

201024168A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

Mowat-Wilson 症候群の診断法の確立と成長発達
に伴う問題点とその対策に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 若松 延昭

平成 23 (2011) 年 3 月

目 次

| | |
|---|----|
| I. 平成 22 年度構成員名簿 | 1 |
| II. 総括研究報告 | |
| Mowat-Wilson 症候群の診断法の確立と成長発達に伴う問題点と その対策に関する研究 | 3 |
| 研究代表者：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 | |
| III. 分担研究報告 | |
| Mowat-Wilson 症候群の遺伝子診断 | 7 |
| 研究代表者 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 部長 | |
| レポーターノックインマウスを用いた、Mowat-Wilson 症候群の原因遺伝子 SIP1 の発現解析と疾患モデルマウス脳が発現タンパク質の解析 | 13 |
| 研究代表者 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 部長 | |
| SHOX2 の高感度測定法の開発とその臨床応用 | 17 |
| 研究分担者 橋田 誠一 徳島文理大学・健康科学研究所 生活習慣病部門 教授 | |
| Mowat-Wilson 症候群のモデルマウス、Zfx1b 欠失マウス、における 血中 SRIF 濃度と大脳皮質における SRIF 遺伝子発現量と含量の検討 | 21 |
| 研究分担者 片上 秀喜 帝京大学ちば総合医療センター 内科臨床研究部 部長、准教授 | |
| Mowat-Wilson 症候群の患者・家族支援に関する研究 | 25 |
| 研究分担者 水野 誠司 愛知県心身障害者コロニー中央病院 小児内科 臨床第一部長 | |
| Mowat-Wilson 症候群患児の成長発達に伴う問題点とその対策に関する 心理・社会的側面 | 29 |
| 研究分担者 斎藤 加代子 東京女子医科大学附属遺伝子医療センター 所長 教授 | |

| | |
|--|----|
| 先天異常モニタリング調査および遺伝外来受診症例による Mowat-Wilson 症候群の発生頻度の推定 | 33 |
| 研究分担者 黒澤 健司 神奈川県立こども医療センター遺伝科 部長 | |
| Mowat-Wilson 症候群の診断法の確立と成長発達に伴う問題点と その対策に関する研究 | 37 |
| 研究分担者 小崎 里華 国立成育医療研究センター遺伝診療科 医長 | |
| Mowat-Wilson 症候群を持つ小児を育てる親の思い | 41 |
| 研究分担者 岡本 伸彦 大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科 科長 参事 | |
| Mowat-Wilson 症候群の成長発達に伴う問題点とその対策に関する研究 | 47 |
| 研究分担者 平木 洋子 広島市こども療育センター 小児科 科長 | |
| IV. 平成 22 年度研究成果に関する刊行物一覧 | 57 |

[I]

平成 22 年度構成員名簿

平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

Mowat-Wilson 症候群の診断法の確立と成長発達に伴う問題点とその対策に関する研究

構成員名簿

| 区分 | 氏名 | 所属 | 職名 |
|-------|-------|---------------------------|--------|
| 研究代表者 | 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 | 副所長・部長 |
| 研究分担者 | 橋田 誠一 | 徳島文理大学健康科学研究所・生活習慣病部門 | 教授 |
| | 片上 秀喜 | 帝京大学ちば総合医療センター・内科・臨床研究部 | 部長・准教授 |
| | 水野 誠司 | 愛知県心身障害者コロニー中央病院・小児内科 | 臨床第一部長 |
| | 斉藤加代子 | 東京女子医科大学附属遺伝子医療センター | 所長・教授 |
| | 黒澤 健司 | 神奈川県立こども医療センター・遺伝科 | 部長 |
| | 小崎 里華 | 国立成育医療研究センター・遺伝診療科 | 医長 |
| | 岡本 伸彦 | 大阪府立母子保健総合医療センター・遺伝診療科 | 科長・参事 |
| | 平木 洋子 | 広島市こども療育センター・小児科 | 科長 |
| 研究協力者 | 東 雄二郎 | 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・周生期学部 | 部長 |
| | 山田 裕一 | 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・遺伝学部 | 室長 |
| | 中西 圭子 | 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・周生期学部 | 主任研究員 |
| | 山田憲一郎 | 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・遺伝学部 | 主任研究員 |

(順不同)

[II]

