

癌遺伝子関連ゲノム情報を活用した先天奇形症候群原因遺伝子の同定

●松原 洋一 ◆青木 洋子

東北大学大学院・医学系研究科・遺伝病学分野

<研究の目的と進め方>

先天奇形症候群の遺伝的要因として、種々の染色体の構造異常、インプリンティング、単一遺伝子異常などが知られているが、未だ原因不明のものも多い。原因不明の先天奇形症候群には、新生突然変異による優性遺伝性疾患の可能性が示唆されているものは少なくない。これらの原因遺伝子の探索にあたっては、染色体異常の合併例における検索や、複数の患者をもつ家系における連鎖解析が有用とされるが、いずれもきわめて稀であるため、その実施は困難である。

申請者らは2005年にHRASの生殖細胞系列(受精卵に始まり全身に存在)での変異を先天奇形症候群であるCostello症候群で同定した(Aoki et al., *Nature Genetics*, 2005)。それに引き続き2006年にcarcio-facio-cutaneous (CFC)症候群の原因がKirsten-RAS (KRAS), B型RAFキナーゼ (BRAF)の生殖細胞系列の変異であることを世界に先駆けて報告した(Niihori, Aoki et al. *Nature Genetics*, 2006)。申請者らの発見がブレイクスルーとなり、海外のグループもNoonan症候群にSOS1・RAF-1・KRAS、CFC症候群にBRAFとMEK遺伝子変異を同定し、RAS/MAPKに異常を持つ先天異常症として疾患概念が確立した。申請者らはその後国内外の遺伝専門施設と継続して連携をとり、候補遺伝子解析と変異蛋白の生化学的解析を行い、世界に発信している。

本研究の目的は、これまで体細胞変異が数多く検出されている癌遺伝子およびそのシグナル伝達経路関連遺伝子を候補遺伝子として、未解明の先天奇形症候群の病因遺伝子を同定するための戦略について検討と実証をおこなうことにある。またHRAS遺伝子陽性のCostello症候群患者における遺伝学的背景を検索することにより、癌を発症しやすい遺伝的な背景を明らかにする。

<2008年度の研究の当初計画>

1) 候補遺伝子の選定

癌遺伝子の変異データベースを対象に、これまでに知られている遺伝子機能、そのシグナル伝達系、その発現部位、発生過程における発現時期などから、先天奇形症候群の候補遺伝子を抽出・選定する。選定の方法としては以下のようなカテゴリーに分ける。申請者らはこのカテゴリーにしたがって40遺伝子の選定をすでに行い解析を開始している。

2) 症例の収集

新生突然変異による可能性が高い先天奇形症候群で、その発生・発達過程において過成長や特定臓器の肥大を伴うことがあるもの、腫瘍(良性・悪性)の合併が報告されているものなどを中心に、国内外の臨床遺伝専門医との共同によって検体を収集する。すでにヌーナン症候群類縁疾患については、270検体を収集済みである。

3) 遺伝子変異のスクリーニング

選定した候補遺伝子について、症例より得られた検体を対象に、順次、遺伝子変異の検索を行う。遺伝子変異の検索に当たっては、遺伝子の各エクソンと近傍イントロンのPCR増幅を行い、塩基配列を決定する。

4) 遺伝子のコピー数の検討

シーケンズにより遺伝子変異が認められなかった症例については、Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法を用いて、候補遺伝子のコピー数の増減の有無を検索する。RAS/ERKシグナル伝達経路に関与する複数遺伝子のコピー数を網羅的に検索するMLPA法は、すでにセットアップ済みである。MLPA法で異常を認めた症例については、サザンブロットィングやFISHによって確認する。

<2008年度の成果>

1) PTPN11, HRAS, KRAS, BRAF, MEK1, MEK2陰性のNoonan症候群22家系とCFC症候群30人に対してSOS1遺伝子解析を行ったところ、3世代の家系を含むヌーナン症候群2家系とCFC症候群3人に遺伝子変異を同定した。CFC症候群と診断されていた3人のうち1人は典型的なCFC症候群で、新規の3アミノ酸挿入変異が同定された。残りの2人はCFCとNoonanの中間の臨床症状を呈していた。これまでSOS1変異はNoonan症候群のみで報告されてきたが、SOS1変異がNoonan症候群からCFC症候群への広い臨床スペクトラムを持つことが明らかになった。

2) PTPN11, HRAS, KRAS, BRAF, MEK1, MEK2, SOS1遺伝子陰性の患者に対して、2007年に新たにNoonan症候群の原因遺伝子として報告されたRAF-1の遺伝子解析を行った。これまでに104人の患者を解析し、17人に8種類(うち4種類が新規変異)を同定した。同定した遺伝子変異を培養細胞で発現させ、遺伝子変異が下流のERKシグナル伝達系を活性化について、またRAF-1活性化のメカニズムについて検討中である。

