

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09062

研究課題名(和文) 巨大結腸症を呈するモワット・ウィルソン症候群類似疾患の新規病因遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of novel causal genes in patients clinically diagnosed with Mowat-Wilson syndrome presenting Hirschsprung disease

研究代表者

山田 憲一郎 (Yamada, Kenichiro)

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・遺伝子医療研究部・主任研究員

研究者番号：30291173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、モワット・ウィルソン症候群(MOWS)が疑われる173症例のZEB2変異解析を行ってきた。ZEB2に異常が同定できなかった60症例の中に、MOWSと症状の類似する疾患が含まれている可能性を考え、17例のエクソーム解析を行った。その結果、未同定だったZEB2変異1症例と、2症例にTBX1遺伝子の同一のミスセンス変異を同定した。同定したTBX1遺伝子のミスセンス変異は、velo-cardio-facial syndrome (DiGeorge症候群)患者で報告されている変異と同一であったが、本症例では既報の症例とは異なる症状が見られ、本変異による症状の多様性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、MOWSと診断される症例の中に、DiGeorge症候群の患者が含まれる可能性があることが明らかとなった。MOWSやDiGeorge症候群の患者には、主症状のほかに、合併する症状とその組み合わせに多様性があり、非典型例の診断には困難を要する。本研究で同定された2症例には、既報のTBX1ミスセンス変異症例では報告のない症状が見られたため、本変異による症状の多様性が明らかになるとともに、DiGeorge症候群の非典型例の臨床的な診断の難しさが明らかとなった。すなわち、多くの症状を合併する疾患では、未同定の非典型例がまだ残されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mowat-Wilson syndrome (MOWS) is a congenital disorder characterized by intellectual disability, epilepsy, microcephaly, characteristic facial features, and multiple congenital anomalies including Hirschsprung disease. MOWS is an autosomal dominant disorder caused by a loss-of-function mutation in the ZEB2 gene. We have already identified ZEB2 mutations in 113 (65.3%) among 173 patients. However, the finding that approximately one-third of the patients with suspected MOWS showed uncertain etiology prompted us to hypothesize that there may be another causative gene. Therefore, we applied genomic microarray and whole exome sequencing, and successfully identified a same mutation in the TBX1 gene in two cases. The G310S mutation had previously been reported as a causative mutation of DiGeorge syndrome (DGS). The current cases presented a different combination of clinical features from the previously reported cases, revealing the diversity of symptoms of this mutation.

研究分野：生化学

キーワード：精神運動発達遅滞 特徴的な顔貌 モワット・ウィルソン症候群 ZEB2 TBX1 DiGeorge症候群

## 1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループは、重度の知的障害、特異的な顔貌、小頭症、巨大結腸症と先天性心疾患を呈するモワット・ウィルソン症候群 (MOWS) の症例から、本症の病因遺伝子が *ZEB2* 遺伝子 (*ZEB2*) であることを世界で初めて明らかにした (引用文献 1)。以後、国内外から MOWS が疑われる症例の遺伝子解析の依頼を受け、本研究の申請時には 150 例を超える症例の *ZEB2* 変異解析を行っていたが、その中の MOWS に臨床所見が類似する 60 症例では、*ZEB2* に異常が同定できなかった。MOWS では、知的障害と特徴的顔貌は全症例に見られるが、他の小頭症、てんかん、巨大結腸症などの症状は様々な頻度で見られ、*ZEB2* に異常が見られる症例でも症状は症例ごとに多様である。そのため、我々が蓄積している症例の中には、症状が類似しているが、*ZEB2* が病因遺伝子ではない症例が含まれるのではないかと考えられた。すなわち、未診断の症例のエクソーム解析を行うことで、*ZEB2* とは異なる新規遺伝子が病因である未知の疾患を同定できるのではないかと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、*ZEB2* に異常はないが、MOWS に臨床所見が類似する未診断の症例の病因遺伝子を明らかにすることである。さらに、MOWS と類似の症状を呈する未知の疾患の存在を、その病因遺伝子を同定することによって明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

