

平成21年 5月 14日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19590875

研究課題名（和文） 若年性大動脈解離性疾患の原因遺伝子の解析と探求

研究課題名（英文） Genetic analyses for juvenile-onset aortic aneurysms and dissections

研究代表者

森崎 裕子（MORISAKI HIROKO）

国立循環器病センター研究所・バイオサイエンス部・室長

研究者番号：40311451

研究成果の概要：

研究期間中、マルファン症候群及び Loey-Dietz 症候群を含む若年性大動脈解離性疾患患者 169 例（マルファン症候群及び Loey-Dietz 症候群 133 例、若年性大動脈瘤または解離 36 例）のゲノム DNA 検体を収集し、大動脈置換手術を受けた患者 50 例については摘出大動脈組織および血管平滑筋初代培養細胞より抽出した RNA を用いて、遺伝子解析を行った。

また、これまでに収集した 204 例のマルファン症候群及び類縁疾患の疑いの患者のうち、臨床所見のそろった 135 例について、現行の診断基準であるゲント基準との適合性を検討したところ、現行の診断基準では、マルファン症候群と Loey-Dietz 症候群を臨床的に鑑別できないことが明らかとなった。他方、遺伝子検査がこれらの疾患の診断において重要な役割を果たしていることも確認された。その他、*FBNI* 遺伝子変異を認めた発端者について、遺伝子型と臨床型との相関を検討した。

若年性大動脈解離性疾患患者の新規疾患原因遺伝子の探索では、非症候群性の若年性大動脈解離性疾患患者（家族発症例または孤発例）60 例中 9 例において、*ACTA2* 遺伝子変異を同定し、これまでの候補遺伝子に比べてこの遺伝子の変異寄与率が大きいことが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学、血管病態学、

キーワード：マルファン症候群、Loey-Dietz 症候群、遺伝性大動脈解離症候群、遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

マルファン症候群（MFS）・遺伝性大動脈解離症候群（TAAD）・Loey-Dietz 症候群（LDAS）はいずれも若年性大動脈解離を高

率に合併する遺伝性疾患群であり、大動脈合併症の早期発見及び早期治療が、生命予後を決定するともいえる。マルファン症候群の診断は欧米人患者を元に設定された診断基準

に基づいた理学所見による診断が中心であるために本邦の患者への適応に問題のあることもあり、また、分子遺伝学的診断法として不十分である。また、マルファン症候群以外の若年性大動脈解離症候群でも、病変の発症機序から同様の治療効果が期待されるが、この場合、理学的所見のみによる早期診断はしばしば困難である上、原因遺伝子が未だ同定されていないものも多く、これらについての遺伝学的診断法は確立されていない。

2. 研究の目的

マルファン症候群 (MFS)・遺伝性大動脈解離症候群 (TAAD)・Loeys-Dietz 症候群

(LDAS)を含む遺伝性若年性大動脈解離性疾患の遺伝的素因を明らかにし、早期診断に役立てると主に、TGF- β シグナル伝達を含めた発症機構の解明を目指す。

具体的には、

(1) 若年性大動脈解離性疾患の患者のゲノム DNA および血管組織より抽出した RNA を用いた遺伝学的解析による遺伝子型・表現型相関解析

マルファン症候群の日本人患者における診断基準の妥当性を検討する。

また、可能であれば、

(2) 若年性大動脈解離性疾患患者の血管組織における新規疾患原因遺伝子の探索、

(3) 若年性大動脈解離性疾患患者の血管組織における TGF- β シグナル伝達に関わる遺伝子群の発現解析

(4) 若年性大動脈解離性疾患患者の血管平滑筋由来初代培養細胞における TGF- β 刺激に対する応答性の解析、も行う。

3. 研究の方法

(1) 若年性大動脈解離性疾患の患者のゲノム DNA および血管組織より抽出した RNA を用いた遺伝学的解析による遺伝子型・表現型相関解析

患者末梢血リンパ球から抽出したゲノム DNA を用い、*FBN1*, *FBN2*, *TGFBR1*, *TGFBR2*, *GLUT10* 遺伝子の変異解析を行う。また、大動脈置換手術を受けた患者の摘出大動脈組織およびこれより初代培養分離した血管平滑筋細胞から抽出した RNA を用いて、上記遺伝子および、*COL3A1*(Ehlers Danlos 症候群IV型)、*MYH11*(血管平滑筋特異的 myosin heavy chain)の RT-PCR 解析を行い、各患者における遺伝子変異の包括的な解析を行う。また、また、遺伝子解析を行った患者の詳細な臨床データの採集も同時に行い、genotype-phenotype 相関解析を行う。

