

200936103A

厚生労働科学研究費補助金

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

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 古庄 知己

平成22（2010）年 5月

目 次

I. 平成21年度構成員名簿

II. 総括研究報告

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	4
古庄知己（信州大学医学部附属病院遺伝子診療部）	

III. 分担研究報告

1. 血管型エーラスダンロス症候群の実態把握	14
福嶋義光（信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座、 信州大学医学部附属病院遺伝子診療部）	
2. 血管型エーラスダンロス症候群の遺伝子解析	16
簗持 淳（獨協医科大学皮膚科）	
3. 血管型エーラスダンロス症候群の診断法と遺伝子治療法の開発	18
渡邊 淳（日本医科大学附属病院遺伝診療科、同生化学・分子生物学）	
4. 新型エーラスダンロス症候群の臨床像	20
古庄知己（信州大学医学部附属病院遺伝子診療部）	
5. 新型エーラスダンロス症候群の責任遺伝子単離	23
松本直通（横浜市立大学医学部遺伝学）	

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 27

I . 平成21年度構成員名簿

I. 平成21年度構成員名簿

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
主 任 研 究 者	古 庄 知 己	信州大学医学部附属病院遺伝子診療部	講師
研 究 分 担 者	福 嶋 義 光	信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座	教授
	旗 持 淳	獨協医科大学皮膚科	教授
	渡 邊 淳	日本医科大学附属病院遺伝診療科・第二生化学	講師
	松 本 直 通	横浜市立大学大学院医学研究科環境分子医科学	教授
研 究 協 力 者	森 崎 裕 子	国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部	室長
	三 宅 紀 子	横浜市立大学大学院医学研究科環境分子医科学	助教

Ⅱ．総括研究報告

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

研究代表者 古庄知己 信州大学医学部附属病院遺伝子診療部

研究要旨：エーラスダンロス症候群（Ehlers-Danlos Syndrome; EDS）は、皮膚、関節、血管など結合組織の脆弱性に基づく遺伝性疾患である。その原因と症状から、6 病型（古典型、関節可動性亢進型、血管型、後側彎型、多関節弛緩型、皮膚脆弱型）に分類されており、全病型を合わせた推定頻度は約 1/5000 人とされている。しかしながら、特定疾患調査研究指定でないことから、これまで全国調査が行われたことはなく、本邦における EDS の実態（患者数、診療状況）は全くわかっていない。そのため、診療現場での認知度はきわめて低く、病型に合った適切な診療指針も確立されていない。特に、若年性動脈破裂・解離・瘤、腸破裂、妊娠中の子宮破裂などの生命に関わる深刻な症状を呈する血管型 EDS においては、そのスクリーニング方法、予防法、治療法、遺伝カウンセリングのあり方を含めた包括的診療指針が確立していないために、経験のある施設とない施設での医療格差は甚大であり、大きい診療上の問題となっている。また、最近我々は、進行性で最重度の皮膚・関節・血管脆弱性と特徴的な奇形徴候を有する新型 EDS を世界に先駆けて見出した。本研究の目的は、血管型および新型 EDS を中心に、本邦初の診療に関する実態調査と遺伝子解析を行うことにより、診療指針を確立することである。血管型 EDS においては、Ⅲ型コラーゲン遺伝子解析または生化学分析により確定診断された国内全症例の抽出を行った。結果、36 家系 41 症例が確認され、男性 23 例、女性 18 例、診断時年齢は 14-54 歳であった。動脈合併症（瘤、解離、破裂）24 例、腸管破裂 7 例、肺合併症（咯血、気胸、出血）20 例であった。変異は、ミスセンス変異 18 例、スプライス変異 15 例であった。3 家系においてタンパク量の減少が認められたが、変異は見出されなかった。さらに、培養皮膚線維芽細胞由来の mRNA を用いた従来の遺伝子解析法とは異なり、末梢血由来 DNA を用いた新しい解析法である高解像度融解曲線分析法の有用性を試みた。結果、既知のミスセンス変異およびスプライシング変異を同定可能であり、かつ、従来の解析法では同定できなかった新規のナンセンス変異を同定することができた。新型 EDS においては、6 例を収集することができ、その臨床像から、顔貌上の特徴、先天性多発関節拘縮、進行性の皮膚・関節弛緩、および、組織脆弱性に起因する進行性の多系統合併症を呈する新しい疾患単位であると結論付けた。さらに、両親が血族婚の 2 家系を対象としたホモ接合性マッピングにより、8.1Mb の責任遺伝子候補領域（Lod score 2.885）を同定、マイクロサテライトマーカーを用いたハプロタイプ解析により候補領域を 6.3Mb まで限局した。そして、この領域に存在する遺伝子 A が本疾患の責任遺伝子であることを突き止めた。さらに機能解析により遺伝子異常が惹起する発症メカニズムや分子病態の一端を明らかにした。今後、両病型を中心に、症例を収集し、より正確で詳細な自然歴を蓄積し、現場で役立つ診療指針を構築していく計画である。また、病態の解明およびこれに基づく根本的治療法の開発にも取り組んでいく計画である。

A. 研究目的

エーラスダンロス症候群（Ehlers-Danlos Syndrome; EDS）は、皮膚、関節、血管など結合組織の脆弱性に基づく遺伝性疾患である。その原因と症状から、6 病型（古典型、関節可動性亢進型、血管型、後側彎型、多関節弛緩型、皮膚脆弱型）に分類されており、全病型を合わせた推定頻度は約 1/5000 人とされている。

