

平成 24-25 年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
総合研究報告書

マルファン症候群類縁疾患の患者レジストリー

研究分担者 森崎裕子
国立循環器病研究センター研究所 分子生物学部室長

研究要旨

マルファン症候群は、*FBNI* 遺伝子の変異により結合組織の主要成分のひとつであるフィブリリンの質的あるいは量的異常をきたし、クモ状指・側弯・胸郭異常・扁平足などの骨格症状、水晶体偏位・近視・乱視などの眼症状、大動脈瘤/解離・僧帽弁異常などの心血管症状など全身性に多彩な表現型を呈する遺伝性疾患である。また2004年、従来マルファン症候群2型と呼ばれていた一群の疾患群が、TGF- β 受容体遺伝子の機能異常により発症することが示され、2005年新たにロイス・ディーツ症候群と命名された。さらに、近年、その他のTGF- β シグナル伝達系の遺伝子の機能異常により骨格系・心血管系にマルファン症候群類似の所見を呈するものがあることが明らかにされている。

当研究室は、2002年より診断を目的としてマルファン症候群の遺伝子解析を施行しているが、今年度より、「先天性異常の疾患群の診療指針と治療法開発をめざした情報・検体共有のフレームワークの確立」研究の一環として、マルファン症候群類縁疾患の患者レジストリーを作ることを目指し、国内関連医療機関より依頼された患者の遺伝子診断を行うとともに、国立循環器病研究センター受診患者については、同院結合織病外来にて患者の診断及び治療・管理をおこなっている。2013年12月末の時点において、当研究室で遺伝子解析により遺伝子変異が同定されているのは、*FBNI* 遺伝子変異385例、*TGFBR1* 遺伝子変異34例、*TGFBR2* 遺伝子変異33例、*SMAD3* 遺伝子変異16例、*TGFBR2* 遺伝子変異2例、*COL3A1* 遺伝子変異32例、*SKI* 遺伝子変異2例、*CHST* 遺伝子変異9例、*FLNA* 遺伝子変異9例である。うち24-25年度の2年間で新たに138例について遺伝子変異を同定した。

また、2010年7月に創設された当院結合織病外来では、遺伝子診断により確定したマルファン症候群（*FBNI* 遺伝子変異）167名、ロイス・ディーツ症候群（*TGFBR1*, *TGFBR2*, *SMAD3*, *TGFBR2* 遺伝子変異）42名をはじめとして、関連疾患の疑われる患者511名について、定期検査・投薬治療・歯周病チェック・遺伝カウンセリング等の遺伝診療を進めている。平成24-25年度の2年間では、マルファン症候群類縁疾患を疑われて受診した新規患者283名のうち83名が遺伝学的にマルファン症候群あるいはロイス・ディーツ症候群と確定診断され、うち77例については遺伝子変異も確定した。さらに、遺伝子検査により診断確定した当該疾患患者については、手術時の血管組織検体の保存、および将来に向けて患者由来線維芽細胞を作成し凍結保存を行った。

その他、「先天性異常の疾患群の診療指針と治療法開発をめざした情報・検体共有のフレームワークの確立」研究の一環として、「マルファン症候群」「ロイス・ディーツ症候群」の小児期における疾患特異的成長手帳を作成した。

A . 研究目的

マルファン症候群は、*FBNI* 遺伝子の変異により結合組織の主要成分のひとつであるフィブリリンの質的あるいは量的異常をきたし、クモ状指・側弯・胸郭異常・扁平足などの骨格症状、水晶体偏位・近視・乱視などの眼症状、大動脈瘤/解離・僧帽弁異常などの心血管症状など全身性に多彩な表現型を呈する遺伝性疾患である。また2004年、従来マルファン症候群2型と呼ばれていた一群の疾患群が、TGF- β 受容体遺伝子の機能異常により発症することが示され、翌年新たにロイス・ディーツ症候群と命名され、さらに、近年、その他の TGF- β シグナル伝達系の機能異常により骨格系・心血管系にマルファン症候群類似の所見を呈するものがあることが明らかにされてき

