

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 Mowat-Wilson 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 ZFH1B (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
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

A. 研究目的

Mowat-Wilson 症候群 (MWS) の原因遺伝子である Smad Interacting Protein-1 (SIP1) 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 (Seuntjens E et al, 2009)。MWS の病因・病態の解明を目指して、原因遺伝子産物である 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。また胎生期のマウス脳解析を行い、Sip1 ヘテロ欠失マウス脳で変動しているタンパク質の同定を試みる。そのようなタンパク質が検出できれば、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となり得る可能性があり、早期診断と治療に貢献すると期待できる。

B. 研究方法

1. SIP1 タンパクの発現解析

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。そこで SIP1 の発現細胞およびその細胞の特性、また外部シグナルに反応した細胞内局在等に関する SIP1 の動態について明らかにする目的で、SIP1 の遺伝子座に in-frame で GFP を挿入し、SIP1 の C 末端側に GFP を融合タンパクとして発現するレポーターノックインマウスを、標的遺伝子組み換えにより作成した。このレポーターノックインマウスを用い、蛍光顕微鏡下での EGFP の局在を直接観察するか、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。

2. Zfx1b (Sip1)ヘテロ欠失マウス脳において変動している遺伝子の同定

胎生 15.5 日(E15.5)マウス仔獣 (野生型と SIP1 ヘテロマウス) の大脳と E17.5 の両マウスの海馬より TRIzol 試薬を用いて total RNA を抽出した。それを用いて、野生型と SIP1 ヘテロマウスにおいて発現量に差が認められる遺伝子を DNA マイクロアレイ法により検索した。

3. Sip1 により転写制御をうける候補遺伝子の発現

3つの候補遺伝子 (Fgf9, Sfrp1, Ntf3) (Seuntjens E et al, 2009) が、幼若神経細胞において Sip1 により転写制御を受けていると報告されている。そこで、これらの遺伝子の発現量を定量 RT-PCR 法により解析した。生後 0 日のマウス仔獣 (野生型と Sip1 ヘテロ欠失マウス) の海馬より抽出した total RNA をランダムプライマーで逆転写して、それぞれの cDNA ライブラリーを作製した。次に本 cDNA を用いて、3つの遺伝子について定量 PCR 法で遺伝子発現量を決定し、野生型と Sip1 ヘテロ欠失マウスで比較した。

C. 研究結果

1. レポーターノックインマウスの作製

図 1 に示した方法を用い、マウス ES 細胞を用いて、SIP1 遺伝子の最終エキソンにレポーターである EGFP を挿入したレポーターノックインマウスを作製した。

2. 作製したレポーターノックインマウスを用いた発現解析

SIP1-EGFP マウスを用いて、SIP1-EGFP の発現を経時的および組織特異的に観察するために、胎生 14 日から出生後 8 週齢までの幾つかの段階において、脳における発現を蛍光顕微鏡による直接観察や抗 EGFP 抗体を用いた免疫染色で観察した。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 2)

(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 3)

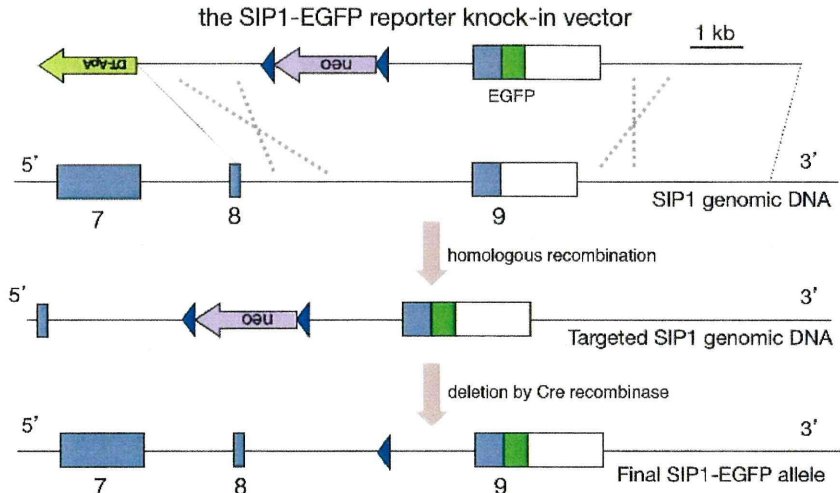


図1 レポーターノックインマウスの作製

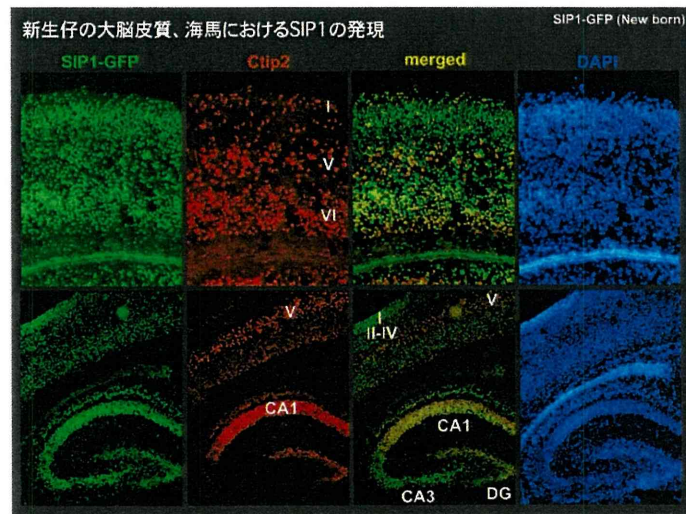


図2 新生仔の大脳皮質、海馬における SIP1 の発現

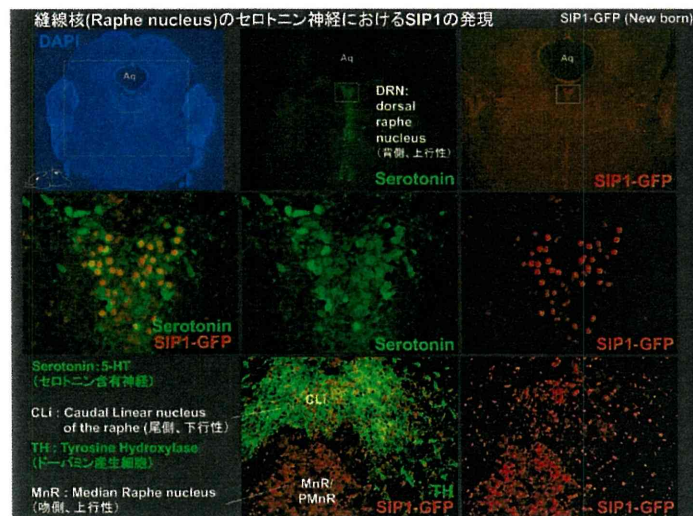


図3 間脳の縫線核における SIP1 の発現

3. Zfhx1b (Sip1) ヘテロ欠失マウス脳において変動している遺伝子の同定

DNA マイクロアレイ法の結果を基にして、野生型と Sip1 ヘテロ欠失マウスにおいて発現量に差が認められる候補遺伝子をリストアップした。これらの候補遺伝子の発現を定量RT-PCR法により順番に解析を行った。その結果、E15.5 の Sip1 ヘテロ欠失マウス大脳で Shox2 遺伝子が約4倍に増加、E17.5 の Sip1 ヘテロ欠失マウス海馬で Smt1 遺伝子が約2倍に増加していた。

4. Sip1 により転写制御をうける3遺伝子の発現解析

生後0日の Sip1 ヘテロ欠失マウスの海馬における Fgf9, Sfrp1, Ntf3 の発現量は、野生型と比較して優位な差は認められなかった。

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。

一方、疾患モデルマウス脳を用いたマイクロアレイ解析で胎生期に発現量の変動する2種類の遺伝子を同定した。しかし、論文で発表されている3遺伝子については、今回の研究で野生型と疾患モデルマウス間に優位な差が得られなかった。その説明として、1) Sip1 による種々の遺伝子の転写調節が脳の領域によってことなること、2) 胎生期の脳の形成や発達に伴って発現量の変動すること、が考えられた。現時点では、最も変動が激しかった Shox2 タンパク質をターゲットとした迅速診断の有効性が重要である。

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, Miquelajaregui 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.

