

201128074A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 若松 延昭

平成 24 (2012) 年 3 月

目 次

I. 平成 23 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 部長	
III. 分担研究報告	
Mowat-Wilson 症候群の遺伝子診断	11
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、モワット・ウィルソン症候群の 原因遺伝子 SIP1 の発現解析	15
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	
ZEB2 の高感度測定法の開発とその臨床応用	19
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 症候群における成長ホルモン関連因子の血中濃度	23
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 症候群の身体計測値に関する研究	27
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 症候群患児の知的側面についての分析	31
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	

FIM (Functional Independence Measure) による Mowat-Wilson 症候群の ADL 評価	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	
モワット・ウィルソン症候群の患者・家族会の設立の支援	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 症候群のフォローアッププロトコール	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 主任部長	
Mowat-Wilson 症候群のコミュニケーション能力の実態把握および 支援法に関する研究	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 23 年度研究成果に関する刊行物一覧	53

[I]

平成 23 年度構成員名簿

平成 23 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	主任部長
	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
	西崎有利子	愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・周生期学部	リサーチレジデント
	西 恵理子	愛知県心身障害者コロニー中央病院・小児内科	医長
	浦野 真理	東京女子医科大学附属遺伝子医療センター	認定遺伝カウンセラー

(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）
総合研究報告書

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

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（MWS）は、病因遺伝子である *ZEB2 (ZFHX1B)* のハプロ不全により発症する疾患であり、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。平成 23 年度の本研究班では、昨年を引き続いて 1) MWS の出生時診断を目指した研究、2) 重度知的障害の病因に関する研究と 3) MWS 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。以上の研究から次の結果が得られた。1) 出生時診断を目指した *ZEB2* 高感度測定法の開発では、測定感度が 0.1pg までの測定系を確立した。2) レポーターノックインマウスを用いた解析では、新生仔と 8 週齢のマウス脳の海馬と歯状回に強い発現が見られた。出生時から成熟個体にまで本発現が維持されているので、同領域の発現量の低下が MWS の重度知的障害に関与すると考えられた。3) 7 例の MWS 症例における GH ならびにその関連因子の血中濃度の各ホルモンの測定値は健常対照者と比較し、有意差を認めなかった。4) 成長に伴う発達や情緒・行動面への実態調査では、言語発達については 16 例全員に発語はみられなかったが、指差し/身振りといったシンボル機能の獲得まで到達している症例が 2 例に見られた。長尾式言語評価において表出能力は低かった（0 ヶ月～11 ヶ月；歴年齢 3 歳～12 歳）が、人とのコミュニケーションの形成、さらに人への働きかけ、環境を理解・把握し事態を予測する能力は相対的に高い傾向があった（5 ヶ月から 18 ヶ月；歴年齢 3 歳～12 歳）。5) MWS の自然歴を把握し、QOL の向上にむけた、フォローアッププロトコルを作成した。6) 本研究班が主催した MWS グループ外来（愛知県心身障害者コロニー中央病院で開催）が口火となり、2011 年 11 月、都内で、3 家族（9 名）が集まり、「モワット・ウィルソン症候群家族会」（略称：MWS 家族会）準備会ならびに第一回家族会が開催され、2012 年 3 月 10 日には家族会・第一回総会が都立東部療育センターで開かれた。今後、本年度の研究成果を本研究班で作成した MWS 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、患者家族および家族会とその診断、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、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

西 恵理子

愛知県心身障害者コロニー中央病院

浦野 真理

東京女子医科大学附属遺伝子医療センター

A. 研究目的

Mowat-Wilson 症候群（以下、MWS）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 23 年度は、MWS 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。

1) ZEB2 変異解析：国内の医師からの依頼に応じて、MWS の病因遺伝子 ZEB2 (ZFHX1B) の変異解析を施行し、MWS の遺伝子診断を行う。その結果を担当医に報告し、MWS の加療と療

