

平成21年 5月14日現在

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2007～2008

課題番号：19689022

研究課題名（和文） Cardio-Facio-Cutaneous 症候群の遺伝子解析と変異体の機能解析

研究課題名（英文） Molecular and biochemical analysis of mutants identified in Cardio-facio-cutaneous syndrome

研究代表者

新堀 哲也（NIHORI TETSUYA）

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40436134

研究成果の概要：

CFC症候群および臨床的に類似したヌーナン症候群、コステロ症候群患者（疑い含む）の検体を収集し、原因遺伝子解析を行った。ヌーナン症候群の原因遺伝子として同定されたSOS1遺伝子については、ヌーナン症候群患者24人中4人のみならずヌーナン/CFC症候群患者2人およびCFC症候群1人にも変異を同定した。また、CFC患者の遺伝子変異がどのように機能しているか解析した。さらに新しい原因遺伝子を求め、候補遺伝子を解析した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
年度			
総計	8,700,000	2,610,000	11,310,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：遺伝・先天異常学

1. 研究開始当初の背景

先天奇形症候群は1000種類以上存在すると言われている。発症原因としては染色体異常、遺伝子異常、発生過程での外的因子（感染、薬物）の影響等が知られているが、多くの先天奇形症候群では発症メカニズムのみならず原因すらも不明である。

欧米では1000から2500人に1人、本邦でも約10000人に1人と比較的頻度の高い先天奇形症候群であるヌーナン症候群は1968年に報告され、その後30年以上原因不明であ

った。しかし2001年に原因遺伝子が同定されて以降、その発生メカニズムの検討がさまざまなグループから報告されている。原因遺伝子 *PTPN11* のコードするプロテインチロシンホスファターゼ SHP-2 は、成長因子、サイトカイン、ホルモンなどのシグナルを RAS/ERK 経路の上流で正に制御する分子である。ヌーナン症候群で同定された変異は機能獲得型変異であることが示され (Tartaglia et al. Nat Genet 34:148-50, 2003, Niihori et al. J Hum Genet 50:192-202, 2005)、下

流の RAS/ERK 経路を活性化する変異であるとされている。

申請者は 2005 年、類縁疾患でも RAS/ERK 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テロ症候群に *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)。

CFC 症候群で同定された変異蛋白の機能解析では、類縁疾患であるヌーナン症候群の病因となる SHP-2 の変異体はシグナル伝達において下流の RAS/ERK 経路を細胞特異的に活性化することから、CFC 症候群の病因変異でも同様に RAS/ERK 経路を活性化することが予測された。しかし、*BRAF* および *KRAS* 変異体の下流への影響を、培養細胞系を用いたリンフェラーゼアッセイで解析した結果、下流のシグナルは変異によって上昇するものと変化しないものが存在することが明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CFC 症候群の原因となる遺伝子の解析とその変異体の機能を解析すること、そして CFC 症候群の新たな原因遺伝子を同定することによって、CFC 症候群の発症メカニズムの一端を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子解析

CFC 症候群および類似の臨床症状の患者からの検体 (血液・線維芽細胞など) および詳細な臨床症状の情報 (腫瘍の合併が無いかなども含めて) を収集し、検体から DNA を抽出する。患者由来 DNA を鋳型として、CFC 症候群の原因遺伝子および類縁疾患の原因遺伝子 (*BRAF*、*KRAS*、*MEK1*、*MEK2* など) のエキソンを PCR で増幅する。精製した PCR 産物を用いてシーケンシングを行ない変異の有無を確認する。

(2) 変異蛋白の機能解析

同定した遺伝子変異が細胞内でどのような影響をもたらすか解析を行うため、変異蛋白発現ベクターを作成し、培養細胞に発現ベクターを導入して、変異蛋白を発現させる。そして変異蛋白と野生型を比較検討するため、網羅的な下流シグナル解析のためのタンパクアレイを行った。

