

領域は解析可能領域の平均 94%であった。

次世代シーケンサーでの解析の結果、陽性対照 18 例中 16 例でサンガー法によって同定されたものと同一の変異が同定された。同定されなかったうち 1 例は 196 塩基の欠失であった。もう一例はある遺伝子の一塩基置換によるミスセンス変異であった。一塩基置換の結果、制限酵素認識配列が生じ、ライブラリ調製時に不具合が生じた可能性が考えられた。

変異が同定されていなかった 96 例の解析では、RIT1 遺伝子変異が 9 例、CBL 遺伝子変異が 3 例、RAF1 遺伝子変異が 1 例、MAP2K2 遺伝子変異 1 例、NF1 遺伝子変異が 1 例で変異が同定された。これらのうち RIT1 の 9 例、CBL の 1 例、NF1 の 1 例は病因として既報告の変異であった。

D. 考察

ターゲットリシーケンスを行うにあたり、ライブラリ調製の手法のうち、ターゲット領域のみの配列を得る手法としては 1) ターゲット領域に特異的なプライマーを用いて Multiplex PCR 等で増幅する方法、2) ターゲット領域をハイブリダイズしてキャプチャする方法、が存在する。Haloplex キットでは 2) の手法を用いており、ゲノムの断片化のステップにおいて制限酵素を用いているのが特徴的である。超音波による断片化と比較すると、初期費用が少なく済むという利点が存在する一方、断片化が配列特異的となり、一塩基の多型や変異の影響を受けることが考えられる。今回の解析での陽性対照で変異が検出できなかったものうち 1 例は 196bp のヘテロの欠失であり、他の解析キットを用いても検出は困難であった可能性が高い。検出できなかったもう一例のミスセンス変異はキットに特徴的なケースであろうと考えられた。キットではゲノムの断片化には 8 種類 (以上) の制限酵素を使用し、ゲノム 1 塩基あたり複数種類のリードでカバーすることにより変異や多型の影響を受けないように工夫されていたが、今回のような例も存在することを念頭に置く必要がある。ただし、変異周辺の領域は、変異が存在することにより切断されたゲノム由来と思われるリードはなく、depth が半量になっているような傾向も見られなかった。詳細は今後検討が必要と考えられた。

Haloplex によるライブラリ調製は比較的容易であり、インプットとなる DNA 量 (225ng) も少なくすみ、ほぼデザイン通りの結果が得られた等の長所がある一方、1 サンプルあたりのコストが高いこと、同定されない変異があったことなどの課題が存在した。今後は変異が同定されない領域をサンガー法で補う等も考慮し、他の手法も検討しながら最善の方法を探索していく。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いた RAS/MAPK 症候群の遺伝子解析を行った。概ね良好の結果を得たが、同時に課題も明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fujiwara I, Murakami Y, [Niihori T](#), Kanno J, Hakoda A, Sakamoto O, Okamoto N, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Kinoshita T, Kure S, Matsubara Y, Aoki Y. Mutations in PIGL in a patient with Mabry syndrome. *Am J Med Genet A*. Epub ahead of print 2015

2) Nakano E, Masamune A, [Niihori T](#), Kume K, Hamada S, Aoki Y, Matsubara Y, Shimosegawa T. Targeted Next-Generation Sequencing Effectively Analyzed the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene in Pancreatitis. *Dig Dis Sci*. Epub ahead of print 2014

3) 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 lentigines. *J Med Genet A*. 167(2):407-11, 2015

4) Izumi R, [Niihori T](#), Suzuki N, Sasahara Y, Rikiishi T, Nishiyama A, Nishiyama S, Endo K, Kato M, Warita H, Konno H, Takahashi T, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Kure S, Matsubara Y, Aoki Y, Aoki M. GNE myopathy

associated with congenital thrombocytopenia: a report of two siblings. *Neuromuscul Disord.* 24(12):1068-72, 2014

5) 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 knockin mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Hum Mol Genet.* 23(24):6553-66, 2014

2. 学会発表

1) 平成 25 年 10 月 2-4 日 第 3 回生命医薬情報学連合大会(仙台) 新堀哲也、井泉瑠美子、西山亜由美、

矢尾板全子、大場大樹、守谷充司、井上晋一、舟山亮、城田松之、中山啓子、松原洋一、青木洋子 次世代シーケンサーを用いた希少遺伝性難病病因遺伝子の探索

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

シグナル伝達異常症の遺伝子解析とモデルマウスにおける治療法開発

研究分担者 青木洋子
東北大学大学院医学系研究科 遺伝病学分野 准教授

研究要旨

細胞内シグナル伝達の異常はがんや発生異常などの様々な疾患に関連することが明らかになってきた。本研究では RAS/MAPK 症候群を中心としたシグナル伝達病の臨床・分子診断の提供、新規原因遺伝子同定と機能解析、疾患モデルマウスの作製と治療法開発を目的としている。これまでに分担者らは 700 例以上の RAS/MAPK 症候群の遺伝子診断を行い、原因不明の患者のエクソーム解析を行い新規原因遺伝子探索を行ってきた。今年度は遺伝子解析を継続し、新規原因遺伝子 RRAS を報告したほか、さらに RIT1 遺伝子変異陽性患者を同定し機能解析を継続している。cardio-facio-cutaneous (CFC)症候群モデルマウスが CFC 症候群患者で認められる表現型の多くを示すことを明らかにし論文として報告した。またそのモデルマウスを利用して新規治療法を見出し、特許を取得した。今後、RAS/MAPK 症候群の病態解明・治療をさらに進めていく。