育に貢献する。

2) ZEB2 高感度測定法の開発：MWS の病因タンパク質である ZEB2 (ZFHX1B、SIP1) は、ZEB ファミリーに属する転写調節因子で、脳と神経堤細胞由来の器官の形成に参与している。ZEB2 は核内に局在し、主に標的遺伝子のプロモーターの ZF (ジンクフィンガー) ドメインに結合し、転写の抑制を行う。患者では片側のアリの ZEB2 遺伝子 (ZEB2) にナンセンス変異、フレームシフト変異、欠失などの機能喪失型突然変異が見られる。欠失はその領域が多様であり、同定が困難な症例も存在する。そこで、血中に漏出した ZEB2 を測定し、MWS の診断に応用する目的で、ZEB2 高感度測定法の開発を行った。

3) レポーターノックインマウスを用いた MWS の病因タンパク質 ZEB2 の発現解析：MWS の病因・病態の解明を目指して、本マウスを用いて ZEB2 の脳における発現を解析し、脳機能に関連する領域や担当細胞を明らかにする。

4) 血中各種成長ホルモンの測定：MWS では出生時より軽度の小頭症と成長障害が見られる。そこで、成長障害に関連する GH 関連因子群 (GH, GHRH, SRIF, IGF-1) の測定を行う。

5) 成長曲線と IQ/DQ：MWS の知能と身体の発達を解析し、成長曲線を作成する。

6) 成長に伴う発達や情緒・行動面への実態調査：前年度に実施した MWS の成長に伴う発達や情緒・行動面への実態調査の結果、コミュニケーション能力および生活能力の低さが際立ち、介護者の問題意識も強かった。そこで、平成 23 年度において、さらに詳細な実態把握、および支援法の検討を目的に調査を進める。

7) フォローアッププロトコル作成：MWS の自然歴を把握し、QOL 向上にむけた、フォローアッププロトコルを作成する。

8) MWS 家族会の設立：MWS は、重度精神遅

滞、特異な顔貌、小頭症を主徴とする先天性多発奇形症候群である。稀少疾患のため、患者・家族は疾患情報の入手が困難である。今回、患者家族への均一的な情報を提供する組織（患者・家族会）のニーズを調査し、患者・家族会設立の支援及び今後の医療・療育機関に対する本疾患の周知を図ることを目的とした。

B. 研究方法

1) ZEB2 変異解析：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 ZEB2 遺伝子 (ZEB2) の変異解析により行っている。研究代表者らは、解析依頼のある症例の ZEB2 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両親の書面による承諾を得てから行っている。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。PCR で欠失が疑われる症例は、黒澤研究分担者がアレイ CGH で欠失領域を決定する。以上の研究は発達障害研究所の倫理委員会の承認を得ている。

2) ZEB2 高感度測定法の開発：ZEB2 の N-末側 (aa 395-408) および C-末側ペプチド (aa 690-703) を合成し、ウサギに免疫することにより抗血清を得た。次いで、これらの抗血清から、抗原-セファロースを用い、アフィニティー精製 IgG を調製した。得られた抗体 IgG のペプシン消化を行い、Fab' を調整後、それぞれ β -D-ガラクトシダーゼ標識（検出用標識抗体）と DNP とビオチン標識（捕捉用標識抗体）をおこない、免疫測定系に供した。

3) MWS の病因タンパク質 ZEB2 の発現解析：ZEB2 の発現を、より容易に且つ類似体である deltaEF1 との cross reactivity を回避した形で観察するために、ZEB2-EGFP レポーターノックインマウス (ZEB2 locus に GFP

が in-frame で挿入されており、ZEB2 の C 末端に GFP が fusion タンパクとして発現される) を用いて、抗 EGFP 抗体、抗 ZEB2 抗体と種々の細胞種特異的なマーカータンパク質に対する抗体を用いた免疫染色により、ZEB2 発現の解析を行った。本年度は主に新生仔脳における発現を解析した。

