

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670490

研究課題名(和文) 先天奇形症候群におけるゲノム・エピゲノム関連

研究課題名(英文) Epigenomic regulation in congenital anomaly 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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：最近、エピジェネティクス制御分子の遺伝子異常が先天奇形症候群の原因であることが明らかになってきた。本研究では、これまで収集したRAS/MAPK症候群と類縁疾患の患者を対象にデスクトップ型次世代シーケンサーを用いて網羅的にエピゲノム関連遺伝子の検索を行った。これまでの解析にて3例にて既知のエピゲノム関連遺伝子の変異が同定された。また、申請者らが作製した、BRAF変異を発現するCFC症候群モデルマウス治療実験においてヒストン修飾酵素阻害剤の効果があることを明らかにし、そのメカニズムを明らかにするために蛋白レベルやRNAレベルでの遺伝子の変化について解析を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed genes that are associated with epigenetic modifications in patients, who are clinically diagnosed as having RASopathies, and identified pathogenic mutations in three affected individuals. We generated a knock-in mice expressing a Braf p.Q241R mutation, as a model mice for CFC syndrome. Treatment with a MEK inhibitor, PD0325901, and a histone H3K27 demethylase inhibitor, GSK-J4, have rescued embryonic lethality in BrafQ241R/+ mice. To explore the mechanisms of efficacy in PD0325901 and GSK-J4 co-treatment, we examined mRNA and protein levels of histone H3K27 methylase and histone H3K27 demethylases in heart tissues from control and BrafQ241R/+ embryos. Further analysis on methylation profiling of H3K27 in each gene will clarify the mechanisms why co-treatment of PD0325901 and GSK-J4 rescued the embryonic lethality in in BrafQ241R/+ mice.

研究分野：分子遺伝学

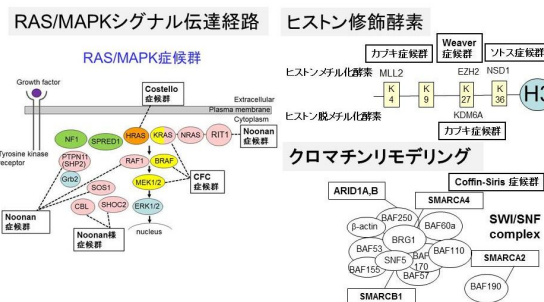
キーワード：ヌーナン症候群 RAS エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

最近、カブキ症候群の原因としてヒストンメチル化酵素である MLL2、Coffin-Siris 症候群にクロマチンリモデリング因子の SWI/SNF の変異などが同定され、エピジェネティック制御分子の遺伝子異常が先天奇形症候群の原因であることが明らかになってきた。

ヌーナン症候群類縁疾患 (RAS/MAPK 症候群) は顔貌異常・心奇形・精神遅滞を主徴とし、RAS/MAPK シグナル伝達経路の遺伝子異常を伴う疾患である。申請者らは RAS/MAPK 症候群の新規原因遺伝子検索と病態の解明の研究を行ってきた (Aoki Y. Nature Genetics, 2005, Niihori Y. Nature Genetics, 2006)。平成 22-25 年に内閣府最先端・次世代研究開発支援プログラムの助成を受け、次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析の解析パイプラインを確立し、ヌーナン症候群の新規原因遺伝子 RIT1 を同定した (Aoki Y. Am J Hum Genet, 2013)。これまでに 27 例のエクソーム解析を終了したが、その中の 2 名でクロマチンリモデリングに関わる遺伝子の変異が同定された (青木ら、未発表データ)。遺伝子変異陽性患者の臨床像を詳細に検討したが、その臨床症状はヌーナン症候群に類似していた。また申請者らは Costello 症候群・CFC 症候群モデルマウス作製に成功した。CFC 症候群モデルマウス治療実験においてヒストン修飾酵素阻害剤の効果を認めている (Inoue SI, Aoki Y et al. 論文作成中) が、そのメカニズムは明らかでない。

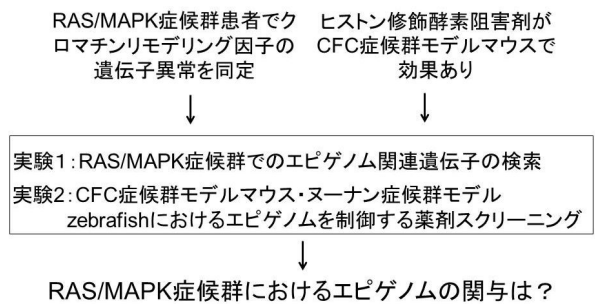
RAS/MAPK症候群の症状と合併腫瘍		
症候群	症状	合併腫瘍
Noonan 症候群	低身長、特異的顔貌 (眼間開離、眼瞼下垂) 心奇形、翼状頸 精神遅滞、白血病合併	若年性骨髄単球性白血病 (JMML) ・骨髄増殖性疾患
Costello 症候群	粗な顔貌、肥大型心筋症 手掌・足底の深いしわ 関節の可動性亢進 精神遅滞、易発癌性(15%)	横紋筋肉腫・神経芽細胞腫・膀胱癌
CFC (cardio-facio-cutaneous) 症候群	特異的顔貌、心奇形・心筋症、湿疹・魚鱗癬様の皮膚症状、精神遅滞	急性リンパ性白血病・非ホジキンリンパ腫・若年性骨髄単球性白血病 (JMML)



