

は、Vickers ligament の存在が関与している可能性がある。

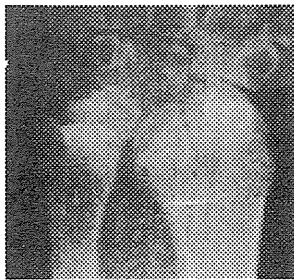
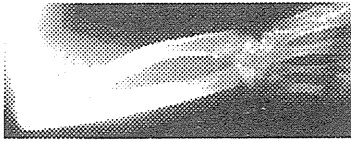


図1. LWS 患者のレントゲン像。

（上）著明な橈骨の短縮、湾曲。（下）月状骨の近位への変位、橈骨尺骨関節面の角度の異常（Madelung 変形）が認められる。

## 2. 3D-C T解析

1 例の LWS 患者において、詳細な画像解析を行った(図 2)。本症においては、橈骨遠位端関節角度の異常による手関節の可動域制限だけでなく、尺骨の亜脱臼と肘関節の形成不全が存在することが明確となった。また、Vickers ligament の付着部と推測されるわずかな骨変化が観察された。

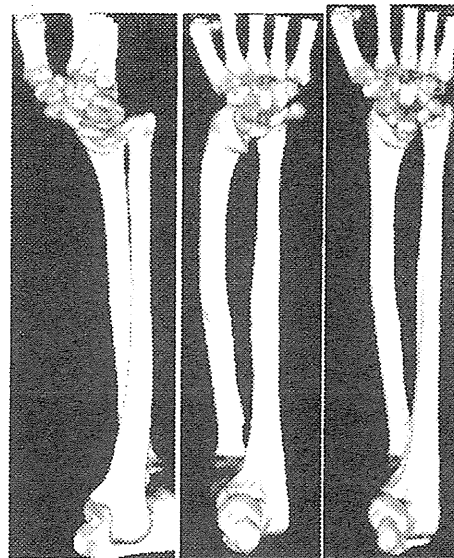


図2. 女性 LWS 患者の 3D-C T 像。

## D. 考察

LWS の一時的変化として、橈骨遠位端尺骨側の成長板早期閉鎖が重要であることが確認された。現在、このような現象が起きる機序は不明である。この部位は、日常生活における転倒等により、外力の影響を受けやすいことから、SHOX 半量不全が外力に対するせい弱性を惹起している可能性がある。一方、女性患者において男性患者より重度の骨変形を認めることから、女性ホルモンが重症化因子として機能していることは明確である。今後、*in vitro* 実験等により、SHOX 異常症の成長板早期閉鎖の機構が解明されると期待される。

3D-C T の解析からは、本症の骨変化が、従来知られている橈骨遠位端の関節面の異常のみならず、尺骨、肘関節の異常を含むことが見出された。今後、整形外科的疾患の治療に際しては、前腕全体の機能の改善を考慮した術式を選択することが重要であると推測される。

単純レントゲン画像の解析および 3D-CT の両者から、本症の骨変化には、Vickers ligament が大きく関与していることが示唆される。今後、この靭帯の発生機序が解明されれば、その知見は、LWS の新規治療法の開発の基盤になると期待される。

E. 結論

LWS の画像上の特徴が明確となった。とくに、重要な点として、本症患者の QOL 低下の原因となる前腕の運動制限や疼痛の発症には、橈骨遠位端関節面の角度の異常だけでなく、尺骨の亜脱臼と肘関節の形成不全が大きく寄与することが見出された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. なし

2. 学会発表

なし

## レリーワイル症候群に対する成長ホルモンと GnRH アゴニスト併用治療の有効性と安全性

研究分担者 長谷川 奉延 慶應義塾大学医学部小児科学教室 准教授

### 研究要旨

レリーワイル症候群(LWS)および SHOX 遺伝子異常による LWS 類縁疾患において成長ホルモン(GH)および GnRH アナログ併用治療を行った 6 名を対象に併用治療の有効性と安全性を検討した。併用治療は本症の低身長に対し有効であり、骨変形に対し安全であることが明確となった。

