

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

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-こころ-018）に関する研究

平成 14 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 15 (2003) 年 3 月

厚生労働省

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

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-こころ-018）に関する研究

平成14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
草深 竹志 (分担研究者)	大阪大学医学部小児外科 助手
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-こころ-018)	
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) HSCR-MR 症候群の臨床像と ZFHX1B 遺伝子変異	
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) 中部地区 (東海・北陸・甲信越) の集計と新たに SIP1 異常が同定された 3 症例について	
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)	19
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 SIP1 欠損症の現状 (第二次アンケート調査中間報告)	
分担研究者：大井 龍司 (東北大学医学部小児外科)	37
5) 近畿地区における SIP1 異常に関連したヒルシュスプルング病の実態調査、 ならびに Sip ヘテロ欠失マウスにおける腸管壁内神経について	
分担研究者：草深 竹志 (大阪大学医学部小児外科)	43
6) ヒルシュスプルング病に関連した SIP1 遺伝子異常に関する中国・四国・九州・ 沖縄地区の調査結果 (第二報)	
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)	55
7) 初期胚神経組織形成過程における転写制御因子 SIP1 の機能	
分担研究者：東 雄二郎 (大阪大学大学院生命機能研究科)	61
8) HSCR-MR 症候群モデル (Sip1 ヘテロ欠失) マウスの表現型と 脳内発現遺伝子の解析	
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)	67
9) 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)	77
3. 研究成果の刊行に関する一覧表	81
4. 研究成果の刊行物・別刷	83
5. その他	115

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
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-こころ-018）

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

著明な知的障害、運動発達遅滞、小頭症、特徴的な顔貌にてんかん、先天性心疾患、ヒルシュスプルング病が多様に合併する SIP1 欠損症は優性遺伝を呈し、Hirschsprung Disease-Mental Retardation (HSCR-MR) 症候群の中の 1 疾患である。本年度は国内外から依頼のあった症例について、SIP1 をコードする ZFHX1B 遺伝子 (ZFHX1B) の変異解析を倫理委員会の承認のもとに行った。これまでに 19 症例から変異を同定し、典型例の 18 症例からナンセンスあるいはフレームシフト変異が同定された。知的障害が中等度の 1 症例からは 1 アミノ酸欠失が同定された。一方、臨床的には HSCR-MR 症候群と診断されているが ZFHX1B 変異が同定されない症例や染色体検査にて 2q22 近傍の染色体欠失が同定され、先天性心疾患などの合併症の見られる重症の症例については、PCR あるいはマイクロサテライトを用いて解析し、各症例の染色体欠失の有無とその領域を決定した。その結果、典型例の 3 症例から約 200 kb から 2 Mb の ZFHX1B を含む欠失を同定した。さらに染色体欠失が染色体検査により同定されている 2 症例には、2q23 に及ぶ約 9.5 Mb と 12 Mb の欠失が認められた。このことは、①典型例の SIP1 欠損症の中には、ZFHX1B を含む 2q22 に欠失が見られる症例が存在し、②典型例より重篤な先天性心疾患や顔面の正中形成不全の見られる症例では 2q22 と同時に 2q23 にも欠失があり、症例に見られる重篤な症状の発症に関与する遺伝子が 2q23 に存在していると考えられた。以上の多様な SIP1 欠損症の臨床像と遺伝子異常の関係については、二次アンケート調査で SIP1 欠損症が疑われる症例を含めた多数の症例の解析により、さらに明らかになると考えられる。

一方、ヒト SIP1 欠損症のモデルとして作成された Sip1 欠失変異マウスの解析も行われた。Sip1 ホモ欠失変異胚では、頭部を含めた全領域において神経

管が閉じないという表現型が観察され、胎生 (E) 9.5~10.5 日において致死であった。更に種々のマーカー遺伝子を用いた解析により、1) *Sox2* の神経板における発現の低下、2) 神経板や神経管の神経上皮細胞における E-cadherin の過剰発現、3) 頭部の遊走する神経堤細胞の減少と頸部での神経堤細胞の消失を認め、*Sip1* が初期胚における神経組織形成や神経堤細胞の正常な発生に必須であることが明らかになった。SIP1 の標的となる神経堤細胞が、同様に頭部神経堤細胞の発生と分化に重要な役割をしている ET-1 (エンドセリン1) のシグナル標的細胞と同一か否か、SIP1 と ET-1 が神経堤細胞を標的として共通のシグナルを有するのかは、遺伝子改変マウスを用いて可能であり、神経堤細胞の機能を理解する上で重要である。さらに、*Sip1* ヘテロ欠失変異マウスでは、純系化した ICR 系統の全マウスに脳梁欠損が出現した。しかし、C57BL/6J 系統のマウスでは脳梁欠損が見られなかった。前者の E15.5 における終脳の遺伝子発現の解析により、E-cadherin の過剰発現を同定した。今後、ジーンチップ等を用いたマウス終脳での網羅的解析が重要であり、同解析により SIP1 欠損症に見られる知的障害の分子病態が明らかになると考えられる。

