

國立臺灣大學醫學院臨床醫學研究所  
博士論文



Department or Graduate Institute of Clinical Medicine  
College of Medicine  
National Taiwan University  
Doctoral Dissertation

台灣先天性巨大結腸症之基因研究  
Genetic study for Taiwan's Hirschsprung's Disease

楊曉文  
Wendy Yang

指導教授：陳沛隆教授  
指導教授：李士傑教授  
Advisor: Professor Pei-Lung Chen  
Advisor: Professor Shyh-Jye Lee

中華民國 113年 1月  
January 2024

## 致謝



在住院醫師訓練期間，從沒有想過研究相關的課題。若說和研究沾得上邊的，最多也就是一些臨床案例報告的文獻回顧。一開始是誤打誤撞，在結束住院醫師訓練後覺得需要多些做研究的能力，就進入了台大臨醫所的碩士班。

一開始提醒我可以考慮基因相關研究的人是長庚的陳正昌醫師。有幸在長庚訓練，也知道我們有許多先天性巨大結腸症的病人及家屬始終困惑著生病的原因，擔憂著再發於下一胎，甚至傳給下一代。也因此希望能更進一步了解這個疾病，能提供病患及家屬手術之外的支持。

在台大碩士班期間非常幸運的能遇到陳沛隆醫師作我的指導教授。讓我一開始在他的實驗室裡學基本的操作，讓我這個從未進過實驗室的研究小白可以慢慢站起來。

兩位陳醫師除了學術上的指導，在我沒有任何經費和研究計畫的初期，無條件的支持我。在我開始進入實驗室之前，無知的我從沒想過經費和人力的問題，更別說基因是這麼燒錢的研究。如果沒有陳醫師們的支持，我應該第一學期結束就可以準備退學了。

在這段時期，感受很深的師長們對研究以及教學的熱忱。一開始做小鼠，靠著林教授的耐心解釋才勉強聽懂一些。進度報告時楊偉勛教授聽到小鼠不孕，馬上打電話給獸醫所蔡沛學教授。原本不知怎麼繼續，就又在所有師長幫忙下跨出了下一步，做了精液分析，做了凍胚。

看了幾篇國外用斑馬魚做研究的論文，就開始跟著作夢。寫信給長庚大學的鄭邑荃教授，又讓我遇到了無條件支持我的貴人。讓實驗室的博班學長幫忙，繼續帶著我跟思潔兩個連對魚什麼都不懂的人從零開始。後續在出國之後，仍有機會在陳沛隆醫師的牽線下，找到李士傑教授繼續指導我關於斑馬魚的相關研究。能走到博士班畢業，完全是所有師長的幫忙。而我，除了感謝還是感謝。


## 中文摘要



先天性巨大結腸症是腸道的神經在發育時發生異常，導致腸道的末端沒有神經節的分布，進而形成遠端腸道功能性的阻塞。在臨床上的發生率約每五千個新生兒生會有一個人患有此疾病，且發生率在男性，亞洲人種最高。

腸道神經發育過程已知和多個基因相關，而任何發育過程的干擾都有可能形成先天性巨大結腸症。研究的初期，我們針對台灣的巨腸症患者做臨床個案的基因體研究。方法上，我們使用受試者的周邊血抽取 DNA，並利用 Captured based 的次世代基因定序，選取 31 個報導過和巨腸症相關的基因做分析。在定序了 41 個家族，共 45 位患者後有幾個發現。第一，這樣的方法可以在 87.5% 的家族性患者以及 46.67% 的偶發性患者中找到可能致病的變異位點，遠高於過往只能在 50% 的家族性患者以及 10~20% 的偶發性患者中找到變異位點。第二，我們發現台灣地區的病患，雖然同樣以 *RET* 的變異為主，但 *SEMA3C* 可能和 *RET* 有著類似的重要性，這和國外報導過的有差別。第三，長型的患者中有 20% 的患者可以確認其致病變異，在未來或可經由人工生殖技術避免致病基因變異遺傳給下一代，降低巨腸症家族的復發率。

除了臨床個案的基因體研究之外，針對 *LICAM* 基因，由於患者帶有的是會導致基因功能缺失，且新發生的突變，同時也符合 L1 症候群裡的水腦以及發展遲緩等症狀，而被進一步分析。我們使用 CRISPR endonuclease 的方式讓 FVB 小鼠帶有一個和我們在患者身上發現的同樣變異，*LICAM* exon 18, g.2155 delG，使小鼠的 *Llcam* 基因產生一個 frameshift 的變異，同時也利用 ssODN 在變異點前方製造了一個限制酶的切點以加速後續分辨小鼠的基因型，並對此變異的致病性做進一步的探討。由於此基因位在 X 染色體上，故我們只針對 *Llcam*<sup>emfs1</sup> hemizygous 的公鼠做觀察並發現了兩件事。第一，在觀察了三代，共 62 隻的 hemizygous 公鼠後，並沒有任何一隻有巨腸症的表現，也沒有過去常提及的水腦，但有明確的公鼠不孕的現象。而公鼠的精液分析正常，體外授精也能順利產



