

して発見された。この症例は生直後より特異な顔貌を呈し、いわゆる floppy infant であり、消化器、循環器、泌尿器と多臓器に先天異常を指摘されて染色体異常を強く疑われていたが、一般の高精度染色体分析では異常を指摘し得なかった。4歳6カ月の現在、発達を認めるものの発達遅延が顕著で、つかまり立ちはできない。当初は Goldberg & Sprintzen 症候群を疑われていたが、遺伝子解析により SIP1 遺伝子異常が確認された。若松、長屋らの報告している症例と比して多臓器の先天異常や発達遅延の程度より重症度が高いように思われる。臨床的観点からは SIP1 異常の症例に軽症型と重症型があるのか、いわゆる連続的なスペクトラムになっているのか、今後症例を重ねて検討して行く必要があると思われる。また、本症例の今後の経過に関しては prospective な観察が可能であり、注目される。

## 厚生科学研究費（脳科学研究事業）

### 分担研究報告書

東北・北海道地区におけるヒルシュスプルング病関連遺伝子異常検索の現状  
(アンケート調査報告)

分担研究者：大井 龍司（東北大学小児外科 教授）

研究協力者：天江 新太郎、石井 智浩、西 功太郎、吉田 茂彦、  
神山 隆道、仁尾 正記、林 富\*  
(東北大学小児外科、小児腫瘍外科\*)

#### 研究要旨

ヒルシュスプルング病に特徴的な顔貌（hypertelorism, strabismus, wide nasal bridge）と脳発育遅延（知的障害、運動発育遅滞、てんかん、小頭症）を伴う症候群（以下、本症候群）患児の北海道・東北地区における実態をアンケート調査により把握するために、北海道・東北地区の小児外科関連 36 施設に対してアンケート調査を行った。23 施設（63.9%）から回答がありヒルシュスプルング病の症例数は 457 例であった。特徴的な顔貌は 6 例（1.3%）であり、うち 5 例は知的障害と身体的発育遅滞を伴っているとの回答であった。この他、東北地区の小児科の医師より主任研究者へ 3 例の *ZFHX1B* 遺伝子解析の依頼があった。従って北海道・東北地区では現在のところ本症候群が疑われた症例は 9 例と考えられた。遺伝子異常が関連すると思われた症例は 8 例であり、同胞発生例が 4 例（2 家系）、中枢性低換気症候群合併例が 2 例、神経芽腫併発例が 2 例であった。しかし、北海道・東北地区では現在知られているヒルシュスプルング病関連遺伝子について異常が認められたとの報告は皆無であった。以上、北海道・東北地区では本症候群と考えられた患児は 9 例であった。今後これらの患児について詳細な検討と、各県の障害者療育施設（小児科）に対する再調査を行う必要があると考えられた。本地区においてはヒルシュスプルング病の遺伝子異常検索はこれからの課題であると考えられた。

#### A. 研究目的

近年、ヒルシュスプルング病はその病因として、複数の遺伝子の関与が明ら

かにされてきた。2001年には主任研究者らによって、新たにヒルシュスプルング病に特徴的な顔貌（hypertelorism, strabismus, wide nasal bridge）と脳発育遅延（知的障害、運動発育遅滞、てんかん、小頭症）を伴う症候群（以下、本症候群）の患児において Smad-interacting protein 1（SIP1）遺伝子の異常が報告された。今回の目的は、北海道・東北地区の主な小児外科施設において上記の症候群の実態を調査し、その患者数を把握することである。

また、上記に関連してヒルシュスプルング病関連遺伝子異常検索を目的に、当科におけるヒルシュスプルング病症例から、関連すると思われる症例を検索しその臨床像をまとめた。

## B. 研究方法

1. 北海道・東北地区の小児外科関連 36 施設に対して下記の A、B についてアンケート調査を行った。アンケート調査項目を以下に示す。

A) 今回発見された *ZFHX1B* (Smad-interacting protein 1) 異常に関連した調査

下記項目 1～5 においてそれぞれの症例数と、各項目における特徴的な顔貌を伴った症例、伴わない症例の内訳

1. 特徴的な顔貌 (hypertelorism, strabismus, wide nasal bridge) を伴った症例
2. 知的障害を認める症例
3. 身体的な発育障害を認める症例
4. 小頭症を認める症例
5. てんかんを併発している症例

B) 遺伝子異常が関連すると思われる症例の調査

1. 同胞発症例、中枢性低換気症候群（オンディーヌカース）合併例、神経芽腫併発例、その他の腫瘍（MEN2A, 2B など）併発例、Waardenburg 症候群合併例