4) 成長障害に関与する GH 関連因子群 (GH, GHRH, SRIF, IGF-1) の測定：患者血液を用いて、放射免疫法あるいは酵素免疫法で測定する。GH/SRIF/IGF-1 は血清、GHRH は血漿 (ACTH 測定用の採血管で ACTH 用と全く同様に、3 mL 採血し、直ちに血漿分離し) 凍結保存する。

5) 成長曲線と IQ/DQ：本研究班で行った ZEB2 の変異解析で診断が確立した症例のうち、発達検査を実施できた 12 例について、発達指数 (DQ) を算定し、分析を行った。MWS の患児では表出言語が認められない児が多いため、知能検査では測定できず、親への質問紙方式や非言語を用いた検査を実施した。また、出生時、1 歳、2 歳、3 歳と以後 3 歳毎の身長、体重、頭囲も解析する。

6) 成長に伴う発達や情緒・行動面への実態調：本検査には、長尾式発語前言語発達検査 (医師/言語聴覚士によって評価) および機能的自立度評価法 (FIM; functional independence measure) (保護者あるいはリハビリスタッフによる回答) を使用した。

7) フォローアッププロトコール作成：フォローアッププロトコールを作成するために、MWS の症例をまとめ、過去の文献からの考察を加えた。

8) MWS 家族会の設立：昨年度 (2011 年) 本研究班が主催した MWS グループ外来 (愛知県心身障害者コロニー中央病院で開催) に参加された患者・家族を対象に、「家族会」

のニーズについて聞き取り調査を行った。その結果、家族会の設立に向け、前向きな意見がきかれた。

C. 研究結果の概要

1) ZEB2 (*ZFHX1B*)変異解析：H23年度、新たに本症候群が疑われる9症例のZEB2変異解析依頼があり、解析の結果、2例に既知のナンセンス変異を同定し、3例は定量PCR法で欠失が疑われた。残りの疑似例4例には、遺伝子変異や染色体の微小欠失は認められず、Mowat-Wilson症候群ではないことが示唆された。以上より、研究代表者らは現在までにナンセンス変異22例、フレームシフト変異28例、欠失22例を同定した。

2) ZEB2高感度測定法の開発：非アフィニティー精製抗体を用いた測定系では、十分な感度は得られなかった。ZEB2抗体の結合能を検討した結果、結合能が非常に弱いことが分かった。そこで、抗体をアフィニティー精製した。アフィニティー精製したZEB2抗体を標識し、測定系の開発を行った。しかし、サンドイッチ測定は調製できなかった。そこで、個々の抗体の大腸菌で発現させて精製したりコンビナントZEB2との結合能を検討した所、N-末側抗体はZEB2と強く反応したが、C-末側抗体は、かなり弱い結合能であることが分かった。そのため、結合能の高いN-末抗体を用い、固相にZEB2を不溶化させた競合法を開発した。測定感度は、0.1pgであった。

3) MWSの病因タンパク質ZEB2の発現解析：新生仔脳におけるZEB2発現は、大脳皮質、海馬、間脳、嗅球の一部の細胞に発現が観察された。(1)大脳皮質におけるZEB2発現は、全層に広く見られた。中でも、Ctip2 (CoupTF2-interacting protein 2)が強く発現する第5層よりも深部の第6層の細胞群で

特に強く観察された。第5層におけるZEB2の発現量は多層と比較して低かった。OligodendrocyteのマーカーであるCC-1の発現は、2-3層、6層辺りに存在するZEB2発現細胞と一部重なるものが見られた。

