

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 15 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 16 (2004) 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 15 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 総長
佐伯 守洋 (分担研究者)	国立成育医療センター 院長
林 富 (分担研究者)	東北大学大学院医学研究科 小児外科 教授
草深 竹志 (分担研究者)	大阪大学大学院医学研究科 小児外科 助手
水田 祥代 (分担研究者)	九州大学大学院医学研究院 小児外科 教授
東 雄二郎 (分担研究者)	大阪大学大学院生命機能研究科 助教授
栗原 裕基 (分担研究者)	東京大学大学院医学系研究科 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) ZFHX1B 遺伝子の変異解析：新たに同定された遺伝子変異

分担研究者：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) ZFHX1B 遺伝子にスプライス変異が見られる知的障害症例の分子遺伝学的解析

分担研究者：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) 13

3) 知的障害を伴った Hirschsprung 病の分析

分担研究者：長屋 昌宏 (愛知県心身障害者コロニー 総長) 17

4) HSCR を伴う SIP1 欠損 (異常) 症における直腸病変部腸筋神経叢の病理学的検討

分担研究者：長屋 昌宏 (愛知県心身障害者コロニー 総長) 23

5) 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

—Hirschsprung 病・類縁疾患における NGF/受容体系発現の検討ならびに  
当院における遺伝子異常を伴った 3 症例の臨床経過報告—

分担研究者：佐伯 守洋 (国立成育医療センター 院長) 29

6) 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報告、追加調査報告)

分担研究者：林 富 (東北大学大学院医学研究科 小児外科) 33

7) 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

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) 35

8) Sip1 欠損マウスを用いた、Sip1 の体節形成過程における機能解析

分担研究者：東 雄二郎 (大阪大学大学院生命機能研究科) 39

9) PGP9.5 の染色性から見た Sip1 ヘテロ欠失変異マウスの腸管壁内神経について

分担研究者：草深 竹志 (大阪大学大学院医学系研究科 小児外科) 43

10) Sip1 ヘテロ欠失変異マウスの神経突起(軸索)の解析

分担研究者：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) 49

11) Zfhx1b に特異的な siRNA を用いた Zfhx1b ノックダウンの試み

分担研究者：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) 53

12) 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（東京大学大学院医学系研究科 教授）	57
3. 研究成果の刊行に関する一覧表	61
4. 研究成果の刊行物・別刷	63
5. その他	71

## 1. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
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

主任研究者らが初めて同定した知的障害の1病因遺伝子、*ZFHX1B* の異常で発症する SIP1 欠損(異常)症は、突然変異で発症する先天性複合奇形症候群の1つである。症例には、著明な知的障害、運動発達遅滞、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などが多様に合併した症状が見られる。本年度も国内外からの依頼に応じて12症例の *ZFHX1B* 解析を行い、4症例から新たにナンセンス、フレームシフト変異 (285fs293X、431fs432X、E609X、860fs862X) を、2症例から *ZFHX1B* を含む染色体欠失を同定した。さらに、眼間解離、高口蓋と指の変形を伴った中度知的障害の症例から、第7イントロンに変異(916+6T>G)を同定した。本症例の末梢血 *ZFHX1B* mRNA の解析では、第7エクソンがスキップした異常 mRNA が見られた。第7イントロンの変異を含むキメラ遺伝子を用いた発現実験により、同変異があると正常の *ZFHX1B* mRNA の発現量が約30%に低下することが明らかになった。症例では片側のアリルに同変異があるので、正常の *ZFHX1B* mRNA が正常人の約65 (50+30/2) % に低下していると推測された。この15%の正常 *ZFHX1B* mRNA の増加が重度知的障害を呈する典型例に比べて、症状の軽症化(中度知的障害)に関与していると考えられる。分担研究者の二次アンケート調査により SIP1 欠損(異常)症が疑われた症例の中で、インフォームドコンセントの得られた3症例について *ZFHX1B* の変異検索および欠失検索を行い、1症例に変異 (431fs432X) を、他の1症例に *ZFHX1B* を含む染色体の小欠失(332 kb)を同定した。さらに、HSCR を伴った7症例の SIP1 欠損(異常)症 (*ZFHX1B* 変異3例、欠失4例) の腸管壁内神経叢の病理学的解析を行い、欠失症例では変異症例に比べてより顕著な病変を認めた。一方、*Sip1* ホモ欠失変異個体(マウス)の解析では、新たに *Sip1* が“体節の分節化境界の成立”に関与していることが明らかになった。*Sip1* ヘテロ欠失変異マウスの解析では、約25%にヒトに発症する HSCR と類似の腸管所見が出現した。さらに、ヘテロマウスに見られる脳梁欠損(昨年度報告)の病態を DiI (P0) を用いた軸索染色、あるいは初代脳神経培養 (E15.5) にて解析し、*Sip1* が脳神経の軸索伸長(特に正中部)に重要であることを明らかにした。また、エンドセリン(ET)-1 遺伝子欠損マウスの解析では、ET-1 は神経堤細胞に作用して鰓弓の背腹軸方向のパターン形成を制御していることが証明された。*Sip1* ホモ欠失変異マウスでも鰓弓が形成されず(昨年度報告)、FGF シグナル後の鰓弓形成における両者の関連性が示唆された。

