

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04223

研究課題名(和文) シグナル伝達異常症のハイスループット機能解析系構築とモデル生物における病態解明

研究課題名(英文) Functional analysis and modeling in RASopathies

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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヌーナン症候群とその類縁疾患はRAS/MAPKシグナル伝達経路の構成する分子の遺伝子異常を持ちRASopathies (RAS/MAPK症候群)と呼ばれている。本研究では網羅的スクリーニング系を用いて遺伝子診断を行い、LZTR1遺伝子陽性患者の臨床症状の詳細を収集し、新規原因遺伝子を同定した。LZTR1がPPP1CB, SHOC2と複合体を結合し、RAF1のリン酸化を制御すること、LZTR1がRASの分解に関わることを明らかにした。疾患モデルマウス3種の増殖病変について解析を行い、CFC症候群モデルマウスで食道の粘膜の著明な角化と胃粘膜・筋層の肥厚、食道上皮の核不整をきたすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Noonan症候群は臨床症状のみで診断を付けることが困難な疾患であるので、その原因遺伝子を明らかにし、遺伝子診断提供により診療に貢献すると考えられる。LZTR1はNoonan症候群で遺伝子変異が同定されたもののその機能は全く明らかではなかった。研究代表者らが、LZTR1がPPP1CB, SHOC2と複合体を作ることを同定したことにより、初めてLZTR1がRAS/MAPKシグナル伝達経路に関与することを示した報告である。さらにこれまでは全く明らかではなかったがん原遺伝子RASの分解制御機構にLZTR1が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：RASopathies are a group of phenotypically overlapping syndromes caused by germline mutations that encode components of the Ras/MAPK signaling pathway. In this project, we provided genetic analysis to patients with RASopathies and identified a novel gene, RAS2, in Noonan syndrome patients (Niihori et al, Am J Hum Genet, 2019). Detailed clinical manifestations were evaluated in LZTR1 mutation-positive patients (Umeki I et al. Hum Mutat 2019). We demonstrated that LZTR1 associates with PPP1B-RAF1-SHOC2 complex. Although function in LZTR1 has not been clarified, we identified that LZTR1 facilitates polyubiquitination and degradation of RAS (Abe T et al. Cell Death Differ. 2020). We also showed that BrafQ241R/+ mice have neonatal feeding difficulties and esophageal dilation. The esophagus tissues from BrafQ241R/+ mice displayed incomplete replacement of smooth muscle with skeletal muscle and decreased contraction.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：がん原遺伝子 RAS

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヌーナン症候群とその類縁疾患は Mitogen-activated protein kinase (RAS/MAPK) シグナル伝達経路の構成する分子の遺伝子異常が同定され RASopathies (RAS/MAPK 症候群)と呼ばれている (Aoki Y, et al. Hum Mutat, 2008)。これまでに申請者らは国内外で RAS/MAPK 症候群を 900 例以上集積し、その遺伝子変異と変異蛋白の活性化メカニズムを明らかにした (Narumi et al, Am J Med Genet, 2007, Narumi et al, J Hum Genet, 2008, Kobayashi et al. Hum Mutat, 2010, Komatsuzaki et al, J Hum Genet, 2010 など)。さらに全エクソーム解析のプラットフォームを構築し新規原因遺伝子 RIT1 を同定しその臨床的特徴を分析し、RIT1 変異を発現したゼブラフィッシュが骨格異常・心臓の奇形・頭顔面の変形をきたすことを報告した (Aoki Y et al. Am J Hum Genet, 2013, Yaoita et al. Hum Genet, 2016)。その病態を明らかにするために、CFC 症候群、Costello 症候群、Noonan 症候群モデルマウスを作製し、個々のマウスについてその表現型解析を進めてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、①機能が不明のバリエーションを解析するための培養細胞系やゼブラフィッシュ解析パイプラインを構築し、パネル解析やエクソーム解析で同定した新規原因遺伝子変異の機能的役割を明らかにする。②CFC 症候群、Costello 症候群、Noonan 症候群モデルマウスにおける増殖病変やがんの発生メカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 新規原因遺伝子スクリーニングとハイスループットバリエーション機能解析系の確立