EDS は、特定疾患調査研究指定でないことから、これまで全国調査が行われたことはなく、本邦における EDS の実態（患者数、診療状況）は全くわかっていない。そのため、診療現場での認知度はきわめて低く、病型に合った適切な診療指針も確立されていない。特に、若年性動脈破裂・解離・瘤、腸破裂、妊娠中の子宮破裂などの生命に関わる深刻な症状を呈する血管型 EDS においては、そ

のスクリーニング方法、予防法、治療法、遺伝カウンセリングのあり方を含めた包括的診療指針が確立していないために、経験のある施設とない施設での医療格差は甚大であり、大きい診療上の問題となっている。

新型 EDS は、後側彎型に類似した臨床症状に、特徴的な顔貌および骨格徴候を伴い、後側彎型の原因である lysyl hydroxylase の欠損が見出されない 2 症例を見出し、後側彎型の亜型として報告したものである (Am J Med Genet 138A: 282-287, 2005)。本病型は、進行性で重度の皮膚・関節・血管脆弱性を呈し、患者・家族の負担がきわめて大きい最重症型である。

本研究の目的は、(1) 血管型 EDS において、本邦初の診療に関する実態調査と遺伝子解析を行うことにより、その診療実態を把握し、診療指針を構築すること、(2) 新型 EDS の原因遺伝子単離、病態解明、臨床データの収集に基づき疾患概念を確立すること、それにより診療指針の構築することである。

B. 研究方法

①血管型 EDS の遺伝子解析および実態調査に基づく診療指針の構築

現在日本において本症の確定診断のための生化学分析・遺伝子解析を行っている施設は、獨協医科大学皮膚科（簗持淳教授、研究分担者）、日本医科大学第二生化学（渡邊淳講師、研究分担者）、国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部（森崎裕子室長、研究協力者）のみである。本年度の研究班において、これら 3 施設がこれまで確定診断した全症例の抽出を行い、信州大学医学部附属病院遺伝子診療部（古庄知己、研究代表者；福島義光、研究分担者）において臨床データおよび遺伝子型を分析した。

確定診断においては、患者皮膚の生検により得られた皮膚線維芽細胞をトリチウム放射性プロリンと共に培養し、産生されたコラーゲンを回収して電気泳動で分離後、フィルムに感光して I 型、III 型コラーゲンを解析した。異常例においては培養皮膚線維芽細胞由来の mRNA を用いて COL3A1 の遺伝子解析を施行した。

より非侵襲的かつ効率的な遺伝子解析法を追求するために、近年注目されている高解像度融解曲線分析法 (high-resolution melt curve analysis ; hrMCA) を試みた。既知の COL3A1 変異を有する血管型 EDS 患者ならびに臨床的に血管型 EDS を疑われた患者の末梢血由来ゲノム DNA を用いて、本法による COL3A1 遺伝子変異スクリーニングについて検討した。

②新型 EDS の病態解明のための遺伝子解析、疾患概念の確立、および、実態調査に基づく診療指針の構築

既報告の 2 症例においては、当科または関係各科の検診時に収集しえた臨床データを用いた。全国から当科に診療相談のあった EDS 症例のなかから、新たに 4 例を見出し、担当医の協力を得て臨床情報を収集した。合計 6 症例の臨床像を詳細に分析した。

両親が血族婚であった 2 家系に於いて、ホモ接合性マッピングを行って責任遺伝子座を限局し、さらに情報性の高いマイクロサテライトマーカー解析を追加し責任領域を狭めた。特定された責任遺伝子座内に局在する候補遺伝子群の変異スクリーニングを行った。責任遺伝子が同定された後は、その機能解析を行い変異のもたらす影響を調査した。

倫理面への配慮

本研究は、血管型 EDS および新型 EDS を中心に、EDS における診療の実態を調査するものである。ヒトを対象とした臨床研究であるため、臨床研究に関する倫理指針（厚生労働省）などを遵守する必要がある、研究代表者は、平成 21 年、「血管型エーラスダンロス症候群の実態把握および治療指針の確立（受付番号 1350）」との課題名で、信州大学医学部医倫理委員会の承認を得た。診療施設から臨床情報を収集する際には、個人情報の保護に留意した。

本研究は、(1) 血管型 EDS の確定診断としての生化学分析および遺伝子解析、そして、(2) 新型 EDS の遺伝子解析および病態解析を含む。研究代表者はすでに、血管型 EDS の遺伝子解析、新型 EDS の遺伝子解析、および EDS の病態解析に関して、信州大学医学部医倫理委員会において承認を得ている。また、遺伝子解析を実施する共同研究施設においても、倫理委員会の承認を得ている。新

たに遺伝子解析を行う患者・家族に対しては、研究代表者またはそのガイダンスを受けた患者主治医により、患者・家族に十分な説明を行い、同意を得ることを原則とした。

C. 研究結果

①血管型 EDS の遺伝子解析および実態調査に基づく診療指針の構築

＜実態調査＞36 家系 41 症例が確認され、男性 23 例、女性 18 例、診断時年齢は 14-54 歳であった。動脈合併症（瘤、解離、破裂）24 例、腸管破裂 7 例、肺合併症（喀血、気胸、出血）20 例であった。変異は、ミスセンス変異 18 例、スプライス変異 15 例であった。3 家系においてタンパク量の減少が認められたが、変異は見出されなかった。

＜新たな遺伝子解析法の検討＞高解像度融解曲線分析法により既知の COL3A1 遺伝子のグリシン変異 3 種類とスプライシング変異 3 種類では同定可能であった。さらに、臨床的に血管型 EDS を疑われた患者に対して、COL3A1 の Exon 42 において 831 番目のグルタミンが終止コドンに変異した新しいナンセンス変異を同定した。この変異は従来の mRNA からの遺伝子変異解析手法では変異を同定できなかった。

