

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）  
総合研究報告書

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。これまでに、ヌーナン症候群および類似のヌーナン様症候群では、細胞内RAS/MAPKシグナル伝達経路に関連する複数の原因遺伝子が同定されている。本研究期間中、新たに3種類の遺伝子（SOS2, LZTR1, RASA2）がヌーナン症候群の病因遺伝子として同定された。同定された患者遺伝子変異は、いずれもRAS/MAPK伝達系を活性化することが示されており、本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示唆することになった。今後、これらの遺伝子をヌーナン症候群の遺伝子診断パネルに追加すると共に、臨床病型との相関や悪性腫瘍発生の可能性について検討していくことが重要と考えられる。

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。

ヌーナン症候群においては、本研究開始時点で約70%の症例で病因遺伝子が明らかにされていた。いずれの遺伝子における変異も、細胞内RAS/MAPKシグナル伝達系を活性化させることが知られている。病因遺伝子が不明な症例についても、次々に新しい病因遺伝子が報告されており、それらの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重要である。

本研究では、ヌーナン症候群における新規の病因遺伝子について、研究協力者および国内外の研究室からの報告を収集整理し、臨床病型との相関や悪性腫瘍発生の可能性について検討することを目的とした。

**B. 研究方法**

研究協力者をふくむ国内外の研究室において同定された新規のヌーナン症候群原因遺伝子について、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を扱わないため、倫理委員会等での審査は必要ないと考えられた。

**C. 研究結果**

1) SOS2遺伝子の変異によるヌーナン症候群  
サンパウロ大学のBertolaらは、既知の7病因遺伝子（PTPN11, SOS1, RAF1, KRAS, SHOC2, CBL, BRAF遺伝子）に変異を認めない58名のブラジル人ヌーナン症候群患者に対して、次世代シーケンスを用いた全エクソーム解析をおこなった（J Med Genet 52:413-421, 2015）。その結果、これまでに報告されていないSOS2遺伝子に変異を有する患者4名（うち2名は血縁関係）を同定した。見出されたSOS2遺伝子変異はいずれもミスセンス変異で患者はそのヘテロ接合であった。

2) LZTR1遺伝子の変異によるヌーナン症候群  
2015年、上記のブラジル人ヌーナン症候群患者のコホートで、LZTR1遺伝子に変異を有する患者5名が同定された（J Med Genet 52:413-421, 2015）。患者で見出された遺伝子変異はいずれもミスセンス変異でこの遺伝子がコードするタンパクのkelchdomainに位置しており、患者はヘテロ接合であった。また、米国NIHのJohnstonらは、ヌーナン症候群患者21名において、常染色体劣性のbiallelicなLZTR1遺伝子変異を同定した（Genetics in Medicine 20:1175-1185, 2018）。見出

された変異は機能喪失、ミスセンス、スプライシング異常などで、家系内のヘテロ接合者は無症状（健康）であった。

わが国では、研究協力者の青木洋子および本分担研究者らにより、日本人患者で RASopathies が疑われ既知の遺伝子変異が同定されていない 166 人の解析により、7 人の患者に LZTR1 のレアバリエントを同定した (Umeki I et al. Hum Genet 138:21-35, 2019)。臨床症状は低身長、精神発達遅滞、肥大型心筋症の頻度が多いことなどであった。また、遺伝形式として常染色体劣性遺伝を示すものがある可能性も示唆された。LZTR1 と結合するタンパク質の解析では、RAF1, SHOC2, PPP1CB と結合していることが明らかにされた。これらの研究は LZTR1 が RAS/MAPK シグナル伝達経路に参与することを初めて示す重要な知見となった。

これまで、LZTR1 陽性ヌーナン症候群に腫瘍合併は報告されていなかったが、フランスの Jacquinet らは LZTR1 変異が同定された典型的ヌーナン症候群患者において oligoastrocytoma が 22 歳で合併し、26 歳での再発時には ganglioblastoma と診断された一例を報告している。

### 3) RRAS2 遺伝子の変異によるヌーナン症候群

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/アシュケナージであった。

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RRAS2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。

