

平成 29年 5月 22日

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業  
(英語) Practical Research Project for Rare/Intractable Diseases

研究開発課題名： (日本語) マルファン症候群における長期多系統障害増悪機構の解明と新規薬物療法  
開発にむけた研究  
(英語) Research on the mechanism and regulation of multi-system failure in  
patients with Marfan syndrome

研究開発担当者 (日本語) 東京大学医学部附属病院循環器内科 助教 武田憲文  
所属 役職 氏名： (英語) The University of Tokyo Hospital, Department of Cardiovascular  
Medicine, Norifumi Takeda (Assistant Professor)

実施期間： 平成 28年 4月 1日 ～ 平成 29年 3月 31日

分担研究 (日本語) マルファン症候群に伴う大動脈瘤に対する新規薬物療法の開発  
開発課題名①： (英語) Development of new therapeutic drugs for aortic aneurysm  
in MFS

研究開発分担者

所属 役職 氏名： (日本語, 英語)

- 1) 武田憲文 (東京大学医学部附属病院・循環器内科・助教)
- 2) 赤澤 宏 (東京大学医学部附属病院・循環器内科・講師)
- 3) 池田祐一 (東京大学医学部附属病院・ユビキタス予防医学講座・准教授)
- 4) 熊谷英敏 (東京大学医学部附属病院・先端臨床医学開発講座・特任助教)
- 5) 鈴木淳一 (東京大学医学部附属病院・先端臨床医学開発講座・准教授)
- 6) 網谷英介 (東京大学医学部附属病院・循環器内科・助教)

1) Norifumi Takeda (Assistant Professor, Department of Cardiovascular Medicine,  
The University of Tokyo Hospital )

- 2) Hiroshi Akazawa (Lecture, Department of Cardiovascular Medicine, The University of Tokyo Hospital)
- 3) Yuichi Ikeda (Associate Professor, Department of Ubiquitous Preventive Medicine, The University of Tokyo Hospital)
- 4) Hidetoshi Kumagai (Assistant Professor, Department of Advanced Clinical Science and Therapeutics, The University of Tokyo Hospital)
- 5) Jun-ichi Suzuki (Associate Professor, Department of Advanced Clinical Science and Therapeutics, The University of Tokyo Hospital)
- 6) Eisuke Amiya (Assistant Professor, Department of Cardiovascular Medicine, The University of Tokyo Hospital)

**分担研究** (日本語) マルファン症候群の骨障害の発症・進展機構に関する研究

**開発課題名②:** (英語) Research on the development of skeletal disorders in MFS

研究開発分担者

所属 役職 氏名: (日本語, 英語)

- 1) 谷口優樹 (東京大学医学部附属病院・整形外科・助教)
- 2) 武田憲文 (東京大学医学部附属病院・循環器内科・助教)
- 3) 犬塚 亮 (東京大学医学部附属病院・小児科・講師)
- 4) 縄田 寛 (東京大学医学部附属病院・心臓外科・講師)

- 1) Yuki Taniguchi (Assistant Professor, Department of Orthopedic Surgery, The University of Tokyo Hospital)
- 2) Norifumi Takeda (Assistant Professor, Department of Cardiovascular Medicine, The University of Tokyo Hospital)
- 3) Ryo Inuzuka (Lecture, Department of Pediatrics, The University of Tokyo Hospital)
- 4) Kan Nawata (Lecture, Department of Cardiovascular Surgery, The University of Tokyo Hospital)

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

### (和文概要)

マルファン症候群は、大動脈、骨格、眼、肺などの全身の結合組織の構造・機能破綻に起因する常染色体優性の希少難治性疾患であり、患者の約 70%で *FBNI* 遺伝子 (フィブリリン 1 をコード) に変異を認める。胸部大動脈瘤に対する治療方法の進捗で生命予後は改善傾向にあるが、一生涯に渡って進行する心血管障害や骨障害の予防・治療への対策は未だ十分ではない。本研究では、長寿化により顕在化した多発動脈瘤や後弯側弯症の病態解明と新規治療方法の開発を目指す。

