

において上記の症候群の実態を調査し、その患者数とその詳細を把握することである。

B. 研究方法

1：北海道・東北地区の小児外科関連 36 施設に対して行った一次アンケートの結果から、本症が疑われた 6 症例（2 施設）に対して 2 次アンケート調査を施行した。アンケート内容は主任研究者が作成したものを使用した。

2：主任研究者に直接、紹介があった宮城県内の 1 症例については主任研究者より情報を入手して確認した。

C. 研究結果

1：2 次アンケートの結果は依頼した 2 施設より回答が得られておらず、回答があり次第集計を行う予定である。

2：主任研究者に直接照会があった 1 症例について供覧する。

症例

妊娠経過中に羊水過多などは認められなかったが、29 週に尿糖が 1 回のみ（++）、37 週から高血圧が認められた。在胎 38 週で帝王切開にて出生し、身長 50.0 cm、体重 3338 g、頭囲 33.0 cm であった。

本症例に認められた所見は以下如くであった。

- a) 特徴的な顔貌（+）
- b) 小頭症（-）
- c) てんかん（-）
- d) 先天性心疾患（-）
- e) 座位（+）（2 歳）、独歩（未）
- f) 脳所見：萎縮（-）、脳梁欠損（-）であるが脳梁は低形成
- g) 尿道下裂（-）
- h) Hirschsprung 病（+）、Hirschsprung 病の診断根拠は詳細不明であるが、人工肛門造設術、根治手術＋人工肛門閉鎖術を受けており、手術所見からは classical type の Hirschsprung 病であった。
- i) 口蓋裂（-）

上記の症例に関しては、インフォームドコンセントを得た上で、遺伝子解析を行った。ZFHX1B の変異解析では、全翻訳領域および一部のイントロン領域

に異常を認めなかった。PCR およびサザン解析法による染色体欠失の検索から、一方の染色体に *ZFX1B* を含む欠失が明らかになり、BAC クローン CTD2252 から 474G7 にかけて 2.2 Mb の染色体欠失を同定した。

D. 結論

北海道・東北地区では本症候群が疑われたのは 8 例のみであった。1 例については遺伝子解析を行い、*ZFX1B* を含む領域の染色体欠失を確認し、詳細な欠失部位の同定に成功した。そのほかの 7 症例については現在調査中である。

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

近畿地区における SIP1 異常に関連したヒルシュスプルング病の実態調査、
ならびに Sip ヘテロ欠失マウスにおける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 医学研究科 小児外科）

研究協力者：米田 光宏、黒田 征加

（大阪大学大学院 医学研究科 小児発達医学 小児外科）

研究要旨

ヒルシュスプルング病以外にも特異的な合併病変を示す SIP1 欠損症（ヒルシュスプルング病症候群）についてその実態を知るために、近畿・中国地区におけるアンケート調査を行なった。691 例のヒルシュスプルング病を集積し、うち 3 例で SIP1 異常の可能性が考えられた。これらの例でさらに詳細を検討するために二次調査を依頼し 2 例に返答を得た。より特徴的な臨床像が明らかとなり、今後の SIP1 をコードする遺伝子 *ZFHX1B* の解析が望まれた。

一方、ヒト臨床例に対応すると考えられる Sip1 ヘテロ欠失マウスにおいて、特に腸管壁内神経につき注目して検討した。明らかな無神経節腸管は証明されなかったが、2 個体で結腸拡張が観察され、組織学的検索では肛門に近い遠位の直腸で筋層間神経節の分布密度が低く観察されたり、NADPH diaphorase 染色強度が低いなど、機能的に腸管通過障害を呈することと矛盾しない所見も見られた。今後の更なる検討の必要性が示唆された。

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遺伝的素因の関与が明らかである場合もある。またまれに知的障害、小頭症、特徴的な顔貌を合併する症例があり、これらの例では神経堤（ヒルシュスプルング病、心奇形、頭部形成異常）と、脳（知的障害、てんかん、運動発達遅滞、小頭症）の両者において、その発生・分化の過程に障害をきたしていることが考えられる。

近年になり若松、長屋らによってこれら患者に SIP1 をコードする遺伝子 *ZFHXB* の異常が発見され、SIP1 欠損症（ヒルシュスプルング病症候群）として臨床上の重要性が認識されている。