研究協力者

新堀哲也（東北大学遺伝病学分野）
井上晋一（東北大学遺伝病学分野）
井泉瑠美子（東北大学遺伝病学分野）
守谷充司（東北大学遺伝病学分野）
矢尾板全子（東北大学遺伝病学分野）
大場大樹（東北大学遺伝病学分野）
西山亜由美（東北大学遺伝病学分野）
富田幸子（東京女子医科大学総合研究所心血管発生分化制御研究部門および循環器小児科）
中畠八隅（聖隷浜松病院）

A. 研究目的

RAS/MAPK 症候群は RAS/MAPK シグナル伝達経路の分子異常を伴う先天奇形症候群の総称で、ヌーナン症候群・Costello 症候群、cardio-facio-cutaneous 症候群が含まれる。これらの患者は、低身長・心疾患・精神遅滞・特異的顔貌などの症状をもつが互いに類似して

いるために分子診断が役立つ。分担者らはこれまでに 700 例以上の RAS/MAPK 症候群に遺伝子診断を提供してきたがその 40%はいまだに原因が不明である。本研究の目的は疾患モデルマウスを作製し、その病態を明らかにすることである。またその表現型を改善するような治療法の開発を目指してゆく。

B. 研究方法

<遺伝子解析とその表現型解析>

エクソーム解析ではエクソンキャプチャー法を用いて抽出した全エクソン領域を、次世代シーケンサーにて配列解析した。次世代シーケンサーは Hiseq 2000 (Illumina)を用いて 101 塩基のペアエンド解析を行った。得られたデータは、BWA でマッピングを行い、GATK v1.5 で変異の一塩基置換や欠失挿入の抽出を行った。変異のアノテーションには、ANNOVAR を使用した。

<モデルマウス作製と治療法研究>

CFC 症候群患者で最も高頻度に認められる

Braf 遺伝子変異 Q241R (ヒトでは Q257R に相当する) を有するノックインマウスを作製し、CFC 症候群の病態メカニズムの解析そしてその治療法の探索を行った。

BrafQ241R ノックインマウス (今後、ノックインマウスと呼ぶ) 胎仔からタンパク質抽出を行い、Braf 下流のシグナル MEK、ERK および異なるシグナル伝達経路、p38、JNK、PI3K/AKT 経路などに与える BrafQ241R 変異の影響を調べた。また NIH3T3 細胞に BrafQ241R 変異、V637E (ヒト V600E に相当する) を過剰発現させ ERK 下流の ELK1 転写活性に与える影響を調べた。

ノックインマウスは胎生 (E) E12.5 から E19.5 までの各ステージで帝王切開を行い取り出し、外表観察を行った。その後、解剖を行い各組織の組織学的観察 (HE、アルシアンブルー/アリザリンレッド染色など) を行った。

心臓は連続切片を作製し形態的特徴を明らかにし、また E13.5、E16.5 の胎仔心臓から RNA、タンパク抽出を行い様々なシグナルの変化を調べた。さらに免疫染色を行い各ステージにおける細胞増殖、細胞死の程度を調べた。

リンパ管の形態は E12.5 および E16.5 のステージにおいて頸部リンパ管、皮膚の組織切片を作製し CD-31、LYVE-1、 α -SMA などの免疫染色を行い調べた。

薬剤投与による有効性の評価は、ノックインマウスを妊娠した母マウスに E10.5 から E18.5 まで毎日、各薬剤の腹腔内投与を行い、その後、離乳時 (生後 21 日目) におけるノックインマウスの数をカウントすることで評価した。また薬剤の有用性を調べるために、浮腫、骨格異常、心疾患の頻度も合わせて評価した。

(倫理面への配慮)
患者からの臨床情報の取得および DNA の採

取に関しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、東北大学医学部のヒトゲノム委員会および倫理委員会に研究計画書を提出し、承認を得た。動物実験については、遺伝子組み換え実験指針と動物実験指針に則り、東北大学の承認を得て施行した。

C. 研究結果

<遺伝子解析とその表現型解析>

原因不明の患者計 26 人に対してエクソーム解析を行い、2013 年に新規の遺伝子 RIT1 を同定し報告した。今年度は、国際共同研究にて RAS/MAPK 症候群の新規原因遺伝子 RRAS を同定し、論文として報告した。RRAS 変異は頻度は低いものの、ヌーナン症候群 1 名、AML, JMML を合併したヌーナン症候群 1 名と JMML の 2 名に同定された。RRAS 以外の新規原因遺伝子についてはも解析が継続中である。

これまでに約 700 サンプルの RAS/MAPK 症候群患者の遺伝子診断を提供してきた。2013 年度に同定された RIT1 遺伝子変異は初めて報告した 2013 年以降にも同定され、現在臨床症状の取得と機能解析を行っている。また本年度は Noonan 症候群で成人の心臓に巨大冠動脈瘤を合併した成人に KRAS 変異を同定して報告したほか、多発性黒子を合併する Noonan 症候群に MAP2K1 遺伝子変異を同定した。

<モデルマウス作製と治療法研究>

我々は以前に、NIH3T3 細胞にヒト BRAFQ257R 変異を過剰発現させることで ERK 下流の ELK1 転写活性が亢進することを報告した。そこでマウス BrafQ241R 変異も同様に ELK1 転写活性を亢進させるかどうか調べた。その結果、BrafQ241R 変異は ELK1 の転写活性をコントロールと比べ 2.7 倍増加させた。

