

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591498

研究課題名(和文) RAF1 遺伝子変異におけるヌーナン症候群発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Understanding the pathogenic mechanism for Noonan syndrome with RAF1 mutation

研究代表者

小林 朋子 (KOBAYASHI, Tomoko)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号：50436119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：(1) RAF1遺伝子変異陽性ヌーナン症候群9症例(生後2か月～16歳)の詳細な臨床症状を収集し、9症例中4例が就学前に死亡、就学している5症例中4例が支援学級に通っているなど、長期的な自然歴を明らかにした。

(2) 先天異常症候群が疑われる患者を診断に導く遺伝学的検査の実施体制を構築した。具体的にはマイクロアレイ染色体検査を導入した。また、マイクロアレイ染色体検査から得られた結果によって患者家族にもたらされる心理社会的影響について文献的レビューを実施し、マイクロアレイ染色体検査実施前後の遺伝カウンセリングの在り方を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：(1) To collect detailed symptoms of 9 Noonan syndrome patients with RAF1 mutation has revealed longer-term natural history such as 4 cases died before school age and 4 patients in 5 cases go to a resource room.

(2) We build the system needed that patient with multiple malformations such as Noonan syndrome is genetically diagnosed. Concretely speaking, we innovated chromosomal microarray analysis. Additionally, systematic review has revealed psychosocial impact of chromosomal microarray analysis for patient's family. In the result, we make a recommendation about existence of genetic counseling before and after chromosomal microarray analysis.

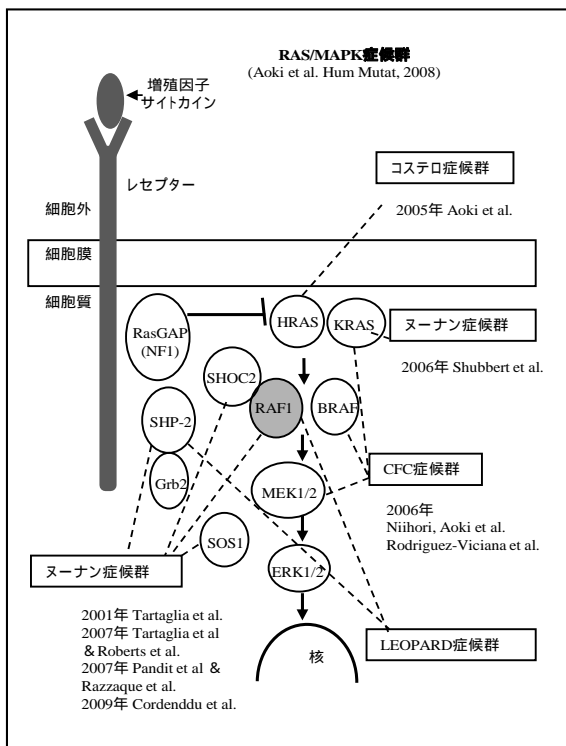
研究分野：臨床遺伝学

キーワード：先天異常症候群 遺伝学的検査 遺伝カウンセリング ヌーナン症候群 RAF1遺伝子 ヌーナン症候群
類縁疾患

1. 研究開始当初の背景

ヌーナン症候群は、低身長・心奇形・翼状頸・特異的顔貌を特徴とする、本邦では1万人に1人と比較的頻度の高い先天奇形症候群である。その原因は、2001年にプロテインチロシンホスファターゼ SHP-2 をコードする PTPN11 遺伝子である事が報告されたが、ヌーナン症候群の約50%ではPTPN11 遺伝子変異が見つからず、その原因は不明だった。青木らは、SHP-2 が細胞の増殖・分化・死をコントロールするシグナル伝達経路である RAS/MAPK 経路を活性化することに注目し、PTPN11 遺伝子変異陰性ヌーナン症候群や臨床的にヌーナン症候群に類似した他の先天奇形症候群の病因が RAS/MAPK 経路に関わる遺伝子変異によるものではないかと考え、PTPN11 遺伝子変異陰性のヌーナン症候群とその類縁疾患であるコストロ症候群、CFC (Cardio-facio-cutaneous) 症候群の候補遺伝子解析を施行した。その結果、コストロ症候群と CFC 症候群の原因遺伝子が、それぞれ HRAS と KRAS/BRAF である事を同定し、発表した (Aoki et al. Nature Genetics 37:1038-40, 2005) (Niihori et al. Nature Genetics 38:294-6, 2006)。

