

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390268

研究課題名(和文)細胞内シグナル伝達異常による先天奇形症候群の分子遺伝学的探索

研究課題名(英文)Molecular analysis of congenital anomaly syndromes caused by intracellular signal transduction defects

研究代表者

松原 洋一 (Matsubara, Yoichi)

独立行政法人国立成育医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：00209602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサーを用いて、これまでに病因遺伝子が不明であったヌーナン症候群180人のうち17人(9%)にRIT1遺伝子変異を同定した。RIT1遺伝子変異陽性患者は肥大型心筋症の合併率が高かった。RIT1変異を導入したNIH3T3細胞では正常cDNAを導入した細胞に比べELK転写活性が亢進していた。遺伝子変異を導入したゼブラフィッシュでは、心臓の異常や頭部の変形が確認された。本研究によって、RIT1がヌーナン症候群の原因遺伝子のひとつであることが世界で初めて明らかにされるとともに、同疾患の病態の解明や治療への可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We identified a total of nine missense, nonsynonymous mutations in RIT1, encoding a member of the RAS subfamily, in 17 of 180 individuals with Noonan syndrome. Seventy percent of mutation-positive individuals presented with hypertrophic cardiomyopathy; this frequency is high relative to the overall 20% incidence in individuals with Noonan syndrome. These RIT1 alterations enhanced ELK1 transactivation. The introduction of mRNAs of mutant RIT1 into 1-cell-stage zebrafish embryos was found to result in a significant increase of embryos with craniofacial abnormalities, incomplete looping, a hypoplastic chamber in the heart, and an elongated yolk sac. These results demonstrate that gain-of-function mutations in RIT1 cause Noonan syndrome and show a similar biological effect to mutations in other RASopathy-related genes.

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：遺伝性疾患 細胞内シグナル伝達 遺伝子変異

## 1. 研究開始当初の背景

小児医療において各種の遺伝性疾患を正しく診断することは、予後の推定、合併症の予防と早期発見、遺伝カウンセリングなどにとって重要である。それぞれの原因遺伝子を同定し、遺伝子診断法を確立することが必要と考えられる。さらに、臨床診断と異なる遺伝子診断が得られる場合も多く、遺伝子型と臨床症状を詳細に照らし合わせることも重要である。

小児の遺伝病には、種々の染色体の構造異常や単一遺伝子異常が知られているが、未だ原因不明のものも多い。遺伝病の原因探索には、家系を用いたリンケージ解析・homozygosity mapping、類似疾患の原因遺伝子から類推した候補遺伝子解析などが用いられてきたが、最近の新しい同定法として次世代シーケンサーを用いた解析が台頭してきた。特に全エクソンをあらかじめオリゴヌクレオチドでキャプチャーしてエクソンのみをシーケンスする方法(エクソーム法)は遺伝病の原因同定に強力なツールとなりつつあり、2010年にはエクソーム法を用いた原因遺伝子同定の成功例が米国より相次いで報告されている。

私たちはこれまでに、先天奇形症候群として知られるヌーナン症候群類縁疾患の原因遺伝子を世界に先駆けて明らかにしてきた。まず、コストロ(Costello)症候群が、これまで癌遺伝子としてよく知られていたHRAS遺伝子の変異によってひきおこされるシグナル伝達異常症であることを報告した(Nature Genetics 37:1038-1040,2005)。また、Cardio-facio-cutaneous (CFC)症候群の原因が同じシグナル伝達上の分子であるKRASとBRAFであることを明らかにした(Nature Genetics 38:294-296,2006)。その後、国内外の研究グループによってRAS/MAPKシグナル伝達経路に存在するMEK1/2、SOS1、RAF1、SHOC2、NRAS、CBLが、次々と病因遺伝子として同定されてきている。私達はこれらの疾患を包括してRAS/MAPK症候群と呼ぶことをそのreview論文の中で提唱した(Hum Mutat, 2008)。私達の研究室では、これらの疾患の遺伝子解析研究とその変異タンパクの生化学的解析を行い、論文として報告してきた。私達はこれまでにヌーナン症候群類縁疾患420例の遺伝子解析を実施したが、そのうち40%ではいまだに遺伝子変異が同定されていない。また同じ遺伝子変異を持つ患者においてもその表現型(症状・発がん率・発がん部位)が異なるメカニズムは明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、1)次世代シーケンサーを用いた遺伝性疾患原因遺伝子同定のパイプラインを確立する、2)いまだに原因が明らかでない症例における新しい原因遺伝子を明らかにする、3)同定された遺伝子変