(2) 若年性大動脈解離性疾患患者の血管組織における新規疾患原因遺伝子の探索

新規遺伝子としては、まず、家族例よりすでに報告のある、5q13、11q23、16p13等に存在する遺伝子を候補として、解析を進める。

4. 研究成果

2007年4月から2008年3月までに、当院及び協力医療機関を受診したマルファン症候群及びLoeys-Dietz症候群を含む若年性大動脈解離性疾患患者169名(マルファン症候群及びLoeys-Dietz症候群133例、若年性大動脈瘤または解離36例)の検体を収集し、遺伝子解析を行った。また、大動脈置換手術を受けた患者50例について摘出大動脈組織より血管平滑筋細胞を初代培養分離し、将来の解析に備えて細胞ストックを作成するとともに、遺伝子解析も行った。

(1) 若年性大動脈解離性疾患の患者のゲノム DNA および血管組織より抽出した RNA を用いた遺伝学的解析 (*FBN1*, *FBN2*, *TGFBR1*, *TGFBR2*による遺伝子型・表現型相関解析

①臨床的にマルファン症候群あるいはLoeys-Dietz症候群が疑われた症例163例中、93例で*FBN1*遺伝子変異、3例で*TGFBR1*遺伝子変異、6例で*TGFBR2*遺伝子変異、1例で*COL3A1*遺伝子変異、1例で*FBN2*変異を同定した。(臨床所見の再検討の結果、*COL3A1*遺伝子変異例は、IV型Ehlers-Danlos症候群、*FBN2*遺伝子変異例は、Beals症候群であることが判明)。*GLUT10*遺伝子、*ACTA2*遺伝子には変異を認めなかった。

②症候群性大動脈疾患以外の若年性大動脈瘤または解離を発症した36例の解析では、1例で*TGFBR2*遺伝子変異を検出した。

③臨床型と遺伝子型との相関の検討

これまでに収集した204例のマルファン症候群あるいはLoeys-Dietz症候群疑いの患者のうち、臨床所見のそろった135例(うち発端者105例)について、遺伝子型と表現型の検討を行った。

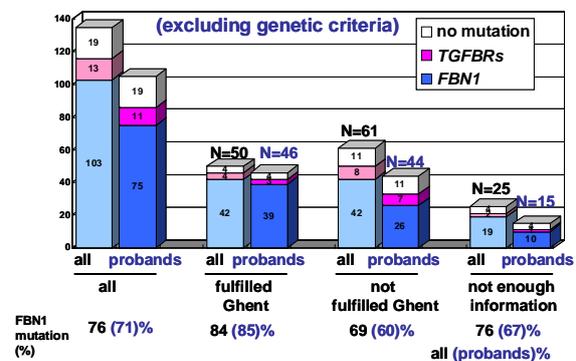


図1. ゲント診断基準との適合性

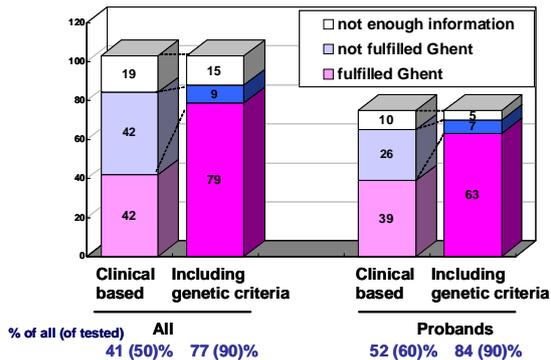


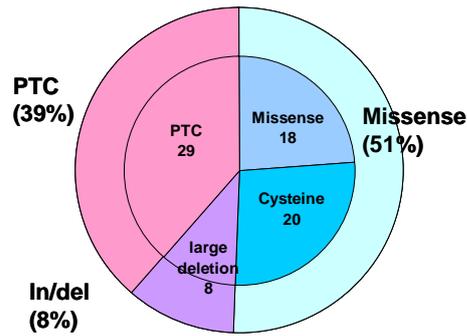
図2. 遺伝項目を含めた場合のгент基準との適合性

まず、現行の診断基準であるгент基準との適合性を検討した。遺伝項目を除外して臨床所見を検討したとき、гент基準を満たした症例では、84%で *FBNI* 遺伝子の変異を検出したが、一方、Loeys-Dietz 症候群の原因遺伝子である *TGF β* 受容体の変異も8%の症例で認めた。(図1) これより、現行の診断基準では、マルファン症候群と Loeys-Dietz 症候群を臨床的に鑑別できないことが明らかとなった。これらの2疾患は、経過や予後、治療法の選択においても異なるため、新規の診断基準の設定が望まれる。