(2)海馬における発現は、海馬CA1領域や歯状回ではZEB2-EGFPの発現とCtip2の発現細胞はほぼ一致した。海馬の脳室側の細胞は成熟した神経細胞マーカーであるNeuNを発現しており、これらの細胞は、ZEB2発現細胞と重なっていた。海馬CA1領域のすぐ上層に見られるSIP1-EGFP発現細胞層には、GFAPの発現が見られ、アストログリア細胞であると考えられた。(3)間脳におけるZEB2発現は、TH (Tyrosine hydroxylase)発現領域であるCLi(Caudal linear nucleus of the raphe)に隣接するMedian and Para-Median Raphe nucleus (MnR, PMnR)と考えられる領域に密集して見られた。

4) GHならびにその関連因子の血中濃度(mean±SE)：7例のMWS症例におけるGH(1.2±0.5ng/mL)、GHRH(32.1±5.2ng/mL)、SST(9.3±0.6pg/mL)、IGF-1(143.1±40.2ng/mL)の各ホルモンの測定値は健常対照者と比較し、有意差を認めなかった。

5) 成長曲線とIQ/DQ：DQ(実施年齢は1歳4か月～9歳2か月)の平均は27.75であった。DQの分布としては、DQ50～70(軽度発達遅滞)が1例(実施が1歳2ヵ月と1歳7ヵ月)、35～49(中度発達遅滞)は3例、20～34(重度発達遅滞)は4例、19以下(最重度発達遅滞)は4例となっており、その分布は中等度の発達遅滞以下にあり、知能の低い側へ偏っていることが明らかになった。MWSの身体の測定では、出生時の頭囲は32cm以下が10例、32-33cmが4例、33-34.5cmが4例であった。身長50cm以下が15例、50-52cmが4例、52-55cmが1例

であった。

6) 成長に伴う発達や情緒・行動面への実態調：言語発達について有用情報の得られた16名全員に発語はみられなかった。要求表現を全く持たないものが16名中2名、一方、指差し/身振りといったシンボル機能の獲得まで到達している児は16名中2名であった。長尾式言語評価において表出能力は低い(0か月～11か月；歴年齢3歳～12歳)。一方、人とのコミュニケーションの形成、さらに人への働きかけ、環境を理解・把握し事態を予測する能力は相対的に高い傾向があった(5か月から18か月；歴年齢3歳～12歳)。また、FIMに関する回答では、機能的自立度の総得点は126点満点中29～54点に分布していた。

7) フォローアッププロトコール作成：以下の項目に注目し、フォローアッププロトコールを作成した。先天性心疾患－心房中隔欠損、心室中隔欠損、動脈管開存、肺動脈狭窄、ファロー徴症などの合併例が多い。MWSを疑えば心エコーを含めた心奇形の精査が必要である。消化管疾患－Hirschsprung病の合併例が多い。MWSを疑えばHirschsprung病の精査を行い、合併があれば外科手術を行う。Hirschsprung病がない例でも慢性的便秘を合併することがある。泌尿器系－尿道下裂、停留精巢合併例がある。適切な時期に形成手術を行う。腎臓疾患－腎臓の形態異常、水腎症、膀胱尿管逆流症などがある。腎エコーや造影検査を行う。気道感染以外で熱発した場合、尿路感染症についての評価が必要である。神経系－大脳萎縮、脳梁欠損・低形成、脳室拡大などの合併がある。前頭側頭部低形成、側頭葉異形成、厚脳回、白質低形成などの異常も認める。頭部CTやMRI検査を行う。脳波異常、てんかんの合併例は多い。点頭

