

多様化する医療ニーズに対応した新たな診療提供体制の整備が必要と感じている。

本研究課題では、当院マルファン外来の対象患者であるマルファン症候群及び類縁疾患の診療および遺伝情報に関するレジストリを作成し、日本人に適した診断基準と治療指針の開発に繋がる成果を得ることを目的とする。

B. 研究方法

1) マルファン症候群における臨床データベースの構築

マルファン外来を受診する患者およびその家族の臨床像についての網羅的データベースの構築を行い、臨床像、予後、治療効果などについて解析する。

2) 新・旧診断基準の解析

マルファン症候群は Ghent の基準(1996 年)により診断されるが、本基準は測定項目が多い上に、日本人の体格を反映しておらず、しばしば確診には至らない。日本人患者の診断基準項目を集計するとともに、改訂された Ghent 基準(2010 年)の有用性についても検討する。

3) 遺伝子解析と家系調査

遺伝性血管難病に対する診断的な特定の遺伝子検査の必要性が増している。実際、臨床症状・徴候でマルファン症候群と診断可能な約 6~7 割の患者で *FBNI* 遺伝子の変異が検出され、その他の症候群性の患者の一部で *TGFβ* シグナルに関連する遺伝子の変異 (*TGFBR1*, *TGFBR2*, *SMAD3*, *TGFB2* など) が報告されている。また、非症候群性の患者の一部でも平滑筋の収縮蛋白に関連する遺伝子の変異 (*ACTA2*, *MYH11* など) が知られている。

従来、本院では DNA チップを用いた array 解析と直接シーケンス法を併用して、*FBNI* 遺伝子の解析を実施してきた(現在は直接シーケンス法で解析を主体に解析している)。今年度からは、症状・徴候や家族歴を考慮して、*FBNI* 以外の候補遺伝子 (*TGFBR1*, *TGFBR2*, *SMAD3*, *TGFB2*, *ACTA2*, *MYH11* など) の解析を本格的に開始することとし、過去に *FBNI* 遺伝子の変異が検出されなかった症例・家系についても、これらの解析を順次追加していくこととした。

4) 表現型と遺伝子型の関連性についての検討

FBNI 遺伝子は 65 エクソン(8613 塩基、2871 アミノ酸)から成る大きな遺伝子で、47 個の EGF-like domain の繰り返し構造を有するが、表現型と遺伝子型との関連性は十分には知られていない。*FBNI* 遺伝子に原因変異が疑われる症例について、その表現型と遺伝子型の関連性を検証する。

5) マルファン症候群の病態把握に有用な非侵襲的検査方法の探索

本症の病態生理の理解のため、また診断と治療効果判定の一助としての新しい非侵襲的検査方法を探索する(血中 *TGFβ* 濃度、大動脈脈波伝播速度・内皮機能の解析など)。

<倫理面への配慮>

本研究では、東京大学臨床研究およびヒトゲノム・遺伝子解析研究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。

C. 研究結果

1) マルファン外来を開業以来、2015 年 2 月末までに約 900 例の新規受診者があり、約 4 割数で原因遺伝子の検索(主として *FBNI* 遺伝子)を行ってきた。マルファン症候群の診断については、遺伝子検査を施行せずに、家族歴や臨床症状・徴候のみでマルファン症候群と診断し得る患者数を合わせると約 320 例程度が当院を受診しており、本邦に約 20,000 人程度いると推測される患者数の約 1.6%程度を占める。

Ghent 基準(1996 年)でマルファン症候群と診断された成人 157 例の解析では、バルサルバ洞径の拡大あるいは上行大動脈解離の既往を有する症例が 87.7%、水晶体亜脱臼が 47.0%と高率に認められた一方、骨の大基準を満たした症例は 22.3%と低かった。骨基準では、手首親指徴候(40.7%)、側弯症(40.0%)、偏平足(42.1%)、高口蓋・叢生歯(48.0%)が比較的高頻度で認められた。また、萎縮皮膚線状(53.8%)、硬膜拡張(64.1%)の頻度も高かった。診断基準の一つである「指極長/身長>1.05(手が長い)」の陽性率は 21.5%であり(平均 1.018)、海外のデータ(55%)と比べて低値であった。骨の表現型と大動脈の拡大や解離形成には明らかな相関は認められなかった。

改訂 Ghent 基準(2010 年)では、①水晶体亜脱臼、②バルサルバ洞の拡大あるいは上行大動脈解離、③遺伝性(マルファン症候群と確定診断された血縁者がいる、あるいは *FBNI* 変異が遺伝子検査で検出される)の 3 つを評価し、そのうち 2 つを満たせば診断に至る。また骨基準や気胸、硬膜拡張などの全身所見は、全身スコア(systemic score: 20 点満点)として集計し、7 点以上を判定基準として重視する。旧 Ghent 基準で判定した 339 例を改訂 Ghent 基準で判定した結果、その一致率は約 95%と良好であった。旧 Ghent 基準では陽性であったが改訂 Ghent 基準では陰性となった 14 例の患者は、心血管の表現型を有していないマルファン様体型の症例や水晶体逸脱症候群、MASS 表現型に分類された。その一方で、心血管系の異常を有するが表現型が揃わないため診断に至れなかった 5 例が、改訂 Ghent 基準ではマルファン症候群と診

断された。臨床現場では改訂 Ghent 基準を用いてより簡便かつ迅速に診断を行うことが可能であろう。しかしながら、日本人では、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）ではない症例も多く含まれる。さらに日本人に適した診断基準と治療指針の作成が望まれる。

2) 大動脈基部動脈瘤については、バルサルバ洞径が 45mm に達した場合に外科的手術（大動脈基部置換術）を推奨している。2014 年 12 月時点で、基部動脈瘤に対して待機的手術を施行した 47 例（O 群：手術径 56.6±13.1mm、手術年齢 31.3±11.6 歳）、上行大動脈解離を発症した 26 例（A 群：解離年齢 33.6±8.6 歳）、基部は未手術・未解離である 108 例（N 群：最終測定径 36.1±6.3mm、年齢 29.4±15.5 歳）の 3 群間で臨床情報と遺伝子型との関連性を解析した（各群の対象年齢に有意差なし）。本症候群疑いのために医療機関でのフォローアップを開始された理由（または受診理由）を検討したところ、N 群では家族歴 40.2%、水晶体偏位 14.7%、高身長・長指趾 11.8%、側弯 10.8%、僧帽弁閉鎖不全（収縮期雑音）9.8%であり、本症候群で特徴的な症状・徴候で本症を疑われた症例が多かった。一方、A 群では 77.3%がスタンフォード A 型解離発症を契機に医療機関でのフォローアップが開始されている。また O 群では、先行して発症した B 型大動脈解離を契機に大動脈基部拡大を指摘された例が多く（23.5%）、続いて大動脈閉鎖不全（拡張期雑音）17.7%、家族歴、水晶体偏位、側弯症、高身長・長指趾が 7-9%程度で続いていた。各群で家族歴や主要な表現型である気胸・水晶体偏位・側弯症の有無には差異がないことから、本症候群の啓蒙活動（大動脈の精査）はさらに必要であるとともに、各群間に表現型の重症度や遺伝子型（後述）などの差異を検証する必要がある。

3) 本院での遺伝子解析は、昨年度までは主に *FBNI* 遺伝子のみを解析対象としていた。本年度から、一部の患者（*FBNI* 遺伝子には原因変異がない）でその他の候補遺伝子の解析を開始した。2015 年 2 月末日までに遺伝子変異が確認された患者数は、

(原因遺伝子)	(検出人数)
<i>FBNI</i>	214 名 (173 家系)
<i>FBN2</i>	3 名 (1 家系)
<i>TGFBR1</i>	7 名 (6 家系)
<i>TGFBR2</i>	9 名 (6 家系)
<i>SMAD3</i>	0 名 (0 家系)
<i>TGFB2</i>	1 名 (1 家系)
<i>ACTA2</i>	0 名 (0 家系)
<i>MYH11</i>	9 名 (3 家系)

であるが、過去の検体に順次解析を追加することで、*TGFβ* シグナル伝達系に関わる遺伝子に異常がある症例数（ロイス・ディーツ症候群）はさらに増加すると予測している。原因遺伝子ごとの臨床データベースの構築を行い、臨床像、予後、治療効果などについての解析が必要である。

4) 表現型と *FBNI* 遺伝子型との関連性

FBNI 遺伝子の変異が原因と判断した 185 例（男性 94 名、女性 91 名、平均年齢 30.5±13.8 歳）について、遺伝子型と臨床情報との関連性を解析した。変異は全エクソンに散在し hot spots は確認されず、またその変異種類別では、ミスセンス異常（システイン異常）59 例(33%)、ミスセンス異常（システイン異常以外）46 名(25.3%)、ナンセンス変異 28 名(15.3%)、フレームシフト異常 25 名(13.7%)、スプライス異常 24 名(13.2%)の順に多かった。

水晶体偏位は 33.5%（61 名、有効解析数 n=182）で確認されたが、システイン異常では 55.9%（33 名、n=59）と有意に高率で発症しており、その他の変異種類では 25%以下の発症率であった。従来から、水晶体偏位とシステイン異常との関連性を示唆する報告があり、当院の結果も之を支持した。