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

Mowat-Wilson 症候群の臨床診断基準の確立と疾患発症頻度の調査

研究代表者 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 副所長・部長

研究要旨

Mowat-Wilson 症候群は、重度精神運動発達遅滞、特徴的な顔貌、小頭症を 3 主徴とする症候群である。Mowat と Wilson らの報告（1998）より前に、愛知県心身障害者コロニー中央病院の医師（山中、長屋ら）は、第 15 回日本小児遺伝医学会（1992）において、「精神遅滞、てんかん、特異な顔貌を呈する 4 症例」を発表しており、両報告の症例は同一疾患である。その後、研究代表者の若松ら（2001）により、本症候群が *ZFHX1B* の loss of function mutation（機能喪失型突然変異）によって発症することが明らかになった。平成 22 年度の本研究班では、1）Mowat-Wilson 症候群の出生時診断を目指した研究と 2）本症候群の成長発達に伴う問題点とその対策に関する研究を中心に行った。さらに、3）神奈川県の本症候群の発生頻度解析と 4）レポーターノックインマウスを用いたマウス脳の解析を行った。以上の研究から次の結果が得られた。1）微量タンパク質測定を用いた出生時診断法を確立するための候補タンパク質の同定は困難であった。2）15 症例のご家族から「成長発達に伴う問題点とその対策に関する研究」に関するアンケート調査の回答を得た。3）神奈川県での本症候群の発生頻度は、約 11 万出生に 1 例と推定され、昨年度の愛知県での同調査研究（10 万出生に 1.3 例）とほぼ同じ値であった。4）胎生後期から成獣に至るマウス脳において、*Sipl* (*Zfhx1b*) タンパク質は主に海馬と歯状回に発現していた。以上より、アンケート調査と発症頻度解析で、日本に約 1000 人の本症候群の患者がいると推定された。さらに、小児科を含めた医師における認知度がまだ低く、未診断の本症患者が多数存在することを確認した。本年度の研究成果を本研究班で作成した Mowat-Wilson 症候群のホームページ上で発表するとともに、正確な診断に基づき、患者家族とその診断、医療、療育に携わる医療スタッフが早期より積極的に治療に参加できる体制作りが重要である。

研究分担者

橋田 誠一

徳島文理大学・健康科学研究所

片上 秀喜

帝京大学ちば総合医療センター

水野 誠司

愛知県心身障害者コロニー中央病院

斉藤 加代子

東京女子医科大学附属遺伝子医療センター

黒澤 健司

神奈川県立こども医療センター
小崎 里華
国立成育医療研究センター
岡本 伸彦
大阪府立母子保健総合医療センター
平木 洋子
広島市こども療育センター

研究協力者

東 雄二郎、中西 圭子、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

A. 研究目的

Mowat-Wilson 症候群は、重度精神遅滞、特徴的な顔貌、小頭症を3主徴候とする症候群である。平成22年度は、Mowat-Wilson 症候群の診断法を確立し、成長発達に伴う問題点を明らかにし、その対策を行うことを目的に研究を行った。

B. 研究方法

現在、本症候群の確定診断は、臨床所見と病因遺伝子である ZFHX1B 遺伝子 (ZFHX1B) の変異解析により行っている。一方、臨床症状が類似しているが ZFHX1B 変異が同定できない症例にも遭遇する。研究代表者らは、解析依頼のある症例の本遺伝子の全エクソンとエクソン/イントロン接合部位の変異解析を行っている。本解析で変異を同定できない症例については、定量PCRを用いて本遺伝子の欠失の有無を解析している。しかし、以上の変異解析により変異が同定できなくても、イントロン変異によるスプライシング異常のように、本症候群を完全には否定できない。そこで、本症候群に共通にみられる代謝(タンパク質)異常に注目し、出生時の微量タンパク

質測定による診断を目指している。一方、本症候群は全国に約1000人の患者がいると推測されるが、まだ病気の知名度は低い。そこで、本症候群の早期からの診断、医療、療育を目指す体制作りのために、患者家族から見た「成長発達に伴う問題点」を、アンケート調査により行った。さらに、Zfhx1b 遺伝子のC末端に GFP (Green Fluorescent Protein) を融合タンパク質として発現するレポーターノックインマウスを作製し、同マウス脳の解析を開始した。

C. 研究結果の概要

1) ZFHX1B 変異解析

本年度、新たに本症候群が疑われる10症例の ZFHX1B 変異解析依頼があり、解析の結果、7例にフレームシフト変異を同定し、残りの3例は定量PCR法で欠失が疑われた。以上より、研究代表者らは現在までにナンセンス変異20例、フレームシフト変異28例、欠失19例同定した。さらに、分担研究者が1例からナンセンス変異を同定した。

2) 高感度測定法の開発

血中の微量測定法を用いた本症候群の診断を目指して、疾患モデルマウスの胎児脳で発現量が増えていた Shox2 (ヒトは SHOX2) に対する高感度測定法の開発を試みたが、測定系は作製できなかった。

3) 血中のソマトスタチン(SRIF)値の測定

疾患モデルマウスと野生型 (WT) マウス脳について、血中のソマトスタチン(SRIF)値の測定を行ったが、両者に優位な差は見られなかった。

4) アンケート調査

「成長発達に伴う問題点」のアンケート調査が15例の家族より得られ、様々な問題点と医師の本症候群の認知度の低さが明

らかになった。

5) レポーターノックインマウス

レポーターノックインマウスの解析により、Zfhx1b タンパク質は、胎生後期から成獣に至るまで、主に海馬と歯状回で発現していた。

D. 考察

Mowat-Wilson 症候群は、出生時より重度の精神遅滞があり、早期診断とその対策が望まれる。一方、本症例の変異解析ではナンセンス変異から染色体の部分欠失まで様々な機能喪失型変異が見られ、その変異の多様性のために通常の変異解析では診断できない症例も存在すると考えられる。従って、本症候群の診断をより確実にするためには、先天異常疾患のスクリーニングのように、ある特定のタンパク質の微量測定を指標にした出生時の診断法が望まれる。