### 共同研究者

なし

### A. 研究目的

レリーワイル症候群(LWS)の主症状の 1 つは低身長である。EUでは LWS における低身長に対して正式に成長ホルモン(GH)治療が認可されている。近年、GH 分泌不全性低身長症、特発性低身長症に対してGHおよび GnRH アナログ併用治療を行い、成人身長の予後が改善するとの報告が散見される。しかし、LWS に対するGHおよび GnRH アナログ併用治療の成長(とくに成人身長)に対する有効性、骨変形に対する安全性は十分に解明されていない。本研究の目的は、臨床的あるいは分子遺伝学的にLWS、あるいはLWS類縁疾患である“LWSの診断基準を満たさないSHOX 遺伝子異常による低身長”と診断された患者においてGHおよび GnRH アナログ併用治療の有効性ならびに安全性を検討することである。

### B. 研究方法

第一に、わが国におけるGH治療患者の最大登録コホートである成長科学協会のデータベースにアクセスし、2000 年以降に LWS あるいは“LWS の臨床症状を示さない SHOX 遺伝子異常による低身長”に対して GH 治療を行われた患者を抽出した。その中からさらに GnRH アゴニストを併用している患者を選択した。

第二に、「SHOX」および「GnRH analog」のキーワードで PubMed 検索を行った。ヒットした論文の中から 2000 年以降に LWS あるいは“LWS の臨床症状を示さない SHOX 遺伝子異常による低身長”に対して GH および GnRH ア

ゴニスト併用治療を行われている患者を選択した。

以上を対象として、併用治療の低身長に対する有効性と骨変形に対する安全性について検討した。なお、既報にならない年間身長増加が 2.0cm/年となった時点の身長を成人身長と定義した。

(倫理面への配慮)

成長科学協会のデータベースおよび検索した論文上ですでにすべての患者は匿名化されている。

### C. 研究結果

1) 選択された患者: 日本人 2 名、非日本人 4 名が選択された。

2) GH および GnRH アゴニスト併用治療の有効性および安全性

日本人 2 名において以下の結果を得た。症例 1: 女性 6 歳 8 カ月(身長-3.3SD)より GH 単独治療(0.17mg/kg/週)を開始し、9 歳 3 カ月より GnRH アゴニスト(60microgram/kg、4 週毎)を併用した。10 歳 6 カ月時の身長は-2.4SD であり、骨レントゲン上両側橈骨遠位端の変形を認めた。症例 2: 女性 6 歳(身長-4.0SD)より GH 単独治療(0.17mg/kg/週)を開始し、12 歳より GnRH アゴニスト(60microgram/kg、4 週毎)を併用し、15 歳時に併用療法を中止した。17 歳時の成人身長は-4.1SD であり、両側外反肘およびマデルング変形を認めた。

非日本人 4 名において以下の結果を得た。11.8±2.1 歳に GH(0.35mg/kg/週)および GnRH アゴニスト(3.75mg、4 週毎)併用治療を開始した。治療開始時の身長は-2.3±1.3SD であった。GH 治療を 2.8±1.8 年、GnRH アゴニストを 3.8±1.1 年行った。16.2±2.3 歳時の成人身長は

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

-1.7±1.7SD であり、併用療法により 0.6±0.4SD の身長 SDS の増加を得た。2名は併用治療開始時に両側モデルング変形を認め、治療中に変形の悪化はなかった。2名は治療開始時、治療終了時のいずれにおいてもモデルング変形を認めなかった。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

D. 考察

1) LWS あるいは LWS 類縁疾患における低身長に対し、GH および GnRH アナログ併用治療は未治療時に比して成人身長を高くする効果を有する。ただし 0.17mg/kg/週 の GH 投与量では効果は限定的と考えられる。GH 治療の開始時期、GnRH アナログの開始時期、および GnRH アナログ投与量の最適化は今後の課題である。なお、今回の成績は GH 単独治療の低身長に対する治療効果を否定するものではないことに注意すべきである。

