

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03636

研究課題名(和文)ヌーナン症候群類縁疾患の新しい発症メカニズムの同定とその病態解明

研究課題名(英文)New mechanisms and pathogenesis of Noonan syndrome and related disorders

研究代表者

青木 洋子 (Aoki, Yoko)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80332500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヌーナン症候群類縁疾患は、低身長・心疾患・易発がん性を示す先天性疾患であり、RAS/MAPKシグナル伝達経路の複数の分子の遺伝子変異が同定されている。その中でRASのユビキチン化を司るLZTR1では常染色体潜性遺伝バリエーションと、顕性遺伝バリエーションがあるがその機能的な意義は明らかでない。本研究ではヌーナン症候群類縁疾患が臨床的に疑われる患者の網羅的ゲノム解析にて、LZTR1の変異、HRASの遺伝子内重複や、新規原因遺伝子を同定し機能解析に着手した。遺伝子変異陽性者の遺伝子-表現型連関を明らかにした。さらにその病態解明のために培養細胞やモデル生物を用いてLZTR1バリエーションの機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LZTR1はその変異がヌーナン症候群で同定されたが、その機能は全く明らかでなかった。申請者らは、LZTR1の機能として、RASをポリユビキチン化し分解に関与することを報告した。海外のグループからもLZTR1がRASのユビキチン化や細胞の局在に関与していることが報告されたが、LZTR1変異蛋白の機能とヌーナン症候群を引き起こす病態メカニズムはまだまだ明らかでは無い。本研究にてLZTR1バリエーションをもつヌーナン症候群の病態の一部が明らかになったことは、本疾患の病態解明に貢献し、さらにがん原遺伝子RASのユビキチン化の生物学的な意義解明へ通じると考えられる。

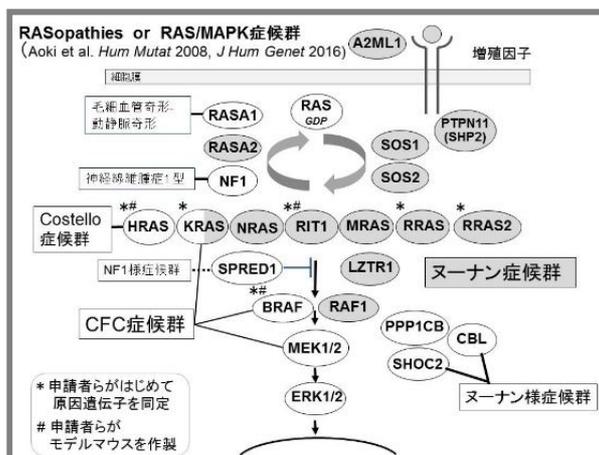
研究成果の概要(英文)：Noonan syndrome related diseases are congenital diseases of short stature, heart disease, and tumor predisposition. Genetic mutations in multiple molecules of the RAS/MAPK signaling pathway have been identified. Among them, LZTR1, which controls the ubiquitination of RAS, has an autosomal recessive inheritance variant and a dominant inheritance variant, but its functional significance is not clear. In this study, we identified LZTR1 mutations, HRAS intragenic duplications, and novel causative genes by comprehensive genome analysis of patients with clinically suspected Noonan syndrome-related diseases. We clarified the genotype-phenotype relationship of mutation-positive individuals. Furthermore, to elucidate the pathophysiology, we analyzed the function of the LZTR1 variant using cultured cells and model organisms.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：シグナル伝達 先天性疾患 がん原遺伝子