2. すでに明らかにされている下記の遺伝子異常が同定できた症例

RET protooncogene、GDNF (glial cell line derived neurotrophic factor)、

ENDRB (endothelin-B receptor gene)、END 3 (endothelin-3 gene)、Sox10 gene

2. 当科におけるヒルシュスプルング病の検討

1967 年から 2001 年まで東北大学第二外科ならびに小児外科で経験したヒルシュスプルング病のうち、詳細な検討が可能であった症例は 174 例（男児 124 例・女児 50 例、病型：(ultra-)short segment 31 例、classical type 101 例、long

segment 30 例、entire colon 8 例、extensive 4 例) であり、これらを対象とした。これらについて、①本症候群に関連すると思われる症状(特徴的な顔貌・知的障害・発育障害・小頭症・てんかん)の合併、②遺伝子異常が関連すると思われる症例(同胞発症、中枢性低換気症候群、神経芽腫併発、その他の腫瘍併発、Waardenburg 症候群)、③遺伝子異常同定症例につき検索した。

### C. 研究結果

1-A, 北海道・東北地区の 36 施設に対してアンケート用紙を送付し 23 施設(63.9%)より回答を得た。各施設から回答のあったヒルシュスプルング病の症例数は 457 例であった。特徴的な顔貌は 6 例(1.3%)であり、これら 6 例のうち 5 例は知的障害と身体的発育遅滞を伴っているとの回答であった。この他、主任研究者へ宮城県の障害者療育施設と青森県の小児科より直接遺伝子検索の依頼があり、主任研究者より計 3 例の SIP1 欠損症と思われる患児の提示あった。1 例はすでに死亡、2 例は存命であるとのことであった。従って本症候群が疑われた症例は 9 例と考えられた。

1-B, 遺伝子異常が関連すると思われた症例は 8 例であった。同胞発症例が 4 例(2 家系)、中枢性低換気症候群合併例が 2 例、神経芽腫併発例が 2 例であった。しかし、北海道・東北地区では現在知られているヒルシュスプルング病関連遺伝子について異常が認められたとの報告は皆無であった。(表 1)

2, 当科における結果を述べる、1967 年から 2001 年まで東北大学第二外科ならびに小児外科で経験したヒルシュスプルング病のうち、詳細な検討が可能であった症例は 174 例(男児 124 例・女児 50 例)であった。

①について、知的障害を認める症例が 2 例あった。2 例とも特徴的な顔貌は認めなかった。知的障害の詳細(原因疾患など)については検索はなされていなかった。現在 2 例とも外来通院しておらず、現在の状況は把握できなかった。また、てんかんを有する症例を 1 例認めた。この症例は後にのべる神経芽腫併発例である。CT、EEG 上異常を認めていない。

②について、同胞発症例を 2 例(兄と 5 歳下の妹)認めた。家族歴に特記すべきことはない。病型はいずれも entire colon aganglionosis であった。両者について RET proto-oncogene、ENDRB 遺伝子を検索中であるが、現在までのところ RET の exon 15 に silent mutation を認めた以外には明らかな変異は認められていない。また神経芽腫併発例を 1 例認めた。家族歴に特記すべきことなし。病型は classic

type であった。神経芽腫に関しては 6 ヶ月マススクリーニング陽性例で右副腎原発、stage I、組織学的に高分化型神経節芽腫・嶋田分類の favorable histology、N-myc 非増幅、aneuploidy。右副腎腫瘍摘出術を行い再発なく経過良好である。この症例では遺伝子異常の検索はなされていない。③については該当症例を認めなかった。

#### D. 考察

北海道・東北地区における本症候群はアンケート調査で 6 例であったが、小児外科以外の施設からは本症が疑たがわれる 3 例があり、アンケート調査の範囲がいささか狭小であったと考えられた。本症候群のごとく知的障害や身体発育遅滞を伴う場合には小児外科以外の施設において加療されている場合があり、今後、本アンケートを北海道・東北地区の障害者療育施設にも送付するべきであると思われた。また、SIP1 遺伝子異常は特異的顔貌とヒルシュスプルング病はないものの便秘を伴う症例でも見られる場合があり、この点からも障害者療育施設への調査は実施すべきであると考えられた。

また、本症候群の特徴である顔貌の特定には hypertelorism, strabismus, wide nasal bridge という言葉のみでは不十分であり、疑われる症例について更に写真等での確認、頭位の測定による小頭症の証明が必要であると思われた。

今回のアンケートで北海道・東北地区ではヒルシュスプルング病における遺伝子異常を認めた症例は皆無であった。当科においても、積極的な遺伝子検索は施行していない。主な理由としては、ヒルシュスプルング病では遺伝子異常の検出率が高くないこと、外科医が臨床の傍らで検索を行うには煩雑であること、現段階では遺伝子異常の検出が治療方針、予後の判定に影響を与えないことがあげられる。しかし、遺伝子の検索を希望する患者への情報提供、病因の解明という観点からは、遺伝子異常の検索を効率良く行うシステムを構築する必要があると考えられた。