次にノックインマウスにおいて Braf 下流のシグナルである MEK、ERK および異なるシグ

ナル伝達経路、p38、JNK、PI3K/AKT 経路の変化を調べたところ、ノックインマウス胎仔 E12.5 および E14.5 の細胞抽出液における pMEK や pERK タンパクレベルはコントロールマウスと比べて変化がなかった。しかし、P-p38、P-AKT(Thr308)においてタンパクレベルの低下が認められた。

続いてノックインマウスの表現型を解析したところ、離乳時にノックインマウスは生存しておらず、生後、数時間で死亡していることが明らかになった。そこでこれらのノックインマウスの死亡原因を調べたところ、約 10%のマウス胎仔 (4/41 匹) で皮下出血を含む浮腫、約 5%のマウス (2/39 匹) で下顎形成不全が認められた。また下顎形成不全をもつマウスをアルシャンブルー/アリザリンレッド染色したところ、下顎形成不全に加えて脊柱の後弯が認められた。さらにこれらの異常に加えて、ほぼすべてのマウスで肝壊死が認められた。

CFC 症候群患者の多くで肺動脈弁狭窄、心房中隔欠損症、心室中隔欠損症などの先天性心疾患が認められることからノックインマウス胎仔の心臓を解析した。その結果、コントロールマウスと比べ、ノックインマウスでは肺動脈弁肥厚などのすべての弁肥厚、肉柱の異常増殖、心内膜床異常、心外膜異常、心室中隔欠損症および緻密化障害が認められた。また弁肥厚が顕著であったことから、弁肥厚を評価するために連続切片における各弁の最大径を測定したところ、コントロールマウスと比べ肺動脈弁、三尖弁の有意な肥厚が認められた。

BrafQ241R 変異は、多くの癌で認められる BRAF 変異同様に下流の MEK、ERK 経路を活性化することがわかっている。そこで、これらの種々の心疾患が ERK 活性化による細胞増殖の亢進によるものかどうか調べた。E13.5 の左室心筋、心室中隔において細胞増殖の指標である pHH3 陽性細胞の亢進が認められた。

また E16.5 の肺動脈弁また心室中隔欠損症もつノックインマウスの心室中隔において顕著に pHH3 陽性細胞の亢進が認められた。続いて、心臓における BRAF 下流の経路の発現を調べたところ pMEK そして pERK のタンパクレベルに変化は認められなかった。しかし、BRAF の直接のターゲットではない P-p38、P-AKT タンパクレベルの低下が認められた。続いて、E13.5、E16.5 の心臓をマイクロアレイにより解析したところ ERK の下流の Ets ファミリー Etv1,4,5 の亢進、そして ERK/JNK/p38 の脱リン酸化酵素 Dusp2,4,6 の亢進が認められ、実際に RT-PCR によって解析したところ、これらの遺伝子の発現亢進が認められた。

CFC 症候群や Noonan 症候群患者の胎児ではしばしば後頸部浮腫が認められる。実際、ノックインマウス胎児では皮下出血を含む浮腫が認められたことからリンパ管発生異常を疑い解析を行った。その結果、E12.5 の時点でコントロールマウスと比べ、ノックインマウスでは頸部リンパ管の拡張と頸部リンパ管内へ血球が認められた。リンパ管の発生は E10.5 に頸静脈の内皮細胞が頸部リンパ管の細胞に分化することからはじまる。そこでリンパ管への分化異常が疑い、リンパ管内皮マーカーである LYVE-1 または血管内皮マーカーである CD31 で免疫染色を行った。その結果、コントロール、ノックインマウス共にリンパ管周囲が LYVE-1 によりポジティブに染色され、CD31 では静脈、リンパ管ともにほんのわずかにポジティブであり、ノックインマウスにおいてもコントロール同様に静脈からリンパ管へ分化していることがわかった。E16.5 では E12.5 で観察された頸部のリンパ管はリンパ管としてではなく内腔構造として認められ、この内腔領域は LYVE-1 で染まらなくなる。しかしノックインマウスでは E12.5 同様の頸部リンパ管様構造が認められた。また、この領域を同定するために LYVE-1、CD31、平滑筋マーカーである α -SMA で免疫染色したと

ころいずれの抗体でも染色されなかった。しかしながら、このとき皮下の領域は極端に LYVE-1 で陽性に染色されリンパ管増生が疑われた。

これまでに MEK 阻害剤である PD0325901 投与によって Noonan 症候群のモデルマウスの胎生致死が軽減することが報告されている。そこで、本マウスで認められた胎生致死が PD0325901 また種々の薬剤・化合物によって改善するかどうか調べた。薬剤投与はノックインマウスを妊娠した母マウスに E10.5 から E18.5 まで毎日、腹腔内投与を行った。その結果、PD0325901 を 0.5mg 投与することによって離乳時まで生存したマウス、30 匹中、2 匹のノックインマウスを得ることができた。また、PD0325901 1.0mg 投与によって浮腫、下顎形成不全の改善が認められ 7 匹のノックインマウスを獲得することができた。加えて、ヒストン H3K9 脱メチル化酵素阻害剤である NCDM-32b、ヒストン H3K27 脱メチル化酵素阻害剤の GSK-J4 を 5.0mg 投与したとき、ともに 1 匹ずつのノックインマウスを得ることができた。PD0325901 と GSK-J4 を併用投与したところ、それぞれの単剤投与を上回る 5 匹のノックインマウスを獲得することができた。しかしながら、その他の薬剤・化合物(MAZ51、ソラフェニブ、ロバスタチン、エベロリムス)による効果は認められなかった。