2) LWS あるいは LWS 類縁疾患における骨変形に対し、GH および GnRH アナログ併用治療は変形を悪化させることはない。一方で、骨変形を予防することはできない。GH および GnRH アナログ併用治療における骨変形以外の安全性（最大骨密度の獲得、将来の妊孕性、など）は今後の課題である。

E. 結論

LWS あるいは LWS 類縁疾患において、GH および GnRH アナログ併用治療は低身長に対して有効であり、かつ骨変形に対して安全である。

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. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

## Leri-Weill 症候群にみられる前腕変形の研究

研究分担者 国立成育医療研究センター 整形外科 関敦仁 医長

### 研究要旨

これまでに本研究班では、Madelung 変形症例に対して新しい骨切り術を開発し、これによる橈骨遠位部のアライメント改善と尺骨に対する相対長確保の重要性を示した。本年度は、術前から橈骨近位部の変形があつて経過観察中に手関節部の愁訴を有した症例を経験したので形態と愁訴の関連について検討した。5 例における外科的介入のアウトカムについて詳細な解析を行った。Madelung 変形に対する矯正骨切り術を行う際には橈骨近位側の変形にも注意して、腕頭関節の安定性を獲得する対策が必要であることが明確となった。

### 共同研究者

深見真紀（国立成育医療研究センター 研究所）

### A. 研究目的

これまでわれわれは、Madelung 変形症例に対して新しい骨切り術を開発し、これによる橈骨遠位部のアライメント改善と尺骨に対する相対長確保の重要性を示した。今回、術前から橈骨近位部の変形があり、経過観察中に手関節部の愁訴を有した症例を経験したので形態と愁訴の関連について検討する。

### B. 研究方法

対象は、2007 年 10 月から 2010 年 12 月までに手術を行った患者 5 例 7 手である。全例女性で、4 例は Leri-Weill 症候群であった。腕橈関節の対向、手術前後の上腕骨小頭橈骨頭間距離、手術時年齢、手術時尺骨骨端線の有無を、術後の手関節症状の有無と比較して検討した。

（倫理面への配慮）

患者の個人情報と保護するとともに診療に際しては説明と同意を分かりやすく徹底した。

### C. 研究結果

術後の経過観察中に手関節症状を訴えた症例は 2 例 3 手で、1 手は回外可動域が改善するにつ

れて発生した尺側部回外時痛、2 手は不安定感であった。術前の腕橈関節は Leri-Weill 症候群の 3 例 4 手で対向不良を呈し、その内の 3 手が手関節症状を有した。しかし、本症候群でも橈尺骨が同程度に短い例では腕頭関節対向が保たれており愁訴も無かった。尺側の回外時痛を訴えた 1 例は手術前後で小頭橈骨頭間が 8mm 短縮していた。不安定感を訴えた 2 手は 2.4mm と 1.6mm の短縮であった（表 1）。不安定感を訴えた症例も日常生活動作困難となるほどの痛みやゆるみではなかった。

### D. 考察

Leri-Weil 症候群の場合、前腕の短縮は多かれ少なかれ認められるが、肘の腕橈関節の対向が保たれているものは手関節部の不安定性の訴えが無かったのに対して、腕橈関節の対向不良を呈するものには手関節部の愁訴を認めた。同疾患の治療を計画する上で前腕長の獲得とともに腕橈関節の対向を改善する必要がある。

### E. 結論

Madelung 変形に対する矯正骨切り術を行う際には橈骨近位側の変形にも注意して、腕頭関節の対向を獲得する対策が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Morisawa Y, Takayama S, Seki A, Nakamura T, Ikegami H : Reconstruction of the first web in congenital thumb anomalies. Hand Surg. 2011;16(1):63-7.
2. 骨の先天異常-上肢を中心に。臨床検査。55 (13) 1547-1553、2011

2. 学会発表

1. 関敦仁ほか：Madelung 変形の治療における腕橈関節対向の重要性。第22回日本小児整形外科学会学術集会，京都 2011. 12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