一方、東らにより SIP1 遺伝子 *ZFHXB* の機能解析を目的に、マウス *Sip1* 遺伝子 *Zfx1b* の null ホモ欠失マウスが作成されている。ホモ欠失体では重篤な表現形をきたして胎生 9.5 から 10.5 日で致死となることが示されており、*Sip1* が初期胚の発生において重要な役割を担うことが考えられている。ヒトで検出される SIP1 異常の多くはエクソン 8 に生じるナンセンス変異であり、変異に関してはヘテロの状態であるが、臨床例的に神経堤、脳の発達障害に関連する症候性の症状を呈している。臨床例に対応するヘテロ欠失マウスについては生存し生殖能力も有するが、haplo-insufficient にヒトと同様に症候性の異常を生ずるか否かは興味深いところである。

本研究では、近畿、中国地区において SIP1 異常に関連したヒルシュスプルング病の実態を知るためにアンケート調査を行うとともに、*Sip1* ヘテロ欠失マウスについて特に腸管壁内神経の構造に注目して検討を行った。

B. 研究方法

1) SIP1 欠損症に関するアンケート調査

近畿・中国地方の 28 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の症例数とともに、関連事項について郵送によるアンケート調査を行った。項目は以下の通りであり、各項目に該当する症例数を調査した。A) 2~3 についてはそれぞれ特徴的な顔貌を伴った症例と、伴わない症例数についても調査した。

A) SIP1 異常に関連した調査

1. 特徴的な顔貌を伴った症例
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. 同胞発生例
2. 中枢性低換気症候群合併例

3. 神経芽腫併発例
4. その他の腫瘍併発例
5. Waardenburg syndrome 合併例
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, GDNF, EDNRB, EDN3, Sox10)

2) SIP1 の異常が疑われる症例に関する二次調査

前項の調査において、特徴的な顔貌、知的障害、身体発育障害、てんかんなどの症状を有する SIP1 異常の存在を示唆する症例については、報告をいただいた施設にさらに詳細な調査票を郵送し個々の症例における臨床事項に関する二次調査を行なった。調査内容は以下のとおりである。

1. 家族について
2. 妊娠と分娩
3. 出生年と性
4. ヒルシュスプルング病について
5. 心奇形
6. 他の合併奇形
7. 染色体異常
8. 特異な顔貌
9. 小頭症
10. てんかん
11. 低身長
12. 身体発育
13. 精神発達
14. 現在の年齢
15. 現状
16. 備考

3) Sip1 ヘテロ欠失マウスにおける腸管壁内神経の検討

当研究班分担研究者である大阪大学東助教授より、Sip1 ヘテロ欠失マウス 12 個体、野生型マウス 6 個体の供与をいただき、それぞれの個体の腸管についてマクロ形態の観察を行うとともに、ミクロ所見の検討を行うためにホルマリン固定、パラフィン包埋標本を作成した。可能な個体については OCT コンパウンドに標本を包埋し凍結標本を作成した。これらの標本を薄切し、H&E 染色、

S100 についての免疫組織染色、アセチルコリンエステラーゼ染色、ならびに NADPH diaphorase 染色を行った。

C. 研究結果

1) SIP1 欠損症に関するアンケート調査 (表 1)

14 施設より返答を得、ヒルシュスプルング病の症例数は合計で 691 例であった。SIP1 に関連した調査については、知的障害を認めると記載があったものが 16 例あったが、特異な顔貌を伴ったとされるものは 2 例であり、14 例では特異な顔貌は伴わず、うち 9 例ではダウン症との記載があった。また、発育障害を認めるとされたものは 5 例であり、3 例では顔貌に異常がなく、2 例で特異な顔貌を伴うと記載があったが、これらは知的障害を伴い顔貌にも異常を認めた 2 例と重複していた。小頭症を認めた症例はなく、既述の症例とは別に 1 例で特異な顔貌は伴わないもののてんかんを認めるとされた症例が 1 例存在した。

遺伝子異常が関連すると思われる症例の調査では、同胞例が 5 例あり、また、中枢性低換気症候群を合併したものが 7 例に見られた。神経芽腫や MEN2A、2B などの腫瘍を併発した例や、Waardenburg 症候群に含まれる例はなかったものの、SIP1 以外の既知のヒルシュスプルング病関連遺伝子の異常が、RET、EDNRB 遺伝子それぞれについて 1 例ずつ合計 2 例に同定されていた。