A. 研究目的

重度 (超重度) の知的障害 (精神遅滞: mental retardation) は、IQ (知能指数) が 35 以下と定義され、全知的障害の約 1/3 を占める。重度の知的障害は、運動発達遅滞、先天性心疾患などの合併症がよく見られ、発生初期から発現している遺伝子の異常が病因と考えられる。主任研究者らは、合併症を呈する重度の症候性知的障害の 1 病因遺伝子が Smad-Interactin Protein 1 (SIP1) をコードする *ZFH1B* 遺伝子 (*ZFH1B*) であることを明らかにした。本年度は、①症候性知的障害の *ZFH1B* の解析を倫理委員会の承認のもとで行い、臨床像と *ZFH1B* の関係を明らかにする。②昨年に引き続いて二次アンケート調査を行い、ヒルシュスプルング病の合併した SIP1 欠損症の発症頻度と臨床像を明らかにする。③*Sip1* ホモ欠失変異マウス (胚) の解析を行い、胎生期の神経組織形成や神経堤細胞の発生における SIP1 の機能を明らかにする。④*Sip1* ヘテロ欠失変異マウスの表現型と終脳の解析を行い、SIP1 欠損症に見られる症状、特に知的障害の分子病態を明らかにする。⑤ET-1 下流シグナルの胚発生における分子機能を解析するために、ET-1 シグナル標的細胞の同定および単離システム (遺伝子改変マウス) を開発する。

B. 研究方法

- 1) 国内外からの依頼により SIP1 欠損症が疑われる症例の *ZFHXB* 変異を倫理委員会の承認のもとに同定する。各症例について *ZFHXB* の 10 個のエクソンを一部のイントロンとともに PCR で増幅し、直接シーケンス法で塩基配列を決定した。
- 2) 欠失が同定されない症例と染色体検査で欠失が明らかな症例については、PCR とマイクロサテライト解析により欠失の有無とその領域を決定した。
- 3) 昨年アンケート調査で SIP1 欠損症が疑われた症例について、更に詳細な情報を提供頂くために二次アンケート調査を行った。
- 4) マウス発生過程における *Sip1* 遺伝子の発現パターンを whole mount *in situ* hybridization により経時的に調べるとともに *Sip1* ホモ変異個体を作製し、その表現型を観察した。同時に同固体における神経組織形成異常についてより詳細な解析を行うために、種々のマーカー遺伝子の、野生型およびホモ変異個体における発現パターンの解析も行った。
- 5) *Sip1* ヘテロ欠失変異マウスの表現型を解析するために ICR と C57BL/6J の 2 系統のマウスと戻し交配を 7 回以上繰り返した。頭部の解析は出生時 (P0) に、脳については E15.5 と E17.5 で KB 染色を行い解析した。E15.5 の終脳から total RNA を抽出し、RT-PCR 法で発現遺伝子の定量を行い、野生型と比較した。
- 6) ET-1 下流シグナルの胚発生における分子機能を解析するために、その受容体である ETAR 遺伝子プロモーターによって蛍光蛋白 GFP が発現するトランスジェニックマウスを作成した。

C. 研究結果の概要

- 1) 19 症例中 18 症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。中等度の知的障害を呈する 1 症例からは 1 アミノ酸欠失 (N99del) を同定した。18 症例全てに重度の知的障害、運動発達遅滞、特徴的顔貌が見られ、てんかんとヒルシュスプルング病は約半数に、先天性心疾患は約 1/3 に見られた。脳梁の完全欠損が 4 例に見られ、6 例以上の症例で脳梁が細くなっていることが観察された。
- 2) 2 次アンケート調査により、各分担地区より 2 名以上のヒルシュスプルン