た。こうした流れの中で、マルファン症候群の診断基準も2010年に改訂されている。その中で、診断においても、遺伝子診断に重きをおかれ、新たな診断基準では、大動脈基部拡大と *FBNI* 遺伝子の病的変異の2者のみでマルファン症候群と診断されうることとなった。

国立循環器病研究センターでは、1998年より、研究を目的として、2002年からは診断を目的として、診療の中で遺伝子解析を活用し、患者や家族の診断に役立ててきたが、今回、本研究において、マルファン症候群類縁疾患の患者レジストリーを作ることとなり、今年度は、さらに遺伝子解析を進め、遺伝子診断により診断の確定した患者の収集を行うとともに、将来に向けて、組織検体および患者由来線維芽細胞のストックを行った。

また、「先天性異常の疾患群の診療指針と治療法開発をめざした情報・検体共有のフレームワークの確立」研究の一環として「マルファン症候群」「ロイス・ディーツ症候群」の小児期における疾患特異的成長手帳を作成する。

B．研究方法

1) 遺伝子解析：当院結合織病外来を受診した患者、および他院より解析を依頼された患者について、遺伝子解析の同意を得た上で血液を採取し、末梢血リンパ球より抽出したゲノム DNA を用いて遺伝子解析を行った。また、手術例については、組織を用いた解析も併用した。

解析は、末梢血リンパ球より抽出したゲノム DNA を用い、*FBNI*、*TGFBR1*、*TGFBR2* の各遺伝子については全翻訳領域のエクソン領域、*FBN2* 遺伝子については第 22 - 36 エクソン領域について PCR 法で増幅したのち直接シーケンス法にて塩基配列を決定し遺伝子変異の解析を行った。さらに、当院にて手術を施行された患者については、術中摘出組織より抽出した RNA およびこれより作成した初代血管組織培養細胞から抽出した RNA を用いた RT-PCR 解析も併用した。また、診断のために皮膚生検を行った患者についても、同様に RT-PCR 解析を行った。上記の方法にて遺伝子変異が同定されなかった症例については、臨床症状に応じて、*COL3A1*、*ACTA2*、*TGFBR2*、*SMAD3*、*SKI* 各遺伝子について解析を行った。また、一部の症例についてはエクソーム解析も併用した。

(倫理面への配慮)

本研究における患者検体を用いた遺伝子解析については、既に国立循環器病センター倫理委員会の承認を得ており、施設および国などの指針を遵守し、書面によりインフォームド・コンセントを受けて研究を実施するなど、倫理面への配慮を十分に行った。他院から遺伝子解析のみ依頼された患者については、依頼先の医療機関における倫理委員会の承認を得てから解析に臨み、また、臨床情報については、共通の患者情報シートにより情報収集をおこなった。なお、遺伝子解析はすべて連結可能匿名化の上で行われた。

2) 遺伝診療：当院結合織病外来では、マルファン症候群類縁の結合織異常が疑われた患者について、臨床的所見、家族歴、遺伝子検査を含めた総合的な診断システムのもとに確定診断を行い、定期検査・投薬治療・遺伝カウンセリングを含めた全身管理を行っている。診断においては、成人は身体所見・家族歴および遺伝子診断を基本とし、小児は、家族歴と身体所見による診断を基本とし、必要に応じて遺伝子検査を併用しながら、改訂ゲント基準にもとづき確定診断を行った。

3) 患者組織由来細胞の収集

国立循環器病研究センター病院血管外科にて、マルファン症候群および類縁のロイス・ディーツ症候群の診断で大動脈人工血管置換手術を施行された患者のうち、今年度は新たに31症例について、術中摘出組織を中膜および外膜に鈍的に分離し、それぞれ、DMEM (10%FBS加)、5%CO₂、37 °C の条件下で組織培養を行い、そこより単離された初代血管組織培養細胞(平滑筋細胞、血管線維芽細胞)について、P1 ~ P2の継代条件のものをTCプロテクターに懸濁して凍結し、-133 °C の条件下で凍結保存を行った。

4) 疾患特異的成長手帳の作成

プライマリケア医師・患者家族に対して、年齢に応じた疾患の手引きを提供する目的で「疾患特異的成長手帳」を作成する。具体的には、「Preventive Health Care for Children with Genetic Conditions」を参照し、本邦の実情に合わせて、各年齢ごとのチェックポイントをまとめる。

