

201442048A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患実用化研究事業

(委託業務題目)

マルファン症候群及び類縁疾患についての治療薬剤スクリーニングと  
モデル動物を用いた評価に関する調査研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 森崎 隆幸

平成27(2015)年3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、独立行政法人国立循環器病研究センターが実施した平成26年度「マルファン症候群及び類縁疾患についての治療薬剤スクリーニングとモデル動物を用いた評価に関する調査研究」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患実用化研究事業

(委託業務題目)

マルファン症候群及び類縁疾患についての治療薬剤スクリーニングと  
モデル動物を用いた評価に関する調査研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 森崎 隆幸

平成27(2015)年 3月

## 目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
マルファン症候群及び類縁疾患についての治療薬剤スクリーニングと モデル動物を用いた評価に関する調査研究 -----	1
森崎 隆幸	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. マルファン症候群類縁疾患の薬剤探索に向けた病因遺伝子変異解析--	5
森崎 隆幸	
2. マルファン症候群類縁疾患治療スクリーニングにむけた 患者由来細胞の収集保存 -----	9
森崎 裕子	
3. Vasculopathyの網羅的診断とDFAT細胞株の樹立-----	12
小崎 健次郎	
4. 細胞モデルを用いた薬剤スクリーニング-----	14
佐谷 秀行	
5. マルファン症候群の日本人に適した診断基準と治療指針の 作成に向けて-----	16
武田 憲文	
6. マルファン症候群患者からのiPS細胞の樹立 -----	21
江良 択実	
III. 学会等発表実績 -----	25
IV. 研究成果の刊行物・別刷（抜粋） -----	27

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）  
委託業務成果報告（総括）

マルファン症候群及び類縁疾患についての治療薬剤スクリーニングと  
モデル動物を用いた評価に関する調査研究

業務主任者 森崎 隆幸 国立循環器病研究センター 分子生物学部長

**研究要旨**

本研究では、稀少難治性疾患であるマルファン症候群および類縁疾患について、QOLを著明に改善できる治療薬を、ドラッグリポジショニングにより見出し、その早期開発を進める。これまでに、既承認薬であるトラニラストの線維化の抑制作用を網羅的in vitroスクリーニングにより同定している。本研究では、患者ならびにモデル動物由来細胞を用いて同薬剤の有効性を検証し、さらに、他のより有効性の高い薬剤を既承認薬ライブラリーより探索する。

これまでに、既に500名を超える患者を登録し、患者由来細胞の検体の収集を進めている。また、患者と同じ遺伝子変異を有し骨格兆候、大動脈病変、水晶体偏位などを有するマルファン症候群ブタおよび患者の脂肪細胞から、脈管系や筋・腱等の組織への分化誘導が可能な脱分化脂肪細胞（DFAT）の誘導に成功した。一方、患者線維芽細胞・iPS細胞・血管系に誘導した細胞の蓄積が進んでいる。DFATとこれらの細胞と共に使用してトラニラストの効果を検証し、新たに既承認薬と類縁化合物の網羅的・複合的なin vitroスクリーニングを展開して、トラニラストに続く薬の同定をめざす。

さらに、計画後半にはマルファン症候群ブタへの候補薬剤の投与を行い、薬効・有害事象評価を行う予定である。患者登録情報は後の臨床試験の際に参照可能にして活用予定である。

研究分担者

森崎 隆幸 国立循環器病研究センター  
分子生物学部 部長  
森崎 裕子 国立循環器病研究センター  
分子生物学部 室長  
小崎健次郎 慶應義塾大学医学部  
臨床遺伝学センター 教授  
佐谷 秀行 慶應義塾大学医学部  
先端医科学研究所 教授  
武田 憲文 東京大学医学研究科  
循環器内科学 特任助教  
江良 拓実 熊本大学  
発生医学研究所 教授

すなわち、既承認薬のin vitroスクリーニングと、申請者らが開発したマルファン症候群ブタモデルを使用して前臨床試験を行って、研究プロジェクトの終了時には前臨床試験を終了し、Proof-of-conceptを得て、臨床試験の着手準備の完了をめざす。

これまでの研究事業で集積した患者由来間葉系細胞・iPS細胞を分化誘導した血管系細胞・マルファン症候群モデル動物由来の細胞の3種類を用いて、既承認薬および類縁化合物の網羅的かつ複合的なin vitroスクリーニングを行う。さらに、得られた化合物の薬効をマルファン症候群ブタモデルなどを用いて、in vivoで検証することにより目的の達成をめざす。

また、研究期間中には、これまでに確立した患者のレジストリーをさらに拡大して、遺伝子変異情報を含めた臨床情報を獲

**A. 研究目的**

本研究はマルファン症候群及び類縁疾患の治療薬の開発を第一の目的とする。

得し、さらに、手術等に得られるサンプルを収集して、上記の*in vitro*スクリーニングに供するほか、このレジストリーは後に実施する臨床試験にも供する事ができるように準備を行う。

## B. 研究方法

### 1) マルファン症候群及び類縁疾患についての遺伝情報を含む臨床データの蓄積

マルファン症候群など類縁の結合織異常を疑う症例について、臨床所見情報とともに遺伝子情報の獲得を行う。

遺伝子解析については、候補遺伝子についてサンガー法による解析に加えて、候補遺伝子の次世代シーケンサーによる解析結果も合わせて情報収集を行う。

### 2) マルファン症候群及び類縁疾患についての患者由来細胞の収集蓄積

マルファン症候群および類縁疾患の患者について、手術時の血管組織などより初代培養細胞として線維芽細胞の蓄積を行い、候補既承認薬剤パネルの*in vitro*スクリーニングに供する際の分類として活用する。

### 3) マルファン症候群及び類縁疾患についての患者由来 iPS 細胞の樹立と血管系細胞への分化系の確立

マルファン症候群および類縁疾患患者から、末梢血を利用して疾患 iPS 細胞の樹立を行い、治療薬のスクリーニングで選別される薬剤の細胞分化、増殖などへの影響の検討への活用を行う。

