

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390290

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解明

研究課題名（英文） Molecular analysis of congenital anomaly syndromes caused by impaired intracellular signaling pathways

研究代表者

松原 洋一（MATSUBARA YOICHI）

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00209602

研究成果の概要（和文）：細胞内シグナル伝達異常症であるヌーナン症候群、コストロ症候群、CFC症候群について、国内外の施設より350例を収集して解析を行った。既知病因遺伝子における遺伝子変異の同定とともに新規病因遺伝子を同定・解析した。また、臨床症状の詳細な解析によって、変異遺伝子と臨床病型の相関を解析した。RAF1変異による病態の分子メカニズムの解明を行った。HRAS遺伝子、BRAF遺伝子に変異をもつ疾患モデルマウスの作製を行った。

研究成果の概要（英文）：We have collected DNA samples from 350 patients with Noonan syndrome, Costello syndrome or CFC syndrome and performed mutation analysis of nine disease-causing genes including a novel gene. Genotype-phenotype correlations were observed. We revealed molecular pathogenesis of RAF1 mutations. Model mice were successfully generated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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・先天異常学・細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

複数の先天奇形と精神遅滞を合併する multiple congenital anomaly/mental retardation syndrome のひとつであるヌーナン（Noonan）症候群は、特徴的な顔貌、心疾患、骨格の異常、精神遅滞を主徴とし、その約50%にチロシンホスファターゼ SHP-2 の遺伝子異常が同定されていた。申請者らは2005年に、ヌーナン症候群類縁疾患であるコストロ（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

症であることを世界に先駆けて報告した（Nature Genetics 37:1038-1040, 2005）。さらに、やはりヌーナン症候群類縁疾患である 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 38:294-6, 2006）。

これら申請者の一連の研究は1) 癌原遺伝子 HRAS, KRAS, BRAF の遺伝子変異を生殖細胞系列に持つヒト疾患をはじめ同定した発見であること、2) RAS/MAPK シグナル伝達経路上の分子の異常が臨床的に類似する先

天異常症の原因であるという新しい疾患概念を確立したこと、により注目されることとなった。

わたしたちは、これら3疾患の遺伝子診断を進める中で、従来の臨床診断による診断が覆される患者が出てきている一方、3疾患の臨床症状の重複が示唆されており、従来の臨床症状による診断に見直しが必要とかがえられた。また、遺伝子変異が同定されない患者が数多く認められることも判明した。

2. 研究の目的

本研究はヌーナン症候群・コステロ症候群・CFC 症候群3疾患の患者の原因遺伝子の網羅的遺伝子解析を行い、その分子診断結果と詳細な臨床的検討を元に疾患概念を再構築することが第一の目的である。またこれらの結果を踏まえたうえで、新規病因遺伝子を同定し、これら類縁疾患における遺伝子診断システムを確立することが第二の目的である。第三の目的として、疾患モデルマウスを作成してその表現型を解析する。

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230例である。これら類縁疾患をさらに日本と海外から収集する。

(2) 遺伝子解析

初期診断に基づいて既知の複数の原因遺伝子を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。遺伝子解析結果をもとに遺伝子診断のフローチャートを作成する。

(3) 臨床症状の調査

各疾患毎に項目を記載した調査用紙を用いて、詳細な情報収集を行う。全疾患に共通する項目として年齢・性・国・出産時父/母年齢、家族歴を設定し、臨床症状(顔貌、心疾患、精神・発達、皮膚、骨格、癌の合併)などは各疾患で設定する。CFC 症候群に関してはKavamuraらが2002年にそれまでに臨床的に診断されたCFC 症候群56例から抽出した81臨床症状をもとに作成したindexを用いる。

(4) 臨床症状と変異遺伝子の相関の検討

主治医から収集した臨床症状を集計し、変異遺伝子毎の臨床的な差異の有無、変異遺伝、これまでの疾患概念との類似点・相違点などの検討を行う。

(5) 新規候補遺伝子検索

これまでの研究では、臨床所見からヌーナン症候群類縁疾患と考えられるにもかかわらず既知の遺伝子に変異を認めない症例が

全体の約40%も存在している。いまだに同定されていない新規病因遺伝子が存在することは明白であり、これらの解明をおこなう。

(6) 変異蛋白を導入した疾患モデルマウスの作成とその表現型の評価

疾患モデルマウスを作成し、その表現型解析を行う。臨床徴候の評価及び組織学的な解析をおこなう。

4. 研究成果

国内外の施設より収集した検体数は350例となった。世界的にも最大規模の収集数と考えられる。

患者を対象に、既知の原因遺伝子 PTPN11, HRAS, KRAS, BRAF, MEK1, MEK2, SOS1 および新規に同定された RAF1, SHOC2 の9種類の遺伝子について包括的遺伝子解析を行った。その結果、60%において遺伝子変異を明らかにすることができた。この遺伝子解析結果をもとに、臨床的に遺伝子診断を実施するためのフローチャートを試作した。