また、前述 2) の大動脈の表現型（重症度）による分類（A, O, N 群）と遺伝子変異種類との間にも関連性があり（ $p=0.029$ ）、特に手術群（O）にナンセンスコドンが多く、非手術・非解離例（N）でミスセンス（システイン異常以外）が多いことなどの特徴があった。手術または解離例（A+O：重症群）と非手術・非解離例（N）とでその遺伝子変異種類を比較した場合、重症群で premature termination codon (PTC) を形成する変異（スプライス変異、ナンセンス変異、フレームシフト変異など）が有意に多かった（ $p<0.01$ ）。最近、同様の傾向を示唆する報告があり、当院症例でも之を支持する結果となった。

5) 先天性拘縮性クモ指症と心血管病

先天性拘縮性クモ指症（Congenital contractural arachnodactyly: CCA）は、マルファン症候群と同様の身体的特徴（高身長で手足が長いなど）を呈して鑑別が困難な場合もあるが、手指など大関節の拘縮や外耳変形（crumpled ear など）などの特徴的な表現型を有し、さらには水晶体偏位や大動脈の拡大・解離は殆どないことも知られている。一方で、*FBNI* と相関性の高い *FBN2* 遺伝子が原因遺伝子の一つとして報告されており、近年 心血管病を合併した CCA 患者の報告例も増えている。その病因・病態の解明と実態把握が急務であるマルファン類縁疾患といえる。

今年度、マルファン類縁疾患を疑われ本院を受診した2家系について、心血管病変を合併したCCAと診断した。1家系では、典型的な手指拘縮を呈し、その外耳は大きく軟骨が柔らかいという特徴を備えていた。祖父は大動脈解離(type A)で死去し、父のバルサルバ洞は拡大、息子(小児)は高身長で側弯症を患っており(大動脈拡大はなし)、*FBN2* 遺伝子にスプライシング異常を検出した。同変異で進行性の大動脈拡大を呈した海外の家系が報告されており、日本人でも同様の表現型を呈し得た貴重な家系・遺伝子変異と考えた。

また、孤発例であるが、典型的な手指拘縮と外耳変形、重度の側弯症を患った拡張型心筋症(植え込み式人工心臓装着済)の若年女性症例を経験した。*FBN2* 遺伝子をはじめ既存の類縁疾患の原因遺伝子には異常はなかったが、マルファン症候群でも心筋症(心機能低下)を併発することは知られており、結合織疾患で心疾患を合併する病態を検証する上で貴重な症例と考えた。

6) *MYH11* 遺伝子の異常に伴う家族性大動脈瘤

平滑筋ミオシンをコードする *MYH11* 遺伝子の変異を原因とする非症候群性・若年性大動脈瘤の報告例は少ないが、動脈管開存PDAを合併することなどが知られている。Ghent基準を満たさない家族性解離・瘤家系について遺伝子解析をしたところ、2種類(3家系、計9名)の遺伝子変異(いずれも既知)を検出できた。1家系1名でPDAを認めたと、他の2家系ではPDA合併者はなく、日本人における貴重な家系と考えた。

7) 大動脈病変を予測する非侵襲的検査の探索

マルファン症候群の血管病変では、TGFβシグナル系が亢進状態にあることが報告されており、血液中にその影響が反映されるとの報告がある(血中TGFβ濃度の上昇)。しかしながら、当院32例での検討では、その病状を推測し薬効を判定し得るほどの鋭敏な指標とは考えにくかった。

次に、マルファン症候群39例について前腕動脈駆血による血流依存性血管拡張反応(Flow Mediated Dilation:FMD)による血管内皮機能の評価を行った。血流依存性血管拡張の平均値は $6.5 \pm 2.4\%$ で、体表面積で補正した上行大動脈径と負の相関を示し($R = -0.39, p = 0.02$)、その関連性は多変量解析でも認められた。

D. 考察

1) 日本人に適した診断基準の作成に向けて
旧Ghent基準(1996)では測定項目が多く、全てを網羅するにはCT、心エコー、骨撮影など

の多くの検査と少なくとも循環器内科、眼科、整形外科を受診する必要があった。改訂Ghent基準(2010)は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た。

2) 大動脈基部病変の重症度に関わる因子

本症候群の動脈病変では、TGFβシグナルが過剰に活性化していることが知られているが、血液中の濃度は診断や評価(薬効など)のためのマーカーとして使用することは困難と判断した。一方で、今回の検討で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ことから、血管内皮機能保持を目指した治療がマルファン症候群の血管イベント抑制につながるか否かの検証が必要と考えた。

また、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ながら、解離または外科手術に至った例では、マルファン症候群としての医療機関でのフォロー(精査)歴が乏しかった。各群の年齢には有意な差がないため、重症化する何らかの素因がある可能性と内科的治療(運動制限を含む)で病態の進展を抑制できる可能性などが考えられる。重症群でpremature termination codon (PTC)を形成する変異が有意に多かった点は、前者の関与を示唆するものではあるが、一方でβ遮断薬やロサルタンによる薬剤治療歴とその効果の検証が必要である。

3) 遺伝子解析について

遺伝子変異の有無は診断基準の一つであり非常に重要でニーズも高い。しかしながら、診断が目的であれば必ずしも全例で遺伝子解析が必要ではなく、逆に特定の遺伝子検査で異常が見つからなかったとしても長期的なフォローが必要と判断される症例も多い。現状、遺伝子解析は、診断のために行うには依然高コストであり、本院でも本研究費などを充当しながら行っているため(患者の費用負担なし)、遺伝子解析の適応については、その必要性和社会的・倫理的な諸問題を十分に説明した上で個別に判断している(受診者の約4割程度に遺伝子解析を実施)。

本年度から、*FBN1* 遺伝子以外の候補遺伝子の解析を開始したところ、*FBN2*, *TGFBR1/2*, *TGFBR2*, *MYH11* 遺伝子などの変異を原因とした血管難病を煩う家系が見つかった。ロイス・ディーツ症候群では、その表現型がより広範囲により早期に発症し、さらに眼間開離や二分口蓋垂(裂)、動脈蛇行(特に椎骨動脈)、中小動脈瘤形成などの特異な症状・徴候があることが知られており、本院の症例でも幾つかの特徴を備えていた。*FBN1* 遺伝子以外の候補遺伝子の解析を進めることで、臨床情報と原因遺伝子

の組み合わせを考慮した、血管難病の診断基準と治療指針の作成に繋げたい。

FBNI 遺伝子に限らず、血管難病を引き起こす原因遺伝子を確定できれば、症状・徴候が揃わない小児例への適切な指導・管理などに利用できる家系も相当数存在するため、マルファン症候群やロイス・ディーツ症候群を含む血管難病に対する特定の遺伝子検査を支える社会的基盤・仕組みの整備が急務と考えた。

4) 社会的意義

若年性動脈瘤・解離の診療では、多系統に渡る症状・徴候があるために、正確な診断がつかない、多くの病院または診療科を受診しなければならないなどの困難さがあり、当院マルファン外来には、遠方からも多くの患者が受診するようになった。患者の受診負担を減らせるばかりでなく、遺伝子解析を実施している施設が少ないことも関係していると思われる。同様の総合診療を目的とした診療形態を導入しようとする他施設からの問い合わせも少なくない。今後、我々の遺伝子解析方法を含めた診療スタイルの普及にも努めたい。

E. 結論

東京大学医学部附属病院に開設したマルファン症候群および類縁疾患に特化した「マルファン外来」における診療活動を通じて、その診断には遺伝子解析が重要であること、改訂 Ghent 基準が簡便で本邦患者にも有用であること、早期診断により疾患進展の予防策を講じることの重要性が明らかとなった。本症のような多系統疾患における総合診療体制の必要性を説き、その普及にも務めたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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 *FBNI* or *FBN2* gene mutation, complicated with dilated cardiomyopathy. *Internal Medicine* 2014 (in press)
- 3) Jain R, Barkauskas C.E, Takeda N, Bowie E.J, Aghajanian H, Wang Q, Padmanabhan A, Manderfield L.J, Gupta M, Li D, Li L, Trivedi C.M, Hoan L.M, Epstein J.A.