グ病を伴う SIP1 欠損症と考えられる症例が同定された（分担報告書を参照）。

- 3) ヒルシュスプルング病を伴う HSCR-MR 症候群の 3 症例より *ZFHX1B* を含む約 200 kb から 2 Mb に及ぶ欠失を同定した。
- 4) 典型例より重篤な先天性心疾患や顔面の正中形成不全の見られる症例では 2q22 と同時に 2q23 にも欠失があり、症例に見られる重篤な症状の発症に関与する遺伝子が 2q23 に存在していると考えられた。
- 5) *Sip1* ホモ欠失変異胚では、頭部を含めた全領域において神経管が閉じないという表現型が観察され、胎生 (E) 9.5~10.5 日において致死であった。更に種々のマーカー遺伝子を用いた解析により、1) *Sox2* の神経板における発現の低下、2) 神経板や神経管の神経上皮細胞における E-cadherin の過剰発現、3) 頭部の遊走する神経堤細胞の減少と頸部での神経堤細胞の消失を認め、SIP1 が初期胚における神経組織形成や神経堤細胞の正常な発生に必須であることが明らかになった。
- 6) *Sip1* ヘテロ欠失変異マウスでは、純系化した ICR 系統の全マウスに脳梁欠損が出現した。しかし、C57BL/6J 系統のマウスでは脳梁欠損が見られなかった。前者の E15.5 における終脳の遺伝子発現の解析により、E-cadherin の過剰発現を同定した。
- 7) ET-1 の標的細胞をマーキングするため、その受容体である ETAR 遺伝子プロモーターによって蛍光蛋白 GFP が発現するトランスジェニックマウスを作成した。さらに、ETAR 遺伝子プロモーターによってトリレトロウイルス受容体 TVA が発現するトランスジェニックマウスも作成し、マウスには感染しないトリレトロウイルスを ET-1 の標的細胞に特異的に感染させることが可能になった。

D. 考察

重度の知的障害、運動発達遅滞、特徴的な顔貌にてんかん、先天性心疾患、ヒルシュスプルング病が多様に合併して見られる典型例の SIP1 欠損症には、SIP1 をコードする *ZFHX1B* にナンセンスあるいはフレームシフト変異が見られる症例と *ZFHX1B* を含む 2q22 近傍に染色体欠失がある症例が存在する。欠失領域が広がるほどハプロ不全により新たな症状が出現すると考えられるが、2q22 近傍の欠失の広さと臨床型の関係は明らかにされていない。そこで、主

任研究者らは典型例で *ZFHXB* に変異が同定されない症例と染色体検査で 2q22-23 の欠失があり典型例に見られる症状に加えて顔面正中部の形成不全と著明な先天性心疾患が見られる 2 症例の欠失の有無とその領域を決定した。SIP1 欠損症の典型的な症状を呈する 3 症例から新たに *ZFHXB* 含む約 0.2 から 2 Mb の欠失が同定されたが、いずれも欠失は 2q22 に限局していた。一方、重度の先天性心疾患などの合併症が見られる症例では、欠失が 2q23 にまで及んでいた。このことは、両者の非重複領域の 2q23 にハプロ不全により症状が出現する（優性遺伝を呈する）遺伝子が存在する可能性を示唆している。この 2 症例に共通する 2q23 の欠失部位（*ACVR2* から *CACNB4* までの 4.5 Mb）が特に注目される。その領域内の遺伝子の中で *ARHE* (RAS homolog gene family, member E) は、RhoE と呼ばれてラット p190RhoGAP 蛋白質と結合する蛋白質としてイーストの 2 ハイブリッド法を用いて単離された (Foster ら, 1996)。哺乳動物の細胞内で RhoE を過剰発現されると細胞内のアクチンの重合、インテグリンによる局所接着 (focal adhesion) などが阻害され、細胞が丸くなる。以上の結果より、RhoE はアクチンの重合や細胞接着の負の調節因子 (negative regulator) であり、本遺伝子の欠損では細胞の遊走障害が強く示唆され、合併症に関与している可能性が高い。

一方、*Sip1* ホモ欠失変異胚を用いた解析では、1) 終脳を含む前頭部の形態形成に重要な *fgf8* の発現と *otx2* の発現が低下していたことより *SIP1* が終脳を含む前頭部の形態形成に重要な役割を担っている。2) 頭尾軸全体にわたって神経管が閉じず、胚盤葉上層 (epiblast) からの神経板形成に伴って、その神経板で消失すべき E-cadherin の発現が持続し、逆に神経板から頭部及び神経管で発現が維持される *sox2* の発現が、*Sip1* ノックアウトマウス胚においては野生型と比較して低下していた。3) 神経堤細胞で発現し、その増殖と分化において重要な役割を担っている *sox10* の発現が、特に頭部および脳梁部において *Sip1* の発現と極めて類似しており、頭部での *sox10* の発現は野生型と比較して同程度～やや減少していたが、遊走する神経堤細胞がほとんど観察されなかった。また、頸部 (vagal) での *sox10* の発現は全く消失していた。以上の結果より、*Sip1* が神経堤および神経板から神経管の正常な発生および分化に必須であることが明らかになった。ET-1 (エンドセリン 1) 下流のシグナルも胚発生、特に頭部神経堤細胞の発生と分化に必須であり、1) *SIP1* のシグナル標的細胞と ET-1 の標的細胞が同一か否か、2) *SIP1* と ET-1 が神経堤細胞を標的として