結局、特異的な顔貌を伴い SIP 1 異常を有する可能性が高いことが考えられる症例は 2 例であり、これらの症例は小頭症やてんかんは伴わないものの知的障害や身体発育障害を伴っていた。また、顔貌を含むその他の項目には異常はないがてんかんを伴う症例が 1 例あり、これらの 3 例についてはさらに詳しい臨床事項を得るために二次調査を行った。

2) SIP1 の異常が疑われる症例に関する二次調査

二次調査を依頼した 3 例のうち、特異的な顔貌を伴う 2 例について返答をいただいた。以下症例 1、2 と称するが、両者とも家族歴、妊娠と分娩について異常はなく、ヒルシュスプルング病については新生児期に発症し初期治療として人工肛門の造設がなされていた。症例 1 については long segment type であり、症例 2 では病変範囲は不明であるもの、2 例とも二期的に Swenson 法による根治術が施行されていた。また 2 例とも心奇形を有し外科的に治療を受けている。症例 2 では、左横隔膜ヘルニア、口蓋裂、副耳などを合併するとともに染色体異常も有している。顔貌については 2 例とも hypertelorism として記載され、症

例1では strabismus、wide nasal bridge を、症例2では low set ear を有している。両例とも小頭症、てんかんは認めないが、低身長、身体発育遅滞ならびに精神発達遅滞を呈する。症例1では6歳の現在歩行、発語、会話についてほぼ正常とされるが、症例2では4歳の現在歩行、会話は不可能で、発語も喃語程度である。

3) Sip1 ヘテロ欠失マウスにおける腸管壁内神経の検討

マクロ形態の観察では、12個体の Sip1 ヘテロ欠失マウスのうち2個体で、肛門より数 mm 口側の直腸を遠位端として4~5 cm にわたる結腸で径6~7 mm 程度の拡張が見られ(図1)、内容は糞便で満たされていた。他の10個体では、結腸の外見は他の6個体の野生型マウスと同様で結腸径はせいぜい3~4 mm までであった。

ミクロ所見の検討項目については結腸拡張を認めない Sip1 ヘテロ欠失マウスの所見は、野生型マウスの所見と同様であり異常は指摘できなかった。そこで以下、結腸拡張を認めた Sip1 ヘテロ欠失マウスの所見を野生型マウスでの所見と比較して記載する。

H&E 染色、S100 免疫組織染色にて検討した腸管壁内の筋層間神経節の存在と分布については、結腸拡張マウスにおいても、最も肛門側の直腸に筋層間神経節は認められ、無神経節腸管は証明されなかった。しかし、結腸拡張マウスでは野生型に比較して肛門より口側1~2 cm の範囲ではその分布はややまばらであるように観察された(図2)。

アセチルコリンエステラーゼ染色については、結腸拡張マウスにおいても腸管粘膜、粘膜下組織に陽性神経繊維の増生は指摘できなかった。

NADPH diaphorase 染色は2個体の結腸拡張マウスのうち1個体のみで検索が可能であったが、この個体では最も肛門側の検体において、より口側の腸管や、野生型マウスの腸管で観察された筋層間神経節に主として観察される強い染色性が見られなかった(図3)。

D. 考察

本研究で行った SIP1 欠損症に関するアンケート調査では、691例のヒルシュスプルング病患者が集計されたが、特異な顔貌やてんかんを合併するなど SIP1 欠損症(ヒルシュスプルング病症候群)としての範疇に入りうる可能性が考えられたものは3例であった。知的障害を認めるものや身体発育障害を認めるも

のは、それぞれ延べ 16 ならびに 5 例存在したが、ダウン症候群の症例が少なくとも 9 例含まれており、多くものは SIP1 欠損症に特に特徴的と言える hypertelorism などの顔貌異常は有していない。また、顔貌異常を呈した 2 例を含めてやはり特徴的とされる小頭症を伴う症例は皆無であった。

同胞発生例や、中枢性低換気症候群の患者はそれぞれ、5 例、7 例に見られたが、これらの病態については今まで SIP1 遺伝子異常は報告されていない。むしろ EDNRB、EDN3、RET などの遺伝子異常が検出される例の報告もあることから他の原因の関与が考えられ、ヒルシュスプルング病と言う疾患からながめた場合、原因は多岐にわたる multi-factorial なものであるとの理解を支持するものであった。

SIP1 欠損症の可能性が考えられた 3 例については、さらに二次調査を行い、2 例についてはさらに詳細な臨床事項を検討し得た。SIP1 欠損症では既報の臨床例の所見より、中核をなす臨床症状として著明な知的障害、特異な顔貌、小頭症、運動発達遅滞が挙げられ、これに加えてヒルシュスプルング病、てんかん、心奇形などが様々な組み合わせで発症すると考えられている。二次調査で得た 2 例の所見をこれらと比較してみると、中核症状のうち小頭症については一致せず、症例 1 では身体発育や歩行、精神発育や会話についてもその障害程度は軽度と言える。これに比して症例 2 では 4 歳の現在で会話や歩行は不可能で身体、精神発達の遅滞は高度である。症例 2 においては SIP1 欠損症であることの証明がなされる可能性がより高いことも考えられ、今後の遺伝子検査の施行が望まれる。

Sip1 ヘテロ欠失マウスにおける腸管壁内神経については、H&E 染色、S100 免疫組織染色の検討で無神経節腸管は証明されず、ヒトで見られるヒルシュスプルング病と同様の病態がヘテロ欠失マウスにおいて少なくとも頻繁に生ずるものとは言いがたい。しかし、ヒト臨床例に類似した結腸の拡張をきたす個体を確認したことは、腸管壁内神経の異常をきたし得る個体も存在することを示唆する。かかるマウス個体の筋層間神経節の分布がややまばらに観察されたことや、NADPH diaphorase 染色で最も肛門側での染色性が、正常に見られるものより弱かったという所見は、この個体では肛門付近の最も遠位の直腸が痙性的であり、機能的な腸管通過障害をもたらしていたことを示している可能性がある。さらに多数例での評価が望まれる。また、今回の使用したマウスは生産でその後も長期に生存している個体である。より高度の障害をもつ個体は死産あ

るいは出生後短期間で死亡している可能性もあり、今後満期付近での検索を考える必要がある。

E. 結論

1) SIP1 欠損症に関するアンケート調査を行い、691 例のヒルシュスプルング病の症例を得た。うち 3 例で特異的な顔貌やてんかんを伴うなど SIP 1 異常を有する可能性が高い症例が認められた。

2) SIP1 の異常が疑われた例についてさらに詳細な二次調査を行ったが、その特徴的な臨床所見より遺伝子検査による病態の確認が望まれた。

3) Sip1 ヘテロ欠失マウスにおける腸管壁内神経の検討では、明らかな無神経節腸管は証明されなかった。しかし、結腸拡張をきたした個体も観察され、腸管の染色所見からは機能的な腸管通過障害を生じている可能性も考えられた。今後もさらに多数の個体で、方法にも工夫を加えた検討が望まれる。

表 1

ヒルシュスプルング病の例数（診療年数 3～40 年）	691 例
A) SIP1 異常に関連した調査	
1. 特徴的な顔貌を伴った症例	2 例
2. 知的障害を認める症例	16 例
うち特徴的な顔貌を伴った症例	2 例
伴わない症例	14 例
（14 例中ダウン症と記載された症例	9 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	2 例
伴わない症例	3 例
4. 小頭症を認める症例	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
C) 遺伝子異常が関連すると思われる症例の調査	
1. 同胞発生例	5 例
2. 中枢性低換気症候群合併例	7 例
3. 神経芽腫併発例	0 例
4. その他の腫瘍併発例	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	1 例
GDNF	0 例
EDNRB	1 例
EDN3	0 例
Sox10	0 例



図 1. Sip1ヘテロ欠失マウスにみられた結腸拡張个体：
肛門より数 mm 口側の直腸を遠位端として 4~5 cm にわたる結腸で径 6
~7 mm 程度の拡張が見られた。

