

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）  
分担研究報告書

エーラス・ダンロス症候群、マルファン症候群の診断と臨床情報採集、  
先天異常症候群、疾患ガイドラインの改定、疾患レジストリ作成

研究分担者 森崎 裕子  
公益財団法人榊原記念財団付属 榊原記念病院 臨床遺伝科 科長

### 研究要旨

血管型エーラス・ダンロス症候群、マルファン症候群およびその類縁疾患であるロイス・ディーツ症候群は、細胞外マトリックスを構成するタンパクあるいはその制御分子の遺伝子異常により発症する先天性結合組織異常であり、いずれも大動脈解離をはじめとする心血管系イベントを発症するリスクが高い疾患である。これらの疾患では、臨床症状においては共通する点も多く、身体所見や一部の心血管症状のみから鑑別をすることはしばしば困難である一方、心血管合併症の罹患範囲や経過、血管外合併症などでは異なる点も多いため、遺伝子ごとの特徴をふまえた適切な対応のために遺伝学的検査による確定診断が必須であった。こうした背景のもと2016年に遺伝学的検査が保険収載され、衛生検査所でのNGS解析による診断の精度も増したため、ここ数年は、遺伝学的検査の件数は倍増している。その一方で、通常のNGS解析では解析困難な遺伝子バリエーションの存在も明らかになってきた。こうした症例の遺伝子解析については、血液や毛包に含まれる微量のmRNAを利用した非侵襲的な解析方法が有効であることを示すことができた。

### 研究協力者

小原 収 かずさ DNA 研究所 副所長  
中山 敦子 榊原記念病院 内科副部長

### A. 研究目的

血管型エーラス・ダンロス症候群(vEDS)、マルファン症候群(MFS)、およびその類縁疾患であるロイス・ディーツ症候群(LDS)は、細胞外マトリックスを構成するタンパクあるいはその制御分子の遺伝子異常により、結合組織の脆弱性に起因する諸症状を呈する先天性疾患である。一方、これらの疾患の症状としては、心血管系をはじめとし、側弯・胸郭異常などの骨格症状や関節過可動性などの関節症状、肺合併症など多彩であり、かつ、共通する点もおおい。本研究では、類縁疾患も含めて、遺伝学的検査で診断が確定した患者の臨床情報を収集し、遺伝学的検査に結びつけるために有用な臨床情報からその多様性について検討し、診断基準や難病対策における重症度分類に有用な情報を得ることを目的とする。今年度は、特に、確定診断のための遺伝学的検査の妥当性や改善点について検討した。

### B. 研究方法

今年度は、昨年度に引き続き、先行研究から継続している「マルファン症候群等の若年性・家族性動脈疾患の病因解明のための遺伝子解析」研究において、遺伝学的検査により診断が確定したマルファン症候群、ロイス・ディーツ症候群患者の自験例を対象に、診断基準との妥当性について検討した。なお、臨床情報は、匿名化データベースの情報を元に解析した。

遺伝学的検査は、まず、血液ゲノム DNA を用い、該当 3 疾患および類縁疾患の原因とされる 17 遺伝子について NGS パネル解析を行った。病原性バリエーションが検出されなかった症例については、exome 解析による追加解析を行った。

また、血液ゲノム DNA 解析では検出できない、あるいは病原性の判定が困難なスプライシング異常の解析法として、血液や毛包に含まれる微量の mRNA を用いたトランスクリプトーム解析を行った。

## 1) ゲノム DNA 解析

### a) NGS パネル解析

末梢血から抽出したゲノム DNA を用い、該当する検査対象遺伝子のたんぱく質コード領域エクソンとそのイントロン境界部分をハイブリダイゼーションにより濃縮し、次世代シーケンサーによる遺伝子配列決定を行った。

(パネル解析対象遺伝子)

*FBN1, TGFBR1, TGFBR2, ACTA2, COL3A1, EFEMP2, FBN2, FLNA, MYH11, MYLK, SLC2A10, SMAD3, TGFB2, TGFB3, SMAD2, COL1A1, PRKG1*

### b) exome 解析

末梢血から抽出したゲノム DNA を用い、NEXTflex Rapid DNA-Seq kit (Perkin-Elmer 社) にてライブラリーを構築後、改変 VCGS clinical exome panel (TWIST Bioscience 社) にて濃縮を行い、イルミナ社 NextSeq2000 にて NGS 解析を行った。結果については、以前に報告した変異解析法 (Fujiki R, Ikeda M, Yoshida A, et al: Assessing the Accuracy of Variant Detection in Cost-Effective Gene Panel Testing by Next-Generation Sequencing. J Mol Diagn 2018;20: 572-582.) にて絞り込みを行い、検出された病原性バリエーションについてはサンガー法 (両方向解析) による確認を行った。