Plasticity of Hopx+ type I alveolar cells to regenerate type II cells in the lung. *Nature Communications* (in press 2015)

- 4) 藤田大司, 武田憲文, 今井靖, 平田恭信. マルファン症候群の現状と展望. 綜説シリーズ-現代医学の焦点(380). 日本臨床72(6):1163-1171, 2014 (日本臨床社)
- 5) 武田憲文, 藤田大司, 犬塚亮, 谷口優樹, 縄田寛, 山内治雄, 加藤昌義, 西村敬史, 永原幸, 中島淳, 小野稔, 小室一成. マルファン症候群と類縁疾患. 呼吸と循環 2015 (医学書院) (印刷中)
- 6) 武田憲文, 原弘典, 小室一成. 生体心筋細胞は分裂するのか? *Annual Review* 2015. 小室一成, 佐地勉, 坂田隆造, 赤阪隆史編集 (中外医学社) p1-7, 2015
- 7) 武田憲文, 小室一成. 再生医療がもたらす心筋梗塞の治療の将来性についておしえてください. *治療* 96(3):272-274, 2014 (南山堂)

2. 学会発表

- 1) 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 年 1 月 16~18 日)
- 2) 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, 2014/4/11~13)

G. 知的所有権の出願・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

東京大学循環器内科
藤田大司、西村敬史、加藤昌義、
森田啓行、小室一成
東京大学心臓外科
縄田寛、山内治雄、中島淳、小野稔
東京大学小児科 犬塚亮
東京大学整形外科 谷口優樹
東京大学眼科 永原幸
東京大学血管外科 重松邦広
東京通信病院・病院長 平田恭信
自治医科大学・学長 永井良三

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）マルファン症候群患者からの iPS 細胞の樹立

担当責任者 江良 択実 熊本大学発生医学研究所 教授

研究要旨

人工多能性幹細胞（iPS 細胞）は、皮膚由来の線維芽細胞や末梢血液細胞に Sox2, KLF4, Oct3/4, cMyc を発現させ作製する。試験管内で未分化性を維持した状態で増幅可能であり、疾患の標的細胞を誘導し作り出すことができる。そこで病気の発症機序や治療法の開発へ利用できると期待されている。比較的容易に収集可能な血液等から作製できるので、多くの疾患から作製可能である。iPS 細胞樹立のために、国産のセンダイウイルスベクター（SeV ベクター）をさらに改良した新型ベクターを開発した。新しいベクターは、iPS 細胞作製に用いる初期化因子が染色体に組み込まれないように、誘導効率が高く、また、ベクターを早期に除去できる利点をもつ。これらのベクターを使い、マルファン症候群 4 症例の皮膚生検サンプルを収集し、全例から皮膚由来線維芽細胞を樹立、さらに 4 症例から iPS 細胞を樹立した。

A. 研究目的

人工多能性幹細胞（iPS 細胞）は、皮膚由来の線維芽細胞や末梢血液細胞に 4 つの初期化因子 Sox2、KLF4、Oct3/4、cMyc を発現させ作製した多能性幹細胞である。この細胞は試験管内で容易に増幅可能であり、さまざまな細胞を誘導し作り出すことができる。そこで患者由来の iPS 細胞を樹立し、その細胞から病気の標的細胞を作り出して研究することで、病気の発症機序や治療法の開発へ利用できると期待されている。本研究では、マルファン症候群の患者から iPS 細胞の樹立を行った。

B. 研究方法

1. iPS 細胞樹立のための皮膚線維芽細胞の樹立

患者の皮膚生検から、皮膚由来初代線維芽細胞を樹立する。

2. 新型センダイウイルスベクター（SeV）の開発
体細胞から iPS 細胞の誘導効率を向上させ、樹立早期にウイルス除去を可能とする SeV を開発するために、Sox2、KLF4、Oct3/4 の初期化因子が 1 つのウイルスベクター上にタンデムに並んだベクターを

作成する。このベクターを用いて、ヒト線維芽細胞や血液細胞からの iPS 細胞の誘導効率やウイルスの除去率等を調べる。

3. SeV を使った iPS 細胞の確立

SeV によって患者由来線維芽細胞へ初期因子（Oct3/4、Sox2、KLF4、c-Myc）を一過性に発現させ iPS 細胞の樹立を行う。

樹立した iPS 細胞については、1)アルカリフォスファターゼ染色 2)Nanog、Oct3/4、SSEA-4、TRA-1-60 の免疫染色による iPS 細胞の確認を行う。さらに、未分化マーカーの発現を RT-PCR 法にて確認する。

（倫理面への配慮）

1) 倫理審査

疾患由来の iPS 細胞作製とその解析については倫理委員会ですでに承認済みである。また患者サンプルの提供については、提供機関である循環器病センターにおいても倫理審査委員会の承認済みである。

2) 人権擁護上の配慮

本研究は、個人ゲノムそのものの情報を得るわけ

ではない。作製した iPS 細胞等を用いた病因解析・治療薬開発研究は本研究では行わない。また、研究の成果を学術雑誌に投稿することや、学会等で発表する場合、個人が特定される個人情報公表されることはない。本研究のために特別に用意した番号によって管理し、人種・性別・年齢・診断名以外の患者情報はサンプル提供を行う臨床機関にて管理を行う。作製した iPS 細胞は所属機関において施錠できる研究室にて管理し、一般の人々やこの研究に関係ない他の研究者の目に触れることはない。したがって、iPS 細胞から個人の特定の情報につながることはない。また、ヒト iPS 細胞から個体を作製すること、ヒト胚への導入、ヒト胎児への導入、生殖細胞の作製は、行わない。

3) 不利益・危険性の排除や説明と同意

サンプル採取には、研究目的・予想される成果、患者情報の保護、予想される不利益等を同意書に記載している内容に準じて、担当医からの十分な説明の後(必要であれば代表申請者も同席して)、同意(インフォームド・コンセント)を得て行う。

皮膚由来線維芽細胞を得るための皮膚生検は通常の医学診療の範囲で行われている方法に準じて行う。痛みは、局所麻酔注射の時のみである。瘢痕は普通のけがの場合と同じである。以上より、危険性はほとんどない。

本研究による成果が知的財産権の対象になる場合もあるが、提供者に権利が帰属したり、利潤を得ることはない。サンプル提供者にご負担していただく必要経費はなく、また、サンプル提供による謝金・交通費の支給もない。研究にかかる費用については、研究費から支出する。

利益相反について

本研究での利益相反関連事項はない。

C. 研究結果

1. 皮膚由来線維芽細胞の樹立

患者からの同意が得られた 4 例の症例において皮膚生検を行い、全例から iPS 細胞作成に必要な皮膚由来の線維芽細胞を樹立した(表 1)。

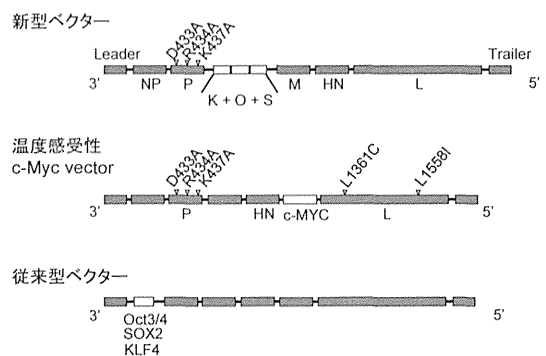
表1 iPS細胞を樹立した症例

症例	年齢	性別	線維芽細胞	iPS細胞
1	60	男性	樹立	樹立
2	35	女性	樹立	樹立
3	30	女性	樹立	樹立
4	29	女性	樹立	樹立

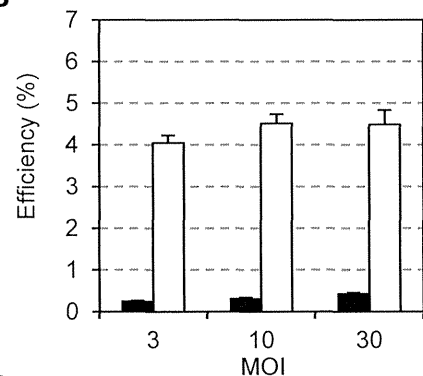
2. 新型ベクターの開発

Sox2、KLF4、Oct3/4 の 3 つの初期化因子をタンデムにつないだセンダイウイルスベクターを作成した(図 1 A)。このベクターを使って正常ヒト線維芽細胞から iPS 細胞を作製すると 4% という高効率で作成することができた(図 1 B)。

A



B



C

	Time of temperature shift	
	Passage 1	Passage 2
Conventional vector	0/22 (0%)	0/22 (0%)
TS12KOS vector	19/23 (84.7%)	15/23 (65.2%)

図1 新型SeV

- A. SeVの構造
- B. ヒト線維芽細胞からのiPS細胞の樹立効率
- C. SeVの除去率

このベクターは温度感受性があるミュータントで 38 度では増殖できない。そこでコロニーを分離後すぐに培養温度を 37 度から 38 度に変更し、5 日間培養し、ウイルス除去率を調べた (図 1 C)。これまでのベクターではほとんど除去できない場合でも、80%以上の高い割合でウイルスを除去することができた。

3. iPS 細胞の樹立

症例から樹立した皮膚由来線維芽細胞を用いて iPS 細胞の作製を行った。線維芽細胞に 4 つの初期化因子(Oct3/4, Sox2, KLF4,c-Myc) を持つセンダイ・ウイルスを感染させ、感染後 1 週間目にマイトマイシンで処理したマウス胎仔初代線維芽細胞 (MEF) 上へまきなおした。