共通のシグナルを有するのかは、神経堤細胞の機能を理解する上で重要である。今後、ETAR 遺伝子プロモーターによって蛍光蛋白 GFP が発現するトランスジェニックマウス等を用いて両者の関係が明らかになると期待される。一方、Sip1 ヘテロ欠失変異マウスの解析により、同マウスの表現型は、1) 成長の遅延が見られる、2) ICR 系統では、全てに脳梁欠損が出現するという点で SIP1 欠損症に類似していたが、SIP1 欠損症に見られる特徴的な顔貌、ヒルシュスプルング病は明らかでなく、軽症と考えられた。注目すべき点は、純系化した C57BL/6J 系統のヘテロ欠失変異マウスでは、脳梁欠損が全く見られなかったことである。この差違は、おそらく両者の遺伝的背景の違いに基づくと考えられる。ICR の終脳で著明に発現が増加している E-cadherin などの遺伝子の発現が C57BL/6J の終脳でも同様に上昇しているか否かを解析することが重要である。両者に明らかな差があれば、その遺伝子が脳梁欠損に関与している可能性が高い。そのためにジーンチップを用いた網羅的な解析が必要であり、現在進行中である。

E. 結論

- 1) 重度の知的障害、運動発達遅滞、特徴的な顔貌などの典型的な SIP1 欠損症の症状は *ZFHX1B* のナンセンスあるいはフレームシフト変異だけでなく、*ZFHX1B* を含む 2q22 の欠失症例にも見られる。
- 2) *ZFHX1B* を含む欠失が 2q23 にまで及んでいる症例では、SIP1 欠損症に見られる症状以外に顔面の正中形成不全と著明な先天性心疾患が出現し、2q23 にこれらの発症に関与する遺伝子の存在が考えられた。
- 3) Sip1 ホモ欠失変異胚は、早期（胎生 9.5~10.5 日）で致死になった。各種のマーカー遺伝子を用いた解析により、Sip1 が神経堤および神経板から神経管の正常な発生および分化に必須であることが明らかになった。
- 4) Sip1 ヘテロ欠失変異マウスは、小型（成長遅延）であり、ICR 系統のマウス全てに脳梁欠損が出現したが、C57BL/6J 系統のマウスでは脳梁欠損は全く見られなかった。前者の終脳、脳梁形成前の E15.5 の遺伝子発現の解析では、E-cadherin が 2 倍以上に増加していた。異常に増加している他の遺伝子の同定と後者の終脳で発現している遺伝子との比較が重要である。
- 5) ET-1 下流シグナルの胚発生における分子機能を解析するために、ET-1 シグナル標的細胞の同定および単離システム（遺伝子改変マウス）を開発した。

同システムを用いて、神経堤幹細胞の分化誘導機構研究への広い展開が可能になった。

F. 研究発表 (本研究に関する原著論文)

1. Nagaya M, Kato J, Niimi, N, Tanaka S, Wakamatsu N: Clinical feature of a form of Hirschsprung's disease caused by a novel genetic abnormality. *J Pediatr Surg* 37: 1117-1122, 2002.
2. Yoneda M, Fujita T, Yamada Y, Yamada K, Fujii A, Inagaki T, Nakagawa H, Kishikawa M, Shimada A, Nagaya M, Azuma T, Kuriyama M, Wakamatsu N: Late infantile Hirschsprung disease-mental retardation syndrome with a 3-bp deletion in *ZFHX1B*. *Neurology* 59: 1637-1640, 2002.
3. Van de Putte T, Maruhashi M, Francis A, Nelles L, Kondoh H, Huylebroeck D, Higashi Y: Smad interacting protein-1 (*Zfhx1b*) deficient mice reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiology of Hirschsprung disease - mental retardation syndrome. *Am J Hum Genet* 73, 465-470, 2003.
4. 若松延昭, 長屋昌宏: ヒルシュスプルング症候群. *ゲノム医学* 2: 259-264, 2002.
5. 東雄二郎, 若松延昭: *zfhx1* ファミリーとその欠損症. *生化学* 75: 27-36, 2003.

2. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

HSCR-MR 症候群の臨床像と ZFH1B 遺伝子変異

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）

石原 尚子 （名古屋大学大学院 医学研究科 小児科）

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、Hirschsprung disease-Mental retardation：HSCR-MR 症候群）。これらの症例では、神経堤（ヒルシュスプルング病、先天性心疾患、特徴的な顔貌）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、本症は両者の分化と発達に関与する遺伝子の異常により発症すると考えられる。我々は、突然変異（優性遺伝）により発症する本症の病因遺伝子が Smad-Interacting Protein 1 (SIP1) をコードする ZFH1B 遺伝子 (ZFH1B) であることを明らかにした。典型例の SIP1 欠損症では、重度の知的障害、運動発達遅延、特徴的な顔貌、小頭症にてんかん、先天性心疾患、ヒルシュスプルング病が様々な合併していた。国内外の SIP1 欠損症が疑われる症例の ZFH1B 解析を倫理委員会の承認を得て行い、現在までに 19 症例から遺伝子異常を同定した。典型例の 18 症例からナンセンスあるいはフレームシフト変異が同定された。知的障害が中等度の 1 症例からは 1 アミノ酸欠失が同定された。一方、臨床的には HSCR-MR 症候群と診断されているが ZFH1B 変異が同定されない症例や染色体検査で 2q22 近傍の染色体欠失が同定され、先天性心疾患などの合併症の見られる重症の症例については、PCR などを用いて各症例の染色体欠失の有無とその領域を決定した。その結果、典型例の 3 症例から約 200 kb から 2 Mb の ZFH1B を含む欠失を同定した。さらに染色体欠失が同定されている 2 症例には、2q23 に及ぶ約 9.5 Mb と 12 Mb の欠失が認められた。従って、①典型例の

SIP1 欠損症の中には、*ZFH1B* 変異の見られる症例と *ZFH1B* を含む 2q22 に欠失が見られる症例が存在する。②典型例より重篤な先天性心疾患や顔面の正中形成不全の見られる症例では 2q22 と同時に 2q23 にも欠失があり、症例に見られる重篤な症状の発症に関与する遺伝子が 2q23 に存在していると考えられた。

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、特徴的な顔貌が認められた。さらに 4 例には先天性心奇形とてんかんも見られた。このような HSCR-MR 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正常な形成に重要な役割を行っていると考えられる。我々は、突然変異（優性遺伝）により発症する本症の病因遺伝子が Smad-Interacting Protein 1 (SIP1) をコードする *ZFH1B* 遺伝子 (*ZFH1B*) であることを明らかにした。本年度は、国内外の SIP1 欠損症が疑われる症例の *ZFH1B* 解析を倫理委員会の承認を得て行い、臨床型と *ZFH1B* 変異の関係を明らかにする。

B. 研究方法

突然変異（優性遺伝）により発症する本症の病因遺伝子が SIP1 をコードする *ZFH1B* であることを報告して以来、国内より 33 症例、国外より 6 症例の *ZFH1B* の解析依頼が来ている。愛知県コロニー発達障害研究所の倫理委員会で遺伝子解析の承認を得て同遺伝子の解析を行った。

1. *ZFH1B* の 10 個のエクソンを一部のイントロンを含めて PCR で増幅した後、直接シーケンス法で塩基配列を決定し、変異の有無を検討した。2. *ZFH1B* に変異の同定されない症例では、PCR あるいはマイクロサテライト解析により *ZFH1B* を含む染色体の欠失の有無を検討した。3. 染色体検査ですでに 2q22 を含む欠失の見られた重度の発達障害の症例についても (2) と同様に欠失の領域を決定した。

C. 研究結果

1. 19 症例から *ZFH1B* 変異を同定した (表 1)。18 例の典型例からはナンセ

ンスあるいはフレーム変異が同定された。簡単な会話が可能な中等度の知的障害の症例からは、1アミノ酸欠失 (N99del) が同定された。典型例全例に著明な知的障害、運動発達遅滞と特徴的な顔貌が見られた。Hirschsprung病とてんかんは約半数に先天性心疾患は約 1/3 の症例に認められた。脳梁欠損 (脳梁低形成を含む) も約半数に認められた。

