healthy cont.



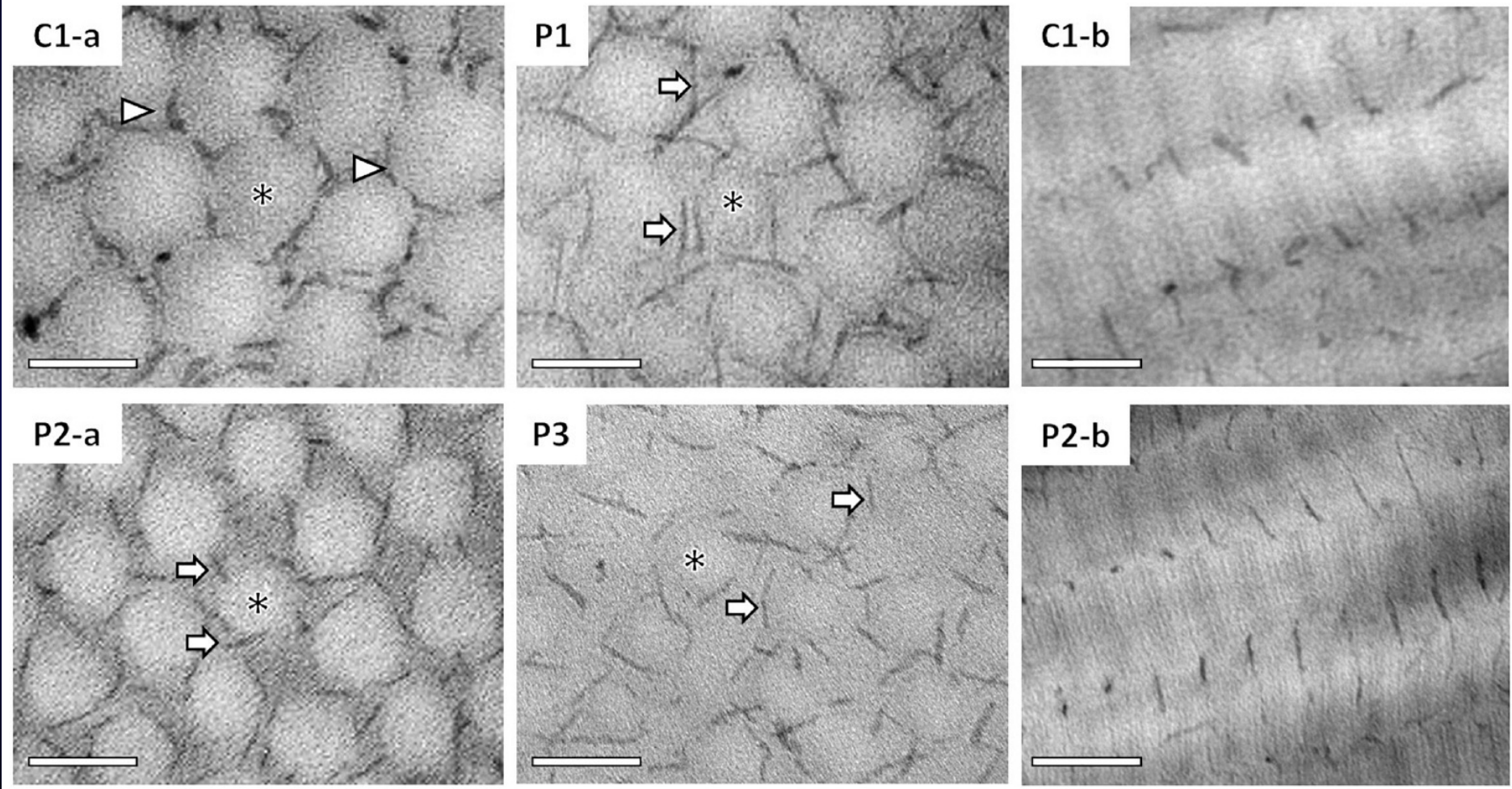
Patient



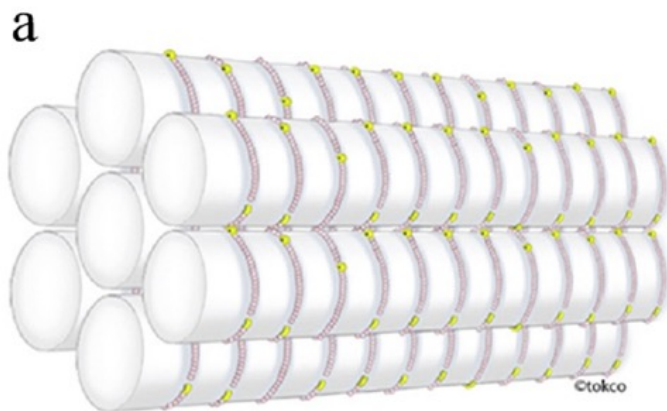
The structural alterations of collagen fibers  
by mechanical compression in normal and affected states



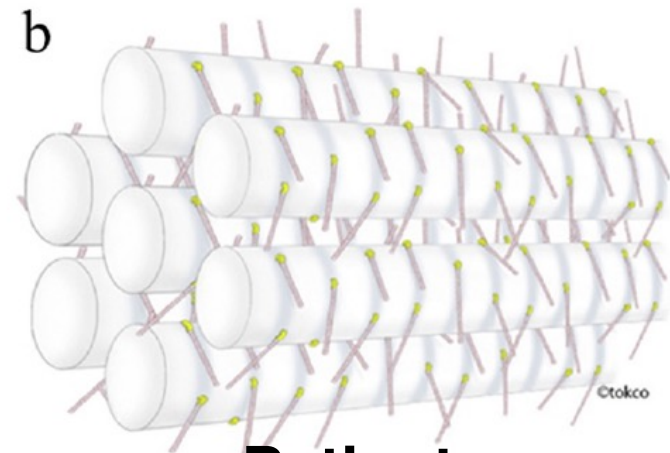
# Structural alteration of glycosaminoglycan side chains in the skins of patients