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

表1. 5症例におけるアウトカム

症例		Leri-Weill	橈骨短縮	腕橈関節 対向	手関節不 安定
1	右	なし	なし	OK	なし
	左	なし	なし	OK	なし
2	右	あり	あり	OK	なし
	左	あり	あり	OK	なし
3	右	不明	あり	不良	あり
	左	不明	あり	不良	軽度
4	右	あり	あり	不良	軽度
	左	あり	あり	不良	軽度
5	右	不明	あり	不良	ありTFC痛
	左	不明	あり	不良	なし

レリーワイル症候群に対する成長ホルモン治療の安全性

研究分担者 長谷川 行洋 都立小児医療センター内分泌・代謝科 部門長

研究要旨

レリーワイル症候群(LWS)およびSHOX 遺伝子異常によるLWS 類縁疾患において成長ホルモン (GH) 治療はEU の一部の国で承認されている。SHOX 遺伝子が欠けているターナー症候群において GH 治療は低身長に対して有効かつ、安全であることは国内、国外で多くの報告が存在する。我々はLWS およびLWS 類縁疾患、ターナー症候群における GH 治療の安全性に関するデータを入手し、ターナー症候群と比べてLWS およびLWS 類縁疾患への GH 治療の安全性を検討した。2年間という短い期間に限定すれば、LWS およびLWS 類縁疾患では骨変形の悪化等の危惧される AE の報告はなく、ターナー症候群と比較しても安全性に差異を認めなかった。

共同研究者  
なし

A. 研究目的

レリーワイル症候群(LWS)の主症状は低身長、骨変形である。LWS での低身長に対して、および、LWS 類縁疾患（特発性低身長と診断されていた児の一部に認められる SHOX 遺伝子異常）における低身長に関して GH 治療の有効性が RCT を用いて報告されている。実際、近年、EU では正式に成長ホルモン (GH) 治療が認可されている。一方、SHOX 遺伝子が片方のアレルで機能を持たないという点では共通するターナー症候群にみられる低身長には GH 治療が有効、かつ安全であると報告されている。LWS およびLWS 類縁疾患での GH 治療の歴史は、ターナー症候群に比べ短い。

本研究の目的は、臨床的あるいは分子遺伝学的にLWS、あるいはLWS 類縁疾患と診断された患者における GH 治療の安全性を Adverse event(AE)を指標としてターナー症候群と比較することである。

B. 研究方法

LWS およびLWS 類縁疾患（症例数 14）およびターナー症候群(症例数 57)での2年間のGH 治療に関する安全性に関しては、EU での情報を入手した（ドイツ、W. Blum 教授との私信）。ターナー症候群に関しては、さらに日本ケミカルリサーチ、ノボノルディスクファーマ株式会社市販後調査資料（おのおの2年間、10年間）、および、「turner syndrome, GH treatment, adverse event」のキーワードでPubMed 検索を行い、ヒットした論文の中から最も長期である20年の治療成績に基づいている論文(J Clin Endocrinol Metab 93:344-351,2008)を研究材料とした。なお、国内での市販後調査に掲載されているもののうち、ALP 上昇に代表される検査値の異常は調査対象からはずした。

（倫理面への配慮）

EU からの情報、市販後調査資料および検索した論文上ですでにすべての患者は匿名化されている。

C. 研究結果

1) EU データ ; LWS およびLWS 類縁疾患とターナー症候群との比較



上気道炎、胃腸炎といった健常児にみられる日常的事象に加え、関節痛、女性化乳房、母斑の増加、中耳炎、側弯症が LWS および LWS 類縁疾患に対する 2 年間の GH 治療期間で AE として報告されていたが、ターナー症候群での AE 報告と頻度に有意差は認めなかった。LWS および LWS 類縁疾患では GH 治療により骨変形の悪化、四肢プロポーションの悪化も認めなかった。

2) ターナー症候群における GH 治療成績  
ターナー症候群に対する国内 GH 治療市販後調査での AE は上記の EU からの結果と同質であった。上述した欧米からの文献（20 年の長期検討）では EU からの報告 AE に加え、1 型糖尿病、膵炎、大腿骨頭すべり症、頭蓋内圧亢進症、さらに、致死的な AE として 6 名の（リスクのない対象での）悪性腫瘍、5 名の大動脈拡張（14-16 歳）が報告されていた。