てんかん発症例もあり、乳児期から注意が必要である。発作型にあった抗てんかん薬治療を行う。発達－一般的にMWSでは精神運動発達遅滞は重度である。早期からの療育訓練が重要である。定期的な発達評価は必須である。行動面も特徴がある。手や指をなめたりかんだりなど、常同行動がみられる例がある。就学に際しては発達状況を考慮して特別支援教育を実施する。睡眠障害が多い。入眠困難や早朝覚醒の例がある。8) MWS家族会の設立：調査結果を踏まえ、担当主治医からの呼びかけに応じ、MWS患児・家族が、家族会設立への賛同が得られた。家族が中心となり、資料検索、関係者へ協力要請を開始した。2011年11月、都内で、3家族(9名)が集まり、「モワット・ウィルソン症候群家族会」(略称MWS家族会)準備会ならびに第一回患者・家族会が開催された。医療関係者の参加者は、3名で、当研究班分担研究者ならびに患者の主治医らであった。準備会では、当会の設立趣意、会則などが説明され、引き続き、第1回患者・家族会が開催された。その後、2012年3月10日には家族会・第一回総会が都立東部療育センターで開かれ、10家族が参加した。本研究班の研究代表者である若松が「モワット・ウィルソン症候群：診断と病因」のタイトルで講演を行い、活発な話し合いが行われた。

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、本年度は出生時診断を行うために ZEB2 の高感度測定法の開発に着手した。病因解明に関しては、症例の成長ホルモンの測定倫理委員会の承認を得て、行うことになった。さらに、ZEB2-EGFP レポーターノックインマウスを用いて、ZEB2 の発達に伴う発現部位を詳細に解析した。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より詳細なアンケート調査を行った。今後、研究成果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予定である。以下に、各研究課題毎に考察を記す。

1) ZEB2 高感度測定法の開発：ZEB2 の N-末側と C-末側の 2 種類の抗体を用いたサンドイッチ測定系の開発は達成できなかった。その原因としては、ZEB2 では作製した C-末側の抗原領域が立体的に障害（隠）されており、抗体と反応しない可能性が考えられた。今後は、リコンビナント ZEB2-FLAG をヒトの細胞 (HEK293) で発現させたのち、FLAG 抗体を用いて精製し、N-末及び C-末抗体価を評価し、再度、サンドイッチ測定系の開発を行う予定である。一方、今回、N-末を用いた競合測定法では、0.1pg の ZEB2 の測定が可能となった。

2) MWS の病因タンパク質 ZEB2 の発現解析：新生仔の脳においては脳皮質、海馬 CA1 と CA3 領域と歯状回に ZEB2 発現が高かった。同様に 8 週齢の脳の解析でも海馬と歯状回における発現量の増加を観察しており、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と考えられた。

3) GH ならびにその関連因子の血中濃度：7 例の MWS の測定値はコントロールと優位な差を認めず、本症における低身長は GH とその関連因子などによるホルモン分泌異常に由来するものではなく、IGF-1 情報伝達系あるい

は形態形成に關与するタンパクの発現異常に基づく可能性が示唆された。

4) 成長曲線と IQ/DQ : MWS の患児では重度の精神発達遅滞を伴うことが知られている。発達指数をまとめてみると、数値では DQ8~53 まで幅はあったが、発達の遅れは全員に共通しており、その障害の程度は重度のレベルであることが追認された。発達指数より、言語表出は喃語のみの患児がほとんどであり、要求の表出は泣く行動や指さしくらいまでの段階で、発達レベルに相応していると考えられた。要求等の表現が限られていることから、かんしゃくを起こしやすく、気分の波がある傾向に対して、親が児の訴えをうまくとらえられていないと感じることが多く、養育の難しさが窺われた。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が、同じように NSD1 遺伝子のハプロ不全で起こる Sotos 症候群の精神発達遅滞と比較を試みた。Sotos 症候群では、MWS と同様に、早期より知的障害と運動発達の遅れが見られるが、その程度は様々で、軽度から重度まで幅がある。Sotos 症候群の多くの患児は言語表出に困難さを伴うが、有意語の表出が認められる児がきわめて少ない本症候群とは大きく異なっていることがわかった。従って、発達遅滞の程度は MWS の方がより重度であり、日常生活において介助の必要性も大きいことが示唆された。身体の発達指標である成長曲線の作成には、様々な年齢における身体測定とプログラムソフトが必要であり、現在作成中である。

