

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 1 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461084

研究課題名(和文) 遺伝子診断・細胞工学を組み合わせた遺伝性大動脈疾患の病態解明

研究課題名(英文) Elucidating the pathophysiology of inherited aortic diseases by combinational approach of genetic diagnosis and biotechnologies

研究代表者

今井 靖 (Yasushi, Imai)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20359631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マルファン症候群は優性遺伝の全身結合織疾患であり、体型的特徴、水晶体偏位、若年発症の大動脈拡大・解離を主な表現型とする。本症候群・類縁疾患の原因遺伝子としてFBN1およびTGFβ受容体関連遺伝子群が知られる。我々は大動脈解離・瘤の家系を集めその遺伝的背景を検索、先述の遺伝子群に変異を多く検出しえた。特に6人同胞中3名が大動脈解離を発症した濃厚な家系があり新規変異MYH11 c3766_3768 del AAG, pK1256delを同定した。機能的解析を進めるためCrisper-Cas9 システムを用いノックインマウスを作成、大動脈解離が高率に生じヒトの病態のモデルとなりうることを示された。

研究成果の概要(英文)：Marfan syndrome is characterized by clinical manifestations including skeletal abnormalities, ectopia lentis, and aortic dissection / dilatation. We have been followed patients suffering from Marfan syndrome and familial aortic diseases in our facilities and tested their genetic backgrounds by candidate gene approach. Among them, we encountered one pedigree, in which three women among the six siblings suffered from aortic dissection. We detected a novel mutation: MYH11 c3766_3768 del AAG, pK1256del in this pedigree. To elucidate molecular/functional mechanism in this mutation, we established the knock-in mice which carried the aforementioned mutation by new gene editing technology Crisper-Cas 9 system. This knock-in mice have been found to mimic human phenotypes and we have continued further analyses.

研究分野：循環器疾患

キーワード：マルファン症候群 家族性疾患 大動脈解離 大動脈瘤 機能解析 遺伝子改変動物

1. 研究開始当初の背景

マルファン症候群は日本人において 5000 人に一人が罹患する結合組織疾患であり時に大動脈合併症（大動脈解離、大動脈瘤）、心臓合併症（大動脈弁閉鎖不全、僧帽弁へいさ不全）は罹患患者の予後に大きな影響を及ぼす。私たちは東京大学においてこのマルファン症候群および類縁する大動脈解離・瘤発生を伴う疾患について 500 例を超える症例をフォローしてきたが、遺伝的発症予知・ハイリスク症例の選定、病態生理について不明な点も多く、それらを解明する研究の意義は非常に大きいと考えられた。

2. 研究の目的

マルファン症候群および類縁疾患に関する原因遺伝子についての遺伝子診断を行うとともにそれら疾患の病態生理を明らかにすること。

3. 研究の方法

東大病院マルファン外来、および研究代表者が異動した先の自治医科大学 先天性・遺伝性疾患専門外来においてフォローされるマルファン症候群および類縁疾患を対象とし、疾患原因遺伝子診断を行い検出される遺伝子変異と臨床像との関連性を検討する。さらにそれら患者由来の組織、特に血管から細胞を採取し、必要とあれば他系統の細胞へ分化誘導を行い遺伝子変異に伴う機能的変化について解析を行う。

4. 研究成果

我々はマルファン症候群について遺伝子解析を実施、約 8 割に *FBN1* 遺伝子変異を検出しえた。また類縁疾患である Loyes-Dietz 症候群においてはすでに良く知られるとおり、TGF- β 受容体に遺伝子変異が多く認められた。特に若年において強い血管表現型をとる症例が多く、症例報告として検出された遺伝子変異とともに報告を行った。患者由来細胞を用いた機能解析、組織を用いた検討を行っていたが個体間の差異が大きく安定した結果が得られなかった。また発生工学的技術を用いて iPS 細胞作成も実施する予定であったがその経験者が異動したこと、また本研究の研究代表者も自治医科大学へ異動となり iPS 細胞作成が出来ない状況となったため遺伝子変異解析と動物・組織由来細胞での解析を研究課題の中心として研究を継続することとした。

マルファン症候群や Loyes-Dietz 症候群のような身体的特徴などの表現型を伴わない大動脈解離・瘤の家系についても遺伝的背景を検索したところ一部の症例において *ACTA2*, *MYH11* 変異が検出された。それらの中で特記

すべき家系を見出した。6 人同胞中 3 名が大動脈解離を発症した濃厚な家系であり、この同胞のうちの罹患者の一人は娘も大動脈解離を発症（3 名の子供のうち第 3 子を妊娠中に発症し死亡、児は無事娩出され現在も元気にしておられる）、その孫には動脈管開存症が認められた。この家系において新規変異 *MYH11 c3766_3768 del AAG, pK1256del* を同定した。この遺伝子変異は種を超えて保存されているモチーフ内に存在し、コンピューターを用いた蛋白構造の推計からはミオシンの分子構造に有意な変化が生じるものと考えられた。

この遺伝子変異機能的解析を進めるため Crisper-Cas9 システムを用いノックインマウスを作成、3 塩基欠失変異導入は容易ではなかったが最終的に作成に成功した。ホモ、ヘテロ体ともに生残することがわかり、また動脈負荷モデルを作成すると、大動脈解離が高率に生じることが明らかとなった。また一部のマウスでは動脈管開存症が確認され、ヒトの病態が忠実に再現されていることが確認された。現在このマウスを用いて家族性大動脈解離に対する有効な治療法・薬剤について探索を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1: Oshima T, Hara H, Takeda N, Hasumi E, Kuroda Y, Taniguchi G, Inuzuka R, Nawata K, Morita H, Komuro I. A novel mutation of NF1X causes Sotos-like syndrome (Malan syndrome) complicated with thoracic aortic aneurysm and dissection. *Hum Genome Var.* 2017 Jun 1;4:17022. doi: 10.1038/hgv.2017.22.