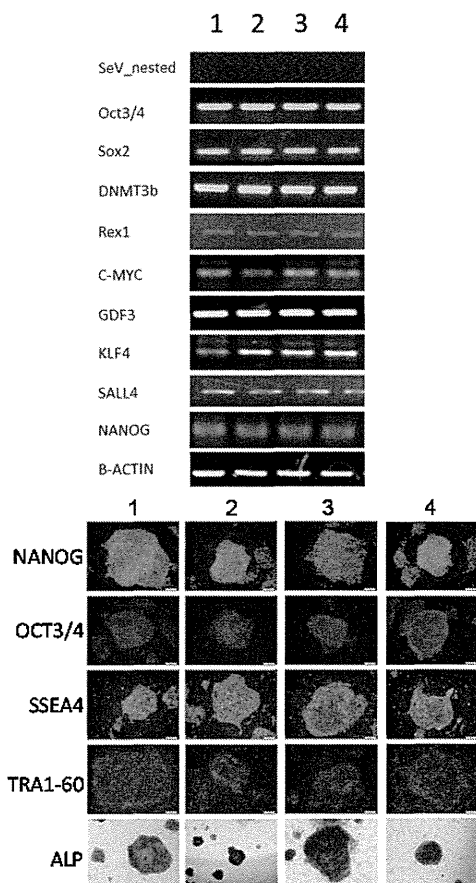


図2 樹立したiPS細胞

- A. 未分化マーカーの発現 (RT-PCR)、
 B. 未分化マーカーの発現 (免疫染色) と
 アルカリフォスファターゼ染色 (ALP)

感染から 14 日目ぐらいからコロニーが出現した。

感染後 25 日目にコロニーを顕微鏡下にてピックアップしそれぞれのクローンを培養、増幅した。その後、ウイルス除去のために培養の温度を 38 度へシフトさせた。RT-PCR 法にてウイルス除去を確認した後、未分化マーカーの発現を免疫染色と RT-PCR にて調べ、iPS 細胞であることを確認した。この研究で計 4 症例から 40 数株の外來因子フリーの iPS 細胞株を樹立した(図 2)。

D. 考察

マルファン症候群患者 4 例より皮膚由来の線維芽細胞を樹立し、それを用いて iPS 細胞を樹立した。線維芽細胞樹立のためには生検が必要であり、コロニーが肉眼で確認でき、ピックアップできるまでに約 1 ヶ月かかる。従来型の SeV では、そこからウイルス除去までさらに 3 か月程度を要していたが、新型ではコロニーピックアップ直後に 80%以上のコロニーでウイルスが除去される。これは、従来型は Myc のみが温度感受性ウイルスであったが、新型では 1 つの温度感受性ウイルスに 3 つの初期化因子を挿入したためと考えられる。さらにこのベクターを用いると血液細胞からも容易に iPS 細胞の樹立が可能である。血液細胞由来の細胞を iPS 細胞作製のソースとすることで、生検を行わずに末梢血の採血で iPS 細胞作製が可能となるために安全かつ容易に行える。

E. 結論

患者 13 例より皮膚由来の線維芽細胞を樹立し、そのうち 4 例から iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞は形態的にも、また、未分化マーカーの発現でも iPS 細胞に矛盾することがなかった。したがって、iPS 細胞が樹立されたと言える。

F. 研究発表

1. 論文発表

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 and Era T. New type of Sendai virus vector provides transgene-free iPS cells derived from chimpanzee blood. *PLoS One*. 9 :e113052, 2014.

2. 学会発表

1. Soga M, Hamasaki M, Yoneda K, Nakamura K, Matsuo M, Irie T, Endo F and Era T.

Establishment of disease model using induced pluripotent stem cells derived from Niemann-Pick disease type C INTERNATIONAL SOCIETY FOR STEM CELL RESERCH 12th annual meeting. Vancouver, June 18th, 2014.

2. 江良 択実 骨・代謝性疾患由来 iPS 細胞を使った疾患モデルと治療薬開発 第 35 回日本炎症・再生医学会年会 教育講演 2014 年 7 月 2 日、沖縄

3. 江良 択実 iPS 細胞研究の進展 難治性疾患由来 iPS 細胞の樹立、解析とそのバンク化 第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム疾患 iPS 細胞 2014 年 10 月 15 日 京都

4. 江良 択実 iPS 細胞を使った難病研究 第 27 回日本動物実験代替法学会大会 シンポジウムヒト iPS 細胞を用いた創薬研究の新たな展開 2014 年 12 月 7 日 横浜

G. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書 籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
森崎裕子	Loeys-Dietz 症候群, Shprintzen-Goldberg 症候群	黒澤健司	神経症候群 (第2版) IV.	日本臨床社	東京	2014	598-601

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Morisaki H</u> , <u>Morisaki T</u>	Loeys-Dietz syndrome	Pediatr Cardiology and Cardiac Surg	30	232-238	2014
Shimizu H, Mori A, Yoshitake A, Yamada T, <u>Morisaki H</u> , Okano H, Yozu R	Thoracic and thoracoabdominal aortic repair under regional spinal cord hypothermia	Eur J Cardiothorac Surg	46	40-43	2014
Nishida K, Tamura S, Yamazaki S, Sugita R, Yamagishi M, Noriki S, <u>Morisaki H</u>	Postoperative mitral leaflet rupture in an infant with Loeys-Dietz syndrome	Pediatr Int	56	e82-85	2014
Nakajima T, Tachibana K, Miyaki Y, Takagi N, <u>Morisaki T</u> , Higami T	Acute dilatation of the ascending aorta and aortic valve regurgitation in Loeys-Dietz syndrome	Ann Thorac Surg	97	2188-2190	2014
<u>森崎裕子</u>	遺伝性循環器疾患における遺伝子医療の現状	医学のあゆみ	250	365-370	2014
<u>森崎裕子</u>	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
Nobusue H, Onishi N, Shimizu T, Sugihara E, Oki Y, Sumikawa Y, Chiyoda T, Akashi K, <u>Saya H</u> , Kano K	Regulation of MKL1 via actin cytoskeleton dynamics drives adipocyte differentiation.	<i>Nature Communications</i>	5	3368	2014
Takenouchi T, Ohyagi M, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, <u>Kosaki K</u>	.Porencephaly in a fetus and HANAC in her father: Variable expression of COL4A1 mutation.	Am J Med Genet		in press	2015

Fujita D, <u>Takeda N</u> , Imai Y, Inuzuka R, Komuro I, Hirata Y.	Pathophysiology and Japanese clinical characteristics in Marfan syndrome.	Pediatr Int.	56	484-491	2014
Yagi H, Hatano M, <u>Takeda N</u> , 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 <i>FBN1</i> or <i>FBN2</i> gene mutation, complicated with dilated cardiomyopathy.	Internal Medicine		in press	2014
藤田大司, <u>武田憲文</u> , 今井靖, 平田恭信	マルファン症候群の現状と展望. 綜説シリーズ-現代医学の焦点(380)	日本臨床	72	1163-1171	2014
武田憲文, 藤田大司, 犬塚亮, 谷口優樹, 縄田寛, 山内治雄, 加藤昌義, 西村敬史, 永原幸, 中島淳, 小野稔, 小室一成	マルファン症候群と類縁疾患.	呼吸と循環		in press	2015
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, <u>Era T</u> .	New type of Sendai virus vector provides transgene-free iPS cells derived from chimpanzee blood.	Plos One	9	e113052	2014

Loeys-Dietz 症候群

森崎 裕子, 森崎 隆幸

国立循環器病研究センター研究所分子生物学部

Keywords :

Loeys-Dietz syndrome, *TGFBR1*,
TGFBR2, TGF- β signaling pathway,
Marfan syndrome

Loeys-Dietz Syndrome

Hiroko Morisaki, Takayuki Morisaki

Department of Genetics and Bioscience, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan

Loeys-Dietz syndrome (LDS) is an autosomal dominant genetic disorder characterized by vascular (arterial tortuosity, aneurysms and/or dissections), craniofacial (hypertelorism, bifid uvula/cleft palate, craniosynostosis), and skeletal manifestations (pectus excavatum or pectus carinatum, scoliosis, joint laxity, arachnodactyly, talipes equinovarus); however, not all symptoms are always present in patients. Clinical features possibly overlap with Marfan syndrome, but the most characteristic feature of LDS is aggressive and widespread arterial aneurysms throughout the arterial tree, which needs frequent echocardiography or CT/MRA examinations and early therapeutic intervention. LDS is best managed with a multidisciplinary team of specialists, including pediatric and adult cardiologists, cardiothoracic surgeons, orthopedists and medical geneticists. The genes responsible for LDS are *TGFBR1* and *TGFBR2*, and *SMAD3* and *TGFB2* are also involved in LDS-related phenotypes. These genes are all related to the TGF- β signaling pathway.