対象となる症例は、MOWS と類似の症例であるため、1) 顕性疾患である可能性が高い、2) 孤発例であり、3) 両親のゲノムがないまたは得るのが難しい、などの通常のトリオ解析には適さない症例であった。また、新規の病因遺伝子である場合、兄弟例がないため、通常のトリオ解析では単一の病因候補遺伝子に絞ることは困難であることが想定された。そこで、対象症例の中に同じ疾患が含まれている場合、同じ病因遺伝子に原因となるような異常が同定されると考え、解析可能な 17 症例の全エクソーム解析を行い、それぞれの症例の候補遺伝子のリストを、症例同士で様々な組み合わせで比較し、複数の症例に共通して異常が見られる遺伝子の抽出を試みた。

得られた候補遺伝子の異常を再現した発現ベクターを作成した。同ベクターを培養細胞に導入し、同定した異常によるタンパク質機能の低下を検索した。

## 4. 研究成果

### 他施設で指摘されたゲノム異常の確定

共同研究者の協力を得て、*ZEB2* に異常が同定されていない症例 17 例の全エクソーム解析を行った。並行して、当施設の臨床医らとともに現在の担当医に再度連絡をとり *ZEB2* に異常が同定されていない症例のフォローアップを行い、他施設において染色体検査や他の遺伝子解析が行われているなど、対象症例の現在の状況を確認した。本研究で行った全エクソーム解析の結果と合わせて、以下の微細な染色体欠失例 2 例が明らかになった。1) 5 番染色体短腕の微細欠失、2) *FOXG1* 遺伝子を含む微細欠失。また、1 例には、*AUTS2* 遺伝子の機能喪失型変異が見られ、Mental Retardation Autosomal Dominant 26 と診断された。これらの 3 例は、他機関において指摘されていたゲノムの異常を改めて確定することができた。

### *ZEB2* 遺伝子異常の再検索

次に、残りの 14 症例の全エクソーム解析の結果を用いて、まず *ZEB2* の異常を再検索した。その結果、1 例に以前のサンガー法では検出できなかった *ZEB2* の異常を同定した。新たに PCR プライマーを設計して検出した変異をサンガー法により確認し、本症例を MOWS 症例であると確定した。

### 全エクソーム解析から候補遺伝子の同定

残りの 13 症例から得られた全エクソーム解析結果の候補遺伝子リストから、以下の条件で候補遺伝子を絞り込んだ。また、報告例のない候補遺伝子の場合、複数の症例で同じ遺伝子に異常が見られることで絞り込みを行った。

- 1) 精神運動発達遅滞の病因遺伝子として報告がある遺伝子。
- 2) 片側の染色体に機能喪失型異常がある遺伝子 (ヘテロ接合性)。
- 3) 片側の染色体にミスセンス変異が見られるもの (ヘテロ接合性)。

4) 両アリルに機能喪失型またはミスセンス変異が見られるもの(ヘテロコンパウンド)  
 5) 本症で想定される発症機序の一つである神経堤細胞の分化及び遊走に与ることが明らかとなっている遺伝子のリストを、マウスモデルやヒトのデータベース及び文献情報を用いて、独自に作成した。その遺伝子リストに合致するもの。

1 症例に、巨大結腸症の病因遺伝子の一つである *RET* (ret proto-oncogene) の片側アリルにミスセンス変異を引き起こす多型(c.788A>G, p.Tyr263Cys)を同定した。この多型は、健常人のゲノムデータベース gNOMAD において報告がないため、本症例の病因となる異常である可能性が考えられた。しかし、NCBI ClinVar において症状との関連が Uncertain-Significance として登録されている多型(rs1837736594)であり、さらに Tyr263 は、Cadherin domain と RET Cadherin like domain 3 の繋ぎ目に位置し、直接 RET タンパク質の機能ドメインに含まれるアミノ酸ではなく、また、他の症例には本変異は見られなかった。以上より、本ミスセンス変異を本症例の病因として決定することはできなかった。

