

厚生科学研究研究費補助金

脳科学研究事業

SIP1 欠損症：神経堤障害とてんかんを呈する知的障害患者の
病態解明と治療法の開発（H13-脳-011）に関する研究

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 若松 延昭

愛知県心身障害者コロニー 発達障害研究所

平成 14 (2002) 年 3 月

厚生労働省

厚生科学研究研究費補助金

脳科学研究事業

SIP1 欠損症：神経堤障害とてんかんを呈する知的障害患者の
病態解明と治療法の開発（H13-脳-011）に関する研究

平成13年度 研究班

若松 延昭 (主任研究者)	愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 遺伝学 部長
長屋 昌宏 (分担研究者)	愛知県心身障害者コロニー中央病院 院長
佐伯 守洋 (分担研究者)	国立小児病院 副院長
大井 龍司 (分担研究者)	東北大学医学部小児外科 教授
岡田 正 (分担研究者)	大阪大学医学部小児外科 教授
水田 祥代 (分担研究者)	九州大学医学部小児外科 教授
東 雄二郎 (分担研究者)	大阪大学細胞生体工学センター形態形成分野 助教授
栗原 裕基 (分担研究者)	熊本大学発生医学研究センター細胞識別分野 教授

目次

1. 総括研究報告書

SIP1 欠損症：神経堤障害とてんかんを呈する知的障害患者の病態解明と治療法の開発 (H13-脳-011)

主任研究者：若松 延昭 (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 遺伝学)

1

2. 分担研究報告書

1) ヒルシュスプルング症候群の病因遺伝子の同定

主任研究者：若松 延昭 (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 遺伝学) 9

2) 知的障害を伴ったヒルシュスプルング病の実態調査：

中部地区(東海・北陸・甲信越) 報告書

分担研究者：長屋 昌宏 (愛知県心身障害者コロニー中央病院 小児外科) 23

3) 知的障害を呈する巨大結腸症の集積とその患者の臨床型の確立

- 関東地区における調査 -

分担研究者：佐伯 守洋 (国立小児病院小児外科) 33

4) 東北・北海道地区におけるヒルシュスプルング病関連遺伝子異常検索の現状

アンケート調査報告

分担研究者：大井 龍司 (東北大学医学部小児外科) 39

5) ヒルシュスプルング病弧発例に於ける遺伝子変異について

分担研究者：岡田 正 (大阪大学医学部小児外科) 45

6) ヒルシュスプルング病に関連した SIP-1 遺伝子異常に関する

中国・四国・九州・沖縄地区の調査結果 - 第一報 -

分担研究者：水田 祥代 (九州大学大学院医学研究院小児外科) 53

7) Sip1 ノックアウトマウスの作製とその表現型の解析

分担研究者：東 雄二郎 (大阪大学細胞生体工学センター形態形成分野) 57

8) 神経堤細胞の発生分化におけるシグナル分子の役割の解析

分担研究者：栗原 裕基 (熊本大学発生医学研究センター細胞識別分野) 65

3. 研究成果の刊行に関する一覧表

69

4. 研究成果の刊行物・別刷

71

5. その他

95

1. 総括研究報告

平成13年度厚生科学研究費 総括研究報告書

SIP1 欠損症：神経堤障害とてんかんを呈する知的障害患者の病態解明と
治療法の開発 (H13-脳-011)

主任研究者：若松 延昭

(愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 遺伝学部長)

研究要旨

主任研究者らは、著明な知的障害、小頭症、特徴的な顔貌などの合併症状を伴ったヒルシュスプルング病の1症例に見られた染色体転座の転座部位（染色体2番q22）の分子遺伝学的解析により、本症の病因遺伝子が *ZFHX1B* (SIP1 をコードする) であることを初めて明らかにした。同遺伝子異常は、類似症状を呈する9症例（ヒルシュスプルング病のある3症例とない6症例）にも認められた。以上の遺伝子異常は全て *de novo* の全遺伝子欠失とナンセンスあるいはフレームシフト変異であった。一方、分担研究者の東らは、SIP1 の発見者であるベルギーの Huylebroeck と共同で SIP1 の胚発生過程での機能を解明する目的で、Sip1 のノックアウトマウスを作製した。以上の結果、①ホモの Sip1 欠損マウスは、早期（胎生 9.5～10.5 日）で致死になること、②ヒトの全ての SIP1 欠損症例には、片側のアレルからの遺伝子産物が消失して症状が出現するハプロ不全が見られることより、SIP1 が脳と神経堤の関与する様々な器官（臓器）の形成に必須であることが明らかになった。本症は、今回のヒルシュスプルング病に関するアンケート調査でもかなりの症例数が報告され、ヒルシュスプルング病がない症例とまだ見つからないミスセンス変異のある症例を考慮すると、*ZFHX1B* は症候性知的障害の主病因遺伝子であると考えられる。今後、SIP1 の脳形成における標的遺伝子の同定、あるいは栗原らが神経堤細胞研究用に作製したトランスジェニックマウスを用いた研究により、SIP1 の脳を含めた様々な器官の発生・分化に及ぼす影響が分子レベルで解明されると期待される。従来、Goldberg-Schprintzen 症候群といわれていた本症は、*ZFHX1B* が病因遺伝子として同定されて以来、ヒルシュスプルング症候群として、疾患概念が確立した (MIM 235730)。