これまでに確立している網羅的スクリーニング系を用いて、遺伝子診断にて遺伝子変異陰性の 200 人から新規原因遺伝子と LZTR1 遺伝子変異を持つ患者をさらに同定する。培養細胞における機能解析とゼブラフィッシュを用いた機能解析系を構築し、同定されたバリエーションの機能を明らかにする。

(2) RAS/MAPK 症候群モデルマウス 3 系統における横断的発がん解析

これまでは個々のマウスの病態解析を行ってきたが、3 種類のマウスの作製に成功した。本研究では、消化管・膀胱・血液系における増殖病変の解析を進め、発がんメカニズムについて、マウス毎の違いを横断的に検討することにより、遺伝子毎の発生における働きの違いについて検証する。

4. 研究成果

(1) 網羅的遺伝子解析と LZTR1 バリエーションの同定

2001 年にヌーナン症候群の原因遺伝子が同定されて以来、続々とその類縁疾患を含めた原因遺伝子が明らかになり、現在ではまだ十分に明らかでない遺伝子も含め、原因遺伝子の数は 20 個以上にわたる。当研究室ではこれらの鑑別疾患の遺伝子 45 個を含む網羅的解析系を構築し遺伝子診断を提供したほか、特に最近同定された新規原因遺伝子である LZTR1, PPP1CB, SOS2 を中心に解析を行った。これまでに原因が明らかでなかった 166 人の解析を行ったところ 7 人の患者に LZTR1 のバリエーション、一人に PPP1CB のバリエーションが同定された。LZTR1 バリエーションが同定された患者のうち、一人は症状のない両親から一つずつバリエーションを受け継いでいるため、常染色体劣性遺伝形式と考えられた。1 人は新生突然変異としてバリエーションを持っていた。既知のバリエーションが同定された 1 人の患者では家族性と考えられたが、残りの 4 人で同定されたバリエーションは意義不明のバリエーション (VUS) と考えられた。PPP1CB が同定された患者は、報告と同様の症状を持っており、ヌーナン様症候群と診断された。

(2) LZTR1 の機能解析とゼブラフィッシュ解析系の確立

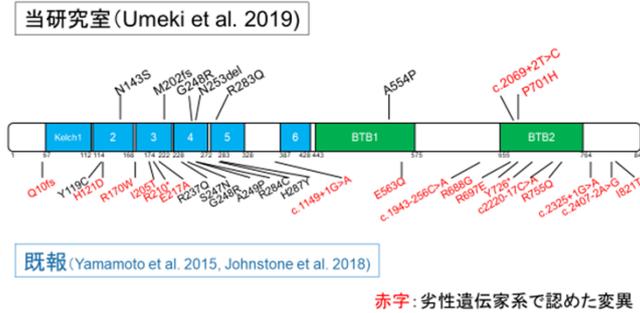
LZTR1 は 21q11.2 領域に存在し、BTB-KELCH 蛋白をコードしている。その変異は膠芽腫やシュワノマトーシスの原因として報告されており腫瘍抑制遺伝子と考えられるが、その機能は

いまだ不明である。私達は LZTR1 の結合蛋白を明らかにするために、293 細胞の抽出液を用いて抗 LZTR1 抗体を用いて免疫沈降し、結合蛋白を質量分析にて解析を行った。IgG で免疫沈降を行ったものに比べ複数の蛋白が検出されたが、その中に RASopathies の原因遺伝子でもある PPP1CB が含まれていた。

LZTR1 と RAS/MAPK シグナルに 関与する分子との結合を見るために、LZTR1 と PTPN11, RAF1, SHOC2, PPP1CB との免疫沈降を行ったところ、LZTR1 が細胞内で PTPN11 以外の RAF1, SHOC2, PPP1CB と結合することが明らかになった。LZTR1 と RAS/MAPK