#### TBX1 遺伝子ミスセンス変異の同定と変異が及ぼすタンパク質機能への影響

17 症例中の 2 症例に共通して、*TBX1* 遺伝子にミスセンス変異(c.928G>A, p.Gly310Ser (G310S))を同定した。ゲノム DNA より PCR により変異部分を増幅し、サンガー法により変異を確認した。本変異は 2 症例ともに片側アリルに変異が見られるヘテロ接合性であった(図 1)。

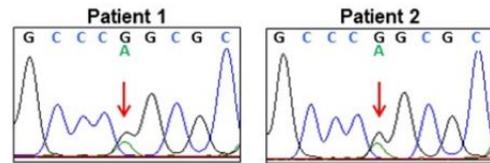


図1 症例のTBX1ミスセンス変異(c.928G>A, p.Gly310Ser (G310S))

DiGeorge 症候群(DGS)は、特徴的な顔貌、心疾患、知的障害を呈し、第 22 番染色体の欠失(22q11.2 deletion)が病因となる遺伝性疾患である。*TBX1* は、22q11.2 欠失領域に含まれ、顔貌の特徴と心疾患の主要な責任遺伝子として考えられている。同定したミスセンス変異(G310S)は、特徴的な顔貌、心疾患を呈する velo-cardio-facial syndrome (VCFS) の症例で報告された変異と同一であった。次に、本変異が de novo の変異であるのかを確かめるため、入手できた症例 1 の両親の *TBX1* のシーケンス解析を行った。その結果、共通に見られた G310S 変異は症例 1 の父親(無症状)にも見られた。すなわち、本変異が本症例の病因となる異常であるのか不明瞭であった。そこで、症例 1 と父親には未同定の違いがあるのではないかと考えて、エクソーム解析では、対象となっていない *TBX1* のプロモーター領域の解析を行った。症例 1 と父親は、同様にヘテロ接合性の+226 の T>C (rs5748417)、+307 の G>A (rs5748418) の多型(両方とも多型頻度は約 30%)が確認されたが、症例 1 と父親に特に違いは見られなかった。この多型は症例 2 でも同様であった。

c.928G>A の変化は、新たにスプライシングジャンクションを形成する可能性がある変化である。そこで、野生型と c.928G>A の exon 4-9 を含む領域を pCI-neo ベクターに連結した mini-Gene を作製し、HEK293 細胞に導入した。培養細胞より total RNA を抽出して、RT-PCR を行った。内在性の *TBX1* 転写産物と区別するため、片側のプライマーにはベクターの配列を用いて PCR を行った(図 2)。

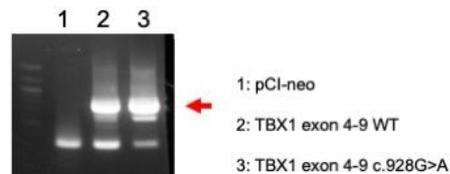


図2 c.928G>A mini-geneのRT-PCR解析

c.928G>A の mini-Gene でも野生型と同様に転写産物が得られ、そのバンドの配列は、野生型と同一であった。すなわち、c.928G>A は、スプライシングの異常を引き起こす変異ではないことが明らかとなった。

*TBX1* タンパク質(isoform C)は N 末端側に DNA-binding T-box domain を持つ転写因子である。C 末端側には、まだ機能ドメインは同定されておらず、立体構造もはっきりしていない。310 番目の Gly は、T-box domain から 13 アミノ酸下流で、T-box domain と C 末端側のペプチド鎖のジョイント部分に位置していると考えられた。そこで、タンパク質立体構造を予測する AlphaFold を用いて、野生型と G310S ミスセンス変異の *TBX1* の立体構造を比較したところ、C 末端側のペプチド鎖と T-box domain との位置関係に顕著な変化が見られた。*TBX1* は、いくつかの因子と結合することが報告されている。そこで、この構造変化が他の因子との結合に影響を与えるのではないかと考えて、文献的に *TBX1* との結合が示唆されている *HOXD10*、*SMARCD1* との免疫沈降実験を行った。しかし、様々な条件を検討したが、野生型の *TBX1* でも、*HOXD10*、*SMARCD1* との結合を示す結果は得られなかった。次に *TBX1* とターゲット遺伝子の転写制御を競合することが報告されている *SETD7* との相互作用について解