近年、ヒストン H3K27 メチル化酵素、脱メチル化酵素が心発生に重要であることがいくつかの研究で報告された。そこで、GSK-J4 による投与が心疾患を改善することでノックインマウスの胎生致死を軽減しているのではないかと考え、PD0325901 と GSK-J4 を E10.5 から E15.5 まで併用投与し E16.5 の時点で心臓を解析した。その結果、ノックインマウスにおける肺動脈弁および三尖弁肥厚は併用投与により改善が認められた。

D. 考察

RAS/MAPK 症候群については、その約 40% がいまだに原因不明であったが、エクソーム解析にて同定された RIT1 はヌーナン症候群で 3 番目に頻度が高い遺伝子であることが示され、エクソーム解析が強力なツールであることが明らかになった。今年度は RIT1 よりはかなり頻度が低いものの国際共同研究にて RRAS 遺伝子変異を同定し報告した。RIT1 は 2013 年以降さらに 14 人に同定され、その臨床症状の詳細を検討している。さらに遺伝子体制の整備を行い RAS/MAPK 症候群の病態の解明を進める予定である。

Braf Q241R 変異をもつノックインマウスはリンパ管形成異常、骨格異常、心疾患など CFC 症候群患者に特有な症状を示すことから CFC 症候群のモデルマウスとして有用であると考えられる。また近年、Oncogenic RAS、RAF の変異による RAS/MAPK 経路活性化が今回の阻害剤のターゲットとなったヒストン H3K27 メチル化酵素、脱メチル化酵素の発現レベルを変動させるまた制御するという報告がされており、RAS/MAPK 経路とヒストン修飾の連関が考えられる。従って ERK 経路の制御と同様にエピゲノム修飾の変化は RAS/MAPK 活性化で生じる本疾患、他の RASopathies またがんなどの症状改善に有用であると考えられる。

E. 結論

CFC 症候群モデルマウスを作製し、その病態発生メカニズムの一端を明らかにした。さらにそのモデルマウスの治療法として MEK 阻害剤、ヒストン脱メチル化阻害剤およびその併用療法が有用であることを示唆した。RAS/MAPK 症候群は先天性疾患であるが、その症状を緩和するような治療法の開発によって、その生活の質や予後の改善が期待できると考えられる。さらにその病態解明を進めていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.* 173:e63-6, 2014
2. Narumi Y, Nishina S, Tokimitsu M, Aoki Y, Kosaki R, Wakui K, Azuma N, Murata T, Takada F, Fukushima Y, Kosho T. Identification of a novel missense mutation of MAF in a Japanese family with congenital cataract by whole exome sequencing: A clinical report and review of literature. *Am J Med Genet A.* 164A:1272-1276, 2014
3. 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.* 23:4315-27, 2014
4. Dragneva S, Szyszka-Niagolov M, Ivanova A, Mateva L, Izumi R, Aoki Y, Matsubara

Y. Seven Novel Mutations in Bulgarian Patients with Acute Hepatic Porphyrrias (AHP). *JIMD Rep.* 16:57-64, 2014

5. Inoue SI, 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.* 23:6553-66, 2014
6. 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 lentigines. *Am J Med Genet A.* 167:407-11, 2015
7. Fujiwara I, Murakami Y, Niihori T, Kanno J, Hakoda A, Sakamoto O, Okamoto N, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Kinoshita T, Kure S, Matsubara Y, Aoki Y. Mutations in PIGL in a patient with hyperphosphatasia mental retardation syndrome. *Am J Med Genet A*, Epub ahead of print 2015

2. 学会発表

1. 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
2. 新堀哲也、井泉瑠美子、西山亜由美、矢尾板全子、大場大樹、守谷充司、井上晋一、舟山亮、城田松之、中山啓子、松原洋一、青木洋子 第 3 回生命医薬情報学連合大会 次世代シーケンサーを用いた希少遺伝性難病病因遺伝子の探索 2014 年 10 月 2-4 日 仙台
3. 井上晋一、守谷充司、渡邊裕介、宮川一

- 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 BrafQ241R ノックインマウスによる cardio-facio-cutaneous 症候群の病態解明と治療法研究第 13 回日本心臓血管発生研究会 2014 年 10 月 16-17 日 福島
4. 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 東京
5. 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 東京
6. 井上晋一、守谷充司、渡邊裕介、宮川一富田幸子、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 東京
7. 井上晋一、守谷充司、渡邊裕介、宮川一富田幸子、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 横浜
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 1.特許取得
CFC 症候群モデルマウスの作製とその治療法の確立 特願 2014-063166
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他

BRAF V600E 変異の体細胞モザイクにより発症した Schimmelpenning 症候群の遺伝子解析ならびに合併した先天性悪性神経膠腫に対する vemurafenib による分子標的療法の研究