分担研究者：

長屋昌宏

愛知県心身障害者コロニー・総長  
佐伯守洋

国立成育医療センター・院長  
林 富

東北大学大学院医学研究科・教授  
草深竹志

大阪大学大学院医学研究科・助手  
水田祥代

九州大学大学院医学研究院・教授  
東雄二郎

大阪大学大学院生命機能研究科・  
助教授

栗原裕基

東京大学大学院医学系研究科・教授

#### A. 研究目的

本研究班の最終年度となる本年度は、SIP1 欠損(異常)症の臨床研究の集大成と Sip1 欠失変異マウスを用いた病態解明を研究の主目標にして以下の研究を行った。①症候性知的障害の ZFHXB 解析を行い、臨床像と ZFHXB の関係を明らかにする。②二次アンケート調査で、ヒルシュスプルング病(HSCR)の合併した SIP1 欠損(異常)症が疑われた症例の ZFHXB 解析を行う。③HSCR を伴う SIP1 欠損(異常)症の腸管神経節所見に、ZFHXB 変異症例と欠損症例との間に差異があるか否か明らかにする。④Sip1 ホモ欠失変異マウス(胚)の解析を行い、胎生期の器官形成における SIP1 の機能を明らかにする。⑤Sip1 ヘテロ欠失変異マウスの腸管壁内神経を解析し、異常の有無を明らかにする。⑥Sip1 ヘテロ欠失変異マウスの終脳の解析を行い、SIP1 欠損(異常)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。⑦神経堤細胞の分化に関わるエンドセリン 1(ET-1)の下流にあるシグナル経路や転写因子の制御機構を明らかにするとともに、ET-1 の関与する鰓弓のパターン形成についても解析する。

#### B. 研究方法

- 1) 国内外からの依頼に応じて、SIP1 欠損(異常)症が疑われる症例の ZFHXB 変異を同定する。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する。
- 2) 変異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は、PCR、マイクロサテライトなどを用いて解析し、ZFHXB を含む欠失の有無あるいは欠失領域を決定する。症状が軽い中度知的障害の症例についても ZFHXB の変異解析を行う。以上、1) と 2) 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、愛知県コロニー発達障害研究所の倫理委員会の承認を受けており、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。
- 3) HSCR を伴う SIP1 欠損(異常)症の腸管神経節を ZFHXB に変異が見られる症例群と ZFHXB が欠損している症例群に分け、神経節の平均面積、単位面積あたりの神経細胞数などを

指標に解析する。

- 4) Sip1 ホモ変異個体では、第 7 番目までの体節しか形成されないのので、同個体の体節形成過程を病理学的あるいは分子生物学的に解析を行う。
- 5) 野生型および Sip1 ヘテロ欠失変異マウスの腸管壁内神経の異常の有無を PGP9.5 染色を用いて解析する。
- 6) Sip1 ヘテロ欠失変異マウスに見られる脳梁欠損を詳細に解析するために、DiI を野生型およびヘテロマウス(P0)の脳表直下に注入し脳梁形成に関与する軸索を染色する。さらに、E15.5 の野生型およびヘテロマウスの終脳を用いて初代培養を行い、軸索伸長について解析する。
- 7) 病理学的あるいは遺伝子発現の解析の手法を用いて ET-1 遺伝子欠損マウスの表現型を解析する。Hela 細胞を用いて ET-1 シグナルの下流にあるカルパイン 6 遺伝子の分子機能を免疫細胞染色、遺伝子強制発現、siRNA の手法を用いて解析する。

### C. 研究結果の概要

- 1) 国内外からの依頼に応じて SIP1 欠損(異常)症が疑われる 12 症例の *ZFHX1B* 解析を行い、4 例から新たなナンセンス、フレームシフト変異(285fs293X, 431fs432X, E609X, 860fs862X) を、2 症例から *ZFHX1B* を含む染色体欠失を同定した。眼間解離、高口蓋と指の変形を伴った中度知的障害の 1 症例から第 7 イントロンに変異(916+6T>G)を同定した。本症例の末梢血 *ZFHX1B* mRNA には第 7 エクソンのスキッピングが見られたので、同変異を含むキメラ遺伝