#### E. 結論

北海道・東北地区の小児外科施設におけるアンケート調査の 6 例と、主任研究員のもとへ直接報告された 3 例を含めると現在のところ、9 例の患児が本症候群であると考えられた。今後はこれらの症例についての詳細な検討と、各県の障害者療育施設に対する再調査を行う必要があると考えられた。

ヒルシュスプルング病に対する遺伝子異常を認めた症例は北海道・東北地区では皆無であった。遺伝子の検索を希望する患者への情報提供、病因の解明という観点からは、遺伝子異常の検索を効率良く行うシステムを構築する必要があると考えられた。

表 1 : 北海道・東北地区におけるアンケート調査結果

A. 今回発見された ZFHX1B (Smad-interacting protein 1) 異常に関連した調査		
1. 特徴的な顔貌 (hypertelorism, strabismus, wide nasal bridge) を伴った症例		6 例
2. 知的障害を認める症例		10 例
	うち特徴的な顔貌を伴った症例	6 例
	伴わない症例	4 例
3. 身体的な発育障害を認める症例		5 例
	うち特徴的な顔貌を伴った症例	5 例
	伴わない症例	0 例
4. 小頭症を認める症例		1 例
	うち特徴的な顔貌を伴った症例	1 例
	伴わない症例	0 例
5. てんかんを併発している症例		1 例
	うち特徴的な顔貌を伴った症例	0 例
	伴わない症例	1 例
B. 遺伝子異常が関連すると思われる症例の調査		
1. 同胞発症例		4 例
2. 中枢性低換気症候群 (オンディーヌカース) 合併例		2 例
3. 神経芽腫併発例		2 例
4. その他の腫瘍(MEN2A, 2B など)併発例		0 例
5. Waardenburg syndrome 合併例		0 例
6. すでに明らかにされている遺伝子異常が同定できた症例		
	RET (receptor tyrosine kinase protooncogene)	0 例
	GDNF (glial cell line derived neurotrophic factor)	0 例
	ENDRB (endothelin-B receptor gene)	0 例
	END3 (endothelin-3 gene)	0 例
	Sox10 (gene for a transcription factor)	0 例

## 厚生科学研究費（脳科学研究事業） 分担研究報告書

ヒルシュスプルング病孤発例に於ける遺伝子変異について

分担研究者：岡田 正（大阪大学医学部小児外科 教授）

研究協力者：草深 竹志、米田 光宏（大阪大学医学部小児外科）

### 研究要旨

ヒルシュスプルング病において、その成因に関わることが考えられている因子として、レセプター蛋白である RET、Endothelin-B receptor (EDNRB)、また EDNRB のリガンドである Endothelin-3 (ET-3)、さらに転写因子である Sox10 などがあげられている。今回これらの4種の因子をコードする遺伝子について、同疾患の孤発例における遺伝子異常の発現頻度、病型との関連について検討した。疾患の発生に関連することが考えられる遺伝子異常として、RET 遺伝子については、41 例のヒルシュスプルング病患者中 3 例に変異を検出した。これらの症例は 1 例が short segment 型、2 例が long segment 型であり、変異の出現率は 7.3%であった。EDNRB 遺伝子については、78 例のヒルシュスプルング病患者中 3 例で変異を検出した。これらの症例は 2 例が short segment 型、1 例が long segment 型であり、変異の出現率は 3.8%であった。一方、ET-3 遺伝子と SOX10 遺伝子については、それぞれ 41 例、61 例のヒルシュスプルング病患者について検討を行ったが、変異は検出されなかった。すなわち、ヒルシュスプルング病孤発例においては、約 10%の症例で RET 遺伝子や EDNRB 遺伝子の異常が疾患の成立に関連するものと思われたが、ET-3 遺伝子や、SOX10 遺伝子の異常は疾患の成立に関与することは稀であると考えられた。また、病型との関連については、RET 遺伝子異常は long segment 症例の発生とより関連があることが考えられ、一方、EDNRB 遺伝子異常は short segment 症例とより強い関連があるものと考えられた。SIP1 については、ヒルシュスプルング病以外に特異的な合併病変を示すため、近畿・中国地区でアンケート調査により症例を集積中であり、今後 SIP1 変異の解析を行う予定である。



## A. 研究目的

ヒルシュスプルング病は、新生児、乳児期に腸閉塞症状にて発症し、5,000 出生あたり 1 人の発生頻度を有する小児外科領域における代表的疾患である。多くは特発性に発生する孤発例であるが一部に家族内発生が見られる。病理病態像は、肛門側腸管における腸管壁内神経節細胞の欠損と腸管外からの外来神経線維の増生を特徴とし、無神経節腸管は収縮様の状態にあり、正常の弛緩がみられない。一義的には胎生初期の vagal neural crest に由来する enteric neuroblast の腸管壁内への移動、分化が不完全であることが病因であると考えられる。近年レセプター蛋白である RET、Endothelin-B receptor (EDNRB)、また EDNRB のリガンドである Endothelin-3 (ET-3) の正常な機能が enteric neuroblast の移動、分化の完了に必要なことが、これらをコードする遺伝子を破壊したマウスの系で示されている。また、転写因子である Sox10 についても、ヒルシュスプルング病に難聴、色素異常を合併する Shah-Waardenburg 症候群症例で遺伝子異常が報告されている。