#### D. 考察

ターナー症候群での GH 治療中に致死的なイベントとして報告されている大動脈拡張はおそらく、現病固有のものであり現時点では GH 治療で悪化するという証拠は存在しない。また、大動脈拡張は現在まで、LWS および LWS 類縁疾患では報告されていないため、その発症には SHOX 遺伝子ではなく、それ以外の X 染色体遺伝子（例えば、想定されているリンパ管形成遺伝子）の関与が考えられる。

今回の EU からのデータの検討結果は 2 年間という短い時間であるものの、LWS および LWS 類縁疾患での GH 治療がターナー症候群と比較して安全性に関して危惧されないことを示したものである。しかし、ターナー症候群において 20 年のデータをもととした論文での AE は、EU での 2 年の同症候群の情報での AE と比べて、より多岐にわたり、かつ一部重篤な AE が含まれているため、LWS および LWS 類縁疾患での 2 年間という短い検討期間が今回の検討の方法論の限界であることは明白である。さらに、今回の研究では 1) 一般的に報告されている AE では報告する

医師が重要と判断したもののみが入る可能性、  
2) LWS および LWS 類縁疾患では EU からのみの報告であり、EU 独特の医療・文化などが AE 報告に影響を与えている可能性は排除できない。

#### E. 結論

LWS あるいは LWS 類縁疾患における 2 年間の GH 治療は、より安全性が確認されているターナー症候群と比べて危惧されるとはいえない。

#### 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. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 研究成果の刊行一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Fukami M, Tsuchiya I, Takada S, Kanbara A, Asahara H, Igarashi A, Kamiyama Y, Nishimura G, and Ogata T.	Complex Genomic Rearrangement in the SOX9 5' Region in a Patient with Pierre Robin Sequence and Hypoplastic Left Scapula. American Journal of Medical Genetics	American Journal of Medical Genetics	印刷中		2012
深見真紀、 緒方勤.	小児内分泌疾患とゲノムコピー数異常	生体の科学	印刷中		2012
Monisawa Y, Takayama S, Seki A, Nakamura T, Ikegami H.	Reconstruction of the first web in congenital thumb anomalies.	Hand Surg	16(1)	63-7	2011
関敦仁	骨の先天異常-上肢を中心に	臨床検査	55(13)	1547-1555	2011

研究成果の刊行物・別刷り

Complex Genomic Rearrangement in the *SOX9* 5' Region  
in a Patient with Pierre Robin Sequence and Hypoplastic Left Scapula

Maki Fukami<sup>1,\*,#</sup>, Takayosi Tsuchiya<sup>1,3,#</sup>, Shuji Takada<sup>2,#</sup>, Akiko Kanbara<sup>4</sup>, Hiroshi Asahara<sup>2</sup>,  
Arisa Igarashi<sup>2</sup>, Yasunori Kamiyama<sup>4</sup>, Gen Nishimura<sup>5</sup> and Tsutomu Ogata<sup>1,6</sup>

Departments of <sup>1</sup>Molecular Endocrinology and <sup>2</sup>Systems Biomedicine, National Research  
Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan

<sup>3</sup>Department of Pediatrics, Dokkyo University Koshigaya Hospital, Koshigaya, Japan

<sup>4</sup>Department of Pediatrics, Saiseikai Utsunomiya Hospital, Utsunomiya, Japan

<sup>5</sup>Department of Pediatric Imaging, Tokyo Metropolitan Children's Medical Center, Tokyo, Japan

<sup>6</sup> Department of Pediatrics, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, Japan

Running title: Fukami et al., Genomic abnormality in Pierre Robin sequence

\*Correspondence to:

Maki Fukami, M.D., Department of Molecular Endocrinology, National Research Institute for  
Child Health and Development, 2-10-1 Ohkura, Setagaya, Tokyo, 157-8535, Japan, E-mail:  
mfukami@nch.go.jp, Telephone number: +81-3-5494-7025, Fax number: +81-3-5494-7026

<sup>#</sup>These authors are equally contributed to this manuscript.