シグナル伝達経路との関連を調べるために siRNA で LZTR1 を低下させたところ、抑制性のリン酸化部位である RAF1 の S259 リン酸化が低下し、RAF1 の活性化が考えられた。LZTR1 の機能についてさらに研究したところ、LZTR1 が RAS のポリユビキチン化に関連し RAS を分解する分子であることを明らかにした。一連の機能解析から研究代表者らは機能的側面において LZTR1 が RAS/MAPK シグナル伝達経路にかかわる分子であることを初めて示した。さらにヒトの特に発生異常を解析するモデルとしてのゼブラフィッシュ解析基盤を立ち上げ、受精卵への RNA 注入、あるいはゲノム編集を用いた変異導入を行った。

新規原因遺伝子 LZTR1 の変異スペクトラム

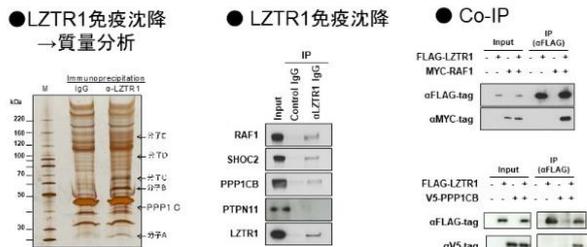


当研究室 (Umeki et al. 2019)

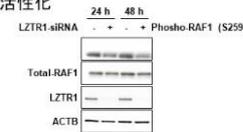
既報 (Yamamoto et al. 2015, Johnstone et al. 2018)

赤字: 劣性遺伝家系で認めた変異

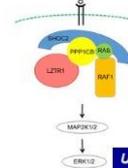
LZTR1 は PPP1CB, SHOC2 と複合体を形成



● siLZTR1
→RAFS259リン酸化低下
→RAFの活性化



初めてRAS/MAPKとの関与を示した



Umeki et al. Hum Genet, 2019

(3) モデルマウスにおける増殖性病変の観察と発がんモデルの構築

BRAF Q257R 変異を有する成獣型 CFC 症候群モデルマウスは著明な食道拡張を示し、4 週から 2 か月頃の成長障害を呈して死亡する個体がある。これらのマウスの消化管の構造を検索したところ、食道の粘膜の著明な角化と胃 (前胃、腺胃) の粘膜・筋層の肥厚、食道上皮の核不整がみられた。

コストロ症候群は患者の 15% に悪性腫瘍 (神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、膀胱移行上皮癌) を合併する。私達はコストロ症候群で最も頻度の高い G12S 変異を持つマウスを作成した。コストロ症候群モデルマウスは骨格異常・心肥大などを呈するものの、成獣まで大部分が生存する。高脂肪食投与によって肝臓における代謝異常がみられることが明らかになった。HRAS 変異マウスは高脂肪投与によって有意に生存率が低下するが、死亡の原因が心・血管系などの異常によるものか明らかではない。成獣の解剖においても明らかな腫瘍病変は観察されないが、膀胱の組織を綿密に観察したところ、正

2017
Inoue et al, Hum Mol Genet.

CFC 症候群/ICR (成獣モデル)

- ・食道疾患
食道拡張
筋分化異常
運動性の低下
- ・前胃の疾患
上皮過増殖による過角化
筋層肥厚

治療 **MEK 阻害剤**
ヒストン脱メチル化酵素阻害剤
成長障害、消化器疾患の改善

常マウスに比べ、膀胱粘膜の増殖・粘膜下層に細胞の集簇・増殖病変が観察された。

さらに RIT1 A57G 変異を導入した Noonan 症候群モデルマウスを作成した。RIT1 変異マウスは HRAS 変異マウス同様心肥大を示し、Isoproterenol 誘発により心肥大と著明な線維化を示した。RIT1 モデルマウスは生後直後に約半数のマウスが死亡するがその原因は明らかでない。

