

機関番号：11301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2010

課題番号：21689029

研究課題名（和文） RAS/MAPK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 patients with RAS/MAPK syndromes.

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

研究成果の概要（和文）：

RAS/MAPK 症候群（ヌーナン症候群、コストロ症候群、CFC 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。ヌーナン様症候群の原因遺伝子として同定された SHOC2 遺伝子については、RAS/MAPK 症候群（疑い）患者 92 人中 8 人変異を同定した。また、ヌーナン症候群およびコストロ症候群患者で同定された遺伝子変異がどのように機能しているか、培養細胞に変異タンパクを強制発現させ解析した。

研究成果の概要（英文）：

Mutation analysis in patients with the RAS/MAPK syndromes was performed. SHOC2 gene was analyzed in 92 patients with the RAS/MAPK syndromes. Eight patients had SHOC2 p.S2G mutation. To understand the mechanism underlying the pathogenesis of the RAS/MAPK syndromes, we performed functional analysis of RAF1 and HRAS mutants identified in the patients.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|------------|
| 2009年度 | 5,400,000 | 1,620,000 | 7,020,000 |
| 2010年度 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 8,500,000 | 2,550,000 | 11,050,000 |

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：先天異常学、ヌーナン症候群、コストロ症候群、CFC 症候群、RAS/MAPK 症候群

1. 研究開始当初の背景

欧米では1,000から2,500人に1人、本邦でも約10,000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2001年に原因遺伝子が同定された。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/MAPK (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/MAPK 経路を活性化する変異であるとされている。

研究代表者らは、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 などにも 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 (Narumi Y, Aoki Y, Niihori T et al. Am J Med Genet A 143A:799-807, 2007、Narumi Y, Aoki Y, Niihori T et al. J Hum Genet 53: 834-41)。神経線維腫症 1 型も 10% 程度でヌーナン症候群類似の症状を呈し、病因はこの経路のネガティブレギュレーターである NF1 や SPRED1 異常である。申請者らはこれらの症候群が共通の RAS/MAPK 経路の異常が原因であることから、その総称として RAS/MAPK 症候群という呼称を提唱している (Aoki, Niihori et al. Hum Mutat 29:992-1006, 2008)。

しかし原因遺伝子が次々同定されている一方で、次の点は未だ十分明らかでなかった。

(1) 新たな原因遺伝子

ヌーナン症候群の 3 割、CFC 症候群の 3 割では既知の遺伝子に変異は同定されないことから、その存在が予想されている。

(2) 表現型/遺伝子型の相関

ヌーナン症候群、CFC 症候群では複数の原因遺伝子が存在しているが、遺伝子解析をされている症例数が少ないため未だ十分明らかになっていない点が多い。

(3) 原因となる遺伝子変異がどのように作用して臨床症状につながっていくか

例えば、RAS/MAPK 症候群は細胞増殖などを正に制御するシグナル伝達経路が活性化されていることが多いはずなのに、なぜ成長障害を合併するのか? や、コストロ症候群では腫瘍の合併率が高い (13%) が、全例で腫瘍を合併するのではないのはなぜか? といった疑問が存在した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、先天奇形症候群であるヌーナン症候群、コストロ症候群、CFC 症候群といった RAS/MAPK 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によって、これらの症候群に合併する症状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) 遺伝子解析および臨床症状の検討

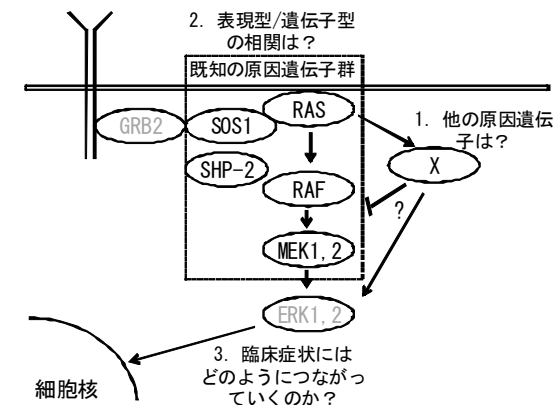
患者由来 DNA を鋳型として、原因遺伝子

(PTPN11、HRAS、BRAF、KRAS、MEK1、MEK2、SOS1、RAF1、SHOC2、NRAS) のすべてのエクソンを 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。変異の同定された遺伝子によって、または同一遺伝子内でも変異の部位によって患者の表現型に差がないかを検討する (図の 2)。ある特定部位に注目した塩基の遺伝子型判定については融解曲線解析法が有用であるので、SHOC2 遺伝子の解析には同法も用いた。シーケンシングで変異の同定されなかった症例については、遺伝子のコピー数の異常がないか検討するため Multiplex

Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法を用いて遺伝子の重複・欠失を解析する。また、変異の見つからない症例については候補遺伝子の解析を行う (図の 1)

(2) 臨床症状発生メカニズムに関する検討 MAPK 経路のシグナル伝達上では上流に位置する FGFR シグナル経路異常による疾患でのこれまでの知見を参考にし、RAS/MAPK 症候群患者で同定され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、変異蛋白発現プラスミドまたはウイルスを作成し、ヒト線維芽細胞に変異遺伝子を導入して、変異蛋白を発現させる。そして変異蛋白と野生型の影響を比較検討する (図の 3)。



4. 研究成果

(1) RAS/MAPK 症候群の遺伝子解析

臨床症状から RAS/MAPK 症候群が疑われる患者検体を収集し、既知の原因遺伝子である PTPN11、HRAS、KRAS、BRAF、MEK1/2、SOS1、RAF1 および最近新たに原因であると報告された SHOC2、NRAS の遺伝子解析を行った。SHOC2 遺伝子については、PTPN11、KRAS、HRAS、BRAF、MAP2K1/2、SOS1、RAF1 遺伝子変異陰性患者 92 人について全エクソンの塩基配列決定を行ったところ、8 人に既報告の p. S2G 変異を同定した。同変異を持つ患者は全例において低身長、疎な頭髪、アトピー様の皮膚を呈した。6 例においては重篤な精神運動発達遅滞と抜けやすい頭髪を認めた。1 例においては白血球増多を認めた。また、融解曲線解析法による遺伝子型判定を可能とする実験系を確立し、同変異が白血病細胞 82 例で同定されるか検討したが変異は同定されなかった。この結果

は、患者の臨床症状と遺伝子型の関連を明らかにする上で重要である。この概要はJournal of Human Genetics誌に報告した。変異が同定されなかった検体は新たな原因遺伝子を持つ可能性があり、候補遺伝子の解析 (MLPA法を含む) をすすめたが新規原因遺伝子の同定には至っていない。

(2) 変異蛋白による遺伝子発現への影響の包括的な検討

ヒト線維芽細胞に野生型HRASまたは活性型HRASを発現させ、アフィメトリクス社 GeneChip® 3 IVT Express Kitを用いて遺伝子発現量を包括的に解析した。その結果、細胞外マトリックス、サイトカイン、ケモカインなどに関連する分子のRNA発現が特に大きく変化していることが判明した。このことは、コストロ症候群の臨床症状の成因を考える上で重要である。

(3) Noonan症候群患者で同定されたRAF1変異のRAS/MAPK経路活性化メカニズムの検討

患者で同定された *RAF1S257L*、*N262K* 変異とRAF1の抑制分子である14-3-3遺伝子を培養細胞に導入し共発現させ検討したところ、RAF1と14-3-3の結合に重要な*RAF1S259*のリン酸化が低下しており、それにより14-3-3と分離しやすくなり下流のシグナルが活性化されることが示唆された。これはこれまで不明であった一部の変異の活性化機序を明らかにしたものであり、Human Mutation誌に報告した。

(4) コステロ症候群で同定されたHRAS変異体の機能解析

コストロ症候群で同定されたHRAS変異体9種類をNIH3T3細胞に一過性に導入しRASシグナル下流の転写活性を調べたところ、*Lys117Arg*、*Ala146Val* 変異では*Gly12Ser*等と比べ転写活性の上昇は軽度であった。これらの結果から、*Lys117Arg* および *Ala146Val* を持つコストロ症候群患者の臨床症状が典型例に比べやや軽度であるのは、変異体のシグナル伝達経路下流への影響が弱いためである可能性が示唆された。この所見により、遺伝子変異と患者表現型の関連を機能的に説明できる可能性がある。また、HRAS変異体9種類を、レトロウイルスベクターを用いヒト線維芽細胞に安定的に過剰に発現させた場合、いずれの変異体を発現させた細胞においても細胞の大きさが大型となる形態的特徴を示し、細胞内分子の解析では細胞周期を阻害する分子の発現上昇が見られた。この所見は、コストロ症候群における成長障害のメカニズムの一つである可能性があり、重要である。これらの研究内容をまとめ論文投稿中である。