そこでヒルシュスプルング病の中でも多くの割合を占める孤発例について、これらの遺伝子異常がどの程度の頻度で疾患の発生に関わり、また病変腸管の長さなど病型に関連する否かの検索を行った。また最近、知的障害、小頭症、特徴的な顔貌を伴うヒルシュスプルング病症候群 (SIP1 欠損症) が明らかになっており、これについては近畿・中国地区の小児外科認定施設を対象に、その患者数と臨床像を把握するためにアンケート調査を行った。

## B. 研究方法

### 1) 臨床検体

ヒルシュスプルング病症例より、手術標本 (切除腸管) あるいは血液を収集し、これらより DNA を抽出して、PCR のための template として用いた。また各患者を臨床所見より、病型ごとに分類した。

### 2) 検索対象遺伝子

RET、EDNRB、ET-3、SOX10 の各遺伝子について、収集した臨床検体を用いて遺伝子異常の検出を試みた。

### 3) 遺伝子変異の検出

各遺伝子の各エクソンに対応する primer 配列を用いて PCR を行った。遺伝子変異の検出には、single-strand conformational polymorphism (SSCP) 法を用い

た。この際、変異の検出率を上げるため、電気泳動法として discontinuous buffer system を用いた泳動法を使用した (Multiphor II system; Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)。SSCP 法にて変異の存在が考えられた検体については、direct sequencing 法にてその塩基配列を決定し、変異の詳細を明らかにした。

#### 4) SIP1 欠損症に関するアンケート調査

近畿・中国地方の小児外科認定施設を対象として、ヒルシュスプルング病と、知的障害、小頭症、特徴的な顔貌を合併する症例の経験について、郵送にてアンケート調査を行った。

### C. 研究結果

#### 1) RET 遺伝子異常 (Figure 1, Table 1)

RET 遺伝子については、41 例のヒルシュスプルング病患者について検討を行った。3 例でそれぞれ、TTC->TCC (Phe174Ser, exon 3)、TGC->TAC (Cys197Tyr, exon3)、A->G (exon 13 splice acceptor site) の変異を検出した。これらの症例は 1 例が short segment 型、2 例が long segment 型であった。変異の出現率は 7.3% であった。

#### 2) EDNRB 遺伝子異常 (Figure 2, Table 1)

EDNRB 遺伝子については、78 例のヒルシュスプルング病患者について検討を行った。3 例でそれぞれ、TGG->TAG (Trp275stop, exon 4)、T insertion (nucleotide 878, exon 4)、T->C (exon 3 splice donor site) の変異を検出した。これらの症例は 2 例が short segment 型、1 例が long segment 型であった。変異の出現率は 3.8% であった。

#### 3) ET-3 遺伝子異常 (Table1)

ET-3 遺伝子については、41 例のヒルシュスプルング病患者について検討を行ったが、変異は検出されなかった。

#### 4) SOX10 遺伝子異常 (Table 1)

SOX10 遺伝子については、61 例のヒルシュスプルング病患者について検討を行った。6 例に exon 3, codon 6 で GAT->GAC の silent mutation を認め、他の 2 例に exon 3 の下流の intron9 番目の塩基に C->G の変異を認めた。さらに codon 309 において、浸透率の高い CAT->CAC の polymorphism を認めた。しかし、いずれの変異もアミノ酸変化を来さないものであり、病因に関連すると思われる異常は検出されなかった。

#### 5) 既知の関連遺伝子の変異検出頻度

我々の検討では、検索した遺伝子異常を重複して有するものは認められず、有意の遺伝子異常であると考えられた RET 遺伝子、EDNRB 遺伝子いずれかの変異を有する頻度は 10%程度であった。

#### 6) SIP1 欠損症例

アンケート調査の結果は、現時点に於いて集計中であるが、若干の SIP1 欠損症を疑う症例の解答を得た。

### D. 考察

本研究では、ヒルシュスプルング病臨床例の中でも特に頻度的に大多数を占める孤発例において、病変発生への関連が考えられている 4 種の遺伝子について異常が検出されるか否か、また検出された場合その頻度はどの程度かを明らかにした。これによると RET 遺伝子、EDNRB 遺伝子では遺伝子異常が孤発例においても約 10%の症例に見られ、疾患の成立に関連するものと思われた。一方 ET-3 遺伝子や、SOX10 遺伝子の異常は silent mutation にあたるもののみであり、これらの遺伝子異常はヒルシュスプルング病の成立に関与することは、あったとしても極めて稀であると考えられた。