C．研究結果

1) 遺伝子解析

2012年4月より2013年12月に当院結合織病外来を受診し新たに遺伝子解析の同意を得た患者182例、および他院より解析を依頼された新規患者173例、計355例における解析では、*FBNI* 遺伝子変異を97例、*TGFBR1* 遺伝子変異を13例、*TGFBR2* 遺伝子変異を4例、*SMAD3* 遺伝子変異を4例で同定しており、計118例で、原因遺伝子が同定され、マルファン症候群あるいはロイス・ディーツ症候群と確定診断された。また、その他11例において、その他の関連遺伝子の変異を同定した。また、マルファン症候群あるいはロイス・ディーツ症候群として診断依頼された患者のうち2例において、類縁の Shprnzen-Goldberg 症候群の原因遺伝子として昨年度新規に報告された *SKI* 遺伝子に病原性の明らかなミスセンス変異が同定された。これらの2例は、ともに臨床的にも Shprnzen-Goldberg 症候群の所見に合致しており、遺伝子診断がより適切であることが示された。

これまでの研究の成果も加えると、当院における遺伝子解析により、2013年12月末の時点において、*FBNI* 遺伝子変異385例、*TGFBR1* 遺伝子変異34例、*TGFBR2* 遺伝子変異33例、*SMAD3* 遺伝子変異16例、*TGFBR2* 遺伝子変異2例、*COL3A1* 遺伝子変異32例、*SKI* 遺伝子変異2例、*CHST* 遺伝子変異9例が同定されている。

その他、上行大動脈拡張に関節過可動性を合併し、マルファン症候群あるいはエーラス・ダンロス症候群として紹介された患者7例において、エクソーム解析により *FLNA* 遺伝子変異が同定され

た。*FLNA* 遺伝子は異所性灰白質の原因遺伝子として知られており、一部の症例で、上行大動脈拡張、エーラスダンロス症候群様の皮膚関節所見を認めることが知られており、脳 MRI 検査の結果 7 例のうち 5 例において異所性灰白質が確認された。一部の *FLNA* 遺伝子異常に上行大動脈瘤や心臓弁異常の合併を認めることは知られていたが、今回の解析では全例で心血管系の異常を認めており、異所性灰白質を認めた場合は、心血管系の精査が必要であると考えられた。

2) 遺伝診療

国立循環器病研究センター結合織病外来に登録されている患者のうち、改訂ゲント基準によりマルファン症候群と診断された患者は 190 名で、うち 160 名は遺伝子診断により *FBNI* 遺伝子変異を同定されており、さらに 7 例については、*FBNI* 遺伝子変異陽性の家族歴をもとに診断されている。その他、2 名については、水晶体偏位のみで心血管系・骨格系には陽性所見を認めず、Ectopia Lentis 症候群としてフォローされている。

一方、マルファン症候群では、当院受診例では、8 例を除く 182 例(96%)で有意な大動脈基部拡張を認めたが、他院からの紹介例では、大動脈基部拡張を認めないとされた症例が、成人例(16 才以上)71 例中 11 例(15%)あった。この傾向は特に小児においてさらに顕著であり、当院結合織病外来受診例では、31 例中 28 例(90%)で有意な大動脈基部拡張を認めているのに対し、他院からの紹介例では、拡張を認めたのは 60 例中 40 例(67%)に過ぎない。これは、当院が循環器病専門病院であり、受診患者の傾向にある程度の偏りがあることは否定できないが、紹介患者を例にとっても、大動脈基部拡張の評価が十分になされていない例も少なからずあることは経験しており、循環器科専門医による評価の必要性が痛感された。

一方、*SMAD3* 遺伝子、*TGF β 2* 遺伝子変異を含む広義のロイス・ディーツ症候群と診断された患者は 40 名で、全例で大動脈瘤/解離を認めるが、マルファン症候群と異なり、骨格系所見は顕著でない例、大動脈基部ではなく上行～弓部大動脈に拡張を認める例など、臨床所見は多岐にわたり、診断には遺伝子検査がより有効であった。