2. 新たに典型的な SIP1 欠損症状を呈する 3 症例 (P3, P19, P27) より 0.2 Mb から 2.2 Mb の染色体欠失を同定した。ZFHX1B 同定の契機となった症例 1 (P1) を含めて 4 症例の欠失領域を図 1 に示す。症例 1 の欠失領域が他の 3 症例の欠失領域を含んでいた。3 症例の欠失断点部位を含む BAC クローンは以下の通りである。症例 (セントロメア側, テロメア側) : P3 (95O9, 107E5); P19 (107E5, 699O7); P27 (CTD2252, 474G7)。
3. 典型例の SIP1 欠損症に見られる症状に著明な先天性心疾患などの合併症が見られる 2 症例から 2q22-23 の欠失を同定した。症例 23 は、出生時の身長 44.0 cm、体重 1,968 g、頭囲 27.8 cm (小頭症) であり、出生直後より排便、排ガスを認めず、哺乳も不可であった。著明な発達遅滞とともにファロー四徴症が見られ、顔面中央部が陥凹していた。頭部 MRI では、小脳低形成と脳梁欠損も認めた。検査で Hirschsprung 病と診断され、5 ヶ月で人工肛門造設術施行した。1 歳 8 ヶ月で Duhamel-池田 (GIA) 法による根治術裂を行った。1 歳 10 ヶ月時に鎖骨下動脈肺動脈吻合術を施行した。染色体検査で 2q22 近傍の欠失を認めた。症例 30 は、妊娠中に羊水過多を認め、胎児エコーにて先天性心疾患を疑われた。在胎 38 週、2848 g、帝王切開にて出生した。心疾患の加療目的で小児循環器科に入院し、心エコーにて右側大動脈弓、両大動脈右室起始症、肺動脈閉鎖、共通房室弁逆流、左室低形成、心室中隔欠損、心内膜床欠損、卵円孔開存、左動脈管開存と診断された。小頭症、口蓋裂と特徴的な顔貌が見られた。注腸検査：S 状結腸の拡張より Hirschsprung 病が疑われた。染色体検査で 2q22-23 が欠失していた。この 2 症例の欠失領域を(2)と同様の方法で決定した。症例 23 に約 9.5Mb、症例 30 に約 12 Mb の ZFHX1B を含む欠失が認められた (図 2)。2 症例の欠失断点部位を含む BAC クローンは以下の通りである。症例 (セントロメア側, テロメア側) : P23 (107E5, 157M22); P30 (186C15, 454E6)。

D. 考察

出生直後より著明な精神運動発達遅滞と Hirschsprung 病、特徴的な顔貌などの神経堤障害が見られる典型例の SIP1 欠損症は、本年度の研究により SIP1 をコードする *ZFHX1B* 変異（ナンセンスあるいはフレームシフト）と 2q22 近傍の *ZFHX1B* を含む染色体欠失で発症する事が明らかになった。一方、SIP1 欠損症に見られる症状に顔面正中部の形成異常と重篤な先天性心疾患が合併した症例では、染色体欠失が *ZFHX1B* を含む 2q22 から 2q23 まで及んでいる事が明らかになった。前者（SIP1 欠損症と同じ症状が見られる）と後者（SIP1 欠損症以外の症状が合併している）の非重複領域である 2q23 に重篤な合併症状に関与する遺伝子の存在が示唆される。P23 と P30 に共通な 2q23 の欠失部位、ACVR2 から CACNB4 までの 4.5 Mb、が特に注目される。その領域内の遺伝子の中で *ARHE* (RAS homolog gene family, member E) は、RhoE とも呼ばれてラット p190RhoGAP 蛋白質と結合する蛋白質としてイーストの 2 ハイブリッド法を用いて単離された (Foster ら, 1996)。RhoE は全ての組織で発現が見られる。RhoE は GTP に結合するが内在性の GTPase 活性はない。哺乳動物の細胞内で RhoE を過剰発現されると細胞内の actin 重合、integrin による局所接着 (focal adhesion) などが阻害され、細胞が丸くなる。以上の結果より、RhoE は actin 重合や細胞接着の負の調節因子 (negative regulator) と考えられる。本遺伝子の欠失変異マウスは作成されていないので、ヒトのハプロ不全で症状が出現するか否か不明である。しかし、RhoE 欠損では細胞の遊走障害が強く示唆されるために、P23 と P30 に認められた合併症に関与している可能性が高い。さらに、ACVR2 (activin A receptor, type II) のホモ欠失変異マウスでは、口蓋の融合不全が一部のマウスに出現するので、本遺伝子が関与している可能性もある。今後、顔面の正中構造の形成異常や重篤な先天性心疾患の見られる症例の中に 2q23 の小欠失が認められれば、さらに合併症の病因遺伝子を限定できると考えられる。