本症の動脈瘤壁では、結合組織が脆弱化しているだけでなく、TGF $\beta$ シグナルやアンジオテンシン II (AngII) タイプ 1 受容体 (AT<sub>1</sub>R) シグナル、活性酸素種 (ROS) などの過剰な活性化が、病態の発症・進展に強く関与している。AT<sub>1</sub>R 拮抗薬 (ARB: ロサルタンなど) の効果が報告される一方で、ARB 効果が乏しい症例も経験することから、AT<sub>1</sub>R 下流のシグナル因子を選択的に制御することでロサルタンより優れた臨床効果を期待できる可能性があると考えた。また、後弯側弯症については、*FBNI* 遺伝子型と罹患率・重症度の関係を解析した上で、至適な動物モデルの作成と解析を試みる。

### (1) マルファン症候群に伴う大動脈瘤に対する新規薬物療法の開発

本年度は、AT<sub>1</sub>R 下流の① $\beta$ -アレスチン経路と②ROS 産生経路に着目した、次の薬剤スクリーニング系を構築した。すなわち、①AT<sub>1</sub>R 下流の G タンパク質経路または $\beta$ -アレスチン経路のいずれかを選択的に制御するバイアスドリガンドを選別するための、AT<sub>1</sub>R 特異的な両経路の活性化を別々にモニターする細胞アッセイ系と、②細胞透過性プローブ DCFH-DA を用いて、培養平滑筋細胞に AngII 投与後に発生する ROS を迅速かつ高感度に測定できる細胞アッセイ系である。次年度は、約 1500 種類の既存薬ライブラリーをスクリーニング予定であり、ドラッグリポジショニングによる早期臨床前試験実施への可能性を探りたい。

### (2) マルファン症候群の骨障害の発症・進展機構に関する研究

側弯症では、フィブリリン 1 遺伝子異常に起因する患者の解析から、フィブリリン 1 の発現量低下 (ハプロ不全) が発症・進展に特に強く関与していることが予測された。現在、骨組織特異的フィブリリン 1 欠損マウスを作成段階であり、次年度には、軟骨内骨化過程の検討、脊柱変形の解析、骨密度の評価などの解析を行い、脊柱変形の病態解明を目指した新規動物モデルを確立する予定である。

#### (英文概要)

Marfan syndrome (MFS) is an autosomal dominant heritable disorder of connective tissue that affects the cardiovascular, skeletal, ocular, and pulmonary systems, and 70% of patients have mutations in the *FBNI* gene, which encodes the major component of extracellular matrix microfibril fibrillin1. Recent combined medical and surgical treatments have improved their life expectancy, but the comprehensive measures to prevent multiple aortic aneurysms/dissections and osteopathic disorders, remain insufficient, which progressively worsens throughout their long life with a decreased quality of life. In this research project, we aim to create a new therapy based on the molecular mechanism underlying the progressive aortic diseases and kyphoscoliosis.

MFS is traditionally considered to result from the structural weakness of connective tissue, however recent investigation indicates that activation of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and angiotensin II (AngII) signal pathways play crucial roles in the onset and progression of MFS and related disorders. AngII receptor blockers (ARBs), such as losartan, can prevent aortic aneurysm progression in a *Fbn1(C1039G/+)* MFS mouse model by inhibiting TGF- $\beta$  mediated ERK activation.

Losartan may be an attractive option for patients with MFS, but it did not have overwhelming clinical efficacy, compared with  $\beta$ -blocker treatment, even though we experienced some patients with a considerable preferable response. Thus, we here plan to perform chemical screening to identify agents that regulate activated downstream signals of AngII type I receptor (AT<sub>1</sub>R) more selectively and/or effectively than losartan. We also analyze the association between the *FBNI* genotype and the incidence and severity of kyphoscoliosis, and generate a suitable mouse model to study the molecular mechanism of kyphoscoliosis.

### (1) Development of new therapeutic drugs for aortic aneurysm in MFS

In this fiscal year 2016, we have developed cell-based high throughput screening assays for monitoring (1) AngII-dependent AT<sub>1</sub>R- $\beta$ -arrestin interaction via b-galactosidase enzyme fragment complementation, (2) AngII-induced G protein signaling by NFAT transcriptional activity, and (3) AngII-stimulated reactive oxygen species (ROS) production using dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe. In the next fiscal year, we will screen a collection of well-characterized pharmaceutical agents (a library of existing drugs, n=1,500 compounds) to discover promising candidates for drug repositioning.

### (2) Research on the development of skeletal disorders in MFS

We analyzed the association between the *FBNI* genotype and the incidence and severity of kyphoscoliosis, and found that patients with haploinsufficient *FBNI* mutations are affected more frequently and more severely than patients with dominant-negative *FBNI* mutations. Thus, we are now developing bone-specific *Fbn1* knockout mice presumably mimicking the severe type, and will analyze the processes of endochondral ossification and spinal deformity, and the effect on bone density in the next fiscal year.

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：東京大学医学部附属病院・循環器内科・武田憲文 総括研究報告を参照。

## III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）

1. 武田憲文, 前村園子, 八木宏樹, 小室一成. 遺伝性大動脈瘤・解離の precision medicine (特集/循環器疾患の precision medicine. 循環器内科 (科学評論社), 2017, 82, 印刷中.
2. Takeda N\*, Sayama S\*, Iriyama T, Inuzuka R, Maemura S, Fujita D, Yamauchi H, Nawata K, Bougaki M, Hyodo H, Shitara R, Nakayama T, Komatsu A, Nagamatsu T, Osuga Y, Fujii T. Peripartum type B aortic dissection in patients with Marfan syndrome who underwent aortic root replacement. BJOG. 2017 in press. (\*equally first authors)
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 Loeys-Dietz syndrome. Int Heart J. 2016, 57, 271-7.

4. Suzuki JI, 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, 456-60.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. High-fat diet promotes aortic aneurysm formation in a mouse model of Marfan syndrome, 八木宏樹, 赤澤宏, 武田憲文, 小室一成, 第 81 回日本循環器学会学術集会, 2017/3/17-19, 国内.
2. マルファン症候群における最新の知見-RA 系抑制を含めて-, 武田憲文, 循環器疾患研究会, 2017/3/4, 国内.
3. マルファン症候群の大動脈瘤形成に肥満が与える影響, 八木宏樹, 赤澤宏, 武田憲文, 清水悠, 加茂雄大, 嵯峨亜希子, 柳青, 小室一成, 第 20 回日本心血管内分泌代謝学会学術集会, 2016/12/16-17, 国内.
4. マルファン症候群に対する新たな分子標的治療の可能性, 赤澤宏, 第 26 回日本循環薬理学会, 2016/12/2, 国内.
5. マルファン症候群における大動脈瘤形成の分子機序, 赤澤宏, 第 21 回 Circulation Forum in AKITA, 2016/10/21, 国内.
6. マルファン症候群の肥満による病態修飾の機序, 八木宏樹, 赤澤宏, 武田憲文, 清水悠, 加茂雄大, 嵯峨亜希子, 柳青, 小室一成, Molecular Cardiovascular Conference II (MCC2), 2016/9/2-3, 国内.
7. 幼少期に著明な大動脈弁輪拡張症を来した Marfan 症候群の一例, 小川陽介, 中野克俊, 進藤考洋, 犬塚亮, 笠神崇平, 平田陽一郎, 清水信隆, 藤田大司, 武田憲文, 谷口優樹, 岡明, 第 52 回日本小児循環器学会学術集会, 2016/7/6-8, 国内.
8. マルファン関連疾患の診断と治療について, 武田憲文, 東大病院・検査部カンファレンス, 2016/5/10, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし