

「Costello 症候群の摂食障害への治療・介入のための研究」
研究分担者 川目 裕 お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科・
ライフサイエンス専攻遺伝カウンセリングコース・教授

研究要旨

Costello 症候群における摂食障害は、胎児期からの羊水過多の原因であり、出生後に、ほぼ 100%に認める所見で、体重増加不良をきたす。また、哺乳摂食は、養育者にとっても大きな課題となる。今回、Costello 症候群の治療と健康管理の解明のために、摂食障害について過去の文献を検討した。Costello 症候群の摂食障害には、出生後、早期から経管栄養や胃瘻などの対応が必要である。多くの場合、小児期に離脱して、経口摂取が可能である。しかし、Costello 症候群の摂食障害についての自然歴、介入方法などの全貌は未だ明らかなく、今後の研究が必須である。

研究協力者

飯倉立夏(お茶の水女子大学・大学院)

A. 研究目的

Costello 症候群は、出生後に始まる成長障害、哺乳摂食障害、肥大型心筋症や不整脈などの心合併症、色黒の皮膚、手足の緩い皮膚、足関節の位置異常、精神運動発達遅滞、特異的顔貌を有する症候群。1977 年、Costello によって報告された。2005 年に東北大学のグループが病因としてがん原遺伝子の生殖細胞系列での *HRAS* 遺伝子変異を同定。現在、*HRAS* 遺伝子変異を有する場合を本症候群と診断する。

本症候群の大きな症状のひとつに摂食哺乳の障害が知られている。それは、胎児期から認め、それによって羊水過多をきたす。出生後には、ほとんどの症例で経口よりの哺乳や摂食が困難で、ほぼ全例で、経管栄養が必要と報告されている。しかし、解剖学的、機能的な嚥下機能についてはしばしば異常を認めない。

今回、Costello 症候群の治療法の開発と健康管理の解明のための基礎的な知見を得るために、本症候群の哺乳摂食障害に関して症例を網羅的な文献レビューにより検討をおこなった。

B. 研究方法

文献データベースである PubMed について Costello

症候群の論文を抽出し（キーワード：Costello-syndrome）、言語が英語であり、入手可能な論文から「摂食」について記述のあるものについて検討した（2010 年 8 月現在）。この際、摂食障害の有無のみの記述されている論文は除外した。

（倫理面への配慮）

特になし。

C. 研究結果

1) Costello 症候群の摂食障害の報告の状況

PubMed において検索結果、Costello 症候群の論文は、188 報にて、入手可能であった文献は 184 報であった。そのうち摂食障害に関して具体的な記述のある文献は 47 報であった。しかしながら、Costello 症候群の摂食障害を専門的に扱った文献は認められなかった。

2) Costello 症候群の摂食障害

文献的には、47 報の論文にて、91 例の症例について摂食障害について記述があった。そのうち 69 例に経管栄養あるいは胃瘻の非経口的栄養法の使用が報告されている。これら 69 例についての成長、摂食の状況について、附録にまとめる

3) Costello 症候群の経管栄養または胃瘻の利用状況

摂食障害に状況を明らかにするために、経管栄養や

胃瘻についての記述を検討した。今回、検討し得た 91 例のうち、経管栄養または胃瘻の利用期間が明示されている 26 症例について図 1 に示す。26 症例のうち 25 症例 (96%) は 6 ヶ月以前より経管栄養または胃瘻の利用を開始していた。さらに、経管栄養や胃瘻の開始年齢のみが記述されている症例の 23 症例のうち、16 症例 (70%) は 6 ヶ月以前に開始されていた。すなわち何らかの補助的栄養手段が必要な児の場合は、月齢 6 ヶ月までの新生児期、乳児期早期から非経口的栄養法が必要であることがわかった。

4) Costello 症候群罹患児の経口摂取の状況

91 症例の中で 8 症例について、経口摂取の状況についての具体的な記述がある (表)。これらの報告のなかで、記述されている経口開始の年齢は、1 歳 3 カ月から 7 歳 6 ヶ月と幅がある。

十分な栄養量を経口摂取が可能となることは、経管栄養あるいは胃瘻からの離脱 (終了) より推測できるので、3) で検討した経管栄養の利用期間のスペクトラムのデータからは、26 症例のうち 13 症例 (50%) では 1 歳までに利用が終了しており、8 症例の報告の結果と併せると、約 59.5% (26 例中 18 例, 8 例中 4 例) において、2 歳までに安定した経口摂取が可能であったと解釈できる。

一方で、4 歳 6 ヶ月、19 歳までと小児期を越えても経管栄養を利用している症例も稀に認めていた。

D. 考察

Costello 症候群における摂食障害は、胎児期からの羊水過多の原因であり、出生後に、ほぼ 100% に認める所見で、体重増加不良をきたす。また、哺乳摂食がうまくいかないことは、食事は 24 時間のことであり、休むことが出来ず、養育者にとっても大きな課題となる。Costello 症候群の摂食嚥下障害については、ほとんどで解剖学的、また機能的要因を見出すことができず、原因には、過度の過敏性が推測されているが、未だ十分には解明されていない。さらに、これらの摂食障害を有する Costello 症候群の子どもが、どのように食べ始めてゆくのかの詳細も不明であり、かつ、必要な栄養の確保のために、経管栄養や胃瘻、高カロリー補助食品などの対応が行われるが、経口摂取可能のための介入方法やリハビリテーションについては確立

されていない。

今回、Costello 症候群の治療と健康管理の解明のために、摂食障害について過去の文献を検討した。

摂食障害を呈する場合には、経管栄養や胃瘻などの非経口的栄養法が、出生後、早期から、ほとんどが 6 ヶ月以前に開始必要であった。

安定した経口栄養が可能となる年齢、すなわち、非経口栄養法からの離脱については、従来、報告されている 2 歳から 4 歳ごろに比して、2 歳以前に約 60% 報告が多くみられた。一方では、19 歳まで経管栄養を利用していた稀な症例がみられ、詳細な症状や経過の記述はないが、摂食障害は、必ずしも小児期に改善しない、あるいは、摂食障害への適切な介入がなされない場合には、生涯にわたる課題になることが推測された。

今回は、摂食障害について記述のある論文を抽出しているので、Costello 症候群における摂食障害の頻度については不明である。しかし、症例を総合して推測すると、出生時早期から必ずしも完全に経口摂取が不可能ではないこと、しかし、十分な経口摂取が出来ず年齢とともに体重増加不良などを呈し、子どもと家族の状況から、非経口摂取法が開始される。その後、経口と経管栄養などを併用にて管理されて成長してゆく。そして乳児期から幼児期にかけて、何らかを契機として、経口摂取が進み始めて、最終的に非経口栄養からの離脱となると考えられる。

今回の検討した文献での報告例においては、具体的な経口開始の状況や、きっかけとなった食品などについての報告はなかった。また、興味深い点は、摂食障害を主に解析検討した論文が外国文献の中には、一報も見られなかったことである。我が国では、Costello 症候群の摂食障害について焦点をあてた論文を認める (篠崎昌子ら, 2004; 齊藤峻ら, 2002; 横地光子ら, 1999)。この違いについては子どもの食に対する欧米と我が国に違いが推測され興味深い。

以上述べてきたように、Costello 症候群の摂食障害について、今回の文献検討の結果、その原因、自然歴、介入法について包括的な研究がないことが判明し、今後、これらの研究は必須と考えられる。

E. 結論

Costello 症候群の摂食障害には、経管栄養や胃瘻などの対応が必要である。多くの場合、小児期にそれらから離脱して、経口摂取が可能である。しかし、Costello 症候群の摂食障害についての自然歴、介入方法などの全貌は未だ明らかなく、今後の研究が必須である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Komatsuzaki S, Aoki Y, Niihori T, Okamoto N, Hennekam RC, Hopman S, Ohashi H, Mizuno S, Watanabe Y, Kamasaki H, Kondo I, Moriyama N, Kurosawa K, Kawame H, Okuyama R, Imaizumi M, Rikiishi T, Tsuchiya S, Kure S, Matsubara Y. Mutation analysis of the SHOC2 gene in Noonan-like syndrome and in hematologic malignancies. *J Hum Genet.* 2010 Dec;55(12):801-9

2) Kobayashi T, Aoki Y, Niihori T, Cavé H, Verloes A, Okamoto N, Kawame H, Fujiwara I, Takada F, Ohata T, Sakazume S, Ando T, Nakagawa N, Lapunzina P, Meneses AG, Gillissen-Kaesbach G, Wiczorek D, Kurosawa K, Mizuno S, Ohashi H, David A, Philip N, Guliyeva A, Narumi Y, Kure S, Tsuchiya S, Matsubara Y. Molecular and clinical analysis of RAF1 in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation. *Hum Mutat.* 2010 Mar;31(3):284-94

2. 学会発表

川目裕，高木紀美代，菊池昭彦，中村友彦．cystic hygroma，過敏性を合併し Noonan 症候群と診断された母子例：Noonan 症候群の診断とフォローアップ．第 46 回日本周産期新生児医学会学術集会．神戸，2010 年 7 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

J. 謝辞

本研究は、お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科ライフサイエンス専攻博士前期課程遺伝カウンセリングコースの飯倉立夏氏の協力のもとに行われた。

図1 経管栄養あるいは胃瘻の期間

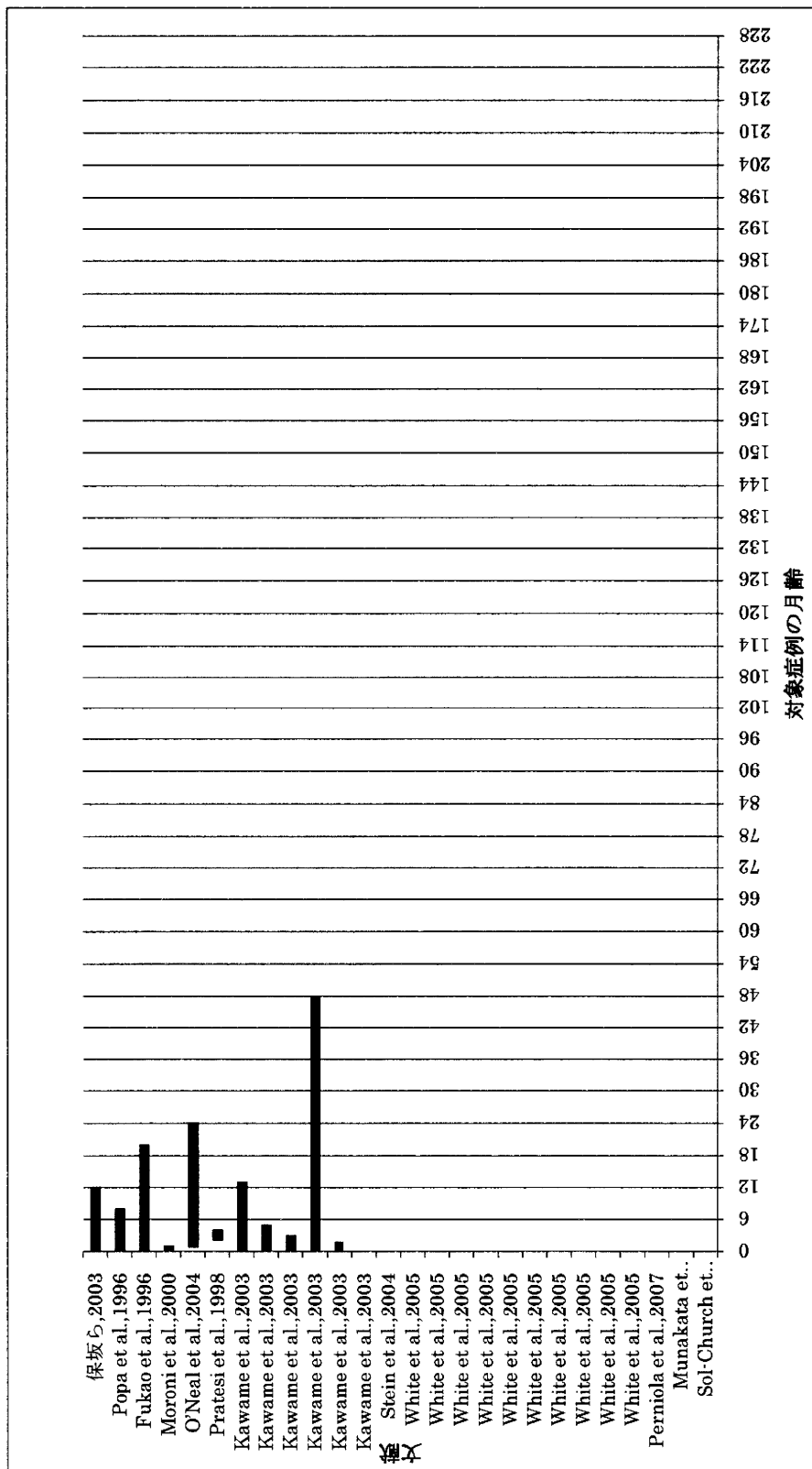


表1 Costello 症候群の経口摂取の状況

文献	経口摂取 開始時期	摂食障害の状況
Gregersen and Viljoen, 2004	出生後	哺乳障害があったが、6ヶ月までには良好な経口摂取が可能となる
Teebi and Shaabani, 1993	出生後	1歳6ヶ月まで摂食は乏しかったが経管栄養は行っていない
Davies et al., 1994	出生後	1時間毎にスプーンで経口栄養摂取を行った
Gripp et al., 2008	1歳3ヶ月	胃瘻造設, GERD. 17ヶ月時に胃瘻閉鎖
Johnson et al., 1998	1歳6ヶ月	哺乳瓶での摂食・液体の経口摂取が可能となる
Kerr et al., 1998	3歳6ヶ月	むせながらも経口摂取可能となったが、食べ物に興味はない
Kerr et al., 1998	3歳9ヶ月	スプーンを用いて自食が可能となる
Johnson et al., 1998	7歳6ヶ月	少量だが経口摂取を受け入れるようになる