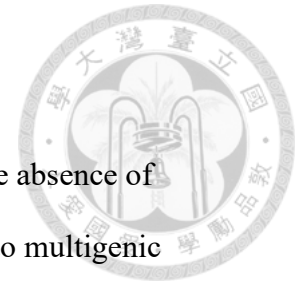
生可復育的胚胎，推測其不孕或許和其行為模式異常相關。第二，*Llcam* 在小鼠一共有 6 個不同的 transcripts，而利用不同 primer 做個別分析時發現，在 *Llcam<sup>emfs1</sup>* 小鼠的腦部，所有的 transcripts 表現量都非常的低，然而在腸道中，短片段的 transcripts 表現量較 wild type 來的更高。在使用不同的 *Llcam* 抗體做免疫螢光染色時發現小鼠的腸道神經節的確有表現這些非全長的 *Llcam* 蛋白質。比較過去報導過 *LICAM* 變異導致 L1 症候群伴隨巨腸症的患者中，會影響到這些短片段 transcripts 的變異佔了將近七成。這些短片段是否具有保護腸道神經節正常發育的功能值得進一步探討。

在小鼠之後，我們還有利用斑馬魚做基因的功能研究。斑馬魚有著繁殖數量多，魚體初期透明便於活體觀察等特性而被大量用於發育的相關的研究。我們在初期的基因體實驗中發現一對父女帶有 *NTRK1* exon7 上的點突變，但 *NTRK1* 對巨腸症的影響並不明確。為此，我們引進了一隻經由 ENU 突變導致其 *nrkl* exon7 帶有終止碼的斑馬魚品系，sa14955，並利用其和神經節帶有 GFP 螢光的 *Tg(phox2b:EGFP)w37* 的基因轉殖魚配種後得到可以觀察 *nrkl* 缺失後神經發育表現的子代。經過初步的觀察發現在 *nrkl* 缺失的斑馬魚的後半腸道，若有的確有明顯神經結數量減少的現象。未來將增加觀察的斑馬魚數量，以及利用攝影產生 Spatiotemporal maps 來確認減少的神經節是否有造成蠕動的異常。

在未來，除了繼續斑馬魚的實驗之外，針對易用目前定序方式仍找不到變異位點的長型患者，可進一步利用父母以及患童的 Trios 全外顯子定序方式試著找到未知的可能致病的基因變異。

關鍵字: 先天性巨大結腸症，次世代基因定序，L1 症候群，*Llcam* 基因剔除小鼠，*nrkl* 基因剔除斑馬魚

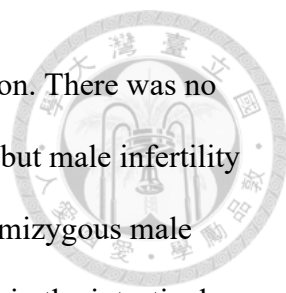
## **Abstract**



Hirschsprung's disease (HSCR) is a congenital disorder with the absence of myenteric and submucosal ganglion cells within the distal gut. Due to multigenic inheritance and interactions, we employed next-generation sequencing (NGS) to investigate the genetic backgrounds of Hirschsprung's disease in Taiwan.

We started with a clinical genetic study in patients with HSCR. Genomic DNA extracted from the peripheral blood of HSCR patients was subjected to capture-based NGS, based on a 31-gene panel. This study enrolled 45 HSCR patients, including 37 (82.22%) sporadic cases and 8 (17.78%) familial patients in 4 different families. Among these patients, we found possible harmful variants 87.5% of familial patients and 46.67% in sporadic patients. This is much higher than what was reported previously that only 50% of the familial cases and 10~20% of the sporadic cases can found possible harmful variants. We also noticed that *SMEA3C* may play an important role in Taiwan's patients which is different from other studies. Lastly, in our study, 20% of our long-segment HSCR patients could find a pathogenic variant. This might be used to prevent the transmission of variants down to their offspring, especially when in vitro fertilization is needed for infertility.

From our clinical genetic study, we found an *LICAM* de novo frameshift mutation in a female with mild hydrocephalus and skip-type HSCR. A nearly identical *L1cam* variant was introduced into FVB/NJ mice via the CRISPR-EZ method. A silent mutation was created via ssODN to gain an artificial NcoI restriction enzyme site for easier genotyping. Six *L1cam* protein-coding alternative transcripts were quantitatively measured. Immunofluorescence staining with polyclonal and monoclonal *L1cam* antibodies was used to characterize *L1cam* isoform proteins in enteric ganglia. Fifteen mice, seven males and eight females, generated via CRISPR-EZ, were confirmed to



carry the *L1cam* frameshift variant, resulting in a premature stop codon. There was no prominent hydrocephalus nor HSCR-like presentation in these mice, but male infertility was noticed after observation for three generations in a total of 62 hemizygous male mice. Full-length *L1cam* transcripts were detected at a very low level in the intestinal tissues and almost none in the brains of these mice. Alternative shorter transcripts encoding the extracellular domains were over-expressed in the intestine of *L1cam* knockdown mice. Immunofluorescence confirmed no full-length L1cam protein in enteric ganglia. These shorter L1cam isoform proteins might play a role in protecting *L1cam* knock-down mice from HSCR.