Pierre Robin sequence (PRS) can occur as a component of campomelic dysplasia (CD) and acampomelic campomelic dysplasia (ACD) caused by dysfunction or dysregulation of *SOX9*, although it can also take place as an isolated form. Recently, genomic alterations in the far upstream and the far downstream region of *SOX9* have been identified in patients with isolated PRS. Here, we report a male patient with PRS and a heterozygous genomic rearrangement in the 5' region of *SOX9*. Clinical analysis revealed PRS-compatible craniofacial anomalies, mild hypoplasia of the left scapula and normal male external genitalia. Molecular analysis identified a paracentric inversion on the long arm of chromosome 17 with breakpoints at 17q21.31 and 17q24.3, and a microdeletion spanning from -4.15 to -1.16 Mb relative to *SOX9*. These findings indicate that the chromosomal region more than 1.16 Mb apart from *SOX9* contains at least one developmental enhancer(s) for *SOX9* that plays a critical role in the development of the mandible and a relatively small role in the development of the scapula. Moreover, the concept of exclusion mapping argues that putative CD/ACD loci are located within the 1.16 Mb region closest to *SOX9* coding exons, which remain intact in this non-CD/ACD patient. This study provides a novel example for long-range cis-regulatory mutations of *SOX9*.

**Key words:**

campomelic dysplasia, deletion, inversion, enhancer, non-coding element

## INTRODUCTION

Pierre Robin sequence (PRS) (OMIM 261800) is a congenital malformation sequence characterized by micrognathia, glossoptosis and posterior U-shaped cleft palate [Robin et al., 1923]. The primary defect of PRS is assumed to be mandibular hypoplasia caused by impaired chondrogenesis or aberrant proliferation of neural crest cells [Gordon et al., 2009]. PRS frequently occurs as a component of known syndromes such as campomelic dysplasia (CD) (OMIM 114290), acampomelic campomelic dysplasia (ACD) and Stickler syndrome (OMIM 108300), although PRS can also take place as an isolated (non-syndromic) form [Holder-Espinasse et al., 2001].

CD and ACD are caused by dysfunction or dysregulation of *SOX9*; multiple intragenic mutations of *SOX9* as well as various types of chromosomal rearrangements around the coding exons have been identified in patients with CD and ACD [Meyer J et al., 1997; Gordon et al., 2009]. In addition to PRS, patients with CD manifest bowing of the long bones (campomelia), hypoplastic scapulae, pelvic malformations, a missing pair of ribs, clubfeet and 46, XY gonadal dysgenesis. ACD represents a mild variant of CD lacking campomelia. Since PRS is present in most patients with CD and ACD [Gordon et al., 2009], *SOX9* likely plays a particularly important role in the development of the mandible.

Recently, molecular defects in the far upstream and the far downstream region of *SOX9* have been identified in patients with isolated PRS. Jamshidi et al. [2004] and Jakobsen et al. [2007] identified balanced translocations of t(2;17) in familial and sporadic PRS cases respectively, and found that the 17q breakpoints are located more than 1.0 Mb upstream of *SOX9*. Subsequently, Benko et al. identified variable genomic abnormalities (translocations, deletions and a nucleotide substitution) at a position more than 1.0 Mb apart from *SOX9* in two sporadic and five familial cases with PRS [2009]. Furthermore, Benko et al. showed that the deletions and translocations included several highly conserved non-coding elements (HCNE) and the nucleotide substitution abolished the tissue-specific enhancer activity of one of these HCNEs (HCNE-F2) [2009]. These data provide the first evidence that dysfunction of the

very-long-range enhancer(s) of *SOX9* causes isolated PRS. However, there is no other report of patients with a molecular defect in the far upstream or the far downstream region of *SOX9*. Here, we report on a male patient with a complex genomic rearrangement in the 5' region of *SOX9*. Clinical and molecular analyses of this patient provide further information on tissue-specific regulation of *SOX9*.