1) 学術雑誌で報告されている3個の Sip1 の標的遺伝子と2) 研究代表者が疾患モデルマウスと WT マウス脳のジーンチップの解析により同定した異常発現遺伝子について、定量 PCR を用いて発現量の定量を行ったが、大部分に変動は確認できなかった。その中で、モデルマウス脳で約2倍と5倍に発現量が増加していた2個の遺伝子(Sst, Shox2)に注目した。しかし、前者のタンパク質はモデルマウスの脳と血中で優位な増加は見られなかった。後者については、微量タンパク質測定法の開発中であり、今後の解析結果が待たれる。一方、本症候群の成長発達に伴う問題点とその対策に関するアンケート調査では、重度精神運動発達遅滞の所見に加え、1) かんしゃくをおこしやすく、機嫌がかわりやすい特徴(性格)、2) 感覚刺激の受け取り方の偏り、3) 身振りなどの動作による要求手段の有用性とコミュニケーション能力訓練

の重要性、4) 本疾患の認知度の低下が指摘され、これらを本研究班のホームページ上で報告し、臨床の場に還元することが重要である。さらに、レポーターノックインマウスの解析により得られた、Zfhx1b(Sip1) タンパク質の海馬と歯状回での発現は、症例に見られる海馬の低形成の所見と合わせて、本症候群に見られる重度精神遅滞の原因に海馬の形成異常が関わっていることを示唆している。

E. 結論

- 1) Mowat-Wilson 症候群の微量タンパク質測定を用いた出生時診断法の確立をめざした研究を開始した。
- 2) 15 症例のご家族から「成長発達に伴う問題点とその対策に関する研究」に関するアンケート調査の返事を得て、発達・療育における新たな知見と問題点が得られた。
- 3) 神奈川県での本症候群の発生頻度は、約11万出生に1例と推定され、昨年愛知県での同研究結果(10万出生に1.3例)と、ほぼ同じ値であった。
- 4) 胎生後期から成獣に至るまでのマウス脳において、Sip1 (Zfhx1b) タンパク質は主に海馬と歯状回に発現していた。

文献

- Mowat DR, Croaker GDH, Cass DT et al. Hirschsprung disease, microcephaly, mental retardation, and characteristic facial features: delineation of a new syndrome and identification of a locus at chromosome 2q22-q23. *J Med. Genet* 35: 617-623, 1998.
- Wakamatsu N, Yamada Y, Yamada K et al. Mutations in SIP1, encoding Smad interacting protein-1, cause a form of Hirschsprung disease. *Nat Genet* 27: 369-370, 2001.

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

本年度、関連発表なし。

2. 学会発表

山田裕一, 山田憲一郎, 水野誠司, 古谷憲孝, 松尾真理, 浦野真理, 平木洋子, 黒澤健司, 斎藤加代子, 若松延昭: Mowat-Wilson 症候群典型例における *ZFHX1B* 遺伝子変異. 日本人類遺伝学会 (さいたま) 2010.10.28.

平木洋子, 坪倉ひふみ, 夜船展子, 土方 希, 山根希代子, 田辺明男, 伊予田邦昭, 山田裕一, 若松延昭: Mowat-Wilson 症候群の遺伝型と表現型の関連—自験例から. 中国四国小児科学会 (広島) 2010.10.28.

Yamada Y, Yamada K, Mizuno S, Furuya N, Matsuo M, Urano M, Hiraki Y, Kurosawa K, Saito K, Wakamatsu N: Novel mutations of *ZFHX1B*

responsible for the typical cases of Mowat-Wilson syndrome. Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Washington DC, USA) 2010.11.5.

山田裕一, 山田憲一郎, 水野誠司, 古谷憲孝, 松尾真理, 浦野真理, 平木洋子, 秋丸憲子, 松田圭子, 岡本伸彦, 黒澤健司, 斎藤加代子, 若松延昭: Mowat-Wilson 症候群典型例にみられた新しい *ZFHX1B* 遺伝子変異. 日本生化学会日本分子生物学会合同大会 (神戸) 2010.12.10.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1 特許取得

なし

2 実用新案登録

なし

3 その他

なし

[III]

分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

Mowat-Wilson 症候群の遺伝子診断

研究代表者 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

研究要旨

精神運動発達遅滞と眼間開離などの特異的な顔貌に、ヒルシュスプルング病、てんかん、小頭症、心奇形などを併発し、常染色体優性遺伝形式を呈する Mowat-Wilson 症候群は、2番染色体に座位する SIP1 (Smad interacting protein 1) をコードする遺伝子 *ZFH1B* の異常により発症する。本年度新たに本症候群が疑われる 10 症例について、*ZFH1B* の全翻訳領域の塩基配列を解析して、7 例にこれまでに報告のない 5 種類の新しい原因遺伝子変異 (784fs794X, 55fs74X, 498fs515X, 213fs238X, 216fs223X) と 2 種類の既報告変異 (R695X, R921X) を同定した。定量 PCR 法による欠失解析により、変異の認められない 3 症例に *ZFH1B* の部分欠失が推測された。当研究室での遺伝子解析により、典型例 48 例に、ナンセンス変異 20 例とフレームシフト変異 28 例を同定した。また 19 症例に、遺伝子の全欠失あるいは部分欠失を見い出した。