In addition to the mice study, we also include zebrafish as our animal model. The advantages of using zebrafish include that hundreds of embryos can be produced in a single clutch and the optical clarity of the developing embryo, which allows live imaging at the organism level. From our clinical genetic study, we found a family with a single nucleotide variant in the exon 7 of *NTRK1*. We imported sa14955, which was generated via ENU and carried a stop codon at *nrk1* exon 7. By crossing sa14955 with *Tg(phox2b:EGFP)w37*, we could observe the distribution of ganglion cells in *nrk1* knock-down or knock-out embryos as the neurons carry GFP. The initial results showed that significantly decreasing neurons were noted in the distal intestine of these zebrafish when compared to their wild-type counterparts. We will carry on with spatiotemporal maps to see if the motility of the intestine has also been affected.

In the future, a trio whole exome sequence can be applied to the long-segment HSCR patients whose variant can not be identified by the current method.

Keywords: Hirschsprung's disease, next-generation sequencing, L1 syndrome, *L1cam* knock out mice, *nrk1* knock out zebrafish

# 目次



致謝	i
中文摘要	ii
英文摘要	iv
第一章 緒論	
1-1. 先天性巨大結腸症介紹	1
1-2. 先天性巨大結腸症可能相關之基因	5
1-3. 與先天性巨大結腸症相關的藥物及環境因子	13
1-4. 先天性巨大結腸症的動物模型	15
1-5. 研究目標	16
1-6. 研究之重要性及預期影響	16
第二章 研究方法	
2-1. 臨床個案基因體研究	18
2-2. 小鼠模型	24
2-3. 斑馬魚模型	26
第三章 研究成果	
3-1. 臨床個案基因體研究成果	28
3-2. <i>Llcam</i> knock in 小鼠模型研究成果	29
3-3. <i>nrk1</i> knock out 斑馬魚模型研究成果	35
第四章 討論	
4-1. 臨床個案基因體研究成果討論	39
4-2. <i>Llcam</i> 小鼠模型研究討論	41
4-3. 研究過程中遭遇之困難及解決途徑	45
第五章 未來展望	
5-1. 本論文在該領域之貢獻	47

- 5-2. 未來的研究:全基因組定序和全外顯子定序分析
- 5-3. 未來的研究: *Nrg1* Conditional knock out 小鼠模型
- 5-4. 未來的研究:斑馬魚模型

## 第六章 參考文獻





圖次	頁數
圖一 先天性巨大結腸症患者外觀	64
圖二 下消化道攝影	64
圖三 巨大結腸症患者腸道組織的病理特徵	65
圖四 腸道的神經發育過程	66
圖五 腸道由近端到遠端捲起固定成”瑞士捲”狀的檢體	66
圖六 斑馬魚腸道神經節計算方式	67
圖七 完成 panel 分析的病患分群	67
圖八 先天性巨大結腸症患者基因罕見變異出現的頻率	68
圖九 <i>LICAM</i> De Novo Mutation	69
圖十 FVB 小鼠和人在 <i>LICAM</i> 的序列比較	69
圖十一 FVB 小鼠 <i>Llcam</i> mutation 的位點設計	70
圖十二 小鼠的基因變異確認以及 Sanger's 定序結果	71
圖十三 小鼠腸道神經染色 (低倍)	72
圖十四 小鼠 <i>Llcam</i> 蛋白質結構	73
圖十五 <i>Llcam</i> mRNA 在不同基因型及年紀的公鼠表現量	74
圖十六 小鼠腸道神經染色 (高倍)	75
圖十七 <i>nrkl</i> _sa14955 genotyping 結果	76
圖十八 斑馬魚腸道神經節數量統計	76
圖十九 腸道蠕動距離及時間的 Spatiotemporal maps	77
圖二十 斑馬魚腸道分析	77
圖二十一 家族性先天性巨大結腸症患者的基因變異, Sanger's 定序	78



## 表次

	頁數
表一 巨腸症在家族中再現比率	79
表二 已知和巨腸症相關的基因及小鼠模型	79
表三 NGS 選取之 gene panel	80
表四 長型患者基定序結果	82
表五 短型患者基因定序結果	86
表六 MGP_FVBNJ_ <i>Llcam</i> 不同轉錄產物使用的 primer	90
表七 Isperm 小鼠精液分析	91
表八 <i>RET</i> exon 3: c.G341A:p.R114H 在病人及家屬中的表現	92
表九 <i>SEMA3C</i> exon 11: c.G1009A: p.V337M 在病人及家屬中的表現	92
表十 L1 症候群伴隨先天性巨大結腸症的案例報告統計	93