### 4) マルファン症候群モデルブタからの脱分化細胞の樹立

FBN1 遺伝子欠損マルファン症候群ブタモデルの皮下脂肪組織から脂肪前駆細胞の役割を果たす脱分化脂肪細胞 (DFAT) を樹立し、治療薬ライブラリーのスクリーニングの際にリソースとして活用する。

(倫理面への配慮)

本研究では、研究実施機関の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。動物実験を行う際には動物愛護の精神に則り、施設および国などの指針を遵守して実施した。

## C. 研究結果

### 1) マルファン症候群及び類縁疾患についての遺伝情報を含む臨床データの蓄積

今年度までに600名以上について診療管理を行い臨床情報を集積し、そのうちマルファン症候群193例、ロイスディーツ症候群37例について診断を確定して診療情報を獲得した。

遺伝子情報については、これまでにエクソンPCR-直接シーケンス解析法1391例を行った結果に加えて、次世代シーケンサーによる解析の有用性についても情報を検討し、効率的な遺伝情報の獲得法の検討が進捗した。

### 2) マルファン症候群及び類縁疾患についての患者由来細胞の収集蓄積

これまでに、患者由来初代培養細胞298例の集積を行った。このうち、病因遺伝子情報により診断確定した症例はマルファン症候群116例、ロイスディーツ症候群19例であり、これらの試料は臨床情報と遺伝子変異情報を組み合わせて、候補既承認薬剤パネルの*in vitro*スクリーニングに供する有用なリソースとして確保が行えた。

### 3) マルファン症候群及び類縁疾患についての患者由来 iPS 細胞の樹立と血管系細胞への分化系の確立

これまでに、患者由来 iPS 細胞は9症例分について、既樹立あるいは樹立過程にあり、iPS 細胞からの分化系の確立が進捗し、薬剤スクリーニングの際の有用なシステムとなることが期待される状況である。

#### 4) マルファン症候群モデルブタからの脱分化細胞の樹立

マルファン症候群モデルブタの皮下脂肪組織より、成熟脂肪細胞を得たのちに、培養を継続して、線維芽細胞様の細胞への変化を確認した。線維芽細胞様細胞は脂肪分化能を持つことが確認され、脱分化細胞として、薬剤スクリーニングの際の有用なリソースとなることが期待される結果を得た。

#### D. 考察

マルファン症候群及び類縁疾患について、600名を超える患者の臨床情報を集積し、患者由来細胞も290例以上集積した。同時に、病因としての遺伝子変異情報のスクリーニングの有用性と遺伝子情報の集積も進捗し、新規薬剤候補の評価にむけて基盤が構築された。

樹立した患者由来iPS細胞を含む患者由来細胞と、新規に分化能を確認したマルファン症候群モデルブタおよび患者の脂肪細胞から脱分化脂肪細胞(DFAT)の誘導に成功し、こうした脈管系や筋・腱等の組織への分化誘導系は、新たに既承認薬と類縁化合物の網羅的・複合的なin vitroスクリーニングの展開の基盤として重要であり、今後、既承認薬と類縁化合物からの新規薬剤候補の同定につなげる予定である。

#### E. 結論

稀少難治性疾患であるマルファン症候群および類縁疾患についての新規治療薬の探索と評価に向けて、患者臨床情報・遺伝子情報の蓄積とスクリーニングにむけた患者由来細胞(iPS細胞含む)の蓄積が進み、疾患モデルブタ由来の脱分化細胞とともに、既承認薬と類縁化合物からの新規薬剤候補のスクリーニングの研究基盤がさらに強固なものとなり、研究進展を期待している。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakajima T, Tachibana K, Miyaki Y, Takagi N, Morisaki T, Higami T: Acute dilatation of the ascending aorta and aortic valve regurgitation in Loeys-Dietz syndrome. *Ann Thorac Surg* 97:2188-2190, 2014.
- 2) Shimizu H, Mori A, Yoshitake A, Yamada T, Morisaki H, Okano H, Yozu R: Thoracic and thoracoabdominal aortic repair under regional spinal cord hypothermia *Eur J Cardiothorac Surg* 46: 40-43, 2014.
- 3) Nishida K, Tamura S, Yamazaki S, Sugita R, Yamagishi M, Noriki S, Morisaki H: Postoperative mitral leaflet rupture in an infant with Loeys-Dietz syndrome *Pediatr Int* 56: e82-85, 2014.
- 4) 森崎裕子; 循環器領域の遺伝カウンセリング. *日本遺伝カウンセリング学会誌*. 35: 73-76, 2014
- 5) Morisaki H, Morisaki T: Loeys-Dietz syndrome. *Pediatr Cardiol Cardiac Surg* 3:232-238, 2014.
- 6) Nobusue H, Onishi N, Shimizu T, Sugihara E, Oki Y, Sumikawa Y, Chiyoda T, Akashi K, Saya H and Kano K: Regulation of MKL1 via actin cytoskeleton dynamics drives adipocyte differentiation. *Nat Commun* 5: 3368, 2014
- 7) Fujita D, Takeda N, Imai Y, Inuzuka R, Komuro I, Hirata Y. Pathophysiology and Japanese clinical characteristics in Marfan syndrome. *Pediatr Int* 56(4):484-491, 2014
- 8) Yagi H, Hatano M, Takeda N, Harada S, Suzuki Y, Taniguchi Y, Shintani Y, Morita H, Kanamori N, Aoyama T, Watanabe M, Manabe I, Akazawa H, Kinugawa K, Komuro I. A case of congenital contractural arachnodactyly without FBN1 or FBN2 gene mutation, complicated with dilated cardiomyopathy. *Internal Medicine* 2014 (in press)
- 9) Takenouchi T, Ohyagi M, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Kosaki K. Porencephaly in a fetus and HANAC in her father: Variable expression of COL4A1 mutation. *Am J Med Genet*, in press
- 10) Fujie Y, Fusaki N, Katayama T, Hamasaki M, Soejima Y, Soga M, Ban H, Hasegawa M, Yamashita S, Kimura S,

Suzuki S, Matsuzawa T, Akari H, Era T: New type of Sendai virusvector provides transgene-free iPS cells derived from chimpanzee blood. PLoS One. 9 :e113052, 2014.