F. 研究発表

1. 論文発表
関連発表なし。
2. 学会発表
関連発表なし。

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

ZEB2 および SHOX2 の高感度測定法の開発

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

研究要旨

モワット・ウィルソン症候群（MWS）の病因遺伝子（タンパク質）である ZEB2（ZFHX1B、SIP1）の血中濃度を測定し、MWS の診断に応用する目的で、ZEB2 測定系の開発を行った。ZEB2 の N-末側（aa395-408）および C-末側ペプチド（aa690-703）を合成し得た 2 種類の抗体を用いた高感度サンドイッチ免疫測定法の開発を試みた。しかし、C-末抗体の反応性が弱く、十分な感度を得ることが出来なかった。そこで、残った N-末抗体による競合的免疫測定法を作成した。その結果、リコンビナント ZEB2 を 0.1 fmol (6.4 pg) まで、検出できることが分かった。現在、リコンビナント ZEB2 を免疫し、whole ZEB2 に対する抗体を作成しており、この抗体と N-末抗体を組み合わせ、高感度サンドイッチ免疫測定法を開発する予定である。

共同研究者

若松 延昭

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（MWS）の病因遺伝子（タンパク質）である ZEB2（ZFHX1B、SIP1）は、ZF（ジンクフィンガー）ファミリーに属する転写調節因子で、形態形成に関与すると考えられている。ZEB2 は核内に局在し、主に標的遺伝子のプロモーターの ZF ドメインに結合し、転写の抑制を行っている。患者では ZEB2 遺伝子にナンセンス変異、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、時に同定が困難な場合に遭遇する。

一方、研究代表者らは、RT-PCR を用いた解析で MWS のモデルマウスの胎児海馬（E17.5）の Shox2 の発現量が野生型（WT）のそれに比べて

約 2 倍であることを見出した。SHOX2 は、その染色体上の位置と、マウス相同遺伝子の発生段階における発現パターンから、頭蓋や手足の奇形、骨成熟の遅れなどの症状を呈するコルネリア・デ・ランゲ症候群などの奇形症候群の原因遺伝子の候補と考えられている。

転写制御因子は細胞質内で翻訳された後、核内へ移行する。この制御因子に変異があると、時には核内への移行に障害となり、細胞質に貯留することとなる。そして、細胞外に漏出または放出されることもある。そのため、ある特定の変異においては、細胞外に検出されることが予想される。事実、がん抑制遺伝子 p53 の変異体は蛋白分解酵素に抵抗性を示し、細胞外に漏出される。その結果、変異 p53 自己抗体が惹起され、食道・大腸・乳がんでは高頻度で検出されるようになって来た。

そこで、血中に漏出した ZEB2 タンパク質および SHOX2 タンパク質を測定し、MWS の診断に応用する目的で、ZEB2 および SHOX2 測定系の

開発を行った。

B. 研究方法

1) 一般試薬

一般試薬は、ナカライテスク（京都）及び和光純薬工業（大阪）より購入した。ウシ血清アルブミン（BSA）は、ナカライテスクより、ストレプトアビジン、和光純薬工業より購入した。抗ウシ血清アルブミン（BSA）血清は、シバヤギ（群馬）より購入した。

2) 抗原

標準リコンビナント・ヒト ZEB2（aa383-720）は GST-ZEB2 融合タンパク質として大腸菌で発現させた後、アフィニティー精製を行い得た。標準リコンビナント・ヒト SHOX2 は、Abnova 社 (USA) より購入した。

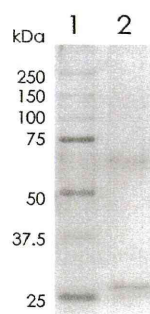


図 1. SIP1 抗原の精製

SIP1 抗原（アミノ酸 383-720）と GST の融合タンパク質を大腸菌で発現し、GST-Sepharose カラムで精製した。

SDS-PAGE (10%) で分離し、CBB 染色した。

Lane 1: タンパク質分子量マーカー

Lane 2: 精製タンパク質

GST (26.8) + SIP1 (37.6) = 64.4 kDa

3) 抗体

ZEB2 の N-末側（aa395-408）および C-末側ペプチド（aa690-703）を合成し、ウサギに免疫することにより抗体を得た。モノクローナルマウス抗ヒト SHOX2（aa117-205）抗体 IgG2a およびウサギ抗ヒト SHOX2（aa179-228）抗体は、共に Abcom 社 (USA) より購入した。

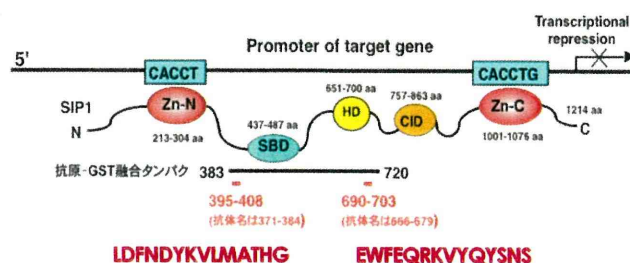


図 2. ZEB2 (ZFHX1B, SIP1) と抗体作成ペプチド



図 3. SIP1 抗体の評価

SIP1 抗原（アミノ酸 383-720）と GST の融合タンパク質を大腸菌で発現し、細胞を破砕後 10000xg で遠心分離した。上清を SDS-PAGE (10%) で分離し、PVDF 膜に転写し、BSA でブロッキングした。GST (26.8) + SIP1 (37.6) = 64.4 kDa

4) 緩衝液

0.1 M NaCl, 0.1% BSA, 1 mM MgCl₂, 0.1% Na₃Nを含む 0.01 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) を緩衝液 A、0.4 M NaCl, 0.1% BSA, 1 mM MgCl₂, 0.1% Na₃N を含む 0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) を緩衝液 B、0.1 M NaCl, 0.01% BSA, 1 mM MgCl₂, 0.1% Na₃N を含む 0.01 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を緩衝液 C、0.1 M NaCl を含む 0.01 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) を緩衝液 D とした。

5) F(ab')₂ の調製

ウサギ抗 ZEB2 の N-末側 (aa395-408) IgG および C-末側ペプチド (aa690-703) IgG は、0.1 M 塩化ナトリウムを含む 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) にて一夜透析し、1 ml に濃縮する。2%

(W/W) になるようにペプシン (Roche) を加え、37°Cで20時間インキュベートする。インキュベーション後、反応は緩衝液 A で平衡化したウルトロゲル AcA44 (1.5 × 45 cm) (Bio SEPR) カラムに添加し、F(ab')₂を得て、0.5 ml に濃縮した。

モノクローナルマウス抗ヒト SHOX2 (aa117-205) 抗体 IgG2a は、0.1 M 塩化ナトリウムを含む 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.2) 1 ml に溶解後、同緩衝液にて一夜透析し、0.5 ml に濃縮する。上記と同様の操作を行い、F(ab')₂を得た。

6) 標識抗体の調製

ウサギ抗 ZEB2 の N-末側 (aa395-408) F(ab')₂ および C-末側ペプチド (aa690-703) F(ab')₂ を還元し得られたヒンジ部の SH 基に、マレイミド基を導入した β-D-ガラクトシダーゼと反応させ、4°Cで20時間インキュベーション後、緩衝液 B で平衡化したウルトロゲル AcA22 カラムに添加し、ヒト ZEB2 の N-末側 (aa395-408) および C-末側ペプチド (aa690-703) 検出用標識抗体 (β-D-ガラクトシダーゼ標識 ZEB2 の N-末側 (aa395-408) および C-末側ペプチド (aa690-703) Fab') コンジュゲートを調製した。

