

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
分担研究報告書

「Noonan症候群の診療ガイドラインの作成に関する研究」

研究分担者 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

研究要旨

ヌーナン症候群は、低身長、心疾患・骨格異常・軽度の精神遅滞や発達障害を示す先天異常症候群である。ヌーナン症候群の原因としてRAS/MAPKシグナル伝達経路の複数の分子に変異が同定されてきたが、現在も新規原因遺伝子が同定され報告されている。本研究では、日本における遺伝子陽性患者の表現型の検討を行いながら、ヌーナン症候群の診断基準の改定と診療ガイドライン策定をめざす。本年度は現在日本で保険収載遺伝子には含まれていない新規原因遺伝子についてその病原性について文献的考察を行うと共に、主に成人期にヌーナン症候群に合併報告が蓄積してきた脊髄神経根の腫大について文献的考察を行った。

A. 研究目的

ヌーナン症候群は、低身長、心疾患・骨格異常・軽度の精神遅滞や発達障害を示す先天異常症候群である。ヌーナン症候群の原因としてRAS/MAPKシグナル伝達経路の複数の分子に変異が同定されてきたが、まだ原因不明の患者は存在し、現在も新規原因遺伝子が同定され報告されている。本研究では、日本における遺伝子診断による表現型の検討を行いながら、ヌーナン症候群の診断基準の改定と診療ガイドライン策定をめざす。

B. 研究方法

1) 最近同定された原因遺伝子陽性患者の表現型の検討と文献的考察

日本における保険収載されている Noonan 症候群の原因遺伝子は以下の 9 個になっている（PTPN11, SOS1, RAF1, RIT1, KRAS, NRAS, SHOC2, CBL, BRAF）、遺伝学的検査に組み込まれていない遺伝子、あるいはごく最近同定された新規原因遺伝子について、日本人における遺伝子同定状況と、ClinGen Expert Panel における検討結果と（Grant et al. Human Mutation, 2018）照らし合わせて文献的な考察を行った。

2) CQ の設定

ヌーナン症候群の診断基準や診療ガイドラインの改訂に必要と考えらる CQ を設定した。

3) 成人期のヌーナン症候群の合併症について文献的考察を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得ている（承認番号(2021-1-271)）。

C. 研究結果

1) 最近同定された原因遺伝子陽性患者の表現型の検討と文献的考察

昨年度に引き続き、日本の保険収載遺伝子に入っておらず、最近同定された Noonan 症候群原因遺伝子についての文献的考察を行った。

RRAS2 : RRAS2 は RAS subfamily のメンバーであり、HRAS と 55% のホモロジーを有する。これまではその somatic 変異が固形がんあるいは JMML に同定されていた。2019 年に当グループと、ヨーロッパのグループでは、これまでに変異が同定されていない Noonan 症候群において、RRAS2 の遺伝子変異を初めて同定し、発表した。新堀らは、3 人の患者に 3 つのバリエント（c.70_78dup [p.Gly24_Gly26dup], c.216A>T [p.Gln72His], and c.215A>T [p.Gln72Leu]) を同定した。遺伝子変異はすべて de novo の変異であり、患者の表現型は Noonan 症候群に合致していた。変異の培養細胞への導入にて GTP 活性上昇とリン酸化 ERK の活性化がみられた。さらに zebrafish の受精卵への導入により、これらの変異を導入した zebrafish は低体長であり、顎骨の角度異常を示すことが明らかになった。Capri らは、6 人の患者に 5 つのバリエント（[c.68G>T [p.Gly23Val], c.65_73dup [p.Gly22_Gly24dup],

c.70_78dup [p.Gly24_Gly26dup], c.208G>A [p.Ala70Thr], c.215A>T [p.Gln72Leu])を同定した。そのうち5つのバリエーションは *de novo* で生じていた。患者の表現型はヌーナン症候群に合致していた。遺伝子変異を細胞に導入したところ、pERKの活性化や、細胞の形態の変化や細胞骨格の変化がみられた。この2報の発表の後に、RRAS2 p.Q72Lをもつ1例が報告された。その表現型としては胎内で水頭症で気づかれ、生後は特異的顔貌、Dandy-Walker奇形、血小板減少症を呈し、Noonan症候群と診断されたが、その後白血球増加、呼吸不全などが進行し生後9週で死亡した。