## 2) mRNA 解析

血液リンパ球および毛包細胞から、RNA 抽出キットにて抽出した RNA を用い、NGS 解析にて transcriptome 解析を行った。

(倫理面への配慮)

「マルファン症候群等の若年性・家族性動脈疾患の病因解明のための遺伝子解析」(榊原記念病院倫理委員会(16-035)) として研究同意を得ている。

3) 本邦におけるマルファン症候群、ロイス・ディーツ症候群、血管型エーラス・ダンロス症候群の症例数の遺伝子ごとの分布を、かずさ DNA 研究所において解析した結果から検討した。

## C. 研究結果

### 1) ゲノム DNA 解析

今年度は、当院受診者では、マルファン症候群 12名、ロイス・ディーツ症候群2名 (LDS2 1名, LDS3 1名)、血管型エーラス・ダンロス症候群1名が、新たに診断された。これらの患者においては、臨床診断と遺伝子診断との間に

矛盾は生じなかった。また、臨床症状のみで診断が確定していた症例では全6例で病原性変異が検出された。

### b) exome 解析

exome解析により、パネル解析対象遺伝子に新たな変異は検出されなかったことより、現行の NGS パネル解析の変異検出率が十分に高いことが示された。また、従来の Sanger 法による解析では検出が難しいとされた CNV も 12 例で原因となる領域欠損・重複を認めており、変異検出効率が高いことが示された。

パネル解析対象外の遺伝子では、今回新たに 1 例で *PMEPA1* 遺伝子にフレームシフトバリエーションを検出した。*PMEPA1* 遺伝子は、新たなロイス・ディーツ症候群関連遺伝子として米国人類遺伝学会 (ASHG) 2017 および国際マルファン学会 (Int. Marfan Symposium) 2018 で、学会報告をしていたが、その後、他の 2 家系でも同変異を検出し、また、欧米の共同研究者からも同様の遺伝子変異を検出したという連絡が相次ぎ、各国での症例をまとめて、今年度、Nature Medicine 誌に共同研究として報告した。

このバリエーションを有する患者では、高頻度で LDS 様の骨格系症状を呈するものの、大動脈病変の合併頻度や A 型解離発症例は MFS/LDS に比べて比較的少なかった。一方、B 型解離のリスクは高いことから、慎重なフォローが必要なが示された。

## 2) mRNA 解析

国際的ゲント診断基準を満たしたマルファン症候群患者で、*FBN1* の既報同義置換型バリエーション (*FBN1*:c.6354C>T(p.Ile2118=)) を検出した症例について、血液リンパ球および毛包細胞から抽出した mRNA を用いた transcriptome 解析を行った。その結果、このバリエーションにより、当該エクソンが除外されたトランスクリプトが正常トランスクリプトと同等量検出され、この SNV が exon-skipping の原因バリエーションであることが確認された。現在、イントロン・バリエーション(未報告)を検出した症例および MFS 確定診断例であっても原因バリエーションが検出されなかった他院の症例についても、同様の解析を進めている(結果未着)。

### 3) 本邦での遺伝子解析の実態

2020年4月より2023年3月までの3年間の間に、かずさDNA研究所から解析支援として相談を受け、病原性変異として原因バリエーションが同定された件数は、

2020年度 129件

2021年度 189件

2022年度 197件

と年々増加しており、本邦での保険診療としての遺伝学的検査が、診断ツールとして定着してきたといえる。また、このうち14件は、サンガー法では解析不可能とされる広範囲CNVであり、NGS解析の優位性が示された。

#### D. 考察

血管型エーラス・ダンロス症候群(vEDS)、マルファン症候群(MFS)、およびその類縁疾患であるロイス・ディーツ症候群(LDS)の診断のためのNGSパネル解析は、極めて有効であり、また、CNV変異についても変異検出効率が高いことが示された。ただし、パネル解析の対象となっているのは、エクソン周辺のバリエーションのみであり、スプライシング変異、特に deep intron 部のバリエーションによるスプライシング異常の検出は、困難である。今回、血液細胞や毛包から抽出した mRNA を用いた transcriptome 解析を行ったが、高精度で異常を検出できることが示され、ゲノム解析の補助解析として有効であることが示された。