A. 研究目的

知的障害 (精神遅滞: mental retardation) は、① IQ (知能指数)が 70 以下、② 意志伝達、家庭生活、社会的/対人的技能など 11 項目の内 2 項目以上の領域で現在の適応機能の欠陥、③18 歳以下の発症、と定義され(American Association on Mental Retardation: AAMR, 1992)、全人口の 2-3%に認められる。現在、1000 以上の知的障害が何かの遺伝子異常により発症すると指摘されている (OMIM)。しかし、その約半数は未だ病因遺伝子が明らかでない。その理由の一つに、発達障害の中には、突然変異 (優性遺伝) により発症し、重篤な症状を呈する症例が多く存在することが挙げられる。同疾患では、症例の症状が重篤なために、同じ遺伝子異常を有する子孫が存在する可能性が少なく、従来、家系内発症の遺伝病の解析に用いられる連鎖解析等の手法が病因遺伝子の同定に有効でない。しかし、このような合併症を呈する重篤な知的障害 (症候性知的障害) の病因遺伝子は、まれに症例に出現する染色体の転座や微細な染色体欠失などの染色体の構造異常に注目すれば、同定が可能な場合がある。症候性知的障害の病因遺伝子を明らかにすることは、脳のみならず合併症状の見られる他の器官の発生分化における、同遺伝子の作用機序を分子レベルで理解する上で極めて重要である。

主任研究者 (若松) は分担研究者 (長屋) と、愛知県心身障害者コロニー (以下、愛知県コロニー) 中央病院で加療している未だ病因が解明されていない数多くの知的障害症例の臨床像と染色体異常の有無について詳細に検討を行った。その結果、著明な知的障害にヒルシュスプルング病、先天性心奇形、特徴的な顔貌などの神経堤障害と小頭症が見られる 5 症例 (以下、ヒルシュスプルング症候群) の中の 1 症例に染色体 2 番 q22(2q22)と 13 番 q22(13q22)の間に相互転座を見出した。一方、ヒルシュスプルング症候群は、1981 年の Goldberg と Schprintzen の報告以来、世界各国から報告されており、その後の研究により海外の 2 症例には 2q22-23 の小欠失が認められている。以上の研究背景により、愛知県コロニーの転座症例の 2q22 の転座部位に本症の病因遺伝子が局在している可能性が考えられたので、同症例の分子遺伝学的解析を開始した。一方、大阪大学の東らは、SIP1 (Smad-interacting protein 1) の発見であるベルギーの Huylebroeck と共同で SIP1 の胚発生過程での機能を解明する目的で、Sip1 のノックアウトマウスを作製していた。その後、我々の研究によりヒルシュスプルング症候群の病因遺伝子が SIP1 をコードする ZFH1B 遺伝子 (以下、ZFH1B)

であることが明らかになったので、SIP1 欠損症の臨床型の確立と Sip1 欠損マウスを用いての SIP1 (Sip1) の脳および神経堤の発生・分化における作用を分子レベルで明らかにすることを目標に本研究班が組織された。今後3年間に① SIP1 欠損症の臨床像の確立、②脳および神経堤の関与する器官形成における SIP1 の標的遺伝子 (蛋白質) の解明、③SIP1 のシグナル伝達の関与する知的障害の同定と、④Sip1 欠損ヘテロマウスを用いた治療の試みを目指す。