近年 KRAS と SOS1 遺伝子もヌーナン症候群



の原因遺伝子である事が報告された。研究代表者らは、ヌーナン症候群家系と CFC 症候群 3 家計で SOS1 遺伝子変異を同定し、SOS1 遺伝子変異ヌーナン症候群のみならず、CFC 候群でも原因となることを示した

Narumi et al. J Hum Genet 53: 834-41, 2008)。

その後、SHOC2 遺伝子がヌーナン症候群の原因遺伝子である事が報告された。研究代表者らは、既知の遺伝子変異陰性のヌーナン症

候群患者 92 人で遺伝子解析を施行、8 人に SHOC2 遺伝子変異を同定した。その臨床症状は既存のヌーナン症候群とは合致せず、SHOC2 遺伝子変異陽性患者はヌーナン様症候群として独立した疾患と考えられた (Komatsuzaki et al. J Hum Genet 55:801-9, 2010)。

最近では RAF1 遺伝子がヌーナン症候群と LEOPARD 症候群の原因遺伝子である事が報告された。研究代表者は、ヌーナン症候群とその類縁疾患における RAF1 遺伝子解析を施行した。その結果、既知の遺伝子変異陰性のヌーナン症候群類縁疾患患者 119 人中 18 人で RAF1 遺伝子変異を同定した。RAF1 遺伝子変異陽性患者は全例ヌーナン症候群と確定診断でき、臨床症状の検討から、RAF1 遺伝子変異陽性者では肥大型心筋症の合併率が優位に高いことを明らかにした。RAF1 タンパクの機能解析から、RAF1 変異タンパクでは抑制性の S259 リン酸化が低下しており、RAF1 活性化抑制に重要な 14-3-3 タンパクとの結合が低下し、その結果非刺激時にもシグナル伝達経路下流の ERK を活性化していることを明らかにした (Kobayashi et al. Hum Mutat 31:284-94, 2010)。

この 10 年間でヌーナン症候群を始めとする RAS/MAPK シグナル伝達経路にかかわる遺伝子変異が原因で生じる先天奇形症候群 (RAS/MAPK 症候群) の原因遺伝子が次々と同定されているが、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のか

いずれの原因遺伝子も RAS/MAPK シグナル伝達経路下流の ERK を活性化するが、同じヌーナン症候群でも RAF1 遺伝子変異陽性者では肥大型心筋症、SHOC2 遺伝子変異陽性者では毛髪異常の合併が高率など臨床症状に違いが出てくるのはなぜか、といった疑問が存在する。

(2) 表現型/遺伝子型の相関

研究代表者は、自験例と報告例から他の遺伝子 (PTPN11・KRAS・SOS1) 変異陽性ヌーナン症候群患者と比較して RAF1 遺伝子変異陽性ヌーナン症候群では肥大型心筋症の合併率が優位に高いことを明らかにしている。その他にも低身長、精神発達遅滞、心房心室中隔欠損症の合併率が高く、乳幼児期早期の死亡者が多い傾向を見出している。しかし、低身長は四肢短縮を伴うものなのか、精神発達遅滞を引き起こす様な要因 (てんかんや脳形態異常など) は伴っていないのか、乳幼児期以降の長期予後はどうなるのかなど、それらの表現型の詳細についての検討はなされていない。また、RAF1 遺伝子変異の部位による表現型の相違については、症例数不足から検討されていない。

2. 研究の目的

(1) RAF1 遺伝子変異が RAF1 遺伝子変異陽性ヌーナン症候群で高率に合併する肥大型心筋症にどのように関与するのかを RAF1 遺伝子機能解析によって明らかにする。