### CLINICAL REPORT

This Japanese male patient was born at 38 weeks of gestation after an uncomplicated pregnancy and delivery. At birth, his length was 48.0 cm (-0.48 SD), weight 2.83 kg (-0.55 SD) and head circumference 32.0 cm ( $\pm$  0 SD). Immediately after birth, he was referred to our clinic because of respiratory distress and facial anomalies. He had hypoplastic mandible, cleft palate and glossoptosis and was therefore diagnosed as having PRS. In addition, he showed bilateral clubfeet. Campomelia and tibial skin dimples were not observed. He manifested normal male external genitalia with bilateral descended testes. On skeletal survey, dolichocephaly with hypoplasia of the facial bone, micrognathia and hypoplasia of the left scapula were evident (Fig. 1). The right scapula was unremarkable. The ischia appeared somewhat broad, and the ischiopubic synchondroses wide; yet, these findings were too mild to be distinguishable from the normal range. Other radiological hallmarks in campomelic dysplasia, such as cervical kyphosis, hypoplastic pedicles of the thoracic spine and narrow ilia, were not discernible. G-banding chromosome analysis showed a normal 46,XY karyotype. Direct sequence analysis for *SOX9* detected no mutation in the coding region [Wada et al., 2009].

During several months after birth, he continually required medical intervention for respiratory and feeding difficulties. He underwent a tracheotomy at 8 months of age. He showed no obvious developmental delay; he was able to stand and walk along the wall at 1 year of age and was able to indicate his desires and needs by pointing at 1 year and 7 months of age. On his last examination at 1 year and 7 months of age, he measured 76.3 cm (-1.77 SD) and weighed 9.2 Kg (-1.31 SD). His parents and sister were clinically normal.



## MOLECULAR ANALYSES

This study was approved by the Institutional Review Board Committee at the National Center for Child Health and Development. After obtaining written informed consent from the parents, a peripheral blood sample was taken from the patient. Parental samples were not available for molecular analysis.

High-resolution chromosomal banding revealed a karyotype of 46,XY,der(17)inv(17)(q21.31q24.3)del(17)(q24.3q23?) (Fig. 2A). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis using RP11-84E24-BAC containing *SOX9* and RP11-20N01-BAC on 17q21.31 indicated a paracentric inversion on one of the two chromosome 17 (Fig 2B and 2C). Signals for *SOX9* were detected on two chromosome 17. Comparative genomic hybridization (CGH) analysis using a human genome oligoarray (1x1 M format, G4447A, Agilent Technologies Palo Alto, CA) indicated a heterozygous deletion in the *SOX9* upstream region (Fig. 3A). *In silico* analysis using UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>; hg 19; NCBI Build 37) showed that the deletion was 2.99 Mb in physical length and flanked by the proximal and the distal breakpoints residing at -4.15 Mb and -1.16 Mb to *SOX9*, respectively. A total of 18 known genes were located within the deleted region, as assessed using the Refseq database (Fig. 3A).

## DISCUSSION

A complex genomic rearrangement in the 5' region of *SOX9* was identified in a male patient with PRS. The genomic lesion was started at a point 1.16 Mb upstream of *SOX9* and affected several HCNEs. In particular, HCNE-F2, previously shown to act as a developmental enhancer for the craniofacial region [Benko et al., 2009], was deleted in this patient (Fig. 3B). Thus, the PRS phenotype of this patient would be ascribed to *SOX9* misexpression due to loss of HCNE-F2, although we cannot rule out the possibility of another hitherto unidentified cis-regulatory element(s) of *SOX9* being affected by the deletion/inversion. In this regard, while