わが国でも、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)。

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た。

## D. 考察

SOS1 は、RAS 特異的 GEF (guanine nucleotide exchange factor) で GDP に結合した不活型 RAS を GTP 結合活性化 RAS に変換する機能を有しており、Ras/MAPK 経路において重要な役割を果たしている。

LZTR1 (Leucine Zipper Like Transcription Regulator 1) は癌抑制遺伝子であり、BTB-Kelch スーパーファミリーに属するタンパクをコードする。これまで LZTR1 遺伝子の体細胞変異による loss-of-heterozygosity が glioblastoma multiforme に認められることが知られていた。

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。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。様々な固形腫瘍や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。

以上の 3 遺伝子はいずれも RAS/MAPK 伝達系に関連している。患者で同定された変異はこの経路を活性化することが示されており、本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さらに裏付けることになった。臨床的に悪性腫瘍の合併はヌーナン症候群で最も留意すべき点であり、これらの遺伝子の体細胞変異がすでにごん組織で報告されていることを鑑みると、今後、これらの患者における腫瘍発生を注視する必要がある。

## E. 結論

この 3 年間の間に、ヌーナン症候群の原因遺伝子として新たに SOS2, LZTR1, RRAS2 が同定された。このことにより、ヌーナン症候群患者における病因遺伝子の同定率は、約 70% から 80% に増加した。今後、これらの遺伝子をヌーナン症候群の遺伝子診断パネルに追加すると共に、臨床病型との相関や悪性腫瘍発生の可能性について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) Nakamura S, Miyado M, Saito K, Katsumi M, Nakamura A, Kobori Y, Tanaka Y, Ishikawa H, Yoshida A, Okada H, Hata K, Nakabayashi K, Okamura K, Ogata H, Matsubara Y, Ogata T, Nakai H, Fukami M. Next-generation sequencing for patients with non-obstructive azoospermia: implications for significant roles of monogenic/oligogenic mutations.**Andrology**. 5(4):824-831, 2017.
- 2) Honda A, Umegaki-Arao N, Sasaki T, Nakabayashi K, Hata K, Matsubara Y, Tanikawa A, Amagai M, Kubo A. Somatic HRAS p.G12S mosaic mutation causes unilaterally distributed epidermal nevi, woolly hair and palmoplantar keratosis.**J Dermatol**. 44(6):e109-e110, 2017.
- 3) Shima H, Ishii A, Wada Y, Kizawa J, Yokoi T, Azuma N, Matsubara Y, Suzuki E, Nakamura A, Narumi S, Fukami M. SOX2 nonsense mutation in a patient clinically diagnosed with non-syndromic hypogonadotropic hypogonadism.**Endocr J**. 64(8):813-817, 2017.
- 4) Fukami M, Suzuki E, Izumi Y, Torii T, Narumi S, Igarashi M, Miyado M, Katsumi M, Fujisawa Y, Nakabayashi K, Hata K, Umezawa A, Matsubara Y, Yamauchi J, Ogata T. Paradoxical gain-of-function mutant of the G-protein-coupled receptor PROKR2 promotes early puberty.**J Cell Mol Med**. 21(10):2623-2626, 2017.
- 5) Hattori A, Katoh-Fukui Y, Nakamura A, Matsubara K, Kamimaki T, Tanaka H, Dateki S, Adachi M, Muroya K, Yoshida S, Ida S, Mitani M, Nagasaki K, Ogata T, Suzuki E, Hata K, Nakabayashi K, Matsubara Y, Narumi S, Tanaka T, Fukami M. Next generation sequencing-based mutation screening of 86 patients with idiopathic short stature.**Endocr J**. 64(10):947-954, 2017.
- 6) Inoue SI, Takahara S, Yoshikawa T, Niihori T, Yanai K, Matsubara Y, Aoki Y. Activated Braf induces esophageal dilation and gastric epithelial hyperplasia in mice.**Hum Mol Genet**. 26(23):4715-4727, 2017.