## 2. 学会発表

1) 森崎裕子. 循環器領域の遺伝カウンセリング 第 38 回日本遺伝カウンセリング学会総会 教育講演. (大阪) 2014.6.24.

2) Morisaki H, Morisaki T: TGFB3 pathogenic mutations cause MFS/LDS phenotypes and aortic aneurysms in 3 Japanese families . 9th International Research Symposium on Marfan Syndrome and Related Disorders. (Paris, France) 2014.9.25-27.

3) Morisaki T, Morisaki H: Genetic analysis of Japanese young-onset or familial thoracic aortic aneurysm and/or dissection. 9th International Research Symposium on Marfan Syndrome and Related Disorders. (Paris, France) 2014.9.25-27.

4) Fujita D, Takeda N, Imai Y, Hirata Y, Hirata Y. Comparison between the original and revised Ghent criteria in Japanese Marfan syndrome. 9th International symposium on Marfan syndrome and related disorders (Paris, France) 2014.9.25-27.

5) Morisaki H, Yoshida A, Yamanaka I, Sultana R, Oda T, Tanaka H, Sasaki H, Minatoya K, Matsukawa R, Tsukube T, Kubo N, Morisaki T: TGFB3 pathogenic mutations cause MFS/LDS phenotypes and aortic aneurysms in 3 Japanese families . 64th Annual Meeting of American Society of Human Genetics. (San Diego, USA) 2014.10.18-22

6) Morisaki H: TGF- $\beta$  signaling and aortic /pulmonary arterial diseases. 第 59 回日本人類遺伝学会. (東京) 2014.11.22.

7) Fujita D, Takeda N, Kato M, Nishimura H, Inuzuka R, Imai Y, Hirata Y, Komuro I. Marfan syndrome - Fibrillin I mutation and clinical phenotypes. 第 17 回日本成人先天性心疾患学会 (東京) 2015.1.16-18

## 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



厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）  
委託業務成果報告（業務項目）

マルファン症候群及び類縁疾患についての治療薬剤スクリーニングと  
モデル動物を用いた評価に関する調査研究

（分担項目）マルファン症候群類縁疾患の薬剤探索に向けた病因遺伝子変異解析

担当責任者 森崎 隆幸 国立循環器病研究センター分子生物学部 部長

### 研究要旨

本研究では、マルファン症候群及び類縁疾患の治療薬の開発をめざして、これまでに行ってきたマルファン症候群など類縁疾患患者の情報（臨床情報、遺伝子解析情報）を獲得集積して治療薬の対象とすべき病態を明らかにする。これまでに構築したマルファン症候群及び類縁疾患についての総合診療体制を活用し、所見の集積を行うとともに、病因同定のための遺伝子解析について方法の改良を行って実施し、遺伝子変異情報の獲得、集積を推進した。今年度までに総計652例のマルファン症候群など類縁疾患患者についての診療管理を行って、臨床情報の集積を進め、また、総計で1391例について病因遺伝子解析を実施し、このうち615例について病因遺伝子変異を同定した。このうち、FBN1遺伝子変異同定（マルファン症候群）は439例に、他の遺伝子変異同定は176例であった。以上により、新規薬剤の開発の基盤となる情報収集が進んだ

### 研究分担者

森崎裕子 国立循環器病研究センター  
分子生物学部 室長

### A. 研究目的

本研究は、マルファン症候群及び類縁疾患の治療薬の開発を最終目標に、これまでに行ってきたマルファン症候群など類縁疾患患者のレジストリーを拡充し、症例ごとの遺伝子変異情報を臨床情報とともに獲得集積し、治療対象とすべき病態を明らかにする。鑑別診断と病型分類に必要な臨床データの蓄積と分析、有効な遺伝子解析法について検討することを目的とする。成果は並行して行う患者由来細胞の収集蓄積と合わせ、既承認薬スクリーニングに用いる細胞の選別分類を行うとともに、*in vitro*スクリーニングならびに*in vivo*スクリーニングで得られる候補薬剤についての臨床試験の参考情報に供することのできる情報獲得を行う。

### B. 研究方法

#### 1) 該当疾患の診療管理

国立循環器病研究センターでは、マルファン症候群など類縁の結合織異常が疑われる患者については、身体所見、家族歴、遺伝子解析を含めた総合診療体制を組み、全身管理を行っている。診断に際しては、既存の診断基準（改訂セント基準）に加えて、必要に応じた遺伝子解析を実施し、類似疾患との鑑別を行うとともに、病型分類の参考になる情報の獲得を行う。

#### 2) 病因遺伝子変異解析と情報集積

国立循環器病研究センターでは、従来より、当院受診した患者ならびに他院より解析を依頼された患者につき、遺伝子解析の同意を得た上で血液を採取し、末梢血より抽出したゲノムDNAを用いて遺伝子解析を行っている。

今回の検討では、エクソン PCR-直接シーケンシング解析法、MLPA 法に加えて、次世代シーケンサー (Miseq) を用いて、イルミナ社の Tru Seq Custom Amplicon システムによる 21 遺伝子 1363 領域の標的遺伝子エクソン配列解析も併用して、解析精度の向上を試みた。さらに、手術時に組織・細胞の提供が行われた場合には cDNA を用いた配列解析、また、培養細胞が使用できる際には、薬剤負荷を行って、Nonsense Mediated mRNA Decay (NMD) を抑制し、エクソン内のミスセンス変異だけでなく、スプライシング変異を含む、通常のエクソン PCR-直接シーケンシング解析法では同定の困難な病因遺伝子変異についての検討も行い、病因同定の向上に努めた。

#### (倫理面への配慮)

本研究では、国立循環器病研究センター倫理委員会の承認を得て、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から研究を実施する、など、倫理面への配慮を十分に行っている。

### C. 研究結果

#### 1) 該当疾患の診療管理状況

今年度は、マルファン症候群および類縁疾患が疑われた患者 163 名について新規に診療管理を行い、継続診療を含め 652 名について管理を行っている。既存の診断基準 (改訂ゲント基準) に加えて、必要に応じて後述するように遺伝子解析を実施し、類似疾患との鑑別、病型分類の参考になる情報の獲得を行った。