## 第一章 緒論



### 1-1. 先天性巨大結腸症介紹

#### 1-1-1 歷史背景

先天性巨大結腸症（亦稱為赫普隆氏症）是一種腸胃道神經發育異常所引起的疾病。最早的相關紀錄，甚至可以追溯到古印度，當時文獻記載了一種名為 Baddha Gudodaram 的疾病，其描述的症狀包括了結腸被氣體及石頭（糞石）填滿脹大，患童會在上腹（心臟到肚臍之間）有明顯的腹脹等，均和巨大結腸症有著高度的相似性。除此之外，他們也提到了這些症狀的病因為直腸及肛門的狹窄，對疾病的病生理有著深刻的了解。而更正式的病例紀載可追溯到十七世紀時，Frederick Ruysch 紀錄了一名五歲孩童死於不明原因之腸阻塞，在解剖時除了發現脹大的結腸之外，沒有找到其他的問題。其後在 1800 年時，Battini 也報導了一例類似的病例，一名因為嚴重便秘而在他門診追蹤了十年的男童，最終死於腸阻塞。同樣在解剖時發現巨大的結腸。於是 Battini 提出了"巨大結腸症"這一病名，然而其病因卻未能被了解。在 1825 到 1888 年間，類似的病例報告累積了 20 例左右。直到 1887 年丹麥的一位兒科醫師 Harald Hirschsprung 針對兩名因嚴重便秘與腹脹而死的男童進行解剖之後，才發現這些患者在腸道的肌肉層間（myenteric）以及黏膜下層（submucosal）缺乏自主的副交感神經細胞，導致被疾病影響的腸段，因為沒有辦法正常放鬆而形成功能上的阻塞。在阻塞腸道的近口端，由於堆積了無法順利排出之糞便以及空氣而導致極度的脹大，也造成了我們臨床上所見的巨大腸段。相對於看起來不正常脹大的腸段，遠端缺乏神經結的腸段反而因無法放鬆而看起來保持著相當正常的尺寸與外觀。也因此，在病理診斷確立之前，外科醫師幾乎沒有想過看起來正常的腸道其實不正常而需切除，反而常常選擇切除看起來脹到誇張的有神經節腸段，使得臨床治療的成效不佳，死亡率居高不下。



### 1-1-2 流行病學及臨床表現

依據過去文獻的統計，先天性巨大結腸症的平均發生率約為每五千名新生兒中有一名病童。其發生率與種族有關：西班牙裔為萬分之 1，高加索裔為萬分之 1.5，非洲裔為萬分之 2，亞洲裔為萬分之 2.8。此外，此疾病在男性的發生率遠高於女性，平均來說男女比為 4 比 1。但此男女發生率的差異，會隨著被影響的腸道範圍越長，男女比的差距越小。最常見的短型患者，男女比可以高達 7 比 1；而在全大腸無神經節的患者，男女比則接近 1 比 1。先天性巨大結腸症約有 70% 是偶發的 (sporadic)，其中有 12% 可以找到染色體的異常 (如唐氏症)，有高達 18% 的病人同時伴隨有其他的先天性異常 (Badner et al. 1990)。

這樣的比例在台灣地區則有些不同，根據 1998 到 2010 年間的台灣健保資料庫統計，一共有 629 位新診斷的先天性巨大結腸症病患，發生率為萬分之 2.2，接近之前文獻中亞洲裔的發生率。不過男女比的差異則較低，男性病患為女性的 2.38 倍。令人訝異的是，所有病患有高達 26.9% 伴隨有其他的先天性異常，其中以腸胃道及循環系統最為常見；唐氏症的比例則僅有 1.9% (Chia et al. 2016)。

由於胚胎時期神經細胞離開神經脊後的移動是由頭端往尾端生長 (Fu et al. 2004)，故先天性巨大結腸症的病患，其腸道沒有神經節的幾乎都是由尾端 (肛門端) 往上延伸。根據病患腸道無神經節的長度，先天性巨大節腸症可被區分為四型。若被影響的腸段侷限在乙狀結腸以下至肛門者，歸類為短型 (short-segment)；影響範圍延伸至降結腸以上者，歸類為長型 (long-segment)。臨床上短型的病人為主，占了 80%。在少數 (2%~13%) 的病人，可以是全部大腸連同一段迴腸末段的腸道均沒有神經節，稱為全大腸無神經節型 (total colonic aganglionosis) (Badner et al. 1990; Payen et al. 2022)。而最後一種類型則為跳躍式的神經節缺損，其表現是在兩段沒有神經節的腸段中間夾雜了一段有神經節的正常腸道，在臨床上極少見，多為案例報告，也難用一般胚胎發育的過程解釋其病因。被影響的腸道越長，病患之間男女性別的差異越不明顯，而家族性的傾向越明顯，同時可被找到基因



異常的比率越高(Moore 2012)。

臨床的表現上，新生兒時期常見的症狀包括了胎便的延遲排出（超過九成的病嬰出生後超過四十八小時仍未解胎便）、嚴重腹脹但常常可以經由灌腸或直腸刺激得到暫時的緩解、帶有膽汁甚至是糞便的嘔吐物等遠端腸阻塞所引起的症狀，以及生長遲緩 (Khan, Vujanic, and Huddart 2003)。除了單純的腸阻塞，患童也容易因腸炎 (enterocolitis) 而產生血便，敗血症等嚴重的併發症。在台灣地區，巨腸症的病患有三成左右會在術前或術後產生腸炎的症狀 (Chia et al. 2016)。如果缺乏適當的處置與治療，腸道有可能被脹破而引發腹膜炎、敗血症等可能致死的狀況。