(2) RAF1 遺伝子変異陽性ヌーナン症候群の詳細な臨床症状の情報を自験例と報告例から収集し、表現型/遺伝子型の相関を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)ヌーナン症候群の原因遺伝子として同定された RAF1 遺伝子の機能解析

ヌーナン症候群で同定された RAF1 遺伝子変異と肥大型心筋症との関連を検討する。

RAF1 遺伝子変異陽性ヌーナン症候群では73%で肥大型心筋症を合併する。またヌーナン症候群で認められる RAF1 遺伝子変異は S257L が最多である (Kobayashi et al. Hum Mutat 31:284-94, 2010)。Raf1^{L613V} マウスでは、心筋細胞肥大からなる肥大型心筋症を合併しており、ミオシン重鎖で肥大型心筋症に特徴的な所見が認められている (Wu X et al. J Clin Invest 121:1009-25, 2011)。S257L 変異 RAF1 遺伝子が心筋細胞内でどのような影響をもたらすのかを解析するために、RAF1 変異タンパク発現プラスミドまたはウイルスを作成し、心筋細胞株に RAF1 変異遺伝子を導入して、変異タンパクを発現させる。そして変異型と野生型の影響を比較検討する。

具体的には、変異型または野生型遺伝子導入細胞において

心筋細胞の形態、増加曲線などに注目して観察

心筋細胞を各種染色で染め、構成の特徴を把握する

心筋の主な構造タンパクであるミオシンの RT-PCR による定量比較

ERK のみならず Jnk や p38 MAPK シグナル伝達経路など、他のシグナル伝達経路への影響を見るために抗リン酸抗体などを用いたウエスタンブロットを行い、成長因子処理などによって変異型と野生型で差がないか検討

網羅的な下流シグナル解析のための遺伝子発現アレイ

(2)RAF1 遺伝子変異陽性ヌーナン症候群の臨床症状の詳細な検討

研究代表者は RAF1 遺伝子変異陽性ヌーナン症候群患者において、周産期異常(2項目)・発育発達(4項目)・顔貌異常(8項目)・体格(4項目)・循環器系(8項目)・四肢/骨格(5項目)・皮膚/毛髪(6項目)・性/泌尿器(4項目)・血液(2項目)の43項目について臨床症状を集積している。RAF1 遺伝子変異陽性ヌーナン症候群患者の臨床症状の特徴を明らかにするために、他の遺伝子変異陽性ヌーナン症候群患者の臨床症状と比較した。その結

果、RAF1 遺伝子変異陽性者では、肥大型心筋症の合併が優位に高いことが判明した。その他にも、精神発達遅滞、心房心室中隔欠損症、低身長との合併が多い傾向にあった。現時点では、循環器系以外の合併症についてはその根本的な事象についての検討がなされていない。また RAF1 遺伝子解析が施行されている症例数の不足から RAF1 遺伝子変異部位での表現型の相違は不明である。そこで、RAF1 遺伝子変異がヌーナン症候群の表現型に及ぼす影響を詳細に検討する。

具体的には、

RAF1 遺伝子変異陽性ヌーナン症候群の症例を集積し、RAF1 遺伝子内での変異の部位によって患者の表現型に差がないか検討する。

研究代表者は小児神経専門医・臨床遺伝専門医であり、精神発達遅滞が認められた症例において、その原因となる根本的な事象(てんかんや脳形態異常の有無など)についてさらに検討していく。研究代表者が所属する東北大学小児科では、各種の小児科専門医が所属しており、研究代表者は助言を得ながら、各項目で認められる臨床症状の根本的な事象について検討する。

4. 研究成果

(1)ヌーナン症候群の原因遺伝子として同定された RAF1 遺伝子の機能解析

RAF1 遺伝子変異陽性ヌーナン症候群患者では肥大型心筋症を高率に合併することの関連を明らかにするために RAF1 遺伝子機能解析を中心的に施行した。

具体的には、ヌーナン症候群で認められる RAF1 遺伝子変異は S257L 変異が最多であり、この変異のタンパク発現プラスミドを作成し、心筋細胞株に RAF1 変異遺伝子を導入した。野生型と変異型遺伝子導入細胞での RAF1 タンパク発現状態を比較検討したが、結論づけられる様な結果が出ず、RAF1 遺伝子機能解析に関しては手詰まりの状態となった。