E. 結論

SIP1 をコードする *ZFHX1B* を含む 2q22 に欠失がある症例には、SIP1 の遺伝子異常（ナンセンス変異とフレームシフト変異）により発症する HSCR-MR 症候群に見られる症状と同じ症状が見られるので、2q22 領域にはハプロ不全により著しい症状が出現する遺伝子は *ZFHX1B* 以外には存在しないと考えられる。一方、2q22-23 に染色体欠失が見られる症例では、SIP1 欠損症に出現する症状

以外に顔面の正中構造形成不全と重篤な先天性心疾患が合併していた。従って、2q23 にハプロ不全で発症する遺伝子が存在する可能性が高い。その領域内には、細胞の遊走に関している *RhoE* がある。同遺伝子を含めた個々の遺伝子の研究により 2q23 に存在する優性遺伝の病因遺伝子が同定されることが考えられる。

F. 研究発表

原著論文

1. Nagaya M, Kato J, Niimi, N, Tanaka S, Wakamatsu N: Clinical feature of a form of Hirschsprung's disease caused by a novel genetic abnormality. *J Pediatr Surg* 37: 1117-1122, 2002
2. Yoneda M, Fujita T, Yamada Y, Yamada K, Fujii A, Inagaki T, Nakagawa H, Kishikawa M, Shimada A, Nagaya M, Azuma T, Kuriyama M, Wakamatsu N: Late infantile Hirschsprung disease-mental retardation syndrome with a 3-bp deletion in *ZFX1B*. *Neurology* 59: 1637-1640, 2002.

総説, 報告

1. 若松延昭, 長屋昌宏: ヒルシュスプルング症候群. *ゲノム医学* 2: 259-264, 2002.
2. 東雄二郎, 若松延昭: *zfx1*ファミリーとその欠損症. *生化学* 75: 27-36, 2003.
3. 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. *痛風と核酸代謝* 27: 36, 2002.

学会発表

(国内)

1. 三浦清邦, 熊谷俊幸, 大木隆史, 山田裕一, 孫田信一, 若松延昭: 遺伝子診断により早期に確定診断した Rett 症候群の 3 例. 日本小児科学会東海地方会 (名古屋) 2002.5.12.
2. 若松延昭: 多様な脳・神経堤発達障害を呈する SIP1 欠損症. 特別講演, 多摩小児神経懇話会 (府中) 2002.5.18.
3. 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, 水野誠司, 山田裕一, 孫田信一, 若松延昭, 山中 勲, 長屋昌宏: SIP1 欠損症の中核神経症状について. 日本小児神経学会 (仙台) 2002.6.28.

4. 若松延昭：多様な臨床症状を呈する Hirschsprung Disease-Mental Retardation 症候群の病因遺伝子. シンポジウム「Hirschsprung 病の基礎と臨床」, 日本小児病理研究会 (東京) 2002.9.7.
5. 山田裕一, 山田憲一郎, 石原尚子, 野村紀子, 三浦清邦, 熊谷俊幸, 大木隆史, 大屋一博, 瀬川昌巳, 三牧正和, 米田誠, 長屋昌宏, 若松延昭：神経堤障害を伴う知的障害、ヒルシュスプルング病-MR 症候群の ZFX1B 変異. 日本人類遺伝学会 (名古屋) 2002.11.14.
6. 石原尚子, 山田憲一郎, 山田裕一, 三浦清邦, 加藤純爾, 桑原直樹, 長屋昌宏, 若松延昭：2q22-23 の部分欠失を有する SIP1 欠損症 3 症例の臨床像と遺伝子異常. 日本人類遺伝学会 (名古屋) 2002.11.14.
7. 山田憲一郎, 小野教夫, 大木隆史, 石原尚子, 三浦清邦, 熊谷俊幸, 山田裕一, 孫田信一, 若松延昭：染色体 6q21 と 12p13 で相互転座が見られ、重度の発達障害を呈する症例の病因遺伝子の解析. 日本人類遺伝学会 (名古屋) 2002.11.14.
8. 山田憲一郎, 伊藤美武, 石原尚子, 山田裕一, T. Van de Putte, 近藤寿人, D. Huylebroeck, 島田厚良, 東雄二郎, 若松延昭：Sip1 ヘテロ欠失変異マウスに見られる脳梁欠損とその分子病態. 日本分子生物学会 (横浜) 2002.12.12.
9. 水沼真紀子, 山田裕一, 山田憲一郎, 孫田信一, 若松延昭, 藤森 新：Lesch-Nyhan 症候群患者に認めた X 染色体逆位の遺伝子構造の解析. 日本分子生物学会 (横浜) 2002.12.13.
10. 石原尚子, 山田裕一, 山田憲一郎, 三浦清邦, 大木隆史, 熊谷俊幸, 加藤純爾, 桑原直樹, 小林康子, 米田誠, 長屋昌宏, 若松延昭：Sip1 欠損症の多様な臨床型と遺伝子異常. 日本分子生物学会 (横浜) 2002.12.14.
11. 山田裕一, 若松延昭, 小笠原信明：HPRT 欠損症の遺伝子解析. シンポジウム I 「先天性プリン・ピリミジン代謝異常症 -最近の進歩-」, 日本痛風・核酸代謝学会 (東京) 2003.2.13.
12. 水沼真紀子, 山田裕一, 若松延昭, 小笠原信明, 渡辺浩一, 小片展之, 山内俊一, 藤森 新：Lesch-Nyhan 症候群患者に新しく同定された転座変異の解析. 日本痛風・核酸代謝学会 (東京) 2003.2.13.