巨腸症雖然是可以簡單地形容成患童因為功能性腸阻塞而產生前段所述的症狀，但其臨床表現千變萬化，在兒童外科被稱為「偉大的模仿者」，並不容易直接診斷。許多患童在新生兒時期並沒有被診斷出來，尤其是吃母乳的孩子，因為消化容易且排便型態較軟，故六個月內可能沒有明顯的症狀，但在轉換成配方奶或是開始接觸副食品後，便秘的症狀便時好時壞的出現，也有人一直到成年之後才被診斷出來 (Khan, Vujanic, and Huddart 2003)。目前約 70~80% 的患者會在出生後的幾個月內被診斷 (Amiel et al. 2008) 並在一歲內接受手術，但仍有 15% 左右的患者拖到五歲前才被診斷，更少數的人會在成年之後才被發現 (Reategui, Spears, and Allred 2021)。若是沒有在嬰幼兒時期被診斷並接受治療，常可見病患腹部極度脹大，然後四肢卻因為營養不良而極度纖細（圖一） (Vorobyov, Achkasov, and Biryukov 2010)。

### 1-1-3 診斷方法

先天性巨大結腸症的患童在沒有發生腸炎或腹膜炎時，理學檢查常可見到極度脹大的腹部，但壓痛相對不明顯。若已有腸炎發生的時候，則可能有明顯的腹膜炎症狀，包含腹部的壓痛、反彈痛、以及腹壁肌肉僵硬的現象。肛門指診的時候，直腸是小小、空空的感覺，如果患病的部位只局限在直腸或直腸乙狀結腸附

近，手指可以更深入而越過移行地帶（transition zone），會有突然覺得寬闊起來的感覺，手指拔出之後則會緊跟著大量的氣體及大便液體排出，此稱之為 squirt sign。這類病患在經過灌腸或是肛管減壓可以讓腹部暫時消脹。

在腹部的 X 光檢查。由於大部分的患童為短型的先天性巨大結腸症，故此類病患常可見異常脹大的結腸，裡面充滿空氣或糞石。此外下消化道的鋇劑攝影在短型的患童也可以見到兩種變化，1. 直腸較結腸來的狹窄 (reverse R/S ratio) 2. 沒有神經節的腸段細窄，而其上有神經節之腸段被脹大而形成了交界處的明顯變化 (transition zone) (圖二)。

在症狀跟影像學的檢查之外，還有針對功能性來檢查直腸壓力對肛門括約肌的影響。在正常狀況下，直腸的壓力增加會促使肛門內括約肌放鬆，以利排便。但在巨腸症的患者身上，直腸壓力的增加不會看到肛門內括約肌的放鬆 (Hirsh et al. 1980)。

然而無論臨床症狀、下消化道攝影有多典型，確診的原則仍是腸道的病理切片在肌肉層間 (myenteric) 以及黏膜下層 (submucosal) 沒有看到腸道神經節。有時可以見到肥大的神經束，在免疫染色之下可以發現乙酰膽鹼的濃度較正常腸道顯著上升 (圖三)。

#### 1-1-4 治療方法

在此疾病能夠用病理診斷之前，外科醫師在手術時往往因為遠端沒有神經節的腸道在肉眼下上看不出異常的外觀所以做了保留;反而是近端有神經節的腸道因為不正常的脹大而被切除。病人則因長期無法正常進食而營養不良，且因腸阻塞而容易反覆產生腸炎，所以有著極高的死亡率。在病因被病理診斷確認之後，醫界才逐漸了解此疾病及過去治療成效不好的原因。

到了 1946 年，Ehrenpreis 提出正確的手術方式應該切除遠端沒有神經節的腸道。此後再發展成為保留了患者的肛門括約肌，而從 dentate line 之上切除沒有神

經節的腸段，再將正常腸道縫回肛門的手術。之後針對術式的改良，現今最常使用的手術方法大致上有三種：Swenson，Soave 以及 Duhamel，在此不再贅述手術方法之間的差別。

隨著病理診斷的精進與手術技術的發展，在台灣近三十年，此疾病的死亡率已經逐漸降低至 2% 左右，且死亡的患童多伴隨有其他的先天性異常，而非單純只有先天性巨大結腸症 (Yeh et al. 2014)。雖然大部分的患童在接受手術切除無神經節之腸段後，均能有不錯的生長發育；但部分的患童仍難免需要經歷多次手術、有長期滲便甚至是失禁的問題，嚴重影響孩童時期的求學與社交發展，也給整個家庭帶來沉重的心理及經濟負擔 (Yeh et al. 2014)。隨著此疾病的致死率越來越低，手術後有較過往正常的生長發育，現今的患者有遠高於過往的機會長大，進而結婚生子，也讓此疾病能在家族內再現的可能性越來越高。