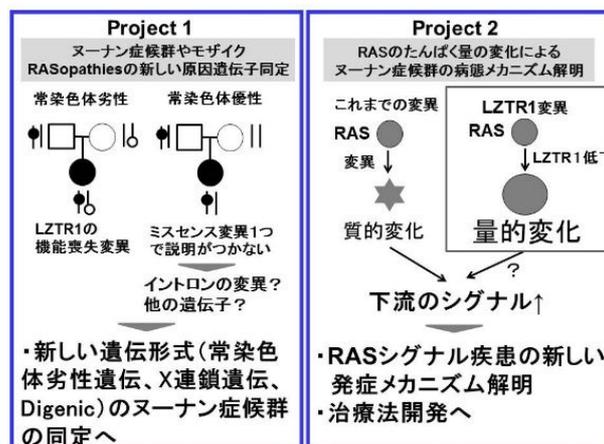
1. 研究開始当初の背景

ヌーナン症候群・コストロ症候群・CFC 症候群は心疾患・精神遅滞・易発がん性を示す先天性疾患である。これまでに研究代表者らは、コストロ症候群、CFC 症候群の原因遺伝子として HRAS, KRAS, BRAF、ヌーナン症候群の原因遺伝子 RIT1, RRAS, RRAS2 を世界に先駆けて同定し、RAS/MAPK 症候群（現在国際的には RASopathies）という疾患概念を確立してきた。また RIT1, HRAS, BRAF 変異をもつヌーナン症候群、コストロ症候群、CFC 症候群モデルマウス 3 種類の作成に成功しその治療法開発を行ってきた。



2015 年に同定された LZTR1 は、常染色体優性、あるいは常染色体潜性遺伝（劣性遺伝）遺伝形式のヌーナン症候群の原因になることが明らかになった。申請者らもこれまでに未報告も含め 19 人に LZTR1 のバリエーションを同定している（未発表データ）。顕性遺伝（優性遺伝）のバリエーションでは、症状のない親にそのバリエーションが同定されることが多く、その意義については明らかでなく、その発症メカニズムは明らかでは無い。当科には従来の先天性疾患であるヌーナン症候群類縁疾患のみならず、モザイク疾患と考えられる原因不明な患者が蓄積している。特にこれまで注目されてこなかった潜性遺伝（劣性遺伝）遺伝形式の RASopathies を同定することは、新しい病態メカニズムの解明につながる。

LZTR1 はヌーナン症候群の原因として同定された後もその機能は明らかではなかった。申請者らは、LZTR1 の機能として、RAF-PPP1CB と複合体を作ること、LZTR1 を細胞に導入すると、RAS をポリユビキチン化し分解に関与することを報告した（Umeki I et al. Hum Genet, 2019, Abe T et al. Cell Death Differ, 2019）。海外のグループからも LZTR1 が RAS のユビキチン化や細胞の局在に関わっていることが報告されたが、LZTR1 変異蛋白の機能とヌーナン症候群を引き起こす病態メカニズムはいまだ明らかでは無い。さらに RAS タンパクの量的変化が下流のシグナルを制御し疾患の発症に関与するメカニズムはこれまでに報告がない。



2. 研究の目的

本研究ではこれまでに収集した症例の臨床症状の再検討と再解析を行い、潜性遺伝（劣性遺伝）遺伝を含む新しい遺伝形式を示すヌーナン症候群やモザイク RASopathies の新規原因遺伝子を同定する。もう一つの目的は、LZTR1 変異の機能を培養細胞やモデル生物で解析し、RAS のたんぱく量の変化によるヌーナン症候群の病態解明をめざす。本研究により、ヌーナン症候群の新しい疾患発症メカニズムと、RAS シグナルの新しい制御メカニズム解明を目指す。

3. 研究の方法

Project 1：潜性遺伝（劣性遺伝）遺伝ヌーナン症候群やモザイク RASopathies の新しい原因遺伝子同定

ヌーナン症候群類縁疾患の代表疾患はヌーナン症候群・コストロ症候群・CFC 症候群であり、そのうち 12 遺伝子が保険収載での遺伝学的検査の対象となっている。当研究室では保険収載の遺伝子以外の候補遺伝子も含む 41 遺伝子 (A2ML1, AKT3, ARID1A, ARID1B, BRAF, CBL, CDC42, EZH2, HRAS, KAT6A, KDM6A, KDM6B, KMT2D, KRAS, LZTR1, MAP2AK1, MAP2K2, MAP3K8, MRAS, NF1, NRAS, NSD1, PIK3CA, PIK3R2, PTPN11, RAF1, RASA1, RASA2, RIT1, RIT2, RRAS, RRAS2, SHOC2, SMARCA2, SMARCA4, SMARCB1, SMARCE1, SOS1, SOS2, SPRED1, SPRY1) を含むパネル解析系を確立し遺伝子解析を行ってきた。本研究ではこれまでに収集した患者の臨床症状の再検討を行い、LZTR1 を初めとしたバリエーションのスクリーニングを行い、陽性患者を蓄積する。遺伝子変異遺伝子患者に対して全エクソーム解析を