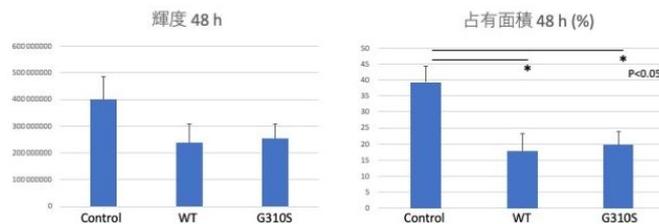


図3 TBX1-FLAG + MYC-SETD7 の細胞増殖に対する抑制効果

この構造変化が他の因子との結合に影響を与えるのではないかと考えて、文献的に *TBX1* との結合が示唆されている *HOXD10*、*SMARCD1* との免疫沈降実験を行った。しかし、様々な条件を検討したが、野生型の *TBX1* でも、*HOXD10*、*SMARCD1* との結合を示す結果は得られなかった。次に *TBX1* とターゲット遺伝子の転写制御を競合することが報告されている *SETD7* との相互作用について解

析を行った。TBX1 と SETD7 を同時に HEK293 細胞に導入すると細胞増殖が抑制される。そこで、SETD7 と、TBX1 野生型または G310S を同時に HEK293 細胞に導入（導入された細胞のみを検出するために、GFP も同時に導入した）し、48 時間後の細胞数（GFP の総輝度）および細胞占有面積（単位面積あたりの GFP が光っている面積）を測定した。野生型と G310S はコントロールと比較して細胞数、占有面積共に低下したが、野生型と G310S との間には有意差は見られなかった（図 3）。また、TBX1 と SETD7 を同時に HEK293 細胞に導入すると、TBX1 の導入量に比例して、SETD7 のタンパク質発現量が低下することを発見した。そこで、SETD7 の発現量低下に対する TBX1 の dose dependency を野生型と G310S で比較した（図 4）。しかし、野生型と G310S で図 4 中の近似直線の傾きに有意な差は見られなかった。

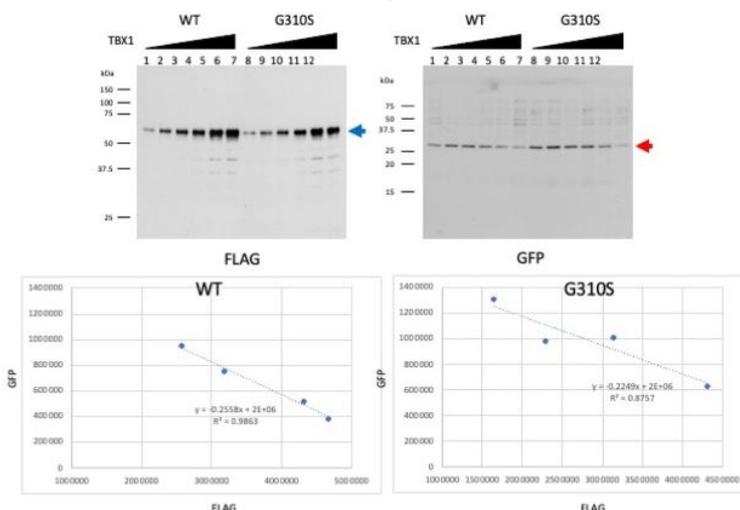


図4 SETD7の発現量低下に対するTBX1のdose dependencyを野生型と G310S で比較した（図 4）。しかし、野生型と G310S で図 4 中の近似直線の傾きに有意な差は見られなかった。

本研究では、G310S による TBX1 の機能異常を明確に示すことはできなかったが、他の研究グループから、1) T-box domain が結合する DNA 配列を用いたプロモーター活性測定において、G310S は野生型に比べて転写誘導活性が約 50% に低下すること、2) PITX2 と協力して行う *Pitx2c* 遺伝子の転写抑制活性が、G310S は野生型に比べて転写抑制活性が約 50% に低下することが報告され、G310S ミスセンス変異は、TBX1 の機能異常を引き起こす変異であると考えられる。（引用文献 2, 3）

TBX1 G310S ミスセンス変異が報告されている他の症例と本研究の 2 症例の症状の比較（引用文献 4, 5）

症例 1 は、非血族の健康な両親のもとに、在胎 36 週 6 日、普通分娩で生まれた女児である。出生時に肺閉鎖と二重出口右心室と診断され、生後 19 カ月で根治手術を受けた。いくつかの顔貌や、外形の特徴が観察された。内側に広がった眉毛、広く離れた目、膨らんだ上まぶた、広い鼻先、狭い口、中央が窪んだ肉厚な耳たぶ、両手の第 5 指が斜指状になっている細い指、両側鼠径ヘルニアが認められた（図 5）。発達の遅れが指摘され、DQ は、3 歳 5 か月で 46、5 歳 8 か月で 32 であった。便秘も見られた。2 歳時に臨床的に MOWS の疑いがあり、*ZEB2* 遺伝子解析を行ったが、*ZEB2* の異常は見られなかった。症例 1 には、*TBX1* G310S ミスセンス変異の他に、片側アリのルの 16 番染色体（16p13.11）の染色体欠失も同定された。FISH 法や、定量 PCR 法を用いて 0.75 Mb の欠失領域を決定した（図 6）。



図5 症例の表現型

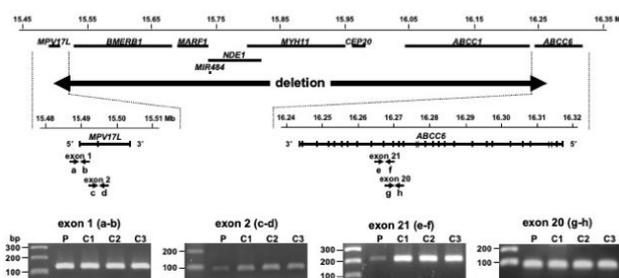


図 6 症例1の16番染色体欠失領域

症例 2 は、在胎 38 週、普通分娩で生まれた男性である。両親は非血族であり、父方の祖父母はいとこ同士であった。軽度の発達の遅れが指摘された。9 歳時の彼の知能指数は 54（タナカ・ビネー知能指数）であった。8 歳 11 か月の時、発熱を伴わない全身強直発作と脳波異常を呈した。43 歳時には、フェノバルビタールとカルバマゼピンによりてんかんをコントロールできている。小頭症、内側に広がった眉毛、深くセットされた目、下顎前突、高いアーチ状の口蓋、四角い鼻根、狭い鼻翼、細い指、および四肢の軽度の筋緊張低下を示した（図 5）。27 歳時に MOWS の疑いで、*ZEB2* 遺伝子解析を行ったが、*ZEB2* の異常は見られなかった。

症例 2 に比較して症例 1 では、知的障害が重度であり、低身長や VCFs 様の顔貌の特徴が見られる。症例 1 では、G310S に加えて、16p13.11 染色体欠失も認められている。症例 1 と同様に、

16p13.11 に欠失を持つ他の数名の症例も発達遅滞が報告されている。欠失領域に含まれる *NDE1*(OMIM \*609449)は、脳神経の発達に寄与することが明らかとなっている。*NDE1* のホモ接合性機能喪失変異は、小頭症および/または滑脳症につながる異常な神経移動を引き起こすことが報告されている。症例 1 では、欠失していない染色体上の *NDE1* に機能喪失型になるような変異は見られなかったが、*NDE1* のヘテロ接合性完全欠失が神経発達に影響を及ぼし、症例 1 の症状の重症化を引き起こしている可能性が示唆された。

報告されている他の G310S を持つ症例と本研究で明らかとなった 2 症例の症状をまとめた (Table1)。DGS/VCFS の症状は非常に多様であり、22q11.2 欠失の領域が同じ家族例でも症状が異なる場合が多く、Monozygotic twin でさえ症状が異なる場合がある。また、欠失が見られても無症状の家族員

も報告されている。また、*TBX1* 遺伝子の機能喪失型モデルマウス ( *Tbx1*+/- マウス )でも、心奇形の発生率は低い。すなわち、遺伝子型と症状の発生率の対応が低い疾患であることが明らかになっており、症例 1 の父も無症状の家族であると考えられる。G310S は、複数の健常人データベースにおいて 0.1-0.5% のアリル頻度で登録されている。本研究の症例は、

Table 1 Overview of phenotype in the present cases, patients with *TBX1* mutation, typical DGS, and MOWS.