5) 成長に伴う発達や情緒・行動面への実態調：MWS 児は環境を理解・把握し事態を予測する能力が相対的に高い。この特性を生かし人や環境への働きかけを促す方法として、具体物の提示やサイン言語の導入な

どがあげられる。また、介護負担度の軽減のためにも環境整備や適切な介入・介護によって生活能力を向上させる一方、行政福祉サービスの充実が望まれる。

6) フォローアッププロトコール作成：フォローアッププロトコール作成により、各地の医療機関においてMWSの適切なフォローアップを行うことができる。合併症の早期診断、早期治療に役立てる情報となると考えられる。

7) MWS 家族会の設立：本分担研究では、本疾患の患者・家族会の設立にむけて、医療者の取り組み・サポートを行った。患者家族への均一的な情報を提供できるような組織、併せて、心理・社会支援が可能となる家族会の設立は、本疾患の周知を図り、次いで、早期介入、療育の開始など慢性難治疾患としての対策を講じうると期待される。

E. 結論

- 1) MWS の出生時診断を目指して ZEB2 の高感度測定法の開発を行った。0.1pg の ZEB2 の測定が可能となった。
- 2) MWS の重度知的障害の病因に大脳皮質、海馬と歯状回での ZEB2 の発現量の低下が示唆された。
- 3) 身体測定や発達指数 (DQ) に加えて、長尾式や FIM などの詳細な調査研究を行い、成長に伴う発達や情緒・行動面への実態が明らかになった。
- 4) フォローアッププロトコール作成した。
- 5) 本研究班の呼びかけにより、MWS 家族会が設立された。

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

水野誠司、西恵理子、村松友佳子、若松延昭：

Mowat-Wilson 症候群の耳介形態. 日本先天異常学会学術集会 (東京) 2011.7.22.

平木洋子、山田裕一、若松延昭：Mowat-Wilson 症候群の成長・発達における特性と課題. 日本小児神経学会中国・四国地方会 (岡山) 2011.7.23.

Yamada Y, Yamada K, Mizuno S, Nishi E, Ishihara N, Akimaru N, Urano M, Matsuda K, Okamoto N, Hiraki Y, Wakamatsu N: Molecular analysis of ZEB2 responsible for the Mowat-Wilson syndrome. International Congress of Human Genetics and Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Montreal, Canada) 2011.10.13.

富永牧子、古谷憲好、榎本啓典、岩崎陽子、今高城治、鈴木 宏、若松延昭、黒澤健司：欠失型 Mowat-Wilson 症候群の 2 症例. 日本人類遺伝学会／東アジア人類遺伝学会共同大会 (千葉) 2011.11.10.

山田裕一、山田憲一郎、水野誠司、西恵理子、石原尚子、今高城治、鈴木由香、鮫島希代子、秋丸憲子、松田圭子、岡本伸彦、平木洋子、若松延昭：Mowat-Wilson 症候群における ZEB2 遺伝子解析. 日本人類遺伝学会／東アジア人類遺伝学会共同大会 (千葉) 2011.11.10.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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 *ZEB2* (*ZFHX1B*) の異常により発症する。本年度は疑似例を含む新たな 9 症例について *ZEB2* を解析し、2 例に既知の同一変異 (R695X) を同定した。また、定量 PCR 法による欠失解析により、変異の認められない典型 3 症例に *ZEB2* の全欠失もしくは部分欠失が推測された。これまでに当研究室での遺伝子解析により、典型例 50 例に、ナンセンス変異 22 例とフレームシフト変異 28 例を同定し、22 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

口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、*ZEB2* 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少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、あらためて遺伝子解析を行って、病因遺伝子変異を同定した。

A. 研究目的

最近 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 *ZEB2* (*ZFHX1B*) であり、常染色体優性遺伝で片方の遺伝子のハプ

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症例 9 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、*ZEB2* 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、染色体の微小欠失部位を推定した。