私たちはがん抑制遺伝子欠損マウスを導入し、変異マウスと掛け合わせた。がん抑制遺伝子欠損（ホモ欠失）の場合、生まれても早期に死亡、あるいは産仔は得られず胎生致死であると考えられた。続いてがん抑制遺伝子のヘテロ欠損：変異マウスを作成し、その表現型を解析した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Umeki I, Niihori T, Abe T, Kanno SI, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Nagasaki K, Yoshida M, Ohashi H, Inoue SI, Matsubara Y, Fujiwara I, Kure S, Aoki Y.	4. 巻 138
2. 論文標題 Delineation of LZTR1 mutation-positive patients with Noonan syndrome and identification of LZTR1 binding to RAF1-PPP1CB complexes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hum Genet.	6. 最初と最後の頁 21 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00439-018-1951-7.	査読の有無 無
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 Tamura A, Uemura S, Matsubara K, Kozuki E, Tanaka T, Nino N, Yokoi T, Saito A, Ishida T, Hasegawa D, Umeki I, Niihori T, Nakazawa Y, Koike K, Aoki Y, Kosaka Y.	4. 巻 6
2. 論文標題 Co-occurrence of hypertrophic cardiomyopathy and juvenile myelomonocytic leukemia in a neonate with Noonan syndrome, leading to premature death.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Case Rep.	6. 最初と最後の頁 1202 ~ 1207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ccr3.1568.	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 Ueda Kimiko, Yaoita Masako, Niihori Tetsuya, Aoki Yoko, Okamoto Nobuhiko	4. 巻 173
2. 論文標題 Craniosynostosis in patients with RASopathies: Accumulating clinical evidence for expanding the phenotype	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Am J Med Genet A	6. 最初と最後の頁 2346 ~ 2352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.a.38337	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 Inoue Shin-Ichi, Takahara Shingo, Yoshikawa Takeo, Niihori Tetsuya, Yanai Kazuhiko, Matsubara Yoichi, Aoki Yoko	4. 巻 26
2. 論文標題 Activated Braf induces esophageal dilation and gastric epithelial hyperplasia in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hum Mol Genet.	6. 最初と最後の頁 4715 ~ 4727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddx354	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 Oba Daiju, Inoue Shin-ichi, Miyagawa-Tomita Sachiko, Nakashima Yasumi, Niihori Tetsuya, Yamaguchi Seiji, Matsubara Yoichi, Aoki Yoko	4. 巻 27
2. 論文標題 Mice with an Oncogenic HRAS Mutation are Resistant to High-Fat Diet-Induced Obesity and Exhibit Impaired Hepatic Energy Homeostasis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 138 ~ 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2017.11.029	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 -

