2版

様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　6 年　6 月 13 日現在

機関番号：１１３０１
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2021～2023
課題番号：２１Ｋ１９４３６
研究課題名（和文）がん原遺伝子RASシグナル伝達疾患におけるリンパ管異形成のメカニズム解明

研究課題名（英文）Lymphatic abnormalities in RAS 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）　　5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ヌーナン症候群類縁疾患は心疾患・精神遅滞などを示す先天性疾患である。ヌーナン症候群は胎児期の浮腫、出生後も頸部浮腫などリンパ管異形成を合併するがRASがん遺伝子変異のリンパ管発生における機能はいまだ明らかではない。本研究では、リンパ管内皮特異的にRASがん遺伝子を発現するモデルマウスと、Noonan症候群モデルマウスにおけるリンパ管形成異常について検討を行った。胎児期のRAS遺伝子変異発現によりリンパ管増生や拡張が観察されたが血管系の異常は同定されず、リンパ管特異性がみられた。RASがん遺伝子の活性化にて胎児期にリンパ管発生の異常をきたすことが明らかになり成果を論文として発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
最近somatic RASopathiesとしてリンパ管腫症などの組織においてもRASの変異が同定されてきた。本研究ではリンパ管腫症の原因であるNRAS変異をリンパ管内皮細胞特異的に発現させたマウスと、ヌーナン症候群モデルマウスにおいて検討を行い、どちらも胎児期にリンパ管異形成が起こることを明らかにした。出生後における病態は今後の検討課題であるが、リンパ管発生の新しい分子機構を明らかにすることは、リンパ管疾患の新しい発症機序解明に貢献すると考えられる。最近はヌーナン症候群やリンパ管異常に対してパスウェイ阻害剤を投与する症例報告も海外から出ており今後の治療法検討に役に立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Noonan syndrome is a congenital disorder that indicates heart disease and intellectual disability. Patients with Noonan syndrome are associated with lymphatic dysplasia, including edema in the fetal period and cervical edema after birth, but the function of RAS oncogene mutations in lymphatic development is not yet clear. In this study, we examined lymphatic development in a mouse model that specifically expresses the RAS oncogene in the lymphatic endothelial cells and in a mouse model with Noonan syndrome. Lymphatic enlargement and dilation were observed due to the expression of RAS gene mutations in the fetal period, but no abnormalities in the vascular system were identified, suggesting lymphatic specificity. These results suggest that activation of the RAS oncogene causes abnormalities in lymphatic vessel development during the fetal period, and the results were published as a paper.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：リンパ管発生　リンパ管内皮　がん遺伝子

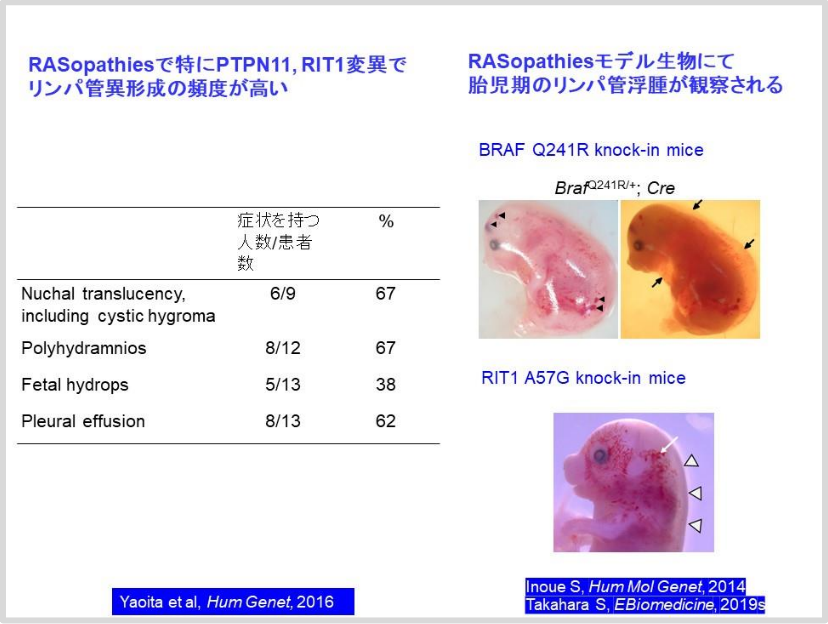
※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

ヌーナン症候群・コステロ症候群・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、コステロ症候群, 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（RASopathies）という疾患概念を確立してきた（Aoki Y, et al. Nat Genet, 2005, Niihori T, Aoki Y et al. Nat Genet, 2006, Aoki Y et al. Am J Hum Genet, 2013 など）(図 1)。また RIT1, HRAS, BRAF 変異をもつヌーナン症候群、コステロ症候群、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（Inoue S et al. Hum Mol Genet, 2014, Oba D et al. EBioMedicine, 2018, Takahara et al. EBioMedicine, 2019)。ヌーナン症候群は胎児期からの浮腫を呈し、出生後も頸部浮腫やリンパ管異形成を伴う代表的な疾患である。研究代表者がすでに作成した BRAF 変異マウスでは胎児の皮下のリンパ管拡張や頸部の juglar vein の拡張などリンパ管形成不全が明らかになった（Inoue et al Hum Mol Genet, 2014)。しかしながら RAS がん遺伝子変異のリンパ管発生における機能はいまだ明らかではない。