研究分担者 吳 繁夫

東北大学大学院医学系研究科 小児病態学分野 教授

研究要旨

先天性の脂腺母斑ならびに中枢神経、眼、骨症状を合併する Schimmelpenning 症候群は、KRAS あるいは NRAS 遺伝子の活性化変異の体細胞モザイクにより発症することが報告されている。今回我々は、先天性悪性神経膠腫で発症した Schimmelpenning 症候群患者に、BRAF V600E の体細胞モザイク変異を世界で初めて同定した。悪性神経膠腫は BRAF V600E 阻害薬である vemurafenib の投与によって著明に改善した。本研究は、Schimmelpenning 症候群の新しい責任遺伝子を明らかにしたと共に、合併する悪性腫瘍に対する有効な治療オプションを提示した点で、非常に重要と考えられた。

研究協力者

新妻秀剛（東北大学大学院医学系研究科 小児病態学分野）

渡辺 祐子（東北大学大学院医学系研究科 小児病態学分野）

A. 研究目的

先天性の脂腺母斑ならびに中枢神経、眼、骨症状を合併する Schimmelpenning 症候群は、KRAS あるいは NRAS 遺伝子の活性化変異の体細胞モザイクにより発症することが報告されている。

①本研究では、これらの遺伝子に変異の無い同症候群の患者において、新たな責任遺伝子として BRAF 遺伝子の解析を行う。

②BRAF 変異で最も頻度の高い V600E 変異は発癌性が高い一方、vemurafenib 等の分子標的療法薬が開発されている。BRAF V600E による Schimmelpenning 症候群に合併した先天性悪性神経膠腫に対し、vemurafenib による分子標的療法の有効性を検証する。

B. 研究方法

①遺伝子解析について保護者の同意が得られた Schimmelpenning 症候群患者において、患者末梢血単

核球、正常皮膚、ならびに腫瘍検体より DNA を採取し、次世代シーケンス機を用いて網羅的に遺伝子変異の解析を行う。発見された変異については Sanger 法により確認する。

②Vemurafenib による治療の対象となる、BRAF V600E 変異陽性の先天性悪性神経膠腫を合併する患者においては、保護者による同意が得られ、且つ他の治療法が無効となった場合、vemurafenib による治療を行う。

（倫理面への配慮）

Vemurafenib による先天性悪性神経膠腫の治療に関しては、東北大学病院臨床研究倫理委員会において承認を受けた。

C. 研究結果

①脂腺母斑、眼症状ならびに先天性悪性神経膠腫を合併して発症した Schimmelpenning 症候群の乳児患者において、神経膠腫、脂腺母斑、正常皮膚、末梢血単核球の4検体の遺伝子変異解析を行った。神経膠腫ならびに脂腺母斑において、BRAF V600E 変異が同定された。この変異は正常皮膚ならびに末梢血単核球には存在せず、体細胞変異であるが、由来の異なる2つの臓器からの検体に存在しているため、この個体は同変異をモザイクで

有していると考えられた。

②この患者の悪性神経膠腫に対して、carboplatin, vincristine, temozolomide 等の抗癌剤を用いた化学療法を行ったが、全く無効であったため、vemurafenib による分子標的療法を行った。効果は著明で、治療前は重度水頭症を合併し連日大量の髄液穿刺廃液を要していたが、治療開始数週間で腫瘍は著明に縮小、水頭症も改善し髄液穿刺不要となった。このためこの患者は出生後始めて退院する事ができ、現在も外来通院での治療を継続している。

D. 考察

Schimmelpenning 症候群はこれまでに KRAS、NRAS 遺伝子変異の体細胞モザイクが報告されているのみであったが、同じシグナル伝達経路の下流分子である BRAF の変異によっても発症する事が、本研究ではじめて明らかにされた。

BRAF V600E 変異は悪性黒色腫をはじめとして大腸癌、甲状腺乳頭癌、ランゲルハンス組織球症、小児神経膠腫などの様々な悪性腫瘍において見られる変異である。BRAF V600E に対する分子標的療法は悪性黒色腫において有効性が確立され、現在欧米諸国では小児神経膠腫を含めた他疾患での有効性が、臨床研究で検証されている。

このように BRAF V600E 変異は、悪性腫瘍において治療可能な標的分子として非常に重要であり、Schimmelpenning 症候群に合併する悪性腫瘍においてもこの変異を検索する事は極めて重要であると考え

られた。

E. 結論

本研究で、Schimmelpenning 症候群が BRAF V600E 変異の体細胞モザイクによって発症することを世界で初めて見出した。BRAF V600E に対しては優れた分子標的療法薬が開発されているため、特に悪性腫瘍を合併する Schimmelpenning 症候群患者においては、BRAF の遺伝子解析を行うことは極めて重要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(投稿準備中)

2. 学会発表

第 218 回 日本小児科学会宮城地方会 (2014/11/9 仙台市) BRAF V600E 変異により先天性退形成性星細胞腫を生じた Schimmelpenning 症候群の 1 例

第 32 回 日本脳腫瘍学会 (2014/11/30 浦安市) BRAF V600E 変異により先天性退形成性星細胞腫を生じた Schimmelpenning 症候群の一例

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究課題

細胞内シグナル伝達異常による先天奇形症候群の病態解明と治療法開発
研究分担者 梅澤明弘（国立成育医療研究センター研究所副所長）

研究要旨

RAS/MAPK 症候群は、細胞内シグナル伝達異常が原因となる先天奇形症候群である。特異的顔貌・先天性心疾患・低身長・精神遅滞などを示す常染色体優性遺伝性疾患であり、ヌーナン症候群・Costello（コステロ）症候群、cardio-facio-cutaneous (CFC) 症候群などが含まれる。これらの疾患に対する新規治療法の開発において、薬事的見地からの情報収集を実施した。