3) これまでにNoonan類縁疾患250人を収集し既知の原因遺伝子PTPN11, HRAS, KRAS, BRAF, MEK1, MEK2, SOS1, RAF-1の包括的遺伝子解析を行ってきたが、いまだその40%は原因が不明である。新規候補遺伝子38分子全572エクソンを、既知の遺伝子変異陰性の48人に対して網羅的に候補遺伝子検索を開始した。現在はまだ解析途中であるが、SNPデータベースにはない遺伝子変異を14遺伝子で同定しており両親のサンプルを収集して病因か否についての検討を行っている。

<国内外での成果の位置づけ>

Human MutationにReview論文を投稿し、RAS/MAPKシグナル伝達異常に伴う疾患をRAS/MAPK症候群と呼ぶことを提唱した。また松原・青木が「第64章 HRAS and Costello syndrome」を執筆した、Oxford University Press出版のヒト発

生異常の教科書である「Inborn Errors of development」第2版が2008年に出版された。

5月にバルセロナで行われたEuropean Society of Human Genetics学会のサテライトシンポジウム「Rare disorders of MAPK pathway」と、前橋で行われた第8回国際プロテインホスファターゼカンファレンス（前橋）において青木がシンポジストとして講演した。国内の学会では、日本人類遺伝学会、日本癌学会、日本分子生物学会・生化学会合同大会のシンポジウムにて青木が発表した。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

大規模候補遺伝子検索を行った結果、同定されてきている変異はSNPデータベースにも含まれておらず、正常人DNAサンプルにも同定されない遺伝子変化がほとんどである。このような遺伝子の変化が原因として証明されるためには1)他の患者でも同じ遺伝子の異常が同定されること2)正常集団における検索で1/100以下であること3)両親の検索でde novoであること、あるいは家族性であった場合には症状と遺伝子変異が一致すること4)機能解析で正常との機能的な変化が観察されることが必要である。しかし、それぞれにおいて1)Heterogenousな疾患では共通な遺伝子変異が同定される確率が低いこと2)の場合もRare variantで有る場合には病因かSNPかという判断が難しいこと、3)ではde novoでPaternityが確定すれば病因であると結論できるものの、従来Noonan症候群(PTPN11,RAF-1,SOS1)は家族性に見られる疾患であり、年齢を減るにあたって表現型は軽微になるため、家族に変異が同定されたとしても否定するのは困難である。また4)での機能アッセイは、細胞内での限られた役割を検討するものであり、ヒトの発生時の変化を再現しているかどうか疑問が残る。

以上のように候補遺伝子検索をして同定された遺伝子変化を病因変異と結論するに当たって、検討すべきクライテリアを設定して病因遺伝子と結論していくことが重要と考えている。

<今後の課題>

- 1)上に問題点を記したように、候補遺伝子解析を継続し、同定された変異が原因変異であるか否かの検討を、両親のサンプルの解析・正常人コントロールでの解析・機能解析を合わせて行っていく。と同時に既知の遺伝子変異陰性の検体を第2次コホートとして追加し、変異が同定された遺伝子について検討を行う。また原因不明の症例についてはarray CGHを導入し、ゲノムDNAにおける微細欠失や増幅についても検討を行っていく。
- 2)RAF-1遺伝子変異の活性化メカニズムについて、引き続き研究を継続する。

<成果公表リスト>

- 1)論文
1. 0806270016 [Aoki Y](#), Niihori T, Narumi Y, Kure S, Matsubara Y. The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. Hum Mutat. (8):992-1006, 2008
2. 0806270039 [Aoki Y](#), Matsubara Y. HRAS and Costello syndrome. Inborn Errors of Development, Oxford University Press. New York, (p632-638).

3. 0806270029 [Rauen KA](#), [Hefner E](#), [Carrillo K](#), [Taylor J](#), [Messier L](#), [Aoki Y](#), [Gripp KW](#), [Matsubara Y](#), et al. Molecular aspects, clinical aspects and possible treatment modalities for Costello syndrome: proceedings from the 1st International Costello Syndrome Research Symposium 2007. Am J Med Genet A. 146:1205-1217, 2008
4. 0806270025 [Narumi Y](#), [Aoki Y](#) et al., Clinical manifestations in patients with SOS1 mutations range from Noonan syndrome to CFC syndrome. J Hum Genet. 53(9):834-41, 2008

2) データベース

www.medgen.med.tohoku.ac.jp/RasMapk_syndromes.html
にて遺伝子変異データベースを一部公開中