

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19598

研究課題名(和文) BRAF遺伝子の心臓発生・骨格形成の働き

研究課題名(英文) The functional role of BRAF in cardiac development and bone formation

研究代表者

井上 晋一 (Inoue, Shin-ichi)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70622091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Cardio-facio-cutaneous(CFC)症候群は先天性心疾患、骨格異常、低身長、皮膚疾患、精神発達遅滞を特徴とする遺伝性の先天奇形症候群である。これまで疾患特異的モデル動物の開発が進んでいないことから、病態発生メカニズム、治療法開発は進んでいなかった。本研究では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ICR系統のノックインマウスを作製し解析した。その結果、ノックインマウスはCFC患者同様に成長障害、先天性心疾患、骨格異常を示すことを見出した。この成果はCFC症候群の病態メカニズムの解明、治療法開発に役立つであろう。

研究成果の概要(英文)：Germline mutations in BRAF have been identified in 70% of patients with cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome, which is characterized by heart defects, distinctive facial features, short stature and ectodermal abnormalities. We recently demonstrated that mice expressing a Braf Q241R mutation on a C57BL/6J background are embryonic/neonatal lethal, with multiple congenital defects, preventing us from analyzing the phenotypic consequences after birth. Here, to further explore the pathogenesis of CFC syndrome, we backcrossed these mice onto an ICR genetic background. The BrafQ241R/+ ICR mice exhibited growth retardation, sparse and ruffled fur, a hunched appearance, craniofacial dysmorphism and heart defects, including pulmonary stenosis and atrial septal defects. These data suggest that the heterozygous BrafQ241R/+ ICR mice show similar phenotypes as CFC syndrome after birth and will be useful for elucidating the pathogenesis and potential therapeutic strategies for CFC syndrome.

研究分野：遺伝学

キーワード：CFC症候群 疾患モデルマウス 遺伝性疾患 RASopathies RAS/MAPKシグナル伝達経路 BRAF 先天性心疾患

1. 研究開始当初の背景

先天性奇形症候群であるNoonan症候群、Costello症候群、cardio-facio-cutaneous (CFC) 症候群は特異的顔貌、心疾患、骨格異常、精神発達遅滞を示す常染色体優性遺伝性疾患である。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への変異が同定された<sup>1)</sup>(図1)。2005年には、当研究室においてCostello症候群の原因遺伝子としてHRASを同定し<sup>2)</sup>、さらにCFC症候群の原因遺伝子としてBRAF、KRASを同定した<sup>3)</sup>(図1)。これまでに、これら先天性奇形症候群の原因遺伝子は数多く同定されており、その多くがRAS/mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル伝達経路に存在することから「RASopathies」と呼ばれている<sup>4)</sup>(図1)。

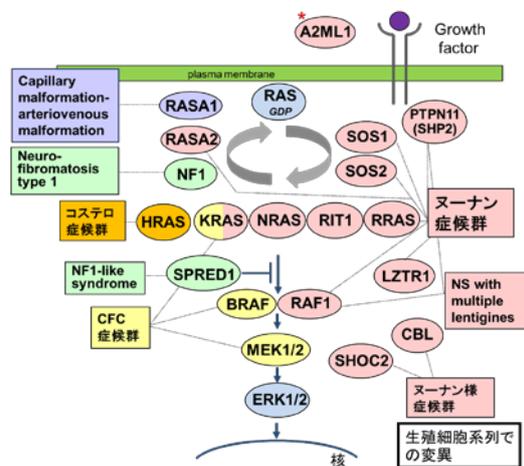


図1:RAS/MAPK経路とRASopathiesの原因遺伝子

CFC 症候群は臨床症状として心疾患、骨格異常を起因とする特異的顔貌、皮膚疾患、低身長(成長障害)、てんかん、重度の精神発達遅滞などを呈する。特徴的な心疾患としては、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に加え、肥大型心筋症、不整脈を呈する。これまでCFC症候群の原因遺伝子としてBRAF、MAPK2K1 (MEK1)、MAPK2K2 (MEK2)、KRASが同定されており、BRAFへの変異が約70%を占める。なかでもBRAFの257番目のアミノ酸であるグルタミン(Q)がアルギニン(R)に置換されたBRAF Q257R変異がCFC症候群患者で最も多く認められる。近年、BRAF V600EおよびL597V変異をもつマウスが成長障害・骨格異常・肥大型心筋症を示すことから、CFC症候群モデルになると報告された<sup>5,6)</sup>。しかしながら、これらのBRAF変異は癌(体細胞変異)において認められるものの生殖細胞系列における遺伝子変異(先天的変異)を原因とするCFC症候群患者では認められない。従