同様に、ウサギ抗 ZEB2 の N-末側 (aa395-408) F(ab')₂ および C-末側ペプチド (aa690-703) を F(ab')₂還元し得られたヒンジ部の SH 基に、マレイミド基を導入した DNP 標識及びビオチン標識 BSA を同時に反応させ、4°C20時間インキュベーション後、緩衝液 C で平衡化したウルトロゲル AcA34 カラムに添加し、ヒト ZEB2 の N-末側 (aa395-408) および C-末側ペプチド (aa690-703) 捕捉用標識抗体 (DNP 化ビオチン化 BSA 標識 ZEB2 の N-末側 (aa395-408) および C-末側ペプチド (aa690-703) Fab') コンジュゲートを調製した。

ウサギ抗ヒト SHOX2 (aa179-228) IgG に導入した SH 基とマレイミド基を導入した β-D-ガラクトシダーゼと反応させ、上記と同様の手順によ

り、ヒト SHOX2 検出用標識抗体 (β-D-ガラクトシダーゼ標識ウサギ抗ヒト SHOX2 (aa179-228) IgG) コンジュゲートを調製した。

ヒト SHOX2 捕捉用標識抗体 (DNP 化ビオチン化 BSA 標識モノクローナルマウス抗ヒト SHOX2 (aa117-205) Fab') コンジュゲートは、上記と同様の手順により調製した。

7) 固相の調製

ウサギ抗 ZEB2 の N-末側 (aa395-408) IgG および C-末側ペプチド (aa690-703) IgG は、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) に 10 μg/ml の濃度に溶解し、直径 6.4 mm のポリエチレンビーズ (イムノケミカル、岡山) と一夜室温で浸漬後、緩衝液 A で洗浄し、4°Cで保存した。アフィニティー精製した抗 DNP-IgG も上記と同様の手順により調製した。

ビオチン化-BSA は、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) に 10 μg/ml の濃度に溶解し、直径 6.4 mm のポリエチレンビーズ (イムノケミカル) と一夜室温で浸漬後、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) で洗浄し、さらに同じ緩衝液で溶解したストレプトアビジン溶液 (10 μg/ml) に一夜室温で浸漬後、緩衝液 A で洗浄し、4°Cで保存した。

8) 免疫複合体転移酵素免疫測定法 (Immune Complex Transfer Enzyme Immunoassay; ICT-EIA)

標準ヒトリコンビナント GST-ZEB2 100 μl または試料 100 μl を用い、これに酵素標識抗体及び捕捉用標識抗体を緩衝液 B に溶解した混合液 100 μl を加え、16時間4°Cでインキュベーションし、捕捉用標識抗体・ヒト ZEB2・検出用標識抗体の3者からなる免疫複合体を形成させた。次いで、この反応液にアフィニティー精製した抗 DNP-IgG を不溶化したポリスチレンビーズ 1 個を加え 0.5 時間反応させた。ビーズを緩衝液 C (2 ml) で 2 回洗浄後、2 mM DNP -L-リジン (150 μl) と 0.5

時間反応させ、ビーズから免疫複合体を溶出させた。抗 DNP-IgG 不溶化ポリスチレンビーズビーズを除去した後、溶出液にストレプトアビジンを不溶化したポリスチレンビーズ 1 個を加え、さらに 0.5 時間反応させ、このビーズに免疫複合体を転移させた。ビーズとの反応は全て 25°C で 180 回/分の振とう下に行った。再びビーズを緩衝液 C (2 ml) で 3 回洗浄後、ビーズ上に転移された β -D-ガラクトシダーゼ活性は 0.1 mM 4-methyl-umberiferryl β -D-galactoside (蛍光基質; 4MUG) (400 μ l) を用いて 30°C でインキュベート後、0.1 M グリシン緩衝液 (pH 10.3) (2 ml) を加え反応を停止後、蛍光分光光度計 (F-2500、日立) を用い測定した)。なお、蛍光波長は 360 nm 蛍光測長は 450 nm とし、蛍光強度は 10^{-8} M 4MU を 100 として換算した。

標準ヒト SHOX2 100 μ l または試料 100 μ l を用い、これに酵素標識抗体及び捕捉用標識抗体を緩衝液 B に溶解した混合液 100 μ l を加え、以降ヒト ZEB2 と同様の操作により測定した。

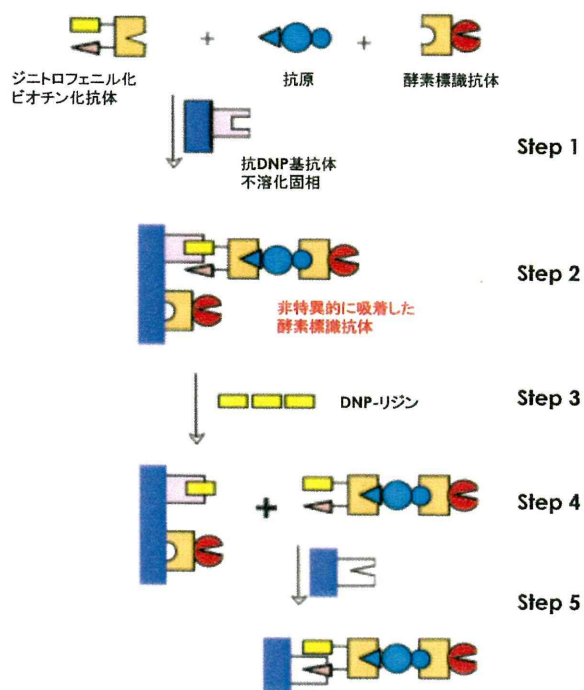


図 4. 抗原を測定するための ICT-EIA 法

Step 1: 免疫複合体の形成。Step 2: 免疫複合体のトラップ。

Step 3: 免疫複合体の溶出。Step 4: 免疫複合体の転移。
Step 5: 免疫複合体の酵素活性測定。

9) 競合的免疫測定法 (Competitive Immunoassay)

標準ヒトトリコンビナント GST-ZEB2 100 μ l または試料 100 μ l を用い、これに検出用酵素標識抗体を緩衝液 B に溶解した混合液 100 μ l を加え、16 時間 4°C でインキュベーションし、ヒト ZEB2・検出用標識抗体の 2 者からなる免疫複合体を形成させた。この時、検出用酵素標識抗体は余っている。次いで、この反応液に GST-ZEB2 を不溶化したポリスチレンビーズ 1 個を加え 0.5 時間反応させた。ビーズを緩衝液 C (2 ml) で 2 回洗浄後、ビーズ上に転移された β -D-ガラクトシダーゼ活性は 0.1 mM 4-methylumberiferryl β -D-galactoside (蛍光基質; 4MUG) (400 μ l) を用いて 30°C でインキュベート後、0.1 M グリシン緩衝液 (pH 10.3) (2 ml) を加え反応を停止後、蛍光分光光度計 (F-2500、日立) を用い測定した。なお、蛍光波長は 360 nm 蛍光測長は 450 nm とし、蛍光強度は 10^{-8} M 4MU を 100 として換算した。

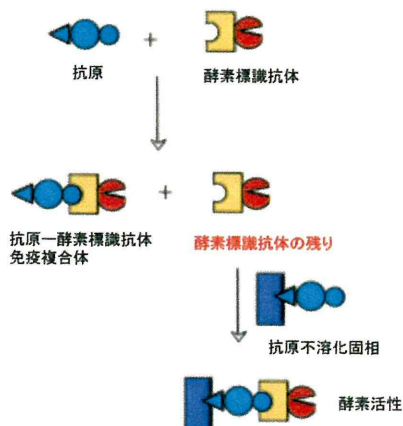


図 5. 競合的免疫測定法

C. 研究結果

ZEB2 の N-末側 (aa395-408) および C-末側ペプチド (aa690-703) に対する 2 種類の抗体 (抗体の調製参照) を調製し、ZEB2 の ICT-EIA 法の作