(国際学会)

1. Yamada K, Ono T, Ishihara N, Yamada Y, Ohki T, Miura K, Kumagai T, Sonta S, Wakamatsu N: A case of severe developmental delay with pharyngeal anomaly due

- to a *de novo* translocation [46, XY, t(6;12)(q16;p12)]. The American Society of Human Genetics, Annual Meeting (Baltimore, USA) 2002.10.16.
2. Yamada Y, Nomura N, Yamada K, Igarashi N, Wakamatsu N: Molecular characterization of a large genomic deletion including a part of the *HPRT* gene responsible for the Lesch-Nyhan. The American Society of Human Genetics, Annual Meeting (Baltimore USA) 2002.10.19.
 3. Ishihara N, Yamada K, Yamada Y, Miura K, Ohya K, Nakayama A, Yoneda M, Nagaya M, Wakamatsu N: Molecular characterization of *ZFHX1B* in patients with SIP1 deficiency. The American Society of Human Genetics, Annual Meeting (Baltimore USA) 2002.10.18.

班会議

1. 石原尚子, 山田憲一郎, 山田裕一, 若松延昭: SIP1 欠損症の多様な臨床像: 2q22 欠失症例に見られる特異な症状について. 平成 14 年度厚生科学研究(こころの健康科学事業, H13-こころ-018) 第 1 回班会議 (名古屋) 2002.9.21.
2. 若松延昭, 東雄二郎: Sip1 ヘテロ欠失変異マウスに見られる脳異常所見について. 平成 14 年度厚生科学研究(こころの健康科学事業, H13-こころ-018) 第 1 回班会議 (名古屋) 2002.9.21.
3. 若松延昭, 石原尚子, 山田憲一郎, 山田裕一: SIP1 欠損の臨床症状を呈する 2q22-23 欠失症例の分子遺伝学的解析. 平成 14 年度厚生科学研究(こころの健康科学事業, H13-こころ-018) 第 2 回班会議研究発表会 (名古屋) 2003.2.28.
4. 山田憲一郎, 石原尚子, 山田裕一, 若松延昭: Sip1 ヘテロ欠失マウスの終脳における異常発現遺伝子の同定. 平成 14 年度厚生科学研究(こころの健康科学事業, H13-こころ-018) 第 2 回班会議研究発表会 (名古屋) 2003.2.28.

講演

1. 若松延昭: 遺伝子と遺伝病: 知的障害の病因遺伝子について. 愛知県臨床検査技師会, 遺伝子・染色体研究班講演会 (名古屋) 2002.11.23.
2. 若松延昭: 先天的遺伝子異常の研究の現状. 愛知県コロニー平成 14 年度療育関連職員研修Ⅲ (春日井) 2002.12.12.
3. 若松延昭: 知的障害の病因遺伝子の同定と分子病態解明へのアプローチ.

徳島大学大学院講義（徳島）2003.2.21.

4. 若松延昭：SIP1 欠損症：神経堤障害、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. 平成 14 年度厚生科学研究（こころの健康科学事業中間・事後評価委員会（東京）2003.3.7.

表 1. *ZFHXB* 変異を有する症例（19 例）のまとめ

<i>FHXIB</i> 変異		Clinical features	
ナンセンス変異	10 例	HSCR	10/19
フレームシフト変異	7 例	constipation	5/19
1 アミノ酸欠失	1 例	mental retardation	19/19
完全欠失	1 例	epilepsy	10/19
		microcephaly	18/19
		characteristic face	18/19
		congenital heart disease	6/19