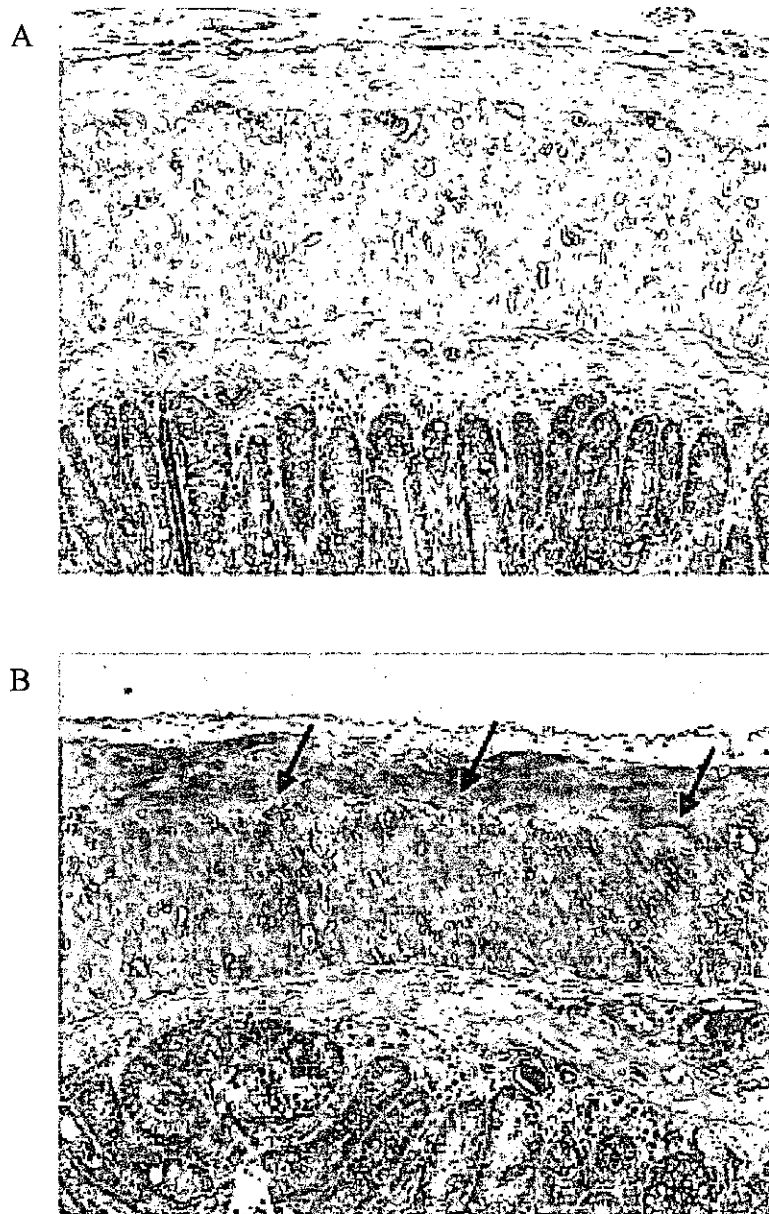


図 2. 結腸拡張個体での腸管組織像

A: 肛門に近い遠位結腸では筋層間神経節まだらで、この写真では観察されない。

B: 口側の近位結腸では野生型と同様の密度で筋層間神経節（矢印）が観察される。

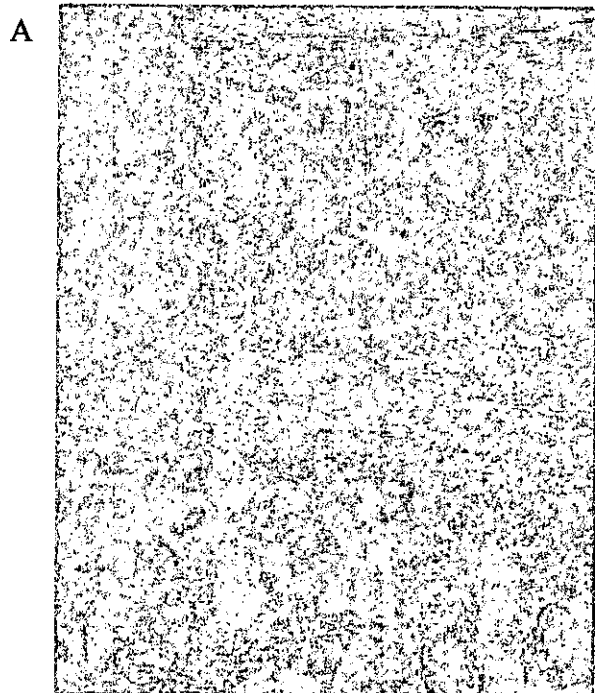


図 3. 結腸拡張個体でのNADPH diaphorase 染色像

A: 肛門に近い遠位結腸では染色性が弱い。

B: 口側の近位結腸では野生型と同様の強い染色性が観察される。

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

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・
沖縄地区の調査結果（第二報）

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 Smad-Interacting Protein 1 (SIP1) をコードする遺伝子 *ZFHX1B* の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。2年目は1年目に回答のなかった施設に再度お願いするとともに、加えて症例別の調査も行った。その結果、回収率 70.0 %で 902 例を集計することができた。うち顔貌異常を伴うのは 19 例、知的障害は 31 例、身体発育異常は 17 例、小頭症は 3 例、てんかんは 8 例にみられた。21 trisomy の症例を除外し、上記症状が重複する症例に関して、個々の臨床像を症例別調査票により 13 例をピックアップし、さらに班会議で 11 例にしぼることができた。来年度はこれらの症例に関して遺伝子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 Smad-Interacting Protein 1 (SIP1) をコードする遺伝子 *ZFHX1B* がその原因遺伝子であることを、本研究班長の若松らが世界に先が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・教育関連施設に加えて、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（オンディーヌカース）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および長屋班員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。今年度はさらに一年目に回答がなかった施設に再度用紙を送付し催促すると同時に、上記症状を重複する症例で 21 trisomy を合併しない症例について、症例別に調査票に記載していただき、個々の症例について検討した。

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、回答率は中国・四国 10/16 (62.5%)、九州・沖縄 24/33 (73.0%) で全施設では 34/49 (70.0%) であった。

集計できた症例数は 902 例で、顔貌異常をともなうものは 19 例であったが、そのうち 15 例は 21 trisomy の診断であった。知的障害は 31 例にみられ、うち顔貌異常を伴うものは 18 例であった。身体的発育異常は 17 例にみられ、顔貌異常を伴うものは 7 例であった。小頭症は 3 例で 2 例に顔貌異常をみとめた。てんかんは 8 例で、うち顔貌異常のあるものが 2 例であった。21 trisomy の症例を除外すると、症状を重複する例は 13 例ピックアップされた。なお同胞発症は 29 例、オンディーヌの呪いは 10 例、神経芽腫 (MENII 型) が 1 例、Waardenburg 症候群が 1 例にみられた。

