

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293241

研究課題名(和文) RAS/MAPK症候群の原因・病態の解明とその治療戦略

研究課題名(英文) Molecular analysis and pathogenesis of the RAS/MAPK syndromes

研究代表者

青木 洋子 (Aoki, Yoko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・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)：RAS/MAPK症候群は、ヌーナン症候群類縁疾患を含む先天性疾患であり、生殖細胞系列におけるRAS/MAPKシグナル伝達経路の遺伝子変異を原因とする。研究代表者らはこれまでにNoonan症候群類縁疾患の遺伝子診断を行ってきたが、本研究では原因遺伝子を網羅的に解析する系を確立した。また2013年に研究代表者らNoonan症候群の新規原因遺伝子として報告したRIT1遺伝子変異陽性患者をさらに同定した。RIT1変異陽性者を含むNoonan症候群の詳細な臨床症状を収集し、RIT1変異陽性者に特徴的な臨床像を確立した。また、RAS/MAPK症候群モデルマウスを作製し、その病態を解明した。

研究成果の概要(英文)：We have performed genetic testing in patients with RASopathies and successfully identified a new gene, RIT1, in patients with Noonan syndrome. In this study, we further analyzed clinical manifestations in RIT1 mutation-positive patients and performed functional analysis in cell culture system. We developed comprehensive analysis system using a next generation sequencer to analyze genes for RASopathies. We successfully generated model mice for CFC syndrome. The results would lead to the understanding of the pathogenesis of these disorders and the development of therapeutic means.

研究分野：先天異常症の分子遺伝学

キーワード：遺伝性疾患 シークエンス モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

申請者らは 2005 年、易発癌性を示す先天奇形症候群である Costello 症候群が、癌原遺伝子 HRAS の生殖細胞系列の変異が原因であることを世界で初めて同定した (Aoki Y, et al. **Nature Genetics**, 2005)。翌年、類縁疾患である cardio-facio-cutaneous (CFC) 症候群の原因が KRAS、B 型 RAF キナーゼ(BRAF)の遺伝子変異であることを報告した (Niihori T, Aoki Y, et al. **Nature Genetics**, 2006)。申請者らの発見がブレイクスルーとなり、Mitogen-activated protein kinase (RAS/MAPK) シグナル伝達経路の構成分子 (MEK1/2, SOS1, RAF1, SHOC2, NRAS, SHOC2, CBL) に次々と遺伝子異常が同定された。申請者らは類縁疾患に関する Review 論文を執筆し、これらの疾患を RAS/MAPK 症候群と呼ぶことを初めて提唱した (Aoki Y, et al. **Hum Mutat**, 2008) (図 1)。

2013 年には次世代シーケンサーを用いて Noonan 症候群の新規原因遺伝子 RIT1 を同定した。また RASopathies の病態を明らかにするためにモデル生物作製に着手していた。

2. 研究の目的

本研究の目的の一つはこれまでに収集した、あるいはこれから収集する RAS/MAPK 症候群患者検体を解析し、新規原因遺伝子 RIT1 変異を同定する。RIT1 遺伝子変異陽性患者の臨床症状を明らかにし、他のヌーナン症候群との違いを明らかにする。さらに RIT1 変異蛋白の下流の分子・シグナルと変異蛋白の機能を明らかにすることである。

もう一つの目的は RASopathies モデルマウスにおける表現型の解析と薬剤スクリーニングを行い、その病態解明と治療法確立を行うことである。

3. 研究の方法

(1) 新規原因遺伝子 RIT1 変異患者の同定と臨床像の確立

120 名以上の変異陰性患者が存在するので、それらの患者において RIT1 のスクリーニングを行い遺伝子変異を確定する。そのうえで変異陽性の患者の臨床症状を詳細に検討し RIT1 変異陽性患者の臨床像を確立する。他の遺伝子が原因で生じるヌーナン症候群においても臨床症状を収集し、RIT1 変異陽性患者と比較する。

(2) RIT1 変異蛋白が活性化する下流のシグナル同定

細胞培養系を用いて RIT1 変異蛋白が活性化するシグナルについてウェスタンブロットやレポーターアッセイを用いて検索する。

(3) 網羅的遺伝子診断体制の確立

デスクトップ型シーケンサーを用いて、

RAS/MAPK 原因遺伝子や、他の類似疾患の遺伝子を含めた網羅的遺伝子スクリーニングの系を確立する。

具体的には複数の遺伝子を含む網羅的解析系を構築する。初めにこれまで遺伝子変異が同定されたサンプルを陽性コントロールとし、その遺伝子変異が確認できるかどうかについて検討する。また解析のクオリティーを見ながら一回に解析するサンプル数を検討する。その後、診断検体を解析し、キャピラリーシーケンサーで解析するときとの違いをみながら、遺伝子診断に用いることが可能であればデスクトップ型シーケンサーでの解析を診断に用いていく。