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. Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, Abe Y, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Kanno J, Niihori T, Ono M, Ishii N, Owada Y, Fujimura M, Mashimo Y, Suzuki Y, Hata A, Tsuchiya S, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. J Hum Genet 56(1):34-40, 2011. 査読有
2. Watanabe Y, Yano S, Niihori T, Aoki Y, Matsubara Y, Yoshino M, Matsuishi T. A familial case of LEOPARD syndrome associated with a high-functioning autism spectrum disorder. Brain Dev 2010 Nov 17. [Epub ahead of print] 査読有
3. Komatsuzaki S, Aoki Y, Niihori T, Okamoto N, Hennekam RC, Hopman S, Ohashi H, Mizuno S, Watanabe Y, Kamasaki H, Kondo I, Moriyama N, Kurosawa K, Kawame H, Okuyama R, Imaizumi M, Rikiishi T, Tsuchiya S, Kure S, Matsubara Y. Mutation analysis of the SHOC2 gene in Noonan-like syndrome and in hematologic malignancies. J Hum Genet 55(12):801-9, 2010. 査読有
4. Ohtake A, Aoki Y, Saito Y, Niihori T, Shibuya A, Kure S, Matsubara Y. Non-Hodgkin Lymphoma in a Patient With Cardiofaciocutaneous Syndrome. J Pediatr Hematol Oncol. 2010 Jun 2. [Epub ahead of print] 査読有
5. Kobayashi T, Aoki Y, Niihori T, Cavé H, Verloes A, Okamoto N, Kawame H, Fujiwara I, Takada F, Ohata T, Sakazume S, Ando T, Nakagawa N, Lapunzina P, Meneses AG, Gillessen-Kaesbach G, Wieczorek D, Kurosawa K, Mizuno S, Ohashi H, David A, Philip N, Guliyeva A, Narumi Y, Kure S, Tsuchiya S, Matsubara Y. Molecular and clinical analysis of RAF1 in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation. Hum Mutat 31(3):284-94, 2010. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

1. Abe Y, Aoki Y, Niihori T, Ohashi H, Kurosawa K, Okamoto N, Kawame H, Mizuno S, Ogata T, Kuriyama S, Kure S, Matsubara Y. Prevalence and clinical features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome in Japan. The American Society of Human Genetics

60th annual meeting. 2010年11月5日、ワシントンDC、米国

2. Saito Y, Aoki Y, Niihori T, Ohtake A, Shibuya A, Sekiguchi K, Suenobu S, Izumi T, Muramatsu H, Kojima S, Kure S, Tsuchiya S, Matsubara Y. Hematologic abnormalities associated with patients with cardio-facio-cutaneous syndrome. The American Society of Human Genetics 60th annual meeting. 2010年11月5日、ワシントンDC、米国

3. Komatsuzaki S, Aoki Y, Niihori T, Okamoto N, Hennekam RCM, Hopman S, Ohashi H, Mizuno S, Watanabe Y, Kamasaki H, Kondo I, Moriyama N, Kurosawa K, Kawame H, Imaizumi M, Rikiishi T, Tsuchiya S, Kure S, Matsubara Y. SHOC2 mutation analysis in Noonan-like syndrome and hematologic malignancies. The American Society of Human Genetics 60th annual meeting. 2010年11月5日、ワシントンDC、米国

4. 小松崎匠子ほか Noonan 症候群類縁疾患及び血液腫瘍細胞における SHOC2 遺伝子変異解析 日本人類遺伝学会第 55 回大会 2010年10月30日、大宮

5. 松原洋一、小林朋子、新堀哲也、呉 繁夫、青木洋子 Noonan 症候群類縁疾患における RAF1 遺伝子解析とその発症メカニズムの検討 第 17 回日本遺伝子診療学会大会 2010年8月6日 津

6. Nishi E, Mizuno S, Niihori T, Aoki Y, Matsubara Y. CFC Syndrome with BRAF mutation at exon 15 in a patient with marked cutaneous symptoms. American Society of Human Genetics 59th annual meeting. 2009年10月23日 ワイキキ、米国

7. 小林朋子、青木洋子、新堀哲也、小松崎匠子、岡本伸彦、黒澤健司、川目 裕、大橋博文、水野誠司、松原洋一 Noonan 症候群類縁疾患 (The RAS/MAPK syndromes) の包括的遺伝子解析 日本人類遺伝学会第 54 回大会 2009年9月24日 東京

8. 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 16 回日本遺伝子診療学会大会 2009年8月1日 札幌

[図書] (計 1 件)

青木洋子、新堀哲也 小児の症候群 小児科診療 72 巻増刊 (2009 年) p31, 60, 68 診断と治療社

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：