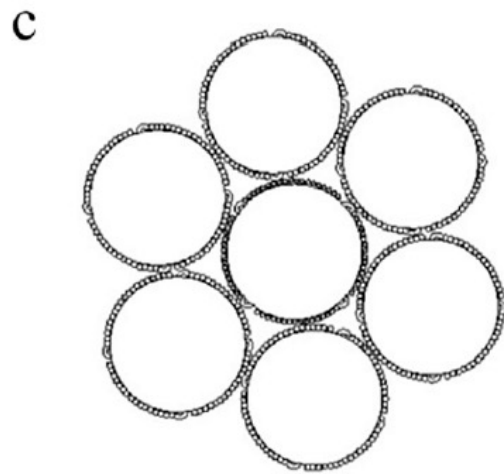
# Structure of collagen fibrils and GAG chains in the skin of healthy individuals and patients



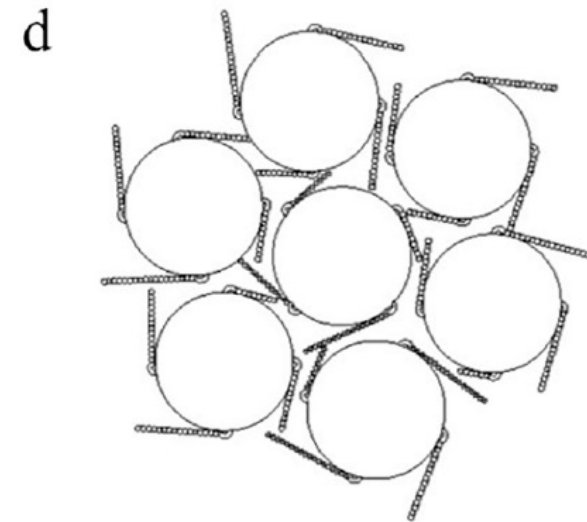
**Healthy subjects**



**Patients**



**DS chains adhere to collagen fibrils.**



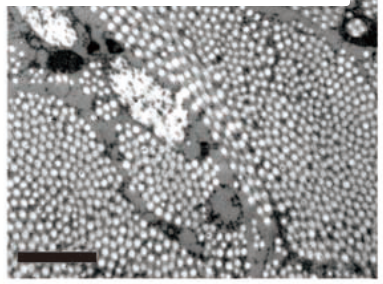
**CS chains spread across interfibrillar spaces.**



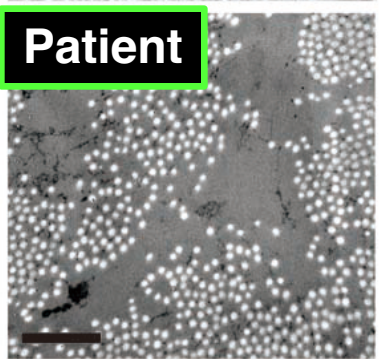
# The collagen fibers in the patient

Electron  
microscopy

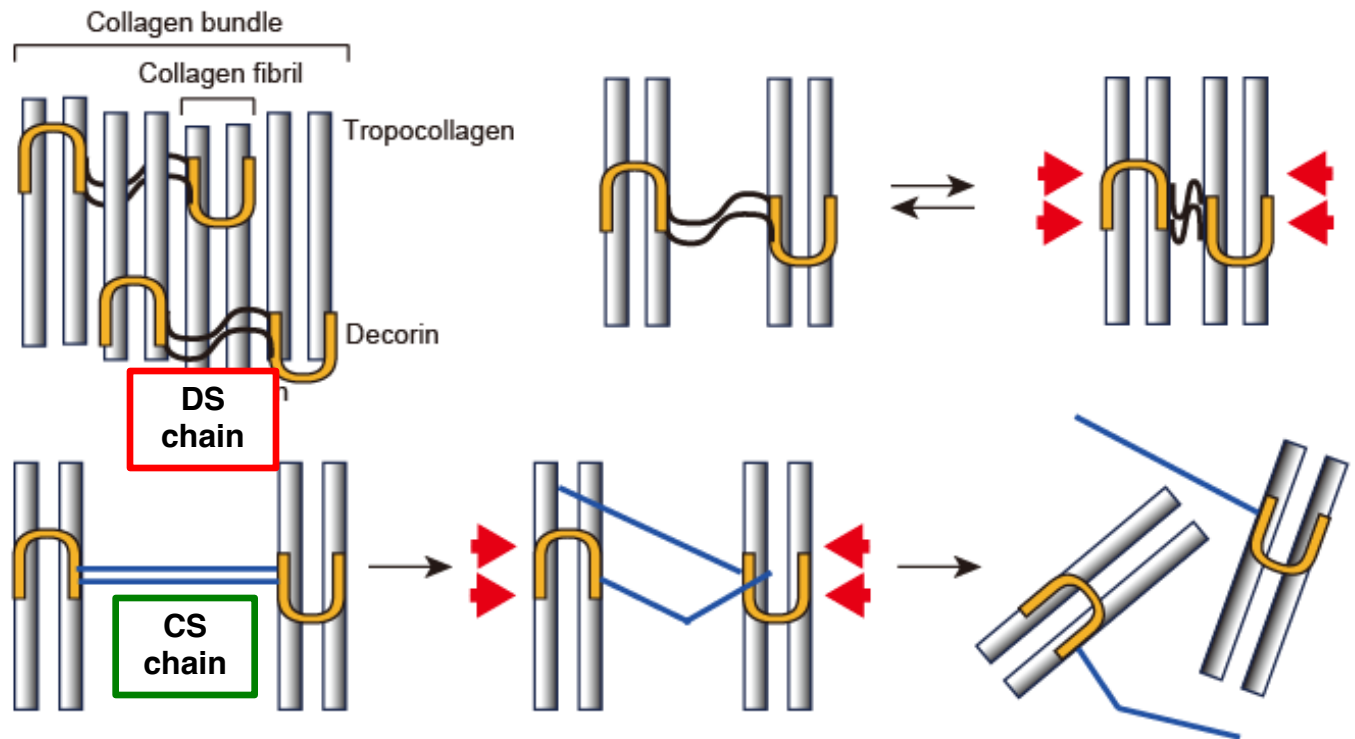
Healthy cont.