②新型 EDS の病態解明のための遺伝子解析、疾患概念の確立、および、実態調査に基づく診療指針の構築

＜臨床像＞2 症例の親が近親婚であった。顔貌は、乳児期、大泉門開大、眼間開離、短い眼瞼、青色強膜、小さい鼻柱を伴った短い鼻、耳介低位、高口蓋、長い人中、薄い上口唇、小さい口、小さく後退した下顎といった特徴を、思春期以降、細長い、非対称、下顎突出といった特徴を有した。骨格は、出生時、手指、手首、股関節の拘縮、内反足を呈し、小児期に、全身的な関節弛緩および変形が進行した（多発関節脱臼、外反扁平または凹足、扁平または漏斗胸、後側彎）。皮膚は、進行性の過伸展性、易出血性、脆弱性を呈し、成人期には顕著なたるみと特異な手掌の皺を呈した。心臓血管系は、心臓弁の逸脱・逆流、また、血管の破綻によると推測される反復性巨大皮下血腫を呈した。消化器系は、重度便秘、腸憩室破裂を、

泌尿器系は、膀胱拡張、反復性尿路感染症を呈した。眼科的には、斜視、近視、眼圧上昇を、耳鼻科的には、高音域の聴力低下を認めた。運動発達遅滞は認められたが、明らかな精神遅滞は認められなかった。

＜原因遺伝子単離・病態解明＞血族婚家系 2 家系を用いたホモ接合性マッピングにより常染色体領域に 8.1 Mb の責任領域を 1 カ所同定した（Lod score 2.885）。責任領域内と近傍の 7 つのマイクロサテライトマーカー解析を行い、責任領域を 6.3 Mb にまで狭小化した。候補領域内の 109 遺伝子の中から機能的に関連性の疑われる 7 つの遺伝子を選択し変異解析を行った。この結果遺伝子 A（未発表のため仮称とする）においてホモ接合性変異あるいは複合ヘテロ接合性変異を全例で認め、遺伝子 A が本疾患の責任遺伝子で常染色体劣性遺伝性疾患であると結論した。遺伝子 A はタンパク翻訳後修飾を司る酵素をコードする。同定されたナンセンス変異 1 種とミスセンス変異 3 種における酵素活性を検討し、いずれの変異も酵素活性が欠如し機能喪失性変異であることが強く示唆された。

D. 考察

①血管型 EDS の遺伝子解析および実態調査に基づく診療指針の構築

＜実態調査＞診断されていない症例も少なくないと推定され、症例収集上のバイアスがある可能性はあるが、現時点での本邦における血管型 EDS 患者の概要を把握することができた。従来の報告に比べて、肺合併症の頻度が高い傾向にあった。タンパク量の減少が見られるものの遺伝子変異を同定できない症例においては、培養皮膚線維芽細胞由来の mRNA を用いた遺伝子解析では RNA decay により変異を検出できないハプロ不全例も含まれている可能性がある。

＜新たな遺伝子解析法の検討＞従来の培養皮膚線維芽細胞由来 mRNA を用いた遺伝子解析において同定しえなかった Exon 42 におけるナンセンス変異を高解像度融解曲線分析法により同定しえた理由は、mRNA decay を生じていたためと考えられた。本変異によって変異タンパク質は出現しないことから、ハプロ不全により発症すると推測される。多くの血管型 EDS 患者で想定されてい

る優性阻害効果とは異なるため、治療方策も異なると予測される。

②新型 EDS の病態解明のための遺伝子解析、疾患概念の確立、および、実態調査に基づく診療指針の構築

＜臨床像＞近親婚の存在から常染色体劣性遺伝が想定され、進行性の病変からコラーゲンの生合成に関わる酵素の欠損が原因である可能性が示唆された。

＜原因遺伝子単離・病態解明＞新型 EDS の責任遺伝子 A はタンパク翻訳後修飾を司る酵素をコードしていた。この異常により EDS の中核的異常であるコラーゲン線維束の形成異常が惹起されることが推察された。進行性の全身結合組織脆弱性という臨床像に矛盾しない病態であると考えられた。

E. 結論

①血管型 EDS の遺伝子解析および実態調査に基づく診療指針の構築

現時点での本邦における血管型 EDS 患者の概要を把握した。肺合併症の頻度は動脈合併症に次いで多かった。今後、さらに症例を増やして検討を進める必要がある。また、高解像度融解曲線分析法は、本症の遺伝子診断において、末梢血由来 DNA を用いるという点で非侵襲的であるのみならず、培養皮膚線維芽細胞由来 mRNA では検出しないナンセンス変異をも同定できる有望な解析法と考えられた。

②新型 EDS の病態解明のための遺伝子解析、疾患概念の確立、および、実態調査に基づく診療指針の構築

収集しえた 6 例は症状および経過が酷似しており、臨床的に新型 EDS と考え得るとの結論に達した。また、責任遺伝子 A の単離に成功した。本遺伝子のコードする酵素の機能障害によりコラーゲン線維束の形成異常が惹起され、進行性の全身結合組織脆弱性を来すことが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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, Multiple Congenital Contractures, Progressive Joint and Skin Laxity, and Multisystem Fragility-related Manifestations. Am J Med Genet Part A (in press).

Muramatsu Y, Kosho T (corresponding author), Magota M, Yokotsuka T, Ito M, Yasuda A, Kito O, Suzuki C, Nagata Y, Kawai S, Ikoma M, Hatano T, Nakayama M, Kawamura R, Wakui K, Morisaki H, Morisaki T, Fukushima Y. Progressive aortic root and pulmonary artery aneurysms in a neonate with Loeys-Dietz syndrome type 1B. Am J Med Genet Part A 152A: 417-421, 2010.