A. 研究目的

RAS/MAPK 症候群は、細胞内シグナル伝達異常が原因となる先天奇形症候群である。特異的顔貌・先天性心疾患・低身長・精神遅滞などを示す常染色体優性遺伝性疾患であり、ヌーナン症候群・Costello（コステロ）症候群、cardio-facio-cutaneous (CFC) 症候群などが含まれる。これらの疾患に対する新規治療法の開発において、薬事的見地からの情報収集を実施する。

B. 研究方法

主任研究者らと連携し、疾患の情報を収集し、新規治療法の開発における薬事的なポイントを整理し、有効性・安全性の両側面からアプローチするための研究環境の整備に関するモデルに対する助言を行う。

（倫理面への配慮）

本分担課題は実際にヒト試料や動物を取り扱うものではないため、倫理的な取り組みは必要ないと判断した。

C. 研究結果

新規治療法に関する薬事的な取り組みのうち、治験薬概要書内の背景情報の整理に注力した。すでに主任研究者らが収集している疾患に対する様々な情報を基盤とし、薬事審査に向けたプロセスに関する助言を行った。

D. 考察

主任研究者らは RAS シグナル伝達異常を示す症候群を RAS/MAPK 症候群と総称することを国際的に提唱している。これまでに RAS/MAPK 症候群の原因は 10 個以上に上るが、いまだその約 40% は原因が不明である。またわが国における自然予後・合併症・治療などの実態は不明であり、根本的な治療法はない。難治性希少疾患の新規治療法の開発は、産業界が参入しにくい分野であり、研究開発から治験、承認申請までの一連のプロセスにおいて、厚生労働科学研究として関与していくことは、厚生労働行政において重要な位置づけとなる。

E. 結論

この疾患に対する新規治療法の開発は社会からの期待が大きく、薬事的なプロセスを一つ一つ積み上げるための産官学一体となった開発体制の構築は非常に意義深いものとなる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

医療機関・患者への情報提供とプロジェクト推進班会議の開催

研究分担者 青木洋子

東北大学大学院医学系研究科 遺伝病学分野 准教授

研究要旨

RAS/MAPK 症候群を中心としたシグナル伝達病は比較的新しい疾患概念であり、患者さん・家族あるいは医療関係者への情報提供が確実な診断・診療について重要な鍵となる。本研究班では、遺伝子診断を全国の医療機関に提供しているが、その報告書において患者さんの診断診療へのアドバイスを行うとともに、RAS/MAPK 症候群ホームページで情報提供を行っている。また、患者・家族あるいは医療関係者に対して情報提供を行うために、平成 26 年 12 月 21 日に東京国際フォーラムにて第二回ヌーナン症候群シンポジウムを開催した。また 12 月 21 日にプロジェクト推進班会議を行いおける進捗状況を確認し、今後の研究計画を確認した。

研究分担者

松原洋一（国立成育医療研究センター研究所）

緒方 勤（浜松医科大学）

黒澤 健司（神奈川県立こども医療センター）

岡本 伸彦（大阪府立母子保健総合医療センター）

水野 誠司（愛知県心身障害者コロニー中央病院）

大橋 博文（埼玉県立小児医療センター）

川目 裕（東北大学・東北メディカルメガバンク機構）

呉 繁夫（東北大学大学院医学系研究科）

梅澤 明弘（国立成育医療研究センター研究所）

新堀 哲也（東北大学大学院医学系研究科）

研究協力者

横谷 進（国立成育医療研究センター病院）

深見真紀（国立成育医療研究センター研究所）

井上晋一（東北大学大学院医学系研究科）

井泉瑠美子（東北大学大学院医学系研究科）

守谷充司（東北大学大学院医学系研究科）

矢尾板全子（東北大学大学院医学系研究科）

大場大樹（東北大学大学院医学系研究科）

西山亜由美（東北大学遺伝病学分野）

吉井啓示（大阪府立母子保健総合医療センター）

三島祐子（大阪府立母子保健総合医療センター）

清水健司（埼玉県立小児医療センター）

小林朋子（東北大学・東北メディカルメガバンク機構）

A. 研究目的

RAS/MAPK 症候群を中心としたシグナル伝達病は比較的新しい疾患概念であり、患者さん・家族あるいは医療関係者への情報提供が確実な診断・診療について重要な鍵となる。本プロジェクトは患者・家族と医療関係者対象のシンポジウムを開催し、情報提供を行うとともに、実際の患者さんが困っていることや問題点を掘り起こす。またプロジェクト推進会議を行い、プロジェクトの進捗状況と今後の研究計画を確認する。

B. 研究方法

班会議の開催、第 2 回ヌーナン症候群シンポジウムの開催、ホームページの公開により班員の情報交換と情報公開をする。

C. 研究結果

<班会議の開催>

12 月 21 日（日）13:00-15:00 に東京国際フォーラムにてプロジェクト推進班会議を行った。初めに研究代表者からの挨拶と全体の概要、各分担者の自己紹介と進捗状況報告を行った。その後東北大学 新堀哲也から「東北大学における研究進捗状

況説明（遺伝子解析）」、東北大学井上晋一から「東北大学における研究進捗状況説明（モデルマウス）」、研究代表者の青木洋子から「今後の遺伝子診断体制について」発表を行った。班員からは今後の遺伝子診断の提供体制や、モデルマウスにおける治療薬の検討とヒトへの応用について活発な議論が行われた。

