

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）
分担研究報告書

ヌーナン症候群関連疾患の研究

研究分担者 氏名 松原 洋一
所属・職位 国立研究開発法人国立成育医療研究センター研究所・研究所長

研究要旨

ヌーナン症候群は、特徴的な顔貌、低身長、先天性心疾患を呈する常染色体優性もしくは劣性疾患である。ヌーナン症候群および類似のヌーナン様症候群では、これまでに、細胞内RAS/MAPKシグナル伝達経路に関連する16種類の原因遺伝子が同定され、約80%の症例で病因遺伝子が明らかにされている。しかしながら、残る約20%の症例では未だ病因遺伝子は不明である。本年度、新たなヌーナン症候群の病因遺伝子としてRAS GTPase superfamilyのひとつであるRRAS2が、欧米の研究室から6家系、また日本の研究室から3家系で報告された。In vitro, in vivoの機能解析によって、患者で同定されたRRAS2変異がERK1/2およびELK1を活性化させ、形態学的異常を引き起こすことが示された。今後、さらに患者とその臨床情報を収集し、ヌーナン症候群の診断基準及び診療指針に取り入れていくことが重要である。

研究協力者:青木洋子・東北大学大学院医学系研究科遺伝医療学分野・教授

A. 研究目的

本分担研究では、国際標準に立脚した奇形症候群領域の診療指針に関する学際的・網羅的検討のうち、ヌーナン症候群関連疾患について検討を行うことが目的である。

これまでに、ヌーナン症候群およびヌーナン様症候群の原因遺伝子として、PTPN11, KRAS, SOS1, RAF1, SHOC2, CBL, BRAF, NRAS, RRASが知られている。さらにエクソーム解析の導入によって、RIT1, A2ML1, RASA2, SOS2, LZTR1, PPP1CB, MRASの各遺伝子も病因遺伝子であることが報告された。しかしながらこれらの遺伝子のいずれかに変異を有する患者は約80%にとどまっており、残る20%の患者における原因遺伝子解明が課題であり、それらの最新情報を遅滞なく収集し、ヌーナン症候群の診断基準及び診療指針に取り入れていくことが肝要である。

B. 研究方法

本年度は新たにヌーナン症候群の原因遺伝子として報告されたRRAS2について、その臨床病型とRAS/MAPKシグナル伝達系における機能異常について文献的検討を行った。

(倫理面への配慮)

本分担研究ではヒトの検体や個人情報扱わないため、倫理委員会等での審査は必要ないと考えられる。

C. 研究結果

1) 欧米人患者におけるRRAS2変異の報告

2019年、フランス、イタリア、ドイツ、セルビア、カナダ、米国の共同研究により、6家系9人のヌーナン症候群患者において5種類のRRAS2変異が報告された (Capri et al. Am J Hum Genet 104:1223-1232, 2019)。患者の人種は、アルジェリア、スリランカ、ドイツ、インド、セルビア、南米/アッシュケナージであった。同定された変異は、

c.65_73dup (p.Gly22_Gly24dup)

c.68G>T (p.Gly23Val)

c.208G>A (p.Ala70Thr)

c.215A>T (p.Gln721Leu)

c.70_78dup (p.Gly24_Gly26dup)

であった。このうち、ドイツ人患者のp.Ala70Thrは父由来、セルビア人患者のp.Ala70Thrはde novoで認められ、残る4種類の変異はすべてde novoであった。

臨床症状としては、特徴的な顔貌は全員 (9/9) に、心疾患は5/9に認められた。低身長を示す症例は少なく、軽度発達遅滞は3例にのみ見られた。

胎生期の異常（項部浮腫、羊水過多、心筋症）は5家系に存在した。リンパ球減少1例、血小板減少1例を認めたが、腫瘍性疾患はなかった。

In vitroの実験によると、変異を有するRRASタンパクはいずれもERKのリン酸化を促進しMAPK伝達系を活性化することが判明した。

2) 日本人患者におけるRRAS2変異の報告

同じく2019年、東北大学の青木洋子（研究協力者）の研究グループから、ヌーナン症候群日本人患者3人における3種類のRRAS2変異を同定したという報告がなされた（Niihori et al. *Am J Hum Genet* 104:1233-1240, 2019）。同定された変異は、

c.70_78dup (p.Gly24_Gly26dup)

c.216A>T (p.Gln72His)

c.215A>T (p.Gln72Leu)

