

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860839

研究課題名(和文) BRAF遺伝子変異をもつCFC症候群発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) BRAF knock-in mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects in CFC syndrome

研究代表者

井上 晋一 (INOUE, SHINICHI)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70622091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：Cardio-facio-cutaneous(CFC)症候群は心疾患・特異的顔貌・皮膚疾患を特徴とする遺伝性疾患である。しかしながら、その発症メカニズムはわかっていない。そこでCFC症候群患者において主要な原因となるBrafQ241R遺伝子変異をもつノックインマウスを作製し解析した。ノックインマウスは心疾患、肝壊死、浮腫、骨格異常を示し胎生致死であった。しかしノックインマウスの胎生致死はPD0325901(MEK阻害剤)、GSK-J4(ヒストン脱メチル化阻害剤)またその併用投与によって改善した。これらの成果はCFC症候群の病態メカニズムの解明に役立つとともに、治療法の開発に有用である。

研究成果の概要(英文)：Germline mutations in BRAF cause cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome, which is characterized by heart defects, distinctive facial features and ectodermal abnormalities. To define the pathogenesis and to develop a potential therapeutic approach in CFC syndrome, we generated knock-in mice expressing the Braf Q241R mutation. Knock-in mice manifested embryonic/neonatal lethality, showing liver necrosis, edema, craniofacial abnormalities and multiple heart defects. Prenatal treatment with a MEK inhibitor, PD0325901, or a histone 3 demethylase inhibitor, GSK-J4, rescued the embryonic lethality in knock-in embryos. Combination treatment with PD0325901 and GSK-J4 further increased the rescue from embryonic lethality. These results suggest that Braf knock-in mice recapitulate major features of CFC syndrome and that epigenetic modulation as well as the inhibition of the ERK pathway will be a potential therapeutic strategy for the treatment of CFC syndrome.

研究分野：医歯薬学

キーワード：CFC症候群 BRAF RASopathies RAS/MAPK 先天性心疾患 ヒストン脱メチル化酵素

1. 研究開始当初の背景

先天性奇形症候群である cardio-facio-cutaneous (CFC) 症候群、Noonan 症候群、Costello 症候群は特異的顔貌・心疾患・精神遅滞を示す遺伝性疾患である。2001年にNoonan 症候群の原因として SHP-2タンパク質をコードするPTPN11遺伝子への変異が同定された(図1)¹⁾。その後、本研究室においてCostello 症候群の原因がHRAS 遺伝子への変異であること²⁾、さらにCFC 症候群の原因遺伝子としてBRAF、KRAS を同定した(図1)³⁾。これら症候群の原因遺伝子はRAS/MAPK経路に存在することからRAS/MAPK 症候群またはRASopathiesと呼ばれている^{4,5)}。

現在までにCFC 症候群原因遺伝子はBRAF、MEK1/2、KRAS であることがわかっているが、その約半数以上がBRAF への変異である。中でもBRAF遺伝子の257番目のアミノ酸であるグルタミンがアルギニンに置換されたBRAFQ257R変異がその半数を占める。これまでの研究でCFC症候群の原因は明らかとなったが、その病態発生メカニズム、治療法開発における研究は行われていない。

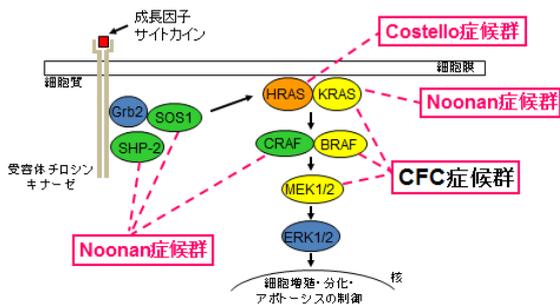


図1: RAS/MAPK経路と先天性奇形症候群の原因遺伝子

2. 研究の目的

本研究では、CFC 症候群患者で最も高頻度に認められるBrafQ241R変異(ヒトBRAFQ257R変異に相当する)をもつノックインマウスの作製およびその細胞の機能解析を行い、CFC 症候群病態発生メカニズムおよびその治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞における BrafQ241R 変異の機能解析