2. 研究の目的

最近、先天奇形症候群の原因として DNA のメチル化やヒストン修飾をつかさどるエピジェネティック制御分子の変異が同定されてきた。

申請者らはこれまでヌーナン症候群類縁疾患 (RAS/MAPK 症候群) の遺伝子解析とモデルマウス作製を行ってきたが、次世代シーケンサーを用いた解析より RAS/MAPK 症候群患者 2 例にてクロマチンリモデリング因子の遺伝子変異を見出した。また、申請者らが作製した CFC 症候群モデルマウスの症状改善に、ヒストン修飾酵素の阻害剤が効果を示すことを見出した。本研究では RAS/MAPK 症候群におけるエピゲノム異常の関与を明らかにし、先天異常症の病態の新しい病態メカニズムを明らかにすることを目的とする。



3. 研究の方法

実験 1 : これまで収集した 600 例以上の RAS/MAPK 症候群患者のうち変異陰性患者について、デスクトップ次世代シーケンサーを用いて網羅的にエピゲノム関連遺伝子 (DNA メチル化酵素、ヒストン修飾酵素、クロマチンリモデリング因子) を検索し、遺伝子変異を同定する。遺伝子変異を同定したらその変異蛋白の生化学的な機能を解析する。具体的には HaloPlex を用いた解析系において、RASpathies に関連する遺伝子とエピゲノム関連遺伝子全 24 遺伝子が解析できるように調整した。HaloPlex 反応を行った後にデスクトップ型シーケンサーにかけ、排出されたデータを BWA でマッピング、GATK でバリアントコールを行い、ANNOVAR でアノテーションを付けた。

実験 2 : すでに作製している CFC 症候群モデルマウスに対して、エピゲノム制御因子の阻害剤を投与し、その表現型を改善する薬剤を選択する。表現型が改善したマウスの組織について、そのエピゲノム修飾と遺伝子発現を網羅的に解析し、薬剤投与によるエピゲノム修飾と遺伝子発現の変化を解析し、そのメカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

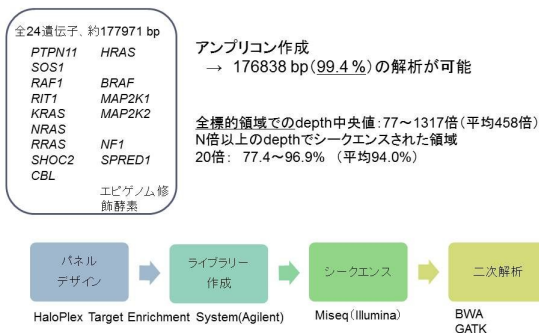
実験 1 : これまで収集した RAS/MAPK 症候群患者のうち既知の変異陰性患者にてデスクトップ型次世代シーケンサーを用いて網

羅的にエピゲノム関連遺伝子の検索を行った。HaloPlex を用いた解析系で、これまでに遺伝子変異が既に同定されている陽性コントロール 20 名を解析したところ、1つの変異の同定ができなかった。この原因としては、HaloPlex 反応を行う際に、複数の制限酵素でゲノムを切断するが、遺伝子変異が入ることでその部位に制限酵素認識部位が新たに生まれるために、その断片をキャプチャーすることができなくなるためと考えられた。

次に、これまでの Sanger 法によるスクリーニングで変異陰性患者の解析を行ったところ、最近同定した RIT1 遺伝子変異や、Sanger 法でのスクリーニングに含まれていなかった CBL の変異が同定された。一例にて既知のクロマチンリモデリング因子の変異が同定されたほかに、今までに報告の無いバリエーションが複数の患者で同定された。これらのバリエーションが病因かどうか検討を行なっている。

既知のクロマチンリモデリング因子変異が同定された患者は、長い間ヌーナン症候群と臨床診断されていたが、変異同定後に詳細な臨床症状の再評価が行なわれたところ、ヌーナン症候群に非特異的な症状もあるということが明らかになった。これらの結果よりヌーナン症候群類縁疾患とエピジェネティック制御分子変異をもつ疾患とは類似性があることが示唆された。今後サンプル数を増やして解析を行う予定である。

RASopathies 関連遺伝子の網羅的スクリーニング法



実験 2 : 申請者らは、最近 BRAF p.Q241R 変異を導入した CFC 症候群モデルマウス作製に成功した。BRAF p.Q241R 変異マウスは、先天性疾患・浮腫・肝壊死・骨格異常などを呈して胎生 16-19 日前後に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シグナル伝達阻害剤やエピゲノム修飾阻害剤を投与したところ、ヒストン脱メチル化酵素阻害剤 2 剤 (NCDM-32b, GSK-J4) の単剤投与と、MEK 阻害剤 (GSK-J4) とヒストン脱メチル化酵素阻害剤 (PD0325901) の併用療法が、変異マウスの胎生致死を回避することが明らかになった。