って、これらのマウスは正当なCFC症候群モデルとしては疑問が残っていた。本研究室では、2014年に世界で初めてBraf Q241R(ヒトのQ257Rに相当する変異)に変異をもつC57BL/6J系統のノックインマウスを作製し報告した<sup>7)</sup>(Braf<sup>Q241R/+</sup> B6マウス)。Braf<sup>Q241R/+</sup> B6マウスは、心疾患(肺動脈弁狭窄・心室中隔欠損症・緻密化異常・肉柱異常)、骨格異常(脊柱後弯・下顎形成不全)、肝壊死、浮腫などが認められ、胎生期/新生仔期に致死であった。CFC症候群患者は胎生期に胎児水腫、心不全、乳び胸などを原因に死亡することがある。従って、Braf<sup>Q241R/+</sup> B6マウスで認められたこれらの疾患はCFC症候群の胎生期の特徴を再現しておりCFC症候群モデルとして有用であった。しかし、これらマウスは胎生期/新生仔期致死のため、新生仔期以降の表現型の評価は困難であった。そこでBraf<sup>Q241R/+</sup> B6マウスの発生異常を改善するような薬剤・化合物をスクリーニングしたところ、MEK阻害剤のひとつであるPD0325901を胎生期に投与することでBraf<sup>Q241R/+</sup> B6マウスの致死は改善することを見出した。また、PD0325901投与によって生存したマウスは生殖能力を有していたことから、非近交系ICR/CD1および近交系BALB/cマウスと交配させたところ生存可能であった。よって、これらICR、BALB/cの遺伝的バックグラウンドをもつBraf Q241Rノックインマウスが新生仔期以降のCFC症候群モデルマウスとして有用である可能性が考えられるがどのような表現型を示すのかは明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では申請者の研究室で初めて作製したCFC症候群モデルマウスである、BrafQ241R変異をもつノックインマウスを用いて、心疾患および先天奇形発症メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) Braf<sup>Q241R/+</sup> BALB マウスの表現型の解析

- ①成長曲線、生存率を調査する。
- ②外表評価
- ③心臓の連続切片を作製し HE 染色を行うことで先天性心疾患の有無を解析する。

(2) Braf<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスの表現型の解析

- ①成長曲線、生存率を調査する。
- ②外表評価
- ③頭蓋骨の X 線 CT 検査
- ④心疾患の評価：心電図、心臓超音波検査、電子顕微鏡解析など。

#### 4. 研究成果

(1) *Braf*<sup>Q241R/+</sup> BALB マウスは成長障害、心疾患、肝壊死を示し新生仔期に死亡する。

*Braf*<sup>Q241R/+</sup> BALB マウスの表現型の解析を行った結果、*Braf*<sup>Q241R/+</sup> BALB 雄マウスは繁殖可能であったが、雌マウスは不妊であった。すべての *Braf*<sup>Q241R/+</sup> BALB マウスは成長障害を認め、荒れた毛並みを示した。生存率を調べたところ、胎生 16 日目および出生直後はコントロールマウスと *Braf*<sup>Q241R/+</sup> BALB マウスは同等であった。しかし、出生 5 日目では約 50% の *Braf*<sup>Q241R/+</sup> BALB マウスが死亡し、出生後 28 日目では約 90% が死亡した。新生仔期における死亡原因を解析したところ、出生 3 日目に約 36% の *Braf*<sup>Q241R/+</sup> BALB マウス (11 匹中 4 匹) は肝壊死を示した。CFC 症候群患者の多くは心疾患を呈することから心疾患もまた新生仔期致死のひとつの要因と考え解析を行った。その結果、出生 5 日目の *Braf*<sup>Q241R/+</sup> BALB マウスは心肥大 (心重量/体重比亢進) を認め、6 匹中 5 匹の *Braf*<sup>Q241R/+</sup> BALB マウスで心房中隔欠損症が認められた (図 2)。

