

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791148

研究課題名(和文)RAS/MAPK症候群における遺伝子発現・エピジェネティクス解析

研究課題名(英文)Epigenetic effects of the mutations in patients with the RAS/MAPK syndromes

研究代表者

新堀 哲也(NIIHORI, Tetsuya)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40436134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：ヌーナン症候群および類縁疾患が疑われ、既知遺伝子に変異が同定されなかった14人について新規原因遺伝子同定を目的としてエクソーム解析を行った。その結果4人にRASサブファミリーに属するRIT1遺伝子にミスセンス変異を同定した。更に変異陰性患者166例でRIT1遺伝子を解析したところ、13例に変異を同定し、合計180例中17例(9%)に9種類のミスセンス変異を同定した。RIT1変異陽性患者の臨床症状はヌーナン症候群に合致しており、70%に肥大型心筋症を認めた。これはヌーナン症候群全体での肥大型心筋症合併率である20%と比べ高かった。

研究成果の概要(英文)：We identified a total of nine missense mutations in RIT1 gene, encoding a member of the RAS subfamily, in 17 of 180 individuals (9%) with Noonan syndrome and related conditions without mutations in known genes. Clinical manifestations in the mutation-positive individuals are consistent with those of Noonan syndrome, which are characterized by distinctive facial appearance, short stature and congenital heart defects. Seventy percent of mutation-positive individuals had hypertrophic cardiomyopathy, a high frequency compared with the 20% incidence in individuals with Noonan syndrome overall.

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 RAS/MAPK症候群

1. 研究開始当初の背景

本邦では約 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 年に原因遺伝子の一つとして PTPN11 が同定された。PTPN11 のコードするプロテインチロシンホスファターゼ SHP2 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。

申請者らは、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)。

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、SHOC2 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. 2007、Narumi Y, Aoki Y, Niihori T et al. 2008、Kobayashi T, Aoki Y, Niihori T et al. 2010、Komatsuzaki S, Aoki Y, Niihori T et al. 2010)。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、次の点は未だ解決されていない。

(1)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

RAS/MAPK の原因遺伝子が明らかとなってきており、そのほとんどは RAS/MAPK 経路を活性化するが、RAS/MAPK 経路の活性化がどのように臨床症状を引き起こすのかは明らかになっていない。例えば、RAS/MAPK 症候群に共通することとして、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は不明である。一方 RAS/MAPK 症候群であってもコステロ症候群ではヌーナン症候群/CFC 症候群よりも腫瘍発生率が高いことが示唆されている等、原因が同じシグナル伝達経路上の変異であっても、原因遺伝子によって臨床症

状が異なるが、そのメカニズムの違いは明らかになっていない。

(2) 新たな原因遺伝子

ヌーナン症候群・CFC 症候群の 3 割では既知遺伝子のシーケンスで変異は同定されないことから、新たな病因遺伝子の存在が予想されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、先天奇形症候群である RAS/MAPK 症候群(ヌーナン症候群、コステロ症候群、Cardio-facio-cutaneous 症候群など)の患者において既知原因遺伝子および新規原因候補遺伝子の塩基配列やエピジェネティックな変化を解析することで臨床症状発生の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) 既知原因遺伝子解析

ヌーナン症候群、コステロ症候群、CFC 症候群および類似の臨床症状の患者からの検体を収集し、検体から DNA を抽出した。患者由来 DNA を鋳型として、既知原因遺伝子のエキソンを 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した。本研究にあたっては、患者および代諾者より遺伝子解析に関する同意を得たうえで研究を遂行した。

(2) エクソーム解析

既知原因遺伝子に変異が同定されなかった例においてエクソーム解析を行った。SureSelect Human All exon v1 または 50Mb (v3) kit (Agilent) を用いてエクソーム濃縮を行い、HiSeq2000 (Illumina) にて 91 塩基または 101 塩基ペアエンドでの塩基読み取りを行った。得られた塩基配列をヒトゲノム配列 (hg19) に bwa0.5.9 を用いてマッピングし、重複リードの除去を行い、Genome Analysis Toolkit1.5 を用いて realignment、recalibration、SNP・Indel のバリアントコールを行い、ANNOVAR を用いてアノテーション付加を行った。