「多発奇形を伴う精神運動発達遅滞症例の CGH マイクロアレイ解析」
研究分担者 吳 繁夫 東北大学・大学院医学系研究科・小児病態学分野

研究要旨

コステロ症候群・CFC症候群のような小児奇形症候群には、高率に精神運動発達遅滞を伴う。本研究では、精神運動発達遅滞および多発奇形を持つ小児の病因を明らかにする目的で、これらの症例の CGH マイクロアレイ解析によるゲノム・コピー数異常のスクリーニングを実施した。解析対象としたのは、19 例で、うち 2 例に 1p36-pter のサブテロメア領域の欠損を認め、1p36 症候群と診断したので、臨床的特徴と合わせて報告する。

研究協力者

菊池敦生、福與なおみ
(東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野)

A. 研究目的

コステロ症候群・CFC 症候群のような多発奇形 (multiple congenital anomaly, MCA) を有する小児には、高率に精神運動発達遅滞 (mental retardation, MR) を伴う。これらの MCA+MR 患児の大部分の病因は不明である。この研究では、精神運動発達遅滞および多発奇形を持つ小児の病因検索を目的として、CGH マイクロアレイ解析によるスクリーニングを行い、ゲノム・コピー異常の検出を行った。

B. 研究方法

多発奇形を伴う精神運動発達遅滞を示す 19 名の小児の末梢血からゲノム DNA を抽出し、アジレント社製 Human Genome CGH マイクロアレイ 244k を用いてゲノム・コピー異常を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、東北大学医学部倫理委員会の承認を受けており (平成 21 年承認)、解析にあたってはインフォームド・コンセントを書面で得た上で実施した。

C. 研究結果

MCA を伴う MR を持つ 19 症例のゲノム DNA を CGH マイクロアレイ法で解析し 2 例のゲノム・コピー異常を

見出した。

【症例 1】10 歳、男児。染色体 1p36.32-pter 領域約 3.0Mb の欠失 (図 1)。妊娠 38 週、2,455g、帝王切開で出生。APGAR 3 点/4 点。新生児期にけいれん、無呼吸あり。てんかん (PB、CBZ、CZP にて発作は 1 日 3-4 回程度)、重度精神発達遅滞あり。誤嚥性肺炎を反復し、喉頭気管分離を施行した。現在、追視あり、寝返り可。有意語なし。深部腱反射消失、四肢体幹の筋萎縮、筋緊張低下。おちくぼんだ眼、細い顎、足指の重なりあり。聴覚反応良好。

【症例 2】13 歳、男児。1p36.32-pter 領域約 4.5Mb の欠失と 2p25.2-pter 領域約 4.9Mb の重複 (図 2)。妊娠 37 週、2040g、経陰自然分娩にて出生。APGAR 7 点/7 点。生後 1 ヶ月に PDA、肺高血圧にて発症。PDA 術後、心筋緻密化障害、僧帽弁逆流による心不全が明らかとなった。精神発達遅滞、てんかんを合併している。誤嚥性肺炎を反復し、喉頭気管分離を施行した。現在、独歩まで獲得したが、心不全のため現在寝たきり。有意語なし。筋緊張低下、筋量少ない。老人様顔貌 (?) (おちくぼんだ眼、細い顎)、太く短い指を示す。

D. 考察

1p36 欠失症候群は、端部欠失症候群としてはもつとも頻度が高く (5000 出生に 1 人)、精神運動発達遅滞 (中～重度)、難聴、けいれん、成長障害、低緊張、心奇形・拡張型心筋症、特徴的顔貌を特徴とする。と

きに口唇・口蓋裂、内分泌異常（甲状腺機能低下、思春期早発症）、行動異常（自傷行為）、脳 MRI 異常（多小脳回、白質脳症、萎縮）がみられる。欠失のサイズと症状数には相関がないとされているが、難治てんかん・難聴のような一部の症状については欠失範囲との相関があるといわれている。表2に1p36症候群で報告されている症状と今回見出された2症例に認められる症状との比較を示す。

E. 結論

多発奇形を伴う精神発達遅滞症例の原因検索として、マイクロアレイCGHを用いた解析は有用であり、コストロ症候群・CFC症候群類縁疾患の解析にも用いることが可能と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki Y, Kure S, Oota M, Fukuda M. Nonketotic Hyperglycinemia: Proposal of a Diagnostic and Treatment Strategy. *Pediatr Neurol* 2010;43:221-4.

2. Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, Abe Y, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Kanno J, Niihori T, Ono M, Ishii N, Owada Y, Fujimura M, Mashimo Y, Suzuki Y, Hata A, Tsuchiya S, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet* 2011;56:34-40.

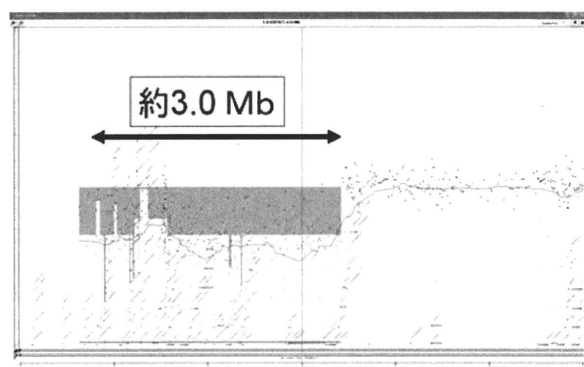
2. 学会発表

菊池敦生、福與なおみ、佐藤育子、涌澤圭介、廣瀬三恵子、奈良千恵子、富樫紀子、植松貢、萩野谷和裕、呉繁夫、土屋滋 「マイクロアレイCGHによるサブテロメア領域の検索 —1p36欠失症候群の二例」 日本小児神経学会総会（福岡）、脳と発達、42:S443, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

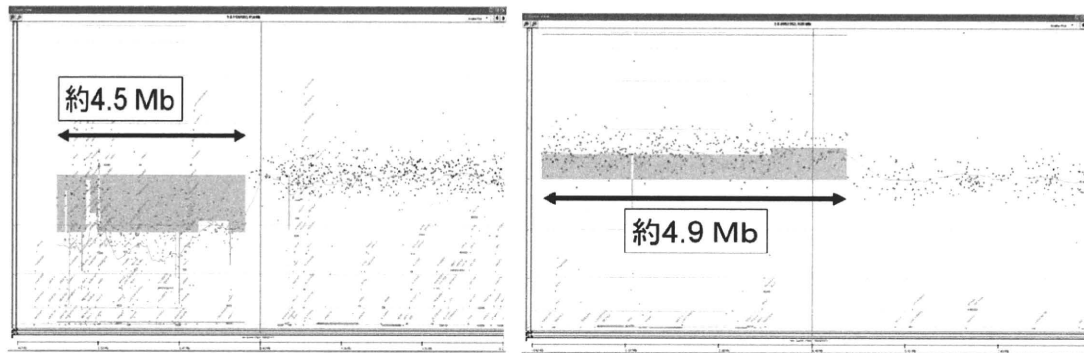
なし

図1 症例1のCGHマイクロアレイ解析の結果



1番染色体短腕サブテロメア領域
(1p36.32-pter)に約3.0Mbの欠失

図2 症例2のCGHマイクロアレイ解析の結果



1番染色体短腕サブテロメア領域
(1p36.32-pter)に約4.5Mbの欠失

2番染色体短腕サブテロメア領域
(2p25.2-pter)に約4.9Mbの重複

表1 症例1、2に認められた1p36症候群の臨床症状

【1p36欠失症候群の症状】

	症例1	症例2
・低緊張	+	+
・てんかん	+	+
・体重増加不良	+	
・特徴的顔貌	+	+
・運動精神発達遅滞	+	+
・口唇・口蓋裂	-	-
・脳MRI異常	?	+
・心奇形・拡張型心筋症	?	+
・難聴	-	+
・甲状腺機能低下	?	?
・行動異常	?	?