D. 考察

今回の調査では、疑わしい症例は 1 例ずつ症例調査用紙に記載していただいたので、症状の重複状態がよく把握できた。症状の重複が多いほど広範囲の欠失が考えられるため、遺伝子異常の確率が高く優先的に検査を行うべきであろう。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を 13 例ピックアップした。これらをさらに班会議で 1 例ずつ吟味し、2 例を除外して 11 例が遺伝子検査の候補として残った。

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 の遺伝子異常が疑われる症例を 11 例ピックアップすることができた。最終年度はこれら 11 症例のうち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予定である。

F. 研究発表

原著論文（欧文）

1. Suita S, Shono K, Tajiri T, Takamatsu T, Mizote H, Nagasaki A, Inomata Y, Hara T, Okamura J, Miyazaki S, Kawakami K, Eguchi H, Tsuneyoshi M: Malignant germ cell tumors: Clinical characteristics, treatment, and outcome. A report from the study group for Pediatric Solid Malignant Tumors in the Kyushu Area, Japan. *J Pediatr Surg* 37(12): 1703-1706. 2002.
2. Kaneko M, Tsuchida Y, Mugishima H, Ohnuma N, Yamamoto K, Kawa K, Iwafuchi M, Sawada T, Suita S: Intensified chemotherapy increases the survival rates in patients with stage 4 neuroblastoma with MYCN amplification. *J Pediatr Hematol Oncol* 24(8):613-621, 2002.
3. Yoshizato T, Satoh S, Taguchi T, Suita S, Nakano H: Intermittent 'double bubble' sign in a case of congenital pyloric atresia. *Fetal Diagn Ther* 17(6):334-338, 2002.
4. Suita S: Neuroblastoma screening in early life. (author reply) *N Engl J Med* 347(11): 852-854, 2002.
5. Satoh S, Inatomi S, Kubota M, Suita S, Nakano H: Antenatal sonographic detection of vesicoureteral reflux. A case report. *Fetal Diagn Ther* 17(5): 277-280, 2002.
6. Suita S, Stephen L: Gans overseas lecture. Mass screening for neuroblastoma in