#### E. 結論

血管型エーラス・ダンロス症候群(vEDS)、マルファン症候群(MFS)、およびその類縁疾患であるロイス・ディーツ症候群(LDS)はいずれも遺伝学的検査による遺伝子診断が診断のために極めて有効である。現在、本邦ではNGSパネル解析による解析が中心に行われているが、それにより確定診断に至る件数が年々増加傾向にあり、保険診療としての遺伝学的検査が、診断ツールとして定着してきたことが示された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Imamura T, Omura T, Sasaki N, Arino S, Nohara H, Saito A, Ichinose M, Yamaguchi K, Kojima N, Inagawa H, Takahashi K, Unno T, Morisaki H, Ishikawa O, Yoshikawa G, Okada Y. Case Report: Spontaneous Postpartum Quadruple Cervicocephalic Arterial Dissection With a Heterozygous COL5A1 Variant of Unknown Significance. *Front Neurol.* 2022;13:928803.
- 2) Minatogawa M, Unzaki A, Morisaki H, Syx D, Sonoda T, Janecke AR, Slavotinek A, Voermans NC, Lacassie Y, Mendoza-Londono R, Wierenga KJ, Jayakar P, Gahl WA, Tiffit CJ, Figueroa LE, Hilhorst-Hofstee Y, Mauger A, Ishikawa K, Kobayashi T, Aoki Y, Ohura T, Kawame H, Kono M, Mochida K, Tokorodani C, Kikkawa K, Morisaki T, Kobayashi T,

Nakane T, Kubo A, Ranells JD, Migita O, Sobey G, Kaur A, Ishikawa M, Yamaguchi T, Matsumoto N, Malfait F, Miyake N, Kosho T. Clinical and molecular features of 66 patients with musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome caused by pathogenic variants in CHST14 (mcEDS-CHST14). *J Med Genet.* 2022;59(9):865-77.

- 3) Muroi A, Shiono J, Ihara S, Morisaki H, Nakai Y. Nonsurgical treatment of cerebral ischemia associated with ACTA2 cerebral arteriopathy: a case report and literature review. *Childs Nerv Syst.* 2022;38(6):1209-12.
  - 4) Seike Y, Matsuda H, Inoue Y, Sasaki H, Morisaki H, Morisaki T, Kobayashi J. The differences in surgical long-term outcomes between Marfan syndrome and Loeys-Dietz syndrome. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2022;164(1):16-25 e2.
  - 5) Seike Y, Yokawa K, Koizumi S, Masada K, Inoue Y, Morisaki H, Morisaki T, Sasaki H, Matsuda H. Long-term durability of a reimplantation valve-sparing aortic root replacement can be expected in both Marfan syndrome and Loeys-Dietz syndrome. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2022;61(6):1318-25.
  - 6) Yokota T, Koiwa H, Matsushima S, Tsujinaga S, Naya M, Morisaki H, Morisaki T. Loeys-Dietz Cardiomyopathy? Long-term Follow-up After Onset of Acute Decompensated Heart Failure. *Can J Cardiol.* 2022;38(3):389-91.
  - 7) 森崎裕子. 【心疾患のプレコンセプションケア】Marfan 症候群類縁疾患のプレコンセプションケア. *心臓.* 2022;54(12):1325-9.
  - 8) 森崎裕子. 遺伝性大動脈疾患 遺伝学的検査による早期診断と管理. *脈管学.* 2022;62(10):105-10.
  - 9) 森崎裕子. 【知っておくべき周産期・新生児領域の遺伝学的検査を展望する】結合織疾患 Marfan 症候群、Loeys-Dietz 症候群、Ehlers-Danlos 症候群. *周産期医学.* 2022;52(5):734-7.
  - 10) Greene D, Genomics England Research C, Pirri D, Frudd K, Sackey E, Al-Owain M, Giese APJ, Ramzan K, Riaz S, Yamanaka I, Boeckx N, Thys C, Gelb BD, Brennan P, Hartill V, Harvengt J, Kosho T, Mansour S, Masuno M, Ohata T, Stewart H, Taibah K, Turner CLS, Imtiaz F, Riazuddin S, Morisaki T, Ostergaard P, Loeys BL, Morisaki H, Ahmed ZM, Birdsey GM, Freson K, Mumford A, Turro E. Genetic association analysis of 77,539 genomes reveals rare disease etiologies. *Nat Med.* 2023;29(3):679-88.
- ##### 2. 学会発表
- 1) 森崎裕子「遺伝性大動脈瘤・解離：臨床診断と遺伝学的検査」, 横浜, 2022.10.29, 国内

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