B. 研究方法

1) 愛知県コロニーで加療、療育をおこなっている患者の中から、11 症例のヒルシュスプルング症候群が認められた。著明な知的障害、小頭症、特徴的な顔貌、運動発達遅滞は全症例に共通に認められ、5 症例にヒルシュスプルング病、9 症例にてんかん、5 症例に先天性心奇形が認められた。ヒルシュスプルング病の見られる 5 症例の中の 1 症例 (症例 1) に 2q22 と 13q22 の相互転座が認められたので、この 5 症例について病因遺伝子の同定を開始した。以下の順に分子遺伝学的解析を行った。①海外で報告されている 1 例のエンドセリン変換酵素 1 (*ECE1*) 欠損症例が、この 5 症例と知的障害を除く症状が類似していたので、*ECE1* の解析を行った。②海外の症状が極めて類似している 2 症例に 2q22-23 の部分欠失が認められたので、2q22 と 13q22 で相互転座の認められる症例 1 の 2q22 の転座部位を FISH にて詳細に解析した。③上記の研究により *ZFHX1B* (SIP1) が病因遺伝子であることが明らかになったので (C. 研究結果を参照)、ヒルシュスプルング症のない 6 名の患者についても *ZFHX1B* の解析を行った。*ZFHX1B* の解析は、対象となる各症例よりゲノム DNA を抽出した後に、*ZFHX1B* を構成している 10 個のエクソンと各々のエクソン/イントロン接合部を含む領域を PCR で増幅、精製し、直接シーケンス法で解析した。以上の遺伝子解析は、代諾者である両親のインフォームドコンセントの得られた症例から抽出した末梢血 DNA を用いて行われた。本研究は、愛知県コロニーの倫理規定に基づいており、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) を厳守している。

2) SIP1 の胚発生過程での機能 (固体の発生・分化における役割) を明らかにする目的で、ジーンターゲティング法を用いて Sip1 欠損マウスを作製する。この際、組織特異的あるいは時期特異的な Sip1 遺伝子破壊を行えるように、

その第7エクソン (ヒトの第8エクソンに相当) を欠失させるように Cre-loxP 組み換え系を導入した。次に Cre recombinase を発現している EIIa-Cre マウスと交配し、その子孫から、第7エクソンを欠失させたヘテロ変異マウスを単離する (東、分担報告書を参照)。さらに、ヘテロ変異個体を交配させることにより、ホモ変異個体を作製し、その表現型を観察する。

3) 各分担研究者が①東北・北海道地区、②関東地区、③中部地区、④近畿地区、⑤中国・四国・九州・沖縄地区を担当し、同地区の主要小児外科施設に以下のような内容の調査票 (アンケート用紙)を送付した。アンケート用紙の原案は主任研究者が作製した。各分担研究者は、担当地区の状況に応じて原案を一部改変したのを使用した。項目は、ヒルシュスプルング病の症例数、そのうち知的障害の見られる症例数、小頭症を伴った症例数、特徴的な顔貌を伴った症例数などである。中部地区のアンケートに使用した用紙を試料として掲載する。回答のいただいた各施設に関しては、同施設が含まれる地区のアンケートの集計結果を送付し、謝辞と同時に今後の本症の臨床研究の参考になるように配慮した。

4) エンドセリン1 (ET-1) の欠損マウスの所見がヒルシュスプルングがないヒルシュスプルング症候群の症状に類似しているので、ET-1 シグナルの標的となる神経堤細胞の同定と単離できるシステムを開発することにより、神経堤幹細胞の分化誘導機構研究への広い展開を目指した。

C. 研究結果の概要

1) ヒルシュスプルング症候群の病因遺伝子の同定

①ヒルシュスプルング病のある5名の症例には、*ECE1* 変異は認められなかった。

②症例1の2q22の転座は、*KIF5C* と *Cyclin T2* の約7 Mb (現在~15 Mb) の間で起こっていた。FISHによりその間の約5 Mbに染色体欠失を同定した。同部に局在する *ZFX1B* に注目して、他の4例の遺伝子解析を行った結果、3例からナンセンスあるいはフレームシフト変異を同定した (Nat Genet, 2001)。

③さらに、ヒルシュスプルング病のない6例のヒルシュスプルング症候群からも同遺伝子の変異を同定した。以上の10症例からの変異はすべて *de novo* の染色体欠失とナンセンスあるいはフレームシフト変異であった (Am J Hum Genet, 2001)。

2) Sip1 ノックアウトマウスの作製

①ジーンターゲット法を用いて第 7 エクソンのない Sip1 欠損マウスを作製した (Genesis, 2002)。

②マウス同士を交配させてホモ変異マウスを作製し、その表現型を観察した。その結果、ホモ変異胚では、胎生 8.75 日でおこる turning が起こらず、さらに神経の閉鎖も見られず、胎生 9.5 から 10.5 日で致死となった。

③ヘテロ変異マウスに関しては、現在、交配により純系化している。

3) ヒルシュスプルング症候群の実施調査

本アンケート調査は、画一的な全国調査ではなく、各分担研究者の意向を尊重して施行している。したがって、まだ調査は完了していないが、現時点では以下のような結果を得た。①回答のいただいた小児外科の専門医療施設 104、②ヒルシュスプルング病症例の総数 3,805 のうち、③知的障害を呈する症例 69、④小頭症を呈する症例 27、⑤特徴的な顔貌を呈する症例 44 であった。主任研究者に直接遺伝子解析の依頼のあった 3 症例を加えると、41 例が本症と考えられた。