臨床症状の調査では、とくにヌーナン症候群の患者18人で同定された RAF1 遺伝子変異を中心に、臨床症状との相関と変異蛋白の機能解析をおこなった。RAF1 遺伝子変異を持つ場合、他の遺伝子異常に比べて肥大型心筋症と低身長との合併頻度が有意に高かった。変異 RAF1 蛋白では抑制性の S259 部位のリン酸化が低下しており、そのために RAF1 活性抑制に重要な 14-3-3 蛋白との結合が低下し、非刺激時にも下流の ERK を活性化していることが明らかとなった。これらの成果を英文論文として発表した (Kobayashi et al, Hum Mutat 2010)。

また、本研究開始後に新規病因遺伝子として同定された SHOC2 遺伝子の検索を行った。その結果、8例に SHOC2 遺伝子変異を同定した。同定された変異はすべて p.S2G というミスセンス変異で、機能獲得型の変異と考えられた。患者は、低身長、薄い毛髪、アトピー性皮膚炎、精神遅滞、抜けやすい毛髪 (loose anagen hair) などを示した。1例では白血球増加を認めた。海外の報告を含めてすべての患者に同一変異が認められたことから、p.S2G の迅速診断法を考案した。このこれらの結果を英文論文として発表した (Komatsuzaki et al., J Hum Genet 2010)。

次に、コステロ症候群のモデルマウスとして HRAS 遺伝子変異ノックインマウス、CFC 症候群のモデルマウスとして BRAF 遺伝子変異ノックインマウスの作製をすすめた。後者についてはその作成に成功し、ヌーナン症候群に類似すると考えられる表現型が認められた。現在詳細な解析を実施中である。

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 14 件)

1. Ohashi H, Suzumori K, Chisaka Y, Sonta S, Kobayashi T, Aoki Y, Matsubara Y, Sone M, Shaffer LG. Implications of prenatal diagnosis of the fetus with both interstitial deletion and a small marker ring originating from Chromosome 5. **Am J Med Genet A**. 155A(1):192-6, 2011 (査読有り)
2. Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, Abe Y, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Kanno J, Niihori T, Ono M, Ishii N, Owada Y, Fujimura M, Mashimo Y, Suzuki Y, Hata A, Tsuchiya S, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. **J Hum Genet** 56(1):34-40, 2011 (査読有り)
3. Aizaki K, Sugai K, Saito Y, Nakagawa E, Sasaki M, Aoki Y, Matsubara Y. Cardio-facio-cutaneous syndrome with infantile spasms and delayed myelination. **Brain Dev**. 33(2):166-9, 2011 (査読有り)
4. 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**. 2010 [Epub ahead of print] (査読有り)
5. Komatsuzaki S, Aoki Y, Niihori T, Okamoto N, Hennekam RC, Hopman S, Ohashi H, Mizuno S, Watanabe Y, Kamasaki H, Kondo I, Moriyama N, Kurosawa K, Kawame H, Okuyama R, Imaizumi M, Rikiishi T, Tsuchiya S, Kure S, Matsubara Y. Mutation analysis of the SHOC2 gene in Noonan-like syndrome and in hematologic malignancies. **J Hum Genet**. 55(12):801-809. 2010 (査読有り)
6. Ohtake A, Aoki Y, Saito Y, Niihori T, Shibuya A, Kure S, Matsubara Y. Non-Hodgkin Lymphoma in a Patient With Cardiofaciocutaneous Syndrome. **J Pediatric Hematol Oncol**. 2010 [Epub ahead of print] (査読有り)
- 7. Kobayashi T, Aoki Y, Niihori T, Cavaé H, Verloes A, Okamoto N, Kawame H, Fujiwara I, Takada F, Ohata T, Sakazume S, Ando T, Nakagawa N, Lapunzina P, Meneses AG, Gillesse-Kaesbach G, Wiczorek D, Kurosawa K, Mizuno S, Ohashi H, David A, Philip N, Guliyeva A, Narumi Y, Kure S, Tsuchiya S, Matsubara Y. Molecular and clinical analysis of RAS in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation. **Human Mutation**, 31(3):284-94, 2010 (査読有り)
8. Kaput J, Cotton RG, Hardman L, Watson M, Al Aqeel AI, Al-Aama JY, Al-Mulla F, Alonso S, Aretz S, Auerbach AD, Bapat B, Bernstein IT, Bhak J, Bleoo SL, Blöcker H, Brenner SE, Burn J, Bustamante M, Calzone R, Cambon-Thomsen A, Cargill M, Carrera P, Cavedon L, Cho YS, Chung YJ, Claustres M, Cutting G, Dalgleish R, den Dunnen JT, Diaz C, Dobrowolski S, dos Santos MR, Ekong R, Flanagan SB, Flicek P, Furukawa Y, Genuardi M, Ghang H, Golubenko MV, Greenblatt MS, Hamosh A, Hancock JM, Hardison R, Harrison TM, Hoffmann R, Horaitis R, Howard HJ, Barash CI, Izagirre N, Jung J, Kojima T, Laradi S, Lee YS, Lee JY, Gil-da-Silva-Lopes VL, Macrae FA, Maglott D, Marafie MJ, Marsh SG, Matsubara Y, Messiaen LM, Möslein G, Netea MG, Norton ML, Oefner PJ, Oetting WS, O'Leary JC, de Ramirez AM, Paalman MH, Parboosingh J, Patrinos GP, Perozzi G, Phillips IR, Povey S, Prasad S, Qi M, Quinn DJ, Ramesar RS, Richards CS, Savage J, Scheible DG, Scott RJ, Seminara D, Shephard EA, Sijmons RH, Smith TD, Sobrido MJ, Tanaka T, Tavtigian SV, Taylor GR, Teague J, Töpel T, Ullman-Cullere M, Utsunomiya J, van Kranen HJ, Vihinen M, Webb E, Weber TK, Yeager M, Yeom YI, Yim SH, Yoo HS; Contributors to the Human Variome Project Planning Meeting. Planning the human variome project: the Spain report. **Hum Mutat**. 30(4):496-510, 2009. (査読有り)
9. Metoki H, Ohkubo T, Watanabe Y, Nishimura M, Sato Y, Kawaguchi M, Hara A, Hirose T, Obara T, Asayama K, Kikuya M, Yagihashi K, Matsubara Y, Okamura K, Mori S, Suzuki M, Imai Y; BOSHI Study Group. Seasonal trends of blood pressure during pregnancy in Japan: the babies and their parents' longitudinal observation in Suzuki Memorial Hospital in Intrauterine Period study. **J Hypertens**. 26(12):2406-13, 2008 (査読なし)
10. Narumi Y, Aoki Y, Niihori T, Sakurai M, Cave H, Verloes A, Nishio K, Ohashi H, Kurosawa K, Okamoto N, Kawame H, Mizuno S, Kondoh T, Addor MC, Coeslier-Dieux A, Vincent-Delorme C, Tabayashi K, Aoki M, Kobayashi T, Guliyev