その結果、これまでにマルファン症候群 193 例、ロイスディーツ症候群 37 例について診断を確定して診療管理することができ、さらに、似た病像を呈しうる血管型エーラスダンロス症候群 14 例、家族性胸部大動脈瘤・解離 24 例を鑑別し、それぞれについて診療管理を行うことができた。

#### 2) 病因遺伝子変異解析

今年度、他院からの要請を含めて、マルファン症候群および類縁疾患についての遺伝子解析を新規に 237 例について実施し、これまでの解析患者数累計は 1391 例となった。

エクソン PCR-直接シーケンシング解析法、MLPA 法、次世代シーケンサーによる標的遺伝子エクソン配列解析、cDNA 配列解析を組み合わせることにより、新規に FBN1 変異 56 例、TGFB1 変異 11 例、TGFB2 変異 5 例、ACTA2 変異 4 例、COL3A1 変異 7 例を同定し、累計では、FBN1 変異 439 例、TGFB1 変異 45 例、TGFB2 変異 38 例、SMAD3 変異 17 例、TGFB2 変異 3 例、ACTA2 変異 33 例、MYH11 変異 1 例、COL3A1 変異 39 例を同定した。

FBN1 変異については、約 40% の症例で NMD をきたす変異を有していたが、現時点では、臨床所見と NMD 変異との関係は必ずしも明確にはならなかった。

### D. 考察

今回、マルファン症候群及び類縁疾患について、総合診療体制の元での臨床情報の集積、診断・鑑別診断に有益な遺伝子解析結果の集積を進めることができ、本研究の最終目標である新規薬剤開発に際して鍵となる情報が獲得できた。

診療管理の把握については、マルファン症候群ならびに類縁疾患について、〇〇例について診療管理を行い、臨床所見の集積を進めることができ、マルファン症候群の中での病像の違いや治療と病変進展との関係について、レジストリを進めることができ、これまでの経緯の把握ができるようになったほか、今後の経過情報の把握が容易になるシステムの構築が進んだ。患者数はマルファン症候群が約 71% と多数を占め、13% 程度がロイスディーツ症候群、残る 16% が家族性大動脈瘤・解離あるいは血管型エーラスダンロス症候群などで

あったが、病因の明らかでない例もあり、今後の研究継続が重要と考えられた。

病因遺伝子変異解析については、今回、次世代シーケンサーによる解析を加えたことで、臨床所見からは遺伝子変異の存在が疑われるが、従来の方法では同定が困難であった遺伝子変異を明らかにできた症例があり、解析精度の向上が図られた。一方で、なお、原因遺伝子の不明な症例もあり、別途検討を行っているエクソーム解析などの成果を待つ必要があると考えられた。

以上の成果は、並行して行っている患者由来細胞の収集蓄積とともに、既承認薬スクリーニングに用いる細胞として選別分類がより容易になることが期待され、さらに、*in vitro* スクリーニングならびに *in vivo* スクリーニングで得られる候補薬剤についての臨床治験にも有用な基盤となると考えられた。

## E. 結論

遺伝子解析を含む総合診療体制により、マルファン症候群ならびに類縁疾患 652 例について継続して診療管理を行うことができ、本研究全体の目標である新規薬剤の開発の基盤となる情報、試料の収集、また、本研究の成果を元にした臨床研究実施に向けての基盤を整備することができた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nakajima T, Tachibana K, Miyaki Y, Takagi N, Morisaki T, Higami T: Acute dilatation of the ascending aorta and aortic valve regurgitation in Loeys-Dietz syndrome. *Ann Thorac Surg* 97:2188-2190, 2014.
- 2) Shimizu H, Mori A, Yoshitake A, Yamada T, Morisaki H, Okano H, Yozu R: Thoracic and thoracoabdominal aortic repair under regional spinal cord hypothermia *Eur J Cardiothorac Surg* 46: 40-43, 2014.

- 3) Nishida K, Tamura S, Yamazaki S, Sugita R, Yamagishi M, Noriki S, Morisaki H: Postoperative mitral leaflet rupture in an infant with Loeys-Dietz syndrome *Pediatr Int* 56: e82-85, 2014.
- 4) 森崎裕子; 循環器領域の遺伝カウンセリング. *日本遺伝カウンセリング学会誌*. 35: 73-76, 2014.
- 5) Morisaki H, Morisaki T: Loeys-Dietz syndrome. *Pediatr Cardiol Cardiac Surg* 3:232-238, 2014.

### 2. 学会発表

- 1) 森崎裕子. 循環器領域の遺伝カウンセリング 第 38 回日本遺伝カウンセリング学会総会 教育講演. (大阪) 2014.6.24.
- 2) Morisaki H, Morisaki T: TGFB3 pathogenic mutations cause MFS/LDS phenotypes and aortic aneurysms in 3 Japanese families . 9th International Research Symposium on Marfan Syndrome and Related Disorders. (Paris, France) 2014.9.25-27.
- 3) Morisaki T, Morisaki H: Genetic analysis of Japanese young-onset or familial thoracic aortic aneurysm and/or dissection. 9th International Research Symposium on Marfan Syndrome and Related Disorders. (Paris, France) 2014.9.25-27.
- 4) Morisaki H, Yoshida A, Yamanaka I, Sultana R, Oda T, Tanaka H, Sasaki H, Minatoya K, Matsukawa R, Tsukube T, Kubo N, Morisaki T: TGFB3 pathogenic mutations cause MFS/LDS phenotypes and aortic aneurysms in 3 Japanese families . 64th Annual Meeting of American Society of Human Genetics. (San Diego, USA) 2014.10.18-22
- 5) Morisaki H: TGF- $\beta$  signaling and aortic /pulmonary arterial diseases. 第 59 回日本人類遺伝学会. (東京) 2014.11.22.