子を HEK293 細胞に導入して遺伝子発現実験を行った。その結果、同変異があると正常(エキソンスキッピングのない)の *ZFHX1B* mRNA の発現量が変異のないキメラ遺伝子を導入した場合に比べて、約 30% に低下することが明らかになった。

- 2) 二次アンケート調査により、分担研究員の分担地区より SIP1 欠損(異常)症と考えられた症例の中で、インフォームドコンセントの得られた 3 例の *ZFHX1B* 変異解析を行い、1 症例に変異(431fs432X)を、他の 1 症例に *ZFHX1B* を含む染色体の小欠失(332 kb)を同定した。
- 3) HSCR を伴った 7 例の SIP1 欠損(異常)症(*ZFHX1B* 変異 3 例、欠失 4 例)の切除腸管壁内の神経叢を病理学的に解析した。欠失症例では切除標本に神経節を認めなかったが、変異症例では神経節内の神経細胞数が減少し、神経節も小さかった。以上より、変異症例では手術標本に無神経節領域を認めなかったため、症例では断端の肛門側に局限した小さい無神経節領域が残っていると考えられた。
- 4) Sip1 ホモ欠失変異胚(マウス)において、形成過程における Sip1 の発現領域を L-fringe を指標に検討すると、Sip1 は予定分節境界の尾側の第一体節分領域で強く発現していた。ホモ欠失変異胚では未分化沿軸中胚葉の領域が相対的に大きくなっていった。未分節および未分化中胚葉で発現している Tbx6 と Fgf8 の発現は、その領域が頭側に広がっていた。さらに、1 つの体節が生じる時期に発現パターンが変化する Hes7 と Delta-like1

についても同様の結果を得た。従って、Sip1 は“体節の分節化境界の成立”に関与していると考えられた。

- 5) 3匹の母マウスからE18.5の胎児を51個体得た。その内、野生型(16個体)とヘテロ(12個体)の直腸を肛門までPGP9.5免疫組織染色して解析した。その結果、3個体のヘテロマウスには、肛門近傍の直腸に壁内神経細胞が認められず(神経節の欠如)、その病変は肛門管付近の直腸遠位端から口側に向かい連続していた。従って、ヘテロマウスの約25 (3/12) %にヒトに発症するHSCRとよく似た腸管所見が出現することが明らかになった。
- 6) 野生型とヘテロマウスの脳(P0)の脳梁に関与する軸索をDiIを用いて染色を行うと、野生型では対側の半球まで強く染色された。一方、ヘテロマウスでは一部が正中を越えて対側の半球に入っていたが、大半は正中の手前で止まっていた。また、野生型とヘテロマウスの終脳(E15.5)を用いた初代脳神経細胞の培養では、後者において軸索伸長の著しい低下を認めた。以上より、Sip1は脳神経の軸索伸長(特に正中部)に重要な役割を果たしていることが明らかになった。
- 7) *ET-1*<sup>-/-</sup>マウスの上下顎の形態観察あるいは*Pitx1*、*Prx2*などの遺伝子マーカー発現の解析から、*ET-1*<sup>-/-</sup>胚の下顎は上顎の形態へのホメオティック様変化と考えられた。さらに、ET-1とETARの発現解析の結果を合わせてET-1は、ETARを介して頭部神経堤細胞に作用し、背腹軸に沿った神経堤細胞の運命決定に寄与してい

るとも考えられた。鰓弓形成におけるET-1シグナルの下流の標的遺伝子としてカルパイン6遺伝子を同定した。同遺伝子は鰓弓・心臓においてET-1シグナルの下流にあるdHANDと一致して発現し、細胞形態や増殖にも関与していた。

#### D. 考察

重度の知的障害、運動発達遅滞、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多様に合併して見られる典型例のSIP1欠損(異常)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。最近、本症はMowat-Wilson症候群とも呼ばれている。平成15年度も依頼された典型例の*ZFHX1B*解析を行い、新たに*ZFHX1B*のナンセンスおよびフレームシフト変異と*ZFHX1B*を含む欠失を6症例から同定したが、ミスセンス変異は未だ同定していない。従って、*ZFHX1B*のミスセンス変異を有する症例は上記と異なる症状を呈すると考えられる。これに関連して、本年度は*ZFHX1B*のスプライシング異常を呈する軽症例を経験した。本症例では第7エクソン/第7イントロン接合部から6番目の第7イントロンのTがGに置換していた。同変異を含むキメラ遺伝子を用いた発現実験より、同変異があると優先的に第7エクソンのスキッピングが起こり、スキッピングのない正常の*ZFHX1B* mRNAは約30%に減少していた。同変異は片側のアレルに見られるので、本症例では上記の重度知的障害の見られる典型例に比較して