(3) 新規候補遺伝子解析

CFC 症候群患者においては *BRAF*、*KRAS*、*MEK1*、*MEK2* 遺伝子をシーケンス

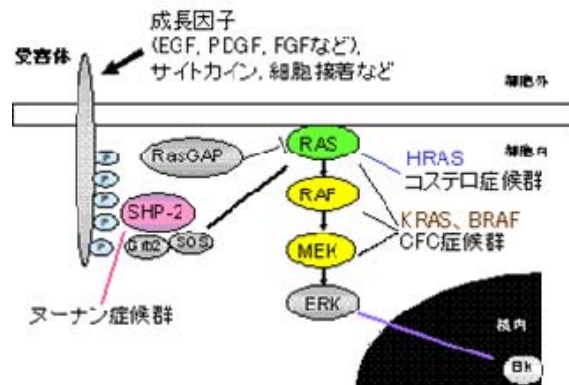
してもなお 40%程度は変異が同定されず、原因は不明のままであり、新たな原因遺伝子の存在が疑われている。新たな原因遺伝子の同定は、疾患の診断のみならず、発症のメカニズムを知るためにも大変重要である。

そこで、新たな原因遺伝子の同定を目指し、変異の認められなかった検体を用いてシグナル伝達における上流および下流の分子の遺伝子のシーケンシングを行なった。

4. 研究成果

(1) 遺伝子解析

CFC 症候群および臨床的に類似した表現型をもつ症候群であるヌーナン症候群、コステロ症候群患者またはこれら3症候群が疑われる患者検体を収集した。これらの新たな検体およびこれまでに集まっていた患者検体について、*BRAF*、*KRAS*、*MEK1*、*MEK2*、*PTPN11*、*HRAS*、および研究開始後にヌーナン症候群の原因遺伝子として判明した *SOS1*、*RAF-1* 遺伝子解析を行った。



SOS1 遺伝子については、ヌーナン症候群患者 24 人および CFC 症候群患者 30 人で遺伝子解析を行ったところ、ヌーナン症候群患者では 4 人、CFC 症候群患者のうち 3 人 (うち 2 人はヌーナン症候群の表現型も併せ持つ) に遺伝子変異を同定した。これまで *SOS1* 遺伝子変異はヌーナン症候群患者にのみ同定されていた。この発見は *SOS1* 遺伝子変異を持つ患者はヌーナン症候群のみならず CFC 症候群を呈することもあることを示すものである。

(2) *BRAF* 遺伝子変異の新たな下流分子の同定

遺伝子変異の影響が ERK/ELK 以外の伝達経路にあるのか否かを検証するために、*BRAF* WT、V600E (癌で同定)、CFC 症候群で同定された遺伝子変異で ERK を活性化する変異である K499E と ERK を活性化しない変異 E501G を NIH3T3 細胞に導入し、R&D 社の Proteome Profiler Arrays において複数のキナーゼの活性化を検討した。その結果、ERK 以外のキナーゼ (JNK や P38) でも活性の上昇が観察された。

(3) 新規原因遺伝子発見を目指した候補遺伝子解析

BRAF, KRAS, MEK1, MEK2 遺伝子変異陰性の CFC 症候群および遺伝子変異が同定されていないヌーナン症候群、コストロ症候群患者計 48 例の検体について、RAS/MAPK シグナル伝達経路の制御に関わる複数の分子の遺伝子についてシーケンスを行った。全体の 94% が終了した段階で、複数の多型データベースにない遺伝子配列を同定した。さらに家族内検索や正常人での解析をすすめ、病因であるかの検討が必要である。

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. Aoki Y, Niihori T, Narumi Y, Kure S, Matsubara Y: The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. Hum Mutat 29:992-1006, 2008 査読あり
2. Narumi Y, Aoki Y, Niihori T, Sakurai M, Cavé H, Verloes A, Nishio K, Ohashi H, Kurosawa K, Okamoto N, Kawame H, Mizuno S, Kondoh T, Addor MC, Coeslier-Dieux A, Vincent-Delorme C, Tabayashi K, Aoki M, Kobayashi T, Guliyeva A, Kure S, Matsubara Y: Clinical manifestations in patients with SOS1 mutations range from Noonan syndrome to CFC syndrome. J Hum Genet 53:834-41, 2008. 査読あり
3. Narumi Y, Aoki Y, Niihori T, Neri G, Cave H, Verloes A, Nava C, Kavamura MI, Okamoto N, Kurosawa K, Hennekam RC, Wilson LC, Gillessen-Kaesbach G, Wiczorek D, Lapunzina P, Ohashi H, Makita Y, Kondo I, Tsuchiya S, Ito E, Sameshima K, Kato K, Kure S, Matsubara Y: Molecular and clinical characterization of cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome: Overlapping clinical manifestations with Costello syndrome. Am J Med Genet A 143A:799-807, 2007 査読あり
4. Makita Y, Narumi Y, Yoshida Y, Niihori T, Kure S, Fujieda K, Matsubara Y, Aoki Y: Leukemia in cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome: a patient with a germline mutation in BRAF proto-oncogene. J Pediatr Hematol Oncol 29:287-290,