２．研究の目的

本研究の目的は以下のとおりである。
(1) HRAS, BRAF, RIT1 変異を培養リンパ管内皮細胞に導入し表現型の解析とマルチオミクス解析により 3 つの RAS/RAF 分子のリンパ管内皮に対するシグナルネットワークの変化とリンパ管内皮特異的な分子マーカーを同定する。
(2) RAS 変異マウス胎児・成獣の心臓、皮膚、脾臓におけるリンパ管形成異常の有無を横断的に解析し、がん原遺伝子特異的なリンパ管形成ネットワークへの関与を明らかにする



３．研究の方法

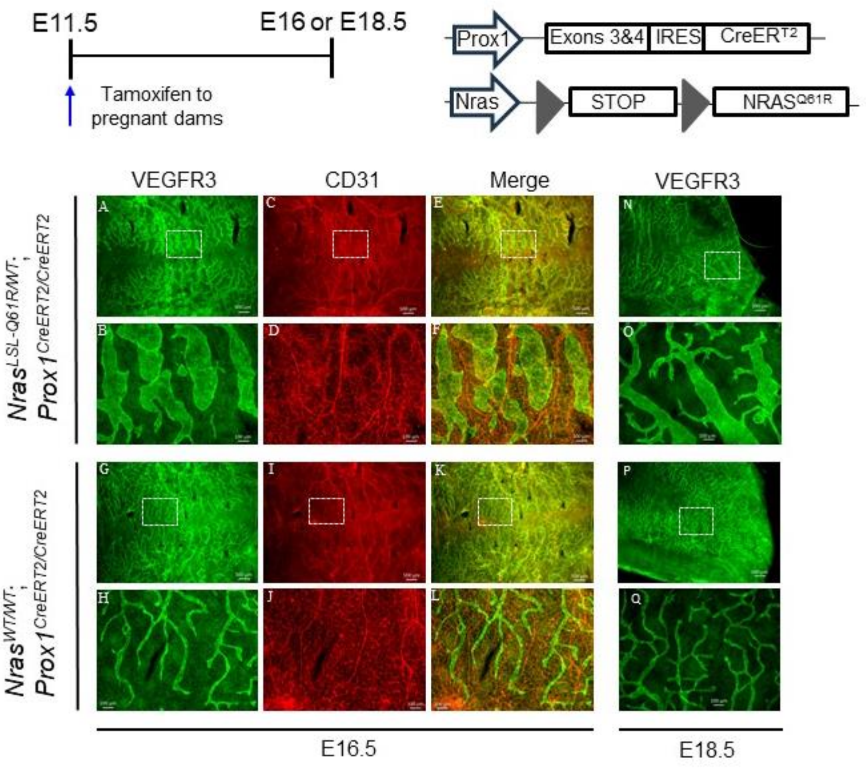
(1)培養リンパ管細胞に RAS 変異を導入しその表現型を解析する。変異導入細胞をマルチオミクス解析を行い、特に RIT1 特異的にリンパ管異形成に重要なシグナル、分子マーカーを同定する。
(2)NRAS Q61R 変異をタモキシフェンにてリンパ管内皮特異的に発現するマウスモデルを作成し、皮膚、脾臓におけるリンパ管形成異常の有無を横断的に解析する。
(3) すでに作成している RIT1 変異ノックインマウスにおいて胎児期・新生児・成獣の皮膚、耳、脾臓、肺、心臓においてリンパ管の発達と分子マーカーを解析しその変化を明らかにする。
RIT1 マウスは正常マウスに比べ心重量が重いが心筋細胞肥大はなく、間質細胞が増加している。RIT1 変異マウスにおける心臓リンパ管増生の有無と線維化との関係を解析する。

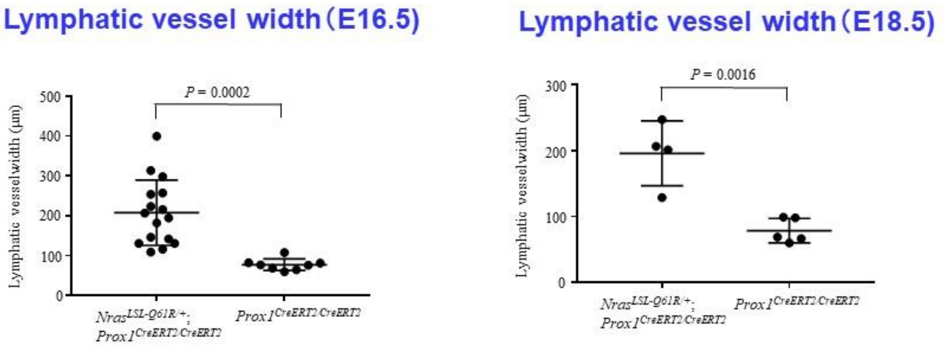
４．研究成果

(1)培養リンパ管内皮細胞（HDLEC)に RAS 変異を導入しの ELK 転写活性を測定した。HDLEC への一過性発現の効率は低く、その結果のばらつきを生じた。NIH3T3 細胞に導入し ELK 活性の上昇が観察された RIT1 変異を選定した。RIT1 A57G, M90I, Q79L について ELK 転写活性を観察したが A57G において活性上昇が認められた。次にウイルスベクターを用いて変異導入を試みたが、細胞毒性が強く実験を継続中である。