成を試みた。2抗体の組み合わせ等を検討したが、何れにおいても特異的なシグナルは得られなかった。次いで、従来の ELISA 法を試みた。N-末抗体を不溶化させた固相と ZEB2 抗原を反応させ、その後、酵素標識した C-末抗体と反応させた。また C-末抗体不溶化固相と酵素標識した N-末抗体の逆の組み合わせも検討した。しかし、いずれも特異的なシグナルは見られなかった。

そこで、抗体の結合能を大腸菌で発現させて精製したリコンビナント ZEB2 を不溶化した固相を用い検討した。その結果、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 (図 6)。そのため、結合能の高い N-末抗体の酵素標識下コンジュゲートと、リコンビナント ZEB2 を不溶化した固相を用い、競合的免疫測定法を検討した。種々の条件を検討した結果、リコンビナント ZEB2 は 0.1 fmol (6.4 pg) まで、検出できることが分かった (図 7)。

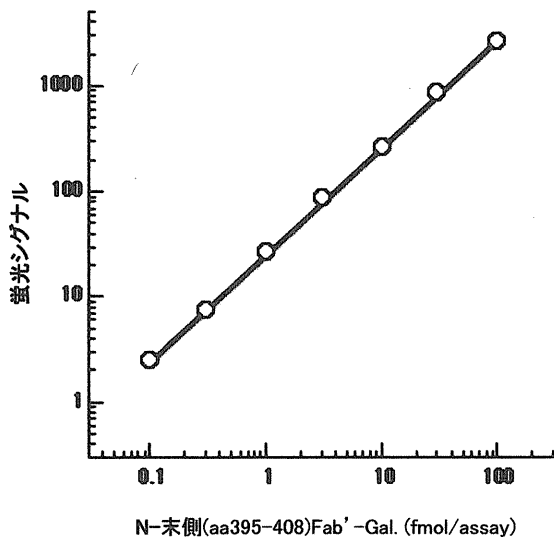


図 6. ZEB2 不溶化固相への N 末側 Fab'-Gal コンジュゲートの結合

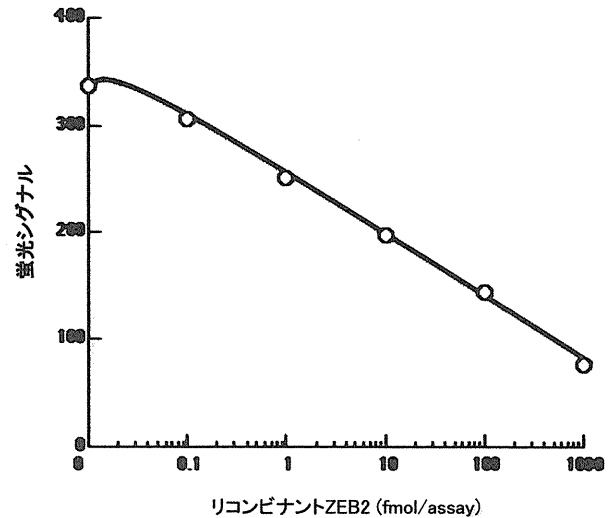


図 7. ZEB2 の競合的免疫測定法

モノクローナルマウス抗ヒト SHOX2 (aa117-205) とウサギ抗ヒト SHOX2 (aa179-228) IgG の 2 種類の抗体 (抗体の調製参照) を購入し、それぞれ捕捉用および検出用コンジュゲートを調製した。これら 2 種のコンジュゲートを組み合わせ、ICT-EIA 法の作成を試みたが、特異シグナルは得られなかった。

D. 考 察

ZEB2 の測定系開発においては、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は達成できなかった。その原因としては、C-末側の抗体と ZEB2 との反応が弱いことが一因に挙げられる。これらの 2 種類の抗体は合成ペプチドにより免疫され調製されたものである。また、ZEB2 のウエスタンブロット抗原とは良く反応している。では、これらの相違は何処から由来しているのであろうか。

我々は、これまで、HIV-1p17 抗体の測定法開発の際に、ウエスタンブロットした p17 抗原、固相に不溶化した p17 抗原及び溶液中の遊離 p17 抗原に対し、患者血清中の抗 p17 抗体の反応が全く異なることを見出している。SDS PAGE により変性した p17 抗原は、抗体と良く反応するが、固相に

に不溶化した native p17 抗原は抗体との反応が弱いこと。また、溶解している native p17 抗原は固相よりは良く反応した。これらのことは、native 抗原の立体構造により、エピトープの出現が異なっていることを示している。

以上の結果から、ZEB2 の C-末側エピトープ領域が立体的に障害（隠れている）されており、抗体と反応しない可能性が考えられた。現在、リコンビナント ZEB2 を免疫し、whole ZEB2 に対する抗体を作成しており、この抗体と N-末抗体を組み合わせ、高感度サンドイッチ免疫測定法を開発する予定である。

E. 結論

ヒト ZEB2 のサンドイッチ型の免疫複合体転移測定法の作成にはいたらなかった。しかし、N-末抗体による競合的免疫測定法により、リコンビナント ZEB2 を 0.1 fmol (6.4 pg) まで、検出でき

ることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表
関連発表なし。
2. 学会発表
関連発表なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得
名称：糖尿病性疾患の進行度評価方法
出願日：2011/3/4
出願番号：特願 2011-64959
出願人：橋田誠一
発明者：橋田誠一、梅原麻子
- 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

モワット・ウィルソン症候群の GH とその関連因子の血中濃度ならびに
同疾患モデルマウスにおけるソマトスタチン（SRIF）発現

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

研究要旨

モワット・ウィルソン症候群（Mowat-Wilson 症候群；MWS）のモデルマウスの胎児の
大脳（E15.5）では、Sip1 で転写調節される *Shox2*（short stature homeobox 2）の発現量の増
加が見られた。本遺伝子上流域にはソマトスタチン（SRIF）応答性配列が存在し、組織中
の SRIF が *Shox2* 産生量を調節し、本症候群の病態に影響している可能性が示唆される。ま
た、E17.5 のモデルマウス海馬で *Smt1* 遺伝子の発現量が RT-PCR 法で野生型（WT）の約 2
倍に増加していたので、本モデルマウスの組織中ならびに血中の SRIF を測定し、野生型
（WT）とヘテロ体（HT）で比較検討した。新生（生直後 P1-5）および成熟モデルマウス
の、血中ならびに大脳の SRIF 含量を、高感度 RIA を用いて測定した。さらに、大脳皮質中
の SRIF 遺伝子発現量を real time-PCR でも併せて検討した。しかし、血中ならびに組織中の
SRIF 含量と、大脳皮質の SRIF 発現量は WT と HT との間に有意差を認めず、SRIF 濃度測
定は、本疾患の定量的簡易診断法にはならないと考えられた。一方、MWS 患者に見られる
身体発達遅滞を解析する目的で、成長に関与する成長ホルモン（GH）とその関連因子であ
る GH 放出ホルモン（GHRH）、SRIF、GH の作用を介在するインスリン様成長因子（insulin
like growth factor-1, IGF-1）の血中濃度を既報の超高感度あるいは高感度測定法を用いて検
討した。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（mean±SE）は
GH（1.2±0.5 ng/mL）、GHRH（32.1±5.2 ng/mL）、SRIF（9.3±0.6 pg/mL）、IGF-1（143.1±40.2 ng/mL）
であり、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。したがって、
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よるも
のではなく、他の形態形成に関与するタンパク等の発現異常に基づく可能性が示唆された。