1. 著者名 Suzuki-Muromoto Sato, Miyabayashi Takuya, Nagai Koki, Yamamura-Suzuki Saeko, Anzai Mai, Takezawa Yusuke, Sato Ryo, Okubo Yukimune, Endo Wakaba, Inui Takehiko, Togashi Noriko, Kikuchi Atsuo, Niihori Tetsuya, Aoki Yoko, Kure Shigeo, Haginoya Kazuhiro	4. 巻 64
2. 論文標題 Leucine-485 deletion variant of BRAF may exhibit the severe end of the clinical spectrum of CFC syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 499 ~ 504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-019-0579-3	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 Niihori Tetsuya, Nagai Koki, Fujita Atsushi, Ohashi Hirofumi, Okamoto Nobuhiko, Okada Satoshi, Harada Atsuko, Kihara Hirotaka, Arbogast Thomas, Funayama Ryo, Shirota Matsuyuki, Nakayama Keiko, Abe Taiki, Inoue Shin-ichi, Tsai I-Chun, Matsumoto Naomichi, Davis Erica E., Katsanis Nicholas, Aoki Yoko	4. 巻 104
2. 論文標題 Germline-Activating RRAS2 Mutations Cause Noonan Syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1233 ~ 1240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2019.04.014	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 Abe Taiki, Umeki Ikumi, Kanno Shin-ichiro, Inoue Shin-ichi, Niihori Tetsuya, Aoki Yoko	4. 巻 27
2. 論文標題 LZTR1 facilitates polyubiquitination and degradation of RAS-GTPases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Death & Differentiation	6. 最初と最後の頁 1023 ~ 1035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41418-019-0395-5	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Shin-Ichi Inoue and Yoko Aoki
2. 発表標題 The basis of nutritional and metabolic problems in RASopathies:Lessons form mouse models
3. 学会等名 7th International Meeting on Rare Disorders of the RAS-MAPK Pathway (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shin-ichi Inoue, Shingo Takahara, Takeo Yoshikawa, Kazuhiko Yanai, Yoichi Matsubara and Yoko Aoki
2. 発表標題 Pathogenesis and treatment of esophageal dilation and gastric epithelial hyperplasia in a mouse model for cardio-facio-cutaneous syndrome
3. 学会等名 ESHG/EMPAG 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青木洋子
2. 発表標題 RASopathies ~ 新しい疾患概念とその病態解明 ~
3. 学会等名 第42回日本小児皮膚科学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青木洋子
2. 発表標題 単一遺伝子疾患におけるゲノム医療の発展：新しい疾患概念形成と治療法開発へ
3. 学会等名 第60回日本腎臓学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 青木洋子
2. 発表標題 遺伝性疾患の病態解明から 新しい生命現象を明らかにする
3. 学会等名 第59回日本小児神経学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井上晋一、高原真吾、吉川雄朗、新堀哲也、谷内一彦、松原洋一、青木洋子
2. 発表標題 がん原遺伝子Braf活性化はマウス食道の拡張、前胃上皮の過増殖をもたらす
3. 学会等名 第40回分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 青木洋子、梅木郁美、阿部太紀、岡本伸彦、水野誠司、黒澤健司、長崎啓祐、吉田真、大橋博文、井上晋一、松原洋一、藤原幾磨、呉繁夫、新堀哲也
2. 発表標題 Noonan症候群類縁疾患の網羅的解析とLZTR1の機能解明
3. 学会等名 臨床遺伝2019 in Sapporo 第26回日本遺伝子診療学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Niihori T, Nagai K, Fujita A, Ohashi H, Okamoto N, Okada S, Harada A, Kihara H, Arbogast T, Funayama R, Shirota M, Nakayama K, Abe T, Inoue SI, Tsai IC, Matsumoto N, Davis EE, Katsanis N, Aoki Y
2. 発表標題 Germline-Activation of RRAS2 mutations cause Noonan syndrome
3. 学会等名 6th International RASopathies Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nagai K, Umeki I, Katata Y, Inoue-Shibui , Abe T, Inoue S, Niihori T, Aoki Y.
2. 発表標題 LZTR1 variants identified by genetic test for RASopathies using a targeted NGS panel.
3. 学会等名 6th International RASopathies Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoko Aoki, Shin-Ichi Inoue, Taiki Abe, Yu Katata, Aya Shibui-Inoue, Koki Nagai and Tetsuya Niihori
2. 発表標題 RASopathies : genetic syndromes associated with the Ras/MAPK pathway
3. 学会等名 Tohoku Forum for Creativity Thematic program 2019 International symposium1 Cancer Etiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木洋子
2. 発表標題 NGSを用いた希少遺伝性疾患の研究やその医療への応用
3. 学会等名 第37回日本染色体遺伝子学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019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
<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	松原 洋一 (Matsubara Yoichi) (00209602)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・所長室・研究所長 (82612)	
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)	
研究分担者	井上 晋一 (Inoue Shin-ichi) (70622091)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	
研究協力者	阿部 太紀 (Abe Taiki)	東北大学・医学系研究科・助教	
研究協力者	梅木 郁美 (Umeki ikumi)	東北大学・医学系研究科・大学院生	
研究協力者	大場 大樹 (Oba Daiju)	東北大学・医学系研究科・大学院生	
研究協力者	高原 真吾 (Takahara Shingo)	東北大学・医学系研究科・大学院生	
研究協力者	堅田 有宇 (Katata Yu)	東北大学・医学系研究科・大学院生	

6. 研究組織（つづき）

	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	永井 康貴 (Nagai Koki)	東北大学・医学系研究科・大学院生	