「小児を対象とした研究に対する親の意識」

研究分担者 栗山進一 東北大学・大学院医学系研究科・分子疫学分野・教授

研究要旨

医学研究を遂行するためには、高い同意率が必要である。小児を対象とする医学研究においては、親権者がその代諾者となるため、親権者が研究について説明された際に、どのように受け止めるかを明らかにすることは、高い同意率を得るための重要な手がかりを提供する。本研究では、インタビュー形式を用いた半構造化面接を行った。プライバシーの確保されたインタビュールームを確保し、妊婦 3 名を対象とした。インタビューでは、調査への参加意欲を促進する要因・阻害する要因について質問し、特に“小児を調査対象とする”という点についてどのように感じるかを聞いた。その結果妊婦は、研究参加によって、どの程度子どもの負担になるのか不安を持っていた。また、研究参加にあたって母親として、何を、どのくらいの期間、どのくらいの頻度で協力しなければならないのか、その調査内容に関して具体的な説明を求める妊婦が少なくなかった。また、子どもの調査参加に関わる意思決定に関しては、半数以上の妊婦が父親（夫）に相談すると回答した。本研究は対象者数が限定的であり、かつサンプルの代表性が保持されていないため、本研究結果を一般化するには注意が必要であるが、小児が研究に参加することに対する研究対象者の心理・行動様式を十分に理解し、その対策を立案することは、調査・研究への参加同意率向上のために不可欠であることが明らかとなった。

研究協力者

なし

A. 研究目的

医学・疫学研究を遂行するためには、高い同意率が必要である。成人における研究においてもこの点は常に課題となっているが、小児を対象とする医学・疫学研究の場合には、特に重要である。小児を対象とする医学研究においては親権者がその代諾者となるため、親権者が研究について説明された際に、どのように受け止めるかを明らかにすることは、高い同意率を得るための重要な手がかりを提供する。

研究対象者の心理・行動様式を調査・分析して適切なアプローチを生み出す手法はソーシャルマーケティングと呼ばれ、日本においても、がん検診受診率向上のための受診勧奨等に広く用いられている。

本研究の目的は、親権者の心理・行動様式を十分に把握した上で、小児を対象とする研究への参加に同意することを阻害する要因を明らかにすることで

ある。こうした手法を用いることで、小児を対象とする研究参加に同意することを阻害する要因を明らかにすることができ、かつ参加同意率の向上に向けた施策を立てることが可能となる。

B. 研究方法

インタビュー形式を用いた半構造化面接を行った。プライバシーの確保されたインタビュールームを確保し、対象者 3 名に対して、インタビューを行った。インタビューの冒頭において、調査の趣旨説明を行い、個人情報収集しないことなどについて口頭で説明し、調査への協力をもって同意とした。

インタビューでは、調査への参加意欲を促進する要因・阻害する要因について質問し、特に“小児を調査対象とする”という点についてどのように感じるかを聞いた。

C. 研究結果

妊婦 3 名がインタビューに応じた。彼女たちにと

って、今後生まれてくる自分の子どものことが最も大きな関心事であり、どの程度子どもの負担になるのかを懸念していた。また、研究参加にあたって母親として、何を、どのくらいの期間、どのくらいの頻度で協力しなければならないのか、その調査内容に関して具体的な説明を求めていた。さらに、子どもの調査参加に関わる意思決定に関しては、半数以上の妊婦が父親（夫）に相談を行うと回答した。以下、対象者のコメント・反応である。

調査・研究への漠然とした不安

“研究・調査って聞くと、すごく大変なことをするんだらうなと思ってしまいます。血をぬいたり、自分の子どもの負担になるようなことはあんまりさせたくないという感じ”

“採血とか何に使うんだらう？って思った。頻繁に取られるのか、不安。なるべくなら子どもに痛いこととかさせたくないし・・・”

“自分の子どもに何か悪いことが見つかったらどうしようってすごく気になります。だから正直なところ、(調査・研究に参加するのは)自分の子どもじゃなくてもいいんじゃないかって思います”

調査・研究の対象者数・規模

“(研究対象者が)少人数であればあるほど、自分と子どもへの負担が大きくなりそう。少人数だと自分の子どもを簡単に特定できる気がするし、あれこれ「調べられている」感じがしてなんとなく気持ち悪い。もし仮にすごく多くの対象者だったら、自分の子どものデータもたくさんの統計データの一つになるような気はしますけど・・・”

研究に参加することの利益

“(研究に参加することで得られる)自分の子どもへの利益がなさそうなので、モチベーション的に盛り上がりません。めんどくさいとかではないですね”

“自分から率先してやる感じでもない。もし病院の人から言われたらやるかもしれない。でも、自分の子どもへの直接的な利益がやっぱり少ないかもしれないかなって思う”

調査・研究に参加することで生じる負担(時間、労力)

“(血液とか尿とか)決められた試料採取のために定

期的に出向く時間がないかもしれない”

父親の承諾

“父親が調査対象者になっているかどうかに関わらず、いずれにせよ父親には相談します。自分だけの問題ではなく、子どもに関わることなので自分だけでは決められません”

D. 考察

本研究では、小児を対象とする研究に参加する際の阻害要因を明らかにするために、対象者に対して対面式のインタビュー調査を行い、多面的にその要因を分析した。

子どもを持つ親(妊娠している親)にとって、自分の子どもを調査・研究に参加させることで子どもに生じる様々な負担が一番の不安・懸念事項として挙げられる。通常の医学・疫学研究では極端に大きな負担はないものの、子どもに痛みや苦痛を伴わせることに関しては、ぜひ避けたいという心情を持っていた。また、子どもへの負担の大小にかかわらず、父親や母親に対しては、調査・研究で依頼することは何かを伝えるだけではなく、なぜ行うのか、調査・研究の意義や重要性をきちんと平易な言葉を用いて説明し、心に抱く様々な不安・懸念を払しょくしてあげるように話すことがカギであると考えられた。

子どもの調査・研究への参加に関する意思決定として、母親だけで参加了承を得られるケースもあるが、半数以上が父親に相談すると回答した。「子どものことは自分一人では決められず、父親に相談して決める」という、意思決定に父親が介在するケースが多く、調査・研究への参加を促す際の重要なステークホルダーであることが改めて浮き彫りとなった。したがって、子どもの調査・研究への参加に関して父親からいかに理解と承認が得られるか、そのためにはどのような説明を行い、どのような資料が効果的かを十分に検討する必要がある。