共同研究者

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

水野 誠司

愛知県心身障害者コロニー中央病院

平木 洋子

広島市こども療育センター

岡本 伸彦

大阪府立母子保健総合医療センター

ZFH1B であり、常染色体優性遺伝で片方の遺伝子のハプロ不全で発症することを明らかにした (Wakamatsu et al. 2001)。これまでに本症候群が疑われる症例で、*ZFH1B* の全翻訳領域の塩基配列を解析して、ナンセンス変異やフレームシフト変異を報告するとともに、遺伝子の全欠失あるいは部分欠失が見られる染色体の微小欠失例を報告してきた (Yamada et al. 2001; Ishihara et al. 2004) が、昨年度、難治性疾患克服研究事業を開始するにあたり、あらためて臨床症状により典型例を中心に遺伝子解析を行い、病因遺伝子変異を同定した。

A. 研究目的

最近では Mowat-Wilson 症候群と呼ばれる SIP1 異常症は、精神運動発達遅滞と眼間開離などの特異的な顔貌に、ヒルシュスプルング病、てんかん、小頭症、心奇形などの合併症が見られる。我々はこの病因遺伝子が 2 番染色体に座位する転写調節因子、smad 結合タンパク 1 (smad interacting protein 1, SIP1) をコードしている

B. 研究方法

共同研究者等の施設より照会、遺伝子解析依頼のあった典型症例 10 例の末梢血よりゲノム DNA を抽出し、PCR 法と直接塩基配列決定法により、*ZFH1B* の全翻訳領域とエクソン/イント

ロン接合部の塩基配列を解析して、原因遺伝子変異を明らかにした。

変異の見つからない症例については、定量 PCR 法 (Ishihara et al. 2004) を用いて、染色体の微少欠失部位を推定した。

C. 研究結果

症例 10-01

症例 10-01 では、2 度に渡り詳細に遺伝子解析を行ったが、遺伝子変異の同定には至らなかった。そこで定量 PCR 法を用いて、*ZFH1B* の第 1、第 3、第 6、第 10 エクソンの増幅を観察したところ、一方のアレルにエクソン 3 から 10 の部分欠失が推測された。欠失断点の詳細な分析はまだ行っていないが、*ZFH1B* の第 3、第 6、第 10 エクソンを含む染色体の微少欠失が病因と考えられた。

症例 10-02

症例 10-02 の遺伝子解析の結果、1 方のアレルに 1 塩基挿入が同定された。正常では 2349 番目の塩基から T が 2 個連続するが、変異アレルでは 3 個連続する。すなわち 2351 番目の塩基に T 1 塩基が挿入し、784 番目のコドンからフレームシフトが起り、異なったアミノ酸が翻訳され、794 番目のコドンが翻訳停止コドンとなり (2351insT, 784fs794X)、病因遺伝子変異と考えられた。

症例 10-03

症例 10-03 では、2 度に渡り詳細に遺伝子解析を行ったが変異が同定できず、定量 PCR 法による欠失解析から、*ZFH1B* の第 3、第 6、第 10 エクソンの部分欠失が推測された。欠失断点の詳細な分析はまだ行っていないが、染色体の微少欠失が病因と考えられた。

症例 10-04

症例 10-04 では、1 塩基欠失が同定された。すなわち 164 番目の C 1 塩基が欠失しており、55 番目のコドンからフレームシフトが起り、異なったアミノ酸が翻訳され、74 番目のコドンが翻

訳停止コドンとなる (164delC, 55fs74X)。

症例 10-05

症例 10-05 は、遺伝子変異が同定できず、定量 PCR 法による欠失解析から、*ZFH1B* の第 3、第 6、第 10 エクソンの部分欠失が推測され、病因と考えられた。

症例 10-06

症例 10-06 では、1493 番目の C 1 塩基が欠失しており、498 番目のコドンからフレームシフトが起り、515 番目のコドンが翻訳停止コドンとなる (1493delC, 498fs515X)。

症例 10-07

症例 10-07 では、片方のアレルで 2761 番目の塩基 C が T に置換しており、921 番目のアミノ酸アルギニンが翻訳停止コドンに変わるナンセンス変異 (2761C>T, R921X) が病因遺伝子変異と考えられた。この変異は昨年度異なった家系で同定し報告しており、2 例目の同定となった。

症例 10-08

症例 10-08 では、片方のアレルで 2083 番目の塩基 C が T に置換しており、695 番目のアミノ酸アルギニンが翻訳停止コドンに変わるナンセンス変異 (2083C>T, R695X) であった。この変異は既に 8 例報告している。

症例 10-09

症例 10-09 では、片方のアレルに CCTG 4 塩基の反復挿入が認められた。正常では 635 番目から CCTG 4 塩基が並び、C 4 塩基に続くが、変異アレルでは 639 番目から CCTG 4 塩基が反復挿入していた。すなわち、213 番目のコドンからフレームシフトが起り、238 番目のコドンが翻訳停止コドンに変わる (639insCCTG, 213fs238X)。

症例 10-10

症例 10-10 は、片方のアレルで 647 番目の G 1 塩基が欠失しており、216 番目のコドンからフレームシフトが起り、223 番目のコドンが翻訳停止コドンとなる (647delG, 216fs223X)。