C. 研究結果

症例 11-01

症例 11-01 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、*ZEB2* 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 1 から 10 の全欠失が推測された。欠失断点の詳細な分析はまだ行っていないが、*ZEB2* の全エクソンを含む染色体の微小欠失が病因と考えられた。

症例 11-02

症例 11-02 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、また定量 PCR 法による欠失解析でも異常は認められなかった。症例は典型例とはいえ、Mowat-Wilson 症候群ではないと考えられた。

症例 11-03

症例 11-03 は、遺伝子変異が同定できず、また定量 PCR 法による欠失解析でも異常は認められなかった。症例は典型例とはいえ、Mowat-Wilson 症候群ではないと考えられた。

症例 11-04

症例 11-04 では、遺伝子変異は同定できなかったが、定量 PCR 法による欠失解析から、*ZEB2* の第 1 エクソンの部分欠失が推測され、Mowat-Wilson 症候群の病因と考えられた。

症例 11-05

症例 11-05 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、*ZEB2* の第 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 11-06

症例 11-06 は、遺伝子変異が同定できず、また定量 PCR 法による欠失解析でも異常は認められなかった。症例は典型例とはいえ、Mowat-Wilson 症候群ではないと考えられた。

症例 11-07

症例 11-07 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 9 例報告している。

症例 11-08

症例 11-08 は、遺伝子変異が同定できず、また定量 PCR 法による欠失解析でも異常は認められなかった。症例は典型例とはいえ、Mowat-Wilson 症候群ではないと考えられた。

症例 11-09

症例 11-09 では、症例 11-07 と同一のナンセンス変異 (2083C>T, R695X) が同定された。Mowat-Wilson 症候群で 10 例目の報告となった。

D. 考 察

Mowat-Wilson 症候群の病因遺伝子が、*SIP1* をコードしている *ZEB2* (*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; Cecconi et al. 2008) がある。

永年、分析を進めてきたが、対象が疑似例に及び、変異の同定される確率が低下する傾向にあった。2009 年度より、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、2009-2010 年度の分析全例に原因遺伝子変異もしくは *ZEB2* の 1 部分を含む染色体の微小欠失を明らかにすることができた。本年度はまた敢えて疑似例を加えて分析したが、やはり典型例のみに遺伝子変異や微小欠失が認められた。

これまでに当研究室での遺伝子解析により、典型例 50 例に、ナンセンス変異 22 例とフレームシ

フト変異 28 例を同定し、22 症例に遺伝子の全欠失あるいは部分欠失を見出した。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。本年度 2 症例で同定したナンセンス変異 R695X はこれで 10 症例に見つかったこととなり、遺伝子変異の 20% にあたり ZEB2 変異のホットスポットと考えることができるかもしれない。

E. 結 論

Mowat-Wilson 症候群の疑似例を含む新たな 9 例の ZEB2 遺伝子解析を行い、2 例に既知の同一変異 (R695X) を同定した。また、定量 PCR 法による欠失解析により、変異の認められない典型 3 症例に ZEB2 の全欠失もしくは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.
- Dastot-Le Moal F, Wilson M et al. ZFH1B 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 ZFH1B 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 ZFH1B 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 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.
- Yamada Y, Yamada K, Nomura N et al. Novel mutations of ZFH1B 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 ZFH1B. *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 ZFH1B 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 ZFH1B

mutation associated with a mild Mowat-Wilson syndrome phenotype. *Am J Med Genet* 140A: 869-872, 2006.

F. 研究発表

1. 論文発表

本年度、関連発表なし。

2. 学会発表

Yamada Y, Yamada K, Mizuno S, Nishi E, Ishihara N, Akimaru N, Urano M, Matsuda K, Okamoto N, Hiraki Y, Wakamatsu N: Molecular analysis of *ZEB2* responsible for the Mowat-Wilson syndrome. International Congress of Human Genetics and Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Montreal, Canada) 2011.10.13.