## 1-2. 先天性巨大結腸症可能相關之基因

### 1-2-1 腸道神經的發育

先天性巨大結腸症的成因複雜。在胚胎發育的第四週，為了完成腸道的神經系統 (enteric nervous system, ENS) 發育，遷移性迷走神經脊細胞 (migratory vagal neural crest cells) 從神經脊 (vagal neural crest) 出發，由胚胎之頭側往尾側 (rostral-to-caudal) 逐漸移行 (migration)，經過增生 (proliferate)，及分化 (differentiate) 成為神經元細胞 (neurons) 或是神經膠細胞 (glia)，使神經最後能分布 (colonize) 於整個腸道。在胚胎發育時，任何階段的神經細胞有發育異常均可能導致先天性巨大結腸症。包含了最初在神經脊的神經母細胞缺乏，導致能從神經管移動到腸道的神經母細胞不足；或神經母細胞不能正常的移動到腸道；或神經母細胞雖然有移動到腸道，但在腸道內沒辦法存活；或雖在腸道中有神經母細胞存活，但分化異常，沒有形成正常的神經元；或是腸道的局部環境異常導致神經

細胞的移動或生長異常 (Heanue and Pachnis 2007)等。雖然在整個腸道發育的過程中，任何的異常均可能致病，但神經母細胞未能移動到腸道或未能在腸道內增殖被認為是造成先天性巨大結腸症的主因。

在神經母細胞移行的過程中，腸道神經前驅細胞 (enteric neural crest-derived cells, ENCCs) 會表現 *RET*, *SOX-10* 以及 *EDNRB*。神經母細胞的移動方向受到腸道細胞表現較高的 *GDNF* 及 *EDN3* 表現而由頭端往尾端移動。之後在第七周時，神經母細胞在腸道內受到腸道微環境的影響開始增殖及分化為腸道的神經細胞 (Heanue and Pachnis 2007)，一直到第 12 周時，腸道的神經發育完成(圖四)。

### 1-2-2 遺傳特色

在經由分離分析 (segregation analysis) 發現此疾病在遺傳學上有幾個特色：(i) 在家族中有 3~25% 的復發率，且遺傳形式不符合孟德爾定律；(ii) 其復發率跟初始患者 (proband) 的性別以及無神經節之腸道的長短有關 (表一)。而在眾多可能致病的基因中，*RET* 被認為最具相關性，同時其上許多不同的突變點都與此疾病相關，尤其是會導致受體酪氨酸激酶 (Receptor Tyrosine Kinase) 功能下降或甚至喪失的突變。在 50% 的家族性病例以及約 35% 的偶發性病患身上都可以看到 *RET* 的變異，其外顯率 (penetrance) 在女性約 50%，男性則高達 70% (Angrist et al. 1993; Gabriel et al. 2002; Romeo et al. 1994; Badner et al. 1990; Amiel et al. 2008) (表二)。由於胚胎發育時，牽涉之路徑複雜，此疾病被懷疑與許多基因的異常都有相關。以下簡述過去曾發表或懷疑與先天性巨大結腸症相關的基因。

### 1-2-3 *RET*

*RET* 是最早被發現和先天性巨大結腸症相關的基因。雖然有部分因 *RET* 功能增強而導致多發性內分泌腫瘤 (Multiple endocrine neoplasia) 患者也同時具有先天性巨大結腸症的表現 (Borrego et al. 2003; Takahashi et al. 1999)，但大部分的時候




先天性巨大結腸症與 *RET* 功能的缺失或低下相關。從 1993 年開始陸續有研究指出 *RET* 的突變隨著不同的突變位置與突變的方式可能導致臨床上長型或短型先天性巨大結腸症的不同表現。但同時也發現，即使是同樣的變異，也有可能造成臨床上不同的表現型甚至是完全正常的個體。這也間接證明了其他基因調控因子或環境因子在此疾病同樣扮演重要的腳色 (Edery et al. 1994)。

除了在外顯子 (exon) 的變異之外，其第一內含子 (intron 1) 中作為強化因子 (enhancer) 的部分若有特定的單一核苷酸多型性 (SNP) *RET*+3:T (rs2424357)，會改變 *SOX-10* 和 *RET* 在此強化區間 (enhancer) 的結合度，進而使 *RET* 的表現量降低，提高了先天性巨大結腸症的可能 (Emison, Garcia-Barcelo 2010)。在 rs2424357 表現為 TT allele 的人，患有先天性巨大結腸症的機率高出了一般不帶 T allele 的人 20 倍之多。除了和 *SOX-10* 的相互作用，*NRG1* 的兩個基因多型性：rs7835688 以及 rs16879552 的存在也被發現會分別提高 rs2435357 的風險至 2.3 倍以及 1.5 倍 (Garcia-Barcelo et al. 2009)。更有趣的是，此多型性在非洲人極少 (allele frequency < 0.01)，歐洲人次之 (allele frequency 0.25)，而在亞洲人最高 (allele frequency 0.45)。除了種族間的差異，趨向試驗 (trend test) 也顯示此多型性在男性子代的傳遞率 (transmission frequency) 約是女性的兩倍 (P=0.0007) (Emison et al. 2005)。或許這些發現可部分解釋此疾病在亞洲人以及男性比率較高的原因。近年來，越來越多的研究發現 *RET* 的多型性和先天性巨大結腸症有著密切的關係。除了 rs2435357 之外，rs1800858、rs1800860、rs1800861 以及 rs10900297 也和此疾病密不可分 (Liang et al. 2014)。