4) ET-A 受容体プロモーターに GFP をつないだトランスジェニックマウスの作製

神経堤の神経堤細胞のマーキング、単離同定、特異的遺伝子導入のために上記マウスを作製した。

尚、上記研究結果の詳細に関しては、各分担研究報告を参照されたい。

D. 考察

重度知的障害 (IQ 35 以下) を呈する発達障害の病因遺伝子は、ほとんど解明されていない。愛知県コロニーの症例を例にあげると、重度知的障害の症例の中には多くの症候性知的障害が認められる。今回、我々は 2q22 と 13q22 に転座の見られる症例から、ヒルシュスプルング症候群の主要な病因遺伝子、*ZFH1B* (*SIP1*)、を初めて同定した。本遺伝子は当初予想した以上に、脳を含めた様々な器官 (臓器) の形成に重要な役割を行っていると考えられる。その理由は、①ヒルシュスプルング病のない著明な知的障害の症例からも同遺伝子変異が同定された。②ホモの Sip1 欠損マウスは、早期 (胎生 9.5~10.5 日) で致死になる。③ヒルシュスプルング症候群の症例から同定された *ZFH1B* 変異は、すべて *de novo* のナンセンスあるいはフレームシフト変異である。さら

に、④ヒトの変異が最も多く分布している第8エクソンに相当するマウスの第7エクソンを取り除いた *Sip1* ヘテロマウスでは、*Sip1* の量が半分に低下していたことより、ヒトでは器官形成期の SIP1 が半分に低下するだけで、必ず著明な知的障害が発症すると推定された（ハプロ不全）。脳形成における SIP1 の作用機序（分子機構）を解明するために、まず SIP1 の標的となる蛋白質の同定が望まれる。さらに、SIP1 の神経堤の関与する器官形成の分子メカニズムを解明するために、ET-A 受容体プロモーターに GFP をつないだトランスジェニックマウスを用いた研究も重要である。

今回のアンケート調査では、全ヒルシュスプルング病症例の1%以上がヒルシュスプルング症候群である可能性が指摘された。しかし、①ヒルシュスプルング症候群の中には、ヒルシュスプルング病のない症例が多く存在すること、②主任研究者に遺伝子解析の依頼のある小児科のヒルシュスプルング病の術後の症例の中にも、小児外科医が手術時に本症候群の特徴である小頭症や特徴的な顔貌に気づいていないことがあること、③ミスセンス変異の症例が未だ見つかっていないことより、*ZFHX1B* に異常の見られる知的障害の症例は、多数存在すると考えられる。今後、個々の症例について臨床像の検討と *ZFHX1B* の遺伝子解析が望まれる。

E. 結論

- 1) 著明な知的障害を呈するヒルシュスプルング症候群の主病因遺伝子は *ZFHX1B* (SIP1) である。
- 2) *ZFHX1B* にナンセンスあるいはフレームシフト変異の見られるヒルシュスプルング症候群では、著明な知的障害、小頭症、特徴的な顔貌、運動発達遅滞が全症例に共通に見られ、ヒルシュスプルング病、てんかん、先天性心奇形は必ずしも全症例に認められなかった。
- 3) ホモの *Sip1* 欠損マウスは、早期（胎生 9.5~10.5 日）で致死になった。ヘテロの *Sip1* 欠損マウスは現在、純系を作製中であるが、多様な所見が出現すると予想される。
- 4) 日本では、調査可能な全ヒルシュスプルング病症例の1%以上にヒルシュスプルング症候群が存在すると推定された。

補遺：ヒトの *ZFH1B* のコードする蛋白質を SIP1 と表記した。マウスの同蛋白質は、*Sip1* と表記した。さらに、*ZFH1B* は SIP1 遺伝子とも記載されている。