また、各遺伝子異常とヒルシュスプルング病の病型との関連であるが、本研究での結果では、RET 遺伝子異常が 2 例の long segment 症例、1 例の short segment 症例に見られた。一方 EDNRB 遺伝子異常は 1 例の long segment 症例、2 例の short segment 症例に見られた。EDNRB 遺伝子異常の long segment 症例の 1 例は、病変は下行結腸までのものであり short segment 症例に近いものと考えられる。他の海外からの報告と合わせて考えると、RET 遺伝子異常は short segment 症例にも見られるものの、long segment 症例の発生とより関連があることが考えられ、一方、EDNRB 遺伝子異常は short segment 症例とより強い関連があるものと考えられた。

ヒルシュスプルング病における成因について、種々の遺伝子異常の関与が指摘されるが、我々の検討でも RET 遺伝子、EDNRB 遺伝子変異が関与する症例が存在することが確認された。しかし、これだけではすべての症例の説明はできず、症例によっては他の遺伝子変異の関与や、腸管壁内の細胞外マトリックスの異常など他の因子の関与も考えるべきであると思われた。

SIP1 欠損症に関するアンケート調査については、若干の同症候群を疑う症例

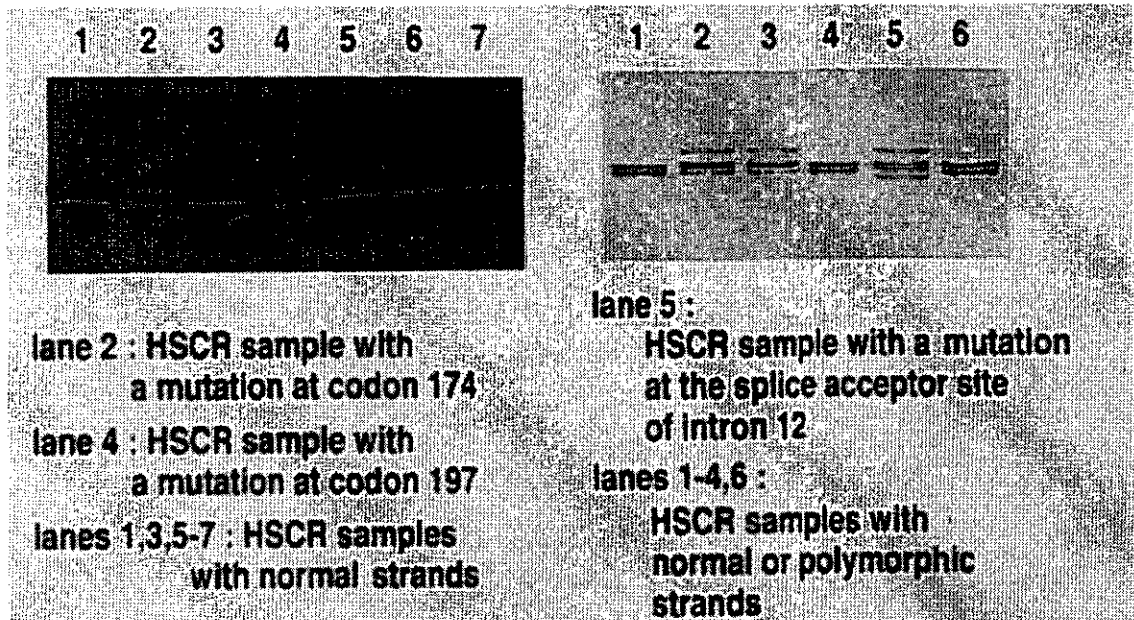
の解答を得ている。現在まだ集計中であるが、今後同症例の臨床像と SIP1 変異の解析により、さらに多様なヒルシュスプルング病の病因が明らかになることが期待される。

#### E. 結論

- 1) ヒルシュスプルング病孤発例における、RET、EDNRB、ET-3、SOX10 の各遺伝子の遺伝子変異の有無と、病型との関連を検討した。
- 2) RET 遺伝子、EDNRB 遺伝子では、約 10%の症例でこれらの遺伝子異常が疾患の成立に関連するものと思われたが、ET-3 遺伝子や、SOX10 遺伝子の異常は疾患の成立に関与することは稀であると考えられた。
- 3) RET 遺伝子異常は long segment 症例の発生とより関連があることが考えられ、一方、EDNRB 遺伝子異常は short segment 症例とより強い関連があるものと考えられた。