行い新規原因遺伝子を同定する。特にこれまで注目してこなかった潜性遺伝(劣性遺伝)遺伝形質や X 連鎖遺伝を示す遺伝子も候補として抽出する。

Project 2 : RAS のたんぱく量の変化によるヌーナン症候群の病態メカニズム解明

常染色体顕性遺伝(優性遺伝)形式で同定されている LZTR1 ミスセンス変異の機能解析を行う。申請者らは、既にゲノム編集技術を用いて LZTR1 の発現を低下させた細胞株を作製しているため、その細胞に野生型 LZTR1 とミスセンス変異を持つ LZTR1 を有するプラスミドを導入し、RAS との結合、RAS のユビキチン化、下流のシグナルに与える影響、増殖の変化などを観察する。ドミナントネガティブ変異の可能性もあるため、WT と変異 LZTR1 の比率を変化させたトランスフェクションも行い、WT に対する阻害効果を確認する。また変異特異的に結合する新しい分子の同定を行う。

最も頻度が高い常染色体顕性遺伝性変異を選択し、モデル生物を作成する。LZTR1 変異を導入した生物において成長や臓器発生(特に顔貌、心臓、骨格、皮膚、発育等)に異常をきたすか、あるいは癌を合併するかどうかを観察し、解析していく。臓器(特に心臓・脳・癌組織など)において、どのようなパスウェイが病態に関与しているかを知るために、遺伝子/蛋白発現・ゲノムの修飾(メチレーションなど)の変化を解析する。

4 . 研究成果

Project 1 : 潜性遺伝(劣性遺伝)遺伝ヌーナン症候群やモザイク RASopathies の新しい原因遺伝子同定

申請者らは、LZTR1 の機能として、RAF-PPP1CB と複合体を作ること、LZTR1 を細胞に導入すると、RAS をポリユビキチン化し分解に関与することを報告した(Umeki I et al. Hum Genet, 2019, Abe T et al. Cell Death Differ, 2019)。ヌーナン症候群類縁疾患の 41 遺伝子を含むパネル解析を行い、HRAS の遺伝子内重複を 2 人同定し、その機能解析を行い、論文として報告した(2019)(Nagai K et al. Hum Mutat, 2022)。解析したうちの 5 人に LZTR1 バリエントが同定された、パネル解析以外にも全エクソーム解析や全ゲノム解析を行った。それらの解析にて 8 人に LZTR1 バリエントが同定された。3 人は潜性遺伝(劣性遺伝)形式、5 人は常染色体顕性遺伝(優性遺伝)形式でバリエントが同定された。顕性遺伝(優性遺伝)バリエントの 2 個はこれまでに報告のないバリエントであった。臨床診断についてはヌーナン症候群疑いであった。1 人は胎児水腫で出生し、その後も胸水腹水の貯留が認められた。先天性疾患あるいは肥大型心筋症は 6 人に認められた。

ヌーナン症候群に同定された LZTR1 バリエントは常染色体潜性遺伝バリエントと、常染色体顕性遺伝バリエントがある。常染色体潜性遺伝(劣性遺伝)形式であるもののバリエントの片方が同定されていない可能性を考え、変異 1 つしか同定されていない患者においてもう片方の原因が解明できるかどうか、全エクソーム解析やパネル解析を行い、検討を行った。イントロンの変異 c.1943-256C>T の有無をパネル解析、あるいはエクソーム解析の IGV を用いて解析したところ、既にバリエントが同定されていた患者 3 人で c.1943-256C>T が同定され、本変異が頻度の高い原因バリエントであることが明らかになった。変異陰性患者のパネル解析結果を IGV で確認したが本バリエントは検出されなかった。これらの結果からイントロン上の c.1943-256C>T が潜性遺伝(劣性遺伝)バリエントとして頻度が高いことが示唆された。