## 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

## H. 班友

湊谷 謙司 国立循環器病研究センター  
佐々木啓明 国立循環器病研究センター  
田中 裕史 国立循環器病研究センター  
尾田 達哉 国立循環器病研究センター  
糸永 竜也 国立循環器病研究センター  
清家 愛幹 国立循環器病研究センター  
吉田 晶子 国立循環器病研究センター  
伊田 和史 国立循環器病研究センター

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）  
委託業務成果報告（業務項目）

マルファン症候群及び類縁疾患についての治療薬剤スクリーニングと  
モデル動物を用いた評価に関する調査研究

（分担項目）マルファン症候群類縁疾患治療スクリーニングにむけた患者由来細胞の  
収集保存

担当責任者 森崎 裕子 国立循環器病研究センター分子生物学部 室長

### 研究要旨

本研究は、マルファン症候群及び類縁疾患の治療薬の開発を最終目標に、情報収集とならんで患者由来組織、細胞の収集集積を実施した。本年度、新規に患者55人について手術時に組織細胞を収集し、累計で298人の患者由来細胞の集積を行った。さらに新規に疾患iPS細胞を末梢血液から樹立を行い、累計でマルファン症候群及び類縁疾患9例のiPS細胞の樹立研究が進捗している。これらの細胞は、細胞機能の検討による病態解明に加えて、本研究の最終目標である、新規薬剤開発にむけた候補既承認薬剤パネルの*in vitro*スクリーニングにも活用できる有用なリソースになると考えられた。

### A. 研究目的

本研究は、マルファン症候群及び類縁疾患の治療薬の開発を最終目標に、情報収集とならんで患者由来組織、細胞の収集集積を推進する。

マルファン症候群および類縁疾患につき、国立循環器病研究センターでは、当該疾患の診療拠点として手術時等の際に細胞試料収集を行っている。これらの細胞試料を本研究プロジェクトで行う候補既承認薬剤パネルの*in vitro*スクリーニングに供して、当該疾患に有効な薬剤の選別に役立てる。

### B. 研究方法

#### 1) マルファン症候群および類縁疾患の患者細胞試料の収集

国立循環器病研究センターでは、マルファン症候群および類縁疾患の患者について血液ゲノムDNA解析を補完する遺伝子情報を獲得するために手術時の血管組織を採取し、直接にゲノム解析に供すると

ともに、初代培養細胞として線維芽細胞の蓄積を行っている。すでに昨年度までに累計で240人以上の手術時の血管組織検体・線維芽細胞を蓄積してきたが、新規の血管組織検体・線維芽細胞を蓄積し、ゲノム解析結果を含めた情報とともに集積を進める

収集した組織細胞を病因遺伝子別、変異種類別に分類し、本研究プロジェクトで行う、候補既承認薬剤パネルの*in vitro*スクリーニングに供する際の分類として活用する。

#### 2) iPS細胞樹立に向けたマルファン症候群類縁疾患の患者細胞試料の収集

国立循環器病研究センターでは、マルファン症候群および類縁疾患の患者8人について、既に手術組織細胞を用いて、本プロジェクトの共同研究者である熊本大学江良教授により疾患iPS細胞の樹立を行ってきたが、今回、新規に、マルファン症候群および類縁疾患患者の末梢血を利用

して疾患 iPS 細胞の樹立を行い、治療薬のスクリーニングで選別される薬剤の細胞分化、増殖などへの影響の検討への活用を行う。

### 3) マルフアン症候群および類縁疾患の患者細胞試料を用いた遺伝子機能の検討

上記により収集集積したマルファン症候群および類縁疾患患者由来の細胞試料を用いて、疾患病態に深く関わる TGF $\beta$  シグナル系所属の遺伝子発現の検討を行い、変異遺伝子ごとだけでなく、変化の類型化により、病態の理解を深めて、治療薬のスクリーニングにも活用する。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、国立循環器病研究センター倫理委員会の承認を得て、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う。

## C. 研究結果

### 1) マルフアン症候群および類縁疾患の患者試料細胞の収集

今年度は、マルファン症候群など類縁の疾患患者 55 名について手術時などに生体試料(組織)を収集し、それぞれ初代培養細胞として集積し、既存試料を含めて 298 例について組織・細胞の集積を行った。

これまでに集積した試料全体のうち、遺伝学的検査により診断の確定した症例の内訳はマルファン症候群 116 例、ロイスディーツ症候群 19 例、その他に血管型エーラスダンロス症候群 21 例、家族性大動脈瘤・解離など 16 例であった。

これらの病因となる遺伝子変異を同定した症例については、それぞれの臨床情報と遺伝子変異情報の組み合わせを、候補既承認薬剤パネルの *in vitro* スクリーニングに供する際の分類として活用していく予定である。

### 2) iPS 細胞樹立に向けたマルファン症候群類縁疾患の患者細胞試料の収集

今年度は、マルファン症候群など類縁の疾患患者 1 名について iPS 細胞樹立のための血液を採取し、共同研究者の熊本大学江良教授により iPS 細胞樹立を行っている。

既に手術等に採取した線維芽細胞を用いて疾患 iPS 細胞の樹立を同様に行っており、すでに 8 症例分を集積保存管理している。内訳はマルファン症候群 4 例、ロイスディーツ症候群 4 例であり、新規に樹立中の細胞を含めると総計 9 症例分となる。

樹立した iPS 細胞は、今後、治療薬のスクリーニングで選別される薬剤の細胞分化、増殖などへの影響の検討への活用を行う。

### 3) マルフアン症候群および類縁疾患の患者細胞試料を用いた遺伝子機能の検討

上記により収集集積した細胞を用いて、マルファン症候群および類縁疾患の疾患病態に深く関わる TGF $\beta$  シグナル系所属の遺伝子発現の検討を行ったところ、TGF $\beta$  シグナル系所属の遺伝子発現増強を認めた。現在、マルファン症候群、ロイスディーツ症候群以外の遺伝性大動脈疾患ことに血管収縮タンパク質遺伝子 ACTA2 の変異症例との比較検討を行い、類似疾患との機能的差異の有無を明らかにするとともに、治療薬剤への反応性の違いや、薬剤ごとの反応性の違いの検討に資する検討を行っている。