SIP1 が約 15 (30/2) % 高いと考えられる。わずかに 15 % の SIP1 蛋白質量の増加が明らかでない臨床症状の改善(中度知的障害)に関与していることは興味深い。SIP1 には N 末と C 末の Zn-finger ドメイン以外に、Smad 結合ドメイン、ホメオドメイン様配列などの複数の機能ドメインがあり、各ドメインが胎生期の器官形成に多様な働きをしていると考えられる。従って、ZFHX1B にミスセンス変異がある症例では、ミスセンス変異の含まれる領域の SIP1 の機能は障害されるが、他のドメインの機能は保たれると考えられる。この点でナンセンス、フレームシフト変異で片側のアリルから作られる SIP1 蛋白質の全機能が消失する上記の典型例と異なっており、ミスセンス変異の症例では典型例と同じ症状は出現しないと推測される。今後、脳形成における各機能ドメインの働きを明らかにすることが重要である。

SIP1 欠損症のモデルマウスを用いた解析では、胎生期の器官形成や脳形成に Sip1 が関与していることが明らかになった。Sip1 ホモ欠失変異マウスを用いた研究では、Sip1 が神経堤細胞の形成・遊走、神経管と体節の形成に必須であり、このような多様な機能はやはり Sip1 の多様な機能ドメインに関連していると考えられる。同様に、Sip1 ヘテロ欠失変異マウスの解析では、Sip1 は脳の交連線維、特に正中部の形成に重要である。この軸索に関する機能は、胎生期の脳が形成される以前の Sip1 の上記機能とは異なるため、両者は異なるシグナル伝達を介して作用していると考えられる。Sip1 ヘテロ欠失変異マウスの解析では、脳梁欠損以外に HSCR と類似の直腸所見(壁

内神経節の欠如) が約 25%に見られた。ヒトの SIP1 欠損症と比べて、ヘテロマウスでは頭部変形と心病変(現在解析中)が認められないが、脳梁欠損と HSCR に類似の直腸所見が見られたのは興味深く、マウスでは神経軸索走行と神経堤細胞の遊走の異常が Sip1 の半減により出現する顕著な所見と理解された。

本研究班の主題研究である、「重度知的障害」の病態解明に関しては、マウス脳に見られる異常所見が重要である。本年度確認された、Sip1 ヘテロ欠失変異マウスの軸索伸長異常(伸長低下)は、Sip1 欠損の *C. elegans* においても軸索走行異常が報告されているので、興味深い所見である。軸索走行には、軸索円錐内の filopodia のアクチンフィラメントの重合、低分子 G 蛋白質の機能等が必要であるが、SIP1 の欠損によりどのような蛋白質が機能障害を受けて軸索伸長に障害が出現するのかは、現在、DNA チップ等を用いて解析中である。

## E. 結論

- 1) 本年度、重度の知的障害、運動発達遅滞、特徴的な顔貌、小頭症などを呈する典型例 4 症例から、新たなナンセンスおよびフレームシフト変異(285fs293X, 431fs432X, E609X, 860fs862X) を、2 症例から ZFHX1B を含む染色体欠失を同定した。このうちの 2 症例は、分担研究員の二次アンケート調査で SIP1 欠損(異常)症が疑われた症例である。
- 2) ZFHX1B の第 7 イントロンに変異が見られる症例では、スプライシング異常(第 7 エクソンのスキッピング)