exon 3

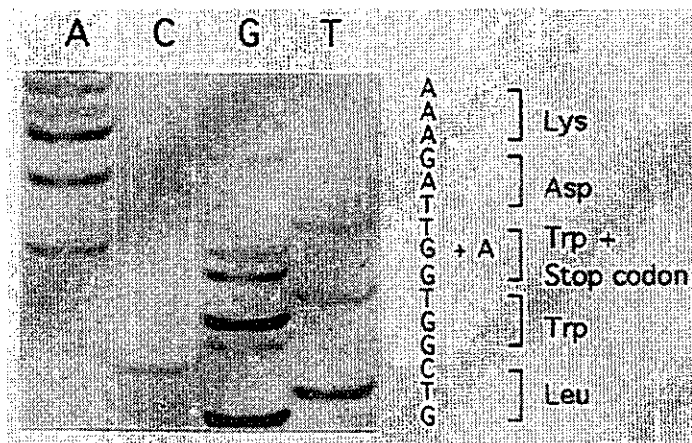
exon 13



### 図 1. RET 遺伝子異常 (SSCP)

exon 3 で 2 例(lane 2, 4)に、exon 13 で 1 例(lane 5)に正常あるいは polymorphism 由来とは異なる band shift を認めた。塩基配列の決定により、それぞれ TTC->TCC (Phe174Ser)、TGC->TAC (Cys197Tyr)、A->G (exon13 splice acceptore site)の変異を確認した。

m1



m2

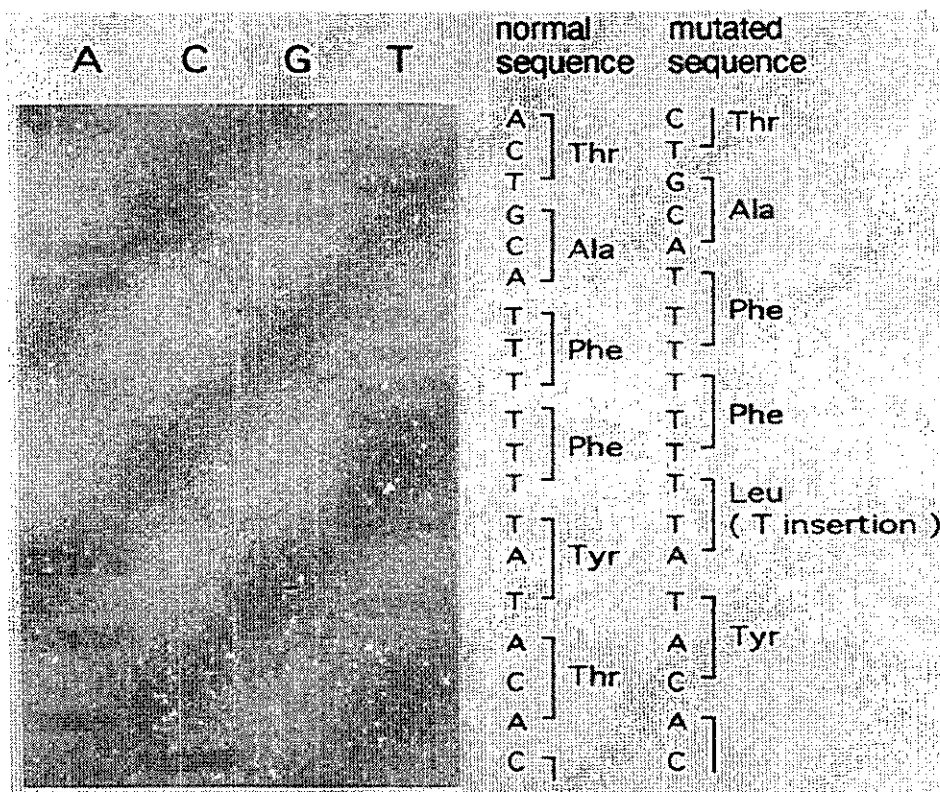


図 2. EDNRB 遺伝子異常

m1 は Tyr275stop、m2 は 878 での T insertion とそれぞれ確認された。

表 1. ヒルシュスプルング病弧発例における遺伝子異常

遺伝子	exon	遺伝子変異	病型	検出頻度
RET (41 例中)	3	Phe174Ser	Rectosigmoid	7.3 %
	3	Cys197Tyr	Transverse	
	13	splice acceptor site A->G	Total colon	
EDNRB (78 例中)	3	splice donor site T->C	Rectosigmoid	3.8 %
			Rectosigmoid	
	4	T insertion at nucleotide 878	Descending	
ET-3 (41 例中)		遺伝子変異検出されず*		0 %
Sox10 (61 例中)		遺伝子変異検出されず*		0 %

厚生科学研究費（脳科学研究事業）  
分担研究報告書

ヒルシュスプルング病に関連した SIP-1 遺伝子異常に関する  
中国・四国・九州・沖縄地区の調査結果  
- 第一報 -

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 教授）  
研究協力者：田口 智章（九州大学大学院医学研究院小児外科 助教授）

研究要旨

ヒルシュスプルング病の発生に関係すると考えられる SIP1 遺伝子異常を有する症例をピックアップする目的で、ヒルシュスプルング病に顔貌異常、知的障害、身体発育異常、小頭症、てんかんを合併している症例について、中国・四国・九州・沖縄地区の小児外科診療施設 49 施設にアンケート調査を依頼した。その結果、回収率 55.0% で 726 例を集計することができた。うち顔貌異常を伴うのは 15 例、知的障害は 23 例、身体発育異常は 16 例、小頭症は 3 例、てんかんは 7 例にみられた。21 trisomy の症例を除外すると、上記症状が重複する症例を 9 例ピックアップすることができた。今後さらに 1 例ずつ臨床像を詳細に調査し、遺伝子解析等を含めて解析を行う予定である。

A. 研究目的

ヒルシュスプルング病症例の中にてんかんや知能発達障害と特異な顔貌を呈する一群の症例があり、神経堤細胞の分化と関連が深い SIP1 遺伝子がある原因遺伝子であることを若松らが世界に先駆けてつきとめることに成功した。これを受けて、このような特殊な病態を伴うヒルシュスプルング病の症例をピックアップし、インフォームドコンセントの得られる症例に関しては遺伝子解析を行うために、中国・四国・九州・沖縄地区の小児外科診療施設における本症例の調査を目的として本研究を施行した。なお、今回の調査は疫学調査ではなく、あくまでも疑わしい症例のピックアップを目的として行った。



## B. 研究方法

中国・四国・九州・沖縄地区の小児外科診療施設として、中国・四国地区は日本小児外科学会認定施設・準認定施設・教育関連施設を対象に、九州・沖縄地区は日本小児外科学会認定施設・準認定施設・教育関連施設にくわえて九州小児外科研究会の施設会員も対象とした。

調査方法はアンケート方式とし、アンケート用紙は班長が作成したものを一部改変し、診療年数、その間のヒルシュスプルング病症例数、そのうち特徴的顔貌をともなった症例数、知的障害を認める症例数、身体的な発育異常を認める症例数、小頭症を認める症例数、てんかんを併発している症例数、同胞発生例、中枢性低換気症候群（オンディーヌケース）合併例、神経芽腫その他腫瘍併発例、Waardenburg 症候群合併例について Fax で返事をいただく方式にした。なおアンケート送付時に班長の原著論文のコピーを同封し、顔貌異常のイメージを理解していただけるよう配慮した。

## C. 研究結果

アンケート送付施設は、中国・四国 16 施設、九州・沖縄 33 施設、合計 49 施設で、回収率は中国・四国 7/16 (43.8%)、九州・沖縄 20/33 (60.6%) で全施設では 27/49 (55.0%) であった。

集計できた症例数は 726 例で、顔貌異常をともなうものは 15 例であったが、そのうち 9 例は 21 trisomy の診断であった。知的障害は 23 例にみられ、うち顔貌異常をともなうものは 14 例であったが、うち 21 trisomy が 8 例であった。身体的発育異常は 16 例にみられ、顔貌異常をともなうものは 7 例で、うち 5 例は 21 trisomy であった。小頭症は 3 例で 2 例に顔貌異常をみとめたが、21 trisomy は 1 例もなかった。てんかんは 7 例で、うち顔貌異常のあるものが 2 例で 21 trisomy は 1 例もなかった。また同胞発生例は 26 例、オンディーヌケース合併例 6 例、MEN II 型合併例 1 例、Waardenburg 合併例 0 例であった。

## D. 考察

アンケートを回収してみて問題点として気づいた点は、顔貌異常について論文のコピーを同封したもののイメージがわかりにくいいため 21 trisomy の症例が重なってきている点である。施設によっては 21 trisomy であることを明記しているが、とくにこちらから 21 trisomy について除外するように指示していない

ため不明の施設もある。したがって、今回いずれかの項目に相当する症例について1例ずつ臨床像を再調査し、SIP1の遺伝子解析を考慮する症例の同定が必要である。

今回の調査で21 trisomy という記載がなく、上記の症状を重複して有する症例は9例ピックアップできた。うち顔貌異常は6例にみられている。内訳は顔貌+知的障害+発育障害+てんかん：1例、顔貌+知的障害+小頭症+てんかん：1例、顔貌+知的障害+小頭症：1例、顔貌+知的障害+発育障害：1例、顔貌+知的障害：2例、知的障害+発育障害+小頭症：1例、知的障害+てんかん：2例であった。

また、今回の調査でピックアップできた家族発生例、オンディーヌカース合併例、MENⅡ型合併例などについても、遺伝子解析の対象となるか否かを検討する必要がある。さらに、今後症例を提供していただいた施設に対して謝辞や謝金なども考慮する必要がある。

#### E. 結論

ヒルシュスプルング病に合併する臨床症状から SIP1 遺伝子異常が疑われる症例を9例ピックアップすることができた。今後さらに1例ずつ臨床像を詳細に調査し、遺伝子解析が可能な症例を抽出していく予定である。また未回答の施設に対して重ねて回答をお願いして回収率をあげるよう努力したい。

#### F. 研究業績

1. Nakao, M., Suita, S., Taguchi, T., Hirose, R., Shima, Y.: Fourteen-Year Experience of Acetylcholinesterase staining for Rectal Mucosal Biopsy in Neonatal Hirschsprung's Disease. *Journal of Pediatric Surgery*. 36: 1357-63, 2001.
2. Kubota, M., Suita, S., Kamimura, T, Ito, Y., Szurszewski JH: Electrophysiological properties of aganglionic segment in Hirschsprung's disease. *Surgery* 131:S288-93, 2002.

