

令和 元年 6 月 24 日現在

機関番号：11301
 研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）
 研究期間：2016～2018
 課題番号：15KK0293
 研究課題名（和文）次世代シーケンサーを用いたヌーナン症候群類縁疾患の網羅的遺伝子診断システムの確立
 （国際共同研究強化）
 研究課題名（英文）Comprehensive genetic analysis of Noonan syndrome and related disorders using
 next-generation sequencing(Fostering Joint International Research)
 研究代表者
 新堀 哲也(Niihori, Tetsuya)
 東北大学・医学系研究科・准教授
 研究者番号：40436134
 交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,000,000円
 渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：ヌーナン症候群の網羅的遺伝子解析において、我々はRRAS2のバリエーションを同定した。そこで、RRAS2バリエーションを導入したゼブラフィッシュモデルをDuke大学Center for Human Disease Modelingで作成した。野生型あるいは変異型mRNAを合成し、col1a1:egfp系統のゼブラフィッシュの胚（1-4細胞期）に注入した。受精後3日目に頭頸部異常を評価するため、角舌骨の角度を測定したところ、患者で同定されたバリエーションを導入した個体では野生型と比較して角度が有意に大きかった。さらに体長を測定したところ、バリエーションを導入した体長が有意に短かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はRRAS2の変異が先天性疾患であるヌーナン症候群の原因になることを世界で初めて明らかにするものである。ヌーナン症候群は指定難病および小児慢性特定疾病であり、診断基準上の「確実なヌーナン症候群」の診断は臨床症状より行われるが、判断が困難な場合がありうる。一方で「確定診断されたヌーナン症候群」は「上記確実なヌーナン症候群の要件を満たし、PTPN11などのRAS/MAPKシグナル伝達経路のヌーナン症候群責任遺伝子群に変異が同定された場合」とされており、RRAS2はヌーナン症候群責任遺伝子群の1つと考えられる。そのため、この発見は指定難病・小児慢性特定疾病と確定診断するために重要である。

研究成果の概要（英文）：We identified RRAS2 variants in patients with Noonan syndrome. We injected the wild-type or variant RNAs of RRAS2 into 1-4 cell-stage embryos. We measured the ceratohyal angle and body length of the larvae at 3 days post fertilization. The ceratohyal angles of larvae introduced with the variants were greater than that of wild-type. The body lengths of larvae with the variants were shorter than that of wild-type. These observations support the hypothesis that RRAS2 is a novel responsible gene of Noonan syndrome.

研究分野：臨床遺伝学

キーワード：ヌーナン症候群 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

ヌーナン症候群は、低身長、眼瞼解離などの特徴的顔貌、心奇形などを伴う先天奇形症候群である。申請者らは、臨床的に類似した疾患も RAS/MAPK 経路に関わる変異が病因ではないかとの仮説に従い、類縁疾患であるコストロ症候群に *HRAS* の変異を同定し (Aoki, Niihori et al. Nature Genet 37:1038-40, 2005)、それに引き続き Cardio-facio-cutaneous (CFC) 症候群に *BRAF*、*KRAS* の変異を同定し発表した (Niihori et al. Nature Genet 38:294-296, 2006)。その後、同じ細胞内シグナル伝達経路を担う分子である *MEK1/2*、*SOS1*、*RAF1*、*SHOC2*、*NRAS*、*CBL*、*RRAS* にも CFC 症候群患者およびヌーナン症候群患者で変異が同定され、我々も報告を行なった。さらに我々は次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析からヌーナン症候群の新規原因遺伝子 *RIT1* の同定に成功した (Aoki, Niihori et al. Am J Hum Genet 93(1):173-180, 2013)。その後も他のグループから *SOS2*、*RASA2*、*A2ML1*、*LZTR1* がヌーナン症候群と関連していると報告されている。これまでの一連の研究では、既知遺伝子をキャピラリーシーケンサーで解析してきた。臨床症状のみから原因遺伝子を推定するのは困難であり、これまでは頻度の高い遺伝子から解析するなどの工夫を行ってきたが、最終的には既知遺伝子の全エクソンを解析する必要がある。

そこで研究代表者はデスクトップ型次世代シーケンサーを使用した網羅的で効率のよい遺伝子解析システムを構築するため基盤 (C) 一般「次世代シーケンサーを用いたヌーナン症候群類縁疾患の網羅的遺伝子診断システムの確立」を申請し、採択された。

2. 研究の目的

本国際共同研究の目的は、ヌーナン症候群および類縁疾患患者の遺伝子解析において同定された遺伝子変異を持つモデル動物を作成することによって、基課題で同定された新規遺伝子変異の個体の表現型への影響の解析系を確立することである。

網羅的遺伝子解析において、病因としては未報告のバリエーションを同定する可能性がある。これが病因であるかを判断するにあたり、家系内での解析 (変異が *de novo* であるか等) や遺伝子多型データベースにおける頻度や遺伝子変異の影響予測ソフトウェアでの解析結果などを参考にすが、バリエーションの意義が不明 (variants of uncertain significance, VOUS または VUS) のままとなることも多い。そこでその変異を持つモデル動物を作成し、患者の臨床症状に類似の症状を発症すれば病因とみなす重要な根拠となりうる。

この場合のモデル動物は、作成が簡便で、安価であり、ハイスループットな解析が可能であることが求められる。ゼブラフィッシュはこの条件を満たし、ヌーナン症候群および類縁疾患の主要な症状である低身長や顔面・心臓の発生などの解析が可能である。

よって、ゼブラフィッシュを用いた先天性疾患モデルの解析のノウハウを持つ研究室との共同研究により、これまで意義付けが困難であったバリエーションの表現型へ影響予測が可能となり、これは網羅的遺伝子解析においても病因変異が絞り切れなかった例に有用である。さらに新規病因遺伝子・病因変異同定につながる。

3. 研究の方法

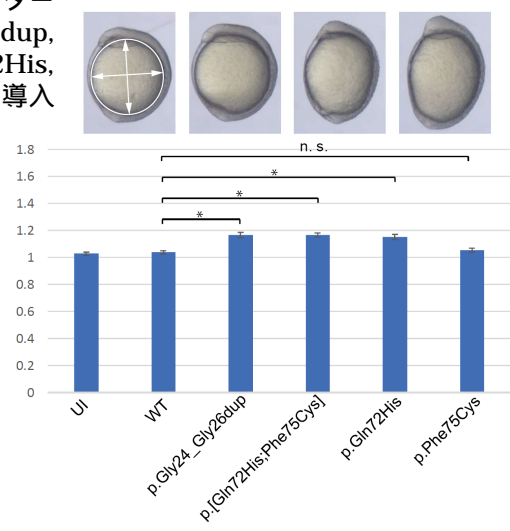
ヌーナン症候群の網羅的遺伝子解析において、我々は *RRAS2* c.70_78dup p.Gly24_Gly26dup および c.[216A>T;224T>G], p.[Gln72His;Phe75Cys] を同定した。本バリエーションはこれまで平滑筋肉腫細胞で同定されており、ERK 経路を活性化することが示唆されていた。そこで、*RRAS2* バリエーションを導入したゼブラフィッシュモデルを Duke 大学 Center for Human Disease Modeling で作成することとした。

(1) *RRAS2* ベクターの構築

ゼブラフィッシュ胚ヘインジェクションする mRNA の合成の鋳型とするためおよび培養細胞を用いた実験のため、pCS2+ベクターに野生型または変異型 (p.Gly24_Gly26dup, p.[Gln72His;Phe75Cys], p.Gln72His, p.Phe75Cys の 4 種類) のヒト *RRAS2* を導入した。

(2) ゼブラフィッシュへの mRNA 注入

(1) で構築したベクターを鋳型として野生型あるいは変異型 mRNA を合成した。合成された mRNA 約 25pg を *coll1a1:egfp* 系統のゼブラフィッシュの胚 (1-4 細胞期) に注入した。受精後 3 日目まで観察を続けた。



4. 研究成果

受精後 11 時間での胚の形態を観察すると (右図)、変異型を注入したものうち、p.Gly24_Gly26dup, p.[Gln72His;Phe75Cys], p.Gln72His を注入したものについては、野生型を注入したものと比較して卵黄嚢の長軸/短軸

比の値が有意に大きかった。p.Phe75Cys を注入したものについては有意差がなかった。

次に受精後 3 日目に頭頸部異常を評価するため、角舌骨の角度を測定したところ、p.Gly24_Gly26dup, p.[Gln72His;Phe75Cys], p.Gln72His を注入した個体では野生型を注入した個体と比較して角度が有意に大きかった。p.Phe75Cys を注入したものについては有意差がなかった。

更に受精後 3 日目に体長を測定したところ、p.Gly24_Gly26dup, p.[Gln72His;Phe75Cys], p.Gln72His を注入した個体では野生型を注入した個体と比較して体長が有意に短かった。p.Phe75Cys を注入したものについては有意差がなかった。

以上より、患者で同定されたバリエーションである p.Gly24_Gly26dup, p.[Gln72His;Phe75Cys] はゼブラフィッシュにおいて頭頸部異常・体長の短縮といった、ヌーナン症候群に観察される症候を引き起こすことが明らかとなり、p.Gln72His は単独でも同様な作用を認めるが、p.Phe75Cys では認めないことが明らかとなった。

これらの所見は、p.Gly24_Gly26dup, p.[Gln72His;Phe75Cys], p.Gln72His は野生型と比較して RAS/ERK 経路を活性化するが p.Phe75Cys では明らかでない、という培養細胞を用いた解析結果の傾向に合致しており、RAS/ERK 経路の活性化が病態を引き起こしていることを示唆した。

さらに他研究で同定された p.Gln72Leu の解析も行い、American Journal of Human Genetics 紙において報告した。

5. 主な発表論文等
(研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1) Germline activating *RRAS2* mutations cause Noonan syndrome. Tetsuya Niihori, Koki Nagai, Atsushi Fujita, Hirofumi Ohashi, Nobuhiko Okamoto, Satoshi Okada, Atsuko Harada, Hirotaka Kihara, Thomas Arbogast, Ryo Funayama, Matsuyuki Shirota, Keiko Nakayama, Taiki Abe, Shin-ichi Inoue, I-Chun Tsai, Naomichi Matsumoto, Erica E. Davis, Nicholas Katsanis, Yoko Aoki. *Am J Hum Genet* 2019 Jun 6;104(6):1233-1240.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

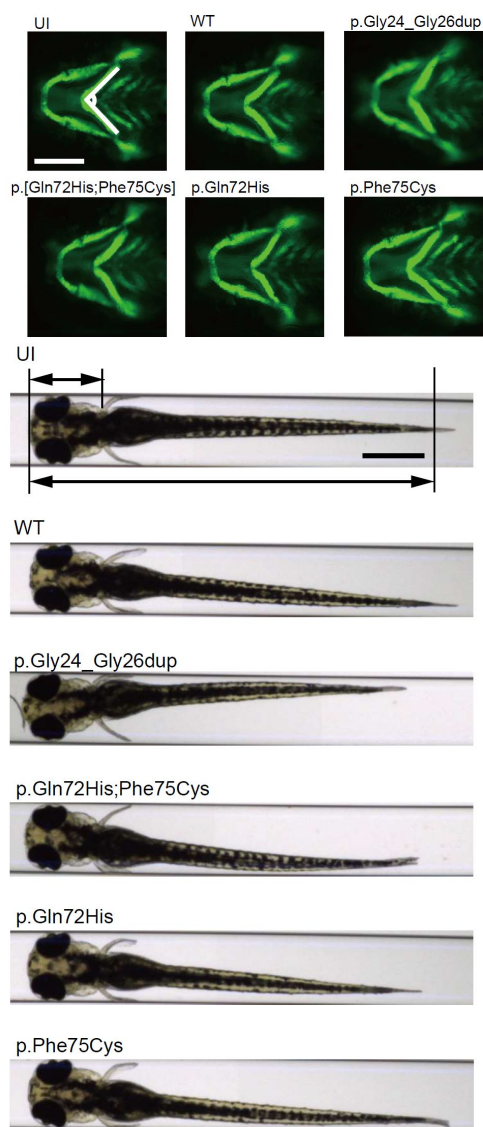
[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：Nicholas Katsanis Ph.D.

ローマ字氏名：Nicholas Katsanis Ph.D.

所属研究機関名： Duke University Medical Center

部局名： Center for Human Disease Modeling

職名： Professor

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：青木 洋子

ローマ字氏名：Yoko Aoki

研究協力者氏名：永井 康貴

ローマ字氏名：Koki Nagai

研究協力者氏名：Erica E. Davis Ph.D.

ローマ字氏名：Erica E. Davis Ph.D.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。