が見られ、軽症（眼間解離と中度知的障害）であった。

- 3) HSCR を伴った 7 例の SIP1 欠損(異常)症 (*ZFHX1B* 変異 3 例、欠失 4 例) の腸管壁内神経叢の病理学的解析を行い、欠失症例が変異症例に比べて顕著(広範な無神経節領域)な病理所見を呈することが明らかになった。
- 4) Sip1 ホモ欠失変異個体(マウス)の解析では、新たに Sip1 が“体節の分節化境界の成立”に参与しているが明らかになった。
- 5) Sip1 ヘテロ欠失変異マウスの解析では、約 25 %にヒトに発症する HSCR と類似の腸管所見が出現した。さらに、ヘテロマウスに見られる脳梁欠損の病態を DiI (P0) を用いた軸索染色、あるいは初代脳神経培養 (E15.5) にて解析し、Sip1 が脳神経の軸索伸長（特に正中線）に重要であることが明らかになった。
- 6) エンドセリン(ET)-1 遺伝子欠損マウスの解析では、ET-1 は神経堤細胞に作用して鰓弓の背腹軸方向のパターン形成を制御していることが証明された。Sip1 ホモ欠失変異マウスでも鰓弓が形成されず、FGF シグナル後の鰓弓形成における両者の関連性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ishihara N, Yamada K, Yamada Y, Miura K, Kato J, Kuwabara N, Hara Y, Kobayashi Y, Hoshino K, Nomura Y, Mimaki M, Ohya K, Matsushima M, Nitta H, Tanaka K, Segawa M, Ohki T, Ezoe T, Kumagai T, Onuma A, Kuroda T, Yoneda M, Yamanaka T, Saeki M, Segawa M, T Saji, Nagaya M, Wakamatsu N: Clinical and molecular analysis of Mowat-Wilson syndrome associated with *ZFHX1B* mutations and deletions at 2q22-q24.1. *J Med Genet* 41: 387-394, 2004.
  - 2) Taguchi T, Suita S, Masumoto K, Nada O: Universal distribution of c-kit-positive cells in different types of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 19: 273-279, 2003.
  - 3) Ieda M, Fukuda K, Hisaka Y, Kimura K, Kawaguchi H, Fujita J, Shimoda K, Takeshita E, Okano H, Kurihara Y, Kurihara H, Ishida J, Fukamizu A, Federoff HJ, Ogawa S: Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest*, in press.
  - 4) Ozeki H, Kurihara Y, Tonami K, Watatani S, Kurihara H: Endothelin-1 regulates the dorsoventral branchial arch patterning in mice. *Mech Dev*, in press.
- ### 2. 学会発表
- 1) 石原尚子, 山田裕一, 三浦清邦, 大木隆史, 熊谷俊幸, 長屋昌宏, 若松延昭: 2q22-23 の部分欠失を有する SIP1 欠損症 5 症例の臨床像と遺伝子異常. 日本小児神経学会 (福岡) 2003.5.23.
  - 2) 田中修一, 長屋昌宏, 加藤純爾, 新美教弘, 加藤禎洋, 山田裕一, 若松延昭: 共通する臨床像を契機に見出されたヒルシュスプルング病の新しい遺伝子異常. 日本小児外科学会総

- 会 (京都) 2003.5.28.
- 3) 丸橋光次, Tom Van de Putte, Danny Huylebroeck, 近藤寿人, 東雄二郎: 「体節の分節境界の成立」に果たす転写制御因子 SIP1 の役割. 日本発生生物学会 (札幌) 2003.6.11.
  - 4) 好本あき, 東雄二郎, 近藤寿人: 転写制御因子 SIP1 がレンズ発生で果たす役割; レンズ特異的な遺伝子欠失マウスによる解析. 日本発生生物学会 (札幌) 2003.6.11.
  - 5) 三好智也, 丸橋光次, 安見孝広, 近藤寿人, 東雄二郎:  $\delta$ EF1/SIP1 二重ノックアウトマウスを用いた *zfh1* ( $\delta$ EF1/SIP1)ファミリー転写制御因子の機能における類似と相違の研究. 日本発生生物学会 (札幌) 2003.6.11.
  - 6) 安見孝広, 三好智也, 丸橋光次, 近藤寿人, 東雄二郎: 転写制御因子 SIP1 の下流標的遺伝子の探索. 日本発生生物学会 (札幌) 2003.6.11.
  - 7) Wakamatsu N, Ishihara N, Yamada K, Miura K, Kuwabara N, Kobayashi Y, Kumagai T, Yamada Y, Nagaya M: Clinical and molecular genetic analysis in patients with SIP1 deficiency associated with 2q22-24 deletion. 日本生化学会大会 (横浜) 2003.10.16.
  - 8) 石原尚子, 山田憲一郎, 山田裕一, 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: *ZFH1B* を含む染色体 2q22-24 欠失 6 症例の臨床像と遺伝子異常. 日本人類遺伝学会 (長崎) 2003.10.24.
  - 9) Ishihara N, Yamada K, Yamada Y, Miura K, Kato J, Kuwabara N, Kobayashi Y, Kumagai T, Nagaya M, Wakamatsu N: Deletion 2q22-q23 syndrome: a variety of clinical features including those manifested in the patients with *ZFH1B* mutations. The American Society of Human Genetics, Annual Meeting (Los Angeles, USA) 2003.11.7.
  - 10) 栗原由紀子, 砺波一夫, 尾関英徳, 福原茂朋, 油谷浩幸, 加藤 篤, 栗原裕基: 大血管 鰓弓形成に關与する神経堤細胞と Endothelin-1 の役割. 日本分子生物学会 (神戸) 2003.12.10.
  - 11) 尾関英徳, 栗原由紀子, 砺波一夫, 栗原裕基: Endothelin-1 遺伝子欠損マウスにおける下顎弓の homeotic transformation. 日本分子生物学会 (神戸) 2003.12.12.
  - 12) 砺波一夫, 栗原由紀子, 油谷浩幸, 加藤 篤, 栗原裕基: 鰓弓形成に關与する Endothelin-1 の下流遺伝子の探索: DNA マイクロアレイを用いた検討. 日本分子生物学会 (神戸) 2003.12.12.
  - 13) 奈良啓悟, 草深竹志, 米田光宏, 黒田征加, 他: *Sip1* ヘテロ欠失変異マウスにおける腸管壁内神経の検討. 日本小児外科学会総会 (大阪) 2004.