要 旨

Loeys-Dietz 症候群 (LDS) は、動脈瘤 / 解離、蛇行性血管などの血管症状、特徴的顔貌 (眼間開離、二分口蓋垂 / 口蓋裂、頭蓋骨早期癒合)、および種々の骨格症状 (漏斗胸、鳩胸、側彎、関節過可動、クモ状指、内反足) を呈する常染色体優性遺伝性の全身性結合組織異常である。症例による症状の幅は広く、また必ずしも前記すべての症状を伴うとは限らないが、何らかの血管症状をほぼ全例で認める。Marfan 症候群 (MFS) に酷似した臨床症状を呈する症例も多く、MFS と診断されている場合も少なくないが、MFS に比し、より若年期からの大動脈基部拡大と、より広範な動脈瘤形成 / 解離の傾向があり、乳幼児期から循環器科の積極的介入が求められることも多い。また、治療管理においては、循環器科、整形外科、形成外科、遺伝科の各専門医を含むチームアプローチが必要である。原因遺伝子は、*TGFBR1* および *TGFBR2* であるが、ほかの TGF- β シグナル伝達系分子である *SMAD3* や *TGFB2* 遺伝子の異常によっても類似の症状を呈することがわかり、これらも LDS の亜型とされている。

はじめに

Loeys-Dietz 症候群 (LDS) は、2005 年に Marfan 症候群 (MFS) 類似の血管系および骨格系病変を主症状とする、常染色体優性遺伝性の全身性結合組織疾患として新たに提唱された疾患概念である¹⁾。論文報告時の 3 主徴

は、「動脈蛇行」「眼間開離」「二分口蓋垂」とされていたが、当初より、小児期からの大動脈基部の高度拡大と若年期での大動脈解離が重要視されており、MFS 以上に循環器科の積極的な介入が求められているため、小児循環器領域においても知っておくべき重要な症候群の一つである。

特別寄稿：第 13 回日本小児心血管分子研究会指定講演より

2013 年 12 月 20 日受付 別刷請求先：〒 565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1

2014 年 3 月 11 日受理

国立循環器病研究センター研究所分子生物学部 森崎 裕子

概念・歴史的経緯

LDS とよく対比される MFS は、骨格症状(クモ状指趾、高身長、側彎、漏斗胸・鳩胸)、水晶体偏位、大動脈病変(基部拡張・瘤・解離)を主症状とする全身性結合組織疾患で、*FBNI* 遺伝子(15q21)の変異による常染色体優性遺伝病である。以前より、MFS に酷似した臨床像を呈するも、水晶体亜脱臼が認められず、*FBNI* とは異なる座位(3p24)と連鎖を示す常染色体優性遺伝の遺伝性症候群が知られており、2 型 MFS とされていた。2004 年、2 型 MFS の原因遺伝子が、トランスフォーミング増殖因子ベータ(TGF- β)に対する II 型受容体をコードする *TGFBR2* 遺伝子であることが、水口らにより明らかにされ²⁾、さらに翌年、Loeys および Dietz により、*TGFBR2* のみならず、TGF- β I 型受容体遺伝子(*TGFBR1*)の変異でも類似の臨床像を呈することが示された¹⁾。これらの遺伝子変異を有する症例では、MFS 同様、大動脈瘤・解離、側彎、クモ状指などの臨床像を呈するが、MFS とは異なり、眼間開離、口蓋裂/二分口蓋垂などの特徴的な顔貌や、全身血管の蛇行、頭蓋骨縫合早期癒合、先天性心疾患、精神運動発達遅滞などの合併をしばしば認めたことにより、新たな疾患概念として認められ、報告者 2 人の名を冠して、Loeys-Dietz 症候群と命名された。

その後、症例の遺伝子解析が進むにつれ、*TGFBR1* および *TGFBR2* の遺伝子変異を有する患者のなかには、特徴的な顔貌をあまり認めず、むしろ、血管型 Ehlers-Danlos 症候群(vEDS)類似の皮膚症状を呈する症例もあることがわかり、2006 年、従来の患者群を LDS1 型、後者の患者群を LDS2 型と分類することが提唱されたが³⁾、1 型・2 型の間に明確な分類基準はない。最近、同じ TGF- β シグナル伝達系分子である *SMAD3* や TGF- β 2 をコードする遺伝子の変異によっても「動脈蛇行」「眼間開離」「二分口蓋垂」などの類似の臨床型を呈することが示され^{4,6)}、これらも広義の LDS に加えられているが、臨床症状や経過は原因遺伝子によりやや異なる。2013 年現在の OMIM 分類では、*TGFBR1* および *TGFBR2* 遺伝子変異を有し、LDS に特徴的な「眼間開離」「二分口蓋垂」の所見を呈し顔貌異型性の強いものをそれぞれ LDS1A および LDS1B、同じ *TGFBR1* および *TGFBR2* 遺伝子変異によるが、特徴的顔貌に乏しくむしろ vEDS 類似の皮膚所見を呈するものを LDS2A および LDS2B、*SMAD3* 遺伝子変異によるものは LDS3、*TGFBR2* 遺伝子変異によるものは LDS4 と分類されている。本稿でもこの分類に沿って概説するが、*SMAD3* および *TGFBR2* 遺伝子変異によるものは型

LDS とされ症例報告数も少ないため、特に記載がなければ *TGFBR1* および *TGFBR2* 遺伝子変異による LDS についての記述とする。

疫 学

TGFBR1 および *TGFBR2* などの TGF- β シグナル伝達系遺伝子の変異により発症する単一遺伝子病である。遺伝形式は常染色体優性遺伝であるため、罹患した親からは児の性別に関係なく 50%の確率で次世代に伝わる。LDS の約 25%は両親いずれかに由来する遺伝子変異により発症し、約 75%は新生突然変異によるとされている³⁾。親から遺伝した場合の遺伝的浸透率はほぼ 100%と考えられるが、症状および重症度については、同一家系内でも個人差が大きい。有病率は、症例報告もまだ少なく不明であるが、MFS が疑われた患者の約 5%が、遺伝子解析の結果 LDS であったという報告もある。

平成 21 ~ 23 年度の厚労省研究班の解析では、臨床的に MFS が疑われた患者の 12%が遺伝学的検査により LDS と判明しており、MFS の有病率が 5,000 ~ 10,000 人に 1 人であることを考えあわせると、数万から 20 万人に 1 人と推定される。原因遺伝子別では、*TGFBR2* 遺伝子変異例が 70%、*TGFBR1* 遺伝子変異例が 20%、*SMAD3* 遺伝子変異例が 5%、*TGFBR2* 遺伝子例が 1%程度とされるが、当院での解析では、*TGFBR2* 遺伝子変異例と *TGFBR1* 遺伝子変異例がともに 40%でほぼ同数であり、*SMAD3* 変異例も 14%と比較的多かった。これは、LDS2A や LDS3 に分類される症例では、身体的特徴が乏しく未診断の症例が多いためと考えられた。

病因・病態

TGF- β シグナル伝達系分子の異常により発症する (Fig. 1)。TGF- β は、各種細胞の増殖・分化の調節に関わる多機能分泌因子であるため、このシグナル伝達系の異常により全身の結合組織に症状があらわれるが、なかでも血管系、顔貌、骨格系、皮膚の症状が特徴的である。遺伝子変異のほとんどは機能喪失型のミスセンス変異あるいは部分欠失変異であるにもかかわらず、組織解析では、下流の TGF- β シグナル系が亢進していることが多くの実験で示されている。MFS でも、原因遺伝子である *FBNI* のハプロ不全により TGF- β シグナル伝達系への抑制作用が不十分となることが病態生理の根幹にあるとされており、最近では TGF- β シグナル

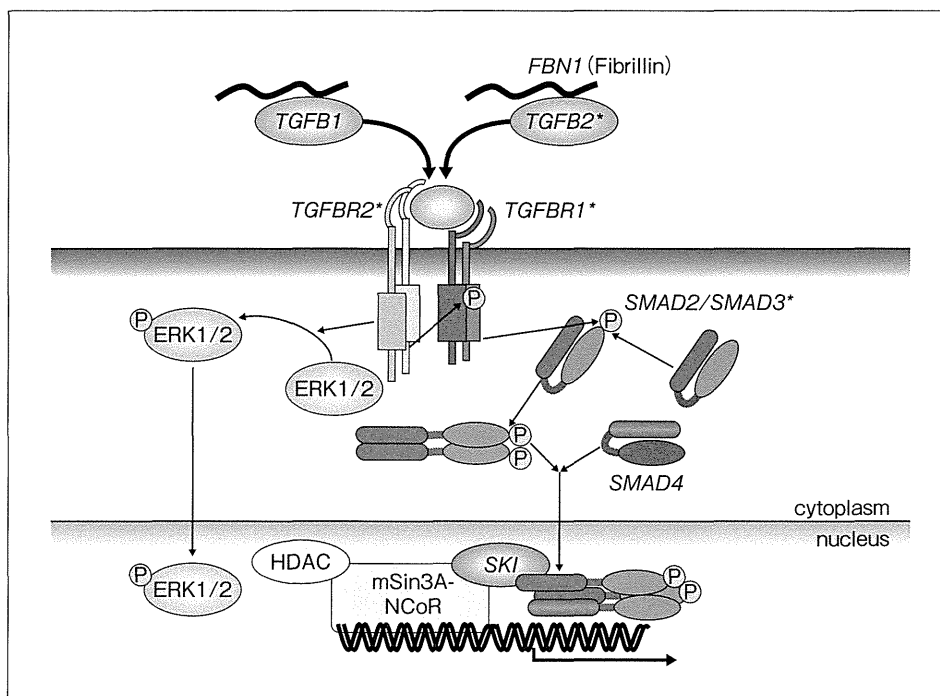


Fig. 1 TGF- β signaling pathway genes.