## D. 考察

国立循環器病研究センターでは、当該疾患の診療拠点として手術時等の際に細胞試料収集が順調に進捗し、これらの細胞試料は本研究プロジェクトで行う候補既承認薬剤パネルの *in vitro* スクリーニングに供して、当該疾患に有効な薬剤の選別に役立てることができると考えられる有用なリソースになると考えられた。さらに、変異遺伝子別、

FBN1 遺伝子の変異種別の細胞を利用することができることから、疾患病因の違いによる細胞機能の検討のみならず、薬剤の有効性について、変異遺伝子ごと、すなわち、マルファン症候群と類縁疾患の違い、あるいは、変異種別ごとの比較が行える有用な検討系になりうると考えている。

## E. 結論

マルファン症候群およびロイスディーツ症候群など類縁疾患について患者由来細胞試料の収集が進捗し、本研究の最終目標である、新規薬剤開発にむけた候補既承認薬剤パネルの *in vitro* スクリーニングにも活用できる有用なシステムが構築されたと考えている。

## F. 研究発表

- 論文発表
  - 1) Nakajima T, Tachibana K, Miyaki Y, Takagi N, Morisaki T, Higami T: Acute dilatation of the ascending aorta and aortic valve regurgitation in Loeys-Dietz syndrome. *Ann Thorac Surg* 97:2188-2190, 2014.
  - 2) Shimizu H, Mori A, Yoshitake A, Yamada T, Morisaki H, Okano H, Yozu R: Thoracic and thoracoabdominal aortic repair under regional spinal cord hypothermia *Eur J Cardiothorac Surg* 46: 40-43, 2014.
  - 3) Nishida K, Tamura S, Yamazaki S, Sugita R, Yamagishi M, Noriki S, Morisaki H: Postoperative mitral leaflet rupture in an infant with Loeys-Dietz syndrome *Pediatr Int* 56: e82-85, 2014.
  - 4) 森崎裕子; 循環器領域の遺伝カウンセリング. *日本遺伝カウンセリング学会誌*. 35(3): p. 73-76.(2014).
- 学会発表
  - 1) 森崎裕子. 循環器領域の遺伝カウンセリング 第38回日本遺伝カウンセリング学会総会 教育講演. (大阪) 2014.6.24.
  - 2) Morisaki H, Morisaki T: TGF $\beta$ 3 pathogenic mutations cause MFS/LDS phenotypes and aortic aneurysms in 3 Japanese families . 9th International

Research Symposium on Marfan Syndrome and Related Disorders. (Paris, France) 2014.9.25-27.

- 3) Morisaki T, Morisaki H: Genetic analysis of Japanese young-onset or familial thoracic aortic aneurysm and/or dissection. 9th International Research Symposium on Marfan Syndrome and Related Disorders. (Paris, France) 2014.9.25-27.
- 4) Morisaki H, Yoshida A, Yamanaka I, Sultana R, Oda T, Tanaka H, Sasaki H, Minatoya K, Matsukawa R, Tsukube T, Kubo N, Morisaki T: TGF $\beta$ 3 pathogenic mutations cause MFS/LDS phenotypes and aortic aneurysms in 3 Japanese families . 64th Annual Meeting of American Society of Human Genetics. (San Diego, USA) 2014.10.18-22
- 5) Morisaki H: TGF- $\beta$  signaling and aortic /pulmonary arterial diseases. 第59回日本人類遺伝学会. (東京) 2014.11.22.

## 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

## H. 班友

湊谷 謙司	国立循環器病研究センター
佐々木啓明	国立循環器病研究センター
田中 裕史	国立循環器病研究センター
尾田 達哉	国立循環器病研究センター
糸永 竜也	国立循環器病研究センター
清家 愛幹	国立循環器病研究センター
吉田 晶子	国立循環器病研究センター
伊田 和史	国立循環器病研究センター

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）  
委託業務成果報告（業務項目）

マルファン症候群及び類縁疾患についての治療薬剤スクリーニングと  
モデル動物を用いた評価に関する調査研究

（分担項目）Vasculopathy の網羅的診断と DFAT 細胞株の樹立

担当責任者 小崎健次郎・慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター・教授

**研究要旨**

マルファン症候群は遺伝子変異による稀少難治性疾患である。年齢とともに結合組織の脆弱性による症状が進行する。小児期から進行を抑制することができれば、患者のQOLを著明に改善できる。本研究ではドラッグリポジショニングにより治療薬を見出し、その早期開発を進めている。In vitro およびin vivoのスクリーニング系を用いてドラッグリポジショニングの手法により候補薬の同定を進めている。候補薬が同定された場合には、臨床試験を実施する計画であるが、変異が陽性であるコホートを確保する必要がある。次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子診断により、既知のマルファン症候群関連疾患を感度・特異度とも高く診断するための方法論を確立した。網羅的な手法の適用により、非典型例の診断が可能となった。非典型例からもスクリーニングのための細胞株を確立してゆく計画である。

**A. 研究目的**

マルファン症候群は優性遺伝子疾患であり、遺伝子変異にもとづいて年齢とともに結合組織の脆弱性による症状が進行する稀少疾患である。小児期から進行を抑制することができれば、患者のQOLを著明に改善できる。本研究ではドラッグリポジショニングにより治療薬を見出し、その早期開発を進めることを目的とする。

今年度の研究は、次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子診断により、既知のマルファン症候群関連疾患および関連する血管疾患を感度・特異度とも高く診断するための方法論を確立した。

**B. 研究方法**

イルミナ社の既知ヒト疾患原因遺伝子4813個を同時にスクリーニング可能な系を応用した。ベイトを用いて全ゲノムのうち、4813遺伝子の部分のみを濃縮し、次世代シーケンサーによって配列を決定した。偶発的所見に関わる倫理的な問題を回避するために、心血管系の発生や維持に関わる遺伝子群のみにおける変異のバリエーションを評価した。遺伝子群にはACTA2、COL3A1、TGFB1、TGFB2、SMAD3、TGFB2、FBN1、MYLK、MYH11、