＜第2回ヌーナン症候群シンポジウムの開催＞ （後頁図1）

12月21日（日）15:00-17:00に東京国際フォーラムにて第2回ヌーナン症候群シンポジウムが開催された。全国から患者・家族と医療関係者74名の参加があり、質疑応答では活発な議論があった。質疑応答の議題は、①KRAS変異陽性の場合、ヌーナン症候群とCFC症候群どのように診断されるのか、②大人における医療体制、③皮膚症状への対応、④低血糖への対応などであった。

参加者からのアンケートでは「限られた時間内にたくさんの耳寄り情報がいただけて勉強になりました。また参加したいと思います。」「先生方の研究の成果を伺うことができ、とても日々進歩していることにうれしさを感じました。ありがとうございました。シンポジウムが開かれることでお医者様の先生方へ広く知っていただけていることはとてもすごいことだと思います。患者さんともっと交流の場にお時間をとっていただけたらもっとうれしいです。」などの声が聞かれた。次回のシンポジウムに生かしたい。

＜ホームページの公開＞

RAS/MAPK 症候群ホームページを開設し、患

者さん家族への情報提供を行っている（図2）。

D. 考察

第2回ヌーナン症候群開催にあたり患者さんご家族や医療関係者への情報提供を行い、交流を深めた。RAS/MAPK 症候群は比較的新しい概念であるため、遺伝子変異と疾患との対応や、その治療に対してこれからもホームページなどでの情報提供が必要と考えられた。また成人患者の症状の把握や医療体制の整備はまだ途上であるため、日本における成人患者数や実態調査が今後の課題と考えられる。シンポジウムを通して患者・家族からの情報を今後の診断体制や治療薬開発に役立てたい。

E. 結論

ヌーナン症候群シンポジウムを開催し、患者・家族、医療関係者への情報提供と交流ができた。患者・家族からの疑問や情報を収集し今後の医療体制・治療薬開発に役立てることが重要と思われた。

F. 健康危険情報

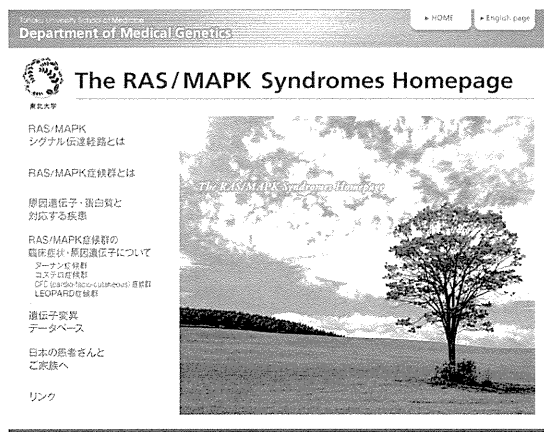
なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



（図1）ヌーナン症候群シンポジウムの開催

第2回 ヌーナン症候群 シンポジウムのご案内

このたび、厚生労働省科学研究委託費（難治性疾患克服研究事業）「細胞内シグナル伝達異常による先天奇形症候群の病態解明と治療法開発の研究」研究班では、ヌーナン症候群の患者さまとそのご家族、医療関係者、研究者を交えたシンポジウムを開催することになりました。

今回のシンポジウムでは、ヌーナン症候群についての最新の情報をご提供するとともに、患者さまやそのご家族が疑問や不安に思っておられることについて、共に考えていきたいと思います。ぜひ奮ってご参加くださるようご案内いたします。

日時 平成26年12月21日（日） 15:00～17:00

会場 東京国際フォーラム ガラス棟 G409会議室
（東京都千代田区丸の内3-5-1）裏面地図参照

参加費 無料（定員80名）

申込方法 裏面にある参加申込書にご記入の上、郵送、FAX
またはモバイルサイトよりお申込みください。
締切は11月25日（火）です。

プログラム（予定）

1) ヌーナン症候群と類縁疾患	青木洋子（東北大学）
2) ヌーナン症候群の症状と生活	大橋博文（埼玉県立小児医療センター）
3) ヌーナン症候群と遺伝子	緒方 勤（浜松医科大学）
4) ヌーナン症候群と成長	横谷 進（国立成育医療研究センター病院）
5) ヌーナン症候群の研究最前線	新堀哲也（東北大学）
6) 質疑・懇談	

主催
厚生労働科学研究委託費（難治性疾患等実用化研究事業）
「細胞内シグナル伝達異常による先天奇形症候群の病態解明と治療法開発の研究」
研究代表者 青木洋子（東北大学）
研究分担者 梅澤明弘（国立成育医療研究センター研究所）、大橋博文（埼玉県立小児医療センター）、
岡本伸彦（大阪府立母子保健総合医療センター）、緒方勤（浜松医科大学）、
川目裕（東北大学）、呉繁夫（東北大学）、黒澤健司（神奈川県立こども医療センター）、
新堀哲也（東北大学）、松原洋一（国立成育医療研究センター研究所）、
水野誠司（愛知県心身障害者コロニー中央病院） 五十音順

共催
成育医療研究開発費
「成育希少疾患の症例登録と遺伝学的診断に関する研究」
研究代表者 深見真紀（国立成育医療センター研究所）
研究分担者 青木洋子（東北大学）