the deletion has removed 18 genes, clinical features of the patient can be explained by *SOX9* dysfunction alone. Moreover, none of the 18 genes, except for *KCNJ2*, are known to be involved in mandibular growth. Furthermore, whereas dominant negative mutations of human *KCNJ2* as well as homozygous deletion of mouse *KcnJ2* have been shown to result in cleft palate and micrognathia [Andelfinger et al., 2002; Zaritsky et al., 2000], haploinsufficiency of *KCNJ2/KcnJ2* has not been shown to cause such abnormalities. Hence, the patient represents a novel case with PRS caused by a *SOX9* cis-regulatory mutation. Such submicroscopic genomic rearrangements may also be present in other patients with isolated PRS. Indeed, only a few genes have been identified as causative genes for isolated PRS. In this regard, it is noteworthy that mutations of collagen genes including *COL11A2* and *COL11A1* were shown to cause a PRS-like phenotype, i.e., Stickler syndrome without apparent ocular involvement [Vikkula et al., 1995; Annunen et al., 1999]. Since collagen genes are known to be direct targets of *SOX9* [Gordon et al., 2009], these data suggest that transactivation of collagen genes by *SOX9* is critical for the development of the mandible.

This patient manifested PRS-compatible craniofacial abnormalities and mild hypoplasia of the left scapula. Nevertheless, he showed no typical CD/ACD skeletal features. These data indicate that the genomic rearrangement of the patient disrupted at least one enhancer for *SOX9* that plays a critical role in the development of the mandible and a small role in the development of the scapula. In addition, the concept of exclusion mapping implies that tissue-specific enhancers for long bones, pelvic bones and ribs are located within the 1.16 Mb region closest to *SOX9*, because CD/ACD is known to be a fully penetrant phenotype in patients with intragenic mutations of *SOX9* [Meyer et al., 1997]. Consistent with this, previous studies have suggested that putative loci for CD/ACD are located within the 1.0 Mb region from *SOX9* [Gordon et al., 2009]. Nevertheless, the phenotype of this patient could also be explained by assuming that there is a global developmental enhancer(s) of *SOX9* in the region more than 1.16 Mb apart from *SOX9* and that the mandible and the scapula are more sensitive to reduced transcriptional levels of *SOX9* than other skeletal tissues [Gordon et al., 2009]. Indeed, various

skeletal changes of the patient such as clubfeet, borderline broad ischia and relatively wide ischiopubic synchondroses, may be related to mildly impaired *SOX9* expression. In this context, it is noteworthy that CD, ACD and isolated PRS are currently regarded as a continuum of a disorder caused by *SOX9* abnormalities [Gordon et al., 2009]. Thus, this patient may represent an intermediate phenotype between ACD and isolated PRS.

This patient had normal male external genitalia, indicating that the testis-specific enhancer(s) of *SOX9* is preserved in this patient. Consistent with this, previous studies on translocation-positive patients suggested that a testis-specific enhancer(s) is located within the 789 kb region closest to *SOX9* [Gordon et al., 2009]. Moreover, animal studies have identified a testis-specific enhancer immediately upstream of *Sox9* [Sekido et al., 2008]. However, fairly well preserved masculinization of this patient may be ascribed to incomplete penetrance of gonadal dysgenesis in *SOX9* abnormalities, because normal testicular development has been observed in about 25% of 46,XY individuals with a *SOX9* intragenic mutation [Mansour et al., 1995].

To date, various types of cryptic deletions have been identified in patients with PRS (Fig. 3B). Notably, there is no overlapping region of deletion that is shared by all PRS cases, although the deletions of sporadic case 4 and familial case 1 reported by Benko et al. [2009] are located within the deleted region of the patient described herein. These results imply that multiple cis-acting elements around *SOX9* are required for the appropriate development of the mandible. Further analysis in a large cohort of PRS patients would enable us to clarify the precise locations of *SOX9* tissue-specific enhancers. In this regard, array CGH would serve as a powerful tool for screening of such patients, because it can detect various copy number alterations in a chromosomal region of several megabases.

In summary, the present study provides a novel example for long-range cis-regulatory mutations of *SOX9*. Our findings suggest that the genomic region more than 1.16 Mb upstream of *SOX9* includes at least one cis-acting element that regulates *SOX9* expression in the developing mandible, and, to a lesser extent, in the developing scapula. Further studies will

permit the full characterization of the genomic environment involved in tissue-specific regulation of *SOX9*.