- Japan: lessons learned and future directions. *J Pediatr Surg* 37(7):949-954, 2002.
7. Taguchi T, Yamada T, Nakao M, Ogita K, Nishimoto Y, Suita S: Cytokine response after segmental small intestinal transplantation: comparison of jejunal and ileal grafts. *Transplant Proc* 34(3): 1052, 2002.
 8. Ogita K, Suita S, Taguchi T, Yamanouchi T, Masumoto K, Nakao M: Benefit of nucleosides and nucleotide mixture in small bowel transplantation. *Transplant Proc* 34(3):1027, 2002.
 9. Taguchi T, Shima Y, Nakao M, Fujii Y, Tajiri T, Ogita K, Suita S: Activation of immediate early genes in relation to proliferation and apoptosis of enterocytes after ischemia-reperfusion injury of small intestine. *Transplant Proc* 34(3): 983, 2002.
 10. Mugishima H, Matsunaga T, Yagi K, Asami K, Mimaya J, Suita S, Kishimoto T, Sawada T, Tsuchida Y, Kaneko M: Phase I study of irinotecan in pediatric patients with malignant solid tumors. *J Pediatr Hematol Oncol* 24(2):94-100, 2002.
 11. Ikeda H, Iehara T, Tsuchida Y, Kaneko M, Hata J, Naito H, Iwafuchi M, Ohnuma N, Mugishima H, Toyoda Y, Hamazaki M, Mimaya J, Kondo S, Kawa K, Okada A, Hiyama E, Suita S, Takamatsu H: Experience with International Neuroblastoma Staging System and Pathology Classification. *Br J Cancer* 86(7): 1110-1116, 2002.
 12. Ogita K, Suita S, Taguchi T, Yamanouchi T, Masumoto K, Nakao M: Roles of nucleosides and nucleotide mixture in small bowel transplantation. *Nutrition* 18(4): 338-342, 2002.
 13. Kubota M, Suita S: Assessment of sphincter muscle function before and after posterior sagittal anorectoplasty using a magnetic spinal stimulation technique. *J Pediatr Surg* 37(4): 617-622, 2002.
 14. Taguchi T, Suita S, Ohkubo K, Ono J: Mutations in the sulfonyleurea receptor gene in relation to the long-term outcome of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *J Pediatr Surg* 37(4): 593-598, 2002.
 15. Shono T, Kai H, Suita S: Ectopic renal tissue in the gubernaculum associated with undescended testis. *BJU Int* 89(3):320-321, 2002.
 16. Shono T, Kai H, Suita S: Effects of the prenatal administration of cimetidine on testicular descent and genital differentiation in rats. *Surgery* 131(1 Suppl): S301-305, 2002.

17. Taguchi T, Suita S: Segmental small-intestinal transplantation: a comparison of jejunal and ileal grafts. *Surgery*131(1 Suppl): S294-300, 2002.
18. Kubota M, Suita S, Kamimura T, Ito Y, Szurszewski JH: Electrophysiological properties of the aganglionic segment in Hirschsprung's disease. *Surgery* 131(1 Suppl): S288-293, 2002.
19. Tajiri T, Shono K, Tanaka S, Suita S: Evaluation of genetic heterogeneity in neuroblastoma. *Surgery*131(1 Suppl):S283-287. 2002.
20. Suita S, Yamanouchi T, Masumoto K, Ogita K, Nakamura M, Taguchi S: Changing profile of parenteral nutrition in pediatric surgery: a 30-year experience at one institute. *Surgery*131(1 Suppl):S275-282. 2002.

原著論文（欧文）

1. 田口智章, 水田祥代, 田口匠平, 田中真司: Peutz-Jeghers 症候群の診断と治療. *小児外科* 34: 1030-1036, 2002.
2. 窪田正幸, 水田祥代: 成人に達した鎖肛症例の問題点. *小児外科* 34: 921-926, 2002.
3. 田尻達郎, 水田祥代: 新生児腫瘍（奇形腫群腫瘍）. *周産期医学* 32: 1109-1113, 2002.
4. 田口智章, 水田祥代: 大学病院における小児外科診療とリスクマネジメント. *小児外科* 34: 511-520, 2002.
5. 水田祥代, 山内 健: 高カロリー輸液（静脈栄養）の実際 1). 外科的疾患. *周産期医学* 32(11):1512-16, 2002.