Yamazaki M, Kosho T (equal contribution, corresponding author), Kawachi S, Mikoshiba M, Takahashi J, Sano R, Oka K, Yoshida K, Watanabe T, Kato H, Komatsu M, Kawamura R, Wakui K, Knappskog PM, Boman H, Fukushima Y. Cold-induced sweating syndrome with neonatal features of Crisponi syndrome: longitudinal observation of a patient homozygous for a CRLF1 mutation. Am J Med Genet Part A 152A: 764-769, 2010.

佐畑貴之, 津田聡, 山岸俊夫, 阿保昌樹, 実方一典, 青木洋子, 古庄知己, 簗持淳. 今月の症例 習慣性の腸管破裂にて Ehlers-Danlos 症候群と判明した 1 例. 日本

内科学会雑誌 98:140-142, 2009.

114:637-645, 2009.

古庄知己. 網膜芽細胞腫. トンプソン&トンプソン 遺伝医学 (監訳 福嶋義光), メディカル・サイエンス・インターナショナル (東京), 318-319, 2009.

古庄知己. 13 トリソミー症候群. 小児科診療増刊号「小児の症候群」 72 Sup:15, 2009.

古庄知己. 18 トリソミー症候群. 小児科診療増刊号「小児の症候群」 72 Sup:19, 2009.

古庄知己. 神経線維腫症 I 型. 小児科診療増刊号「小児の症候群」 72 Sup:106, 2009.

古庄知己. 染色体異常症のファミリー・サポートグループ. 小児内科 41:910-915, 2009.

古庄知己. 二分脊椎の遺伝カウンセリング. 小児外科 41:730-735, 2009.

古庄知己. 13 トリソミー. 小児内科 41 増刊号「小児疾患診療のための病態生理 2」233-235, 2009.

古庄知己. 18 番染色体異常症. 小児内科 41 増刊号「小児疾患診療のための病態生理 2」240-242, 2009.

古庄知己. Ehlers-Danlos 症候群, Marfan 症候群. 小児内科 41 増刊号「小児疾患診療のための病態生理 2」973-980, 2009.

古庄知己. SGA の疫学と発症要因 胎児側の要因. 周産期医学「特集:SGA をめぐる諸問題」40:170-173, 2010.

古庄知己. 18 トリソミーの自然歴およびマネジメントの確立をめざして. 小児科学会誌

Ishiguro T, Takayanagi N, Kawabata Y, Matsushima H, Yoshii Y, Harasawa K, Yamaguchi S, Yoneda K, Miyahara Y, Kagiya N, Tokunaga D, Aoki F, Saito H, Kurashima K, Ubukata M, Yanagisawa T, Sugita Y, Okita H, Hatamochi A. Ehlers-Danlos Syndrome with recurrent spontaneous pneumothoraces and cavitory lesion on chest X-ray as the initial complications. Intern Med 48: 717-722, 2009.

Okita H, Ikeda Y, Mitsuhashi Y, Namikawa H, Kitamura Y, Hamasaki Y, Yamazaki S, Hatamochi A. A novel point mutation at donor splice-site in intron 42 of type III collagen gene resulting in the inclusion of 30 nucleotides into the mature mRNA in a case of vascular type of Ehlers-Danlos syndrome. Arch Dermatol Res [Epub ahead of print]

松下文, 高柳昇, 石黒卓, 原澤慶次, 土屋典子, 米田絃一郎, 宮原庸介, 山口昭三郎, 矢野量三, 徳永大道, 斉藤大雄, 倉島一喜, 生方幹生, 柳沢勉, 杉田裕, 河端美則, 沖田博, 簀持淳. 肺裂傷に伴う肺気腫が診断契機となった Ehlers-Danlos 症候群の 1 例. 日本呼吸器学会雑誌 47:704-710, 2010.

Ohkuchi A, Matsubara S, Takahashi K, Inoue S, Saito T, Mitsuhashi T, Yamagata T, Takahashi N, Watanabe A, Shimada T, Suzuki M. Ehlers-Danlos type IV in pregnancy with a history of myocardial infarction. J Obstet Gynaecol Res. 35: 797-800, 2009.

Kawabata Y, Watanabe A, Yamaguchi S, Aoshima M, Shiraki A, Hatamochi A, Kawamura T, Uchiyama T, Watanabe A, Fukuda Y. Pleuropulmonary pathology of vascular

Ehlers-Danlos syndrome: Laceration, haematoma, and fibrous nodules. Histopathology (in press).

渡邊淳、島田隆、大木由加志： Ehlers-Danlos 症候群. 特集「小児疾患の遺伝子診断・治療の進歩」 小児科 50 1177-1181, 2009.

Hamanoue H, Rahayuningsih SE, Hirahara Y, Itoh J, Yokoyama U, Mizuguchi T, Saitsu H, Hirahara F, Matsumoto N. Gene screening of 104 patients with congenital heart disease revealed a fresh *GATA4* mutation in atrial septal defect. *Cardiol Young* 19: 482-485, 2009.

Shiihara T, Maruyama K-i, Yamada Y, Nishimura A, Matsumoto N, Kato M, Sakazume S. A case of Baraitser-Winter syndrome with unusual brain MRI findings of pachygyria, subcortical band heterotopia and periventricular heterotopias. *Brain Dev* (in press).