F. 研究発表 (本研究に関する原著論文)

1. Wakamatsu, N., Yamada, Y., Yamada, K., Ono, T., Nomura, N., Taniguchi, H., Kitoh, H., Mutoh, N., Yamanaka, T., Mushiake K., Kato, K., Sonta, S., Nagaya, M.: Mutations in SIP1, encoding Smad interacting protein-1, cause a form of Hirschsprung disease. *Nat. Genet.* 27: 369-370, 2001.
2. Yamada, K., Yamada, Y., Nomura, N., Miura, K., Wakako, R., Hayakawa, C., Matsumoto, A., Kumagai, T., Yoshimura, I. Miyazaki, S., Kato, K., Sonta, S., Ono, H., Yamanaka, T., Nagaya, M., Wakamatsu, N.: Nonsense and frameshift mutations in ZFH1B, encoding Smad-Interacting protein 1, cause a complex developmental disorder with a great variety of clinical features. *Am. J. Hum. Genet.* 69: 1178-1185, 2001.
3. Higashi, Y., Maruhashi, M., Nelles, L., Van de Putte, T., Verschueren, K., Miyoshi, T., Yoshimoto, A., Kondoh, H., Huylebroeck, D.: Generation of the floxed allele of the SIP1 (Smad-interacting protein 1) gene for Cre-mediated conditional knockout in the mouse. *Genesis* 32, 82-84, 2002.

2. 分担研究報告

厚生科学研究費（脳科学研究事業）
分担研究報告書

ヒルシュスプルング症候群の病因遺伝子の同定

主任研究者：若松 延昭

（愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 遺伝学部長）

研究協力者：山田 憲一郎、山田 裕一

（愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 遺伝学）

研究要旨

小児外科の代表的な疾患であるヒルシュスプルング病には、まれに知的障害、小頭症、特徴的な顔貌を呈する症例が認められる（以下、ヒルシュスプルング症候群）。これらの症例では、神経堤（ヒルシュスプルング病、先天性心奇形、頭部形成）と脳（知的障害、てんかん、運動発達遅滞、小頭症）の発達障害が見られ、両者の発生・分化に関与する遺伝子の異常により本症が発症すると考えられる。われわれは、中央病院で加療している 200 例以上のヒルシュスプルング病の症例の中に認められた 5 症例のヒルシュスプルング症候群について、平成 11 年より病因遺伝子の同定を開始した。海外で報告されている 2 症例に染色体 2 番 q22-23 (2q22-23)の部分欠失が認められたので、2q22 と 13q22 に転座の見られる中央病院の 1 症例の 2q22 の転座部位に注目して、分子遺伝学的解析を行った。この症例では転座と同時に 2q22 部位に約 5 Mb の染色体欠失が認められ、ZFHX1B 遺伝子（以下、ZFHX1B）を含めて 3 個の遺伝子が、同欠失部位にマップされていた。そこで、ZFHX1B の遺伝子解析を他の 4 症例について行った結果、3 症例に遺伝子異常を認めた。さらに、ヒルシュスプルング病がない以外同一症状を呈する中央病院の 6 症例からも ZFHX1B の遺伝子異常を同定した。以上、ヒルシュスプルング症候群から同定された ZFHX1B は、様々な神経堤障害を呈する知的障害の主要な病因遺伝子であることが明らかになった。

A. 研究目的

愛知県心身障害者コロニー中央病院では、開設以来 31 年間に小児外科の長屋らにより約 200 例のヒルシュスプルング病の症例が加療されている。その中の 5 症例には、通常認められない知的障害、小頭症、特徴的な顔貌と運動発達遅滞が共通に認められた。さらに 4 症例には先天性心奇形とてんかんも見られた。このようなヒルシュスプルング症候群の病因遺伝子は、腸管神経節細胞、頭部、心大血管等の形成に関与する神経堤と脳の発生・分化に重要な役割を行っていると考えられるが、今だ明らかになっていない。そこで、本症の病因遺伝子の同定を目的として、中央病院の 5 症例の分子遺伝学的解析を行う。さらに、中央病院の小児科で加療している類似症状を呈する症例についても、ヒルシュスプルング症候群と同一の遺伝子異常で発症しているか否かを明らかにする。

B. 研究方法

愛知県コロニーで加療している 11 症例に、著明な知的障害、小頭症、特徴的な顔貌、運動発達遅滞が共通に認められ、5 症例にヒルシュスプルング病、8 症例にてんかん、5 症例に先天性心奇形が認められた。その中の 1 症例には 2q22 と 13q22 で相互転座が認められた。まず、その中のヒルシュスプルング病の見られる 5 症例が、共通の遺伝子異常により発症している可能性が考えられたので、同患者の病因遺伝子の同定を開始した。①近年、ヒトの疾患遺伝子の同定あるいはノックアウトマウスを用いた研究により、エンドセリン 1 とその受容体であるエンドセリン A 受容体の異常では、胎生期の顔面・頭部と心大血管の形成異常 (cephalic と cardiac 神経堤障害) が、エンドセリン 3 とその受容体であるエンドセリン B 受容体の異常ではヒルシュスプルング病と皮膚の白斑 (vagal と trunk 神経堤障害) が発症することが明らかになった。対象となる 5 症例では、cephalic、cardiac と vagal 神経堤障害が見られ、両エンドセリンの合成に必須なエンドセリン変換酵素 1 の異常が疑われたので、同遺伝子 (*ECE1*) の解析を 5 症例について行った。②症状が極めて類似している海外の 2 症例に 2q22-23 の部分欠失が認められたので、2q22 と 13q22 で相互転座の認められる 1 症例の 2q22 の転座部位を FISH にて詳細に解析した。③上記の研究により *ZFHX1B* (*SIP1*) が病因遺伝子であることが明らかになったので (C. 研究結果を参照)、ヒルシュスプルング病の認められない 6 症例についても *ZFHX1B* の