2007. 査読あり

5. Nava C, Hanna N, Michot C, Pereira S, Pouvreau N, Niihori T, Aoki Y, Matsubara Y, Arveiler B, Lacombe D, Pasmant E, Parfait B, Baumann C, Héron D, Sigaudy S, Toutain A, Rio M, Goldenberg A, Leheup B, Verloes A, Cavé H: CFC and Noonan syndromes due to mutations in RAS/MAPK signaling pathway: genotype/phenotype relationships and overlap with Costello syndrome. J Med Genet 44:763-71, 2007. 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

1. Y. Narumi, Y. Aoki, T. Niihori, M. Sakurai, H. Cavé, A. Verloes, K. Nishio, H. Ohashi, K. Kurosawa, N. Okamoto, H. Kawame, M.C. Addor, C. Vincent-Delorme, A. Coeslier-Dieux, M. Aoki, A. Guliyeva, T. Kobayashi, S. Kure, Y. Matsubara. Clinical spectrum of patients with SOS1 mutations ranges from Noonan syndrome to cardio-facio-cutaneous syndrome. ASHG 58th Annual Meeting. 平成 20 年 11 月 11-15 日. フィラデルフィア、米国
2. 谷合弘子、水野誠司、浅井朋子、金山学、鷲見聡、新堀哲也、青木洋子、松原洋一. 自閉症を合併した cardio-facio-cutaneous(CFC)症候群の一例—BRAF変異と臨床症状の関連について. 日本人類遺伝学会第 53 回大会. 平成 20 年 9 月 27-30 日. パシフィコ横浜
3. Afag Guliyeva, 青木洋子, 新堀哲也, 鳴海洋子, 小林朋子, 西尾公男, 大橋博文, 黒澤健司, 岡本伸彦, 川目裕, 水野誠司, 近藤達郎, 櫻井雅浩, 青木正志, 呉繁夫, 松原洋一. Noonan症候群類縁疾患の包括的遺伝子解析とSOS1遺伝子変異. 日本人類遺伝学会第 53 回大会. 平成 20 年 9 月 30 日. パシフィコ横浜
4. 青木洋子ら. Noonan 症候群類縁疾患 (The RAS/MAPK syndromes)の包括的遺伝子解析. 第 15 回日本遺伝子診療学会大会. 平成 20 年 8 月 1 日. 仙台市戦災復興記念館
5. 鳴海洋子、青木洋子、新堀哲也、小林朋子、西尾公男、櫻井雅浩、田林暁一、青木正志、大橋博文、岡本伸彦、川目裕、黒澤健司、呉繁夫、松原洋一. Noonan症候群類縁疾患におけるSOS1遺伝子解析と臨床像の検討. 第 111 回日本小児科学会学術集会. 平成 20 年 4 月 25 日. 東京国際フォーラム

6. 青木洋子, 新堀哲也, 鳴海洋子, 小林朋子, Afag Guliyeva, 川目裕, 黒澤健司, 大橋博文, 岡本伸彦, 西尾公男, 櫻井雅浩, 青木正志, 呉繁夫, 松原洋一. Noonan症候群類縁疾患の包括的遺伝子解析と診断システムの考案. 日本人類遺伝学会第52回大会. 平成19年9月13日. 京王プラザホテル (東京)
7. Niihori T et al. Further molecular and clinical characterization in patients with Costello syndrome. 1st International Costello Syndrome Research Symposium 2007 平成19年7月21日 オレゴン健康科学大学 (オレゴン州ポートランド)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新堀 哲也 (NIIHORI TETSUYA)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40436134

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：