(4) CFC 症候群モデルの確立と病態解明

CFC 症候群の中で最も頻度の高い BRAF Q257R 遺伝子変異を導入したモデルマウスについて、その病態を明らかにしその表現型を改善するような薬剤を同定する。

なお、本研究は3省庁の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿って倫理委員会の承認を経て行った。動物実験、組み換え DNA 実験に関しては東北大学の承認を受けている。

4. 研究成果

(1) 2013 年度に報告した RIT1 遺伝子について、さらに 17 人のヌーナン症候群で変異を同定し、その詳細な臨床症状を検討した。他の遺伝子変異を持つヌーナン症候群の文献的検討を行ない、RIT1 遺伝子変異患者特有の表現型を明らかにした。

(2) 細胞培養を用いた変異の機能解析では蛋白レベルで ERK や他の MAPK の変化を検出することはできなかったが、ELK や c-Jun 転写活性を弱いながらも亢進することが明らかになった。

(3) ヌーナン症候群の類縁疾患や RASopathies、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、その運用を始めた。陽性コントロールにて条件検討した後、これまでのサンガー法での解析にて遺伝子変異が同定されなかった 104 人を解析したところ、2013 年以降に同定されてきた新規原因遺伝子を含む新しいバリエーションを同定した。それらの変異陽性者の詳細な臨床症状の検討や両親の解析を行った。

(4) BrafQ241R 変異 (ヒト Q257R 変異に相当) をもつ C57BL/6J 系統のノックインマウスを作製したが、本マウスは心奇形、浮腫などを呈して胎生致死となることが明らかになった。妊娠マウスに対して様々な RAS/MAPK シグナル伝達経路の阻害剤を投与したところ、MEK 阻害である PD0325901 投与にて胎生致死を回避することが可能であった。また、

57BL/6J 系統のノックインマウスを ICR/CD-1 系統のマウスとかけあわせることによって、胎生致死を回避した。ICR 系統の Braf 変異マウスの 31% は生後 74 週を超えても生存した。生存した Braf 変異マウスの解析を行ったところ成長障害、薄く粗い毛並み、脊柱後弯、頭蓋骨の変形、長く変形した爪、心肥大、脾腫など CFC 症候群に類似する症状に加えて、多指、精巣肥大、卵巣嚢胞などの CFC 症候群で報告されていない症状も観察された。心臓超音波検査を行ったところ Braf 変異マウスは肺動脈狭窄、心房中隔欠損症を示し、組織学的解析によって肺動脈弁狭窄と同定された。

他の RASopathies モデルマウスについても解析を続けた。

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 7 件)

- Okamoto N, Nakao H, Niihori T, Aoki Y. Patient with a novel purine-rich element binding protein A mutation. **Congenit Anom** (Kyoto). 査読有 2017 Feb 6. doi: 10.1111/cga.12214. [Epub ahead of print]
- *Aoki Y, Niihori T, Inoue SI, Matsubara Y. Recent advances in RASopathies. **J Hum Genet**. 査読有 61(1):33-9, 2016 Review. doi: 10.1038/jhg.2015.114.
- Yaoita M, Niihori T, Mizuno S, Okamoto N, Hayashi S, Watanabe A, Yokozawa M, Suzumura H, Nakahara A, Nakano Y, Hokosaki T, Ohmori A, Sawada H, Migita O, Mima A, Lapunzina P, Santos-Simarro F, García-Miñaur S, Ogata T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Inoue S, Matsubara Y, Kure S, *Aoki Y. Spectrum of mutations and genotype-phenotype analysis in Noonan syndrome patients with RIT1 mutations. **Hum Genet**. 査読有 135(2):209-22, 2016 doi: 10.1007/s00439-015-1627-5.
- Moriya M, Inoue SI, Miyagawa-Tomita S, Nakashima Y, Oba D, Niihori T, Hashi M, Ohnishi H, Kure S, Matsubara Y, *Aoki Y. Adult mice expressing a Braf Q241R mutation on an ICR/CD-1 background exhibit a cardio-facio-cutaneous syndrome phenotype. **Hum Mol Genet**. 査読有 24(25):7349-60, 2015 doi: 10.1093/hmg/ddv435
- Nishi E, Mizuno S, Nanjo Y, Niihori T, Fukushima Y, Matsubara Y, Aoki Y, Kosho T. A novel heterozygous MAP2K1 mutation in a patient with Noonan syndrome with multiple lentiginos. **Am J Med Genet A**.

査読有 167:407-11, 2015 doi: 10.1002/ajmg.a.36842.