MAPK1: MAPK1はRAS/MAPKシグナル伝達経路における重要な分子であるERK2をコードする遺伝子である。MottaらはNoonan症候群の表現型に類似した患者7人に7種類のMAPK1のバリエーションを同定した(c.221T>A [p.Ile74Asn], c.238D>T [p.His80Tyr], c.521C>T [p.Ala174Val], c.952G>A [p.Asp318Asn], c.953A>G [p.Asp318Gly], c.964G>C [p.Glu322Gln], c.968C>G [p.Pro323Arg])。臨床症状としては、RASopathiesに合致する部分が多いが、精神遅滞、行動異常(ADHD, 不安、攻撃的な行動)などの精神神経症状が強かった。同定された変異を培養細胞に導入したところ、EGFで刺激時のpERKの増強効果がみられた。また*C. elegans*に変異を導入したところ、形態の変化が同定された。

CDC42: 2018年にMartinelliらは発達の遅れ、特徴的な顔貌、神経発達の遅れ、免疫・血液の変化を伴うNoonan症候群類似の臨床症状を示す疾患に9種類のCDC42の遺伝子変異を同定した。CDC42はRHO familyのGTPaseであり、細胞極性やエンドサイトーシス、細胞周期の制御に関わる分子である。精製した正常、あるいは変異型のCDC42タンパク質を用いて、CDC42のeffectorであるp50GAP, PAK1, WASP, FMNL2, IQGAP1, ITSN1との結合を見たところ、その結合は低下する変異、増強する変異、基質により変化する変異があり、それらの3タイプと臨床症状の相関があることを示した。基質との結合が低下するタイプ1は感染の反復や血小板減少がみられる臨床型とされた。CDC42は巨大血小板性血小板低下症、知的障害、屈指、感音性難聴、特徴的顔貌を特徴とする先天異常症候群である武内・小崎症候群の原因ともされており、疾患スペクトラムが広いことが予測された。

これまでの原因遺伝子の検討をもとにAMEDの研究班と連携し、ヌーナン症候群の診断基準(暫定案)の作成を行った。

<参考論文>

1. Niihori T, Nagai K, Fujita A, Ohashi H, Okamoto N, Okada S, Harada A, Kihara H, Arbogast T, Funayama R, Shiota M, Nakayama K, Abe T, Inoue SI, Tsai IC, Matsumoto N, Davis EE, *Katsanis N, Aoki Y. Germline-Activating RRAS2 Mutations Cause Noonan Syndrome. *Am J Hum Genet.* 104(6):1233-1240, 2019.
2. Capri, Y., Flex, E., Krumbach, O. H. F., Carpentieri, G., Cecchetti, S., Lissewski, C., Adariani, S. R., Schanze, D., Brinkmann, J., Piard, J., Pantaleoni, F., Lepri, F. R., and 21 others. Activating mutations of RRAS2 are a rare cause of Noonan syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 104: 1223-1232, 2019.
3. Motta, M., Pannone, L., Pantaleoni, F., Bocchinfuso, G., Radio, F. C., Cecchetti, S., Ciolfi, A., Di Rocco, M., Elting, M. W., Brilstra, E. H., Boni, S., Mazzanti, L., and 38 others. Enhanced MAPK1 function causes a neurodevelopmental disorder within the RASopathy clinical spectrum. *Am. J. Hum. Genet.* 107: 499-513, 2020.
4. Martinelli et al. Functional Dysregulation of CDC42 Causes Diverse Developmental Phenotypes. *Am J Hum Genet.* 102(2):309-320, 2018.

2) CQの設定

ヌーナン症候群の診断基準や診療ガイドラインの改訂に必要と考えらるCQを検討している。これらのCQはAMEDエビデンス創出班「ヌーナン症候群類縁疾患の診断・診療ガイドライン作成に向けたエビデンス創出研究(研究代表者青木洋子)」と、共同して論文検討中である。

3) Noonan症候群の合併症としての脊髄神経根肥大についての文献的検討

臨床的にNoonan症候群(またはCFC症候群)と診断され、RASopathiesには頻度の低い合併症である神経根肥大を合併した患者においてKRAS p.Tyr71Hisを同定したが、PMP22の重複および欠失は認めなかった。その患者の臨床症状を含め報告した(Ando et al. 2021)。