また、当院結合織病外来受診のマルファン症候群小児(16 才以下)37 例と、ロイス・ディーツ症候群小児 27 例において、大動脈拡張傾向を比較したところ、小児における大動脈基部径の Z 値(体表面積より算出した平均値からのずれ)は、マルファン症候群で 4.1、ロイス・ディーツ症候群は 8.8 であり、ロイス・ディーツ症候群は小児期より強い拡張傾向を認めることが示された。

3) 患者組織由来細胞の収集

24-25 年度は新たに 31 症例について細胞を保存した。

4) 疾患特異的成長手帳の作成

「マルファン症候群」「ロイス・ディーツ症候群」の小児期における疾患特異的成長手帳を作成した(資料 2:診療の手引き)。

D. 考察

マルファン症候群は、*FBNI* 遺伝子の変異により結合組織の主要成分のひとつであるフィブリリンの質的あるいは量的異常をきたし、クモ状指・側弯・胸郭異常・扁平足などの骨格症状、水晶体偏位・近視・乱視などの眼症状、大動脈瘤/解離・僧帽弁異常などの心血管症状など全身性に多彩な表現型を呈する遺伝性疾患である。また 2004 年、従来マルファン症候群 2 型と呼ばれていた一群の疾患群が、TGF- β 受容体遺伝子の機能異常により発症することが示され、2005 年新たにロイス・ディーツ症候群と命名された。さらに、近年、その他の TGF- β シグナル伝達系の機能異常により骨格系・心血管系にマルファン症候群類似の所見を呈するものがあることが明らかにされ、広義のロイス・ディーツ症候群とする動きもでてきた。こうした流れの中で、マルファン症候群の診断基準も 2010 年に改訂されている。その中で、診断においても、遺伝子診断に重きをおかれ、新たな診断基準では、大動脈基部拡大と *FBNI* 遺伝子の病的変異の 2 者のみでマルファン症候群と診断されうることとなった。

一方、マルファン症候群の原因遺伝子である *FBNI* 遺伝子は、遺伝子全長 230kb、coding 領域だけでも 8.6 kb、65 エクソンからなる巨大遺伝子であり、遺伝子解析自体容易でないことから、従来、本邦においては、当センターや一部の研究組織以外では診断を目的とした遺伝子解析は積極的にはなされてこなかった、という事情がある。国立循環器病研究センターでは、1998 年より、研究を目的として、2002 年からは診断を目的として、診療の中で遺伝子解析を活用し、患者や家族の診断に役立ててきた。2013 年 12 月末の時点においては、関連するロイス・ディーツ症候群などのマルファン症候群類縁疾患の患者 481 名において遺伝子変異を同定している。病的 *FBNI* 遺伝子変異を有するものは、ほぼ全例で大動脈病変を呈しているが、臨床所見から、3 例は、水晶体偏位のみで骨格系症状や心血管系病変に乏しい Ectopia Lentis 症候群、1 例は、異なる骨格症状を呈する Geleophysic Dysplasia と診断された。

2010 年に開設された国立循環器病研究センター結合織病外来に新規登録されている患者のうち、改訂ゲント基準によりマルファン症候群と診

断された患者は 190 名で、うち 160 名は遺伝子診断により *FBNI* 遺伝子変異を同定されており、さらに 7 例については、*FBNI* 遺伝子変異陽性の家族歴を考慮したうえで新基準に基づいて診断されている。

マルファン症候群では、当院受診例では、ほとんどの症例で有意な大動脈基部拡張を認めたが、他院からの紹介例では、認めないとされた症例も多かった。また、この傾向は特に小児においてさらに顕著であった。これは、当院が循環器病専門病院であり、受診患者の傾向にある程度の偏りがあることは否定できないが、紹介患者を例にとっても、大動脈基部拡張の評価が十分になされていない例も少なからずあることは経験しており、循環器科専門医による評価の必要性が痛感された。

一方、*SMAD3* 遺伝子、*TGFB2* 遺伝子変異を含む広義のロイス・ディーツ症候群と診断された患者は 40 名で、全例で大動脈瘤/解離を認めるが、マルファン症候群と異なり、骨格系所見は顕著でない例、大動脈基部ではなく上行～弓部大動脈に拡張を認める例など、臨床所見は多岐にわたった。以上より、遺伝子診断の併用は、より正確な診断に有効であると考えられた。