#### 1-2-4 *EDNRB*

在 *RET* 之後第二個被確定跟先天性巨大結腸症相關的基因是 *EDNRB*。約有 5~7% 的病人和此基因的變異相關 (Puffenberger et al. 1994)。該基因影響了大腸中黏膜層、黏膜下層、血管及神經節細胞上乙型內皮素受體 (Endothelin receptor type



B) 的表現。在先天性巨大結腸症的病患可發現這類型的受體減少或是全部都有問題 (Puffenberger, Hosoda 1994)。位於 *EDNRB* 上第四個外顯子的突變點 W276C，在同型接合子 (homozygotes) 的病患身上有 74% 的外顯率 (penetrance)，遠高於異型接合子 (heterozygotes) 的 21%。此變異點以一種劑量依存性 (dosage dependent) 的方式遺傳，而非全然的顯性或是隱性。同時男性比女性更易感 (susceptible) (Puffenberger et al. 1994)。除了 W276C 之外，A183G 以及 P383L 的突變都會導致 endothelin 和 *EDNRB* 蛋白質之間的 binding site 減少，也說明了 *EDNRB* 的突變是經由 loss of function 導致先天性巨大結腸症的發生率增加 (Abe et al. 2000)。

*EDNRB* 的突變也有可能導致第四型的瓦登伯格式 Waardenburg-Shah 症候群。患者除了先天性巨大結腸症之外，同時伴有不同程度的感覺神經性聽力障礙，虹膜異色症，以及膚色異常。當只有一個 allele 突變時，患者的症狀相對較輕微，也可能只出現先天性巨大結腸症，或部分瓦登伯格式症等的症狀 (Tüysüz et al. 2009)。

#### 1-2-5 *EDN3*

接下來被發現的 *EDN3* 基因，最初是在瓦登伯革氏症候群 (Waardenburg syndrome) 的病人身上看到，之後在偶發性的病患身上也發現其存在。在偶發性的中國病患身上，*RET*, *EDNRB* 和 *EDN3* 有高復發率 (Garcia-Barcelo et al. 2004)。而和 *EDN3* 蛋白製造路徑相關的 *ECE1*，也在一個跳躍式先天性巨大結腸症的病人身上發現 (Hofstra et al. 1999)。

#### 1-2-6 *SOX10*

*SOX10* 藉由和其他基因的強化因子 (enhancer) 或促進因子 (promoter) 結合來調控標的基因的表現，進而調控神經細胞從神經脊之移動與分化。一開始是在第四型瓦登伯革氏症候群的病人身上發現 (Pingault et al. 1998)。之後 *SOX10* 上

c.153-155del 的變異也被報告於一個偶發性不帶有症候群及其他基因變異點的病人(Sanchez-Mejias et al. 2010)。



#### 1-2-7 *GDNF*


以 *RET* 作為受體的 *GDNF* 也被猜測與先天性巨大結腸症有關，同時在老鼠身上得到了驗證。之後在三個不同的先天性巨大結腸症家族中發現此基因上分別有不同的變異點。然而這些變異點也可於健康的對照組中發現，因此推測更多的調控基因與此疾病相關(Salomon et al. 1996)。

#### 1-2-8 *NRTN*，*ARTN* 以及 *PSPN*

和 *GDNF* 一樣，*NRTN* 也因做為 *RET* 的受體而被懷疑可能與先天性巨大結腸症相關。之後在一個全大腸無神經節的先天性巨大結腸症的家族中被發現。此家族除了 *NRTN* 之外，在 *RET* 也有發現變異點。雖然沒有 *NRTN* 上的變異點單獨存在時可以致病的證據，但懷疑 *NRTN* 可能加重了疾病的表現，也符合此疾病多基因調控表現型的特性(Doray et al. 1998)。除了 *GDNF* 跟 *NRTN* 之外，*ARTN* 以及 *PSPN* 兩個基因也因為作為 *RET* 接受器而被懷疑與先天性巨大結腸症相關。雖然在一些病患的研究上沒有證明 *ARTN* 以及 *PSPN* 和先天性巨大結腸症的相關性(Fernandez et al. 2008)，但在體外的功能分析實驗中，*PSPN* 若產生 R91C 的變異，會影響到其形成的蛋白質功能。同樣在 *NRTN* 若產生了 F127L 的變異，也會導致其生成之蛋白質和 *RET* 結合發生異常，而影響的 *RET* 正常的表現(Ruiz-Ferrer, Torroglosa, Luzon-Toro, et al. 2011)。這兩個基因和先天性巨大結腸症之間的關係仍不能被完全排除。

#### 1-2-9 *BDNF*

腦衍生神經滋長因子 (Brain derived neurotrophic factor, *BDNF*) 被認為和神經



細胞的存活與分化息息相關。在先天性巨大結腸症患者的腸道檢體中，在免疫染色下發現沒有神經節的腸段中不表現，但在正常的腸段中則有表現(Hoehner et al. 1996)。此基因也被認為和先天中樞性換氣不足症候群 ( Congenital central hypoventilation syndrome ) 有關。而有先天中樞性換氣不足症候群的患者中，有 50% 會同時伴有先天性巨大結腸症。反之，在先天性巨大結腸症的患者中，有 1.5% 會有先天中樞性換氣不足症候群 (Croaker et al. 1998)，這一群患者又被稱為哈達德症候群 (Haddad syndrome)。在這群患者中，除了 *BDNF* 之外，有許多人被發現在 *PHOX2B* 的基因上有變異點(Sasaki et al. 2003)，之後 *PHOX2B* 也被懷疑和漢人的先天性巨大結腸症有關(Liu et al. 2009)。