共同研究者

若松 延昭

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所

平木 洋子

広島市こども療育センター

水野 誠司

愛知県心身障害者コロニー中央病院

A. 研究目的

モワット・ウィルソン症候群（MWS）の病因
遺伝子である *ZEB2*（*ZFH1B*, *SIP1*）は、ZF（ジ
ンクフィンガー）ファミリーに属する転写調節因
子で、形態形成に関与すると考えられている。
ZEB2 タンパクは核内に局在し、主に標的遺伝子
のプロモーターの ZF ドメインに結合し、転写の
抑制を行っている。MWS の遺伝子変異は *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変異で、ハプロ不全を示す。欠失はその領域が多様であり、時に同定が困難な場合に遭遇する。ZEB2 (ZFHX1B, SIP1) タンパクは転写調節タンパクの1つである SHOX の発現量を調整し、さらに下流域の形態や神経系の形成タンパクの量的あるいは質的偏倚を来す可能性が考えられる。その結果、Hirschsprung 病、小頭症、精神遅滞、眼間開離、粘膜下口蓋裂などの外表ならびに内臓異常と低身長に影響を与えていると考えられる¹⁾²⁾。

MWS のモデルマウス *Sip1*^{+/+} の胎児 (E15.5) 海馬では、本症の病因遺伝子タンパク (*Sip1*) によって転写調節される遺伝子の一つ、*Shox2* (short stature homeobox 2) 遺伝子発現量が2倍に増加する。本遺伝子上流域にはソマトスタチン (SRIF) 応答性配列が存在し、組織中の SRIF が身体形成のキータンパクの1つである *Shox2* 産生量を調節し、本症候群における種々の外表奇形や身体発育遅滞などの病態に影響している可能性が示唆されている。そこで、本疾患のヘテロ欠失モデルマウス (HT) を用いて、血中ならびに大脳の SRIF 濃度を検討した。

一方、SIP1 は Smad と相互作用する因子として単離され、N 末端および C 末端側に zinc finger モチーフを、その間にホメオドメイン様の配列および Smad 結合領域を有する DNA 結合型の転写因子である。また SIP1 は、そのアミノ酸配列の相同性から deltaEF1 と同じグループのタンパク質である。deltaEF1 は下垂体前葉の lactotrope 細胞に発現し、growth hormone (GH) 遺伝子の上流域の deltaEF1 結合部位に結合する。この deltaEF1-CtBP-LSD 転写抑制複合体は同細胞での GH 遺伝子の発現を抑制していると考えられる³⁾。従って、同じ SIP1/deltaEF1 ファミリータンパク質の SIP1 もホルモンの分泌調整を行っている可能性が考えられる。MWS における SIP1 タンパクの量的・質的偏位が下流域のヒト SHOX タンパクの

発現量をもたらし、成長に関与する成長ホルモンとその関連因子 (GH 放出因子 GHRH, ソマトスタチン SRIF, インスリン様成長因子 IGF-1) の量的異常を介して、身体発達遅滞を生じている可能性を検討した。

B. 研究方法

1) SRIF RIA

マウス SRIF アミノ酸配列は、ラット、サルに共通であるため、既報の高感度 SRIF (測定感度 0.5 pg/ml, 非抽出血清 5 μ l) を用いた。

2) 大脳皮質からの SRIF 抽出

凍結大脳組織の湿重量 (20-40 mg) の 10 倍量の熱 0.1 N HCL を含む試験管内で 10 分間、煮沸した後、テフロン-ガラスホモゲナイザーでホモゲナイズし、RIA 緩衝液で、10 倍~500 倍に希釈し、それぞれ-30°Cに凍結保存した。

3) 大脳皮質 SRIF 遺伝子の定量的発現

凍結大脳皮質 20-40 mg から、Isogen (ニッポンジーン) を用いて、全 RNA を抽出し、RT 反応を行い、4°Cで保存した。マウス SRIF と β -actin 特異的 PCR プライマーを用いて、real time-PCR (Takara, TP800) を行い、 β -actin 遺伝子発現量に対して SRIF 遺伝子発現量を相対定量した。

4) MWS 血中の GH とその関連因子濃度

各施設の研究倫理委員会の承認と、患者家族の了解を取得後、臨床的にあるいは遺伝子検査で診断の確定した MWS 7 症例の食後 2-4 時間の末梢血を EDTA 採血管もしくは通常採血管に採取し、直ちに血漿もしくは血清分離し、-30°Cに保存した。検体は全て、完全匿名化連結不可能な検体とした。血漿中もしくは血清中の GH とその関連諸因子 (GHRH, SRIF, IGF-1) を既報の超高感度あるいは高感度測定法 (GH³⁾, GHRH⁴⁾, SRIF⁵⁾, IGF-1⁶⁾) を用いて、直接的非抽出で測定した。対照は健常人から完全匿名化連結不可能な血清あるいは血漿検体を用いた。

C. 研究結果

1) モデルマウス：今回検討したモデルマウス *Sip1^{+/Δ}* (HT) での血中ならびに大脳組織中の SRIF 含量 (図 1) と、大脳における SRIF 遺伝子発現量 (図 2) は、その野生型 (WT) マウスのそれらに比較して差を認めなかった。ただ、出生マウスの匹数が少なく、今後の解析が必要と考える。

マウスSRIF								
受領日	ID	No	種類	血中 (pg/ml)	大脳皮質 (pg/mg weight)	SRIF相対定量 vs. Beta		
2010.07.08受	50310	#1	マウスWT雄♂ 8ヶ月	血清	12.3			
	50311	#2	マウスWT雄♂ 8ヶ月	血清	10.61			
	50312	#3	マウスWT雄♂ 8ヶ月	血清	7.91			
	50313	#1	マウスWT雄♂ 8ヶ月	血清	13.23	18.6	4.62E-02	
	50314	#2	マウスWT雄♂ 8ヶ月	血清	13.23	22.4	9.34E-02	
2010.12.01受	52040	1	月	血清	10.9	17.2	1.59E-02	
	52041	2	WT♂ 2ヶ月	血清	9.4	11.1	1.58E-02	
	52042	3	WT♂ 2ヶ月	血清	10.1	6.6	2.46E-02	
	52043	4	WT♂ 2ヶ月	血清	8.0	13.3	3.69E-02	
	52044	6	ヘテロ♂ 2ヶ月	血清	9.3	13.7	2.51E-02	
	52045	8	ヘテロ♀ 2ヶ月	血清	8.1	13.1	2.95E-02	
	52046	9	ヘテロ♀ 2ヶ月	血清	8.5	14.4	2.60E-02	
	52047	9E		血清	9.4			
	2011.02.19受	52454	1	WT 不明 産後	全血・清血	なし	11.1	8.91E-03
		52455	2	ヘテロ 不明 産後	全血・清血	なし	10.3	1.59E-02
52456		3	ヘテロ 不明 産後	全血・清血	なし	7.1	1.03E-02	

図1. 血中ならびに大脳組織中の SRIF 含量

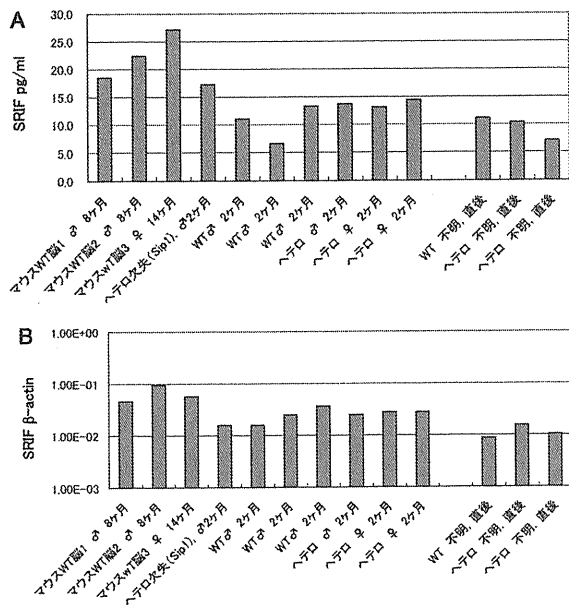


図2. マウス脳の SRIF A: 含量 pg/mL, B: SRIF/β-actin

2) MWS における GH とその関連因子の血中濃度：成人 7 症例の末梢血中の各ホルモン濃度を測定したが、いずれも、健常対照者のそれと有意差を認めなかった (表 1)。