	Patient 1 [present study]	Patient 2 [present study]	Yagi et al.	Xu et al.	Xu et al.
	2/34 (5.9%)				16/398 (4.0%)
Gender	F	M	M	M	M/F
<i>TBX1</i> mutation	G310S	G310S	G310S	G310S	G310S
Zygotes	Hetero	Hetero	Hetero	Homo	Hetero
Other genetic aberration	Δ16p13.11	-	-	-	-
Congenital heart defect	+	-	+	+	+
Hypocalcemia	-	-	+	-	-
Cleft palate	-	-	-	-	-
Velopharyngeal insufficiency	-	-	+	-	-
Short stature	+	-	-	-	-
Intellectual disability	+	+	-	-	-
Psychiatric disorders	n.a.	n.a.	-	-	-
VCFS facial gestalt	+	-	+	-	-
Hypoplastic thymus	-	-	+	-	-
Microcephaly	-	+	-	-	-
Seizure	-	+	-	-	-
Hirschsprung disease	-	-	-	-	-
Constipation	+	-	-	-	-
Characteristic facial appearance	+/-	+/-	-	-	-

MOWS 類似の症状を呈する症例を集めたコホートとして考えられ、G310S のアリル頻度は 2/34 (5.9%) であった。また、Xu らによる染色体異常を伴わない心疾患症例を集めたコホート研究での、G310S のアリル頻度は 16/398 (4.0%) であった。すなわち、G310S は、健常人の約 10 倍のアリル頻度で検出されていることから、*TBX1* G310S 変異は疾患の病因となりうるリスクファクターであると考えられた。

また、Xu らによる染色体異常を伴わない心疾患の症例の中には、ホモ接合性の G310S 症例が 1 例報告されているが、その症例は、ヘテロ接合性の症例よりも重度の心奇形が見られる。すなわち、G310S 変異による *TBX1* の機能異常に比例して心奇形が重症化していると示唆された。一方、ホモ接合性の症例も含めて、顔貌の特徴や精神遅滞は報告されていない。本研究で明らかになった 2 症例では、共に知的障害が見られた。以上から、G310S は、心疾患だけではなく知的障害と顔貌の特徴が主な臨床的特徴である症例でも、疾患原因の 1 つとなる可能性が示唆された。

本研究により、未診断であった 6 例の病因遺伝子を同定することができた。新規の病因遺伝子を発見することはできなかったが、*TBX1* 変異を持つ症例の臨床スペクトルを広げることができ、臨床における診断の根拠となりうる知見を増やすことができた。

#### 引用文献

1. Wakamatsu, N. et al. (2001). *Nat Genet*, 27(4), 369-370.
2. Castellanos, R. et al. (2014). *PLoS One*, 9(5), e95151.
3. Gao S. et al. (2015). *Hum Mol Genet*. 24:2330-48,
4. Xu YJ, et al. (2014). *N BMC Med Genet*. 15:78,
5. Yagi, H., et al. (2003). *Lancet*, 362(9393), 1366-1373.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林 深, 鈴木康予, 野村紀子, 福士大輔, 山田憲一郎, 稲葉美枝, 水野誠司
2. 発表標題 Mowat-Wilson症候群169例の解析により明らかになった多彩な疾患原因
3. 学会等名 第123回日本小児科学会学術集会（オンデマンド・ウェブ配信）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山田憲一郎, 林深, 若松延昭	4. 発行年 2021年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 3
3. 書名 ZEB2（関連疾患：Mowat-Wilson症候群）. 小児科診療.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------