本調査の限界として、第一に、調査対象者数が限定的でありかつサンプルの代表性が保持されていない点があげられる。第二に、行動科学理論や行動科学モデルをベースにした形成的調査ではないため、行動に影響を与える要因に関して必ずしも網羅的に検討されていないという点である。このような理由から、本調査を一般化するためにはさらなる調査の検討・実施が求めら

れる。

E. 結論

小児を対象とする研究への参加同意率を高めるためには、1) 研究の意義を十分に説明すること、2) 子どもへの負担の程度を十分に説明すること、3) 研究参加にあたって母親として、何を、どのくらいの期間、どのくらいの頻度で協力しなければならないのかを十分に説明すること、4) 父親の了承を得る工夫をすること、が重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
黒澤健司	染色体異常の理解	千代豪昭	臨床遺伝学講義ノート	オーム出版社	東京	2010	pp37-49
古谷憲孝 黒澤健司	口唇口蓋裂の遺伝	小林眞司	胎児診断から始まる口唇口蓋裂の集学的治療のアプローチ	メジカルビュー社	東京	2010	pp32-38
Kure S	Moyamoya Disease - Over View and Genetic Linkage Study	Cho BK Tominaga T	Moyamoya Disease Update	Springer	New York	2010	41-50

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, Abe Y, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Kanno J, Nijihori T, Ono M, Ishii N, Owada Y, Fujimura M, Mashimo Y, Suzuki Y, Hata A, Tsuchiya S, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S	A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene.	J Hum Genet	56	34-40	2011
Ohashi H et al.	Implications of prenatal diagnosis of the fetus with both interstitial deletion and a small marker ring originating from Chromosome 5.	Am J Med Genet	155	192-6	2011
Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsuoka K, Matsubara K, Hata K, Horikawa R, Ogata T*	Androgenetic/biparental mosaicism in a girl with Beckwith-Wiedemann syndrome-like and upd(14)pat-like phenotypes	J Hum Genet	56 (1)	91-93	2011
Watanabe Y et al.	A familial case of LEOPARD syndrome associated with a high-functioning autism spectrum disorder.	Brain Dev			Online
Dateki S, Fukami M, Tanaka Y, Sasaki G, Moriuchi H, Ogata T	Identification of chromosome 15q terminal deletion with telomere sequences and its bearing on genotype-phenotype analysis	Endocr J			accepted
Miyazaki O*, Nishimura G, Kagami M, Ogata T	Radiological evaluation of dysmorphic thorax in paternal uniparental disomy for chromosome 14.	Ped Radiol			accepted
Komatsuzaki S et.al	Mutation analysis of the SHOC2 gene in Noonan-like syndrome and in hematologic malignancies.	J Hum Genet	55	801-9	2010

Kobayashi T, Aoki Y, Niihori T, Cavé H, Verloes A, Okamoto N, Kawame H, Fujiwara I, Takada F, Ohata T, Sakazume S, Ando T, Nakagawa N, Lapunzina P, Meneses AG, Gillesen-Kaesbach G, Wiczorek D, Kurosawa K, Mizuno S, Ohashi H, David A, Philip N, Guliyeva A, Narumi Y, Kure S, Tsuchiya S, Matsubara Y.	Molecular and clinical analysis of RAF1 in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation.	Human Mut	31(3)	284-294	2010
Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Sato N, Fukami M, Ogata T*.	Heterozygous OTX2 mutations are associated with variable pituitary phenotype	J Clin Endocrinol Metab	95 (2)	756-764	2010
Dateki S, Fukami M, Uematsu A, Kaji M, Iso M, Ono M, Mizota M, Yokoya S, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Ogata T*	Mutation and gene copy number analyses of six pituitary transcription factor genes in 71 patients with combined pituitary hormone deficiency: identification of a single patient with <i>LHX4</i> deletion	J Clin Endocrinol Metab	95 (8)	4043-4047	2010
Kagami M, O'Sullivan MJ, Green AJ, Watabe Y, Arisaka O, Masawa N, Matsuoka K, Fukami M, Matsubara K, Kato F, Ferguson-Smith AC, Ogata T	The IG-DMR and the <i>MEG3</i> -DMR at human chromosome 14q32.2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers.	T PLoS Genet	6 (6)	1000992	2010
Yamazawa K, Nakabayashi K, Kagami M, Sato T, Saitoh S, Horikawa R, Hizuka N, Ogata T	Parthenogenetic chimaerism/mosaicism with a Silver-Russell Syndrome-like Phenotype.	J Med Genet 47	47 (11)	782-785	2010
Kato H, Yoshida R, Tsukamoto K, Suga H, Eto H, Higashino T, Araki JOgata T, Yoshimura K	Familial cases of atypical clinical features genetically diagnosed as LEOPARD syndrome (multiple lentiginos syndrome)	Int J Dermatol	152A (12)	3189-3192	2010
Suzumori N*, Ogata T, Mizutani E, Hattori Y, Matsubara K, Kagami M, Suguhara-Ogasawara M.	Prenatal findings of paternal uniparental disomy 14: delineation of further patient	Am J Med Genetics A	152A	3189-3192	2010
Inoue H*, Kangawa N, Kinouchi A, Sakamoto Y, Kimura C, Horikawa R, Shigematsu Y, Itakura M, Ogata T, Fujieda K.	Identification and functional analysis of novel human growth hormone-releasing hormone receptor (<i>GHRHR</i>) gene mutations in Japanese subjects with short stature	J Clin Endocrinol Metab	Nov 17	1365-2265	2010
Yamazawa K, Ogata T, Ferguson-Smith AC	Uniparental disomy and human disease: an overview.	Am J Med Genetics C (Seminars in Medical Genetics)	154C (3)	329-334	2010
Tsuyusaki Y, Yoshihashi H, Furuya N, Adachi N, Osaka H, Yamamoto K, Kurosawa K.	1p36 deletion syndrome associated with Prader-Willi-like phenotype.	Pediatr Int	52	547-550	2010