表 1: MWS 7 症例における GH と関連因子の血中濃度

	GH, ng/mL	IGF-1, ng/mL	GHRH, pg/mL	SRIF, pg/mL
Mean	1.2	143.1	31.4	9.3
SE	0.5	40.2	5.2	0.6
成人の基準値	0.05~2.5	50~300	15~50	5~18

D. 考察

SIP1 は Smad と相互作用する因子として単離され、N 末端および C 末端側に zinc finger モチーフを、その間にホメオドメイン様の配列および Smad 結合領域を有する DNA 結合型の転写因子である。また SIP1 は、そのアミノ酸配列の相同性から deltaEF1 と同じグループのタンパク質である。deltaEF1 は下垂体前葉の lactotrope 細胞に発現し、Growth hormone (GH) 遺伝子の上流域の deltaEF1 結合部位に結合し、そこで deltaEF1-CtBP-LSD 転写抑制複合体を形成し同細胞での GH 遺伝子の発現を抑制していると考えられる (Wang et al, 2007)。従って、同じ SIP1/deltaEF1 ファミリータンパク質の SIP1 もホルモンの分泌調整を行っている可能性が考えられる。研究代表者らは、胎生期の海馬において SRIF の発現量が疾患モデルマウスで約 2 倍に増加するのを見出した。しかし、今回の WT と疾患モデルマウスの大脳での SRIF の測定では、両者に優位な差は認められなかった。実際、deltaEF1 の GH 遺伝子の転写抑制も特定の細胞に限られており、今後、SRIF についてもマウス胎児脳を病理学的に解析して、どの領域に SRIF の発現量に違いが見られるかを明らかにしたい。さらに、他のホルモンについても両マウス脳に発現量の違いがあるかどうか、解析する予定である。

つぎに、MWS のマウスモデルでの解析にくわえ、低身長を来した成人 MWS 患者での *SIP1* 遺伝子変異産物の GH-IGF1 系に及ぼす影響を検討した。本研究では生後身体発育を促進する主たる

ホルモンである GH とその関連諸因子として、血中 GH 以外に、GHRH、SRIF ならびに IGF-1 の濃度を測定した。いずれのホルモンの血中濃度も、健常対照のそれとは有意差を認めなかった。したがって、本症の身体発育障害は視床下部 (GHRH-SRIF) -下垂体 GH-肝臓 IGF-1 軸の障害にもとづく可能性は少ない。むしろ、本症における生後の身長体重の増加不良は、高次神経機能不全にともなう摂餌量の減少、末梢組織における IGF-1 作用の減弱、あるいは SHOX タンパクなどの dysmorphogenesis に関与する転写因子の発現異常などによる可能性を示唆する。

E. 結論

MWS モデル動物の血中ならびに大脳皮質の SRIF 発現量は WT と HT との間に有意差を認めなかった。従って、末梢ならびに中枢神経系 (大脳) における SRIF 濃度ならびに含量測定は本疾患モデル動物の定量的簡易診断法にはならないと考えられた。

MWS ではヒトの成長に関与する主要なホルモンである GH とその関連因子 IGF-1、GHRH ならびに SRIF の末梢血濃度は健常対照者との間で有意差を認めなかった。したがって、本症における低身長などの成長障害は GH とその関連因子の分泌低下に基づくものではなく、IGF-1 の作用の障害、SHOX タンパクなどの dysmorphogenesis に関与する転写因子の発現異常、あるいは低栄養状態などによる二次的なものである可能性が示唆された。

文献

- 1) Wit JM, Kiess W, Mullis P: Genetic evaluation of short stature. *Best Practice & Res Clin Endocrinol Metab* 25:1-17, 2011.
- 2) 片上秀喜: 転写因子異常による下垂体機能低下症. *ホルモンと臨床* 49: 1113-1125, 2001.
- 3) Wang J, Scully K, Zhu X, Cai L, Zhang J, Prefontaine GG,

Krones A, Ohgi KA, Zhu P, Garcia-Bassets I, Liu F, Taylor H, Lozach J, Jayes FL, Korach KS, Glass CK, Fu XD, Rosenfeld MG: Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes. *Nature* 446 (7138): 882-887, 2007.

- 4) Katakami H, Hashida S, Yonekawa T, Matsukura S: Detection by a novel and ultrasensitive enzyme immunoassay of pulsatile hGH secretion in spontaneous dwarf rats with targeted expression of hGH-transgene to the pituitary. *Clin Pediatr Endocrinol* 11: S77-83, 2002
- 5) Katakami H, Hashida S, Hidaka H, Ishikawa E, Matsukura S: Development and clinical application of a highly sensitive enzyme immunoassay (EIA) for human growth hormone-releasing hormone (hGHRH) in plasma. *Endocrine J* 45: S67-S70, 1998.
- 6) Katakami H, Hidaka H, Yonekawa T, Kawa S, Shimizu K, Matsukura S: Development of highly sensitive RIA for somatostatin: Direct measurement of plasma somatostatin levels in humans, monkeys and rats. *Clin Pediatr Endocrinol* 11: S99-105, 2002
- 7) 奈須和幸、橋田 誠一、松野 彰、片上 秀喜: ヒトインスリン様成長因子 (ソマトメジンC, IGF-I) に対する新規超高感度測定法の開発と臨床応用. 第 80 回日本内分泌学会総会 (東京) 2007.

F. 研究発表

1. 論文発表
関連発表なし。
2. 学会発表
関連発表なし。

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

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 症候群の成長曲線および身体形態特徴に関する研究

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

研究要旨

Mowat-Wilson 症候群は精神遅滞、てんかん、特異な顔貌を呈する先天異常症候群の一つであり、2001年に愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所の若松らが染色体転座を伴う同症候群例から染色体 2q22 の ZFH1B 遺伝子のハプロ不全が原因であることを示した。本遺伝子がコードするタンパクは神経堤由来細胞の発生・分化に関わり、中枢神経や神経節の形成に重要な役割を持つために、精神遅滞、てんかん、ヒルシュスプルング病、内部奇形などのさまざまな重度の合併症を引き起こす。

先天異常症候群はその疾患毎に特徴的な成長の特性を示すことが知られており、疾患毎の成長曲線を得ることで成長の評価や健康管理に有用である。またそれが奇形所見と合わせて診断の手がかりとなりうる。今回複数の症例から簡易な成長の傾向を調べ身体計測値の変化の概容を調べた。また耳介及び手指の形態について検討した。

Mowat-Wilson 症候群は、「節々の目立つ竹のような細長い指」「巻き込みの強い耳輪と持ち上がった肉厚で正中が陥凹した耳垂」「出生時は標準計測値」「生後の成長障害、小頭症、痩せ型の体型」が本症に特徴的な身体所見であり、顔貌の特徴と合わせて本症の形態学的診断の鍵となる所見であると考えられた。

共同研究者

若松 延昭

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所

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

西 恵理子

愛知県心身障害者コロニー中央病院

鈴木 由香

愛媛大学医学部地域救急医療学講座

A. 研究目的

Mowat-Wilson 症候群は身体的特徴から臨床診断が可能な先天異常症候群である。顔貌などの dysmorphic な所見の他に細い指や痩せた体型などの特徴があるとされるが正確な計測値はない。また、手指の形態がその先天異常症候群の診断に役立つ場合があるとされるが、本症の手指の所見についての報告はまだない。今回本症患者の指の形態について検討しその診断的価値について考察した。また複数の症例を元に本症候群の体格の概