富永牧子, 古谷憲好, 榎本啓典, 岩崎陽子, 今高城治, 鈴木 宏, 若松延昭, 黒澤健司: 欠失型

Mowat-Wilson 症候群の2症例. 日本人類遺伝学会/東アジア人類遺伝学会共同大会 (千葉) 2011.11.10.

山田裕一, 山田憲一郎, 水野誠司, 西恵理子, 石原尚子, 今高城治, 鈴木由香, 鮫島希代子, 秋丸憲子, 松田圭子, 岡本伸彦, 平木洋子, 若松延昭: Mowat-Wilson 症候群における *ZEB2* 遺伝子解析. 日本人類遺伝学会/東アジア人類遺伝学会共同大会 (千葉) 2011.11.10.

G. 知的財産権の出願・登録状況

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、モワット・ウィルソン症候群の
原因遺伝子 SIP1 の発現解析
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 ZFHX1B(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。同マウス脳の解析により、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、胎生期のマウス脳の解析を行い、Sip1 へ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 へテロ欠失マウス）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
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所

A. 研究目的

モワット・ウィルソン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。モワット・ウィルソン症候群の病因・病態の解明を目指して、同症候群の原因遺伝子である SIP1 の脳内における発現を解析する。特に、どのような機能を担う領域、細胞であるかを特定する。

B. 研究方法

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。SIP1 タンパクの発現を、より容易に且つ類似体である δ EF1 との cross reactivity を回避した形で

観察するために、SIP1-EGFP レポーターノックインマウス (SIP1 locus に GFP が in-frame で挿入されており、SIP1 の C 末端に GFP が Fusion タンパクとして発現される) を用い、抗EGFP抗体と種々の細胞種特異的なマーカータンパクに対する抗体等を用いた免疫染色により SIP1 発現の解析を行った。今回は主に新生仔脳における発現を解析した。

C. 研究結果

新生仔脳における発現は、大脳皮質、海馬、間脳、嗅球の一部の細胞に発現が観察された。

(1) 大脳皮質における発現は、全層に広く見られた。中でも、Ctip2 が強く発現する第5層よりも深部の、第6層の細胞群で特に強く観察された。第5層における SIP1 の発現は多層と比較して低く、Ctip2 の発現と重ならないものも多かった。Oligodendrocyte のマーカーである CC-1 の発現は、2-3層、6層辺りに存在する SIP1 発現細胞と一部重なるものが見られた。

(2) 海馬における発現は、海馬 CA1 領域や歯状回では SIP1-EGFP の発現と Ctip2 の発現細胞はほぼ一致した。海馬の脳室側の細胞は成熟した神経細胞マーカーである NeuN を発現しており、これらの細胞は、SIP1 発現細胞と重なっていた。海馬 CA1 領域のすぐ上層に見られる SIP1-EGFP 発現細胞層には、GFAP の発現が見られ、アストログリア細胞であると考えられた。(図1)

(3) 間脳における発現は、TH (Tyrosine hydroxylase) 発現領域である CLi (Caudal linear nucleus of the raphe) に隣接する Median and Para-Median Raphe nucleus (MnR, PMnR) と考えられる領域に密集して見られた。TH を発現している CLi にも、若干の SIP1 陽性細胞が存在し、これらは核及び細胞質にも発現が見られた。また Raphe nucleus におけるセロトニン陽性細胞の一部と重なって観察された。(図2)

D. 考察

現段階では、新生仔の脳について詳細な観察が行えた。その結果、新生仔の脳においては大脳皮質、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。また予試験的な結果ではあるが、8 週齢の脳においても同様に海馬と歯状回における発現が高いことを観察している (現在、再確認中である)。おそらく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。

E. 結論

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。同マウス脳の解析により、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、胎生期のマウス脳の解析を行い、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。

文献

Seuntjens E, Nityanandam A, Miquelajauregui A, Debruyne 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.