PRKG1、SLC2A10、SMAD3、SKI を含む。

（倫理面への配慮）

各施設における倫理委員会の承認を得て実施した。

**C. 研究結果**

種々のvasculopathy網羅的解析を実施した結果、下記のごとき、非典型症例を同定した。マルファン症候群の原因遺伝子はFBN1である。FBN1の特殊な変異によって、早老症様の症状を呈することを報告し、さらに類似症例を見出した。血管の中膜の統合に極めて重要な分子であるが、他の血管の統合に関わる遺伝子の変異は系統的なvasculopathyの原因となりうる。そこでヒト遺伝性疾患の原因遺伝子を網羅的に解析し、マルファン症候群関連疾患を正確に診断することを試みた。細動脈～毛細血管の幅広いレベルの異常を来す疾患としてCOL4A1異常症の家族例を検出した。家族内の表現型の多様性が認められた。SMAD3変異のある家族内で胸部大動脈瘤とロイス・ディーツ症候群の表現型を認めた。やはり家族内の表現型の多様性が認められた。



#### D. 考察

Vasculopathyの原因遺伝子群を含めて網羅的に検出するシステムを確立した。非典型的な症例を同定することができた。FBN1の特殊な変異によって、早老症様の症状を呈することを報告したが、この患者由来組織からDFAT細胞の作成に成功した。今後も、種々の症例について、DFAT細胞を樹立してゆく計画である。

家族内の表現型の多様については、modifier geneの存在が想定される。症状の軽重に関与する遺伝子変異・バリエーションの関与について検討を進める必要がある。

#### E. 結論

種々のvasculopathyに対して網羅的解析を実施した結果、非典型症例を同定することができた。非典型例も含めたin vitroスクリーニング系の作成を計画している。

#### F. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

##### 1. 論文発表

Takenouchi T, Ohyagi M, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Kosaki K. Porencephaly in a fetus and HANAC in her father: Variable expression of COL4A1 mutation. Am J Med Genet, in press

##### 2. 学会発表

なし

#### 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

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）  
委託業務成果報告（業務項目）

マルファン症候群及び類縁疾患についての治療薬剤スクリーニングと  
モデル動物を用いた評価に関する調査研究

（分担項目）細胞モデルを用いた薬剤スクリーニング

担当責任者 佐谷秀行・慶應義塾大学医学部先端研遺伝子制御・教授

**研究要旨**

マルファン症候群は遺伝子変異による稀少難治性疾患である。年齢とともに結合組織の脆弱性による症状が進行する。小児期から進行を抑制することができれば、患者のQOLを著明に改善できる。本研究ではドラッグリポジショニングにより治療薬の見出し、その早期開発を進める。具体的には、*FBNI*遺伝子欠損マルファン症候群ブタモデル由来の細胞を用いて、既承認薬および類縁化合物の網羅的in vitroスクリーニングを進める。既に候補薬としてトラニラストが得られており、トラニラストの誘導体や、他のトラニラストとは異なる作用機序で働く薬剤についてもその効果を調べる。本年度はマルファンモデルブタから脱分化脂肪細胞（DFAT）を樹立し、脂肪分化はOil Red O染色、骨分化はアルカリフォスファターゼ染色を指標にして新たな候補薬剤スクリーニング系を構築した。

**A. 研究目的**

マルファン症候群は優性遺伝子疾患であり、遺伝子変異にもとづいて年齢とともに結合組織の脆弱性による症状が進行する稀少疾患である。小児期から進行を抑制することができれば、患者のQOLを著明に改善できる。本研究ではドラッグリポジショニングにより治療薬を見出し、その早期開発を進めることを目的とする。本分担研究では、マルファン症候群のモデルブタ及び患者由来細胞を用いてアッセイ系を構築し、既承認薬および類縁化合物の網羅的かつ複合的なin vitroスクリーニングを行う。得られた化合物の有効性と毒性については、それらの細胞とマルファン症候群疾患ブタモデルを用いて検証を行う。またマルファン症候群疾患ブタモデルを用いることで、効果判定のための適切な血清マーカー同定も行う。計画プロジェクトの終了時にはProof-of-concept（概念実証POC）を確立し、臨床治験に向けて準備を完了する。

今年度の研究は、スクリーニング及び薬効評価の標的細胞となる*FBNI*遺伝子欠損マルファン症候群ブタ由来脱分化脂肪細胞（DFAT）の樹立を目的として実施した。

**B. 研究方法**

明治大学農学部・長嶋比呂志教授の研究室において作製した*FBNI* 遺伝子欠損マルファン症候群ブタモデルの皮下脂肪組織から脂肪前駆細胞の役割を果たす脱分化脂肪細胞（DFAT）を樹立した。

（倫理面への配慮）

本研究で用いたDFAT細胞は、明治大学の学内動物実験指針および遺伝子組換え実験安全管理規程にしたがって作製した遺伝子改変ブタから摘出した組織から樹立した。

**C. 研究結果**

*FBNI*遺伝子欠損マルファン症候群ブタ脱分化脂肪細胞（DFAT）の樹立

産後死亡した個体より採取した皮下脂肪組織をコラゲナーゼ処理することにより、成熟脂肪細胞を得た。この細胞を、培地を満たしたフラスコに散布し、天井培養を行った。脂肪細胞はフラスコ上面に付着し、分裂を開始し、培養1週間を過ぎると脂肪滴をほとんど有さない線維芽細胞様の細胞に変化した。その後フラスコを反転

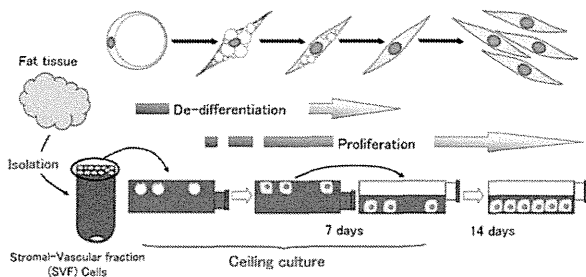


図1 DFAT 細胞の樹立法

脂肪組織を消化したのち、培地を満たしたフラスコで天井培養を行い、7日後に裏返し培養を続けることで、未分化な脱分化脂肪細胞(DFAT 細胞)を樹立する。(Nobusue et. al., Cell Tissue Res, 2008)