黒澤健司	神経線維腫症1型における分子細胞遺伝学的スクリーニング	日レ病会誌	1	35-37	2010
Hosokawa S, Takahashi N, Kitajima H, Nakayama K, Kosaki K, and Okamoto N	Brachmann-de Lange syndrome with congenital diaphragmatic hernia and NIPBL gene mutation.	Congenit Anom (Kyoto).	50	129-132	2010
Okamoto N, Akimaru N, Matsuda K, Suzuki Y, Shimojima K, Yamamoto T.	Co-occurrence of Prader-Willi and Sotos syndromes.	Am J Med Genet A.	152A	2103-2109	2010
Takanashi J, Arai H, Nabatame S, Hirai S, Hayashi S, Inazawa J, Okamoto N, Barkovich AJ.	Neuroradiologic features of CASK mutations.	Am J Neuroradiol.	31	1619-1622	2010
Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto N, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S, Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H, Yoshihashi H, Ono M, Takada F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J.	Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies.	J Hum Genet	2010 Oct 28. [Epub ahead of print]		2010
Filges I, Shimojima K, Okamoto N, Röthlisberger B, Weber P, Huber AR, Nishizawa T, Datta AN, Miny P, Yamamoto T.	Reduced expression by SETBP1 haploinsufficiency causes developmental and expressive language delay indicating a phenotype distinct from Schinzel-Giedion syndrome.	J Med Genet	2010 Oct 30. [Epub ahead of print]		2010
Yamada K, Fukushi D, Ono T, Kondo Y, Kimura R, Nomura N, Kosaki KJ, Yamada Y, Mizuno S, Wakamatsu N.	Characterization of a de novo balanced t(4;20)(q33;q12) translocation in a patient with mental retardation.	Am J Med Genet A.	152(12)	3057-67	2010
水野誠司、西恵理子	形態異常の記載法 — 写真と用語の解説 — 外耳	小児内科	42巻	1316-1338	2010
Shimizu R, Saito R, Hoshino K, Ogawa K, Negishi T, Nishimura J, Mitsui N, Osawa M, Ohashi H.	Severe Peters Plus syndrome-like phenotype with anterior eye staphyloma and hypoplastic left heart syndrome: proposal of a new syndrome.	Congenit Anom	50	197-199	2010
Hirai N, Yamanouchi T, Matsune K, Kobayashi R, Yabe H, Ohashi H, Maeda T.	A Comparison between two-dimensional and three dimensional cephalometry on lateral radiographs and multi Detector Row computed tomography scans of human skulls.	Int J Oral-med Sci	9	101-107	2010

Yamauchi T, Matsune K, Hirai N, Kobayashi R, Yabe H, Ohashi H, Maeda T	Accuracy of tooth development stage, tooth size and dental arch width in multi Detector Row computed tomography scans of human skulls.	Int J Oral-med Sci	9	108-114	2010
Kosho T, Miyake N, Hatamochi A, Takahashi J, Kato H, Miyahara T, Igawa Y, Yasui H, Ishida T, Ono K, Kosuda T, Inoue A, Kohyama M, Hattori T, Ohashi H, Nishimura G, Kawamura R, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N.	A new Ehlers-Danlos syndrome with craniofacial characteristics, multiple congenital contractures, progressive joint and skin laxity, and multisystem fragility-related manifestations.	Am J Med Genet A.	31	284-294	2010
Miyake N, Kosho T, Mizumoto S, Furuichi T, Hatamochi A, Nagashima Y, Arai E, Takahashi K, Kawamura R, Wakui K, Takahashi J, Kato H, Yasui H, Ishida T, Ohashi H, Nishimura G, Shiina M, Saito H, Tsurusaki Y, Doi H, Fukushima Y, Ikegawa S, Yamada S, Sugahara K, Matsumoto N.	Loss-of-function mutations of CHST14 in a new type of Ehlers-Danlos syndrome.	Hum Mutat.	31	966-974	2010
Suzuki Y, Kure S, Oota M, Fukuda M	Nonketotic Hyperglycinemia: Proposal of a Diagnostic and Treatment Strategy.	Pediatr Neurol	43	221-224	2010

(作成上の留意事項)

1. 「研究成果の刊行に関する一覧表」に記入した書籍又は雑誌は、その刊行物又は別刷り一部を添付すること。
2. 研究報告書（当該報告書に含まれる文献等を含む。以下本留意事項において同じ。）は、国立国会図書館及び厚生労働省図書館並びに国立保健医療科学院ホームページにおいて公表されるものであること。研究者等は当該報告書を提出した時点で、公表について承諾したものとすること。
3. 日本工業規格A列4番の用紙を用いること。各項目の記入量に応じて、適宜、欄を引き伸ばして差し支えない。

IV. 研究成果の刊行物・別刷

ORIGINAL ARTICLE

Mutation analysis of the *SHOC2* gene in Noonan-like syndrome and in hematologic malignancies

Shoko Komatsuzaki¹, Yoko Aoki¹, Tetsuya Niihori¹, Nobuhiko Okamoto², Raoul CM Hennekam^{3,4}, Saskia Hopman⁵, Hirofumi Ohashi⁶, Seiji Mizuno⁷, Yoriko Watanabe⁸, Hotaka Kamasaki⁹, Ikuko Kondo¹⁰, Nobuko Moriyama¹¹, Kenji Kurosawa¹², Hiroshi Kawame¹³, Ryuhei Okuyama¹⁴, Masue Imaizumi¹⁵, Takeshi Rikiishi¹⁶, Shigeru Tsuchiya¹⁶, Shigeo Kure^{1,16} and Yoichi Matsubara¹

Noonan syndrome is an autosomal dominant disease characterized by dysmorphic features, webbed neck, cardiac anomalies, short stature and cryptorchidism. It shows phenotypic overlap with Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome. Noonan syndrome and related disorders are caused by germline mutations in genes encoding molecules in the RAS/MAPK pathway. Recently, a gain-of-function mutation in *SHOC2*, p.S2G, has been identified as causative for a type of Noonan-like syndrome characterized by the presence of loose anagen hair. In order to understand the contribution of *SHOC2* mutations to the clinical manifestations of Noonan syndrome and related disorders, we analyzed *SHOC2* in 92 patients with Noonan syndrome and related disorders who did not exhibit *PTPN11*, *KRAS*, *HRAS*, *BRAF*, *MAP2K1/2*, *SOS1* or *RAF1* mutations. We found the previously identified p.S2G mutation in eight of our patients. We developed a rapid detection system to identify the p.S2G mutation using melting curve analysis, which will be a useful tool to screen for the apparently common mutation. All the patients with the p.S2G mutation showed short stature, sparse hair and atopic skin. Six of the mutation-positive patients showed severe mental retardation and easily pluckable hair, and one showed leukocytosis. No *SHOC2* mutations were identified in leukemia cells from 82 leukemia patients. These results suggest that clinical manifestations in *SHOC2* mutation-positive patients partially overlap with those in patients with typical Noonan or CFC syndrome and show that easily pluckable/loose anagen hair is distinctive in *SHOC2* mutation-positive patients.