容について検討した。

B. 研究方法

愛知県心身障害者コロニー中央病院小児内科を受診中の Mowat-Wilson 症候群患者及び、研究班分担研究者の医療機関に通院する Mowat-Wilson 症候群患者を対象として、その過去の医療記録及び家族の自己申告から、任意の年齢における身長と体重の記録を抽出した。また愛知県心身障害者コロニー中央病院小児内科を受診中の Mowat-Wilson 症候群患者についてその耳介と手指の形態を写真撮影して検討を加えた。

(倫理面への配慮)

対象患児は未成年でありかつ知的障害を有するため、患児に関する情報の収集に際しては代理人である両親に対して、同意なく個人情報が伝わることのないように説明を行い、同意を得た個人情報のみ収集するように配慮した。

C. 研究結果

出生時の身体計測値に関する検討

対象症例女児 10 例

出生時体重 (平均±SD)

3119 g±365 g

出生時身長 (平均±SD)

49.4 cm±1.7 cm

出生時頭囲 (平均±SD)

31.8 cm±1.2 cm

参考：

2000 年度の日本人女児出生時計測値

身長 48.4 cm±2.1 cm

身長と体重 (図 1)

身長：3 歳時平均 約 -1.5 SD

6 歳時平均 約 -2.0 SD

体重：3 歳時平均 約 -2.0 SD

6 歳時平均 約 -2.0 SD

頭囲 (図 2)

頭囲は計測の得られた全例において生後 1 歳以後、-2 SD 以下の小頭を認めた (図 2)。

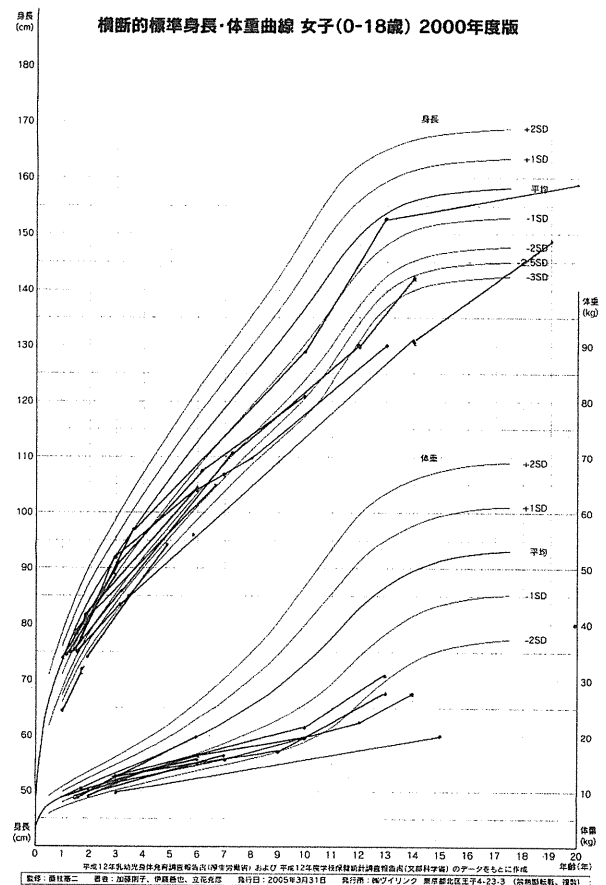


図 1. 身長・体重 (参考：日本人女児の標準曲線)

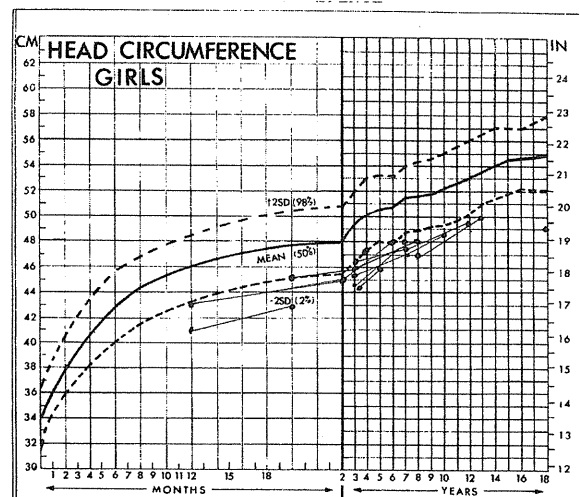


図 2. 頭囲 (参考：日本人女児の標準曲線)

手指の形態についての検討

症例1 R.O. 1歳1か月女児
(ZEB2変異陽性例)



全指にPIP関節以遠が細く、第5指の内彎を認める。

症例2 M.A. 1歳4か月女児



第2-5指は細く、母指は短い。
第5指短小は認めない。

症例3 H.M. 7歳女児



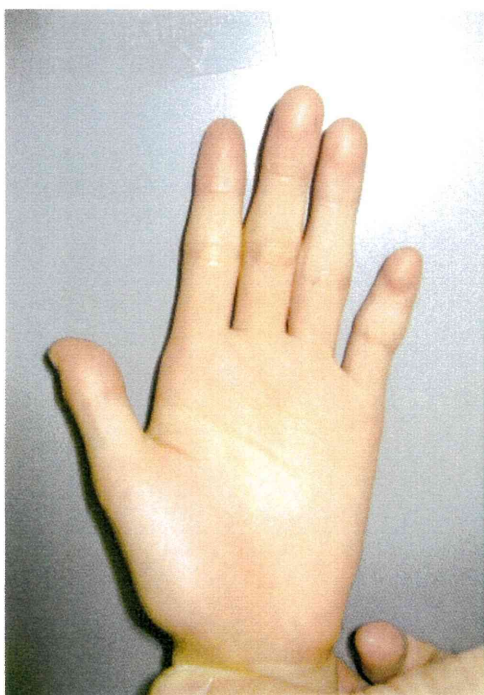
全指が細くDIP関節、PIP関節が目立つ。第5指短小や彎曲は認めない。

症例4 Y.O. 9歳女児



全指が細くDIP関節、PIP関節が目立つ。第5指短小や彎曲は認めない。小指の細長さが目立つ。

症例5 M.K. 12歳 女児



母指と第5指の短小を認める。細長い手掌と指を認める。

症例6 M.H. 14歳 女児



PIP 関節の目立つ細長い指を認める。

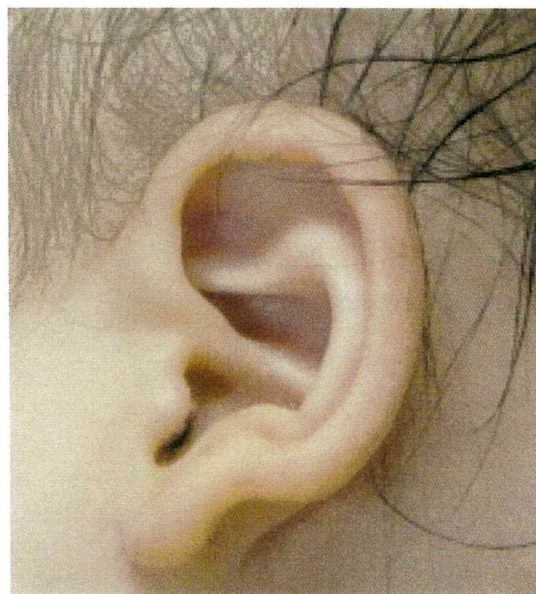
耳介形態についての検討

症例1 M.K. 13歳 女児



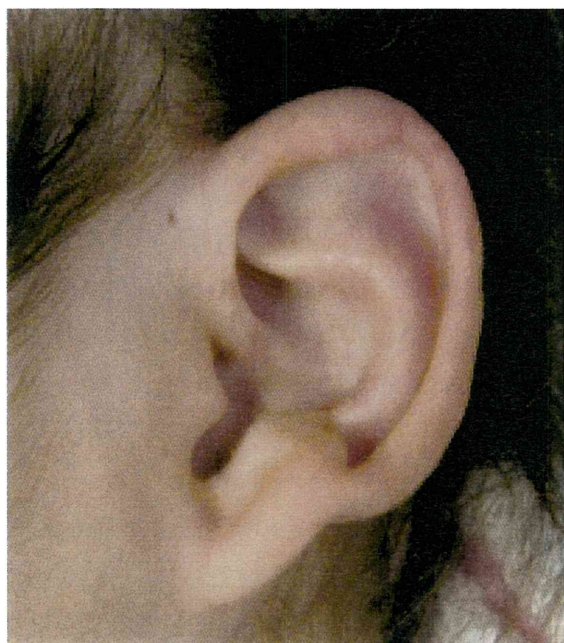
耳介は全体的にやや後方に回転し、耳輪はダーウィン結節が大きく同部位から耳朶に至るまでの巻き込みが強い。耳朶は大きく耳朶の平面は前方を向き耳輪と対耳輪の間の舟状窩の延長が耳朶まで続き耳朶の中心部が陥凹して見える。対耳輪の後脚は認識できない。耳珠は小さく珠間切痕は広い。