Genes associated with LDS (*TGFBR1*, *TGFBR2*, *SMAD3* and *TGFB2*) are members of the TGF- β signaling pathway as shown here. Fibrillin 1, coded by *FBN1* for Marfan syndrome, is also known to regulate TGF- β activity.

系の亢進がこれら2疾患に共通する病態であると考えられている。

臨床所見

1. 心血管系：大動脈瘤・中小動脈瘤・蛇行・先天性心疾患(PDA, VSD/ASD, BAV, ほか)

胸腹部大動脈の拡張または解離は、*TGFBR1*あるいは*TGFBR2*遺伝子変異によるLDS1, LDS2では95%以上、*SMAD3*遺伝子変異によるLDS3でも80%の患者で認められ、予後を考えるうえで最も重要な所見である。拡張部位はMFSと同様に大動脈基部(バルサルバ洞)を含んでいる場合がほとんどである(Fig. 2A)が、一部に基部拡張を伴わないまま下行大動脈の解離に至る症例も存在する。また、大動脈解離は、MFSに比べより小さい血管径で発症することが指摘されており、患者管理上、MFSとの鑑別は重要である。

また、MFSでは、病変部位は大動脈にほぼ限局しているのに対し、LDSでは、上腸間膜動脈、鎖骨下動脈、総腸骨動脈(Fig. 2B)、冠動脈、脳動脈など、あらゆる分枝動脈に及ぶのも特徴的である。血管の病理組織像では、弾性線維の断裂、エラスチン成分(弾性成分)の消失、中膜における無形基質成分の沈着を認める⁷⁾。これ

らの変化は、幼少児の手術症例でも認められることにより、弾性線維の破壊に伴う二次的な変化というより、弾性線維形成そのものが重度に障害されていると考えられる。なお、病理所見からだけでは、MFSとの鑑別は難しい。

動脈蛇行はLDSにおける代表的所見であるが、必ずしも全例で認めるわけではない。しかし、動脈瘤形成が明らかでない若年期から認めることもあり診断的価値は高い(Fig. 2C)。頭頸部の動脈で認めることが多いため、LDSが疑われる患者では、頭頸部血管を含めた画像検査が勧められる。

先天性心疾患の合併は当初より指摘されており、報告例での合併頻度は20～50%程度であるが、当院での解析症例では28%で、なかでもPDA, ASDが比較的多かった。心奇形自体は治療の対象にはならないことも多いが、心奇形合併による血行動態の変化が血管病変をより重症化させることもあり、注意が必要である。僧帽弁逸脱(MVP)は、20～30%程度に認められるという報告もある。当院の解析例でも27%であり、MFSに比べると合併頻度は低い。*SMAD3*遺伝子変異によるLDS3ではMVPの頻度が50%という報告もあるが、当院の解析例では13例中1例に認めたのみである。

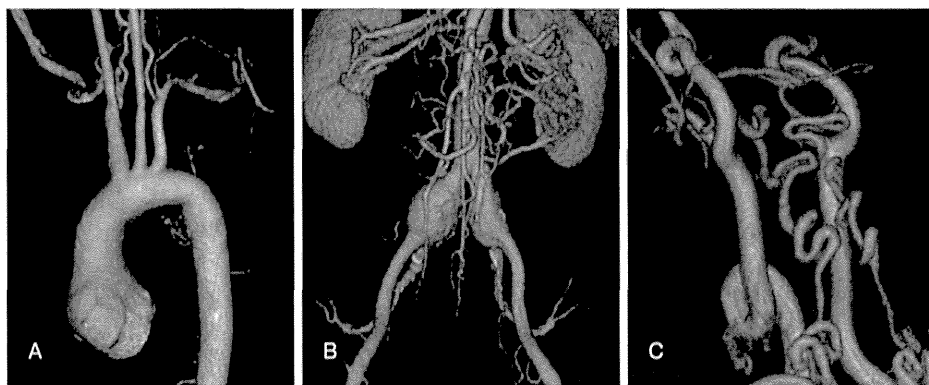


Fig. 2 Vascular manifestations in LDS.
A: Aortic root dilatation (Φ 60mm), B: Bilateral CIA aneurysm, C: Tortuosity of vertebral arteries

2. 特徴的顔貌：眼間開離，口蓋裂／二分口蓋垂(Fig. 3A)，頭蓋骨縫合早期癒合による頭蓋変形(Fig. 3B)，小顎・顎後退，頬骨低形成，眼裂斜下，青色強膜，斜視，高口蓋，叢歯，早老様顔貌など

眼間解離，口蓋裂／二分口蓋垂(軽症では分割線だけを認める幅広の口蓋垂の場合もある)はLDSに共通する特徴的な所見として強調される。当院の解析症例でも，それぞれ91%，73%に認めた。これらの異形性の重症度と心血管系合併症の重症度が相関するという報告もある。ただし，これらの所見がMFSでも時にみられることには留意すべきである。

3. 骨格系：細長い指(クモ状指)(Fig. 3C)，側彎，漏斗胸・鳩胸，先天性内反足(Fig. 3D)，頸椎不安定症・頸椎骨奇形，関節過可動性，関節拘縮，扁平足などクモ状指，側彎，漏斗胸・鳩胸，関節過可動性，などの骨格の特徴はMFSに類似するが，高身長は必ずしも伴わない。前記のうち，先天性内反足，頸椎不安定症・頸椎骨奇形，関節拘縮などはMFSでは頻度の低い所見であることから，これらの所見を認めたときはLDSの可能性を念頭におく。ただし，骨格所見をほとんど認めないLDS症例もある一方，MFSでも時にこれらの所見が認められることには留意すべきである。

SMAD3 遺伝子変異によるLDS3では，早期発症の骨関節症が特徴的であり，Aneurysms-Osteoarthritis Syndrome (AOS)ともいわれる。若年発症の変形性骨関節症に伴う指趾骨や脊椎骨の変形や骨折，骨端症，関節炎等を高頻度に認めるとされ，論文報告例ではほぼ全例で，当院の症例でも40歳以上の患者の80%で認めた。好発部位は，脊椎骨，手指・手首，膝であるが，ほぼ全身の部位で罹患の可能性があり，手術が必要とされる場合も少なくない。

4. 皮膚：柔らかく，静脈血管が透けてみえる薄い皮膚，易出血性，ヘルニア，創傷治癒遅延など

これらは，*COL3A1* 遺伝子異常によるvEDSではよく認める所見であるが，LDSではvEDSに比しその程度は軽い。血管透過性の薄い皮膚は，小児期には特に眉間部で高頻度に認め，診断的価値が高いとされる。一方，MFSで高頻度に認める線条性皮膚萎縮は，比較的少ない。

5. その他

MFSの60%で認める水晶体偏位はいずれのタイプのLDSでも認められず，鑑別診断上最も重要である。気胸はMFS同様に認めることがあるが，合併頻度は低い。当初の論文報告では，精神発達遅滞が症状の一つにあげられていたが，現在では，頭蓋骨縫合早期癒合症や水頭症に伴う二次的なものと考えられており，通常，知能発達は正常である。女性の場合，MFS同様に周産期における大動脈解離のリスクは高い。その他，LDSではvEDS同様に子宮破裂の症例が報告されており，妊娠分娩時に特に注意すべき事項としてあげられている。しかし，実際には子宮破裂は稀であり，適切な心血管系管理下においては，多くの場合，妊娠・分娩は可能である。

[参考]原因遺伝子の違いによる臨床所見の比較(Table 1)

診 断

臨床所見や家族歴より同疾患が疑われる場合には，遺伝子検査で診断を確定する。なお，多くのLDS患者は，2006年に設定されたMFSの診断基準であるGhent基準を満たすことから，従前には，MFSと診断されていた症例も多い。こうした状況を踏まえ，2010年に

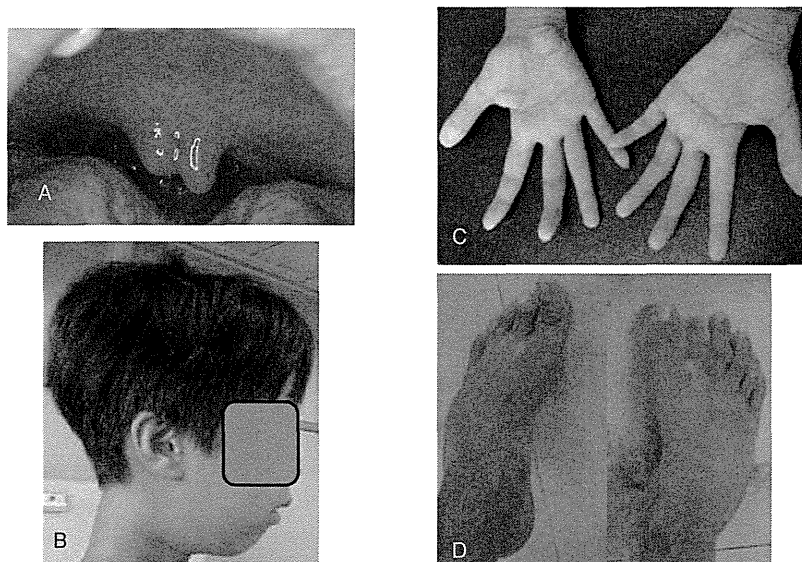


Fig. 3 Clinical features of LDS.
A: bifid uvula, B: craniosynostosis, C: arachnodactyly, D: talipes equinovarus

Ghent 基準の改訂が行われ, MFS と LDS が鑑別されるに至っている⁸⁾.