Journal of Human Genetics (2010) 55, 801–809; doi:10.1038/jhg.2010.116; published online 30 September 2010

Keywords: cardio-facio-cutaneous syndrome; costello syndrome; hematologic malignancy; loose anagen hair; melting curve analysis; noonan syndrome

INTRODUCTION

Noonan syndrome (MIM 163950) is an autosomal dominant disorder characterized by short stature, webbed or short neck, characteristic features (hypertelorism, low-set ears and ptosis), pulmonary valve stenosis and hypertrophic cardiomyopathy.^{1,2} Noonan syndrome is a heterogeneous disease and overlaps phenotypically with Costello syndrome (MIM 218040) and cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome (MIM 115150). Costello syndrome is characterized by mental retardation, distinctive facial features, neonatal feeding difficulties, curly hair, loose skin, and hypertrophic cardiomyopathy and carries an increased risk of malignancy.³ CFC syndrome, on the other hand, is

characterized by mental retardation, ectodermal abnormalities (sparse hair, hyperkeratotic skin and ichthyosis), distinctive facial features (high forehead, bitemporal constriction, hypoplastic supraorbital ridges, downslanting palpebral fissures and depressed nasal bridge) and congenital heart defects (pulmonic stenosis, atrial septal defect and hypertrophic cardiomyopathy).⁴

Recent studies have shown that all three of these disorders result from dysregulation of the RAS/MAPK cascade. It has been suggested that these syndromes be comprehensively termed the RAS/MAPK syndromes⁵ or the neuro-cardio-facio-cutaneous syndrome.⁶ Germline mutations in *PTPN11*, *KRAS*, *SOS1* and *RAF1* have been

¹Department of Medical Genetics, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan; ²Department of Medical Genetics, Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health, Izumi, Osaka, Japan; ³Clinical and Molecular Genetics Unit, Institute of Child Health, Great Ormond Street Hospital for Children, University College London, London, UK; ⁴Department of Pediatrics, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands; ⁵Department of Pediatric Oncology, Emma Children's Hospital, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands; ⁶Division of Medical Genetics, Saitama Children's Medical Center, Saitama, Japan; ⁷Department of Pediatrics, Central Hospital, Aichi Human Service Center, Aichi, Japan; ⁸Department of Pediatrics and Child Health, Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan; ⁹Department of Pediatrics, Sapporo Medical University, Sapporo, Japan; ¹⁰Division of Pediatrics, Oida Hospital, Kochi, Japan; ¹¹Department of Pediatrics, Hitachi Ltd, Mito General Hospital, Ibaraki, Japan; ¹²Division of Medical Genetics, Kanagawa Children's Medical Center, Yokohama, Japan; ¹³Department of Genetic Counseling, Ochanomizu University, Tokyo, Japan; ¹⁴Department of Dermatology, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Japan; ¹⁵Department of Hematology and Oncology, Miyagi Children's Hospital, Sendai, Japan and ¹⁶Department of Pediatrics, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan

Correspondence: Dr Y Aoki, Department of Medical Genetics, Tohoku University School of Medicine, 1-1 Seiryomachi, Sendai, Miyagi 980-8574, Japan.
E-mail: aoki@med.tohoku.ac.jp

Received 14 June 2010; accepted 15 August 2010; published online 30 September 2010

identified in 60–80% of Noonan syndrome patients.^{7–12} In patients with Costello syndrome, germline mutations in *HRAS* have been identified,¹³ and mutations in *KRAS*, *BRAF* or *MAP2K1/MAP2K2* have been identified in approximately 70% of patients with CFC syndrome.^{14,15} However, in approximately 40% of patients with these disorders, specific mutations have not been identified.

SHOC2 is homologous to *soc2*, a gene that was discovered in *Caenorhabditis elegans*. The *soc2* gene encodes leucine-rich repeats¹⁶ and acts as a positive modulator of the RAS/MAPK pathway.¹⁷ Recently, Cordeddu *et al.*¹⁸ reported a gain-of-function missense mutation, c.4A>G (p.S2G), in *SHOC2* in patients with Noonan-like syndrome with loose anagen hair. However, clinical features of patients with a mutation in *SHOC2* remain unknown. In this study, we analyzed 92 patients with Noonan syndrome and related disorders to characterize mutations in the *SHOC2* gene. We also performed expression analysis of *SHOC2* in adult and fetal human tissues and performed sequence analysis of *SHOC2* in 82 leukemia samples.

MATERIALS AND METHODS

DNA samples from patients with Noonan syndrome and related disorders and from leukemia cells

We analyzed 92 patients with Noonan syndrome and related disorders who did not display *PTPN11*, *KRAS*, *HRAS*, *BRAF*, *MAP2K1/2 (MEK1/2)*, *SOS1* or *RAF1* mutations. At the time at which samples were sent, the primary diagnoses of these patients were as follows: 34 Noonan syndrome, 17 Costello syndrome, 21 CFC syndrome, 4 Noonan/CFC, 2 Costello/CFC and 14 others. Control DNA was obtained from 132 healthy Japanese individuals. Control DNA from 105 healthy Caucasian individuals was purchased from Coriell Cell Repositories (Camden, NJ, USA). Eighty-two leukemia DNA samples were collected from

leukemia patients (32 acute myeloid leukemia, 41 acute lymphoblastic leukemia, 1 juvenile chronic myelogenous leukemia, 1 Ki-lymphoma, 2 malignant lymphoma, 1 myelodysplastic syndrome, 1 aplastic anemia, 2 transient abnormal myelopoiesis and 1 unknown). Nine additional genomic DNA samples were collected from patients who had developed leukemia and had achieved complete remission (eight acute lymphoblastic leukemia and one aplastic anemia).

This study was approved by the Ethics Committee of Tohoku University School of Medicine. We obtained informed consent from all subjects involved in the study and specific consent for photographs from seven patients.

Analysis of SHOC2 mutations

Genomic DNA was extracted from patients' peripheral leukocytes. Exons and flanking intron sequences of *SHOC2* were amplified by PCR with primers based on GenBank sequences (Supplementary Table 1, GenBank accession no. NC_000010.10). The M13 reverse or forward sequence was added to the 5' end of the PCR primers for use as a sequencing primer. PCR was performed in 15 µl of solution containing 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6.7 mM MgCl₂, 17 mM NH₄SO₄, 6.7 µM EDTA, 10 mM β-mercaptoethanol, 1.5 mM dNTPs, 10% (v/v) dimethylsulfoxide (except fragment 7), 1 µM of each primer, 50 ng genomic DNA and 1 unit of Taq DNA polymerase. The reaction consisted of 37 cycles of denaturation at 94 °C for 20 s, annealing at the indicated temperature for 30 s and extension at 72 °C for 30 s. The PCR products of fragment 1a were gel purified; PCR products of the other fragments were purified using MultiScreen PCR plates (Millipore, Billerica, MA, USA). The purified PCR products were sequenced on an ABI PRISM 3130 automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Development of a mutation detection system using the light cycler

Real-time PCR and melting curve analysis to detect the c.4A>G mutation was developed using the LightCycler system (Roche Diagnostics, Mannheim,