症例2 A.T 5歳 女児



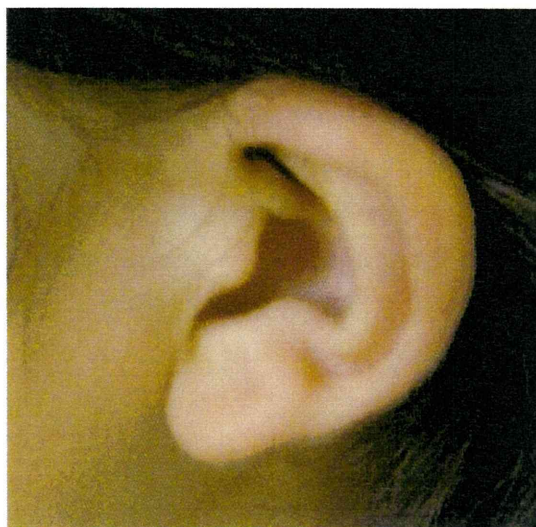
耳輪は上行起始部から耳朶に至るまでの巻き込みが強く下行部の端で一旦前上方に持ち上がり耳朶に垂直に接している。耳朶は大きく耳朶の平面は前方を向き、舟状窩の延長が耳朶まで続き耳朶の中心部が陥凹して見える。対耳輪の後脚は認識できないが全脚は大きい。耳珠は小さく珠間切痕は広い。耳甲介舟、耳甲介腔ともに深い。

症例3 S.F. 10歳 女児



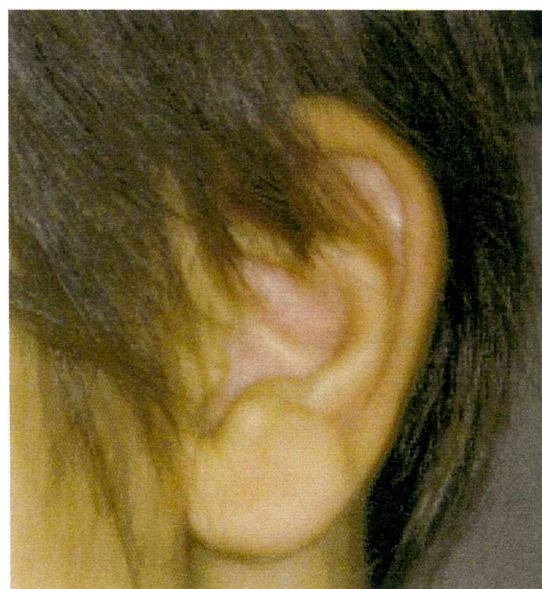
前耳瘻孔がある。耳輪は上行起始部から耳朶に至るまでの巻き込みが若干強い。本例の特徴は耳輪下行部の端で一旦前上方に持ち上がり耳朶にT方に垂直に接していることである。耳朶は大きく耳朶の平面は前方を向き中心部が陥凹している。対耳輪の後脚は形成が弱い。

症例4 H.M. 10歳 女児



耳輪は上行起始部から巻き込みが強く、耳朶に至るまでつづいている。舟状窩が深い。下行部の端で一旦前上方に持ち上がり耳朶に垂直に接している。耳朶は大きく耳朶の平面は前方を向き、舟状窩の延長が耳朶まで続き耳朶の中心部が陥凹して見える。対耳輪の後脚は認識できないが全脚は大きい。耳珠は小さく珠間切痕は広い。耳甲介舟、耳甲介腔ともに深い。

症例5 J.Y. 9歳 男児



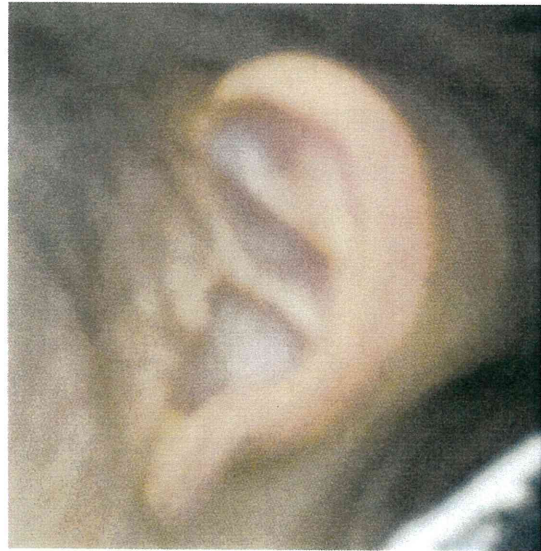
耳輪は上行起始部から巻き込みが強く、耳朶に至るまでつづいている。舟状窩が深い。下行部の端で一旦前上方に持ち上がり耳朶に垂直に接している。耳朶は大きく、耳輪下行部のラインと非連続で盛り上がり円形前向きの耳朶を形成している。耳朶の平面は前方を向き、舟状窩の延長の溝が耳朶まで続き耳朶の中心部が陥凹して見える。対耳輪の後脚は認識できないが全脚は大きい。耳珠は小さく珠間切痕は広い。耳甲介舟、耳甲介腔ともに深い。

症例6 M.H. 15歳 女兒



耳輪は上行起始部から巻き込みが強く、舟状窩のそこが見えないほどの強い巻き込みが耳朶に至るまでつづいている。舟状窩が深く、下行部の端で一旦前上方に持ち上がる。耳朶は大きく円形で耳朶の平面は前方を向き中心部が陥凹して見え、赤血球形態に類似している。対耳輪の後脚は認識できない。耳輪脚は短く、耳甲介舟、耳甲介腔が一つになり深い腔を形成している。

症例7 Y.O. 9歳 女兒



耳輪は起始部から巻き込みが強く下行部では舟状窩を覆うほどである。対耳輪は後脚の隆起が少ないが三角窩は形成している。耳朶は円形で前向きであり中心部の陥凹がみられる。耳輪脚の隆起は細く長く対耳輪に接している。

D. 考 察

先天異常症候群はその疾患毎に特徴的な成長の傾向を示すことが知られており、それが診断の手がかりとなり得る。例えば同じ低身長を特徴とする症候群の中でも、Silver-Russel Syndrome では出生前及び出生後の成長障害が特徴であるのに対して、CFC 症候群では出生時の計測値はほぼ標準であるがその後の成長障害のために低身長となる。また同じ低身長を呈する症候群の中でも、相対的大頭を伴うものとそうで無いものがあり臨床診断の鍵となりうる。

Mowat-Wilson 症候群は小頭症、成長障害（低身長）を伴う症候群であるが、出生時の計測値は身長、体重、頭囲ともに標準値であることが示された。

今後さらに情報を集積して Mowat-Wilson 症候群の成長曲線の作成が望まれる。