また、小児例において、大動脈拡張傾向をマルファン症候群とロイス・ディーツ症候群と比較したところ、ロイス・ディーツ症候群は小児期より強い拡張傾向を認めることが示され、ロイス・ディーツ症候群では、小児期より積極的な医療介入の必要性があることが示された。

E . 結論

マルファン症候群類縁疾患の患者レジストリーの作成を目的として、今年度も昨年度に引き続き、日本全国から依頼された検体を含めて遺伝子解析を進め、遺伝子診断により診断の確定した患者の収集を行うとともに、結合織病外来にてより詳細な患者情報を収集し、さらに将来に向けて、組織検体および患者由来線維芽細胞のストックを行った。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morisaki H, Yamanaka I, Iwai N, Miyamoto Y, Kokubo Y, Okamura T, Okayama A, and Morisaki T, *CDH13* gene coding T-cadherin influences variations in plasma adiponectin levels in the Japanese population. *Hum Mutat.* **33**(2): p. 402-410.(2012).
- 2) Kawazu Y, Inamura N, Kayatani F, Okamoto N, and Morisaki H, Prenatal complex congenital heart disease with Loey's-Dietz syndrome. *Cardiol Young.* **22**(1): p. 116-119.(2012).
- 3) Iba Y, Minatoya K, Matsuda H, Sasaki H, Tanaka H, Morisaki H, Morisaki T, Kobayashi J, and Ogino H, Surgical experience with aggressive aortic pathologic process in Loey's-Dietz syndrome. *Ann Thorac Surg.* **94**(5): p. 1413-1417.(2012).
- 4) Toyama K, Morisaki H, Cheng J, Kawachi H, Shimizu F, Ikawa M, Okabe M, and Morisaki T, Proteinuria in AMPD2-deficient mice. *Genes Cells.* **17**(1): p. 28-38.(2012).
- 5) Cheng J, Morisaki H, Toyama K, Ikawa M, Okabe M, and Morisaki T, AMPD3-deficient mice exhibit increased erythrocyte ATP levels but anemia not improved due to PK deficiency. *Genes Cells.* **17**(11): p. 913-922.(2012).
- 6) 森崎裕子, 森崎隆幸, 「大動脈疾患による遺伝子異常」Annual Review 循環器 2012, 山口徹 他編, 中外医学社. p. 240 - 246. (2012)
- 7) 森崎裕子, 平田恭信, 森崎隆幸, 第 4 回遺伝カウンセリングアドバンスセミナー マルファン症候群. 日本遺伝カウンセリング学会誌. **33**(4): p. 209-212.(2012).
- 8) 森崎裕子, 吉田晶子, 森崎隆幸, 稀少遺伝性循環器疾患に対する包括的医療体制 - 「結合織病外来」・臨床遺伝専門医および認定遺伝カウンセラーの役割. 日本遺伝カウンセリング学会誌. **33**(1): p. 77-81.(2012).
- 9) 森崎裕子, エーラス・ダンロス症候群. 臨床雑誌内科. **109**(6): p. 1049-1051.(2012).
- 10) 森崎裕子, 「ロイス・ディーツ症候群」先天代謝異常症候群, 遠藤文夫編 日本臨床社 p. 731-735. (2012)
- 11) 森崎裕子, 森崎隆幸, 特発性/遺伝性肺動脈性高血圧症の遺伝子解析. *Cardiac Practice.* **24**(1): p. 31-36.(2013).
- 12) Takahashi Y, Fujii K, Yoshida A, Morisaki H, Kohno Y, and Morisaki T, Artery tortuosity syndrome exhibiting early-onset emphysema with novel compound heterozygous *SLC2A10* mutations. *Am J Med Genet A.* **12**(10): p. 35776.(2013).
- 13) JCS Joint Working Group, Guidelines for Diagnosis and Treatment of Aortic Aneurysm and Aortic Dissection (JCS 2011). *Circ J.* **77**(3): p. 789-828.(2013).
- 14) Komiyama M, Ishiguro T, Yamada O, Morisaki H, Morisaki T: Hereditary hemorrhagic telangiectasia in Japanese patients. *J Hum Genet* (in press)
- 15) Kono AK, Higashi M, Morisaki H, Morisaki T, Naito H, Sugimura K: Prevalence of dural ectasia in loey's-dietz syndrome: comparison with Marfan syndrome and normal controls. *PLoS One* 8:e75264, 2013.
- 16) Hayashi S, Utani A, Iwanaga A, Yagi Y, Morisaki H, Morisaki T, Hamasaki Y, Hatamochi A: Co-existence of mutations in the *FBN1* gene and the *ABCC6* gene in a

patient with Marfan syndrome associated with pseudoxanthoma elasticum. *J Dermatol Sci* 72:325-327, 2013.