(2)RAF1 遺伝子変異陽性ヌーナン症候群の臨床症状の詳細な検討

9症例(生後2か月~16歳)の RAF1 遺伝子変異陽性ヌーナン症候群の詳細な臨床症状を収集し、自然歴をまとめた。9症例中4症例が就学前に死亡、就学している5症例中4例が支援学級に通っているなど、長期的な自然歴が明らかとなった。得られた結果は英語学会雑誌へ投稿準備中である。

9症例の臨床症状の詳細な検討では、RAF1 遺伝子内の変異部位による患者の表現型には差が検出されなかった。

(3)その他

ヌーナン症候群をはじめとする先天異常症候群が疑われる患者の診断に繋げるための遺伝学的検査を実施できる体制を構築した。具体的には、従来実施していた

Sanger法以外に、マイクロアレイ染色体検査を導入した。その結果、ヌーナン症候群類縁疾患が疑われる患者が染色体微細欠失症候群やテトラソミーモザイク疾患と確定診断がつけられた症例を認めた。ヌーナン症候群をはじめとする先天異常症候群の患者が、診断を目的にマイクロアレイ染色体検査を実施した場合、得られた結果は4種類に分類される。数的変化を(A)認めなかった場合、(B)認めた場合で1) 数的変化、2) 臨床的意義不明の変化(VUS: Variants of uncertain significance)、3) 偶発的所見(IFs: Incidental Findings)の4種類である。各々の結果が患者と家族にもたらす心理社会的影響について文献的レビューを実施した(下表)。その結果、マイクロアレイ染色体検査を含む網羅的遺伝学的検査実施前後の遺伝カウンセリングの在り方を明らかにすることができた。

		患者保護者		
		肯定的	否定的	文献
変異 無		異常がなく て安心	期待はず れ	金子ら, 2009
変異 有	病的変 異	・不安軽減 ・未診断か らの解放	ショック	Houdayer F, 2013 Hogan J, 2013
	VUS	混乱や困惑 なし (十分な説 明を文書で 受けたた め)	症状理解 の一助に しか過ぎ ない	Jez S, 2015
	IFs	・早期介入 が可能 ・重篤、対 応法ありの 場合は知り たい	・予想外 の結果を 知らされ ショック ・重篤で ない、不 確実、影 響なしの 場合は知 りたくな い	Christen husa GM, 2014 Hogan J, 2013 Cottrell CE, 2010

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 15 件)

- Haginoya K, Kobayashi T, Kure S. (total 16, 5th) FDG-PET study of patients with Leigh syndrome. Journal Neurol Sci. 362: 309-313, 2016. (査読有) DOI: 10.1016/j.jns.
- Katata Y, Kobayashi T, Kure S. (total 12, 7th) Novel missense mutation in CLN8 in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: The first report of a CLN8 mutation in Japan. Brain Dev. 38:341-34, 2015. (査読有) DOI: 10.1016/j.braindev.
- Hino-Fukuyo, Kobayashi T, Kure S. (total 12, 11th) Clinical features and long-term outcome of a group of Japanese children with inflammatory central nervous system disorders and seropositivity to myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibodies. Brain Dev. 37:849-852, 2015. (査読有) DOI: 10.1016/j.braindev.
- Hino-Fukuyo, Kobayashi T, Kure S. (total 18, 12th) Genomic analysis identifies candidate pathogenic variants in 9 of 18 patients with unexplained West syndrome. Hum Genet. 134:649-658, 2015. (査読有) DOI: 10.1007/s00439-015-1553-6
- Inui T*, Kobayashi T*, Haginoya K. *:Co-first authors (contributed equally to this work) (total 14, 1st) Efficacy of long term weekly ACTH therapy for intractable epilepsy. Brain Dev. 37:449-454, 2015. (査読有) DOI: 10.1016/j.braindev.
- Nakayama T, Kobayashi T, Matsumoto N. (total 12, 8th) RBPJ is disrupted in a case of proximal 4p deletion syndrome with epilepsy. Brain Dev. 36:532-536, 2014. (査読有) DOI: 10.1016/j.braindev.
- Kobayashi T, Tsuchiya S. (total 5, 1st) A case of infant botulism infection due to consumption of untreated well-water. J Pediatr. 164:931-933, 2014. (査読有) DOI: 10.1016/j.jpeds.
- Sato H, Kobayashi T, Kure S. (total 9, 5th) Early replacement therapy in a first Japanese case with autosomal recessive guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency with a novel point mutation. Brain Dev. 36:268-271, 2014. (査読有) DOI: 10.1016/j.braindev.
- Haginoya K, Kobayashi T, Iinuma K. (total 19, 14th) The usefulness of subtraction ictal SPECT and ictal near-infrared spectroscopic topography in patients with West syndrome. Brain Dev. 35:887-893, 2013. (査読有) DOI: 10.1016/j.braindev.
- Kakisaka Y, Kobayashi T, Kure S. (total 7, 2nd) Periodic eye movements and epileptic