## 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

ZFHX1B 遺伝子の変異解析：新たに同定された遺伝子変異

分担研究者：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 裕一、山田 憲一郎

（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（名古屋大学医学部医学研究科 小児科）

研究要旨

Hirschsprung 病に、知的障害、てんかん、特徴的な顔貌などが合併する Hirschsprung disease-MR 症候群は、遺伝的にも臨床的にも多様であるが、優性遺伝形式を呈する本症が SIP1 (Smad interacting protein 1) をコードする ZFHX1B の異常により発症することが明らかになり、多くの症例から遺伝子変異を同定した。また通常の遺伝子解析で変異の見られない症例からは、ZFHX1B を含む欠失とその断点部位を同定し、その欠失領域が臨床症状に及ぼす影響を明らかにした。本年度も ZFHX1B の遺伝子解析を続け、新たなナンセンス変異 (E609X) やフレームシフト変異 (284fs293X, 860fs982X, 431fs432X) を同定した。また症状が軽度の例で、スプライシング異常が発見された。ゲノム DNA では第 7 イントロンに変異 (916+6T>G) が見られ、mRNA の解析から、第 7 エクソンがスキップした異常 mRNA (270fs304X) を検出した。

A. 研究の背景・目的

我々は、ヒルシュスプルング病に、精神運動発達遅滞、眼間解離などの特徴的な顔貌、小頭症、てんかん、心奇形などを合併する疾患の病因遺伝子が SIP1 (Smad interacting protein 1) をコードする ZFHX1B であることを明らかにし、SIP1 欠損(異常)症の変異解析や機能解析を行ってきた。遺伝子診断の一環としての変異解析により、これまでに多くの症例の ZFHX1B 変異を同定した。通常の遺伝子解析では変異が見られない症例では、染色体の小欠失を疑い、マイクロサテライトマーカー及び定量 PCR 法を用いて、

欠失の検索と領域の限定し、欠失の断点部位を明らかにした。最近、本症は Mowat-Wilson 症候群とも呼ばれている。

本年度も、研究班を中心に国内外からの分析依頼のあった症例の確定診断を行うとともに、遺伝子異常と臨床症状の関連を明らかにすることを目的として、さらに広範囲な臨床症状の症例について、遺伝子検索を行った。

B. 研究方法

遺伝子異常を疑われる症例および類似症例の末梢血より、ゲノム DNA を抽出し、ZFHX1B の各エクソンとその近傍の

イントロン配列を PCR 増幅し、アガロースゲル電気泳動後 DNA 断片を精製して、直接塩基配列決定法で分析した。変異の詳細はサブクローニングして塩基配列を分析して確認した。

### C. 研究結果

本年度も、国内外から依頼に応じて、SIP1欠損(異常)症例、およびそれに類似する症例、合計12例の変異解析を行い、4例の典型例から新たな変異を同定した。

症例S46では、1805番目のGがTに置換し(1805G>T)、609番目のグルタミン酸が翻訳停止コドンに変化して蛋白の合成が停止するナンセンス変異(E609X)が発見された。

S47には、exon 7に新しい2塩基欠失変異が発見された。854番目と855番目のCAが欠失し(854delCA)、285番目のアミノ酸からフレームシフトがおきて、293番目に翻訳停止コドンが出現する。

S49では2579番目のTが欠失する1塩基欠失(2579delT)が発見され、860番目のアミノ酸からフレームシフトがおきて862番目が翻訳停止コドンとなった。

S50の変異は少し特異で、ダイレクトシーケンシングでは、変異の詳細がつかめなかったため、サブクローニングして分析した結果、1290番目のGからGAGTTCA 7塩基が欠失した代わりに、異なった6塩基ACTGAGが挿入していた。431番目のアミノ酸が変化して、直後の432番目のコドンが翻訳停止コドンとなった。

これまでにナンセンス変異などが同定された症例に比べて、発達遅滞の軽症例(S43)で、スプライシング異常例を認めた。この症例は原因不明の発達遅滞とされていたが、特異的顔貌からSIP1異常症

が疑われた。ゲノムDNAのダイレクトシーケンシングでは、翻訳領域には異常を認めなかったが、intron 7の6番目の塩基にTからGへの置換(916+6T>G)が見られた。エクソン/イントロン接合部の近傍のため、スプライシングへの影響を疑い、RT-PCRでmRNAを分析し、exon 7がスキップした異常mRNAの存在を明らかにした。この異常mRNAは270番目のアミノ酸からフレームシフトがおき、304番目が翻訳停止コドンとなる。