異の生化学的解析を行い、変異蛋白の機能を調べる、4)疾患モデルマウスの作製・解析を行うことである。対象とする疾患は、まずヌーナン症候群類縁疾患を中心に実施し、その後、他の遺伝性疾患にも拡大して新規病因遺伝子の同定を試みる。

## 3. 研究の方法

### 1) 症例の収集

研究開始時点において国内外の臨床遺伝専門医を通じて収集した検体数は、ヌーナン症候群類縁疾患として420例で、世界的にも最大規模の収集数と考えられる。これら類縁疾患をさらに日本と海外から収集する。また当科遺伝科外来を通して収集した先天奇形症候群や、いまだに原因不明の先天代謝異常症において原因不明の患者・家系に類似する患者・家系もその国際的ネットワークを用いて収集する。

### 2) 診断的遺伝子解析

初期診断に基づいて原因遺伝子をPCRにて増幅し、シーケンスにて塩基配列を決定する。初期診断による遺伝子診断が陰性だった患者に対しても初期診断とは異なる疾患の原因遺伝子解析を行う。

### 3) 次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析システムの確立

東北大学大学院医学系研究科では平成22年度に次世代シーケンサーが共通機器室に導入され稼働を開始している。当研究室でもすでにエクソームシーケンス(全遺伝子のエクソンをキャプチャーし解析する)を行い、コントロールサンプルでのエクソンカバー率・エクソン部位での読みの深さ(depth)同定されたSNPと同一サンプルにおいて公開されているSNPとの同定率などを解析した。共通機器室に配属されたバイオインフォマティクス担当者とも連携して解析を行っている。

病因遺伝子同定に対するストラテジーを確立しそのバイオインフォマティクス解析の解析パイプラインを確立する。次世代シーケンサーは東北大学医学系研究科の共通利用設備であるため、本研究では受託解析も併用して解析を実施する。シーケンス結果については、まず、アミノ酸置換を伴う塩基置換、エクソン/イントロン境界のスプライス部位に存在する塩基置換、翻訳領域に存在する欠失・挿入を抽出する。このなかから、dbSNPなどのデータベースに存在する遺伝子多型をフィルターして取り除く。必要に応じて、研究室保有の正常対照検体を用いて遺伝子多型かどうかの検証を行う。

### 4) 次世代シーケンサーを用いた患者検体のエクソーム解析

次世代シーケンサーにおける解析を継続する。次世代シーケンサーからは膨大なデータが得られるが、変異をもつ遺伝子の中から、癌遺伝子・癌抑制遺伝子・シグナル伝達に関わる分子などの絞込みをおこなう。候

補遺伝子変異については、他の患者においても解析を行う。あるいは両親・家族の検体を解析し、原因であるか否かを検討する。

#### 5) モデルマウス作製

これまでに同定されたヌーナン類縁症候群類縁疾患における遺伝子変異のほとんどは、機能獲得型の優性変異である。そこで、変異蛋白を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作成し、疾患モデルマウスの作成を行う。トランスジェニックマウスに関しては、これまでも申請者らの研究室において、独自に高グリシン血症マウスやコネキシン26難聴モデルマウスを作成してきており、実績を有している。

#### 6) 新規病因遺伝子および遺伝子変異の機能的解析

新規病因遺伝子として同定されたものについて、遺伝子変異を発現ベクターに組み込み、培養細胞に導入し、変異タンパクを発現する細胞にて機能解析する。また、変異蛋白を導入したトランスジェニックマウスにおける臨床徴候の評価及び組織学的な解析をおこなう。