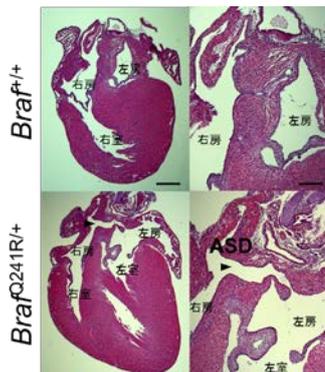


図2:*Braf*<sup>Q241R/+</sup> BALB マウスは心臓中隔欠損症を示す

(2) *Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスの表現型

*Braf*<sup>Q241R/+</sup> BALB マウスは新生仔期に死亡するため、成獣マウスとして解析を行うことができなかった。そこで、非近交系である ICR/CD1 系統とかけあわせた *Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスで解析を行った。*Braf*<sup>Q241R/Q241R</sup> ICR ホモマウスは出生後 19 日以内にすべて死亡した。一方で、*Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR ヘテロマウスの約 50% は生後 4 週をこえて生存した。生後 2 日目の *Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスの体重はコントロールマウスと同等であったが、生後 1 週間目より体重減少が有意に認められ、その後追いつくことはなかった (1 年齢まで測定)。これらの体重減少と一致して、生後 3 日目の *Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスの胃内ミルク減少が見られ、摂食障害が疑われた。次に外表を評価

したところ、*Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスは丸い頭、荒々しい毛並み、後弯が見られた (図 3)。そこで、X 線 CT 検査により、評価した。*Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスの頭蓋骨の長さは有意にコントロールマウスと比べて短く、頭蓋骨の幅は同等であった (図 4)。したがって、結果的に *Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスの頭蓋骨幅/頭蓋骨長さの比は大きくなり大頭であることがわかった。



図3:*Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスは成長障害、後弯を示す

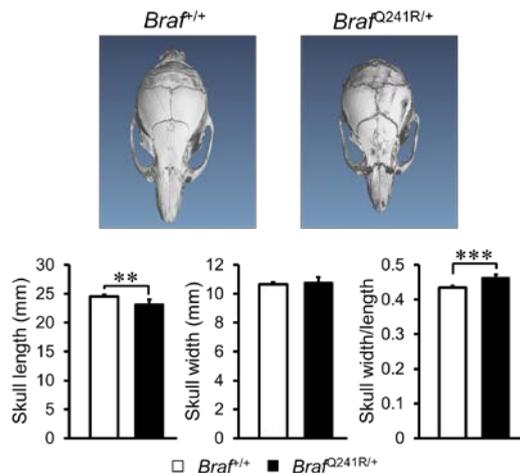


図4:*Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスは大頭を示す

CFC 症候群患者ではまれであるが爪の伸びがはやく、爪の変形、合指症などが認められることが報告されている<sup>8,9)</sup>。約 68% の *Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウス (19 匹中 13 匹) は長いあるいは変形した爪を示した。前肢の多指、後肢の多指はそれぞれ、約 50% (28 匹中、14 匹)、約 3.6% (28 匹中 1 例) の確率で認められた。さらに 10 週齢の *Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR 雌マウスの約 67% (9 匹中 6 匹) で卵巣嚢胞が認められた。26 週齢の時点では、全例 (6 匹中 6 匹) で認められ嚢胞サイズも大きかった。興味深いことに、多指、卵巣嚢胞は CFC 症候群で報告されていない。

(3) *Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスは心肥大、肺動脈弁狭窄、心房中隔欠損症、心筋ミトコンドリア異常を示す。

*Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスの心臓構造異常の有無と心機能を評価するため、生後 23-31 週齢の *Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスを用いて心臓超音波検査を行った。心臓の四腔断面像をカラー Doppler 法にて評価したところ、*Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスの 4 例中 2 例に左房から右房へ流れる血流があり、心房中隔欠損症が考えられた (図 5)。また、心房中隔欠損が考えられた 2 例のうち 1 例に心室性不整脈を認めた。CFC 症候群患者の多くに肺動脈弁狭窄が認められることから肺動脈流出路の血流速度をパルス Doppler 法にて調べたところ、4 例中 3 例の *Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスはコントロールマウスに比べて肺動脈血流速度が上昇しており、肺動脈狭窄が示唆された (図 6)。実際に心臓の連続切片を作製し評価したところ、肺動脈弁の肥厚が認められ、肺動脈弁狭窄と考えられた。次に M モード法にて心機能を調べたところ、*Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスの左室内腔径、左室後壁径、心室中隔径は収縮期、拡張期ともにコントロールマウスと差がなく、左室内径短縮率と左室駆出率も差を認めなかった。以上のことから、*Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスでは心臓壁肥厚や心機能低下はないが、心房中隔欠損症と肺動脈弁狭窄が認められることが明らかになった。

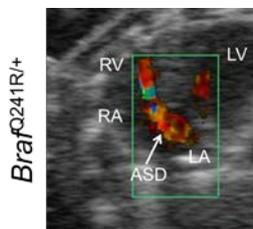


図5:*Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスは心房中隔欠損症を示す

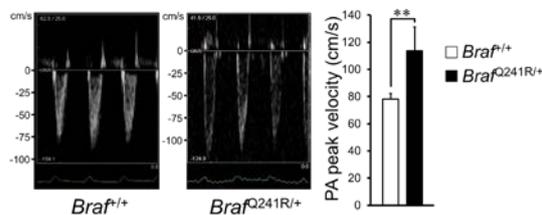


図6:*Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスは肺動脈狭窄を示す

CFC 症候群患者では肺動脈弁狭窄、心房中隔欠損症に加えて、特徴的な心疾患として肥大型心筋症が挙げられる。そこで *Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスにおける肥大型心筋症の有無を調べた。生後 26 週齢の *Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスの心臓はコントロールマウスの心臓と比べて心重量に差を認めなかった。しかし、体重あ

りの心臓重量は生後 6 週齢、12 週齢、23-31 週齢のいずれも有意な差を認めた。さらに心筋細胞の大きさを評価するために小麦胚芽レクチン染色を行ったところ、心筋細胞の大きさに有意な差を認めなかった。また心筋の線維化を評価したところ、*Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスの心筋に線維化は認められなかった。電子顕微鏡により左室心筋構造を評価したところ、*Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウス心臓ではサルコメア構造に異常は認められなかったが、ミトコンドリアの大きさが大小不揃いであり、ミトコンドリア内に細胞障害の指標となる顆粒が認められた (図 7)。ミトコンドリア機能に変化がないかどうかミトコンドリアの融合・分裂に関連するタンパク質をウェスタンブロットにより評価したところ、ミトコンドリアの融合に関係するタンパク質 MFN1、OPA1 は *Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスの左室心筋で高く、ミトコンドリアの分裂関連タンパク質 DLP1、FIS1 に変化はなかった。

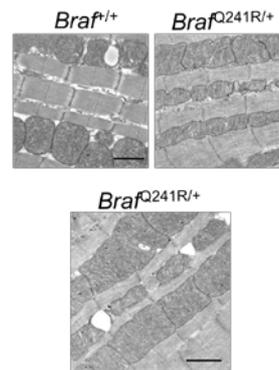


図7:*Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウス心臓はミトコンドリア異常を示す

最後に *Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスの胎仔 (胎生 13.5 日目) と成獣 (生後 12 週齢) 左室心筋の細胞抽出液を用いてウェスタンブロッティングを行い解析したところ、リン酸化 ERK とリン酸化 p38 のタンパクレベルには有意な差を認めなかったが、*Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウス胎仔でリン酸化 AKT (Ser473)、リン酸化 AKT (Thr308) のタンパクレベルが有意に低下していた。また、*Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスの左室心筋ではリン酸化 AKT (Thr308) のタンパクレベルが有意に低下していた。