Patient



The structural alterations of collagen fibers  
by mechanical compression in normal and affected states



# Urine samples from EDS patients with mutation in *D4ST1*

Patient	Age (y)	Sex	D4ST1	References
1	11	F	P281L/Y293C	P1 in Kosho <i>et al.</i> AJMG 2010
2	29	F	P281L/P281L	P2 in "
3	32	M	P281L/P281L	P3 in "
4	20	F	P281L/C289S	P5 in "
5	4	F	P281L/Y293C	P6 in "
6	41	F	F209S/P281L	Kono <i>et al.</i> Acta Derm Venereol 2016
7	10	M	F209S/P281L	P2 in Shumizu <i>et al.</i> AJMG 2011
8	3m	M	F209S/P281L	Brother of patient 7

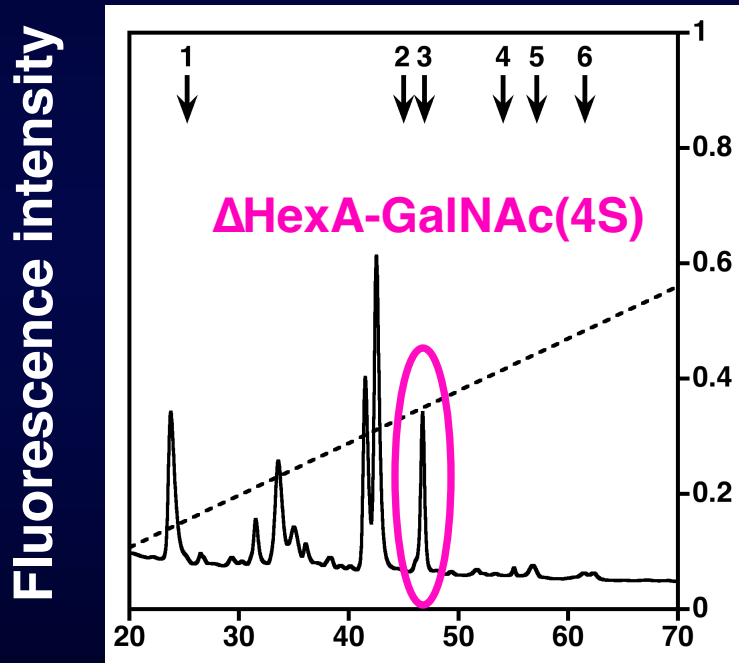
## Urines from healthy subjects (15 samples)

M: 6m, 10, 11, 30, 31y

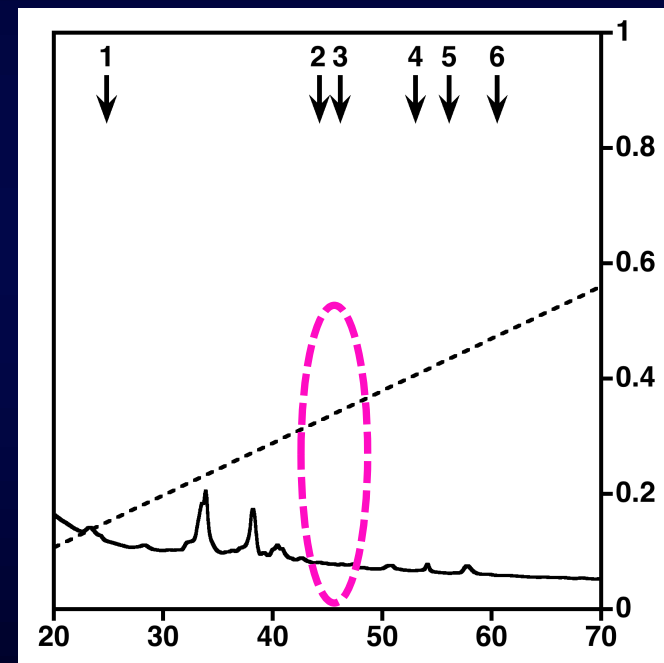
F: 3, 10, 12, 18, 21, 29, 39, 43y

# Analysis of DS in urine from a patient and a healthy subject

Control 3



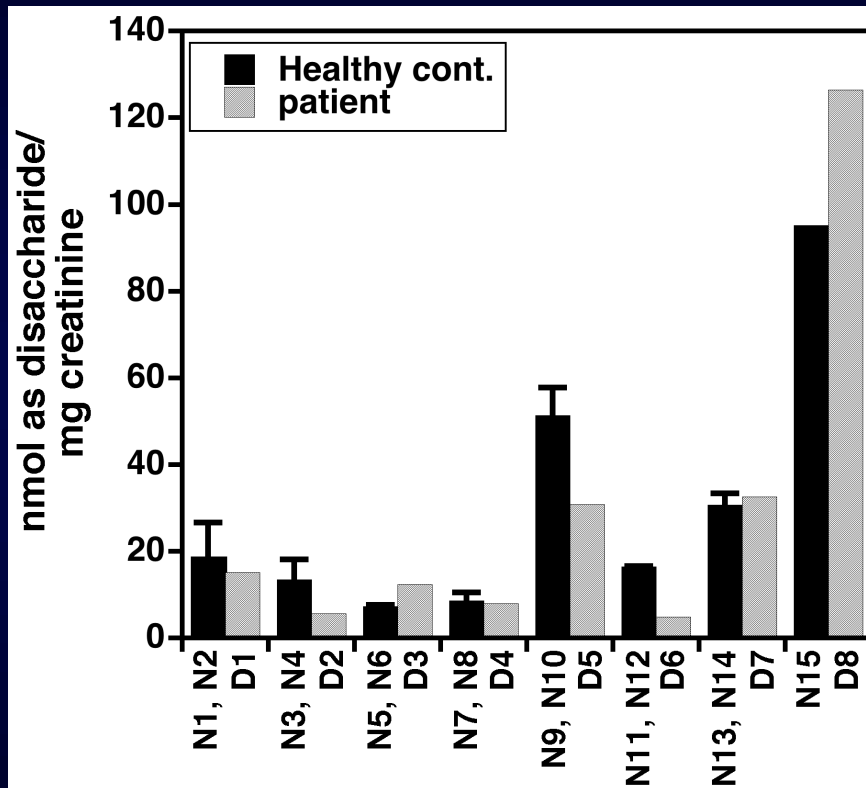
Patient 2 (P281L/P281L)



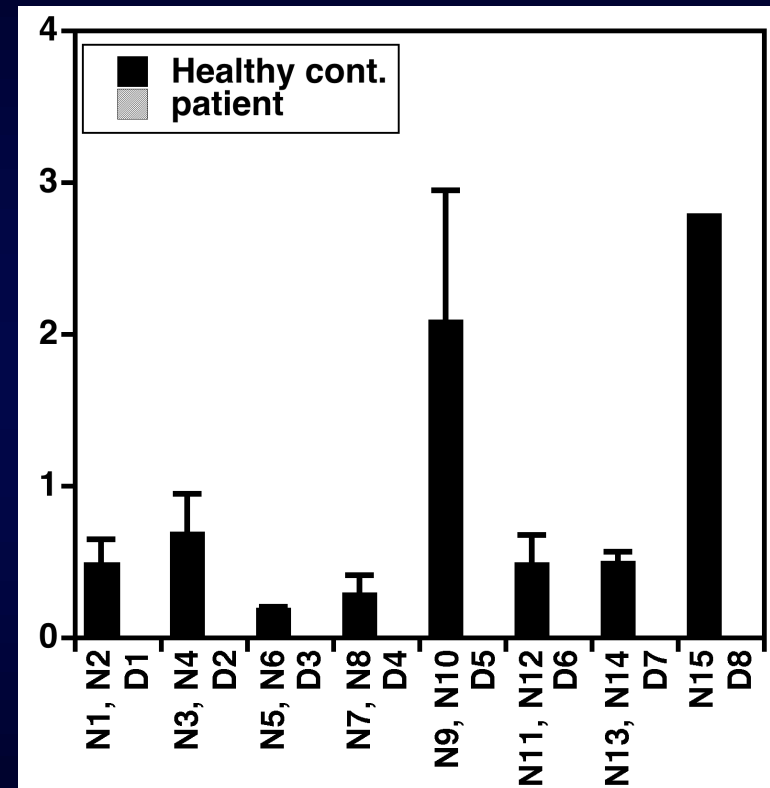
Concentration of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (M) (---)

# Total disaccharides of urinary CS and DS from the EDS patients with mutation in *D4ST1*

## Chondroitin sulfate



## Dermatan sulfate



This result proposes the usefulness of a urinary disaccharide compositional analysis of CS/DS chains as a non-invasive screening method for this disorder.

① Ehlers-Danlos syndrome caused by mutations in D4ST-1

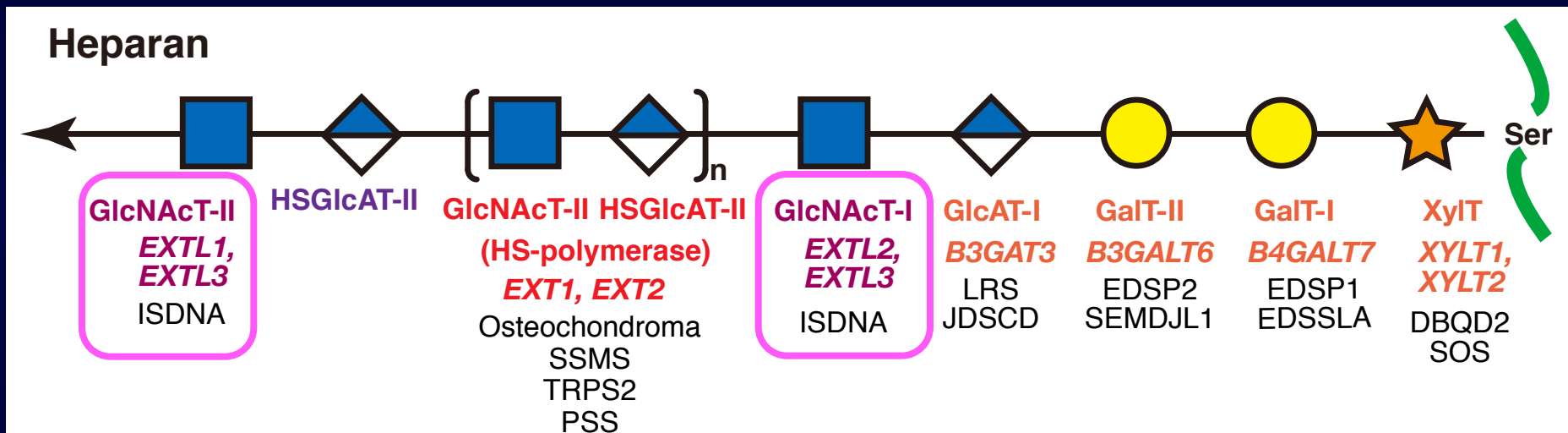
② A novel type of spondylo-epi-metaphyseal dysplasia caused by mutations in EXTL3



# Biosynthesis of HS backbone

Repeating disaccharide region of HS

Linker tetra-saccharide region



Human tumor suppressor *EXT* gene family members *EXTL1* and *EXTL3* encode  $\alpha$ 1,4-*N*-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/heparin biosynthesis

Byung-Taek Kim, Hiroshi Kitagawa, Jun-ichi Tamura, Toshiyuki Saito, Marion Kusche-Gullberg, Ulf Lindahl, and Kazuyuki Sugahara

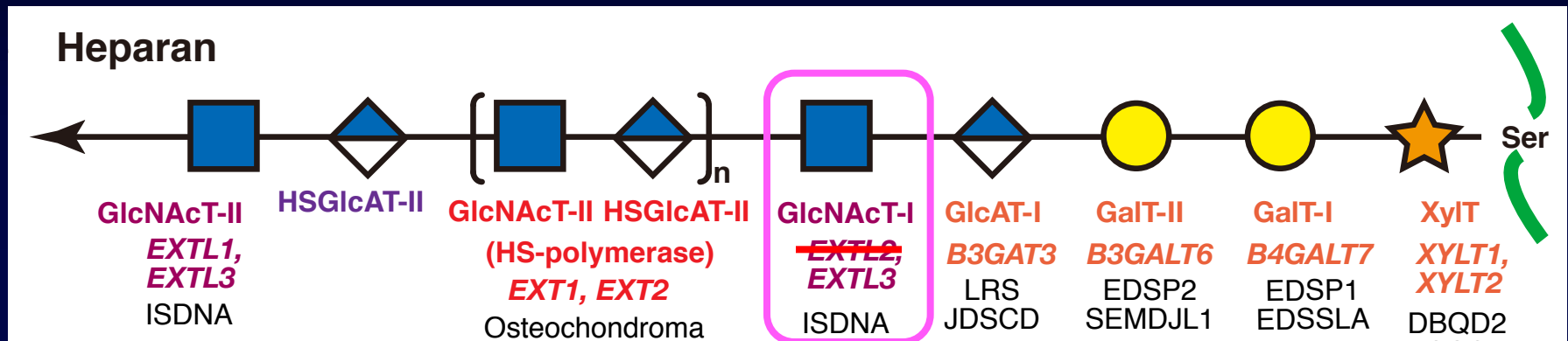
## Systemic *Extl3*-knockout mice are embryonic lethal

	<i>Extl3</i> <sup>+/+</sup>	<i>Extl3</i> <sup>+/-</sup>	<i>Extl3</i> <sup>-/-</sup>	Total
<b>E6.5</b>	<b>3 (19 %)</b>	<b>8 (50 %)</b>	<b>5 (31 %)</b>	<b>16</b>
<b>E7.5</b>	<b>4 (33 %)</b>	<b>4 (33 %)</b>	<b>4 (33 %)</b>	<b>12</b>
<b>E8.5</b>	<b>6 (22 %)</b>	<b>16 (59 %)</b>	<b>5 (19 %)</b>	<b>27</b>
<b>E9.5</b>	<b>12 (26 %)</b>	<b>33 (69 %)</b>	<b>1 (2 %)</b>	<b>46</b>
<b>E10.5</b>	<b>10 (31 %)</b>	<b>22 (69 %)</b>	<b>0</b>	<b>32</b>
<b>5-9 weeks (male)</b>	<b>21 (31 %)</b>	<b>47 (69 %)</b>	<b>0</b>	<b>68</b>
<b>5-9 weeks (female)</b>	<b>14 (31 %)</b>	<b>31 (69 %)</b>	<b>0</b>	<b>45</b>

# Biosynthesis of HS backbone

Repeating disaccharide region of HS

Linker tetrasaccharide region



**EXTL3 seems to be responsible for initiating the chain elongation of HS polysaccharides.**

# **Congenital diseases caused by mutations in the human EXTL3 gene**

**Guo *et al.*, J Hum Genet, 2017**

**Oud *et al.*, Am J Hum Genet, 2017**

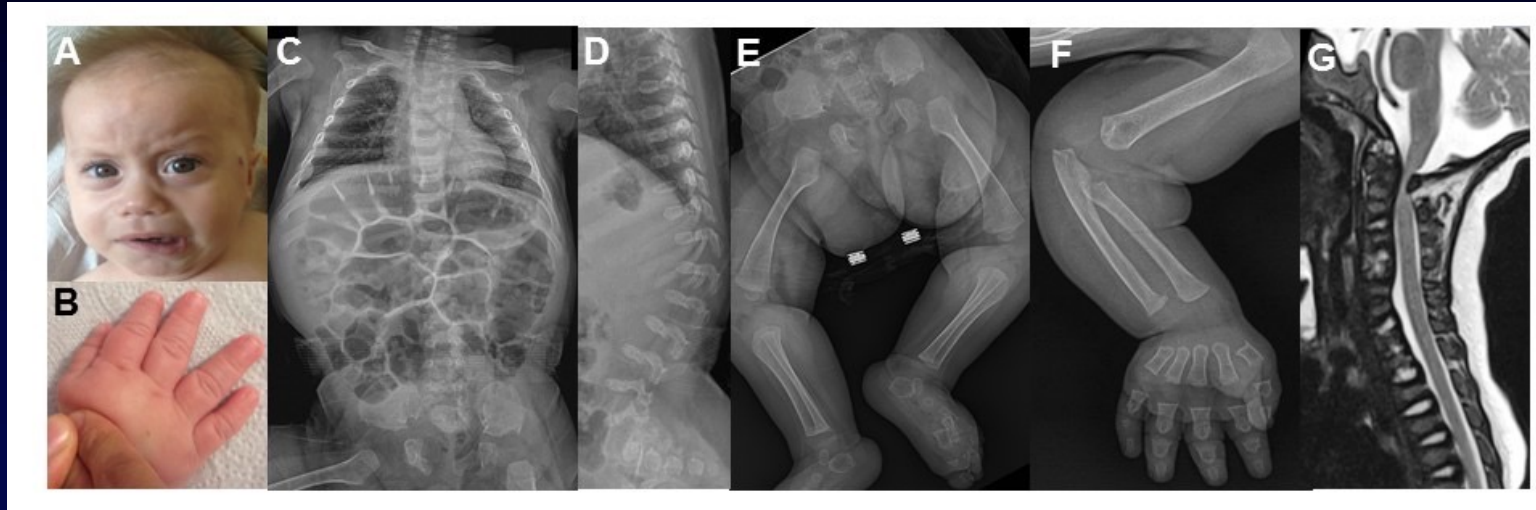
**Volpi *et al.*, J Exp Med, 2017**

**Affected individuals presented with**

- 1) various skeletal abnormalities,**
- 2) neurodevelopmental defects, and**
- 3) T-cell immunodeficiencies.**

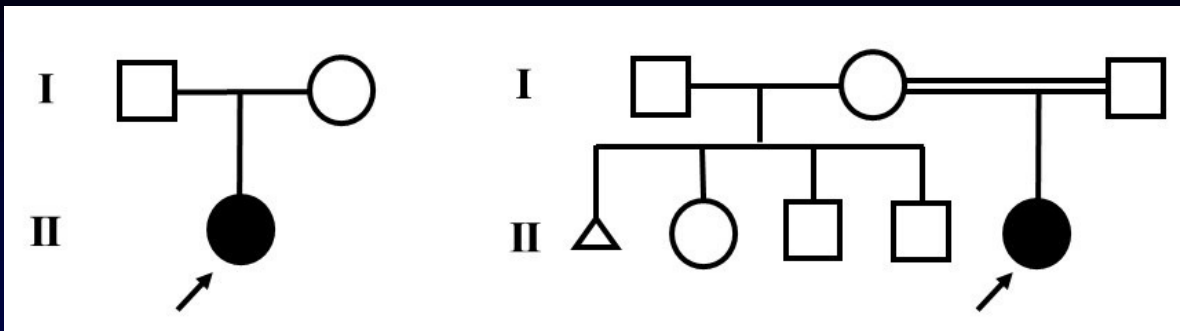
# Spondyloepimetaphyseal dysplasia (SEMD) with immunodeficiency/ Neuro-immuno-skeletal dysplasia syndrome caused by mutation in *EXTL3*

## Patient 1 (5 months)

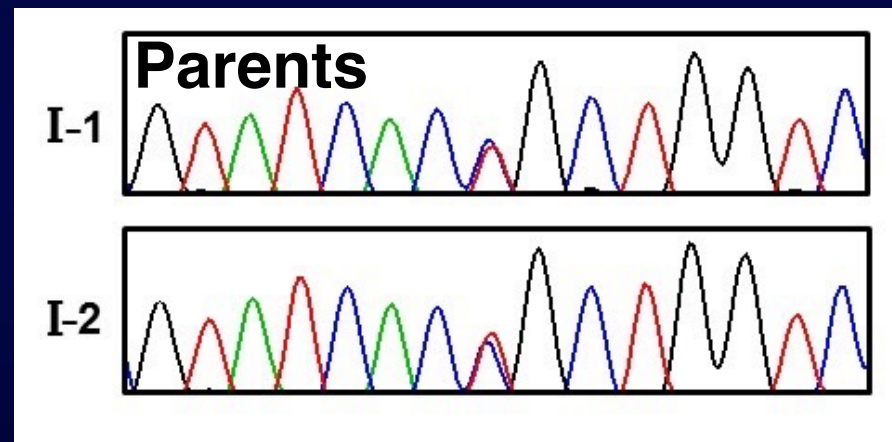
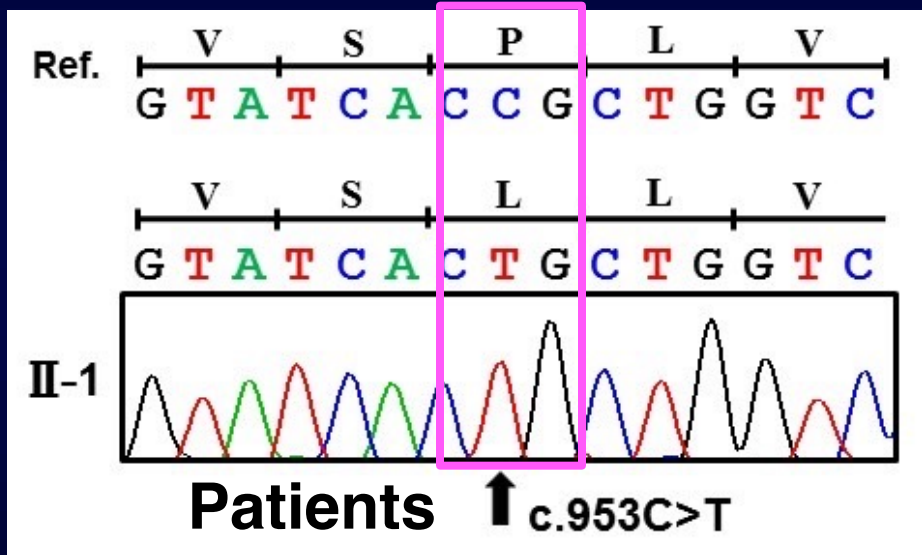


- Clinical pictures (A, B): frontal bossing, prominent eye, depressed nasal bridge, micrognathia and severe brachydactyly
- Radiographs (C-G): broad thorax, severe platyspondyly with kyphosis, broad ilia, broad ischia and pubes, broad metaphyses of the long tubular bones