ヒストン脱メチル化酵素阻害剤と MEK 阻害剤を投与した時に耐性致死を回避するメカニズムを明らかにするために下記の実験を

行った。正常マウスと、BRAF p.Q241R 変異マウスの心臓において、ヒストン脱メチル化酵素の活性を調べたところ、正常マウスと BRAF p.Q241R 変異マウスにおいて、差異は認められなかった。また、薬剤投与前後においてヒストン脱メチル化酵素の mRNA や蛋白量の変動を調べたところ差は見られなかった。

次に、BRAF p.Q241R 変異マウスにおける個々の遺伝子発現変動を明らかにするために、同腹の野生型マウスと変異マウスにおいて、胎生 16 日の心臓を取り出し、マイクロアレイにて RNA の発現を網羅的に解析した。マイクロアレイ解析の結果、RAS/MAPK シグナル伝達経路に関する転写因子や、RAS/MAPK シグナル伝達経路の feedback に関与する酵素などが発現上昇することが明らかになった。またアレイの中から変動の多い遺伝子を抽出しその変動定量 PCR にて検証した。今回抽出した遺伝子の変化が、病態やヒストン脱メチル化酵素阻害剤の効果に関連している可能性があると考えられた。

ヒストン脱メチル化酵素阻害剤投与による *Braf*^{Q241R/+}; *Cre*マウスの胎生・新生仔期致死の軽減



Compound	Dose (mg/kg body weight)	Genotype (3 weeks)				n
		<i>Braf</i> ^{+/+}	<i>Braf</i> ^{+/+} ; <i>Cre</i>	<i>Braf</i> ^{Q241R/Neoflox+}	<i>Braf</i> ^{Q241R/+} ; <i>Cre</i>	
DMSO (vehicle)	-	14	8	8	0	30
NCDM-32b	2.0	12	4	9	0	25
	5.0	10	10	14	1	35
	10.0	11	10	19	0	40
	GSK-J4	5.0	8	18	14	1
PD0325901+GSK-J4	10.0	16	26	20	0	62
	0.5 + 5.0	8	13	5	5	31

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 5 件)

1. 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. (査読あり) 135(2):209-22, 2016 doi: 10.1007/s00439-015-1627-5.
2. Watanabe Y, Shido K, Niihori T, Niizuma H, Katata Y, Iizuka C, Oba D, Moriya K, Saito-Nanjo Y, Onuma M, Rikiishi T, Sasahara Y, Watanabe M, Aiba S, Saito R, Sonoda Y, Tominaga T, Aoki Y.

Kure S. Somatic BRAF c.1799T>A p.V600E Mosaicism syndrome characterized by a linear syringocystadenoma papilliferum, anaplastic astrocytoma, and ocular abnormalities. Am J Med Genet A. (査読あり) 170(1):189-94, 2016 doi: 10.1002/ajmg.a.37376.

3. 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. (査読あり) 24(25):7349-60, 2015 doi: 10.1093/hmg/ddv435.

4. 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. (査読あり) 23(24):6553-66., 2014 doi: 10.1093/hmg/ddu376.

5. Fujimoto N, Nakajima H, Sugiura E, Dohi K, Kanemitsu S, Yamada N, Aoki Y, Nakatani K, Shimpo H, Nobori T, Ito M. Bilateral giant coronary aneurysms in a 40-year-old male with Noonan syndrome caused by a KRAS germline mutation. Int J Cardiol. (査読あり) 173(3):e63-6, 2014 doi: 10.1016/j.ijcard.2014.03.135.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 青木洋子「RASopathiesの最近の進歩」第7回日本レックリングハウゼン病学会学術大会 2015年11月29日 慶應義塾大学(東京)

2. 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「cardio-facio-cutaneousを用いた治療法研究」第60回日本人類遺伝学会 2015年10月14-17日 京王プラザホテル(東京)

3. 青木洋子、井上晋一、守谷充司、大場大樹、新堀哲也、呉繁夫、大場大樹、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明」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)

4. 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「新規 BRAF ノックインマウスの作製による cardio-facio-cutaneous 症候群の病態解明と治療法研究」第59回日本人類遺伝学会 2014年11月19-22日 タワーホール船橋(東京)

5. Aoki Y, Niihori T, Inoue SI and Matsubara Y Molecular analysis of RASopathies using next generation sequencer The 14 th East Asian Union of Human Genetics (EAUHGS) Annual Meeting. 2014年11月20日 タワーホール船橋(東京)

6. 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)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔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

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)

国立研究開発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 (INOUE, Shinichi)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70622091

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

東北大学・大学院医学系研究科
矢尾板 全子 (YAOITA, Masako)
大場 大樹 (OBA, Daiju)
西山 亜由美 (NISHIYAMA, Ayumi)
梅木 郁美 (UMEKI, Ikumi)
高原 真吾 (TAKAHARA, Shingo)