spasms in West syndrome. J Child Neurol. 28:1483-1484, 2013. (査読有)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23670250

- 11) Iwasaki M, **Kobayashi T**, Tominaga T. (total 11, 6th) Parental satisfaction and seizure outcome after corpus callosotomy in patients with infantile or early childhood onset epilepsy. Seizure. 22:303-305, 2013. (査読有) DOI: 10.1016/j.seizure.
- 12) Kakisaka Y, **Kobayashi T**, Kure S. (total 10, 2nd) Utility of thallium-201 scintigraphy in Tolosa-Hunt syndrome. Tohoku J Exp Med. 229:83-86, 2013. (査読有) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23291611
- 13) Hino-Fukuyo Naomi, **Kobayashi T**, Kure S. (total 14, 7th) Extremely low-dose vigabatrin for West syndrome with tuberous sclerosis. J Pediatr Epilepsy. 2:255-258, 2013. (査読有)
- 14) Uematsu M, **Kobayashi T**, Kure S. (total 10, 7th) Hypoperfusion in caudate nuclei in patients with brain-lung-thyroid syndrome. J Neurol Sci. 315:77-81, 2012. (査読有) DOI: 10.1016/j.jns.2011.11.025.
- 15) Kakisaka Y, **Kobayashi T**, Kure S. (total 9, 3rd) Hallucinations associated with cerebrospinal fluid leakage after a lumbar puncture. Br J Anaesth. 109:465-466, 2012. (査読有) DOI: 10.1093/bja/aes290.

【学会発表】(計 16 件)

- 1) **小林朋子**ら. 遺伝と多様性を学ぶための小児を対象とした遺伝教育ツール開発の取り組み. 日本人類遺伝学会第 60 回大会, 2015 年 10 月 17 日, 京王プラザホテル(東京都新宿区)
- 2) **小林朋子**ら. 8q22.3 領域の微細欠失を認めた女児例. 第 38 回日本小児遺伝学会学術集会, 2015 年 7 月 26 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 3) **小林朋子**ら. マイクロアレイ染色体検査がもたらす心理社会的影響～症例報告～. 第 39 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 2015 年 6 月 26 日, 三井ガーデンホテル千葉(千葉県千葉市)
- 4) **小林朋子**ら. マイクロアレイ染色体検査がもたらす心理社会的影響～系統レビュー～. 第 39 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 2015 年 6 月 26 日, 三井ガーデンホテル千葉(千葉県千葉市)
- 5) **小林朋子**ら. DYNC1H1 遺伝子に新規変異を同定した大脳皮質形成異常と両下肢近位筋優位の筋萎縮を認める家族例. 第 57 回日本小児神経学会総会, 2015 年 5 月 29 日, 帝国ホテル大阪(大阪府大阪市)
- 6) **小林朋子**ら. DYNC1H1 新規変異を同定した大脳皮質形成異常と両下肢筋萎縮を認める一例～明らかになってきた DYNC1H1 変異型と表現型との関連～.

