

# 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>

原因不明の先天奇形症候群のうち、新生突然変異による優性遺伝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。

申請者らは最近、顔貌異常・心奇形・精神遅滞を主徴とする Noonan 症候群の類縁疾患である Costello 症候群が、これまで癌遺伝子としてよく知られていた *HRAS* 遺伝子の変異によって引き起こされるシグナル伝達異常症であることを世界に先駆けて報告した (Aoki et al. *Nature Genet* 37:1038-1040, 2005)。それに引き続き類縁疾患の cardio-facio-cutaneous (CFC) 症候群の原因が同じく RAS/MAPK シグナル伝達系に存在する癌遺伝子である *KRAS*, *BRAF* であることを同定した (Niihori T et al. *Nature Genet* 38:294-296, 2006)。これらの研究によりヒト発生に癌遺伝子が重要な役割を果たしていることが明らかになった。先天奇形症候群における候補遺伝子検索の有用性が示唆されたが、類縁疾患が疑われる患者においても原因が不明である例が未だ多数存在する。

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。

## <2007 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。

### 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。

### 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

シーケンス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参与する複数遺伝子のコピー数を

網羅的に検索する MLPA のシステムを構築中である。MLPA 法で異常を認めた症例については、サザンブロットングや FISH によって確認する。

## <2007 年度の成果>

1) これまでに Noonan 症候群類縁疾患と考えられる患者全 250 サンプルを収集した。*PTPN11*, *HRAS*, *KRAS*, *BRAF*, *MEK1/2*, *SOS1* 全遺伝子の解析を行っている。2007 年に新しく Noonan 症候群に同定された *CRAF* 遺伝子も検索を行った。

遺伝子変異陽性 CFC 症候群 35 人の臨床症状 81 項目を収集し、臨床症状の詳細検討を行ったところ、これまで Costello 症候群に特徴的とされていたしわの深い手足、色素沈着、関節の過伸展が CFC 症候群の約 30% にみられ、Costello 症候群と CFC 症候群の臨床的な重複が裏付けられた。

2) 最近 Noonan 症候群 2 例で GEF (guanine-nucleotide exchange factor) の一つである *SOS1* に遺伝子変異(D308Y, E846K)を同定した。1例は3代にわたる Noonan 症候群の家系例で顔貌異常と心奇形(PS, ASD)があるが、精神遅滞や骨格異常は認めない。もう一例は孤発例で顔貌異常と心奇形(PS)、骨格異常はあるが精神遅滞は認めなかった。CFC 症候群で既知遺伝子陰性の患者を新たに収集し全 31 人で調べたところ、3人に *SOS1* 遺伝子変異が同定された。これらの結果から *SOS1* 遺伝子変異は Noonan 症候群と CFC 症候群の両方の表現型を示すことが明らかになった。

3) これまで遺伝子変異が同定されていなかった患者 84 人について、2007 年にヌーナン症候群で同定された *CRAF* の全 17 エクソンをシーケンスしたところ、13 人に遺伝子変異が同定された。これらの変異はその 90% が同一エクソンに属していることより、今後遺伝子診断に有用と考えられた。

4) これまで既知の原因遺伝子 *PTPN11*, *HRAS*, *KRAS*, *BRAF*, *MEK1/2*, *SOS1* が陰性である患者 48 人に対して、新規候補遺伝子 38 個の全 572 フラグメントをシーケンスする候補遺伝子解析を開始した。その結果これまでに報告の無い遺伝子変異を 14 遺伝子で同定した。現在病因か否かの検討を行っている。

5) *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *ERAS*, *PTPN11* のゲノムコピー数を検討するための MLPA のシステムを確立した。

## <国内外での成果の位置づけ>

RAS/MAPK シグナル伝達系に参与する癌遺伝子の生殖細胞系列変異が Costello 症候群や CFC 症候群などの先天奇形症候群の原因であることを世界に先駆けて同定したのは、私達の研究グループである。私達の研究がブレイクスルーとなり 2007 年には他グループから *SOS1*, *CRAF* の変異が同定された。現在ヌーナン類縁疾患と遺伝子変異に関する review 論文が印刷中となっているが、この中で私達はこれらの疾患を The RAS/MAPK

syndromes と呼ぶことを提唱している。

2007年7月21日に米国オレゴン州ポトマックで開催された国際シンポジウム「The 1st International Costello Syndrome Research Symposium」では私達の研究グループが招待され、plenary lectureを行うとともに座長を務めた。そこでは米国の患者団体とも交流を深めることができた。

また国内では2007年10月3-5日の日本癌学会や、12月14-16日の日本小児血液学会などで招待講演や教育講演を行った。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

研究自体は順調に進行しているものの、SOS1,CRAF 遺伝子どうていにおいては競合する他のグループに先を越される事態が生じた。特にアメリカの競合グループにおいては私達とは桁違いの潤沢な研究資金を投じて網羅的なシーケンスを行っているためと考えられる。

#### <今後の課題>

平成19年度からまた大規模に候補遺伝子検索を始めたが全エクソンの解析を完了していない。ただ解析済みの遺伝子から病因変異が疑われる異常が同定されてきているので、今後解析を進めていきたい。

#### <成果公表リスト>

##### 1. 0705081326 (論文)

Narumi Y, Aoki Y, Niihori T, Neri G, Cave H, Verloes A, Nava C, Kavamura MI, Okamoto N, Kurosawa K et al. Molecular and clinical characterization of cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome: Overlapping clinical manifestations with Costello syndrome. *Am J Med Genet A*143A:799-807, 2007.

##### 2. 0710181421 (論文)

Makita Y, Narumi Y, Yoshida M, Niihori T, Kure S, Fujieda K, Matsubara Y, Aoki Y. Leukemia in Cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome: a patient with a germline mutation in BRAF proto-oncogene. *J Pediatr Hematol Oncol.* 29(5):287-90, 2007

##### 3. 0710181426 (論文)

Nava C, Hanna N, Michot C, Pereira S, Pouvreau N, Niihori T, Aoki Y, Matsubara Y, Arveiler B, Lacombe D, Pasmant E, et al. CFC and Noonan syndromes due to mutations in RAS/MAPK signaling pathway: genotype/phenotype relationships and overlap with Costello syndrome. *J Med Genet* 44(12):763-71.

##### 4. Aoki Y, Niihori T, Narumi Y, Kure S, Matsubara Y. The Ras/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Human Mutat*, in press

##### 5. 0710181549 (プロシーディングス)

Aoki Y. HRAS gene: Structure & Function. The 1st International Costello Syndrome Research Symposium 2007. July 21, 2007. Oregon, USA