また典型例の1例(S42)に、ZFHX1Bを含む染色体の小欠失を確認したが、他の類似6症例には異常を認めなかった。

### D. 考察

ZFHX1BがコードしているSmad結合蛋白質1(SIP1)の機能部位と、現在までに同定された変異を図1に示した。SIP1はN末とC末の2つのZinc finger domainが標的遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写を抑制する働きがあることが知られている。

現在までに見つかっている変異は、ナンセンス変異が12例、フレームシフト変異が10例、スプライシング異常例が1例、1アミノ酸欠失が1例であった。1アミノ酸欠失例は、中等度のMRを有し、顔貌に軽度の眼間解離を認めるものの、特異的とまでは言えない軽症例であった。

ナンセンスおよびフレームシフト変異を有する下段に示す22例は、重度のMRと特徴的顔貌を全例に認めており、典型的なSIP1異常症の症状を呈しており、全例C末のZinc finger domainよりも上流で翻訳が停止している。変異はSIP1のC末領域を除く広範な領域に分布し、695番目のアルギニンが翻訳停止コドンに変化するナンセンス変異は7例に発見され、変異のホットスポットと考えられる。

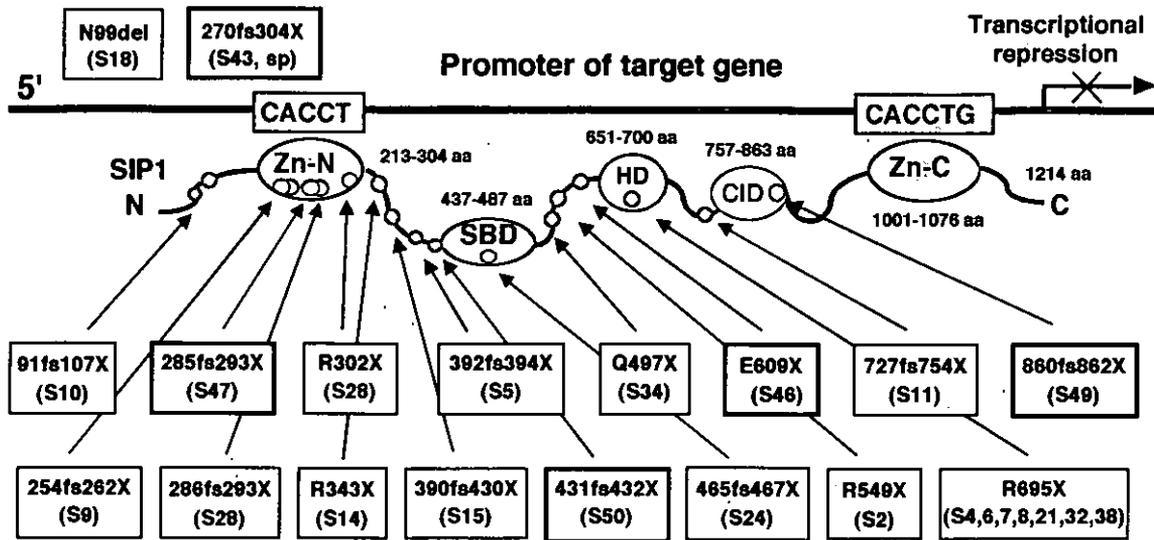


図1 SIP1の構造とZFHXB変異

Zn-N, C: zinc finger cluster (転写抑制)、SBD: Smad結合ドメイン  
 HD: ホメオドメイン様配列、CID: コレプレッサー CtBP結合ドメイン  
 本年度新たに同定した変異を太枠で示す。