- 17) Akizu N, Cantagrel V, Schroth J, Cai N, Vaux V, McCloskey D, Naviaux RK, Van Vleet J, Fenstermaker AG, Silhavy JL, Scheliga JS, Toyama K, Morisaki H, Sonmez FM, Celep F, Oraby A, Zaki MS, Al-Baradie R, Faqeih EA, Saleh MAM, Spencer E, Rosti RO, Scott E, Nickerson E, Gabriel S, Morisaki T, Holmes EW, Gleeson JG: AMPD2 regulates GTP synthesis and is mutated in a potentially treatable neurodegenerative brainstem disorder. *Cell* 154:505-517, 2013.
- 18) Li P, Ogino K, Hoshikawa Y, Morisaki H, Toyama K, Morisaki T, Morikawa K, Ninomiya H, Yoshida A, Hashimoto K, Shirayoshi Y, Hisatome I: AMP deaminase 3 plays a critical role in remote reperfusion lung injury. *Biochem Biophys Res Commun* 434:131-136, 2013.
- 19) Katsuragi S, Neki N, Yoshimatsu J, Ikeda T, Morisaki H, Morisaki T: Acute aortic dissection (Stanford type B) during pregnancy. *J Perinatol* 33:484-485, 2013.
- 20) Takahashi Y, Fujii K, Yoshida A, Morisaki H, Kohno Y, Morisaki T: Artery tortuosity syndrome exhibiting early-onset emphysema with novel compound heterozygous *SLC2A10* mutations. *Am J Med Genet A* 161:856-859, 2013.
- 21) 森崎裕子:「大動脈瘤と遺伝子。」*Heart View* 17, 60-65 (2013).
- 22) 森崎裕子、森崎隆幸:「遺伝性大動脈疾患の診断」大動脈外科の要点と盲点 (高本眞一編) p.53 - 58 (文光堂, 2013).

2. 学会発表

- 1) 森崎裕子. 遺伝性結合織病と大血管病変. in 第42回日本心臓血管外科学会.(秋田)2012.4.18.

- 2) 森崎裕子. SMAD3 遺伝子変異を認めた若年性・家族性胸部大動脈瘤・解離患者の臨床的特徴. in 第57回日本人類遺伝学会(東京)2012.12.26.
- 3) Morisaki H, Yamanaka I, Yoshida A, Sultana R, Tanaka H, Iba Y, Sasaki H, Matsuda H, Minatoya K, Kosho T, Okamoto N, Kawame A, and Morisaki T. High incidence of SMAD3 mutations in thoracic aortic aneurysm and/or dissection (TAAD)patients. in 62nd Annual Meeting of American Society of Human Genetics.(San Francisco, USA):2012.11.6-12.
- 4) 森崎裕子. Marfan 症候群と類縁疾患の原因遺伝子による臨床所見の比較検討. in 第49回日本小児循環器学会.(東京)2013.7.11.
- 5) 森崎隆幸、森崎裕子. フィラミン異常症による大動脈瘤・解離. in 第59回日本人類遺伝学会(仙台)2013.11.20.
- 6) 森崎裕子. 「遺伝性稀少難病に対する国立循環器病研究センターの取り組み」in 第1回難病医療ネットワーク学会(大阪)シンポジウム2013.11.9
- 7) Morisaki H, Yamanaka I, Yoshida A, Sultana R, Minatoya K, Shiraishi I, Ichikawa H, Kosho T, Sonoda H and Morisaki T. FLNA mutations found in patients with thoracic aortic aneurysm/dissections. in 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics.(Boston, USA):2013.10.22-25.

G 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし