

令和元年6月14日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20027

研究課題名(和文)毛細血管奇形-動静脈奇形症候群における遺伝要因の解明

研究課題名(英文) Novel RASA1 mutations in Japanese pedigrees with capillary malformation-arteriovenous malformation

研究代表者

茂木 陽介(Miteki, Yosuke)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：30649405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は脳動静脈奇形を合併する稀な遺伝性疾患であるCapillary-arteriovenous malformation (CM-AVM)の日本人患者における遺伝的背景を明らかにすることを目的とした。

まず、2つの日本人CM-AVM家系の発端者に対して全エクソーム解析を行い、いずれの発端者においてもRASA1遺伝子にそれぞれ異なる機能喪失型変異が検出された。これらの変異はそれぞれの家系内で疾患とco-segregationし、かつ一般人口には存在しなかった。他に2人の発端者で共通して機能障害性変異をきたした遺伝子はなく、RASA1遺伝子が日本人患者でも原因遺伝子となることを初めて証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦においては遺伝子変異解析を行ったCM-AVM患者の報告は未だ無く、本研究が本邦初の報告となるため、その成果を英文雑誌に投稿し、受領され、現在掲載準備中である。論文掲載により、報告例が少なく情報の少ない当該疾患の存在を人々に広く認知させる一助となり、自然歴や患者マネージメントに係る知見、遺伝カウンセリング体制の整備にも結びついていくことが期待される。さらに将来的には、本研究での遺伝学的知見をもとに遺伝子治療、ゲノム創薬といったテーラーメイド医療への応用も目指すことができると考える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is that we reveal the genetic background of the Japanese patients with capillary malformation-arteriovenous malformation (CM-AVM).

Whole-exome sequencing in the two probands identified novel heterozygous mutations in RASA1, which were co-segregated with the disease in each family and were not reported in large-scale sequencing databases. There were no other genes commonly disrupted among these probands. RASA1 was a major causative gene even in Japanese patients with CM-AVM.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：CM-AVM RASA1遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は本邦における死因としてがん、心疾患、肺炎に次ぐ第4位に位置し、欧米と比較し、脳出血の割合が高いことが特徴である。脳卒中の原因の一つである脳動静脈奇形はその約20%が20歳以下で診断され、若年性脳出血の原因として最も頻度が高い。小児の脳動静脈奇形は約80%が出血で発症し、成人と比較して死亡率も高く、大きな社会的損失をもたらす疾患であり、ときに Hereditary hemorrhagic telangiectasia (遺伝性出血性毛細血管拡張症、12q13.13、*ACVRL1* 遺伝子)や PTEN hamartoma tumor syndrome (10q23.31、*PTEN* 遺伝子)などの遺伝子異常を伴った稀な症候群として発症する場合も報告されている。

これらの遺伝性症候群のうち、Capillary malformation-arteriovenous malformation (毛細血管奇形-動静脈奇形、以下 CM-AVM と記す) は、近年になりその疾患概念が提起されはじめた稀少疾患である[文献]。CM-AVM は常染色体優性遺伝形式をとり、有病率はおよそ10万人に1人で、頭蓋内 AVM の合併率は10%と報告されている。すでに疾患原因遺伝子のひとつとして染色体5q14.3に *RASA1* (RAS p21 protein activator) 遺伝子が特定されているが、座位異質性も存在し、*RASA1* 遺伝子異常が認められるのは患者の68~78%である[文献 -]。これらの報告は主にヨーロッパからのものであり、渉猟しうる限り、本邦を含めた東アジア諸国においては未だ *RASA1* 遺伝子異常による CM-AVM の文献的報告は無い。

2. 研究の目的

今回、我々は特徴的な皮膚母斑に脳動静脈奇形を合併する CM-AVM を多発する日本人2家系を経験した。CM-AVM は、近年になってその疾患概念が記述されはじめたばかりの世界的にも非常に稀な遺伝性疾患であり、日本人患者における遺伝学的知見については未だ報告がない。本研究では、この稀少家系に注目し、日本人 CM-AVM 患者の遺伝学的背景を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、最初のステップとして、2つの日本人 CM-AVM 家系についてサンプリングを行い、すでに疾患原因遺伝子として認識されている *RASA1* 遺伝子を含め、早期に *RASA1* 遺伝子以外の新規疾患遺伝子が存在する可能性を模索するため、両家系の2人の発端者に対して全エクソーム解析を行う。その結果、*RASA1* 遺伝子変異が確認された場合には、家系内での疾患との co-segregation および各種データベースを用いて一般人口には存在しない変異であることを確認する。一方、*RASA1* 遺伝子変異が検出されなかった場合には、新規疾患遺伝子の特定を行うために、家系内で疾患とともに伝達している病的遺伝子変異を網羅的に検索する。

4. 研究成果

(1) 両家系の2人の発端者に対して全エクソーム解析を行った結果、いずれの発端者においても約11000個の非同義変異が検出され、その内、Human Genetic Variation Database (HGVD) および Exome Aggregation Consortium Database (ExAC) のいずれにも登録されていない変異が約120個存在した。さらに、18人の陰性コントロールで検出されず、かつ2人の発端者に共通して確認されたのは *RASA1* 遺伝子上のそれぞれ異なる機能喪失型変異であった(図1A)。同変異に対して、サブクローニングおよびダイレクトシーケンスを行い、これらの変異はそれぞれ2つの家系内で疾患と co-segregation していることを確認した。全エクソーム解析では、他に2名の発端者で共通して機能障害性変異をきたしている遺伝子はなく、*RASA1* 遺伝子が日本人患者でも原因遺伝子となることが初めて証明された。

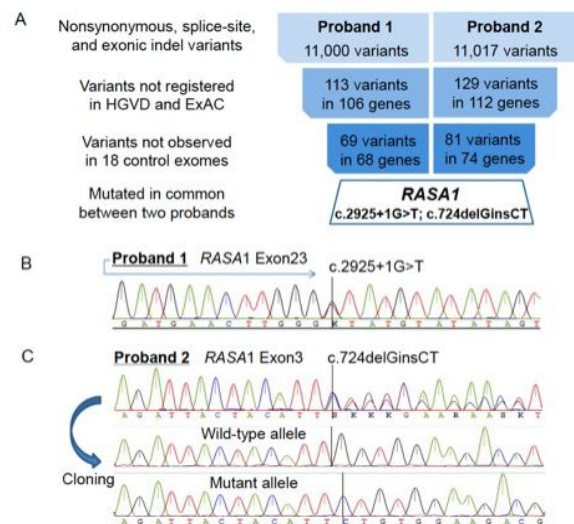


図1 全エクソーム解析結果および *RASA1* 遺伝子変異のダイレクトシーケンス結果

(2) 2人の発端者で検出された変異はそれぞれ *RASA1* 遺伝子上に存在し、c.2925+1G>T および c.724delGinsCT であった(図1B, C)。後者は Exon 3 上のフレームシフト変異であったため、機能障害性変異であることは確実であったが、前者はスプライスサイト変異であり、実際にスプライシング異常を引き起こすかどうかを検証するため、HeLa 細胞および HEK293T 細胞の2種類の培養細胞を用いて minigene assay を行った。スプライス変異を組み込んだエクソントラップ・ベクターを両細胞にトランスフェクションしたところ、いずれにおいて

も wild type とは異なる 3 つの mutant product が検出され、実際にスプライシング異常が起こることを確認した(図 2)。

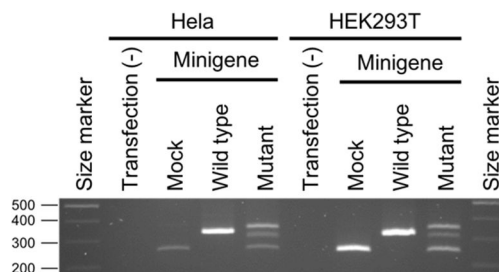


図 2 Mini gene assay の結果

<引用文献>

Eerola I, Boon LM, Mulliken JB, Burrows PE, Domp Martin A, Watanabe S, et al. Capillary malformation-arteriovenous malformation, a new clinical and genetic disorder caused by *RASA1* mutations. *Am J Hum Genet.* 2003;73(6):1240-9.
 Rvencu N, Boon LM, Mendola A, Cordisco MR, Dubois J, Clapuyt P, et al. *RASA1* mutations and associated phenotypes in 68 families with capillary malformation-arteriovenous malformation. *Hum Mutat.* 2013;34(12):1632-41.
 Orme CM, Boyden LM, Choate KA, Antaya RJ, King BA. Capillary malformation-arteriovenous malformation syndrome: review of the literature, proposed diagnostic criteria, and recommendations for management. *Pediatr Dermatol.* 2013;30(4):409-15.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1) Yosuke Moteki, Hiroyuki Akagawa, Yasunari Niimi, Yoshikazu Okada, Takakazu Kawamata. Novel *RASA1* mutations in Japanese pedigrees with capillary malformation-arteriovenous malformation. *Brain and Development.* 査読あり. Accept: 12 June 2019.

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) 茂木 陽介、本邦における毛細血管奇形-動静脈奇形症候群の遺伝要因の解明、第 43 回日本脳卒中学会学術集会、2018 年
- (2) 茂木 陽介、本邦における毛細血管奇形-動静脈奇形症候群の遺伝要因の解明、第 33 回 NPO 法人日本脳神経血管内治療学会学術総会、2017 年
- (3) 茂木 陽介、本邦における毛細血管奇形-動静脈奇形症候群の遺伝要因の解明、日本脳神経外科学会第 76 回学術総会、2017 年

〔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〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：赤川 浩之

ローマ字氏名：(AKAGAWA, hiroyuki)

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。