# EXTL3 mutation



**EXTL3**

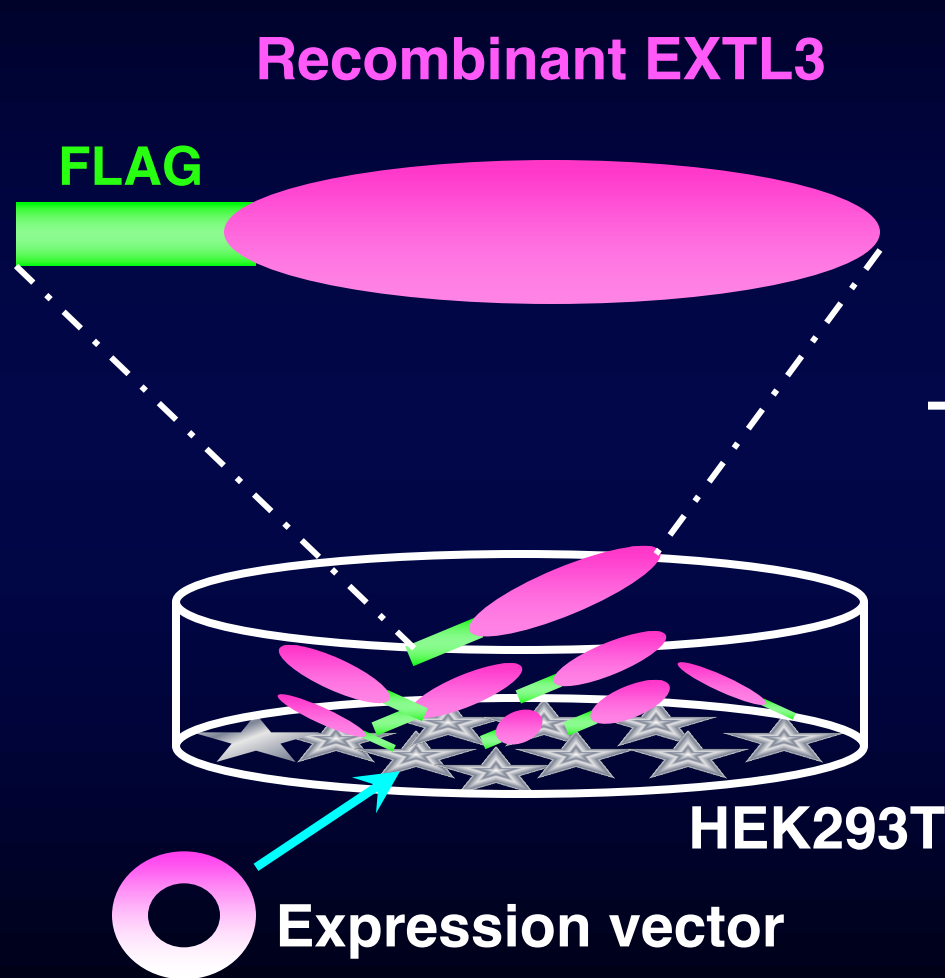


**P318L**

human  
mouse  
rat  
bovine  
Xenopus  
zebrafish

267	RTDGHNEVIINLSRKS	DTQNLLYNVSTGRAMVAQSTFYTVQYRPGFDLVVSP	VHAMSEPNFMEIPPQVPVKKRYLFTFQGEKIESLRSS
267	RTDGHNEVIINLSRKS	DTQNLLYNVSTGRAMVAQSTFYAAQYRAGFDLVVSP	VHAMSEPNFMEIPPQVPVKKRYLFTFQGEKIESLRSS
267	RTDGHNEVIINLSRKS	DTQNLLYNVSTGRAMVAQSTFYAAQYRAGFDLVVSP	VHAMSEPNFMEIPPQVPVKKRYLFTFQGEKIESLRSS
267	RTDGHNEVIINLSRKS	DTQNLLYNVSTGRAMVAQSTFYAAQYRPGFDLVVSP	VHAMSEPNFMEIPPQVPVKKRYLFTFQGEKIESLRSS
267	RTDGHNELIINLSRKS	ETQNYLYNVSTGRAMIAQSTFYDYSQYRPGFDIVVSP	VHAMSEPNFLEIPPQVPVKKRYLFSFQGEKIESLHSS
263	RSDGHNELLVHLS	INSLTQNFLYNVSTGRAAVAQSTFFERYREGFDLVVSP	VHALSEPNFLEVPPQVPVKKRYLFTFQGEKVESLRSS

# Expression of recombinant EXTL3 (Wild-type, P318L) and measurement of the enzyme activity



Purified EXTL3	10 $\mu$ L
UDP-[ $^3$ H]GlcNAc	8.3 $\mu$ M
Heparan sulfate	10 $\mu$ g
MES-NaOH (pH 6.5)	50 mM
ATP	0.17 mM
MnCl <sub>2</sub>	10 mM
<hr/>	
Total	30 $\mu$ L

37 °C for 2h

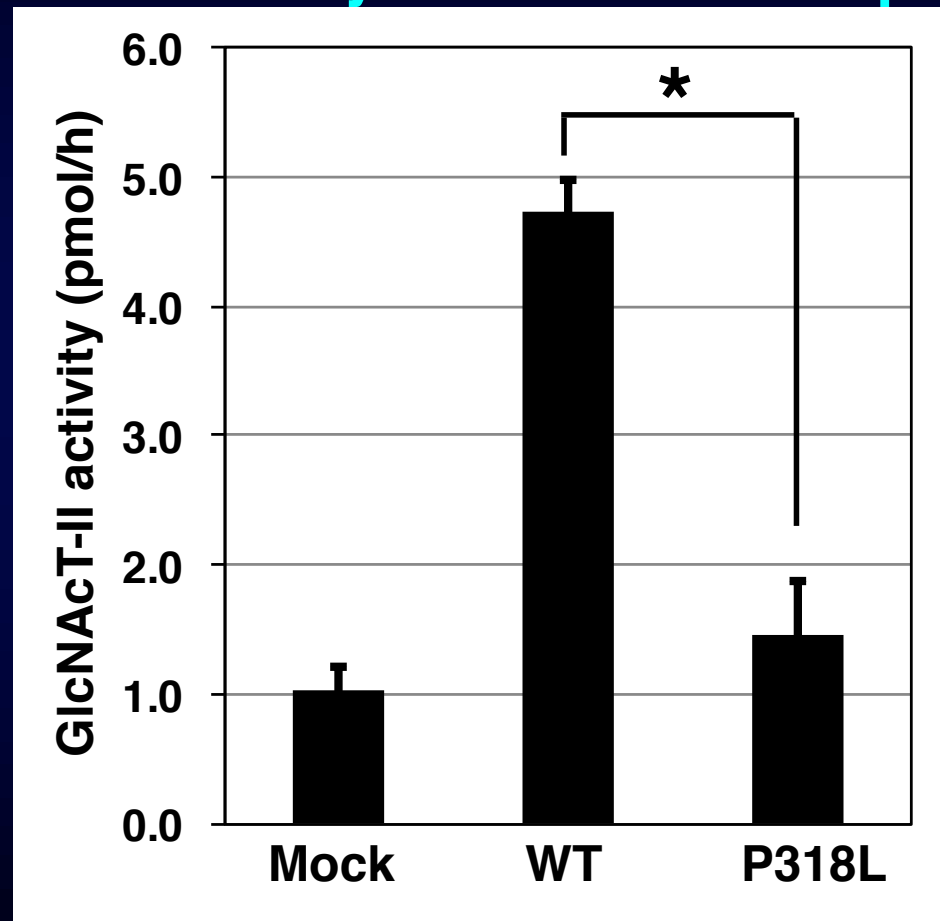
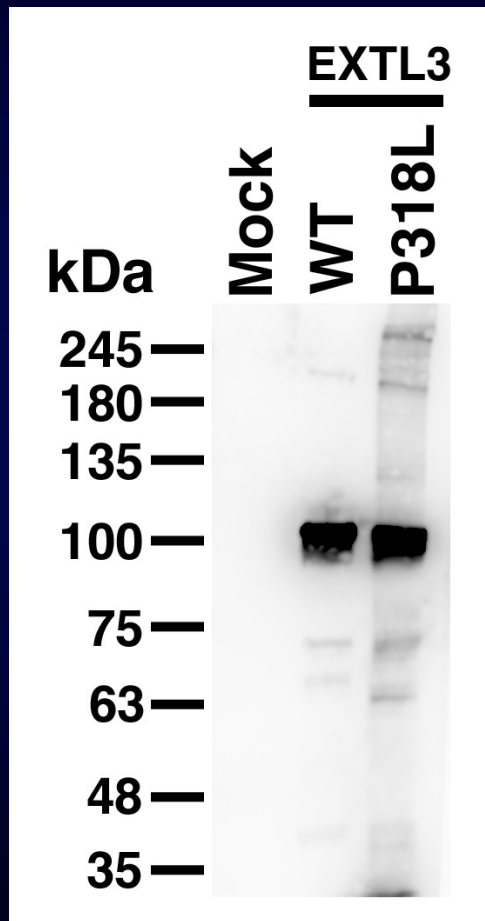
Gel filtration