また、*FBNI* 遺伝子変異を認めた症例のうち、гент基準を満たしたのは、50%にすぎなかった。一方、遺伝子解析の結果を遺伝項目として再検討したところ、遺伝項目の追加により、*FBNI* 遺伝子変異を認めた症例の約90%がгент基準を満たしていた。この結果は、遺伝子診断が診断において重要な役割を果たしていることを示唆している。(図2)

骨格系基準では、*FBNI* 遺伝子変異を認めた症例の70%で罹患(大症状2以上、または、大症状1+小症状2)を認めたが、大症状4という大基準を満たす症例は15%であった。骨格系の基準は、欧米人の計測結果に基づく基準値であり、日本人にはそのままでは当てはまらないことは従前より指摘されていたが、実際、成人例について「指間長：身長>1.05」を調べたところ、1.05の基準値を超える症例は、*FBNI* 変異例の16%にすぎず、一方、13%の症例では1.00以下であったことより、日本人における基準作りの必要性が示唆された。

心血管系大基準を満たす症例は、*FBNI* 遺伝子変異例の77%、眼系大基準は変異例の32%、硬膜大基準は変異例の44%であった。



(PTC: Premature Termination Codon)

図3. *FBNI* 遺伝子型別頻度

FBNI 遺伝子変異は、ミスセンス変異、特にシステイン残基に関連した変異が多く、dominant negative 効果による病態であると従来は考えられていたが、最近では、haplo-insufficiency が本質であろうと考えられるようになってきた。そこで、変異を、ミスセンス変異(システイン関与有り、関与なし)、広範囲(1エクソン以上)のinframe欠失、早期停止型変異(PTC変異: Nonsense mediated decayにより、haplo-insufficiencyを引き起こす)に分けて頻度と臨床所見を検討した。

FBNI 遺伝子変異を認めた発端者で検討すると、変異型分類では、ミスセンス変異は51%であり、早期停止型変異は39%と従来考えられていた以上に、早期停止型変異が多かった。(図3)

重症度には、変異型による有意な差は認めなかったが、システインが関与したミスセンス変異を有する患者群で、水晶体亜脱臼の合併頻度が有意に高かった。

(2) 若年性大動脈解離性疾患患者の血管組織における新規疾患原因遺伝子の探索

① *ACTA2* 遺伝子の解析

2007年に家族性胸部大動脈瘤の原因遺伝子として、血管平滑筋アクチンをコードする *ACTA2* 遺伝子が同定された。この結果を受けて、当研究室に蓄積された若年性大動脈解離性疾患患者の検体のうち、これまでの解析で遺伝子変異が同定されていない患者97例について *ACTA2* 遺伝子の解析を行った。臨床的にマルファン症候群あるいはLoeys-Dietz 症候群が疑われた症例でこれまでに変異の検出されていない患者検体37例の解析では、有意な変異は認められなかったが、非症候群性の若年性大動脈解離性疾患患者(家族発症例または孤発例)60例の解析において、9例(うち発端者6例)において、*ACTA2* 遺伝子変異を同定した。家族発症例に限れば、19家系中4家系(21%)

で *ACTA2* 遺伝子変異が同定されたことになり、これまでの候補遺伝子に比べてこの遺伝子の変異寄与率が大きいことが示唆された。また、家族発症例に限らず、孤発例 26 例の解析でも 2 例(7.7%)で変異を認めた。また、家族例の解析では、遺伝子型と表現型の concordance には矛盾は見られなかったが、変異を有していても大動脈所見を認めない症例も認められ、遺伝的浸透率は 100%ではないことが明らかとなった。(論文投稿中)