- 7) Ozono K, Ogata T, Horikawa R, Matsubara Y, Ogawa Y, Nishijima K, Yokoya S. Efficacy and safety of two doses of Norditropin® (somatropin) in short stature due to Noonan syndrome: a 2-year randomized, double-blind, multicenter trial in Japanese patients.**Endocr J**. 65(2):159-174, 2018.
- 8) Hamanaka T, Kimura M, Sakurai T, Ishida N, Yasuda J, Nagasaki M, Nariai N, Endo A, Homma K, Katsuoka F, Matsubara Y, Yamamoto M, Fuse N. A Histologic Categorization of Aqueous Outflow Routes in Familial Open-Angle Glaucoma and Associations With Mutations in the MYOC Gene in Japanese Patients. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 58(5):2818-2831, 2018.
- 9) Osumi T, Tsujimoto SI, Nakabayashi K, Taniguchi M, Shirai R, Yoshida M, Uchiyama T, Nagasawa J, Goyama S, Yoshioka T, Tomizawa D, Kurokawa M, Matsubara Y, Kiyokawa N, Matsumoto K, Hata K, Kato M. Somatic MECOM mosaicism in a patient with congenital bone marrow failure without a radial abnormality.**Pediatr Blood Cancer**.65(6):e26959, 2018
- 10)Oba D, Inoue SI, Miyagawa-Tomita S, Nakashima Y, Niihori T, Yamaguchi S, Matsubara Y, Aoki Y. Mice with an Oncogenic HRAS Mutation are Resistant to High-Fat Diet-Induced Obesity and Exhibit Impaired Hepatic Energy Homeostasis.**EBioMedicine**.27:138-150, 2018.
- 11)Mizuguchi T, Nakashima M, Kato M, Okamoto N, Kurahashi H, Ekhilevitch N, Shiina M, Nishimura G, Shibata T, Matsuo M, Ikeda T, Ogata K, Tsuchida N, Mitsuhashi S, Miyatake S, Takata A, Miyake N, Hata K, Kaname T, Matsubara Y, Saitsu H, Matsumoto N. Loss-of-function and gain-of-function mutations in PPP3CA cause two distinct disorders.**Hum Mol Genet**.27(8):1421-1433, 2018
- 12)Katoh-Fukui Y, Yatsuga S, Shima H, Hattori A, Nakamura A, Okamura K, Yanagi K, Iso M, Kaname T, Matsubara Y, Fukami M. An unclassified variant of CHD7 activates a cryptic splice site in a patient with CHARGE syndrome.**Hum Genome Var**.5:18006, 2018.
- 13)Ushijima K, Fukami M, Ayabe T, Narumi S, Okuno M, Nakamura A, Takahashi T, Ihara K, Ohkubo K, Tachikawa E, Nakayama S, Arai J, Kikuchi N, Kikuchi T, Kawamura T, Urakami T, Hata K, Nakabayashi K, Matsubara Y, Amemiya S, Ogata T, Yokota I, Sugihara S; Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes. Comprehensive screening for monogenic diabetes in 89 Japanese children with insulin-requiring antibody-negative type 1 diabetes. **Pediatr Diabetes**. 19(2):243-250, 2018.
- 14)Umeki I, Niihori T, Abe T, Kanno SI, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Nagasaki K, Yoshida M, Ohashi H, Inoue SI, Matsubara Y, Fujiwara I, Kure S, Aoki Y. Delineation of LZTR1 mutation-positive patients with ヌーナン syndrome and identification of LZTR1 binding to RAF1-PPP1CB complexes. **Hum Genet**.138(1):21-35, 2019.