D. 考察

Mowat-Wilson 症候群の病因遺伝子が、SIP1 をコードしている *ZFH1B* であることが同定 (Wakamatsu et al. 2001) されて以来、当研究室で変異解析を開始し、原因変異を報告 (Yamada et al. 2001, 2005; Yoneda et al. 2002; Ishihara et al. 2004; Otsuka et al. 2008) してきた。また、他の研究機関より多くの報告 (Amiel et al. 2001; Cacheux et al. 2001; Zweier et al. 2002, 2003, 2006; Horn et al. 2004; McGaughan et al. 2005; Heinritz et al. 2006; Dastot-Le Moal et al. 2007; Ceconi et al. 2008) がある。

永年、分析を進めてきたが、最近対象が疑似例に及んだことから、変異の同定される確率が低下する傾向にあった。昨年度より難治性疾患克服研究事業を開始するにあたり、あらためて臨床症状を厳密に把握して典型例を中心に遺伝子解析を行った結果、分析依頼のあった 15 例中 12 例に原因遺伝子変異を同定することができ、変異の認められない症例では、*ZFH1B* の 1 部分を含む染色体の微少欠失が病因と推測された。

表 1. SIP1 (*ZFH1B*) 異常

| 遺伝子異常 | 症例数 |
|---------------|----------|
| | 115 (15) |
| 典型例 | 67 (15) |
| ナンセンス変異 | 20 (3) |
| フレームシフト変異 | 28 (9) |
| 遺伝子の全欠失, 部分欠失 | 19 (3) |
| 軽度および中等度 | 2 |
| 1 アミノ酸欠失 | 1 |
| スプライシング異常 | 1 |

(2009-2010)

表 1 に当研究室で同定した遺伝子異常をまとめたが、典型例で同定される遺伝子変異はすべて、蛋白の生合成に重大な異常をきたすナンセンス変異、もしくはフレームシフト変異で、全

例 C 末の Zinc finger domain よりも上流で翻訳が停止していた。また遺伝子の全欠失あるいは部分欠失が見られる 19 症例が同定されているが、欠失が 5 Mb までの症例は遺伝子変異の症例と重症度に大差がなかったが、10.42 Mb および 8.83 Mb の大きな欠失 2 例では発達遅滞はより重度であった。うち 1 例では口蓋裂と複雑な心奇形を合併していた (Ishihara et al. 2004)。軽症例では 1 アミノ酸欠失例 (Yoneda et al. 2002)、若干の正常 mRNA を発現するスプライシング異常例 (Yamada et al. 2005) が確認されている。欧米では、非典型例にミスセンス変異が認められている (Heinritz et al. 2006)。昨年度からの典型例の分析では、15 例すべてに遺伝子変異もしくは部分欠失が同定された (表 1 括弧内)。

本症候群は常染色体優性遺伝で片方の染色体のハプロ不全で発症する。このため症例は孤発例がほとんどであるが、まれに家族例 (兄弟例) の報告がある (Otsuka et al. 2008; Ceconi et al. 2008)。

E. 結論

Mowat-Wilson 症候群の典型例 10 例の *ZFH1B* 遺伝子解析を行い、これまでに報告のない新しいフレームシフト変異 5 例 (784fs794X, 55fs74X, 498fs515X, 213fs238X, 216fs223X) と、既知のナンセンス変異 2 例 (R695X, R921X) を同定した。変異はこれまでに典型例でみられたと同様に、すべて蛋白の生合成に重大な異常をきたす遺伝子変異であった、また 3 例に *ZFH1B* の部分欠失が推測される結果を得た。

文献

Amiel J, Espinosa-Parrilla Y, Steffann J et al. Large-scale deletions and SMADIP1 truncating mutations in syndromic Hirschsprung disease with involvement of midline structures. *Am J Hum Genet* 69: 1370-1377, 2001.
Cacheux V, Dastot-Le Moal F, Kaariainen H et al. Loss-of-

- function mutations in SIP1 Smad interacting protein 1 result in a syndromic Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 10: 1503-1510, 2001.
- Cecconi M, Forzano F, Garavelli L et al. Recurrence of Mowat-Wilson syndrome in siblings with a novel mutation in the ZEB2 gene. *Am J Med Genet* 146A: 3095-3099, 2008.
- Dasot-Le Moal F, Wilson M et al. ZFHx1B mutations in patients with Mowat-Wilson syndrome. *Hum Mutat* 28: 313-321, 2007.
- Heinritz W, Zweier C, Froster U et al. A missense mutation in the ZFHx1B gene associated with an atypical Mowat-Wilson syndrome phenotype. *Am J Med Genet* 140A: 1223-1227, 2006.
- Horn D, Weschke B, Zweier C et al. Facial phenotype allows diagnosis of Mowat-Wilson syndrome in the absence of Hirschsprung disease. *Am J Med Genet* 124A: 102-104, 2004.
- Ishihara N, Yamada K, Yamada Y et al. Clinical and molecular analysis of Mowat-Wilson syndrome associated with ZFHx1B mutations and deletions at 2q22-q24.1. *J Med Genet* 41: 387-393, 2004.
- Ohtsuka M, Saito K, Wakamatsu N et al. Mowat-Wilson syndrome affecting 3 siblings. *J Child Neurol* 23: 274-278, 2008.
- Wakamatsu N, Yamada Y, Yamada K et al. Mutations in SIP1, encoding Smad interacting protein-1, cause a form of Hirschsprung disease. *Nat Genet* 27: 369-370, 2001.
- Yamada K, Yamada Y, Nomura N et al. 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.
- Yamada Y, Yamada K, Nomura N et al. Novel mutations of ZFHx1B responsible for the Mowat-Wilson syndrome. Abstracts of 55th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, p399, 2005.
- Yoneda M, Fujita T, Yamada Y et al. Late infantile Hirschsprung disease-mental retardation syndrome with a 3-bp deletion in ZFHx1B. *Neurology* 59: 1637-1640, 2002.
- Zweier C, Albrecht B, Mitulla B et al. Mowat-Wilson syndrome with and without Hirschsprung disease is a distinct, recognizable multiple congenital anomalies-mental retardation syndrome caused by mutations in the zinc finger homeo box 1B gene. *Am J Med Genet* 108: 177-181, 2002.
- Zweier C, Temple IK, Beemer F et al. Characterisation of deletions of the ZFHx1B region and genotype-phenotype analysis in Mowat-Wilson syndrome. *J Med Genet* 40: 601-605, 2003.
- Zweier C, Horn D, Kraus C et al. Atypical ZFHx1B mutation associated with a mild Mowat-Wilson syndrome phenotype. *Am J Med Genet* 140A: 869-872, 2006.