・水晶体偏位(MFS との鑑別)
・斜視

診断後の評価

1. 心血管系

(1) 心臓超音波検査

大動脈基部径の拡大, 大動脈弁閉鎖不全, 僧帽弁逸脱・逆流の有無を調べる. 基部拡張の評価は, 体表面積に対応した基準値をもとに算出した Z 値で行うことが推奨されている⁹⁾.

(2) 造影 CT または MRA

胸腹部大動脈から分枝動脈に至る全身の動脈系についてスクリーニングを行う. 動脈蛇行は, 診断上有用な所見であるが, 脳血管および頸部血管で認められることが多い.

2. 骨格系

以下の評価を行う (X 線撮影・CT・MRI).

- ・漏斗胸・鳩胸, 側彎, 扁平足
- ・頭蓋骨縫合早期癒合
- ・頸椎不安定性
- ・Chiari I 奇形
- ・脊髄硬膜拡張

3. 眼科的検査

一般的検査に加え, 以下の評価を行う.

治療と管理

対症療法が基本である. 全身性疾患であるため, 循環器科, 整形外科, 眼科, 遺伝科各専門医によるチーム診療が望ましい.

1. 循環器科

生命予後への影響が最も大きい. 心血管系の管理は最も重要である. MFS と比べ, より小さい血管径でも解離を発症する可能性があること, 約半数の患者では, 大動脈基部以外の動脈にも動脈瘤・拡張を認めることに注意する.

(1) 降圧剤

大動脈基部拡張を認める患者では, 圧負荷による径の拡張を抑制するために, 高血圧の合併がなくても全例で降圧剤治療が必須である. 降圧剤としては, β 遮断薬および ARB (アンジオテンシン II 受容体拮抗薬) が一般的に使用される. MFS 同様, Losartan が有効であるとされる (私信) が, 症例数が少ないため統計的にはまだ立証されていない.

(2) 予防的大動脈基部人工血管置換術

致命的な急性 A 型大動脈解離の発生を予防するため, 基部径の拡張を認めた患者では予防的に大動脈基部を人工血管に置換する手術が推奨される. MFS に比

Table 1 Comparison of clinical features between LDS and MFS.

gene	LDS			MFS
	TGFBR1 / TGFBR2	SMAD3	TGFB2	FBNI
Cleft palate/bifid uvula	++	+	+	—
Hypertelorism	++	+	+	—
Craniosynostosis	++	—	—	—
Ectopia lentis	—	—	—	+++
Tall stature	+	+	++	+++
Arachnodactyly	++	+	+	+++
Pectus deformity	++	++	++	++
Club foot	++	+	++	—
Osteoarthritis	+	+++	+	+
Aortic root aneurysm	++	++	++	+++
Arterial aneurysm	++	+	+	—
Early dissection	+++	++	+	+
Arterial tortuosity	++	++	+	—
Mitral valve insufficiency	+	+	++	++
Bicuspid aortic valve	++	+	+	—
Skin Striae	+	+	+	++
Hernia	+	+	++	+
Dural ectasia	+	+	+	+

—: absent or at population frequency, +: observed, ++: common, +++: typical

(Modified from Nat Genet 2012; 44: 922-927)

べ、小さい血管径でも解離を発症するため、成人では大動脈基部径が4cmを超えた時点で手術が勧められ、小児でも、大動脈基部径のZ値が4以上、あるいは年間拡張率が0.5cmを超えた場合に手術が勧められる。なお、骨格病変が強い症例ではより早期に解離する傾向があるとされているため、Z値が3以上になったら手術を考慮すべきという意見もあるが、長期予後と考えた際の人工血管径との適合性から、大動脈弁輪径が1.8～2cmに達するまでは、可能な限り内科的治療を優先する¹⁰⁾。術式は、MFSと同様に、自己弁温存手術(David手術)あるいは、自己弁温存が困難な症例においては弁付き人工血管置換術(Bentall手術)が行われる。わが国においては小児に対する自己弁温存手術は積極的には行われていないが、欧米では、小児においても良好な成績を収めており、長期的にみても再手術率は低いことから、術後の抗凝固療法を必要としない自己弁温存手術が推奨されている^{10, 11)}。

2. その他の診療科：整形外科，形成外科，眼科，口腔外科，ほか

対症療法が基本であり、MFSに準じる。頭蓋骨縫合早期癒合症の合併例では、頭蓋内圧亢進により脳発達障害を生じる可能性があるので注意する。

最近の動向：ARBによる大動脈拡張抑制効果について

2003年、MFSの原因遺伝子*FBNI*がコードするFibrillin 1タンパクは、大動脈や肺の組織においてTGF- β を不活性型に保持する働きをしており、その機能不全によるTGF- β の過剰な活性化がMFSの病態の根底にあることが、モデルマウスの実験により示された¹²⁾。その後、TGF- β 受容体異常で発症するLDSにおいても、TGF- β の下流シグナルは亢進していること、*SLC2A10*などTGF- β とは直接関係がないと考えられている遺伝子の異常による動脈瘤でも、TGF- β の活性が上昇していることが示された。最近では、こうしたTGF- β シグナル系の亢進が、大動脈瘤発症・進展の共通機序ではないかと考えられている。これらの研究成果を受け、2006年には、TGF- β 抑制作用のあるARB製剤のLosartan(ニューロタン®など)により*FBNI*変異マウスにおける大動脈瘤発症が実際に抑制できることが示され¹³⁾、その後複数の臨床試験において、MFS患者に対するLosartanの大動脈拡張抑制効果の有用性が示されてきている^{14, 15)}。一方、LDSのモデルである*TGFB2*ヘテロ欠失マウスにおいても、Losartanが有効であることが実験で示されており(私信)、現時点ではLDSの治療の第1選択剤と考えられている。

謝 辞

写真を提供いただきました国立循環器病研究センター放射線診療部の東将浩先生，愛知県心身障害者コロニー中央病院小児科の水野誠司先生に深謝いたします。

【参考文献】

- 1) Loeys BL, Chen J, Neptune ER, et al: A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet* 2005; **37**: 275-281
- 2) Mizuguchi T, Collod-Beroud G, Akiyama T, et al: Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome. *Nat Genet* 2004; **36**: 855-860
- 3) Loeys BL, Schwarze U, Holm T, et al: Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N Engl J Med* 2006; **355**: 788-798
- 4) van de Laar IM, Oldenburg RA, Pals G, et al: Mutations in SMAD3 cause a syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis. *Nat Genet* 2011; **43**: 121-126
- 5) Boileau C, Guo DC, Hanna N, et al: TGFB2 mutations cause familial thoracic aortic aneurysms and dissections associated with mild systemic features of Marfan syndrome. *Nat Genet* 2012; **44**: 916-921
- 6) Lindsay ME, Schepers D, Bolar NA, et al: Loss-of-function mutations in TGFB2 cause a syndromic presentation of thoracic aortic aneurysm. *Nat Genet* 2012; **44**: 922-927
- 7) Maleszewski JJ, Miller DV, Lu J, et al: Histopathologic findings in ascending aortas from individuals with Loeys-Dietz syndrome (LDS). *Am J Surg Pathol* 2009; **33**: 194-201
- 8) Loeys BL, Dietz HC, Braverman AC, et al: The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *J Med Genet* 2010; **47**: 476-485
- 9) Roman MJ, Devereux RB, Kramer-Fox R, et al: Two-dimensional echocardiographic aortic root dimensions in normal children and adults. *Am J Cardiol* 1989; **64**: 507-512
- 10) Van Hemelrijk C, Renard M, Loeys B: The Loeys-Dietz syndrome: an update for the clinician. *Curr Opin Cardiol* 2010; **25**: 546-551
- 11) Everitt MD, Pinto N, Hawkins JA, et al: Cardiovascular surgery in children with Marfan syndrome or Loeys-Dietz syndrome. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009; **137**: 1327-1332; discussion 1332-1323
- 12) Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, et al: Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet* 2003; **33**: 407-411
- 13) Habashi JP, Judge DP, Holm TM, et al: Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science* 2006; **312**: 117-121
- 14) Brooke BS, Habashi JP, Judge DP, et al: Angiotensin II blockade and aortic-root dilation in Marfan's syndrome. *N Engl J Med* 2008; **358**: 2787-2795
- 15) Chiu HH, Wu MH, Wang JK, et al: Losartan added to beta-blockade therapy for aortic root dilation in Marfan syndrome: a randomized, open-label pilot study. *Mayo Clin Proc* 2013; **88**: 271-276



 OPEN ACCESS

Citation: Fujie Y, Fusaki N, Katayama T, Hamasaki M, Soejima Y, et al. (2014) New Type of Sendai Virus Vector Provides Transgene-Free iPSC Cells Derived from Chimpanzee Blood. *PLoS ONE* 9(12): e113052. doi:10.1371/journal.pone.0113052

Editor: Diego Fraidraich, Rutgers University - New Jersey Medical School, United States of America

Received: July 15, 2014

Accepted: October 17, 2014

Published: December 5, 2014

Copyright: © 2014 Fujie et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All DNA array data can be found at the Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). The accession number is GSE62572. Additional materials can be obtained by request from the corresponding author.