Kasuga K, Shimohata T, Nishimura A, Shiga A, Mizuguchi T, Tokunaga J, Ohno T, Miyashita A, Kuwano R, Matsumoto N, Onodera O, Nishizawa M, Ikeuchi T. Identification of Independent *APP* Locus Duplication in Japanese Patients with Early-Onset Alzheimer's Disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80: 1050-1052, 2009.

Yoshida K, Shimizu Y, Morita H, Okano T, Sakai H, Ohata T, Matsumoto N, Katsuya Nakamura K, Tazawa K-i, Ohara S, Tabata K, Inoue A, Sato S, Shimojima Y, Hattori T, Ushiyama M, Ikeda S-i. Severity and progression rate of cerebellar ataxia in 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia (16q-ADCA) in the endemic Nagano area of Japan. *Cerebellum* 8: 46-51, 2009.

Hamanoue H, Megarbane A, Tohma T, Nishimura A,

Mizuguchi T, Saitsu H, Sakai H, Miura S, Toda T, Miyake N, Niikawa N, Yoshiura K, Fumiki H, Matsumoto N. A locus for Ophthalmo-acromelic syndrome mapped to 10p11.23. *Am J Med Genet* 149A: 336-342, 2009.

Kuniba H, Yoshiura KI, Kondoh T, Ohashi H, Kurosawa K, Tonoki H, Nagai T, Okamoto N, Kato M, Fukushima Y, Kaname T, Naritomi K, Matsumoto T, Moriuchi H, Kishino T, Kinoshita A, Miyake N, Matsumoto N, Niikawa N. Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome. *J Hum Genet* 54: 304-309, 2009.

Saitsu H, Kurosawa K, Kawara H, Eguchi M, Mizuguchi T, Harada N, Kaname T, Kano H, Miyake N, Toda T, Matsumoto N. Characterization of the complex 7q21.3 rearrangement in a patient with bilateral split foot malformation and hearing loss. *Am J Med Genet* 149A: 1224-1230, 2009.

Matsumoto N. Gene analysis of Marfan syndrome. Proceedings of VIII annual international symposium on advances in understanding aortic diseases. 23-27, 2009.

2. 学会発表

古庄知己. 周産期医療における臨床遺伝の関わりー染色体異常症を中心にー. 2009 年度総合周産期母子医療センター研修会 (平成 21 年 6 月 26 日 於 沖縄県立中部病院) (招待講演)

古庄知己. 難聴の遺伝カウンセリング. 第 1 回難聴遺伝子の研究会 (平成 21 年 10 月 23 日 於 新横浜プリンスホテル, 横浜) (招待講演)

古庄知己．信大病院におけるマルファン症候群の遺伝子診療．第15回信州遺伝子診療研究会（平成22年1月22日 於 信州大学医学部附属病院，松本）（招待講演）

古庄知己．酵素補充療法が可能となったファブリー病の診療における遺伝子診療部の役割．長野県酵素補充療法研究会（第10回信州ハート倶楽部との合同開催）（平成21年5月30日，於 信州大学医学部附属病院新外来棟4階大会議室）（一般演題）

古庄知己，赤澤陽平，元木倫子，清水 隆，高橋 淳，相澤万象，伊澤淳，笠井宏樹，池田宇一，和田有子，天野 純，山下浩美，玉井真理子，和田敬仁，関島良樹，櫻井晃洋，河村理恵，涌井敬子，森崎裕子，森崎隆幸，福嶋義光．遺伝子検査を活用した Marfan 症候群のマネジメント．第33回日本遺伝カウンセリング学会学術集会（平成21年7月24日～26日，於 兵庫医科大学 平成記念会館）（一般演題）

古庄知己，福井大祐，越川めぐみ，田口智博，永井英雄，國井英治，倉谷徹，金田眞理，鳴海洋子，櫻井晃洋，関島良樹，河村理恵，涌井敬子，渡邊 淳，簀持 淳，福嶋義光．血管型エーラスダンロス症候群9症例の臨床的検討．第54回日本人類遺伝学会（平成21年9月24日～26日，於 高輪プリンスホテル，東京）（一般演題）

貞方里奈子，簀持淳他．新しい遺伝子変異を認めた Ehlers-Danlos 症候群の1例．第560回日本内科学会関東地方会

Banyar Than Naing，渡辺 淳，島田 隆．血管型 Ehlers-Danlos 症候群におけるゲノム DNA を用いた遺伝子変異同定システムの開発．日

本人類遺伝学会 第54回大会（平成21年9月24日，於 東京）

Watanabe, A.，Tang, B.N.，Shimada, T. A new categorized *COL3A1* mutation detected by genome scanning with vascular Ehlers-Danlos syndrome (vEDS). 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium (PPCTSS), 41st Annual Meeting of the Japanese Society of Connective Tissue Research (JSCTR), 56th Annual Meeting of the Japan Matrix Club (JMC) (シンポジウム) (June 4 (Thu), 2009 ; Shonan Village Center).