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

ZFHX1B 遺伝子にスプライス変異が見られる知的障害症例の分子遺伝学的解析

分担研究者：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（名古屋大学医学部医学研究科 小児科）

野村 芳子、瀬川 昌也（瀬川小児神経クリニック）

研究要旨

眼間解離、高口蓋と中等度知的障害が見られる 1 症例の ZFHX1B 遺伝子 (ZFHX1B) を解析し、第 7 イントロンに 1 塩基置換 (916+6T>G) を同定した。同症例の抹消血 mRNA の解析では、第 7 エキソンが消失した異常 ZFHX1B mRNA も見られた。第 7 イントロンの同変異が ZFHX1B mRNA のスプライシングに影響を及ぼすか否かを明らかにするために、CMV プロモーターの下流に全翻訳領域をコードする ZFHX1B cDNA を挿入した発現ベクターと同ベクターに第 6 と第 7 イントロンを含んだ（一方の第 7 イントロンには変異が入っている）2 種類のキメラ遺伝子を作成し、ベクターのみも含めて 4 種類のプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションし、ZFHX1B mRNA を RT-PCR で解析した。正常のキメラ遺伝子をトランスフェクションした細胞では、正常の ZFHX1B mRNA のみが PCR で増幅されたが、変異を含むキメラ遺伝子の方では正常な mRNA はほとんど同定されず、大部分は異常にスプライシングした mRNA であった。正常な ZFHX1B mRNA のみを増幅可能なプライマーを用いて PCR を行い、正常な ZFHX1B mRNA 量を定量すると変異を含むキメラ遺伝子をトランスフェクションした細胞は、変異のないキメラ遺伝子の場合の約 30 %であった。症例では片側のアレルに変異が見られるので、症例では正常の ZFHX1B mRNA 量（蛋白質）が健常人の約 65 (50+15) %であると考えられる。ZFHX1B のハプロ不全で発症し重度の知的障害を呈する典型例の SIP1 異常症の臨床像と比較して、本症例では胎生期における ZFHX1B 発現量の軽度の上昇（約 15 %）が症状の改善に関与していると考えられた。

A. 研究目的

ZFHX1B 遺伝子 (ZFHX1B) のナンセンス、フレームシフト変異あるいは欠失で発症する SIP1 異常症では、重度知的障害、運動発達遅滞、特徴的顔貌、

小頭症、先天性心疾患、Hirschsprung 病と正中構造の形成異常が見られる。しかし、これらの症状を伴った典型例からは、他のミスセンス、スプライス変異などは未だ同定されていない。こ

の事は、*ZFHXB* のミスセンス、スプライス変異では上記と異なる症状を呈する可能性を示唆している。従って、ナンセンス、フレームシフト変異以外の遺伝子異常では、どのような症状が見られるか興味もたれる。本年度、主任研究者らは眼間解離、高口蓋と中等度知的障害が見られる 1 症例より、スプライス変異を伴う変異を第 7 インtron に同定し分子遺伝学的解析を行ったので報告する。

## B. 研究方法

1. 症例は 26 歳男性。言葉がはっきりせず（単語は出たが文章にならず）、学習の遅れが見られるので 8 歳時に近医を受診した。既往歴では、出生時に特記することなし。始語 1 歳 2~3 ヶ月、toilet training 1 歳 6 ヶ月、独歩が 2 歳と遅滞が見られた。1 歳以後、発熱時の痙攣が見られ 5 歳時に服薬を開始した。23 歳時の IQ は 30 (田中・ビネー) であった。現在、眼間解離、高口蓋と指趾の変形が見られる。頭囲は生下時より正常範囲である。会社に就職しレストランの簡単な仕事（食器のかたづけと洗い）に従事している。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。

2. 変異解析：*ZFHXB* 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。

3. 発現実験：同定したイントロン変異を含むキメラ遺伝子を HEK293 細胞にトランスフェクションした後に *ZFHXB* mRNA を RT-PCR で解析した。

## C. 研究結果

1. *ZFHXB* 変異を第 7 インtron (第

7 エクソンとの接合部から 6 番目の T が G に置換) に同定した。症例の末梢血の RT-PCR による解析から、第 7 エクソンの欠損した異常 *ZFHXB* mRNA を同定した(916+6 T>G, exon 7 skipping, 270fs304X、図 1)。

2. 第 6, 7 インtron を含むキメラ遺伝子をトランスフェクションした HEK293 細胞では、①第 7 インtron の変異がない場合は、正常の *ZFHXB* mRNA のみが同定されたが、②第 7 インtron の変異を含む場合は、大部分は第 7 エクソン/第 7 インtron の接合部で異常にスプライシングした *ZFHXB* mRNA であった(図 2)。

3. 正常にスプライシングした *ZFHXB* mRNA のみを増幅するプライマーを用いて正常 *ZFHXB* mRNA を定量すると第 7 インtron 変異を含むキメラ遺伝子は、同変異がないキメラ遺伝子の約 30% であった (図 3)。

## D. 考察

キメラ遺伝子を用いた発現実験により、第 7 インtron に変異を同定した症例では、*ZFHXB* mRNA が正常の約 65% であると推測された。今までの SIP1 異常症の臨床像の解析及び Sip1 欠損マウスの解析により *ZFHXB* のハプロ不全でヒトとマウスに症状（所見）が出現することが明らかになっているが、今回の研究では、*ZFHXB* の発現量が正常の 2/3 でも胎生期の脳発達異常が出現することが示された。我々の他の研究では、*ZFHXB* が半分になるとその標的遺伝子である *E-cadherin* はマウス脳で約 2.5 倍に上昇していた。同様にまだ明らかにされていない SIP1 シグナル伝達の下流の遺伝子も同様に