- Flex E, Jaiswal M, Pantaleoni F, Martinelli S, Strullu M, Fansa EK, Caye A, De Luca A, Lepri F, Dvorsky R, Pannone L, Paolacci S, Zhang SC, Fodale V, Bocchinfuso G, Rossi C, Burkitt-Wright EM, Farrotti A, Stellacci E, Cecchetti S, Ferese R, Bottero L, Castro S, Fenneteau O, Brethon B, Sanchez M, Roberts AE, Yntema HG, van der Burgt I, Cianci P, Bondeson ML, Digilio MC, Zampino G, Kerr B, Aoki Y, Loh ML, Palleschi A, Di Schiavi E, Carè A, Selicorni A, Dallapiccola B, Cirstea IC, Stella L, Zenker M, Gelb BD, Cavé H, Ahmadian MR, Tartaglia M. Activating mutations in RRAS underlie a phenotype within the RASopathy spectrum and contribute to leukaemogenesis. **Hum Mol Genet**. 査読有 23:4315-27, 2014 doi: 10.1093/hmg/ddu148.
- 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 knock-in mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in cardio-facio-cutaneous syndrome. **Hum Mol Genet**. 査読有 23:6553-66, 2014. doi: 10.1093/hmg/ddu376

[学会発表] (計 11 件)

- 1) 青木洋子 「RASopathies: genetic syndromes associated with the Ras/MAPK pathway」日本研究皮膚科学会 第 41 回年次学術大会・総会 2016 年 12 月 9 日 仙台国際センター (仙台)
- 2) 青木洋子, 梅木郁美, 大場大樹, 西山亜由美, 矢尾板全子, 井上晋一, 松原洋一, 新堀哲也 「Noonan 症候群と類縁疾患における遺伝子診断体制の確立とその病態解明」第 23 回日本遺伝子診療学会大会 2016 年 10 月 6 日、イイノホール&カンファレンスセンター (東京)
- 3) 青木洋子 RASopathies: 広がりゆく疾患概念 口頭 第 115 回日本皮膚科学会総会 2016 年 6 月 3 日、国立京都国際会館 (京都)
- 4) 矢尾板全子, 大場大樹, 梅木郁美, 水野誠司, 岡本伸彦, 井上晋一, 松原洋一, 呉繁夫, 新堀哲也, 青木洋子 「ヌーナン症候群類縁疾患における RIT1 遺伝子解析と臨床的特徴の検討」第 119 回日本小児科学会学術集会 2016 年 5 月 13-15 日、ロイトン札幌 (札幌)
- 5) Inoue S, Moriya M, Miyagawa-Tomita S, Nakashima Y, Oba D, Niihori T, Hashi M, Ohnishi H, Kure S, Matsubara Y, Aoki Y

Adult mice expressing a Braf Q241R mutation on an ICR/CD-1 background exhibit a cardio-facio-cutaneous syndrome phenotype」ICHG 2016 The 13th International Congress of Human Genetics 2016年4月3-7日、国立京都国際会館（京都）

- 6) 青木洋子 「遺伝病と血液疾患」(RASopathies and hematologic malignancy)」第77回日本血液学会学術集会、教育講演2015年10月16-18日 ホテル金沢(金沢)
- 7) Shin-ichi Inoue, Mitsuji Moriya, Tetsuya Niihori, Daiju Oba, Yoichi Matsubara and Yoko Aoki BRAF knock-in mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in RASopathies , Oral 4th international RASopathies symposium ,2015年7月17-19日 シアトル(アメリカ)
- 8) 青木洋子、井上晋一、守谷充司、大場大樹、新堀哲也、呉繁夫、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・リーガロイヤルホテル大阪(大阪)
- 9) 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) 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)
- 10) 青木洋子「次世代シーケンサーを用いた希少遺伝性疾患の遺伝子解析研究の現状」日本人類遺伝学会第59回大会「診療における次世代シーケンサーの活用と課題」シンポジウム2014年11月19-22日 タワーホール船橋(東京)
- 11) 青木洋子、新堀哲也、岡本伸彦、水野誠司、黒澤健司、緒方勤、井上晋一、松原洋一「ヌーナン症候群の新規原因遺伝子 RIT1 の同定」第117回日本小児科学会学術集会 2014年4月11-13日 名古屋国際会議場(名古屋)

6. 研究組織

(1)研究代表者

青木 洋子 (AOKI YOKO)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80332500

(2)研究分担者

松原 洋一 (MATSUBARA YOICHI)
独立行政法人国立成育医療研究センター・研究所・所長
研究者番号：00209602

新堀 哲也 (NIIHORI TETSUYA)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40436134

井上 晋一 (SHINICHI INOUE) (H27年度より連携研究者)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：7062291

(3)連携研究者
なし