松本直通．年齢依存性てんかんの最近の話題．第44回遺伝医学研究会（東京女子医科大学）（平成21年6月5日，於 東京女子医科大学・早稲田大学連携生命科学研究教育施設）（招聘講演）

松本直通．疾患ゲノム解析の新戦略．第44回日本小児腎臓病学会学術集会（平成21年6月26日，於 一橋記念講堂・東京）（特別講演）

松本直通．疾患ゲノム解析の新戦略．第26回グライコノミクス研究会（平成21年7月30日，於 北海道大学先端生命科学研究院）（招聘講演）

松本直通．メンデル遺伝病のアプローチ．理研・医科研・先端研合同開催2009遺伝医学夏期集中セミナー（平成21年8月28日，於 東京大学医科学研究所）（講師）

松本直通．年齢依存性てんかん性脳症の最近の話題．第51回日本小児神経学会関東地方会（平成21年9月19日，於 横浜市開港記念会館）（特別講演）

松本直通．疾病の遺伝学研究．先端医科学研究に

関する倫理的・法的・社会的課題についての
調査研究（ゲノム・遺伝子研究の実施に関わ
る諸問題についての調査研究）の研究会（平
成 21 年 10 月 4 日，於 上智大学）（講師）

Matsumoto N. Evaluation of Affymetrix®
Cytogenetics Whole-Genome Array Using
Clinical Sample. Asin Cytogeentics Community
Workshop (by Affymetrix Inc.) (Oct 24, 2009 at
Honolulu, Hawaii, HI) (invited lecture)

Matsumoto N: *STXBPI* mutations in severe infantile
epilepsies with suppression-burst pattern. The
International Symposium in the 9th Annual
Meeting of the East Asian Union of Human
Genetic Society (Nov 19, 2009, Soel, Korea)
(oral presentation).

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願：2009-219304・松本直通／三宅紀子・エーラ
ス・ダンロス症候群患者又は保因者の検出方
法・横浜市立大学・平成 21 年 9 月 24 日

特願：渡邊淳・島田隆・家族性大動脈瘤の遺伝子
変異スクリーニング方法（申請中）

実用新案登録：なし

Ⅲ. 分担研究報告

平成21年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

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
分担研究課題：血管型エーラスダンロス症候群の実態把握に関する研究

研究分担者 福嶋義光 信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座
信州大学医学部附属病院遺伝子診療部

研究要旨：エーラスダンロス症候群（Ehlers-Danlos Syndrome; EDS）は、皮膚、関節、血管など結合組織の脆弱性に基づく遺伝性疾患である。これまでに全国調査が行われたことはなく、本邦におけるEDSの実態（患者数、診療状況）は不明であり、病型に合った適切な診療指針も確立されていない。特に、若年性動脈破裂・解離・瘤、腸破裂、妊娠中の子宮破裂などの生命に関わる深刻な症状を呈する血管型EDSでは、そのスクリーニング方法、予防法、治療法、遺伝カウンセリングのあり方が確立していないことが、大きな診療上の問題となっている。本研究の目的は、血管型EDSにおける本邦初の診療に関する実態調査を行うことである。現在日本において本症の確定診断のための生化学分析・遺伝子解析を行っている3施設がこれまで確定診断した全症例を収集し、診療実態を分析した。36家系41症例が確認され、男性23例、女性18例、診断時年齢は14-54歳であった。動脈合併症（瘤、解離、破裂）24例、腸管破裂7例、肺合併症（喀血、気胸、出血）20例であった。変異は、ミスセンス変異18例、スプライス変異15例であった。3家系においてタンパク量の減少が認められたが、変異は見出されなかった。今後、さらに症例を増やして検討を進める必要がある。

A. 研究目的

エーラスダンロス症候群（Ehlers-Danlos Syndrome; EDS）は、皮膚、関節、血管など結合組織の脆弱性に基づく遺伝性疾患である。6病型に分類されており、推定頻度は約1/5000人とされている。特定疾患調査研究指定はなく、全国調査が行われたこともないため、本邦におけるEDSの実態（患者数、診療状況）は不明である。そのため、診療現場での認知度は低く、病型に合った適切な診療指針も確立されていない。特に、若年性動脈破裂・解離・瘤、腸破裂、妊娠中の子宮破裂などの生命に関わる深刻な症状を呈する血管型EDSでは、そのスクリーニング方法、予防法、治療法、遺伝カウンセリングのあり方が確立していないことが、大きな診療上の問題である。本研究の目的は、血管型EDSにおける本邦初の診療に関する実態調査を行うことである。

B. 研究方法

現在日本において本症の確定診断のための生化学分析・遺伝子解析を行っている施設は、

獨協医科大学皮膚科（旗持淳教授、研究分担者）、日本医科大学第二生化学（渡邊淳講師、研究分担者）、国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部（森崎裕子室長、研究協力者）のみである。本年度の研究班において、これら3施設がこれまで確定診断した全症例の抽出を行い、信州大学医学部附属病院遺伝子診療部（古庄知己、研究代表者；福嶋義光、研究分担者）において分析した。

C. 研究結果

36家系41症例が確認され、男性23例、女性18例、診断時年齢は14-54歳であった。動脈合併症（瘤、解離、破裂）24例、腸管破裂7例、肺合併症（喀血、気胸、出血）20例であった。変異は、ミスセンス変異18例、スプライス変異15例であった。3家系においてタンパク量の減少が認められたが、変異は見出されなかった。

D. 考察

なし

診断されていない症例も少なくないと推定され、症例収集上のバイアスがある可能性はあるが、現時点での本邦における血管型 EDS 患者の概要を把握することができた。従来の報告に比べて、肺合併症の頻度が高い傾向にあった。タンパク量の減少が見られるものの遺伝子変異を同定できない症例においては、培養皮膚線維芽細胞由来の mRNA を用いた遺伝子解析では RNA decay により変異を検出できないハプロ不全例も含まれている可能性がある。

E. 結論

現時点での本邦における血管型 EDS 患者の概要を把握した。肺合併症の頻度は動脈合併症に次いで多かった。今後、さらに症例を増やして検討を進める必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

福嶋義光：遺伝子診断と生命倫理．小児科
50:813-817, 2009

福嶋義光：遺伝と疾病．内科学書（改訂第7版）
Vol 1．内科学総論（編集：伴信太郎）.
pp. 15-20, 2009

福嶋義光：遺伝子診療と倫理．糖尿病学の進歩
2009（日本糖尿病学会編）．診断と治療社
pp. 86-89, 2009

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

平成21年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

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
分担研究課題：血管型エーラスダンロス症候群の遺伝子解析に関する研究