日本人類遺伝学会第 59 回大会, 2014 年 11 月 20 日, タワーホール船堀(東京都江戸川区)

- 7) **小林朋子**ら. シリーズ形成スパズム発作に対して ACTH 療法が有効だった Pallister-Killian 症候群の 2 例. 第 48 回日本てんかん学会学術集会, 2014 年 10 月 3 日, 京王プラザホテル(東京都新宿区)
- 8) **小林朋子**ら. Infantile spasms を呈した Pallister-Killian 症候群の 2 例. 第 56 回日本小児神経学会総会, 2014 年 5 月 29 日, アクトシティ浜松(静岡県浜松市)
- 9) **小林朋子**. 原因不明の精神運動発達遅滞とてんかんで受診し確定診断に至った 6 歳児～マイクロアレイ染色体検査の有用性～. 宮城県小児科医会学術講演会. 2014 年 1 月 9 日(招待講演) 江陽グランドホテル(宮城県仙台市)
- 10) **小林朋子**ら. SLC2A1 遺伝子同一変異でも表現型は多彩であることが示唆されたグルコーストランスポーター 1 欠損症候群の 1 例. 日本人類遺伝学会第 58 回大会, 2013 年 11 月 22 日, 江陽グランドホテル(宮城県仙台市)
- 11) **小林朋子**ら. Drave 症候群における Stiripentol の治療効果の検討. 第 47 回日本てんかん学会学術集会, 2013 年 10 月 11 日, 北九州国際会議場(福岡県北九州市)
- 12) **小林朋子**ら. SLC2A1 遺伝子変異を同定した古典型 GLUT1 欠損症候群の 1 例. 第 55 回日本小児神経学会総会, 2013 年 6 月 1 日, 大分オアシスタワーホテル(大分県大分市)
- 13) **小林朋子**ら. 末梢血マイクロアレイ染色体検査で診断できた Pallister-Killian 症候群の 1 例. 日本人類遺伝学会第 57 回大会, 2012 年 10 月 26 日, 京王プラザホテル(東京都新宿区)
- 14) **小林朋子**ら. 結節性硬化症に伴った難治性てんかんに対するピガバトリンの効果. 第 46 回日本てんかん学会学術集会, 2012 年 10 月 11 日, 都市センターホテル(東京都千代田区)
- 15) **小林朋子**ら. スパズム発作を有する結節性硬化症を伴った難治性てんかんに対するピガバトリンの効果. 第 54 回日本小児神経学会総会, 2012 年 5 月 18 日, ロイトン札幌(北海道札幌市)

【図書】(計 4 件)

- 1) 川目裕, **小林朋子**. 【こどもの病気 遺伝について聞かれたら】頭蓋骨縫合早期癒合症候群. 診断と治療社. 4:174-176, 2015. (査読無)
- 2) **小林朋子**, 川目裕. 神経症候群(第 2 版) Robert 症候群/ SC アザラシ肢症候群. 日本臨床別冊. 29:658-660, 2014. (査読無)
- 3) **小林朋子**, 川目裕. 神経症候群(第 2 版) Robinow 症候群. 日本臨床別冊.

29:661-662, 2014. (査読無)

- 4) **小林朋子**. 原因不明の精神運動発達遅滞とてんかんで受診し確定診断に至った6歳児～マイクロアレイ染色体検査の有用性～. 宮城県小児科医会報. 251:32-33, 2014. (査読無)

〔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

小林 朋子 (KOBAYASHI, Tomoko)
東北大学/ 東北メディカル・メガバンク機構/ 助教
研究者番号：50436119

(2) 研究分担者

呉 繁夫 (KURE, Shigeo)
東北大学/ 医学(系)研究科(研究院)/ 教授
研究者番号：10205221

川目 裕 (KAWAME, Hiroshi)
東北大学/ 東北メディカル・メガバンク機構/ 教授
研究者番号：60246395

松原 洋一 (MATSUBARA, Yoichi)
国立研究開発法人国立成育医療研究センター/ 研究所/ 研究所長
研究者番号：00209602

(3) 連携研究者

無