②その他の候補遺伝子の解析

以上に挙げた遺伝子以外にも、従来より遺伝性大動脈解離の責任領域とされている 11q23、16p13 の各領域の候補 2 遺伝子について遺伝子解析を進めているが、現時点で新たな原因遺伝子の同定には至っていない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ①. Akutsu K, Morisaki H, Takeshita S, Ogino H, Higashi M, Okajima T, Yoshimuta T, Tsutsumi Y, Nonogi H, and Morisaki T, Characteristics in phenotypic manifestations of genetically proved marfan syndrome in a Japanese population. *Am J Cardiol.* 103(8): p. 1146-1148.(2009). 査読有
- ②. Yamawaki T, Nagaoka K, Morishige K, Sadamatsu K, Tashiro H, Yasunaga H, Morisaki H, and Morisaki T, Familial thoracic aortic aneurysm and dissection associated with marfan-related gene mutations: case report of a family with two gene mutations. *Intern Med.* 48(7): p. 555-558.(2009). 査読有
- ③. 森崎裕子, 森崎隆幸, Marfan 症候群－遺伝子変異・治療法についての最近の知見. *日本小児循環器学会雑誌*.(2009). (in press) 査読有
- ④. Matsuo K, Matsuo A, Morisaki H, Morisaki T, Shiono Y, Nakanishi N, Yamaguchi S, Nishibori Y, Inoue E, Tanaka T, Fujita H, Kitamura M, Ko E, and Katsura K, [A case of Loeys-Dietz syndrome demonstrating early postoperative recurrence of aortic regurgitation]. *J Cardiol Jpn Ed.* 2(1): p. 74-78.(2008). 査読有
- ⑤. Akutsu K, Morisaki H, Takeshita S, Sakamoto S, Tamori Y, Yoshimuta T, Yokoyama N, Nonogi H, Ogino H, and Morisaki T, Phenotypic heterogeneity of Marfan-like connective tissue

disorders associated with mutations in the transforming growth factor-beta receptor genes. *Circ J.* 71(8): p. 1305-1309.(2007). 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 森崎隆幸、森崎裕子、「Significance of Comprehensive Genetic Analysis of Syndromatic and Non-syndromatic Aortic Aneurysm and Dissection」、日本循環器学会、2009年3月21日、大阪
- ② 森崎裕子、「*FBNI* 遺伝子の同義置換型一塩基変異により生じた異所性スプライス供与部位によるスプライシング異常」分子生物学会、2008年12月9日、神戸
- ③ Hiroko Morisaki、「Comprehensive genetic analysis and thorough evaluation of phenotypes according to Ghent criteria in 135 Japanese patients with suspected Marfan syndrome.」the American Society of Human Genetics、2008年11月14日、フィラデルフィア (米国)
- ④ 森崎裕子、「*FBNI* 遺伝子の同義置換型一塩基変異により生じた異所性スプライス供与部位によるスプライシング異常により発症した非典型マルファン症候群の一症例」、臨床遺伝研究会、2008年9月28日、横浜
- ⑤ 森崎裕子、「若年発症の大動脈瘤・解離患者における遺伝子解析と臨床像の検討」、日本人類遺伝学会、2008年9月28日、横浜
- ⑥ 森崎裕子、「マルファン症候群類縁疾患の遺伝子解析と臨床症状の検討」、日本心臓病学会、2008年9月8日、東京
- ⑦ 森崎裕子、「Marfan 症候群－遺伝子変異・治療法についての最近の知見」、小児循環器学会、2008年7月2日、郡山
- ⑧ 森崎裕子、「マルファン症候群等若年性大動脈解離性疾患の原因遺伝子の解析」、分子生物学会、2007年12月13日、横浜
- ⑨ 森崎裕子、「脳動静脈瘻の合併を認めた Loeys-Dietz 症候群の一例」、臨床遺伝研究会、2007年9月13日、東京

[図書] (計 3 件)

- ①. 森崎裕子, メディカルトリビューン社、「臨床脈管学」、『マルファン症候群』(2009)。(in press)
- ②. 森崎裕子, 森崎隆幸, マルファンネットワークジャパン、「マルファン症候群ガイドブック」、『マルファン症候群の遺伝子解析』(2008) . p. 42-55.
- ③. 森崎隆幸, 森崎裕子, 中外医学社、「Annual Review 循環器 2008」、『マルファン症候群と TGFbeta シグナル』

(2008) p.83-88

[産業財産権] なし
○出願状況 (計0件)
○取得状況 (計0件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

森崎 裕子 (MORISAKI HIROKO)
国立循環器病センター・研究所・バイオサイ
エンス部・室長
研究者番号：40311451

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

森崎 隆幸 (MORISAKI TAKAYUKI)
国立循環器病センター・研究所・バイオサイ
エンス部・部長
研究者番号：30174410

(4)研究協力者

坏 宏一 (AKUTSU KOICHI)
日本医科大学・集中治療室・助教
研究者番号：20287676

荻野 均 (OGINO HITOSHI)

国立循環器病センター・心臓血管外科・医長
研究者番号：20393241