分担研究者 旗持 淳 獨協医科大学皮膚科

研究要旨：コラーゲン生化学分析および遺伝子解析に基づき、血管型を中心としたエーラスダンロス症候群の確定診断を行った。これまでに血管型20例を遺伝子診断しえた。欧米に比べてスプライス変異が多い傾向にあった（11/20）。症例数が少ないためバイアスがかかっている可能性があり、より多数例を検討する必要がある。また、重症合併症の頻度が低い傾向にあったが、診断年齢が低いためである可能性がある。今後合併症の出現が増加することが懸念され、患者・主治医への指導が重要と考えられた。

A. 研究目的

獨協医科大学皮膚科は、コラーゲン生化学分析および遺伝子解析により本邦において最も多数のエーラスダンロス症候群（EDS）患者の診断に携わっている。本研究の目的は、血管型を中心に、当科において診断を行った症例の臨床像と遺伝子型を検討することである。

B. 研究方法

本学倫理委員会の承認（No. 1818）のもと、患者皮膚を生検し、一部は組織学的診断法に用い、残りを皮膚線維芽細胞の培養に用いる。線維芽細胞をトリチウム放射性プロリンと共に培養し、産生されたコラーゲンを回収して電気泳動で分離し、スィルムに感光して産生されたI型、III型コラーゲンを解析し、血管型、多発関節弛緩型。皮膚脆弱型の診断を行う。尿中のlysylpyridinoline/hydroxylysylpyridinoline比にて後側彎型を診断する。また血管型はCOL3A1の遺伝子検索も施行し解析する。

C. 研究結果

これまでに多発関節弛緩型1例、血管型20例、古典型3例の確定診断を下した。特に血管型ではIII型コラーゲン遺伝子（COL3A1）の解析でグリシンの置換変異とスプライスサイト変異が2:1で見られるとのこれまでの欧米の結果に反し

て前者が半分以下の9例、後者が11例であった。また、重症合併症の頻度が低い傾向にあった。

D. 考察

本邦における血管型EDSの遺伝子変異には素スプライス変異が欧米に比べて多い可能性が示唆されたが、症例数が少ないためバイアスがかかっている可能性がある。重症合併症の頻度が低い傾向に関しては、診断年齢が低いためである可能性があり、今後合併症の出現が増加することが懸念される。

E. 結論

20例の血管型EDSを遺伝子診断しえた。欧米に比べてスプライス変異が多い傾向にあった（11/20）。また、重症合併症の頻度が低かった。今後、合併症の出現に注意して生活するよう患者・主治医への指導が重要と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

佐畑貴之, 津田聡, 山岸俊夫, 阿保昌樹, 実方一典, 青木洋子, 古庄知己, 篠持淳. 習慣性の腸管破裂にて Ehlers-Danlos 症候群と判明した 1 例. 日本内科学会雑誌 98: 852-824, 2009.

特許取得、実用新案登録：なし

Ishiguro T, Takayanagi N, Kawabata Y, Matsushima H, Yoshii Y, Harasawa K, Yamaguchi S, Yoneda K, Miyahara Y, Kagiya N, Tokunaga D, Aoki F, Saito H, Kurashima K, Ubukata M, Yanagisawa T, Sugita Y, Okita H, Hatamochi A. Ehlers-Danlos Syndrome with recurrent spontaneous pneumothoraces and cavitary lesion on chest X-ray as the initial complications. Intern Med 48: 717-722, 2009.

Okita H, Ikeda Y, Mitsuhashi Y, Namikawa H, Kitamura Y, Hamasaki Y, Yamazaki S, Hatamochi A. A novel point mutation at donor splice-site in intron 42 of type III collagen gene resulting in the inclusion of 30 nucleotides into the mature mRNA in a case of vascular type of Ehlers-Danlos syndrome. Arch Dermatol Res [Epub ahead of print]

松下文, 高柳昇, 石黒卓, 原澤慶次, 土屋典子, 米田絃一郎, 宮原庸介, 山口昭三郎, 矢野量三, 徳永大道, 斉藤大雄, 倉島一喜, 生方幹生, 柳沢勉, 杉田裕, 河端美則, 沖田博, 篠持淳. 肺裂傷に伴う肺気腫が診断契機となった Ehlers-Danlos 症候群の 1 例. 日本呼吸器学会雑誌 47 : 704-710, 2010.

2. 学会発表

貞方里奈子, 篠持淳他. 新しい遺伝子変異を認めた Ehlers-Danlos 症候群の 1 例. 第 560 回日本内科学会関東地方会

H. 知的財産権の出願・登録状況

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
分担研究課題： 血管型エーラスダンロス症候群の診断法と遺伝子治療法の開発に関する研究