して通常の培養を継続した。得られた線維芽細胞様細胞が脂肪分化能を持つことを確認した。具体的には、細胞をディッシュ内で semi-confluent になるまで増殖させ、10% FBS, 0.25 μM デキサメタゾン, 0.5 mM イソブチルメチルキサンチンおよび 5 μg/ml インスリンを添加した DMEM 脂肪細胞分化誘導培地で 2 日間処理し、その後 DMEM 培地 (10% FBS) に培地を交換し培養を続け、数日後に細胞内に油滴が存在することを Oil Red O 染色することによって、確認した。その結果、*FBNI* 遺伝子欠損ブタ由来の DFAT 細胞は、野生型ブタ由来の DFAT 細胞に比べて明らか脂肪分化能が低いことが分かった。

#### D. 考察

本年度の研究によって、*FBNI* 遺伝子欠損ブタ由来の DFAT 細胞が樹立できたことで、*FBNI* 遺伝子の異常によってどのような分化異常や代謝異常が細胞にもたらされるかを詳細に解析することが可能となった。特に本年度の結果から、*FBNI* 遺伝子欠損ブタ由来の DFAT 細胞は脂肪への分化能が野生型に比べて低いことが明らかになり、マルファン症候群患者の症状の一つであ

る脂肪組織の委縮と関与している可能性が示唆される。次年度はマルファン症候群患者から DFAT 細胞の樹立も行い、*FBNI* 遺伝子欠損ブタ由来の DFAT 細胞と同様の変化が生じているかを明確にし、症状を代用できるマーカーの同定を目指す。最終的にはスクリーニングで取得した化合物の DFAT に対する作用を調べ、異常の是正が可能かについて検討を行う。

#### E. 結論

*FBNI* 遺伝子欠損ブタ由来の DFAT 細胞が樹立できたことで、ヒット化合物の異常是正能を評価する実験系が構築できた。

#### F. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

##### 1. 論文発表

- 1) Nobusue H, Onishi N, Shimizu T, Sugihara E, Oki Y, Sumikawa Y, Chiyoda T, Akashi K, Saya H and Kano K: Regulation of MKL1 via actin cytoskeleton dynamics drives adipocyte differentiation. *Nat Commun* 5: 3368, 2014

##### 2. 学会発表

#### 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

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）  
委託業務成果報告（業務項目）

マルファン症候群及び類縁疾患についての治療薬剤スクリーニングと  
モデル動物を用いた評価に関する調査研究

（分担項目）マルファン症候群の日本人に適した診断基準と治療指針の作成に向けて

担当責任者 武田憲文 東京大学医学部附属病院 循環器内科 特任助教

**研究要旨**

多系統に障害を患う本症患者の受診の便宜を図るため、我々は関連する院内 10 科で「マルファン外来」を開設（2005 年）して各科が横断的に診療する体制を整えた。その上で、日本人の体格に適した診断基準を作成し、予後を規定する心血管合併症の易発症例を早期に同定し医療介入することを目標とした。2015 年 2 月末までに約 900 例の新規受診者があり、約 320 例をマルファン症候群または類縁疾患と診断した。日本人のマルファン症候群では、心血管系や眼、硬膜の所見が多い反面、典型的なマルファン体型（骨基準）ではない症例も多数含まれていた。改訂 Ghnet 基準（2010）は、旧基準（1996 年）より簡便でかつ正診率も劣らず、本邦患者に対しても適切な診断基準と考えられた。

大動脈基部病変の重症度別（解離、待機的外科治療、未解離・未手術）に患者背景を検証したところ、全ての群で本症候群に特徴的な症状・徴候を同程度に有しているながら、解離または外科手術に至った例では、本症としての医療機関でのフォロー歴が乏しかった。さらに重症群で premature termination codon (PTC) を形成する *FBNI* 遺伝子変異が有意に多く、本症の啓蒙活動をさらに展開するとともに、遺伝子解析によるリスク層別化の必要性がある可能性がある。また、上行大動脈径の拡大がある症例ほど内皮機能の低下が認められた。

本症のような多系統疾患では本外来のような総合的診療が必要であり、今後このシステムを全国に広めて行きたい。

**研究協力者**

平田 恭信（東京通信病院病院長）  
今井 靖司（自治医科大学循環器内科准教授）  
藤田 大司（東京大学保健・健康推進本部助教）

**A. 研究背景および目的**

マルファン症候群は、若年で症候群性の大動脈瘤・解離を来す疾患群の一つで、約 5000 人に 1 人の発症率（性差、人種差なし）があり、結合織の脆弱性を特徴とする遺伝性疾患である。本症では、特徴的な体型（長身、長い指趾）、骨格（漏斗胸や後側弯）、眼（水晶体偏位）、肺（気胸）、皮膚（皮膚線状、腹壁ヘルニア）、硬膜拡張、僧帽弁逸脱などの全身の様々な系統に障害を来すことから、その診断と治療には多系統に渡る症状・徴候の評価とその長期的な管理が必要となる。さらに、生活の質（QOL）を改善させるためには、例えば、心血管系障害を持つ患者の腰痛（進行性の後側弯症）の管理、家族や患者が抱えている遺伝に関する不安や疑問、女性患者の妊娠や周産期の管理、などの諸問題にも適切に対応する必要がある。しかしながら、本症では ①確定診断が難しいこと（特

に小児では症状・徴候が揃わない）、②遺伝子変異とその機能発現・表現型との関係が不明な点、③生命予後を規定する大動脈瘤の重症度に関連した遺伝子変異・種類が明らかでないこと、さらには④大動脈瘤の進行予防法が確立されていない点、などの早急に解決されるべき点が山積している。

そこで我々は、循環器内科、胸部外科、血管外科、小児科、整形外科、眼科、女性診療科・産科、ゲノム医学センターなどの関連する各診療科の垣根を取り払ってチーム体制で診療を行う「マルファン外来」を開設（2005 年）し、地域の医療機関と連携しながら、遺伝子解析を含む包括的な診療体制の実践を行ってきた。最近では、典型的なマルファン症候群のみならず、その類縁疾患や非症候群性の家族性大動脈瘤・解離を疑われた患者の紹介例も増えており、