[ $^3$ H]GlcNAc-HS polymer

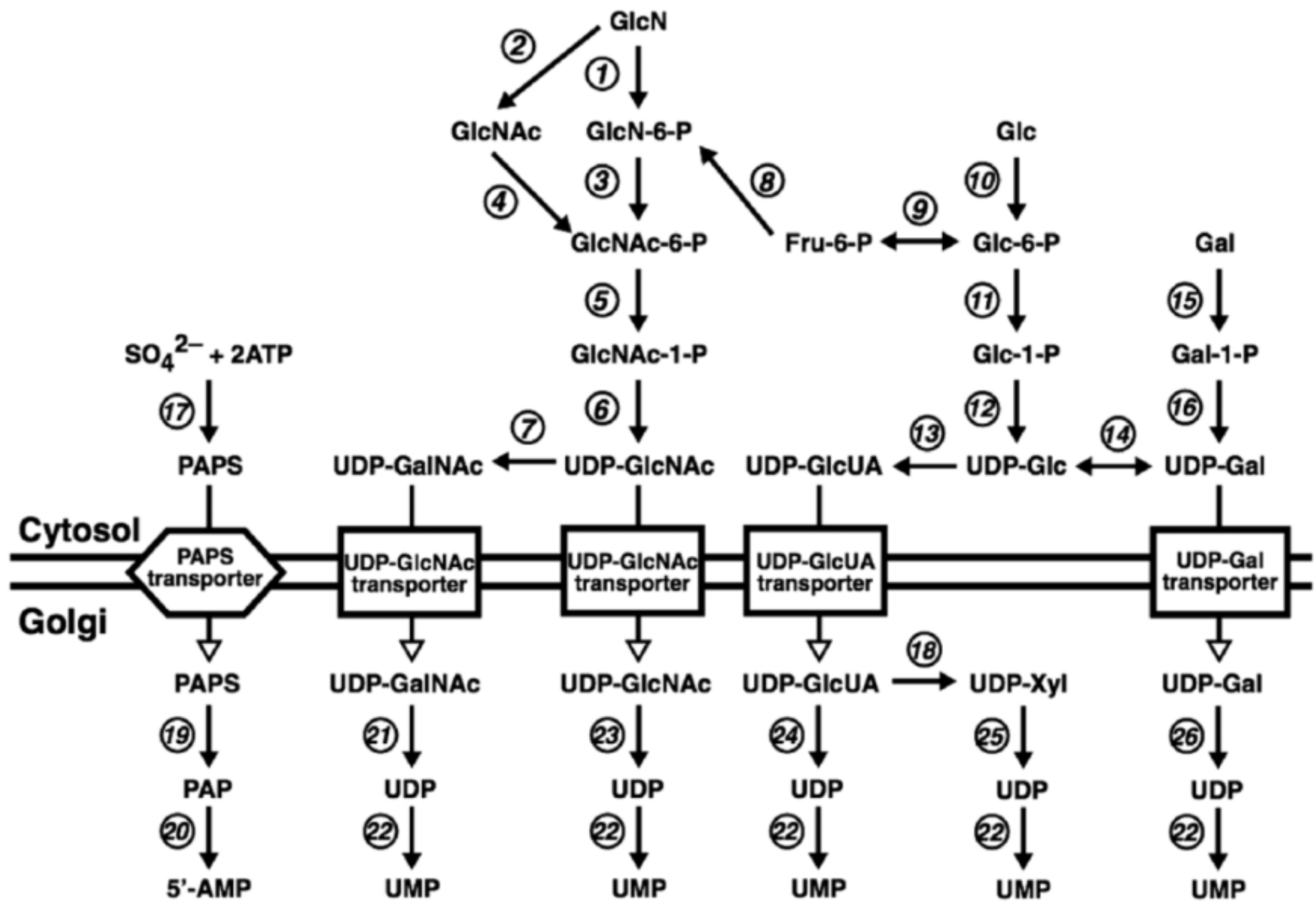
Liquid Scintillation Counting

# GlcNAc-transferase activity of recombinant EXTL3 (Wild-type, P318L)

Western blotting GlcNAc-T activity of recombinant proteins







# CONCLUSIONS

- ・グリコサミノグリカンは様々な疾患と関連がある。  
(癌、脊髄損傷、感染症など)
- ・グリコサミノグリカンの分解異常に基づく遺伝性疾患(ムコ多糖症)は古くから知られている。
- ・グリコサミノグリカンの合成異常に基づく遺伝病が次々に見つかっている。
- ・遺伝病の治療法の開発が急務である。

# Acknowledgements

**Shuji MIZUMOTO (Meijo Univ.)**

**Kazuyuki SUGAHARA  
(Hokkaido & Meijo Univ.)**

**Tomoki KOSHO (Shinshu Univ.)  
Naomichi MATSUMOTO (Yokohama City Univ.)**

**Noriko MIYAKE (National Center for Global Health  
and Medicine)**

**Hirofumi Ohashi (Saitama Children's Med. Center)**

**Atsushi HATAMUCHI (Dokkyo Med. Univ.)**

**Takafumi WATANABE (Rakuno Gakuen Univ.)**

**Nursel ELCIOGLU (Marmara Univ. Med. Sch.,**

**Istanbul, Turkey)**

**Shiro Ikegawa (RIKEN)**