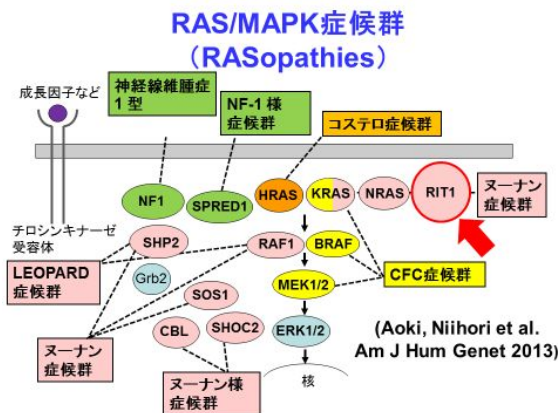
(3) 免疫沈降シーケンス (ChIP-seq)

患者で同定された遺伝子変異によるエピジェネティックな影響を網羅的に解析するため、クロマチン免疫沈降で得た DNA を次世代シーケンサーで解析する方法の確立を試みた。

4. 研究成果

ヌーナン症候群および類縁疾患が疑われ、既知遺伝子に変異が同定されなかった 14 人について新規原因遺伝子同定を目的としてエクソーム解析を行った。その結果、各サンプル毎に 25~100M のリードを得、ターゲットエクソーム領域での平均 Depth は 37~92

であった。エキソン領域のバリエーションは16,000から20,000程度、機能的変化が予測されるバリエーションが7,500から1万弱、そのうちSNPデータベースにないものは122,282であった。これらのバリエーションに注目したところ、4人にRASサブファミリーに属するRIT1遺伝子にミスセンス変異を同定した。更に変異陰性患者166例でRIT1遺伝子を解析したところ、13例に変異を同定し、合計180例中17例(9%)に9種類のミスセンス変異を同定した。RIT1変異陽性患者の臨床症状はヌーナン症候群に合致しており、70%に肥大型心筋症を認めた。これはヌーナン症候群全体での肥大型心筋症合併率である20%と比べ高かった。患者で同定された5種類の変異体をNIH3T3細胞に発現させELK1転写活性をルシフェラーゼアッセイにて解析したところ、野生型と比較し上昇がみられた。また、ゼブラフィッシュ胚に変異mRNAを導入したところ、頭部の形態異常や心のルーピング異常、心腔の形成不全、卵黄嚢の形態異常がみられた。これらの結果により、RIT1の機能獲得型変異がヌーナン症候群を引き起こすことを示され、ヒト発生において古典型RASの変異と同様の機能を持つことが示唆された。



ChIP-seq については培養細胞に導入した遺伝子産物の抗体を用いた免疫沈降を行うための条件検討を行い、免疫沈降で得られたDNAを元に次世代シーケンサー解析用ライブラリを作成した。デスクトップ型次世代シーケンサーである Miseq において塩基配列読み取りを行ったが、カタログスペックより少ないリード数しか得られず、十分なデータ量を得るためには複数回の解析が必要であった。HiSeq2500等の大型シーケンサーを用いたほうが費用対効果が高いと考えられた。

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)

Ogata T, Niihori T, Tanaka N, Kawai M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K,

Nakashima S, Kato F, Fukami M, Aoki Y, Matsubara Y. TBX1 mutation identified by exome sequencing in a Japanese family with 22q11.2 deletion syndrome-like craniofacial features and hypocalcemia. PLoS One. 2014 17;9(3):e91598. doi: 10.1371/journal.pone.0091598. (査読有)

Wakusawa K, Kobayashi S, Abe Y, Tanaka S, Endo W, Inui T, Iwaki M, Watanabe S, Togashi N, Nara T, Niihori T, Aoki Y, Haginoya K. A girl with Cardio-facio-cutaneous syndrome complicated with status epilepticus and acute encephalopathy. Brain Dev. 2014 Jan;36(1):61-3. doi: 10.1016/j.braindev.2012.12.007. (査読有)

Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Ogata T, Takada F, Yano M, Ando T, Hoshika T, Barnett C, Ohashi H, Kawame H, Hasegawa T, Okutani T, Nagashima T, Hasegawa S, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Inoue S, Watanabe Y, Ogura T, Matsubara Y. Gain-of-function mutations in RIT1 cause Noonan syndrome, a RAS/MAPK pathway syndrome. Am J Hum Genet. 2013 11;93(1):173-80. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.05.021. (査読有)

Izumi R, Niihori T, Aoki Y, Suzuki N, Kato M, Warita H, Takahashi T, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Abe K, Nakayama K, Aoki M, Matsubara Y. Exome sequencing identifies a novel TTN mutation in a family with hereditary myopathy with early respiratory failure. J Hum Genet. 2013 May; 58(5):259-66. doi:10.1038/jhg.2013.9. (査読有)

Ninomiya M, Kondo Y, Niihori T, Nagashima T, Kogure T, Kakazu E, Kimura O, Aoki Y, Matsubara Y, Shimosegawa T. Sequential analysis of amino acid substitutions with hepatitis B virus in association with nucleoside/nucleotide analog treatment detected by deep sequencing. Hepatol Res. 2014 44(6):678-684. doi: 10.1111/hepr.12168. (査読有)

[学会発表](計 5件)

2013年11月20-23日 日本人類遺伝学会第58回大会(仙台) 新堀 哲也、青木 洋子、番匠 俊博、岡本 伸彦、水野 誠司、黒澤 健司、緒方 勤、高田 史男、長谷川 奉延、舟山 亮、長嶋 剛史、中山 啓子、井上 晋一、渡邊 裕介、小椋 利彦、松原 洋一 エクソームシーケンシングによる Noonan 症候群新規原因遺伝子 RIT1 の同定

2013年11月20-23日 日本人類遺伝学会第58回大会(仙台) 井泉 瑠美子、新堀 哲也、青木 洋子、鈴木 直輝、加藤 昌昭、割

田 仁、高橋 俊明、豎山 真規、長嶋 剛史、
舟山 亮、阿部 康二、中山 啓子、青木 正志、
松原 洋一 Myofibrillar myopathy の大家系
における次世代型シーケンサーを用いた
新たな原因遺伝子の同定

2013年11月20-23日 日本人類遺伝学会
第58回大会(仙台) 緒方 勤、田中 紀子、
河井 昌彦、深見 真紀、新堀 哲也、青木 洋
子、松原 洋一 エクソーム解析により TBX1
変異が同定された家族性の特徴的顔貌・鼻咽
頭閉鎖不全・低Ca血症を呈する5例

2013年10月22-26日 American Society
of Human Genetics 63rd Annual Meeting
(米国・ボストン) R. Izumi, T. Niihori, Y.
Aoki, N. Suzuki, M. Kato, H. Warita, T.
Takahashi, M. Tateyama, T. Nagashima, R.
Funayama, K. Abe, K. Nakayama, M. Aoki,
Y. Matsubara. A mutation in A-band titin is
associated with hereditary myopathy with
early respiratory failure in a Japanese
family.

2013年10月22-26日 American Society
of Human Genetics 63rd Annual Meeting
(米国・ボストン) T. Niihori, Y. Aoki, T.
Banjo, N. Okamoto, S. Mizuno, K.
Kurosawa, T. Ogata, F. Takada, M. Yano, T.
Ando, T. Hoshika, C. Barnett, H. Ohashi, H.
Kawame, T. Hasegawa, T. Okutani, T.
Nagashima, S. Hasegawa, R. Funayama, T.
Nagashima, K. Nakayama, S. Inoue, Y.
Watanabe, T. Ogura, Y. Matsubara. Exome
sequencing identifies mutations in a novel
gene in patients with Noonan syndrome.

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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：