著書

1. 水田祥代, 田口智章: 器官別にみた胎児の成長・発達とその障害, 消化器・泌尿器・生殖器系, 新女性医学大系 29, 中山書店 pp 345-371, 2002.

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

初期胚神経組織形成過程における転写制御因子 SIP1 の機能

分担研究者：東 雄二郎

（大阪大学大学院・生命機能研究科）

研究要旨

発生過程を含めた生体内における SIP1 の機能を知る目的で、*Sip1* ホモ欠失変異マウスを作製しその解析を行った。*Sip1* ホモ欠失変異胚の一つの形態的特徴として、頭部を含めた全領域において神経管が閉じないという表現型が観察され、胎生 9.5~10.5 日において致死であった。そこで神経組織形成に注目し、種々のマーカー遺伝子を用いて解析したところ、以下の結果を得た。

- 1) 初期神経組織分化のマーカーである *Sox2* の神経板における発現が低下していた。
- 2) 神経板や神経管の神経上皮細胞において消失すべき *E-cadherin* の発現がそれらの組織で観察された。
- 3) 神経堤細胞で発現する *Sox10* の発現を調べたところ、頭部での発現は維持されていたが、遊走する神経堤細胞の減少が示唆された。一方、頸部での *Sox10* の発現は全く消失していた。

これらの結果は SIP1 が初期胚における神経組織形成や神経堤細胞の正常な発生に必須であることを示している。

A. 研究目的

δ EF1/SIP1 ファミリー転写制御因子は、N 末端側と C 末端側に Zn フィンガードメインを、中央部にホメオドメイン配列を有し、転写因子の中でも極めてユニークな構造をした因子である。このファミリーがショウジョウバエ、線虫、ゼブラフィッシュからヒトに至るまで広く保存されて存在していることは、その機能的重要性を示唆していると考えられる。 δ EF1 欠損変異マウスにおいては、種々の骨形成異常が見られ、特に四肢骨の異常は BMP ファミリーの一つである GDF5 (Growth differentiation factor 5) の変異マウスの表現型と酷似して

いた。また SIP1 は、BMP などを含む TGF β スーパーファミリーの細胞内シグナル伝達分子 Smad と結合する因子として単離されたものであり、これらのことは δ EF1/SIP1 ファミリーが BMP シグナルの細胞内伝達系の標的転写制御因子として機能している可能性も示している。我々はこのような δ EF1/SIP1 ファミリーの個体レベルでの機能をさらに明らかにするために、*Sip1* 遺伝子ノックアウトマウスの作製を行った。その結果、胎生 8.5 日における神経管が頭尾軸全体にわたって閉じていないことを見いだした。このことは SIP1 が神経組織形成過程において基本的な役割を担っていることを示している。本研究課題では、SIP1 の神経組織形成過程における役割を明らかにすることを目的として、特に *Sip1* ノックアウトマウスの神経組織における表現型の解析を行った。

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) すでに作製されている *Sip1* ノックアウトマウスを用い、それらのヘテロ変異個体同士を交配させて、ホモ変異個体を作製し、その表現型を観察する。その際、形態的異常を観察するために、実体顕微鏡下における観察や、走査電子顕微鏡、H.E.染色法を用いて行った。

(3) 特に *Sip1* ノックアウトマウス胚における神経組織形成異常についてより詳細な解析を行うために、後述する種々のマーカー遺伝子の、野生型およびホモ変異個体におけるそれぞれの発現パターンの解析を whole mount *in situ* hybridization 等を用いて行った。

C. 研究成果と考察

(1) マウス初期胚における *Sip1* 発現パターンの解析

Sip1 は胎生 6.5 日においては検出限界以下であったが、胎生 7.5 日から頭部神経外胚葉を含んだ広い範囲で発現が観察され始めた。胎生 8.5 日では神経堤細胞を含む菱脳や頭部神経外胚葉および頭部間充織細胞、さらに神経管において観察される。特に菱脳においては、ロンボメア 3, 5 を除いた領域で発現していることが、*krox20* との二重染色により確認された。また胎生 8.5 日におい