解析を行った。*ZFHX1B* の解析は、対象となる各症例よりゲノム DNA を抽出した後に、*ZFHX1B* を構成している 10 個のエクソンと各々のエクソン/イントロン接合部を含む領域を PCR で増幅、精製し、直接シーケンス法で解析した。以上の遺伝子解析は、両親のインフォームドコンセントの得られた症例より抽出した末梢血 DNA を用いて行われた。本研究は、愛知県コロニーの倫理規定に基づいており、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) を厳守している。

C. 研究結果

- ① ヒルシュスプルング病のある 5 症例のヒルシュスプルング症候群には、*ECE1* 変異は認められなかった。
- ② 脳に発現している 5 個の cDNA を用いて FISH を行った結果、症例 1 の 2q22 の転座は、*KIF5C* と *Cyclin T2* の約 7 Mb (現在、~15 Mb) の間で起こっていた (図 1)。次に、同領域を詳細に解析するために RP11-BAC クローンを用いて FISH を行った。その結果、本症例には 2q22 の D2S129 と D2S151 の間に約 5 Mb の染色体欠失が存在することが明らかになった。当時、同欠失部には *KYNU*、*Pro0159*、*ZFHX1B* の 3 個の遺伝子がマップされていた (図 2)。*ZFHX1B* に注目して他の 4 症例について遺伝子解析を行い、症例 3 を除く 2 症例よりナンセンス変異 (549 番目と 695 番目のアルギニンが終止コドンになった、Arg549Stop と Arg695Stop) を、1 症例よりフレームシフト変異 (AACAA:1173-1176 の 4 塩基欠失) を同定した (図 3, 表 1, 症例 2, 4, 5)。以上より、*ZFHX1B* (*Smad-interacting protein 1* : SIP1 をコードする) がヒルシュスプルング症候群の病因遺伝子であることが初めて明らかになった。
- ③ ヒルシュスプルング病を除くと他の症状は上記症例と著しく類似している症例が中央病院で加療されている (表 1, 症例 6-11)。そのうちの 4 症例には、便秘が認められた。これらの症例が *ZFHX1B* 変異により発症しているか否かを明らかにするために、同遺伝子の解析を行った。その結果、3 症例に既知の Arg695Stop のナンセンス変異と他の 3 症例にそれぞれ異なったフレームシフト変異を同定した (図 4, 表 1)。

D. 考察

我々は、ヒルシュスプルング病の見られる 5 症例のヒルシュスプルング症

候群の分子遺伝学的解析を行い、4 症例が *ZFHX1B* の異常により発症することを初めて明らかにした。ヒルシュスプルング病のない 6 症例の同症候群の患者からも *ZFHX1B* 変異を同定した。全症例が *de novo* のナンセンスあるいはフレームシフト変異により発症していた。変異の同定された 10 症例のうち 7 症例にてんかんが 4 症例に先天性心奇形が認められた。Arg694Stop 変異は、ヒルシュスプルング病が発症している 1 症例と発症していない 3 症例より同定された。そのヒルシュスプルング病のない 2 症例には先天性心奇形も見られなかった。この様に、SIP1 欠損症では、著明な知的障害、小頭症、特徴的な顔貌、運動発達遅滞が臨床症状の中核として全症例に出現し、他のヒルシュスプルング病、てんかん、先天性心奇形は様々な組み合わせで発症することが明らかになった。同一の変異 (Arg695Stop) でも臨床症状に広がりが見られる事は、遺伝子異常以外の因子、たとえば胎生期の環境等、が症状に影響を及ぼしていると推測された。今後、未だ同定されていないミスセンス変異の見られる症例を含めたさらに多くの症例の *ZFHX1B* と臨床症状の解析により、SIP1 の脳および神経堤の関与する器官の発生・分化における役割が明らかになると考えられる。

E. 結論

弧発例のヒルシュスプルング症候群の主要な病因遺伝子が *ZFHX1B* であることを明らかにした。同定した変異はすべて *de novo* のナンセンスあるいはフレームシフト変異であった。従って、同遺伝子異常のある症例では、器官形成期に SIP1 の発現が半分に低下していると考えられる (ハプロ不全)。半分に低下することで、このような多様な症状が出現することは、SIP1 が脳と神経堤の関与する器官の発生・分化に重要な役割を行っていることを示している。

