

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

NF1の遺伝子変異の同定率ならびに変異部位・種類と表現型の相関に関する研究

研究分担者 今福信一 福岡大学医学部皮膚科

研究要旨

近年、神経線維腫症1型(Neurofibromatosis 1; NF1)の診断基準は国内外ともに改定され、臨床所見に加えて新しく遺伝子検査の結果も強く反映されることとなった。しかしながら本邦ではNF1の遺伝子検査についての研究報告はほとんどなく、特に正診率や遺伝型表現型の相関については不明な点が多い。本研究では、臨床的にNF1を強く疑う群(CNF群)、多発性にNF1としては非典型的な色素斑が見られる群(PM群)、NF1以外の遺伝性皮膚疾患を疑う群(control群)の3群を設定し、末梢血を用いて詳細に遺伝子検査を行い、前向きに解析を行なった。またCNF群の中で確定診断が得られた症例では遺伝型表現型との相関についても検討を行なった。その結果、CNF群では、*SPRED1*, *MLH1*を含めると全エクソーム解析で38家系中31家系(81.6%)に、キャピラリーシーケンス法及びマイクロアレイを併用することで35家系(92.1%)に、*NF1*及び類縁疾患の対象遺伝子の同定に至った。一方で、PM群、control群では、合計70家系のうち3家系に*NF1*遺伝子の変異が見られたが、いずれも過去の報告より「病的意義は不明」、もしくは「関連はない」と判断した。また*NF1*の病的変異の種類として、ミスセンス変異は33例中2例と少なく、その2例ともにGRD: RAS-GAP related domainにvariantが見られ、Noonan症候群様の顔貌、軽度の運動発達遅滞がみられた。今後、本邦においても遺伝子検査が保険適応される見通しであり、我々の研究結果が日本人における正診率の指標となると考えた。遺伝子型表現型については引き続き、症例の蓄積を行なっていく予定である。

A. 研究目的

本研究目的は2点で、①臨床的にNF1が疑われる症例もしくはNF1以外を疑った症例に対して全エクソーム解析並びに追加の遺伝子検査を行い、どの程度、NF1及び類縁疾患の原因遺伝子変異を検出、同定できるかを明らかにし、遺伝子検査の正診率を明らかにすること、②NF1の変異部位・種類並びに遺伝子型表現型との相関を探求すること、であった。

B. 研究方法

b-1. 対象

2021年3月以降に福岡大学病院皮膚科を受診した患者とした。それらを3群（臨床的にNF1を疑う=臨床診断基準を満たすもしくは典型的なカフェオレ斑が6個以上ある群:clinically Neurofibromatosis, CNF群、多発性に色素斑はあるがNF1としては非典型的である群:Pigmented Macule, PM群、NF1やRasopathes以外の遺伝性皮膚疾患を疑った群:control群）に分けた。末梢血を採取し、ゲノムDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて全エクソーム解析を行なった。

b-2. 検索対象の遺伝子、用いた検査法

NF1, *SPRED1*, *NF2*を含め *PTPN11*, *RIT1*, *LZTR1*, *KRAS*, *HRAS*, *SOS1*, *SOS2*, *RAF1*, *NRAS*, *BRAF*, *MAPK1*, *MAP2K2*, *MAP2K1*, *MAPK3*, *CBL*, *SHOC2*, *ACTB*, *ACTG1*, *KA T6B*, *MRAS*, *PPPICB*, *RRAS*, *GNAS*, *PHIP*, *RET*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *BRCA2*, *FANCA*, *FANCC*, *FANCG*, *ADARI*, *ABCB6*, *SASH1*, *ADAM10*, *SIAH1*, *SOX10*, *SNAI2*, *EDN3*, *EDNRB*, *MITF*, *PAX3*, *KIT*とした。CNF群の中で、上記の遺伝子変異が同定されなかつた症例に対して、キャピラリーシーケンス法並びにマイクロア

レイ検査を追加した。

b-3. バリアントの病原性の検討法

GRCh38を参照配列とし、アリル頻度が1%以上のものは除外した。既知のバリアントは Togovar, Clinvarなどのバリアントデータベースを検索した。ミスセンスバリアントについては SIFT, Polyphen-といったタンパク質の機能に与える影響を予測するスコア(in silico スコア)を評価し、ACMG ガイドラインのフレームワークに基づいて病原性を判定した。

b-4. 倫理面への配慮

本研究は福岡大学倫理委員会の承認を得て行った(承認番号 U21-02-009)

C. 研究結果

c-1. 各群における検索対象遺伝子の同定率

CNF群は40症例(38家系)、PM群は13症例、control群は57症例であった。CNF群では、全エクソーム解析後に38家系中29家系で*NF1*に変異が見られ