- 15) Ohki K, Kiyokawa N, Saito Y, Hirabayashi S, Nakabayashi K, Ichikawa H, Momozawa Y, Okamura K, Yoshimi A, Ogata-Kawata H, Sakamoto H, Kato M, Fukushima K, Hasegawa D, Fukushima H, Imai M, Kajiwara R, Koike T, Komori I, Matsui A, Mori M, Moriwaki K, Noguchi Y, Park MJ, Ueda T, Yamamoto S, Matsuda K, Yoshida T, Matsumoto K, Hata K, Kubo M, Matsubara Y, Takahashi H, Fukushima T, Hayashi Y, Koh K, Manabe A, Ohara A. Clinical and molecular characteristics of MEF2D fusion-positive precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood, including a novel translocation resulting in MEF2D-HNRNP1 gene fusion. **Haematologica**. 104(1):128-137, 2019.
- 16) Yoshida T, Matsuzaki T, Miyado M, Saito K, Iwasa T, Matsubara Y, Ogata T, Irahara M, Fukami M. 11-oxygenated C19 steroids as circulating androgens in women with polycystic ovary syndrome. **Endocr J**. 65(10):979-990, 2018.
- 17) Okano S, Miyamoto A, Fukuda I, Tanaka H, Hata K, Kaname T, Matsubara Y, Makita Y. Genitopatellar syndrome: the first reported case in Japan. **Hum Genome Var**. 2018 May 28;5:8. doi: 10.1038/s41439-018-0010-1. eCollection 2018.
- 18) Kawashima S, Nakamura A, Inoue T, Matsubara K, Horikawa R, Wakui K, Takano K, Fukushima Y, Tatematsu T, Mizuno S, Tsubaki J, Kure S, Matsubara Y, Ogata T, Fukami M, Kagami M. Maternal Uniparental Disomy for Chromosome 20: Physical and Endocrinological Characteristics of Five Patients. **J Clin Endocrinol Metab**. 103(6):2083-2088, 2018.
- 19) Tanase-Nakao K, Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Hara M, Matsumoto K, Matsubara Y, Igarashi M, Miyado M, Fukami M. Dihydrotestosterone induces minor transcriptional alterations in genital skin fibroblasts of children with and without androgen insensitivity. **Endocr J**. 66(4):387-393 2019.
- 20) 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, Saitsu H, Ogata T. Germline-Derived Gain-of-Function Variants of Gs $\alpha$ -Coding GNAS Gene Identified in Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis. **J Am Soc Nephrol**. 30(5):877-889, 2019.
- 21) 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, Kure S. Recurrent de novo MAPK8IP3 variants cause neurological phenotypes. **Ann Neurol**. 85(6):927-933, 2019.
- 22) Lewis JD, Caldara AL, Zimmer SE, Stahley SN, Seybold A, Strong NL, Frangakis AS, Levental I, Wahl JK, Mattheyses AL, Sasaki T, Nakabayashi K, Hata K, Matsubara Y, Ishida-Yamamoto A, Amagai M, Kubo A, Kowalczyk AP. The desmosome is a mesoscale lipid raft-like membrane domain. **Mol Biol Cell**. 30(12):1390-1405, 2019.
- 23) Takahara S, Inoue SI, Miyagawa-Tomita S, Matsuura K, Nakashima Y, Niihori T, Matsubara Y, Saiki Y, 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.
- 24) 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, Matsumoto N. Entire FGF12 duplication by complex chromosomal rearrangements associated with West syndrome. **J Hum Genet**. 64(10):1005-1014, 2019.
- 25) 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, 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(12):2458-2466.e9.2019.
- 26) Hattori A, Okamura K, Terada Y, Tanaka R, Katoh-Fukui Y, Matsubara Y, Matsubara K, Kagami M, Horikawa R, Fukami M. Transient multifocal genomic crisis creating chromothriptic and non-chromothriptic rearrangements in prezygotic testicular germ cells. **BMC Med Genomics**. 12(1):77, 2019.
- 27) 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 Childhood and Adolescent Diabetes. KLF11 variant in a family clinically diagnosed with early childhood-onset type 1B diabetes. **Pediatr Diabetes**. 20(6):712-719, 2019.
- 28) Masamune A, Kotani H, Sörgel FL, Chen JM, Hamada S, Sakaguchi R, Masson E, Nakano E, Kakuta Y, Niihori T, Funayama R, Shirota M, Hirano T, Kawamoto T, Hosokoshi A, Kume K, Unger L, Ewers M, Laumen H, Bugert P, Mori