研究分担者 渡邊 淳 日本医科大学附属病院遺伝診療科、同生化学・分子生物学

研究要旨：血管型エーラスダンロス症候群（EDS）は、血管破裂、消化管破裂、子宮破裂を合併し、ときに突然死を呈する常染色体優性遺伝病である。本疾患は、3 型プロコラーゲン（COL3A1）のヘテロ遺伝子変異により発症し、2/3 はトリプルヘリックス領域にみられる 3 アミノ酸ごとに繰り返すグリシンが置換するミスセンス変異、残りはスプライシング異常を来す。これまでの多くの COL3A1 遺伝子解析は培養皮膚線維芽細胞から抽出した mRNA を用いて行われた。近年、遺伝子変異の検出法として PCR 法と DNA インターカレート蛍光色素を利用した 2 本鎖 DNA の融解曲線パターンの違いで遺伝子変異の有無をスクリーニングする高解像度融解曲線分析法が注目されている。今回、本法を用い vEDS 患者末梢血由来ゲノム DNA にによる COL3A1 遺伝子変異スクリーニングについて検討した。結果、既知の COL3A1 遺伝子のグリシン変異 3 種類とスプライシング変異 3 種類では同定可能であった。さらに、臨床的に血管型 EDS を疑われた患者に対して、COL3A1 の Exon 42 において新しいナンセンス変異を同定した。この変異は従来の mRNA からの遺伝子変異解析手法では変異を同定できなかった。本法は、血管型 EDS の遺伝子診断において、末梢血由来 DNA を用いるという点で非侵襲的であるのみならず、培養皮膚線維芽細胞由来 mRNA では検出しえないナンセンス変異をも同定できる有望な解析法と考えられた。

A. 研究目的

血管型エーラスダンロス症候群（EDS）は、血管破裂、消化管破裂、子宮破裂を合併し、ときに突然死を呈する常染色体優性遺伝病である。本疾患は、3 型プロコラーゲン（COL3A1）のヘテロ遺伝子変異により発症し、2/3 はトリプルヘリックス領域にみられる 3 アミノ酸ごとに繰り返すグリシンが置換するミスセンス変異、残りはスプライシング異常を来す。これまでの多くの COL3A1 遺伝子解析は培養皮膚線維芽細胞から抽出した mRNA を用いて行われた。本研究は、末梢血を用いた新しい遺伝子診断法の開発を目的とする。

B. 研究方法

近年、遺伝子変異の検出法として PCR 法と DNA インターカレート蛍光色素を利用した 2 本鎖 DNA の融解曲線パターンの違いで遺伝子変異の有無をスクリーニングする高解像度融解曲線分析法（high-resolution melt curve analysis ; hrMCA）が注目されている。今回、hrMCA 法を用い vEDS 患者末梢血由来ゲノム DNA にによる COL3A1 遺

伝子変異スクリーニングについて検討した。COL3A1 遺伝子のトリプルヘリックス領域の 44 エクソン各々に対し両端のイントロン領域を含む PCR プライマーを設計した。本手法を用いて既知の COL3A1 変異を有する血管型 EDS 患者ならびに臨床的に血管型 EDS を疑われた患者のゲノム DNA を解析した。DNA インターカレート蛍光色素(LCGreen)を加えた単一 PCR 産物の hrMCA は Light Scanner (Idaho technology 社)を使用した。

C. 研究結果

高解像度融解曲線分析法により既知の COL3A1 遺伝子のグリシン変異 3 種類とスプライシング変異 3 種類では同定可能であった。さらに、臨床的に血管型 EDS を疑われた患者に対して、COL3A1 の Exon 42 において 831 番目のグルタミン が終止コドンに変異した新しいナンセンス変異を同定した。この変異は従来の mRNA からの遺伝子変異解析手法では変異を同定できなかった。

D. 考察

従来の培養皮膚線維芽細胞由来 mRNA を用いた遺伝子解析において同定しえなかった Exon 42 におけるナンセンス変異を高解像度融解曲線分析法により同定しえた理由は、mRNA decay を生じていたためと考えられた。本変異によって変異タンパク質は出現しないことから、ハプロ不全により発症すると推測される。多くの血管型 EDS 患者で想定されている優性阻害効果とは異なるため、治療方策も異なると予測される。

E. 結論

高解像度融解曲線分析法は、血管型 EDS の遺伝子診断において、末梢血由来 DNA を用いるという点で非侵襲的であるのみならず、培養皮膚線維芽細胞由来 mRNA では検出しえないナンセンス変異をも同定できる有望な解析法と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohkuchi A, Matsubara S, Takahashi K, Inoue S, Saito T, Mitsuhashi T, Yamagata T, Takahashi N, Watanabe A, Shimada T, Suzuki M. Ehlers-Danlos type IV in pregnancy with a history of myocardial infarction. J Obstet Gynaecol Res. 35:797-800, 2009.

Kawabata Y, Watanabe A, Yamaguchi S, Aoshima M, Shiraki A, Hatamochi A, Kawamura T, Uchiyama T, Watanabe A, Fukuda Y. Pleuropulmonary pathology of vascular Ehlers-Danlos syndrome: Laceration, haematoma, and fibrous nodules. Histopathology (in press).

渡邊淳、島田隆、大木由加志：Ehlers-Danlos 症候群. 特集「小児疾患の遺伝子診断・治療の進歩」 小児科 50 1177-1181, 2009.

2. 学会発表

Banyar Than Naing, 渡辺 淳、島田 隆. 血管型 Ehlers-Danlos 症候群におけるゲノム DNA を用いた遺伝子変異同定システムの開発. 日本人類遺伝学会 第 54 回大会 (平成 21 年 9 月 24 日, 於 東京)

Watanabe A, Tang B.N, Shimada T. A new categorized *COL3A1* mutation detected by genome scanning with vascular Ehlers-Danlos syndrome (vEDS). 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium (PPCTSS), 41st Annual Meeting of the Japanese Society of Connective Tissue Research (JSCTR), 56th Annual Meeting of the Japan Matrix Club (JMC) (シンポジウム) (June 4 (Thu), 2009 ; Shonan Village Center).

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願：渡邊淳、島田隆・家族性大動脈瘤の遺伝子変異スクリーニング方法 (申請中)

実用新案登録：なし