Funding: This study was supported in part by grants from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan, Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO), and Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Project of the Primate Research Institute, Kyoto University. DNAVEC Corporation provided support in the form of salaries for authors MH & HB, but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. NF was provided with salary by JST grant (PRESTO). The specific roles of these authors are articulated in the 'author contributions' section.

Competing Interests: HB is an employee of DNAVEC Corporation. M. Hasegawa is a founder and adviser of DNAVEC Corporation. NF was an employee of DNAVEC Corporation until January 2013 but not now. The commercial product developed by DNAVEC Corporation is similar to the vectors described in this paper but the component is different. The patent of the Sendai virus vectors to generate iPSC cells that was applied by and of DNAVEC Corporation is pending (WO/2010/008054). NF and HB have waived the right of the patent. These do not alter the authors'


RESEARCH ARTICLE


New Type of Sendai Virus Vector Provides Transgene-Free iPSC Cells Derived from Chimpanzee Blood

Yasumitsu Fujie^{1,9}, Noemi Fusaki^{2,3,9*}, Tomohiko Katayama¹, Makoto Hamasaki¹, Yumi Soejima¹, Minami Soga¹, Hiroshi Ban², Mamoru Hasegawa², Satoshi Yamashita⁴, Shigemi Kimura⁵, Saori Suzuki⁶, Tetsuro Matsuzawa⁷, Hirofumi Akari^{6,8}, Takumi Era^{1*}

1. Department of Cell Modulation, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University, 2-2-1 Honjo, Chuo-ku, Kumamoto 860-0811, Japan, 2. DNAVEC Corporation, 6 Ookubo, Tsukuba, Ibaragi 300-2611, Japan, 3. Precursory Research for Embryonic Science and Technology, Japan Science and Technology Agency, 4-1-8 Honcho Kawaguchi, Saitama, Japan, 4. Department of Neurology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, 1-1-1 Honjo, Chuo-ku, Kumamoto 860-8556, Japan, 5. Department of Child Development, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, 1-1-1 Honjo, Chuo-ku, Kumamoto 860-8556, Japan, 6. Section of Comparative Microbiology and Immunology, Center for Human Evolution Modeling Research, Primate Research Institute, Kyoto University, Inuyama, Aichi 484-8506, Japan, 7. Section of Language and Intelligence, Primate Research Institute, Kyoto University, Inuyama, Aichi 484-8506, Japan, 8. Laboratory of Evolutional Virology, Experimental Research Center for Infectious Diseases, Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto, 606-8507, Japan

*tera@kumamoto-u.ac.jp

 These authors contributed equally to this work.

 Current address: Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine, 35 Shinano-machi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

Abstract

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are potentially valuable cell sources for disease models and future therapeutic applications; however, inefficient generation and the presence of integrated transgenes remain as problems limiting their current use. Here, we developed a new Sendai virus vector, TS12KOS, which has improved efficiency, does not integrate into the cellular DNA, and can be easily eliminated. TS12KOS carries *KLF4*, *OCT3/4*, and *SOX2* in a single vector and can easily generate iPSCs from human blood cells. Using TS12KOS, we established iPSC lines from chimpanzee blood, and used DNA array analysis to show that the global gene-expression pattern of chimpanzee iPSCs is similar to those of human embryonic stem cell and iPSC lines. These results demonstrated that our new vector is useful for generating iPSCs from the blood cells of both human and chimpanzee. In addition, the chimpanzee iPSCs are expected to facilitate unique studies into human physiology and disease.

adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Introduction

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) artificially produced from mammalian somatic cells including mouse and rat, human, marmoset, rhesus monkey, and pig can be induced to undergo sustained, unlimited growth and give rise to various cell types *in vitro* [1–7]. Because of these features, iPSCs have important potential applications as a source for cell therapy in clinical medicine. The iPSCs derived from patients also represent a powerful tool both for understanding disease pathogenesis and for investigating the effects of drugs at the individual and disease level on patient-derived cells [8].

While iPSCs derived from a range of mammalian species could serve as useful translational and disease models for cell and drug therapies, cell lines derived from nonhuman primates are particularly useful for such studies because the anatomical and physiological features of these species tend to be more similar to human than those of other mammals [9, 10]. Among nonhuman primates, the chimpanzee is often not a suitable experimental model because of breeding limitations; however, the chimpanzee shares some important physiological features with humans such as surface antigen cross-recognition by antibodies [11, 12]. Chimpanzees and humans occasionally share common pathogens, including ebola virus and hepatitis virus type B [13]. Thus, chimpanzee cells and stem cells derived from them represent powerful tools for both research and clinical applications in human disease.

The process of iPS cell generation, known as reprogramming, is triggered by the expression of four transcription factors, Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc, which are the same core factors underlying pluripotency in other stem cells such as embryonic stem cells (ESCs) [14]. Since overexpression of the four factors was initially mediated by lentivirus and retrovirus vectors in human skin-derived fibroblasts [5, 15], many methods have been reported including those involving transposons [16], proteins [17], microRNAs [18], and plasmids [19]. Recent progress has seen the increasing use of either plasmids or Sendai virus (SeV) vectors to generate iPS cells easily and quickly from human peripheral blood cells [20, 21]. Both methods are simple to conduct compared to other procedures, and are safer because there is no integration of transgenes into the host genome; however, the frequency of iPS cell colony generation remains low (~0.1%) and it is difficult to attain completely vector-free iPSCs.

Here, we generated a new SeV vector that enables highly efficient generation of iPS cells from peripheral blood cells, is temperature-sensitive (TS), and is quickly and efficiently eliminated from the established iPSCs by temperature shift. In addition to the generation of human iPSCs, we succeeded in establishing iPSC lines derived from the blood cells of chimpanzees.

Results

Vector generation

We previously generated iPSCs by using SeV vectors containing the sequences for four reprogramming factors (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* and *c-MYC*) [22]. Here, to increase the efficiency of iPSC generation and reduce the length of time the vector remains inside the cells, we generated a new TS-SeV vector, TS12KOS, carrying coding sequences for three of the above factors, *KLF4* (K), *OCT3/4* (O), and *SOX2* (S) (Fig. 1a) tandemly linked in the KOS direction. The TS12KOS vector contains three mutations that produce alanine residues (D433A, R434A, and K437A) in the large protein (L)-binding domain of the phosphoprotein (P), a component of SeV RNA polymerase. SeV carrying these three mutations showed moderate expression of GFP at 37°C, but weak expression at temperatures above 38°C [23]. In a previous study, *c-MYC* was inserted between the sequences encoding the HN and L proteins in the TS15 SeV vector (HNL/TS15 *c-MYC*), which carries two other mutations (L1361C and L1558I) in addition to the triple mutation described above [23]. This vector is also temperature-sensitive and only weakly expressed at temperatures greater than 37°C. In this study, TS12KOS vector and a cocktail of conventional vectors carrying three reprogramming factors individually (*OCT3/4*, *SOX2* and *KLF4*), namely the conventional vectors, were used with HNL/TS15 *c-MYC* in following experiments.

First, we compared TS12KOS with the conventional SeV vectors for the efficiency of iPSC generation from human skin fibroblasts of healthy volunteers (Fig. 1b). Based on the numbers of colonies showing alkaline phosphatase (AP)-positive staining and human ESC-like morphology on day 28 after induction, we found that the efficiency of iPSC generation was significantly higher using the TS12KOS vector than with the conventional vectors.

We next examined the effect of temperature shift on iPSC generation from human fibroblasts. When the culture temperature was shifted from 37°C to 36°C for the initial two weeks after infection, the efficiency of colony formation remained high; however, when the temperature downshift continued for three weeks or more after infection, the efficiency tended to decrease in the samples from healthy volunteers (Fig. 1c). Therefore, a temperature downshift for the initial one week only was used in the following experiments.

We next conducted nested RT-PCR analysis of viral RNA to determine whether the TS12KOS vector was eliminated from the iPSCs earlier than the conventional SeV vectors. The nested RT-PCR analysis detects the viral genome with much higher sensitivity than single PCR [24]. We expanded the individual colonies and shifted the temperature from 37°C to 38°C for 3 days at various passages. In the conventional SeV infections, temperature upshifts at passage 1 or 2 induced no virus removal. In contrast, when the temperature of TS12KOS vector-infected cells was upshifted at passages 1 and 2, 84% and 65%, respectively, of iPSC-like clones were negative for viral genomic nucleic acid (Fig. 1d). These results indicated the TS12KOS vector superiority over the conventional SeV vectors in both efficiency of iPSC generation and elimination of virus from the iPSCs.