であった。なお、c.216A>T (p.Gln72His)に付随してcisで認められたc.224T>G (Phe75Cys)は、benign polymorphismと判定されている。

この研究対象コホートでは、既知のヌーナン症候群関連遺伝子に変異を認めないヌーナン症候群及びヌーナン様症候群患者219名中、3名にRRAS2変異が同定された。

臨床症状としては、特徴的な顔貌は全員（3/3）に、心疾患は2/3に、低身長は2/3に認められた。発達遅滞はなし／軽度／重度に分かれた。

生化学的には、同定された変異はいずれもRAS/MAPK伝達経路下流の活性化を引き起こすことが示された。また、変異を有するmRNAをゼブラフィッシュに導入したところ、体長の短縮、大頭、魚舌骨角の異常が認められた。これらは、ヒトにおける低身長、大頭、特徴的顔貌に相当する表現型と考えられる。

D. 考察

RRAS2 タンパク（RAS related 2, 別名 TC21, teratocarcinoma 21）は、RAS GTPase superfamilyのひとつであり、1990年にはじめてその存在が報告された。このタンパクは HRAS, KRAS, NRAS と4つの conserved functional domain を共有しており、HRAS とのアミノ酸相同性は55%である。

今年度、国内外2施設の独立した研究により、RRAS2 変異がヌーナン症候群の病因となることが報告された。いずれの研究でも、患者で見いだされた変異は RAS/MAPK 伝達系を活性化することが示されており、ヌーナン症候群が本伝達経路の過剰な活性化によって生じているということをもさらに裏付けることになった。RRAS2 変異がヌーナン症候群のなかに占める割合については、かなり低く稀なもの（おそらく1%以下？）であることが示唆された。

これまでも RRAS2 の「体細胞変異」はがん組織で報告されている。p.Gly23Val, p.Ala70Thr, p.Gln72Leu は様々な固形腫瘍で報告されており、p.Gln72Leu は若年性骨髄単球性白血病（Juvenile myelomonocytic leukemia: JMML）で同定されている。JMML はしばしばヌーナン症候群患者で発症することが知られている腫瘍病変である。また、今回アルジェリア人のヌーナン症候群患者で発見された P.Gly22_Gly24dup は、子宮平滑筋肉腫において体細胞変異として報告されていた（Huang Y et al., *Oncogene* 11:1255-1260,1995）。

ヌーナン症候群及び類縁疾患に、しばしば悪性腫瘍が合併することは良く知られている。本年度報告された RRAS2 変異を有するヌーナン症候群患者9家系12名には、悪性腫瘍合併の記載はない。しかし、上記のことを勘案すると、これらの患者における悪性腫瘍合併を注意深く観察する必要があると思われる。

E. 結論

RRAS2 の変異が、ヌーナン症候群の原因のひとつであることが明らかになった。今回発見された患者においては悪性腫瘍の合併は確認されていない。しかしながら、これまで固形腫瘍において RRAS2 の体細胞変異が報告されていることから、RRAS2 変異を有するヌーナン症候群患者での悪性腫瘍発生の可能性について、注意深く観察、検討していくことが重要と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanase-Nakao K., Mizuno K., Hayashi Y., Kojima Y., Hara M., Matsumoto K., Matsubara Y., Igarashi M., Miyado M. and Fukami M. Dihydrotestosterone induces minor transcriptional alterations in genital skin fibroblasts of children with and without androgen insensitivity. *Endocr J.* 66. 387-393. 2019.
- 2) Miyado M., Fukami M., Takada S., Terao M., Nakabayashi K., Hata K., Matsubara Y., Tanaka Y., Sasaki G., Nagasaki K., Shiina M., Ogata K., Masunaga Y., Saito H. and Ogata T. Germline-Derived Gain-of-Function Variants of Gsalpha-Coding GNAS Gene Identified in Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis. *J Am Soc Nephrol.* 30. 877-889. 2019.
- 3) Iwasawa S., Yanagi K., Kikuchi A., Kobayashi Y., Haginoya K., Matsumoto H., Kurosawa K., Ochiai M., Sakai Y., Fujita A., Miyake N., Niihori T., Shirota M., Funayama R., Nonoyama S., Ohga S., Kawame H., Nakayama K., Aoki Y., Matsumoto N., Kaname T., Matsubara Y., Shoji W. and Kure S.