新規原因遺伝子同定のための全エクソーム解析あるいは mosaic RASopathies の原因同定のための遺伝子パネル解析も継続して行った。これまでの解析にて原因未同定の患者サンプルにて、RASopathies との関連が示されていない転写因子 X に 4 人でバリエントを新たに認めしており、継続して解析を行っている。ヌーナン症候群がうたわれた胎児水腫例に VEGFR3 バリエントの新規バリエントを同定した。Shimmelpennig 症候群を含む mosaic RASopathies にはまだ原因遺伝子が同定されておらず、全エクソーム解析も視野に入れて解析を継続している。

Project 2 : RAS のたんぱく量の変化によるヌーナン症候群の病態メカニズム解明

顕性遺伝バリエントの機能的意義を調べるために顕性遺伝バリエント 4 種類について発現プラスミドに変異を導入した。293 細胞に WT と変異を導入した場合には、WT とバリエントの ELK レポーター活性は差がなかったが、LZTR1 をゲノム編集で欠失させた細胞に顕性遺伝バリエントを導入して ELK レポーター活性を解析したところ、WT で ELK 活性が減少するとこと、顕性遺伝バリエントでは活性が回復するため、WT に比べて機能的に低下していることが明らかになった。LZTR1 遺伝子バリエントは次々と報告されてきたが、その機能的な意義はまだ明らかでない。潜性遺伝バリエントはフレームシフトを含む loss-of-function が多く、LZTR1 のドメインに関わらず全体に同定される。一方で、顕性遺伝バリエントは KELCH ドメインのその多くが局在している。KELCH ドメインは基質の候補である RAS と結合するドメインと考えられており、今回の結果から LZTR1 の顕性遺伝バリエントが RAS との結合やそのユビキチン化を変化させ、下流の ERK パスウェイを活性化させる可能性があると考えられた。

顕性遺伝バリエントの個体における機能を明らかにするために、ゲノム編集法を用いて 4 番目の KELCH ドメインに変異をもつ生物を作製した。変異を持つ生物は外見上の変化はないが、臓器の重量を検討したところ、正常型に比べて心臓と脾臓の重量が重いことが明らかになった。生後 12 週から肥大型心筋症を有し、WGA 解析で心肥大を有していた他、線維化も亢進してい