#### 7) デスクトップシーケンサーを用いた遺伝子診断法の開発

### 4. 研究成果

#### 1) RAS/MAPK 症候群における新規遺伝子変異同定

700例以上のRAS/MAPKシグナル伝達異常症疑い例について遺伝子解析研究を行った。RAS/MAPK症候群の原因遺伝子は10個以上(PTPTN11, HRAS, KRAS, NRAS, BRAF, RAF1, MEK1/2, SHOC2, CBL)にのぼるが、まだその約30%は原因が不明である。申請者らは本研究で構築した次世代シーケンサーを用いた解析パイプラインを用いてヌーナン症候群14人のDNA検体にてエクソーム解析を行い、4人にRIT1遺伝子変異を同定した。次にSanger法にてこれまでに原因が不明だったRAS/MAPK症候群166人を解析したところ、全体として180人のうち17人(9%)に9種類のRIT1遺伝子変異が同定された。RIT1遺伝子変異陽性患者は肥大型心筋症の合併率が高かった。RIT1変異を導入したNIH3T3細胞では正常cDNAを導入した細胞に比べELK転写活性が亢進していた。遺伝子変異を導入したゼブラフィッシュでは、心臓の異常や頭部の変形が確認された。これまで機能が不明であったRASサブファミリーのRIT1が発生期に古典的癌原遺伝子RAS(HRAS, KRAS, NRAS)と同じ働きを持つ可能性があることを初めて示すとともに、同疾患の病態の解明や治療への可能性を示した(Aoki et al. *Am J Hum Genet*, 2013)。

さらに国際共同研究にて既知の遺伝子変異陰性のRAS/MAPK症候群のスクリーニングを行い、RRAS遺伝子変異を同定し報告した(Flex E et al. *Hum Mol Genet*, 2014)。

#### 2) モデルマウス作製

RAS/MAPK症候群で同定された種々の遺伝子変異を導入したマウスを作成し、その臨床徴候や組織学的解析を行った。患者で認められるような心奇形などが観察されており、現在論文執筆中である。これらのモデルマウスで効果のある薬剤を選定するために薬剤投与を実施中である。

#### 3) デスクトップシーケンサーを用いた遺伝子診断

RAS/MAPK症候群の原因遺伝子と、臨床症状が類似している他の先天異常症の原因遺伝子の全23遺伝子のエクソン部分を解析する系の検討を行った。この方法の利点は、解析に用いるDNA量が少ないこと、全エクソーム解析よりコストが安い点があげられる。これまでに陽性コントロール11名とRIT1以外の遺伝子スクリーニングで陰性だった患者44名の解析を行った。陽性コントロール10名ではSangerシーケンスで既に同定していた変異を確認した。患者44名ではRIT1の変異を5人に同定した。

### 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15件)

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) Sonobe S, Fujimura M, Niizuma K, Nishijima Y, Ito A, Shimizu H, Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Kure S, Tominaga T. Temporal profile of the vascular anatomy evaluated by 9.4-T magnetic resonance angiography and histopathological analysis in mice lacking RNF213: a susceptibility gene for moyamoya disease. *Brain Res*. 2014 Mar 13;1552:64-71. doi: 10.1016/j.brainres.2014.01.011. Epub 2014 Jan 17. PubMed PMID: 24440776. (査読有)

- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) Nakayama T, Saitsu H, Endo W, Kikuchi A, Uematsu M, Haginoya K, Hino-Fukuyo N, Kobayashi T, Iwasaki M, Tominaga T, Kure S, Matsumoto N. RBPJ is disrupted in a case of proximal 4p deletion syndrome with epilepsy. *Brain Dev.* 2014 Jun;36(6):532-6. doi: 10.1016/j.braindev.2013.07.009. Epub 2013 Aug 16. PubMed PMID: 23958593. (査読有)
- 8) Kitazawa H, Moriya K, Niizuma H, Kawano K, Saito-Nanjo Y, Uchiyama T, Rikiishi T, Sasahara Y, Sakamoto O, Setoguchi Y, Kure S. Interstitial lung disease in two brothers with novel compound heterozygous ABCA3 mutations. *Eur J Pediatr.* 2013 Jul;172(7):953-7. doi: 10.1007/s00431-013-1977-8. Epub 2013 Feb 27. PubMed PMID: 23443156. (査読有)
- 9) Saito Y, Aoki Y, Muramatsu H, Makishima H, Maciejewski JP, Imaizumi M, Rikiishi T, Sasahara Y, Kure S, Niihori T, Tsuchiya S, Kojima S, Matsubara Y. Casitas B-cell lymphoma mutation in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 2012 Aug;36(8):1009-15. doi: 10.1016/j.leukres.2012.04.018. (査読有)
- 10) Abe Y, Aoki Y, Kuriyama S, Kawame H, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Ogata T, Kure S, Niihori T, Matsubara Y; Costello and CFC syndrome study group in Japan. Prevalence and clinical features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome in Japan: findings from a nationwide epidemiological survey. *Am J Med Genet A.* 2012 May;158A(5):1083-94. doi: 10.1002/ajmg.a.35292. (査読有)
- 11) Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y, Fujiwara K, Tanemura M, Hata A, Suzuki Y, Relton CL, Grinham J, Leung KY, Partridge D, Robinson A, Stone V, Gustavsson P, Stanier P, Copp AJ, Greene ND, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans. *Hum Mol Genet.* 2012 Apr 1;21(7):1496-503. doi: 10.1093/hmg/ddr585. (査読有)
- 12) Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, Shimojima K, Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawachi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, Matsumoto N. Homozygous c.14576G>A variant of RNF213 predicts early-onset and severe form of moyamoya disease. *Neurology.* 2012 Mar 13;78(11):803-10. doi: 10.1212/WNL.0b013e318249f71f. Epub 2012 Feb 29. PubMed PMID: 22377813. (査読有)
- 13) Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Sakamoto O, Matsubara Y, Saheki T, Kobayashi K, Ohura T, Kure S. Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in SLC25A13. *Mol Genet Metab.* 2012 Apr;105(4):553-8. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.12.024. Epub 2012 Jan 8. PubMed PMID: 22277121. (査読有)
- 14) Niihori T, Aoki Y, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Kawame H, Inazawa J, Ohura T, Arai H, Nabatame S, Kikuchi K, Kuroki Y,

- Miura M, Tanaka T, Ohtake A, Omori I, Ihara K, Mabe H, Watanabe K, Niijima S, Okano E, Numabe H, Matsubara Y. HRAS mutants identified in Costello syndrome patients can induce cellular senescence: possible implications for the pathogenesis of Costello syndrome. *J Hum Genet*. 2011 Oct;56(10):707-15. doi: 10.1038/jhg.2011.85. (査読有)
- 15) Watanabe Y, Yano S, Niihori T, Aoki Y, Matsubara Y, Yoshino M, Matsuishi T. A familial case of LEOPARD syndrome associated with a high-functioning autism spectrum disorder. *Brain Dev*. 2011 Aug;33(7):576-9. doi: 10.1016/j.braindev.2010.10.006. (査読有)

〔学会発表〕(計 8 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スによる 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.

2012 年 10 月 25-27 日 日本人類遺伝学会 第 57 回大会(東京) 飯倉立夏、青木洋子、新堀 哲也、小松崎匠子、松原 洋一 東北大学病院遺伝科の現状

2011 年 11 月 9-12 日 日本人類遺伝学会 第 56 回大会(千葉) 新堀 哲也、青木洋子、岡本伸彦、黒澤健司、大橋博文、水野誠司、川目裕、松原 洋一 コステロ症候群の遺伝子解析および HRAS 変異体の機能解析

2011 年 8 月 12-14 日 第 114 回日本小児科学会学術集会(東京) 新堀 哲也、青木洋子、阿部裕、斎藤由佳、小松崎匠子、松原 洋一 コステロ症候群の遺伝子解析および HRAS 変異体の機能解析

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松原 洋一 (国立成育医療研究センター)

研究者番号: 00209602

### (2) 研究分担者

新堀 哲也 (東北大学)

研究者番号: 40436134

呉 繁夫 (東北大学)

研究者番号: 10205221