2: Suzuki J, Imai Y, Aoki M, Fujita D, Takeda N, Aoyama N, Wakayama K, Ikeda Y, Kumagai H, Akazawa H, Izumi Y, Isobe M, Komuro I, Hirata Y. Periodontitis May Deteriorate Sinus of Valsalva Dilatation in Marfan Syndrome Patients. *Int Heart J.* 2016;57(4):456-60.

3: Takeda N, Yagi H, Hara H, Fujiwara T, Fujita D, Nawata K, Inuzuka R, Taniguchi Y, Harada M, Toko H, Akazawa H, Komuro I. Pathophysiology and Management of Cardiovascular Manifestations in Marfan and Loays-Dietz Syndromes. *Int Heart J.* 2016;57(3):271-7.

4: Fujita D, Takeda N, Morita H, Kato M, Nishimura H, Inuzuka R, Taniguchi Y, Nawata K, Hyodo H, Imai Y, Hirata Y, Komuro I. A novel mutation of *TGFBR2* causing Loays-Dietz syndrome complicated with pregnancy-related fatal cervical arterial

dissections. *Int J Cardiol.* 2015; 201:288-90.

5: Imai Y, Morita H, Takeda N, Miya F, Hyodo H, Fujita D, Tajima T, Tsunoda T, Nagai R, Kubo M, Komuro I. A deletion mutation in myosin heavy chain 11 causing familial thoracic aortic dissection in two Japanese pedigrees. *Int J Cardiol.* 2015;195:290-2.

6: Takeda N, Morita H, Fujita D, Inuzuka R, Taniguchi Y, Imai Y, Hirata Y, Komuro I. Congenital contractural arachnodactyly complicated with aortic dilatation and dissection: Case report and review of literature. *Am J Med Genet A.* 2015 ;167A:2382-7.

7: Takeda N, Morita H, Fujita D, Inuzuka R, Taniguchi Y, Nawata K, Komuro I. A deleterious MYH11 mutation causing familial thoracic aortic dissection. *Hum Genome Var.* 2015;2:15028.

8: Fujita D, Takeda N, Imai Y, Inuzuka R, Komuro I, Hirata Y. Pathophysiology and Japanese clinical characteristics in Marfan syndrome. *Pediatr Int.* 2014 ;56(4):484-91.

9: Hirokawa M, Morita H, Tajima T, Takahashi A, Ashikawa K, Miya F, Shigemizu D, Ozaki K, Sakata Y, Nakatani D, Suna S, Imai Y, Tanaka T, Tsunoda T, Matsuda K, Kadowaki T, Nakamura Y, Nagai R, Komuro I, Kubo M. A genome-wide association study identifies PLCL2 and AP3D1-DOT1L-SF3A2 as new susceptibility loci for myocardial infarction in Japanese. *Eur J Hum Genet.* 2015;23:374-80.

10: Suzuki J, Imai Y, Aoki M, Fujita D, Aoyama N, Tada Y, Wakayama K, Akazawa H, Izumi Y, Isobe M, Komuro I, Nagai R, Hirata Y. Periodontitis in cardiovascular disease patients with or without Marfan syndrome--a possible role of *Prevotella intermedia*. *PLoS One.* 2014;9(4):e95521.

11: Suzuki J, Imai Y, Aoki M, Fujita D, Aoyama N, Tada Y, Akazawa H, Izumi Y, Isobe M, Komuro I, Nagai R, Hirata Y. High incidence and severity of periodontitis in patients with Marfan syndrome in Japan. *Heart Vessels.* 2015;30:692-5.

12: Takata M, Amiya E, Watanabe M, Omori K, Imai Y, Fujita D, Nishimura H, Kato M, Morota T, Nawata K, Ozeki A, Watanabe A, Kawarasaki S, Hosoya Y, Nakao T,

Maemura K, Nagai R, Hirata Y, Komuro I. Impairment of flow-mediated dilation correlates with aortic dilation in patients with Marfan syndrome. *Heart Vessels.* 2014;29:478-85.

〔学会発表〕(計4件)

1. 今井靖 第78回日本循環器学会 2014年3月東京 Comprehensive evaluation and multidisciplinary management of Marfan syndrome patients. 口述発表
2. Fujita D, Takeda N, Imai Y, Hirata Y. 9th International Research Symposium on Marfan Syndrome and Related Disorders. 2014年9月 Paris Comparison between the original and the revised Ghent criteria in Japanese Marfan syndrome patients. ポスター発表
3. 今井靖 日本脈管学会 2015年10月東京 マルファン症候群における包括的診療体制の重要性 マルファン症候群専門外来の経験から シンポジウム講演
4. 今井靖 日本成人先天性心疾患学会 2016年1月大阪 血管型ミオシン欠失変異による日本人大動脈解離・動脈管開存家系の解析 口述発表

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

今井靖(IMAI, Yasushi)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20359631

(2)研究分担者

武田憲文(TAKEDA, Norifumi)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 60436483

(3)連携研究者

特記無し