る傾向を示した。ウェスタンブロット解析にて RAS の量の変化がみられ、RAS の量の増減にて下流のシグナルが制御されている可能性を示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Leoni Chiara, Viscogliosi Germana, Tartaglia Marco, Aoki Yoko, Zampino Giuseppe	4. 巻 Volume 15
2. 論文標題 Multidisciplinary Management of Costello Syndrome: Current Perspectives	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Multidisciplinary Healthcare	6. 最初と最後の頁 1277 ~ 1296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/JMDH.S291757	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Shiohama Tadashi, Fujii Katsunori, Kosaki Rika, Watanabe Yoshimi, Uchida Tomoko, Hagiwara Sho, Kinoshita Kaori, Sugita Katsuo, Aoki Yoko, Shimojo Naoki	4. 巻 188
2. 論文標題 Severe neuroglycopenic symptoms due to nonketotic hypoglycemia in children with cardio facio cutaneous syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part A	6. 最初と最後の頁 3505 ~ 3509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.a.62926	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tartaglia Marco, Aoki Yoko, Gelb Bruce D.	4. 巻 190
2. 論文標題 The molecular genetics of RASopathies : An update on novel disease genes and new disorders	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 425 ~ 439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.c.32012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nagai Koki, Niihori Tetsuya, Okamoto Nobuhiko, Kondo Akane, Suga Kenichi, Ohhira Tomoko, Hayabuchi Yasunobu, Homma Yukako, Nakagawa Ryuji, Ifuku Toshinobu, Abe Taiki, Mizuguchi Takeshi, Matsumoto Naomichi, Aoki Yoko	4. 巻 43
2. 論文標題 Duplications in the G3 domain or switch II region in HRAS identified in patients with Costello syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Mutation	6. 最初と最後の頁 3 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/humu.24287	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nozawa Akifumi, Ozeki Michio, Niihori Tetsuya, Suzui Natsuko, Miyazaki Tatsuhiko, Aoki Yoko	4. 巻 65
2. 論文標題 A somatic activating KRAS variant identified in an affected lesion of a patient with Gorham-Stout disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 995 ~ 1001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-020-0794-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Masahiro, Takashio Seiji, Nakashima Naoya, Hanatani Shinsuke, Arima Yuichiro, Sakamoto Kenji, Yamamoto Eiichiro, Kaikita Koichi, Aoki Yoko, Tsujita Kenichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Double chambered right ventricle complicated by hypertrophic obstructive cardiomyopathy diagnosed as Noonan syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ESC Heart Failure	6. 最初と最後の頁 721 ~ 726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ehf2.12650	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ando Yoshihito, Sawada Mikio, Kawakami Tadataka, Morita Mitsuya, Aoki Yoko	4. 巻 13
2. 論文標題 A Patient with Noonan Syndrome with a KRAS Mutation Who Presented Severe Nerve Root Hypertrophy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Case Reports in Neurology	6. 最初と最後の頁 108 ~ 118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000512265	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yoko Aoki
2. 発表標題 Genotype-based management for Noonan syndrome
3. 学会等名 International Meeting of Pediatric Endocrinology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木洋子、野澤明史、阿部太紀、新堀哲也、小関道夫
2. 発表標題 Somatic RASopathies: リンパ管腫症・Gorham病の原因検索
3. 学会等名 第29回日本遺伝子診療学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部 太紀, 森崎 佳歩, 新堀 哲也, 青木 洋子
2. 発表標題 LZTR1機能不全によるがん原遺伝子産物RASの異常蓄積と腫瘍増殖の亢進
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊達木澄人、川村遥、本川未都里、森内浩幸、後藤悠輔、青木洋子
2. 発表標題 HRAS遺伝子に新規ミスセンスバリエーション(p.Gly13Ala)を同定した軽症Costello症候群
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第67回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoko Aoki
2. 発表標題 Noncanonical GTPases: RRAS2, RRAS, MRAS, RIT1.
3. 学会等名 7th International RASopathies Symposium: Pathways to Understanding-Expanding Knowledge, Enhancing Research and Therapeutic Discovery 2 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永井 康貴、新堀 哲也、岡本 伸彦、近藤 朱音、須賀 健一、大平 智子、早淵 康信、 本間 友佳子、中川 竜二、井福 俊允、阿部 太紀、水口 剛、松本 直通、青木 洋子
2. 発表標題 HRAS遺伝子内重複患者の分子学的解析と臨床症状
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第66回大会 第28回日本遺伝子診療学会大会 合同開催
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新堀哲也、永井康貴、藤田京志、大橋博文、岡本伸彦、岡田賢、原田敦子、木原裕貴、Arbogast Thomas、舟山亮、城田松之、中山啓子、阿部太紀、井上晋一、Tsai I-Chum、松本直通、Davis Erica、Katsanis Nicholas、青木洋子
2. 発表標題 RRAS2の活性化変異はヌーナン症候群を引き起こす
3. 学会等名 第27回遺伝子診療学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富永牧子、井上真理、藤井隆成、富田英、梅木郁美、青木洋子、池田裕一
2. 発表標題 LZTR1に複合ヘテロ接合体変異を認めたNoonan症候群の一例
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青木洋子、野澤明史、新堀哲也、小関道夫
2. 発表標題 Somatic RASopathies: リンパ管腫症・Gorham病におけるがん原遺伝子RASの関与
3. 学会等名 第43回日本小児遺伝学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学 大学院医学系研究科 遺伝医療学分野 ホームページ
http://www.medgen.med.tohoku.ac.jp/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	新堀 哲也 (Niihori Tetuya) (40436134)	東北大学・医学系研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	阿部 太紀 (Abe Taiki) (40810594)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
イタリア	IRCCS			
米国	Icahn School of Medicine at Mount Sinai			