F. 研究発表

原著論文

1. Yamada, K., Yamada, Y., Nomura, N., Miura, K., Wakako, R., Hayakawa, C., Matsumoto, A., Kumagai, T., Yoshimura, I., Miyazaki, S., Kato, K., Sonta, S., Ono, H., Yamanaka, T., Nagaya, M., Wakamatsu, N.: Nonsense and frameshift mutations in *ZFHX1B*, encoding Smad-Interacting protein 1, cause a complex developmental disorder with a great variety of clinical features. *Am. J. Hum. Genet.* 69: 1178-1185, 2001.

2. Yamada, Y., Miura, K., Kumagai, T., Hayakawa, C., Miyazaki, S., Matsumoto, A., Kurosawa, K., Nomura, N., Taniguchi, H., Sonta, S., Yamanaka, T., Wakamatsu, N.: Molecular analysis of Japanese patients with Rett syndrome: Identification of five novel mutations and genotype-phenotype correlation. *Hum. Mutat.* (Online#443) 18: 253, 2001.
3. Wakamatsu, N., Yamada, Y., Yamada, K., Ono, T., Nomura, N., Taniguchi, H., Kitoh, H., Mutoh, N., Yamanaka, T., Mushiake K., Kato, K., Sonta, S., Nagaya, M.: Mutations in SIP1, encoding Smad interacting protein-1, cause a form of Hirschsprung disease. *Nat. Genet.* 27: 369-370, 2001.

ミニレビュー

1. 若松延昭：てんかんと神経堤障害を呈する知的障害患者の病因遺伝子の決定。
日本神経精神薬理学会誌 21: 63-67, 2001.

学会発表

(国内)

1. 三浦清邦, 熊谷俊幸, 大木隆史, 松本昭子, 宮崎修次, 早川智恵美, 山田裕一, 孫田信一, 若松延昭：MECP2 遺伝子異常を伴うレット症候群の臨床症状について。日本小児神経学会（岡山）2001.6.8.
2. 山田憲一郎, 山田裕一, 野村紀子, 山口久美子, 若松延昭：精神運動発達遅滞、てんかん、巨頭症、便秘を呈する伴性劣性疾患の遺伝子座の決定。日本人類遺伝学会（さいたま）2001.10.4.
3. 山田裕一, 山田憲一郎, 野村紀子, 孫田 信一, 山中 昺, 長屋昌宏, 若松延昭：知的障害、てんかん、運動発達遅滞と様々な神経堤発達障害を呈する ZFX1B 欠損症。日本人類遺伝学会（さいたま）2001.10.5.
4. 山田憲一郎, 山田裕一, 小野教夫, 野村紀子, 谷口寛子, 鬼頭浩史, 武藤宣博, 山中 昺, 虫明亨祐, 加藤兼房, 孫田信一, 長屋昌宏, 若松延昭：知的障害、てんかん、特徴的な顔貌と先天性心奇形を合併した Hirschsprung 病の病因遺伝子の同定。日本生化学会（京都）2001.10.28.
5. 山田裕一, 三浦清邦, 熊谷俊幸, 早川知恵美, 宮崎修次, 松本昭子, 野村紀子, 孫田信一, 山中 昺, 若松延昭：レット症候群における MECP2 遺伝子変異と臨床症状。日本生化学会（京都）2001.10.28.

6. 若松延昭, 山田憲一郎, 小野教夫, 山田裕一, 孫田信一, 山中 勳, 長屋昌宏: 多様な神経堤発達障害を呈する ZFHX1B 欠損症. 日本分子生物学会, ワークショップ「心臓大血管形成の分子生物学」(横浜) 2001.12.11.
7. 山田裕一, 山田憲一郎, 野村紀子, 孫田信一, 山中 勳, 長屋昌宏, 若松延昭: 多様な神経堤発達障害を伴う精神運動発達遅滞 (ZFHX1B 欠損症) の遺伝子解析. 遺伝性疾患の生殖・遺伝学研究会 (名古屋) 2001.12.15.
8. 三浦清邦, 熊谷俊幸, 大木隆史, 長屋昌宏, 山田裕一, 孫田信一, 若松延昭, 山中 勳 2: SIP1 欠損症の 2 幼児例. 東海臨床遺伝・代謝懇話会 (名古屋) 2002.2.5.
9. 山田裕一, 野村紀子, 若松延昭, 小笠原信明, 谷口敦夫, 鎌谷直之: 新しく同定された Lesch-Nyhan 症候群の遺伝子変異. 日本痛風・核酸代謝学会 (神戸) 2002.2.8.
10. 藤井達哉, 宮嶋智子, 伊藤正利, 柴田実千代, 熊倉 啓, 鬼頭敏幸, 奥野武彦, 山田裕一, 若松延昭: 2 つの遺伝子変異を持ち診断に苦慮したレット症候群の 1 例. 日本小児神経学会近畿地方会 (高槻) 2002.3.30.