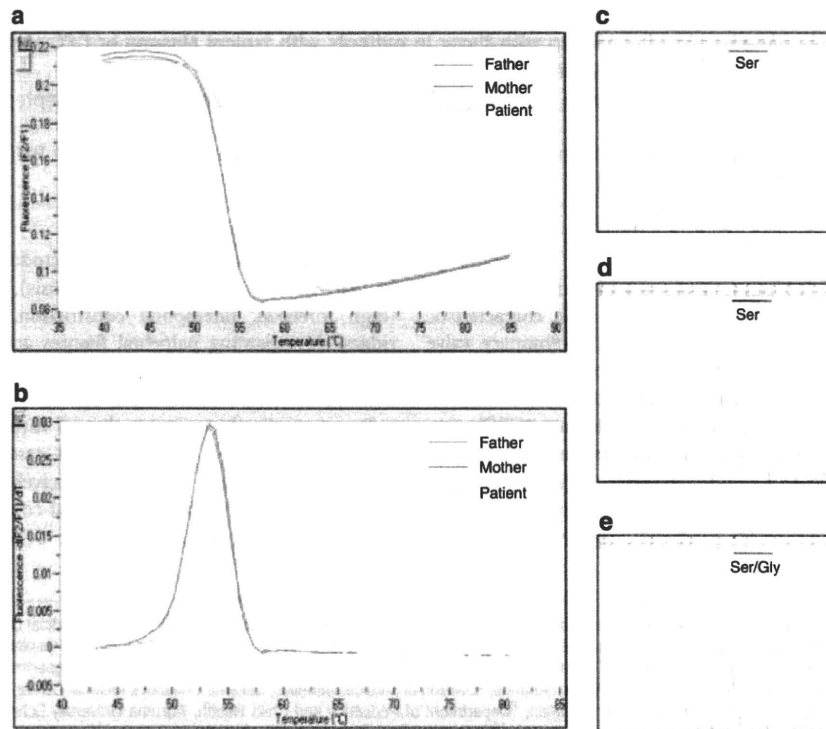


Figure 1 (a) PCR followed by melting analysis to detect the c.4A>G mutation. F2 represents the fluorescence emission of the LC Red 640 fluorophore, whereas F1 shows the fluorescence emission of the fluorescein fluorophore. (b) Melting curves are automatically converted into melting peaks, which are given as the first negative derivative of the fluorescence (F) versus temperature (T) (-dF/dT) (y axis) versus temperature (temp)(x axis). The homozygous wild-type allele (parents of NS128) shows a single melting temperature, whereas the heterozygote (NS128) shows two different melting temperatures. (c, d) Sequencing traces of parents of NS128. (e) Sequencing trace of NS128.

Germany). Primer and probe sequences are shown in Supplementary Table 2. The acceptor probe, which matches the mutant allele sequence, was labeled at its 3' end with fluorescein isothiocyanate. The donor probe was labeled at its 5' end with LC Red640 and phosphorylated at its 3' end to prevent probe elongation by the Taq polymerase. Probes were designed by Nihon Gene Research Laboratories (Sendai, Japan). Amplification was performed in a final volume of 20 µl in glass capillaries containing 10 ng of sample DNA, 2 µl of 10× LightCycler-FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics), 12 nM MgCl₂, 0.3 µM of each forward and reverse primer and 0.2 µM of each acceptor and donor hybridization probe. PCR was performed under the following conditions: initial denaturation at 95 °C for 10 min, 40 cycles of 95 °C for 10 s, 60 °C for 15 s and 72 °C for 7 s with a ramping time of 20 °C s⁻¹. After amplification, melting curve analysis was performed under the following conditions: 95 °C with 0-s hold, cooling to 40 °C for 30 s and slowly heating the sample to 85 °C with a ramp rate of 0.4 °C s⁻¹.

Real-time quantitative PCR

MTC Multiple Tissue cDNA panels Human 1, 2, Human Fetal, Human Immune and Human Cell Line (Clontech, Palo Alto, CA, USA) were used to evaluate the relative expression of SHOC2 in various tissues. Separation of mononuclear and polymorphonuclear (PMN) leukocytes from whole blood was performed using Polymorphoprep (Nycomed, Oslo, Norway); total RNA was prepared with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). One hundred ng of total RNA was used to synthesize complementary DNA (cDNA) using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (ABI). Primers for real-time PCR were designed using software provided by Roche (<https://www.roche-applied-science.com>) (Supplementary Table 3). Universal ProbeLibrary #42 and #60 (Roche) were used for SHOC2 and GAPDH, respectively. PCR was performed in 20 µl of solution containing 10 µl FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche), 18 pmol of each primer, 5 µl cDNA and 0.25 µM universal HybProbe. The reaction conditions were 50 °C for 2 min and 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 11 min.

The real-time PCR program was run by the 7500 Real-Time PCR system (ABI). Diluted control cDNA (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 and 1:10 000) from Multiple Tissue cDNA panels (Clontech) was amplified with each reaction in order to generate a standard curve and calculate relative gene expression of SHOC2.

RESULTS

Mutation analysis in patients and development of a rapid mutation detection system

Sequence analysis of all coding regions of SHOC2 in 92 patients revealed a c.4A>G mutation (p.S2G) in exon1 of SHOC2 in eight unrelated patients. Parental samples were available in three families; the mutation was not identified in parents, suggesting that the mutation occurred *de novo*.

Our results and the previous report identified a c.4A>G mutation in patients with Noonan-like syndrome. To further characterize the occurrence of this mutation, we developed a rapid mutation detection system using a Lightcycler. Two probes were generated for melting curve analysis, and melting curve analysis was performed after PCR. The PCR products from a patient heterozygous for the c.4A>G mutation differed from those obtained from the patient's parents as well as from those obtained from control subjects (Figures 1a and b). The PCR products were verified by sequencing (Figures 1c–e).

Clinical manifestations of patients with the SHOC2 mutation

The clinical manifestations of eight patients with the SHOC2 mutation are shown in Table 1; photographs of five of these patients are shown in Figure 2. The ages of the patients ranged from 4 to 25 years. The primary diagnoses for these patients were Costello, Noonan or CFC syndrome. Three had perinatal abnormalities, including tachypnea, hydramnios, pulmonary hemorrhage and intracranial hemorrhage.

Table 1 Clinical manifestations in SHOC2 mutation-positive patients

Patient ID	NS34	NS93	NS97	NS121	NS128	NS180	NS220	NS232
SHOC2 mutation	p.S2G	p.S2G	p.S2G	p.S2G	p.S2G	p.S2G	p.S2G	p.S2G
Genotype of father/mother	WT/WT	ND	ND	ND	WT/WT	ND	ND	WT/WT
Gender	M	F	F	M	F	M	F	M
Age (years)	13.8	21	10	5.7	8	9	4	25
Country	Japan	The Netherlands	Japan	Japan	Japan	Japan	Japan	Japan
Primary diagnosis	NS/CFC	CFC	CFC	CFC	CFC	NS	CS	CS
Perinatal abnormality								
Polyhydramnios	+	ND	–	–	–	+	+	–
Birth weight	3118 g	3360 g	3068 g	2865 g	2308 g	3258 g	3160 g	3090 g
Others	Tachypnea					Pulmonary hemorrhage	Intracranial hemorrhage	
Growth and development								
Failure to thrive	+	+	+	+	+	+	+	+
Mental retardation	+ WISC III at 9 years 3 months VIQ 81, PIQ 87, FIQ 82	–	+ (DQ44)	+ (DQ48)	+ (DQ 66)	+ WISC III at 9 years 4 months VIQ 61, PIQ <40 FIQ 45	+ (DQ53)	+ (IQ65)
Hyperactivity	–	–	+	–	–	–	–	– (irritability in infancy)
Delayed independent walking (age)	+ (3.6 years)	–	+ (1.8 years)	+ (2.8 years)	+ (4 years)	+ (5 years)	+ (4 years)	+ (3.6 years)
Craniofacial characteristics								
Relative macrocephaly	+	+	+	+	+	+	+	+
Hypertelorism	+	–	–	–	–	+	–	+