Ⅲ. 学会など発表実績

様式第 19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「細胞内シグナル伝達異常による先天奇形症候群の病態解明と治療法開発の研究」

機関名 東北大学 青木洋子

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
ヌーナン症候群の新規原因遺伝子 RIT1 の同定（口頭発表）	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	第 117 回日本小児科学会学術集会（名古屋）	2014 年 4 月 11-13 日	国内
次世代シーケンサーを用いた希少遺伝性難病病因遺伝子の探索（ポスター発表）	新堀哲也、井泉瑠美子、西山亜由美、矢尾板全子、大場大樹、守谷充司、井上晋一、舟山亮、城田松之、中山啓子、松原洋一、青木洋子	第 3 回生命医薬情報学連合大会	2014 年 10 月 2-4 日	国内
BrafQ241R ノックインマウスによる cardio-facio-cutaneous 症候群の病態解明と治療法研究（口頭発表）	井上晋一、守谷充司、渡邊裕介、宮川一富田幸子、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	第 13 回日本心臓血管発生研究会（福島）	2014 年 10 月 16-17 日	国内
Molecular analysis of RASopathies using next generation sequencer（口頭発表）	Aoki Y, Niihori T, Inoue SI and Matsubara Y	The 14 th East Asian Union of Human Genetics (EAUHGS) Annual Meeting (Tokyo)	2014 年 11 月 20 日	国内
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（口頭発表）	青木洋子	日本人類遺伝学会第 59 回大会（東京）	2014 年 11 月 19-22 日	国内

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（口頭発表）	井上晋一、守谷充司、渡邊裕介、宮川一富田幸子、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	日本人類遺伝学会第 59 回大会（東京）	2014 年 11 月 19-22 日	国内
BRAF knock-in mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in RASopathies（口頭発表）	井上晋一、守谷充司、渡邊裕介、宮川一富田幸子、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	第 37 回日本分子生物学会年会（横浜）	2014 年 11 月 25-27 日	国内
BRAF ノックインマウス作製による RASopathies の病態解明と治療法研究（ポスター発表）	井上晋一、守谷充司、渡邊裕介、宮川一富田幸子、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	第 37 回日本分子生物学会年会（横浜）	2014 年 11 月 25 日	国内
ヌーナン症候群の研究最前線（口頭発表）	新堀哲也	第 2 回ヌーナン症候群シンポジウム	2014 年 12 月 21 日	国内
ヌーナン症候群と類縁疾患（口頭発表）	青木洋子	第 2 回ヌーナン症候群シンポジウム	2014 年 12 月 21 日	国内
RASopathies モデルマウスの作製と治療法開発（口頭発表）	井上晋一、守谷充司、渡邊裕介、宮川一富田幸子、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	第 4 回 Multidisciplinary meeting on atherosclerosis（仙台）	2015 年 1 月 10 日	国内
リンパ管疾患と遺伝子（口頭発表）	青木洋子	第 1 回リンパ管シンポジウム	2015 年 2 月 15 日	国内
RAS-MAPK 症候群(RASopathies) をめぐって～希少疾患研究の展望（口頭発表）	松原 洋一	第 18 回小児内分泌研究会特別講演	2014 年 7 月 5 日	国内
小児疾患の遺伝子解析～最近の進歩～（口頭発表）	松原 洋一	第 15 回熊本内分泌代謝フォーラム	2014 年 9 月 12 日	国内
小児慢性特定疾患と遺伝子診断（口頭発表）	松原 洋一	第 48 回日本小児内分泌学会学術集会シンポジウム	2014 年 9 月 27 日	国内

A CHARGE syndrome-like phenotype in a patient with an EP300 splicing mutation (ポスター発表)	Seiji Mizuno, Yoshinori Tsurusaki, Yukako Muramatsu, Kouichi Maruyama, Norihiro Niimi, Kenji Iio, Naomichi Matsumoto	Annual Meeting of American Society of Human Genetics	2014年10月18日	国外
【出生前診断と胎内(胎児)治療】 出生前診断における遺伝カウンセリング(口頭発表)	川目 裕	第117回日本小児科学会	2014年4月11日	国内
Infantile spasmsを呈した Pallister-Killian症候群の2例 (口頭発表)	小林朋子、川目裕	第56回日本小児神経学会総会	2014年5月29日	国内
小児脳神経外科に関連した遺伝子診断(口頭発表)	川目 裕	小児神経外科教育セミナー 2014	2014年5月31日	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文(発表題目)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Bilateral giant coronary aneurysms in a 40-year-old male with Noonan syndrome caused by a KRAS germline mutation.	Fujimoto N, Nakajima H, Sugiura E, Dohi K, Kanemitsu S, Yamada N, Aoki Y, Nakatani K, Shimpo H, Nobori T, Ito M.	Int J Cardiol.	173(3):e63-6, 2014	国外

<p>Activating mutations in RRAS underlie a phenotype within the RASopathy spectrum and contribute to leukaemogenesis.</p>	<p>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.</p>	<p>Hum Mol Genet.</p>	<p>23:4315-27, 2014</p>	<p>国外</p>
<p>New BRAF knock-in mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in cardio-facio-cutaneous syndrome.</p>	<p>Inoue SI, Moriya M, Watanabe Y, Miyagawa-Tomita S, Niihori T, Oba D, Ono M, Kure S, Ogura T, Matsubara Y, Aoki Y.</p>	<p>Hum Mol Genet.</p>	<p>23:6553-66, 2014</p>	<p>国外</p>