本研究において得られた *Braf*<sup>Q241R/+</sup> ICR マウスの表現型を図 8 にまとめた。



図8: CFC症候群モデルマウスの表現型

〈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) Niihori T et al., Nat Genet, 38: 294-296, 2006
- 4) Aoki Y et al., J Hum Genet, 61: 33-39, 2016
- 5) Urosevic J et al., PNAS, 108: 5015-5020, 2011
- 6) Andreadi et al., Genes Dev, 26: 1945-1958, 2012
- 7) Inoue S et al., Hum Mol Genet, 23: 6553-6566, 2014
- 8) Armour C et al., J Med Genet, 45: 249-254, 2008
- 9) Rauen K et al., Gene Reviews, 1993

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4件)

① Shin-ichi Inoue, Shingo Takahara, Takeo Yoshikawa, Tetsuya Niihori, Kazuhiko Yanai, Yoichi Matsubara, Yoko Aoki. Activated Braf induces esophageal dilation and gastric epithelial hyperplasia in mice. *Human Molecular Genetics*, 26: 4715-4727, 2017. DOI: 10.1093/hmg/ddx354 査読有

② Yoko Aoki, Tetsuya Niihori, Shin-ichi Inoue, Yoichi Matsubara. Recent advances in RASopathies. *Journal of Human Genetics*,

61: 33-39, 2016. DOI: 10.1038/jhg.2015.114 査読有

③ 青木洋子、新堀哲也、井上晋一、松原洋一 RASopathies : Noonan症候群類縁疾患 小児科診療、79巻、1777-1781、2016 査読有

④ Mitsuji Moriya, Shin-ichi Inoue, Sachiko Miyagawa-Tomita, Yasumi Nakashima, Daiju Oba, Tetsuya Niihori, Misato Hashi, Hiroshi Ohnishi, Shigeo Kure, Yoichi Matsubara, Yoko Aoki. Adult mice expressing a *Braf* Q241R mutation on an ICR/CD-1 background exhibit a cardio-facio-cutaneous syndrome phenotype. *Human Molecular Genetics*, 24: 7349-7360, 2015. DOI:10.1093/hmg/ddv435 査読有

〔学会発表〕 (計6件)

① 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 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 第40回分子生物学会年会(神戸), 2017

② 井上晋一、守谷充司、宮川-富田幸子、大場大樹、新堀哲也、中瀧八隅、橋美里、大西浩史、呉繁夫、松原洋一、青木洋子 Cardio-facio-cutaneous 症候群モデルマウスを用いた疾患・病態解明と治療法研究 第6回 Multidisciplinary meeting on atherosclerosis (仙台), 2017

③ Shin-ichi Inoue, Mitsuji Moriya, Sachiko Miyagawa-Tomita, Yasumi Nakashima, Daiju Oba, Tetsuya Niihori, Misato Hashi, Hiroshi Ohnishi, Shigeo Kure, Yoichi Matsubara, Yoko Aoki. Adult mice expressing a Braf Q241R mutation on an ICR/CD-1 background exhibit a cardio-facio-cutaneous syndrome phenotype. 13<sup>th</sup> international congress of human genetics, Kyoto, 2016

④ Shin-ichi Inoue, Mitsuji Moriya, Tetsuya Niihori, Daiju Oba, Yoichi Matsubara, Yoko Aoki. BRAF knock-in mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in RASopathies. 4<sup>th</sup> international RASopathies symposium, Seattle, 2015

⑤井上晋一、守谷充司、宮川-富田幸子、中  
畠八隅、大場大樹、新堀哲也、橋美里、大西  
浩史、呉繁夫、松原洋一、青木洋子 がん原  
遺伝子 BRAF の機能獲得性変異は先天性異常  
を引き起こす 第 38 回分子生物学会年会(神  
戸) , 2015

⑥井上晋一、守谷充司、宮川-富田幸子、大  
場大樹、新堀哲也、中畠八隅、橋美里、大西  
浩史、呉繁夫、松原洋一、青木洋子  
Cardio-facio-cutaneous 症候群モデルマウ  
スを用いた治療法研究 日本人類遺伝学会  
第 60 回大会 (東京) , 2015

[その他]

ホームページ等

<http://www.medgen.med.tohoku.ac.jp/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