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

本年度、関連発表なし。

2. 学会発表

山田裕一, 山田憲一郎, 水野誠司, 古谷憲孝, 松尾真理, 浦野真理, 平木洋子, 墨澤健司, 斎藤加代子, 若松延昭: Mowat-Wilson 症候群典型例における ZFHx1B 遺伝子変異. 日本人類遺伝学会 (さいたま) 2010.10.28.

平木洋子, 坪倉ひふみ, 夜船展子, 土方 希, 山根希代子, 田辺明男, 伊予田邦昭, 山田裕一, 若松延昭: Mowat-Wilson 症候群の遺伝型と表現型の関連—自験例から. 中国四国小児科学会 (広島) 2010.10.28.

Yamada Y, Yamada K, Mizuno S, Furuya N, Matsuo M, Urano M, Hiraki Y, Kurosawa K, Saito K, Wakamatsu N: Novel mutations of ZFHx1B responsible for the typical cases of Mowat-Wilson syndrome. Annual

Meeting of the American Society of Human Genetics
(Washington DC, USA) 2010.11.5.

山田裕一, 山田憲一郎, 水野誠司, 古谷憲孝, 松尾
真理, 浦野真理, 平木洋子, 秋丸憲子, 松田圭子,
岡本伸彦, 黒澤健司, 斎藤加代子, 若松延昭:
Mowat-Wilson 症候群典型例にみられた新しい
ZFX1B 遺伝子変異. 日本生化学会日本分子生物
学会合同大会 (神戸) 2010.12.10.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

- 1 特許取得
なし
- 2 実用新案登録
なし
- 3 その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

レポーターノックインマウスを用いた、Mowat-Wilson 症候群の原因遺伝子 SIP1 の
発現解析と疾患モデルマウス脳が発現タンパク質の解析
研究代表者 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

研究要旨

Mowat-Wilson 症候群は、SIP1 タンパク質をコードする片側の ZFH1B(ZEB)遺伝子のナンセンス変異、フレームシフト変異あるいは欠失などの機能喪失変異により発症する疾患である。本症候群の 3 主徴の 1 つである重度精神遅滞の病因は未だ不明である。本研究では、重度精神遅滞の病因解明をめざして *Zfhx1b* のレポーターノックインマウスを作製した。同マウス脳解析により、Sip1 は胎生時期から成獣時期に至るまで主に海馬と歯状回で発現していた。このことは、ヒトにおいても SIP1 は海馬と歯状回の形成と機能維持に関与していることを示唆する。一方、胎生期のマウス脳解析を行い、Sip1 ヘテロ欠失マウス脳で変動しているタンパク質を同定した。同タンパク質は酵素免疫法を用いた出生時診断への応用の候補タンパク質である。今後は、本症候群のモデルマウス（Sip1 ヘテロ欠失マウス）の海馬と歯状回について、レポーターノックインマウスを用いた形態学的研究や異常発現タンパク質の同定を行うことが、病因解明に重要と考えられる。

共同研究者

東 雄二郎、中西 圭子、西崎 有利子

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

A. 研究目的

Mowat-Wilson 症候群の原因遺伝子である Smad Interacting Protein-1（以下 SIP1 と略す）は、zinc finger ドメインやホメオドメイン、さらに TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達を担う Smad 等、他の幾つかの因子との相互作用部位をもつ転写因子である。SIP1 は、発生過程における前脳、中脳、終脳の神経板及び神経堤由来の末梢神経、海馬や大脳皮質に発現し、そのノックアウトマウスでは、神経管の閉鎖障害、神経堤細

胞の移動の停止、海馬や脳梁の欠損が見られるなど、神経系組織の形成に必須の遺伝子である。

Mowat-Wilson 症候群は精神遅滞、特異な顔貌、小頭症を呈する先天異常症候群の一つであるが、中でも重度知的障害を伴う精神発達遅滞は全ての患者において観察され、その病因の解明と治療へ向けた研究は重要である。そこで本研究においては、まずその第一歩として SIP1 の脳内における発現の場所とその動態を詳細に解析することを目的とした。