厚生科学研究費（脳科学研究事業）  
分担研究報告書

Sip1 ノックアウトマウスの作製とその表現型の解析

分担研究者：東 雄二郎

(大阪大学細胞生体工学センター形態形成分野 助教授)

研究要旨

若松らのグループにより SIP1 遺伝子はヒトにおいて一部のヒルシュスプルング病の原因遺伝子であることが明らかにされた。そこで本研究では、マウスの実験系を利用し、SIP1 遺伝子の（特に胚発生過程での）機能を個体レベルで明らかにすることを目的として、そのノックアウトマウスの作製と解析に着手した。これまでにマウス Sip1 遺伝子の null ホモ変異マウスの作製に成功し、ホモ変異胚では 1. 胎生 9.5 から 10.5 日で致死となる、2. 胎生 8.75 日でおこる、turning が起こらない、3. 体節は 7 個以上生じない、その結果、体幹部が成長せず、短縮な形態を示す、4. 神経管が全く閉じない、5. 前頭部の形成不全、等の症状を呈することが判明した。このような極めて重篤な表現型は Sip1 が初期胚の発生において重要な働きを担っていることを示している。今後これらの表現についてさらに詳細な解析を行うことで、SIP1 分子の機能を個体レベルで明らかにできると期待される。

A. 研究目的

我々はこれまで zinc finger と homeodomain を同時に有する転写制御因子  $\delta$ EF1 についてその欠損マウス作製などを用いて、分子及び個体レベルでの解析を行い、 $\delta$ EF1 が骨形成に重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。一方、TGF $\beta$  シグナル伝達を媒介する Smad 分子と相互作用する因子として SIP1 (Smad-interacting protein 1) が単離された。SIP1 はそのアミノ酸配列を含めて構造的に  $\delta$ EF1 と高い相同性を示すこと、また機能的にも、 $\delta$ EF1 と同様に転写に対して抑制的に働くことから、SIP-1 と  $\delta$ EF1 は極めて近縁の分子群であり、 $\delta$ EF1 と共に ZFHX ファミリーを形成する分子であることが明らかとなった。また最近、若松らのグループにより SIP1 遺伝子はヒトにおいて一部

のヒルシュスプルング病の原因遺伝子であることが明らかにされた。そこで本研究では、Sip1 欠損変異マウスを作製し、その表現型を観察することにより、SIP1 遺伝子の生体内での機能をマウス個体を用いて明らかにすることを目的としている。これによって  $\delta$ EF1 を含めた ZFHX1 ファミリーの *in vivo* における機能、またその TGF $\beta$  シグナル伝達系との関連性について、さらにヒトにおける SIP1 ヘテロ欠損症の発症機序について明らかにされることが期待される。

## B. 研究方法

(1) 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。これにより Sip1 がどの時期に、どのような組織で発現されているかが明らかになる。この結果はノックアウトマウスの表現型を理解する上で重要な情報である。

(2) ジーンターゲット法を用いて Sip1 欠損マウスを作製する。この際、組織特異的あるいは時期特異的な Sip1 遺伝子破壊を行えるように、その第 7 エキソンを欠失させるように Cre-loxP 組み換え系を導入する。次に Cre recombinase を発現している EIIa-Cre マウスと交配し、その子孫から、第 7 エキソンを欠失させたヘテロ変異マウスを単離する (図 1)。

(3) それらのヘテロ変異個体を交配させることにより、ホモ変異個体を作製し、その表現型を観察する。すでに作製されている  $\delta$ EF1、BMP、Smad 欠損マウス等の各々の表現型、およびそれらの交配により得られる 2 重欠損変異マウスの表現型等と比較、検討する。またヒトにおける SIP1 ヘテロ欠損患者の症状等とも比較検討を行う。

## C. 研究結果

(1)、whole mount *in situ* hybridization を用いた解析では、Sip1 遺伝子は胎生 7.5 日からその発現が認められ、8.5 日においては、頭部の神経上皮および間充細胞、神経管の背側 (特に閉じようとする直前の神経管の背側とその上皮)、前体節中胚葉に比較的強い発現が見られた。また 9.5 日においては神経管の背側、背根神経節、尾部の前体節中胚葉、またレンズ細胞等に発現が観察された。

(2) Sip1 遺伝子の第 7 エキソンはタンパク翻訳領域のおよそ半分の領域を