NIH3T3細胞にBrafQ241R変異を過剰発現し、

その下流のシグナルの変動をレポーターアッセイにより解析する。

(2)CFC 症候群モデルマウスの作製とその病態解明

CFC 症候群モデルマウスとして BrafQ241R 変異をもつノックインマウスを作製する。その後、ノックインマウスの表現型(疾患)を解析する。

(3) 薬剤・化合物のスクリーニング

ノックインマウスの表現型を参考に、その疾患の改善に有用と考えられる薬剤・化合物のスクリーニングを行う。

4. 研究成果

(1) 細胞における BrafQ241R 変異の機能解析

NIH3T3細胞にマウス BrafQ241R 変異またはポジティブコントロールとしてマウス V637E 変異(ヒト BRAF V600E 変異に相当)を発現させ、ERK 下流の転写因子 E1k1 の転写活性を測定した。その結果、Braf 変異を導入していない WT と比べて BrafV637E 変異、BrafQ241R 変異でそれぞれ 8.4 倍、2.7 倍の E1k1 転写活性の上昇が認められた。

(2)CFC 症候群モデルマウス作製とその病態解明

BrafQ241R 変異をもつノックインマウスは CAG プロモーター下で CRE を発現するトランスジェニックマウスとかけあわせることで変異が恒常的に発現するようにした。まずノックインマウスの全身で BrafQ241R 変異が発現しているか確かめるため、脳、心臓、肝臓から RNA を抽出し cDNA 合成を行い、変異部位のシーケンスを行った。その結果、各組織において BrafQ241R 変異(ヘテロ)が認められた。

ガンで認められる Braf 変異の多くは下流の MEK、ERK を活性化することがわかっている。そこで、BrafQ241R 変異によって MEK、ERK が活性化されているかどうかウェスタンプロットを行ったところ、胎生(E) 12.5 日目、E14.5 のノックインマウス胎仔の細胞抽出液においてリン酸化 MEK、ERK の活性化は認められなかった。しかしながら E16.5 ノックインマウス胎仔の脳ではコントロールと

比べて、リン酸化 MEK のタンパクレベルの上昇が認められた。また RAS/MAPK 経路とは異なる PI3K/AKT、p38、SAPK/JNK 経路を調べたところ E12.5、E14.5 のノックインマウス胎仔の細胞抽出液とともにリン酸化 p38、リン酸化 AKT(Thr308)の低下が認められた。

続いてノックインマウスの表現型の解析を行った。生後21日目の離乳時に genotyping を行いノックインマウスの有無を確認したところ、ノックインマウスの生存が確認できなかった。そこで胎生期または出産直後の死亡を疑い解析を進めたところ E16.5 からノックインマウス胎仔の数が減っており、出生後、数時間以内での死亡が確認された。死亡原因を詳細に調べた結果、皮下出血を含む浮腫、下顎形成不全、肝壊死などを示し死亡していることがわかった。

CFC 症候群患者において肺動脈弁狭窄、心室中隔欠損症、心房中隔欠損症などの先天性心疾患が多く認められることから胎仔 (E16.5) の心臓の解析を行った。その結果、コントロールマウスと比べてノックインマウスでは肺動脈弁、大動脈弁、三尖弁、僧帽弁、すべての弁肥厚が認められた。また肉柱の異常増殖・心外膜異常・心室中隔欠損症・心内膜クッション異常・緻密化障害・冠動脈低形成など種々の心疾患が認められた。特に弁肥厚は顕著であったことから弁の最大径 (厚み) を計測したところ、コントロールと比べて肺動脈弁、三尖弁の有意な肥厚が認められた。

ノックインマウス胎仔の心疾患が細胞増殖の亢進あるいは細胞死の変化によるものか調べるため、細胞増殖をリン酸化ヒストン H3 (pHH3)、細胞死を TUNEL アッセイにより評価したところ、E13.5 のステージではノックインマウス胎仔心筋、心室中隔において pHH3 陽性細胞の亢進が認められた。E16.5 のステージでは、肺動脈弁あるいは心室中隔欠損をもつノックインマウス胎仔の心室中隔において pHH3 陽性細胞の亢進が認められた。細胞死は E13.5、E16.5 のステージともに、コントロールマウスと比べて変化が認められなかった。