(国際学会)

1. Yamada, K., Yamada, Y., Nomura, N., Miura, K., Wakako, R., Hayakawa, C., Matsumoto, A., Kumagai, T., Yashimura, S., Miyazaki, S., Kato, K., Sonta S., Ono, H., Yamanaka, T., Nagaya, M., Wakamatsu, N.: Nonsense and frame-shift mutation in *ZFHX1B*, encoding Smad interacting protein-1, cause a complex developmental disorder with a variety of neurocristopathies. The American Society of Human Genetics, Annual Meeting (San Diego USA) 2001.10.13.
2. Yamada, Y., Miura, K., Kumagai, T., Ohki, T., Hayakawa, C., Miyazaki, S., Matsumoto, A., Nomura, N., Sonta S., Yamanaka, T., Wakamatsu, N.: MECP2 gene analysis in Japanese patients with classical and variant Rett syndromes and with Rett-like features. The American Society of Human Genetics, Annual Meeting (San Diego, USA) 2001.10.13.

研究班会議

1. 若松延昭, 長屋昌宏: 愛知県コロニーの症例からの ZFHX1B (SIP1) 欠損症. 平成 13 年度厚生科学研究 (脳科学研究事業、H13-脳-011) 第 1 回班会議 (名

古屋) 2001.10.9.

2. 山田憲一郎, 山田裕一, 若松延昭: 神経堤障害を伴った知的障害の ZFH1B 変異. 平成 13 年度厚生科学研究 (脳科学研究事業、H13-脳-011) 第 2 回班会議 (名古屋) 2002.3.2.

講演

1. 若松延昭: SIP1 欠損症: 神経堤障害とてんかんを呈する知的障害患者の病態解明と治療法の開発. 厚生科学研究費「脳科学研究」事前評価委員会 (東京) 2001.4.19.
2. 若松延昭: ヒトの遺伝子と遺伝子異常. 愛知県コロニー中央病院講演会 (コロニー) 2001.5.10.
3. 若松延昭: てんかんと多様な神経堤発達障害を呈する知的障害 (ZFH1B 欠損症) の遺伝子異常. 小児内分泌遺伝症例検討会 (名古屋) 2001.7.7.
4. 若松延昭: 多様な臨床症状を呈する症候性知的障害: ZFH1B (SIP1) 欠損症の遺伝子異常. 名古屋大学臨床小児科セミナー (名古屋) 2001.9.7.
5. 若松延昭: 遺伝病について. 愛知県コロニー中央病院学習会 (コロニー) 2001.9.13.
6. 若松延昭: 多様な脳・神経堤発達障害を呈する ZFH1B 欠損症. 国立精神・神経センター神経研究所セミナー (小平) 2001.10.3.
7. 若松延昭: 知的障害を伴う神経堤発達障害の病因遺伝子の解明. 新潟大学神経内科懇話会, 椿神経疾患研究基金平成 13 年度研究助成報告 (新潟) 2001.11.17.
8. 若松延昭: 多様な神経堤障害を伴った脳発達障害: ZFH1B (SIP1) 欠損症. 福井医大第 2 内科研究セミナー (福井) 2001.12.17.
9. 若松延昭, 山田憲一郎, 山田裕一: 知的障害を呈する神経堤発達障害の病因遺伝子の同定と機能解析. 文部科学省特定領域研究 (C) 「先端脳」平成 13 年度班会議 (東京) 2001.12.20.

新聞報道

1. 朝日新聞: 知的障害遺伝子を特定 2001.3.30.
2. 毎日新聞: 知的障害解明に手がかり「病因関連の遺伝子を発見」2001.3.30.
3. 読売新聞: ヒルシュスプルング病「知的障害など発現遺伝子も」2001.3.30.

4. 中日新聞：知的障害やてんかん「病因遺伝子見つける」2001.3.30.
5. 日刊工業新聞：巨大結腸症の発症「たんぱく質異常が原因」2001.3.30.
6. 河北新報：てんかんなどの発達障害「原因遺伝子発見」2001.4.9.
7. 名古屋タイムズ：知的障害の病因遺伝子を発見「海外から高い評価」
2001.4.11.