ヌーナン症候群を含むRASopathies(分子診断済)と脊髄神経根肥大の報告例を調べたところ、7報で12人が報告されていた。KRAS変異を持つ症例が4人、PTPN11の変異を持つNoonan syndrome with multiple lentiginosが6人、SOS1遺伝子変異をもつ親子が2人であった。年齢は3歳から60歳であったが、20歳以上の成人が8/12人と全体の66%を占めていた。症状としては進行性の歩行障害や、末梢の感覚障害、下肢の痛みや筋力低下などが多いため、Noonan症候群と

その類縁疾患の成人期の合併症として注意する必要があると考えた。

D. 考察

現在、日本においては Noonan 症候群遺伝学的検査において、9 遺伝子 (PTPN11, SOS1, RAF1, RIT1, KRAS, NRAS, SHOC2, CBL, BRAF) を解析対象としている。2018 年に発表された ClinGen Expert Panel においても CBL を除く 8 遺伝子の評価は「definitive」であり、これらの遺伝子を遺伝子診断を用いる臨床的妥当性、臨床的有用性は得られていると考えられる。

今回の研究では最近原因遺伝子として報告された原因遺伝子について検討を行った。RRAS2 は同じ non-canonical GTPase である RIT1, RRAS などと同様に臨床症状からもほぼ典型的な Noonan 症候群と考えられる。しかしながらまだ報告されてから間もないため、陽性患者報告の蓄積を待つことが必要と考えられる。MAPK1 の変異についても RAS/MAPK シグナル伝達経路の根幹分子ではあり、その変異は活性化を示す。しかしながら臨床症状は多彩であり、その顔貌の特徴や神経症状については Noonan 症候群と重複する部分もあるが、そのスペクトラムはより広い。

CDC42 は RHO-GTPase であり、陽性患者の臨床スペクトラムはより広い印象であるが、その一部で Noonan 症候群に類似したグループが存在する可能性がある。

Noonan 症候群をもつ成人の臨床症状や自然歴は明らかではない部分も多い。その中で KRAS, SOS1, PTPN11 と複数の分子に変異をもつ患者で脊髄神経根肥大がみられたことは重要な知見と考えられる。このような神経根の肥大は NF1, NF2, あるいは Schwannomatosis などでも観察されるため、RASopathies 全体、あるいはそれと類似する疾患の診療の中で留意すべき所見と考えられた。

E. 結論

現在日本で保険収載されている原因遺伝子については患者数や機能的な解析が十分と考えられるが、それ以外の遺伝子の病原性については引き続き検討が必要である。成人のヌーナン症候群の合併症や自然歴はまだ明らかでないため、症例の蓄積と注意深いフォローが重要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ando Y, Sawada M, Kawakami T, Morita M, Aoki Y. A Patient with Noonan Syndrome with a KRAS Mutation Who Presented Severe Nerve Root Hypertrophy. **Case Rep Neurol.** 13(1):108-118, 2021.

2. Gualtieri A, Kyprianou N, Gregory LC, Vignola ML, Nicholson JG, Tan R, Inoue SI, Scagliotti V, Casado P, Blackburn J, Abollo-Jimenez F, Marinelli E, Besser REJ, Hogler W, Karen Temple I, Davies JH, Gagunashvili A, Robinson ICAF, Camper SA, Davis SW, Cutillas PR, Gevers EF, Aoki Y, Dattani MT, Gaston-Massuet C. Activating mutations in BRAF disrupt the hypothalamo-pituitary axis leading to hypopituitarism in mice and humans. **Nat Commun.** 12(1):2028, 2021.

2. 学会発表

1. Aoki Y. Noncanonical GTPases: RRAS2, RRAS, MRAS, RIT1. 7th International RASopathies Symposium: Pathways to Understanding - Expanding Knowledge, Enhancing Research and Therapeutic Discovery 2 2021年7月23日～2022年7月25日、(Web開催、国外)

2. 青木洋子、野澤明史、新堀哲也、小関道夫、リンパ管疾患と原因遺伝子 第45回 日本リンパ学会総会 シンポジウム2 2021年6月3日～2021年6月4日

3. 小野智愛、新堀哲也、深見真紀、黒澤健司、大橋博文、岡本伸彦、水野誠司、緒方勤、松原洋一、津幡真理、川村真亜子、川目裕、青木洋子 Noonan 症候群類縁疾患を有する子どもの療養生活及び養育者の心理社会的側面に関する実態調査 第45回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 2021年7月2日～2021年7月4日

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