B. 研究方法

1. SIP1 タンパクの発現解析

SIP1 タンパクの発現を組織上で観察するためには、通常 SIP1 に対する抗体を用いて免疫染色

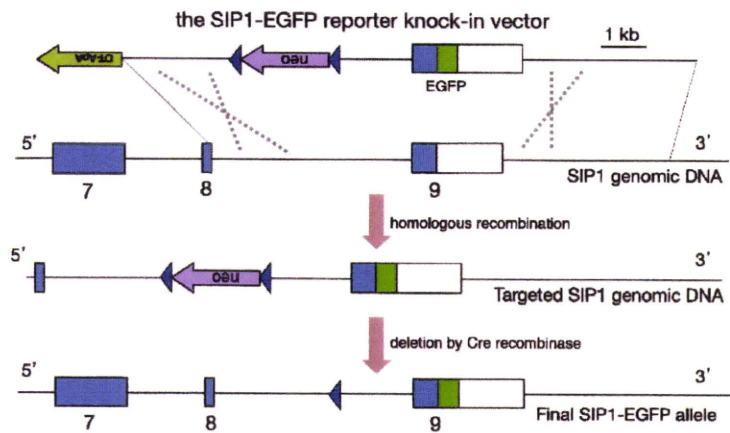


図1 レポーターノックインマウスの作製

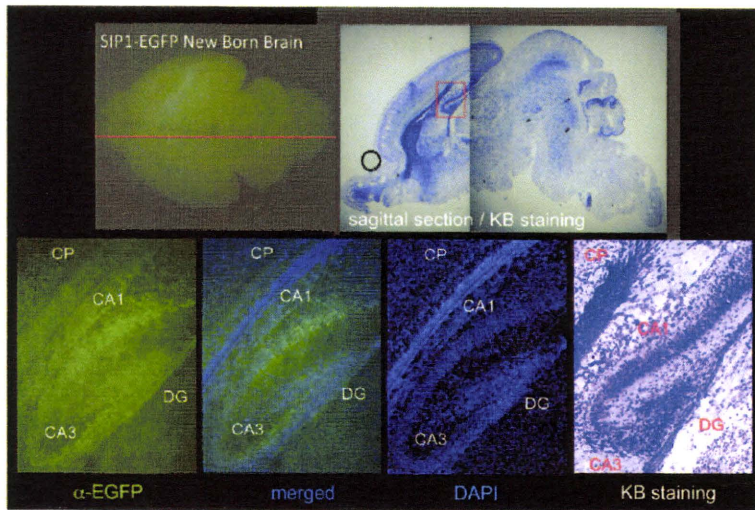


図2 新生仔脳の花馬における SIP1-EGFP の発現

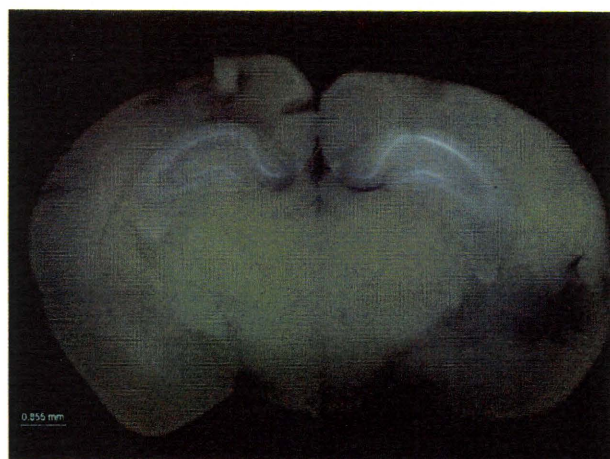


図3 8週齡の脳における SIP1-EGFP の発現
(白く見える部分である。SIP1 は海馬での発現が高い)

等を行うが、本因子は同じ ZFHX ファミリーに属する δ EF1 と比較的高い相同性を示すために、抗体そのものが、 δ EF1 と交差反応を起こし SIP1 の発現を厳密に捉えることが困難なことが多い。そこで SIP1 の発現細胞およびその細胞の特性、また外部シグナルに反応した細胞内局在等に関する SIP1 の動態について明らかにする目的で、SIP1 の遺伝子座に in-frame で GFP を挿入し、SIP1 の C 末端側に GFP を融合タンパクとして発現するレポーターノックインマウスを、標的遺伝子組み換えにより作成した。またこの作製したレポーターノックインマウスを用い、直接蛍光顕微鏡で EGFP の局在を観察するか、抗 EGFP 抗体を用いた免疫染色により SIP1 発現の解析を開始した。

2. *Zfx1b* (*Sip1*)ヘテロ欠失マウス脳において変動している遺伝子の同定:

胎生 15.5 日(E15.5)マウス仔獣(野生型と SIP1 ヘテロマウス)の脳と E17.5 の両マウスの海馬より TRIzol 試薬を用いて total RNA を抽出した。それを用いて、野生型と SIP1 ヘテロマウスにおいて発現量に差が認められる遺伝子を DNA マイクロアレイ法により検索した。