(1例のlikely pathogenic以外は全てpathogenic)、ほかに、それぞれ1家系に*SPRED1*と*MLH1*にpathogenicな変異がみられ、まとめると31/38家系(81.6%)に病的バリアントがみられた。PM群では、13例中1例に*NF1*遺伝子にバリアントがみられたが、病的意義不明と判断し、ほかにそれぞれ*ABCB6*と*SASH1*にもvariantがみられたが、いずれも病的意義は不明と判断した。Control群では、2例に*NF1*のバリアントが見られたが、関連はない、もしくは病的意義は不明と判断した。

続いて、CNF群で同定できなかつた8例(1例は詳細検討のため重複)について、キャピラリーシーケンス法並びにマイクロアレイ検査を行い、4例の

同定に至った。そのため CNF 群では 38 家系中 35 家系で病的遺伝子変異が確認された(92.1%)。

c-2. NF1 に病的遺伝子変異がみられた変異の種類

また NF1 の病的バリアントが得られた 33 家系を解析したところ、nonsense 変異が 11 家系(33.3%)、frameshift 変異 14 家系(42.4%)、Splicing 変異 4 家系(12.1%)、missense 変異 2 家系(6.1%)、deletion 2 家系(6.1%)であった。これらの missense 変異は、いずれも GRD 領域 (RAS-GAP-related domain) であった。

c-3. NF1 ミスセンス変異 2 例の臨床学的特徴

臨床型として、Noonan 症候群様の顔貌、軽度の運動発達遅滞がみられた。

D. 考察

過去に丸岡らは、本邦で臨床診断基準を満たした症例に対して次世代シークエンサー単独による変異を検討し、その結果、約 81% の同定率を報告している。今回の研究では、38 家系中 29 家系(76.3%)で NF1 の病的変異が同定され、その同定率に大きな差はなかった。今回の研究では、臨床的に典型的なカフェオレ斑がみられない群や NF1 を疑わない症例に対しても NF1 及び類縁疾患の遺伝子変異の検索を行っており、それらの群では病的変異は検出できなかつた。これらのことから、典型的なカフェオレ斑を臨床的に示すことは、NF1 及び類縁疾患を強く示唆していることを改めて確認し、たとえ診断基準を満たしていないくとも NF1 である可能性が高いという学説を強く支持する。

また遺伝子変異の種類については、ミスセンス変異の割合が非常に少なかった。病的ミスセンス変異がみられた 2 例に関しては、いずれも GRD 領域 (RAS-GAP-related domain) であった。

E. 結論

末梢血より採取したゲノム DNA を対象に次世代シークエンサーによる全エクソーム解析、キャピラリーシーケンス法、マイクロアレイ検査を複合することで、92.1% の NF1 及び rasopathies (*SPRED1, MLHI*) の病的変異が同定された。これまで本邦では、臨床的に疑われる症例及び臨床的に NF1 を疑わない症例の両面より同定率を検討した報告はなく、新しい知見であった。今後、本邦においても遺伝子検査が保険適応される見通しであり、我々の研究結果が日本人における正診率の指標となると考えた。遺伝子型表現型については引き続き、症例の蓄積を行なっていく予定である。

F. 健康危険情報

採血の際に疼痛、外傷性紫斑などが予想されたが、重大な健康被害の報告はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Koga M, Imafuku S. Frequency of Acne and Acne Scars in Patients with Neurofibromatosis 1. *Acta Derm Venereol.* 104, Published online 2023 Jan 10. doi

i: 10.2340/actadv.v104.18621, 2024.

2. 学会発表

今福信一：エクソームおよびマイクロサテライト解析による神経線維腫症 1 型患者の遺伝子 変異検出と表現型との相関による重症度予測 令和 5 年度厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患政策研究事業) 神経皮膚症候群および色素性乾皮症・ポルフィリン症の学際的診療 体制に基づく医療 最適化と患者 QOL 向上ための研究 第 1 回班会議 2023/7/22 Web

松田亜依、古賀佳織、古賀文二、今福信一：神経線維腫 1 型(Neurofibromatosis1:NF1)患者に生じた皮膚神経線維腫の臨床病理学的検討 第 15 回日本レックリングハウゼン病学会学術大会 2024/2/11 佐賀

古賀 文二、筒井 ゆき、今福 信一：NF1 遺伝子の変異部位・種類と表現型の相関について 令和 5 年度厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患政策研究事業) 神経皮膚症候群および色素性乾皮症・ポルフィリン症の学際的診療 体制に基づく医療 最適化と患者 QOL 向上ための研究 第 2 回班会議 2024/2/23 Web

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