MX, Tsvilovskyy V, Weißgerber P, Kriebs U, Fecher-Trost C, Freichel M, Diakopoulos KN, Berninger A, Lesina M, Ishii K, Itoi T, Ikeura T, Okazaki K, Kaune T, Rosendahl J, Nagasaki M, Uezono Y, Algül H, Nakayama K, Matsubara Y, Aoki Y, Férec C, Mori Y, Witt H, Shimosegawa T. Variants That Affect Function of Calcium Channel TRPV6 Are Associated With Early-onset Chronic Pancreatitis. **Gastroenterology**. 2020 Jan 10. pii: S0016-5085(20)30017-2. doi: 10.1053/j.gastro.2020.01.005. [Epub ahead of print]

## 2.学会発表

- 1) 松原洋一 ヌーナン症候群の低身長は改善できるか? 第 40 回日本小児遺伝学会学術集会、2018/1/13
- 2) 未診断疾患イニシアチブ (IRUD)から見えてきたもの, 口頭, 松原洋一, 第 91 回日本内分泌学会学術総会, 教育講演 18, 2018/4/28, 国内
- 3) 遺伝学的検査 ~なぜ, いつ, どこで, どうやって?~, 口頭, 松原洋一, nordiscience forum2018 企画セッション「日常診療における遺伝学的検査の臨床応用の現状」における基調講演, 2018/6/2, 国内
- 4) セッション: シンポジウム 6「腎臓病領域における希少疾患と指定難病」, 口頭, 松原洋一, 第 61 回日本腎臓学会学術総会, 2018/6/8, 国内
- 5) ゲノム医療時代に求められる遺伝カウンセリングの役割 Genetic counselling in the era of genomic medicine, 口頭, 松原洋一, 第 42 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 特別講演,
- 6) 未診断疾患イニシアチブ (IRUD)の診療体制, 口頭, 松原洋一, 第 25 回日本遺伝子診療学会大会, シンポジウム 2「希少疾患と遺伝医療」, 2018/7/13, 国内
- 7) 急速に拡大しつつある遺伝学的検査~小児科診療へのインパクトと倫理的課題, 口頭, 松原洋一, 第 647 回日本小児科学会 東京都地方会講話会, 2018/7/14, 国内
- 8) 進化する小児疾患の遺伝子診断, 口頭, 松原洋

一, 第 5 回サマーセミナー, 国立成育医療研究センター セミナールーム講堂, 2018/7/28, 国内

- 9) Initiative on Rare and Undiagnosed Diseases (IRUD), 口頭, 松原洋一, 16th Asia Pacific Congress of Pediatrics(APCP)2018, 9th Annual Scientific Meeting of Indonesian Pediatric Society(ASMIPS), 2018/8/27, 国外
- 10) 「ゲノム医療時代における遺伝カウンセリング」, 口頭, 松原洋一, 第 77 回日本癌学会, 特別企画 3, 人類遺伝学会, 遺伝カウンセリング学会, 家族性腫瘍学会の 3 学会合同シンポジウム, 2018/9/28, 国内
- 11) Initiative on Rare and Undiagnosed Diseases (IRUD), ポスター, 松原洋一, American Society of Human Genetics 2018, 2018/10/16~20, 国外
- 12) "日本先天代謝異常学会の活性化に向けて: 関連学会の立場から How we can facilitate the activity of JSIMD?", 口頭, 松原洋一, 第 60 回日本先天代謝異常学会総会 シンポジウム 2 今後の日本先天代謝異常学会を考える, 2018/11/8~10, 国内
- 13) Plenary Lecture III "Initiative on Rare and Undiagnosed Diseases in Pediatrics in Japan", 口頭, 松原洋一, 2018EAUHGS meeting, Seoul, Korea, 2018/11/30, 国外
- 14) 「遺伝子診療における倫理的課題」, 口頭, 松原洋一, 第 4 回日本産科婦人科遺伝診療学会学術講演会 特別講演 1, 2018/12/15, 国内

## G. 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