(3) 薬剤・化合物のスクリーニング

これまでに先天性奇形症候群の一つである Noonan 症候群モデルマウスにおいて MEK

阻害剤である PD0325901 の有用性が明らかにされていた⁶⁾。そこで PD0325901 の投与によってノックインマウス胎仔の胎生致死が改善するかどうか検討した。薬剤は、E10.5 から出産 (およそ E18.5 または E19.5) までの間、毎日、妊娠マウスに腹腔内投与した。その結果、PD0325901 を 0.5mg/kg body weight 投与することによって離乳時に2匹(30匹中)のノックインマウスを得ることができた。また、PD0325901 1.0mg/kg body weight 投与することによって浮腫、下顎形成不全の改善が認められ7匹(37匹中)のノックインマウスを獲得することができた。しかしながら、MAZ51 (VEGFR3 阻害剤)、ソラフェニブ (BRAF、VEGFR、PDGFR 阻害剤)、ロバスタチン (HMG-CoA 還元酵素阻害剤)、エベロリムス (mTOR 阻害剤) の投与では胎生致死の改善は認められなかった。一方、ヒストン H3K9 脱メチル化酵素阻害剤である NCDM-32b、ヒストン H3K27 脱メチル化酵素阻害剤の GSK-J4 を 5.0mg/kg body weight 投与したとき、ともに1匹ずつのノックインマウスを得ることができた。PD0325901 と GSK-J4 を併用投与したところ、それぞれの単剤投与を上回る5匹(31匹中)のノックインマウスを獲得することができた。

引用文献

- 1) Tartaglia, M. et al. Nat. Genet., 29: 465-468, 2001
- 2) Aoki, Y. et al. Nat. Genet., 37: 1038-1040, 2005
- 3) Aoki, Y. et al. Nat. Genet., 38: 294-296, 2006
- 4) Aoki, Y. et al. Hum. Mutat., 29: 992-1006, 2008
- 5) Tidyman, W.E. et al. Curr. Opin. Genet. Dev., 19: 230-236, 2009
- 6) Chen, P.C. et al. J. Clin. Invest., 120: 4353-4365, 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2件)

Inoue S, Moriya M, Watanabe Y, Miyagawa-Tomita S, Niihori T, Oba D,

Ono M, Kure S, Ogura T, Matsubara Y, Aoki Y. New BRAF knockin mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in cardio-facio-cutaneous syndrome. Hum. Mol. Genet., 23(24): 6553-66, 2014. doi:10.1093/hmg/ddu376. 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 93(1):173-80, 2013. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.05.021. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

青木洋子、井上晋一、守谷充司、渡邊裕介、宮川 - 富田幸子、新堀哲也、大場大樹、小野栄夫、呉繁夫、小椋利彦、松原洋一 Cardio-facio-cutaneous 症候群のモデルマウス作製とその病態解析 第118回日本小児科学会学術集会 2015年4月17-19日 大阪国際会議場(大阪)

井上晋一、守谷充司、渡邊裕介、宮川 - 富田幸子、新堀哲也、大場大樹、小野栄夫、呉繁夫、小椋利彦、松原洋一、青木洋子 RASopathies モデルマウスの作製と治療法開発 第4回 Multidisciplinary meeting on atherosclerosis 2015年1月10日 仙台トラストシティ(仙台)

井上晋一、守谷充司、渡邊裕介、宮川 - 富田幸子、新堀哲也、大場大樹、小野栄夫、呉繁夫、小椋利彦、松原洋一、青木洋子 BRAF ノックインマウス作製による RASopathies の病態解明と治療法研究(ポスター発表)第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25-27日 パシフィコ横浜(横浜)

井上晋一、守谷充司、渡邊裕介、宮川 - 富田幸子、新堀哲也、大場大樹、小野栄夫、呉

繁夫、小椋利彦、松原洋一、青木洋子 BRAF knock-in mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in RASopathies (口頭発表) 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25-27日 パシフィコ横浜(横浜)

井上晋一、守谷充司、渡邊裕介、宮川 - 富田幸子、新堀哲也、大場大樹、小野栄夫、呉繁夫、小椋利彦、松原洋一、青木洋子 新規 BRAF ノックインマウスの作製による cardio-facio-cutaneous 症候群の病態解明と治療法研究 第59回日本人類遺伝学会 2014年11月19-22日 タワーホール船堀(東京)

井上晋一、守谷充司、渡邊裕介、宮川 - 富田幸子、新堀哲也、大場大樹、小野栄夫、呉繁夫、小椋利彦、松原洋一、青木洋子 BrafQ241R ノックインマウスによる cardio-facio-cutaneous 症候群の病態解明と治療法研究第13回日本心臓血管発生研究会 2014年10月16-17日 磐梯熱海温泉ホテル華の湯(福島)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: CFC 症候群モデルマウスの作製とその治療法の確立

発明者: 井上晋一、青木洋子、松原洋一

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2014-063166

出願年月日: 2014年3月26日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.tohoku.ac.jp/org/medical/30/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 晋一 (INOUE SHINICHI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 70622091