Recurrent de novo MAPK8IP3 variants cause neurological phenotypes. *Ann Neurol.* 85. 927-933. 2019.

- 4) Lewis J. D., Caldara A. L., Zimmer S. E., Stahley S. N., Seybold A., Strong N. L., Frangakis A. S., Levental I., Wahl J. K., 3rd, Mattheyses A. L., Sasaki T., Nakabayashi K., Hata K., Matsubara Y., Ishida-Yamamoto A., Amagai M., Kubo A. and Kowalczyk A. P. The desmosome is a mesoscale lipid raft-like membrane domain. *Mol Biol Cell.* 30. 1390-1405. 2019.
- 5) Takahara S., Inoue S. I., Miyagawa-Tomita S., Matsuura K., Nakashima Y., Niihori T., Matsubara Y., Saiki Y. and Aoki Y. New Noonan syndrome model mice with RIT1 mutation exhibit cardiac hypertrophy and susceptibility to beta-adrenergic stimulation-induced cardiac fibrosis. *EBioMedicine.* 42. 43-53. 2019.
- 6) Oda Y., Uchiyama Y., Motomura A., Fujita A., Azuma Y., Harita Y., Mizuguchi T., Yanagi K., Ogata H., Hata K., Kaname T., Matsubara Y., Wakui K. and Matsumoto N. Entire FGF12 duplication by complex chromosomal rearrangements associated with West syndrome. *J Hum Genet.* 64. 1005-1014. 2019.
- 7) Kubo A., Sasaki T., Suzuki H., Shiohama A., Aoki S., Sato S., Fujita H., Ono N., Umegaki-Arao N., Kawai T., Nakabayashi K., Hata K., Yamada D., Matsubara Y., Kosaki K. and Amagai M. Clonal Expansion of Second-Hit Cells with Somatic Recombinations or C>T Transitions Form Porokeratosis in MVD or MVK Mutant Heterozygotes. *J Invest Dermatol.* 139. 2458-2466 e9. 2019.
- 8) Hattori A., Okamura K., Terada Y., Tanaka R., Katoh-Fukui Y., Matsubara Y., Matsubara K., Kagami M., Horikawa R. and Fukami M. Transient multifocal genomic crisis creating chromothriptic and non-chromothriptic rearrangements in prezygotic testicular germ cells. *BMC Med Genomics.* 12. 77. 2019.
- 9) Ushijima K., Narumi S., Ogata T., Yokota I., Sugihara S., Kaname T., Horikawa Y., Matsubara Y., Fukami M., Kawamura T., Japanese Study Group of Insulin Therapy for C. and Adolescent D. KLF11 variant in a family clinically diagnosed with early childhood-onset type 1B diabetes. *Pediatr Diabetes.* 20. 712-719. 2019.
- 10) Masamune A., Kotani H., Sorgel F. L., Chen J. M., Hamada S., Sakaguchi R., Masson E., Nakano E., Kakuta Y., Niihori T., Funayama R., Shiota M., Hirano T., Kawamoto T., Hosokoshi A., Kume K., Unger L., Ewers M., Laumen H., Bugert P., Mori M. X., Tsvilovskyy V., Weissgerber P., Kriebs U., Fecher-Trost C., Freichel M., Diakopoulos K. N., Berninger A., Lesina M., Ishii K., Itoi T., Ikeura T., Okazaki K., Kaune T., Rosendahl J., Nagasaki M., Uezono Y., Algul H., Nakayama K., Matsubara Y., Aoki Y., Ferec C., Mori Y., Witt H. and Shimosegawa T. Variants That Affect Function of Calcium Channel TRPV6 Are Associated With Early-Onset Chronic Pancreatitis. *Gastroenterology.* 158. 1626-1641 e8. 2020.

2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
該当なし