3. *Sip1* により転写制御をうける候補遺伝子の発現

3 つの候補遺伝子 (*Fgf9*, *Sfrp1*, *Ntf3*) (Nat Neurosci. 2009)が、幼若神経細胞において *Sip1* により転写制御を受けていると報告されている。そこで、これらの遺伝子の発現量を定量 RT-PCR 法により解析した。生後 0 日のマウス仔獣(野生型と *Sip1* ヘテロ欠失マウス)の海馬より抽出した total RNA をランダムプライマーで逆転写して、それぞれの cDNA ライブラリーを作製した。次に本 cDNA を用いて、3 つの遺伝子について定量 PCR 法で遺伝子発現量を決定し、野生型と *Sip1* ヘテロ欠失マウスで比較した。

C. 研究結果

1. レポーターノックインマウスの作製

図 1 に示した方法を用い、マウス ES 細胞を用いて、SIP1 遺伝子の最終エクソンにレポーターである EGFP を挿入したレポーターノックインマウスを作製した。

2. レポーターノックインマウスを用いた発現解析

SIP1-EGFP マウスを用いて、SIP1-EGFP の発現を経時的および組織特異的に観察するために、胎生 14 日から出生後 8 週齢までの幾つかの段階において、脳における発現を蛍光顕微鏡による直接観察や抗 EGFP 抗体を用いた免疫染色で観察した。

新生仔脳における発現は図 2 に示すように、海馬の CA1, CA3 と歯状回に発現し、その発現は核に局在していた。また海馬に加え、大脳皮質、嗅球の一部の細胞に発現が観察された。

さらに 8 週齢の SIP1-EGFP マウスを用いて、脳の coronal 断面を露出させ、蛍光顕微鏡下において観察した。図 3 に示すように海馬における発現は高い発現のまま維持されていることが明らかとなった。

3. *Zfx1b* (*Sip1*)ヘテロ欠失マウス脳において変動している遺伝子の同定

DNA マイクロアレイ法の結果を基にして、野生型と *Sip1* ヘテロ欠失マウスにおいて発現量に差が認められる候補遺伝子をリストアップした。これらの候補遺伝子の発現を定量 RT-PCR 法により順番に解析を行った。その結果、E15.5 の *Sip1* ヘテロ欠失マウス脳で *Shox2* 遺伝子が約 4 倍に増加、E17.5 の *Sip1* ヘテロ欠失マウス海馬で *Smt1* 遺伝子が約 2 倍に増加していた。

4. *Sip1* により転写制御をうける 3 遺伝子の発現解析

生後 0 日の *Sip1* ヘテロ欠失マウスの海馬における *Fgf9*, *Sfrp1*, *Ntf3* の発現量は、野生型と比較して優位な差は認められなかった。

D. 考察

現段階では、SIP-EGFP レポーターノックインマウスの作製が終わり、発現解析を開始したところであるが、新生仔の脳と 8 週齢の脳について若干の観察が行えた。その結果、新生仔の脳においては海馬 CA1 と CA3 領域と歯状回に発現が高いことが明らかとなった。また同様に 8 週齢の脳においても海馬と歯状回における SIP1 の発現は成熟個体になるまで維持されることが予想されるが、さらに種々の発達段階に沿って発現を見る必要がある。その他、新生仔の大脳皮質と嗅球において一部発現が観察されたが、これに関しては、皮質の表層か深層か等の点についてさらに詳しい解析が必要である。また海馬における高い発現は、ヒトのモワット・ウィルソン症候群における重度知的障害との関連性が予想されるが、この点に関しても今後の解析が必要である。

一方、疾患モデルマウス脳を用いたマイクロアレイ解析で胎生期に発現量が変動する 2 種類の遺伝子を同定した。しかし、論文で発表されている 3 遺伝子については、今回の研究で野生型と疾患モデルマウス間に優位な差が得られなかった。その説明として、1) Sip1 による種々の遺伝子の転写調節が脳の領域によってことなること、2) 胎生期の脳の形成や発達に伴って発現量が変動すること、が考えられた。現時点では、最も変動が激しかった Shox2 タンパク質をターゲットとした迅速診断の有効性が重要である。

E. 結論

1. SIP1 の発現する組織、細胞およびその細胞内局在、を確実にかつ容易に観察するための SIP-EGFP レポーターノックインマウスを作製することに成功した。
2. この SIP-EGFP レポーターノックインマウスを

用いて脳の発生および発達段階における SIP1 の発現解析を開始し、少なくとも新生仔と 8 週齢の脳においては、海馬と歯状回における発現が極めて高いことが明らかとなった。

3. このような発現パターンがヒトのモワット・ウィルソン症候群における重度知的障害との関連性があるのか、今後の解析が必要である。
4. モワット・ウィルソン症候群の疾患モデルマウス脳より、発現が変動しているタンパク質の同定した。同タンパク質のヒトの疾患における変動と脳以外での変動の有無を確認することが重要である。

文献

Seuntjens E, Nityanandam A, Miquelajauregui A, Debruyjn J, Stryjewska A, Goebbels S, Nave KA, Huylebroeck D, Tarabykin V: Sip1 regulates sequential fate decisions by feedback signaling from postmitotic neurons to progenitors. *Nat Neurosci* 12:1373-1380, 2009.

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
本年度、関連発表なし。
2. 学会発表
本年度、関連発表なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

- 1 特許取得
なし
- 2 実用新案登録
なし
- 3 その他
なし