- a A, Kure S, Matsubara Y. Clinical manifestations in patients with SOS1 mutations range from Noonan syndrome to CFC syndrome. **J Hum Genet.** 53:834-841, 2008 (査読有り)
11. Aoki Y, Niihori T, Narumi Y, Kure S, Matsubara Y. The RAS/MAPK syndrome s: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. **Hum Mutat.** 29(8):992-1006, 2008. (査読有り)
12. Inoue H, Kayano S, Aoki Y, Kure S, Yamada A, Hata A, Matsubara Y, Suzuki Y. Association of the GABRB3 gene with nonsyndromic oral clefts. **Cleft Palate Craniofac J.** 45(3):261-6, 2008 (査読有り)
13. Kojima-ishii K, Kure S, Ichinohe A, Shinka T, Narisawa A, Komatsuzaki S, Kanno J, Kamada F, Aoki Y, Yokoyama H, Oda M, Sugawara T, Mizoi K, Nakahara D, Matsubara Y. Model mice for mild-form glycine encephalopathy: behavioral and biochemical characterizations and efficacy of antagonists for the glycine binding site of N-methyl D-aspartate receptor. **Pediatr Res.** 64:228-233, 2008 (査読有り)
14. Rauen KA, Hefner E, Carrillo K, Taylor J, Messier L, Aoki Y, Gripp KW, Matsubara Y, Proud VK, Hammond P, Allanson JE, Delrue MA, Axelrad ME, Lin AE, Doyle DA, Kerr B, Carey JC, McCormick F, Silva AJ, Kieran MW, Hinek A, Nguyen TT, Schoyer L. Molecular aspects, clinical aspects and possible treatment modalities for Costello syndrome: Proceedings from the 1st International Costello Syndrome Research Symposium 2007. **Am J Med Genet A.** 146A(9):1205-17, 2008 (査読有り)

[学会発表] (計 12 件)

1. 松原洋一、Noonan 症候群類縁疾患における RAF1 遺伝子解析とその発症メカニズムの解明、第 17 回日本遺伝子診療学会大会、2010 年 8 月 6 日、津

[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]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 洋一 (MATSUBARA YOICHI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 00209602

(2) 研究分担者

呉 繁夫 (KURE SHIGEO)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号 : 10205221

青木 洋子 (AOKI YOKO)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号 : 80332500

(3) 連携研究者

新堀 哲也 (NIIHORI TETSUYA)
東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 40436134