(2)リンパ管奇形罹患組織にて同定された、NRAS Q61R 変異をタモキシフェンにてリンパ管内皮特異的に発現するマウスモデルを作製した。このマウスにおいて、RAS 活性化変異のリンパ管発生への役割を知るために、胎児期 E11.5 で妊娠マウスにタモキシフェンを投与し E16.5 あるいは E18.5 で胎児の背中皮下のリンパ管の調べたところ、NRAS 変異を発現するのリンパ管内皮特異的に RAS の変異を発現するマウスを作製し、胎児期におけるリンパ管発生への影響を VEGFR3 染色、あるいは CD31 染色などにより調べたところ、顕著なリンパ管の拡張が観察された。リンパ管の分岐が有意に減少し、リンパ管の径の増大がみられた。Prox1 を発現する核の数も有意に

上昇し、りんパ管内皮の増加によるリンパ管増生であることが明らかになった。次に成獣のリンパ管内皮に NRAS 変異を発現するために、生後 0 日から 3 日間タモキシフェンを投与し、P23 にて耳の皮膚におけるリンパ管を調べたが変異導入マウスにおいてコントロールとの差は認められなかった。これらの成果を論文として報告した (Nozawa et al. Hum Mol Genet. 2024)。





(3) RIT1 変異ノックインマウスを用いて胎児 E14.5 と E16.5、生後 1 日に生まれてくる正常と変異マウスの比を調べたところ、E14.5 と E16.5 は同等であるが、生後 1 日には RIT1 変異マウスは正常の約半分になっていることが明らかになった。胎児期の全体の表現型としては、重度の浮腫や出血は見られなったが、胎児期の心臓と頸部リンパ管のヘマトキシリンエオジン染色を行ったところ、E16.5 にて心臓については約半数に異常があったが、頸部リンパ管においてもその拡張が観察された。NRAS 変異マウスにて行ったと同様に E16.5 において背中皮下のリンパ管内皮の VEGFR-3 染色を行ったところ、リンパ管の拡張が観察されたが、CD31 陽性の血管に違いは観察されなかった。以上より、RIT1 はリンパ管内皮の増殖に重要な役割を果たすこと、その一方で血管系の異常は来さないことが明らかになった。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計5件（うち査読付論文　5件／うち国際共著　3件／うちオープンアクセス　3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 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 Nozawa Akifumi、Fujino Akihiro、Yuzuriha Shunsuke、Suenobu Souichi、Kato Aiko、Shimizu Fumiaki、Aramaki-Hattori Noriko、Kuniyeda Kanako、Sakaguchi Kazuya、Ohnishi Hidenori、Aoki Yoko、Ozeki Michio	４．巻 67
２．論文標題 Comprehensive targeted next-generation sequencing in patients with slow-flow vascular malformations	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Journal of Human Genetics	６．最初と最後の頁 721～728
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-022-01081-6	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、Yasue Shiho、Endo Saori、Noguchi Kei、Kanayama Tomohiro、Tomita Hiroyuki、Aoki Yoko、Ohnishi Hidenori	４．巻 68
２．論文標題 Characterization of kaposiform lymphangiomatosis tissue‐derived cells	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Pediatric Blood Cancer	６．最初と最後の頁 e29086
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pbc.29086	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	4．巻
Gualtieri A, (21人) ,Aoki Y, Dattani MT, Gaston-Massuet C	12
2．論文標題	5．発行年
Activating mutations in BRAF disrupt the hypothalamo-pituitary axis leading to hypopituitarism in mice and humans	2021年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Nature Communications	2028

掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.1038/s41467-021-21712-4	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている（また、その予定である）	該当する

〔学会発表〕　計5件（うち招待講演　3件／うち国際学会　1件）

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, a substrate adaptor of ubiquitin E3 ligase, regulates RAS proteostasis and tumor growth
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 青木洋子、野澤明史、新堀哲也、小関道夫
2．発表標題 リンパ管疾患と原因遺伝子
3．学会等名 第45回　日本リンパ学会総会（招待講演）
4．発表年 2021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 血管奇形の原因遺伝子同定の戦略と課題
3．学会等名 第17回日本血管腫血管奇形学会学術集会（招待講演）
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 Tetsuya) (40436134)	東北大学・医学系研究科・准教授 (11301)	

6．研究組織（つづき）

	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	阿部　太紀 (Abe Taiki) (40810594)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	

	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
研究協力者	野澤　明史 (Nozawa Akifumi)	岐阜大学・医学部附属病院・助教	

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