#### 1-2-10 *ECE1*

內皮素轉化酶 (Endothelin - converting enzyme I, *ECE1*) 和內皮素 (endothelin) 的活化有關。而內皮素會影響到胚胎時期腸道神經細胞的發育。最早在一個伴隨有症候群的跳躍式巨大結腸症的病患身上被找到有變異，之後在 *ECE1* 被剔除 (knock out) 的小鼠模型表現出心臟、顱顏異常以及腸道無神經，進一步證明了此基因和先天性巨大結腸症之間的關聯(Hofstra et al. 1999)。

#### 3-2-9 *ZEB2* (*SIP1*; *SIP-1*; *ZFHX1B*)

鋅手指同源框蛋白是調控轉錄過程的重要蛋白質，其家族包括了 *ZEB1* (zinc finger E-box binding homeobox 1) 以及 *ZEB2* (zinc finger E-box binding homeobox 2)。其中，*ZEB2* 的異常會改變 TGF $\beta$ /BMP/Smad-mediated signaling cascade，進而影響到胚胎時期的神經發育。*ZEB2* 的基因異常在一些有症候群的先天性巨大結腸症病患身上可見。有時伴隨小頭、智力發展異常、以及顏面部的特殊表現 (Wakamatsu et al. 2001; Cacheux et al. 2001)。



### 1-2-12 *L1CAM*

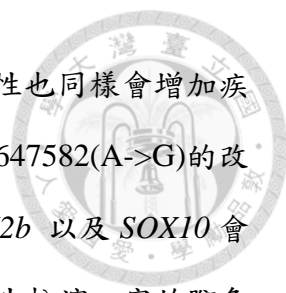
L1 細胞黏附分子 (*L1CAM*) 主要表現於中樞、周邊，以及腸道的神經細胞的表面，和神經細胞突觸的生長、移行、存活、分化，以及神經細胞和神經細胞之間，或是神經細胞和其他組織間的溝通有關(Kamiguchi, Hlavin, and Lemmon 1998; Wallace et al. 2010)。*L1CAM* 變異會導致多種跟神經異常相關的疾病，如瑪莎症候群 (MASA syndrome)，患者會有智力發展遲緩，語言發展遲緩，步伐異常 (shuffling gait)、以及拇指內縮 (adducted thumb) 的現象；或是家族性 X-linked 水腦 (X-linked hydrocephalus) 等(Gu et al. 1996)。

先天性巨大結腸症的男性傾向，使得 X 染色體上基因與此疾病的相關性被高度懷疑。*L1CAM* 對神經移行的影響以及它位於 X 染色體上，讓人開始懷疑 *L1CAM* 是否和先天性巨大結腸症相關而進行了相關的研究。經由免疫染色可以看到 L1 細胞黏附分子在腸道的表現量，而在先天性巨大結腸症的患者身上，*L1CAM* 只表現在有神經節的腸段。無神經節的腸段即使可以看到粗大的神經束 (hypertrophic nerve bundle)，在這些神經束或腸道組織也看不到 *L1CAM* 蛋白質表現(Hofstra et al. 2002; Ikawa et al. 1997)。

除了組織學上的證據，陸續也在一些 X-link hydrocephalus 伴隨先天性巨大結腸症的病人身上發現 *L1CAM* 基因有導致功能喪失的異常 (loss of function)。由於此基因位在 X 染色體上，被報導的病例幾乎都為男性患者，而基因變異來源常可追溯至其正常的母親(Jackson et al. 2009; Fernández et al. 2012)。

### 1-2-13 *PMX2B* (*PHOX2B*)

*PMX2B* (*PHOX2B*) 是一個表現於胚胎腸道組織的基因，其蛋白質是腸道神經細胞發育的必要物質。在一個有先天性巨大結腸症且伴隨有先天中樞性換氣不足症候群女孩被偵測到 t(4;8)(p13;p22) 轉位的異常，以及一段 *PMX2B* 5M 的缺損。進而使這個基因被懷疑和先天性巨大結腸症有關(Benailly et al. 2003)。除了轉



位的異常可能直接導致先天性巨大結腸症之外，此基因的多型性也同樣會增加疾病的可能(Garcia-Barceló et al. 2003)。此基因第二內含子中 rs28647582(A->G)的改變便是一例 (Liu et al. 2009)。之後的研究指出 *NKX2-1*、*PHOX2b* 以及 *SOX10* 會共同作用以調節 *RET* 的轉錄過程，而於先天性巨大結腸症的產生扮演一定的腳色 (Leon et al. 2009)。

#### 1-2-14 *CYP2B6*

*CYP2B6* 位於人體第 19 對染色體上，是肝臟代謝藥物，環境毒物以及致突變物質的重要基因。過去在老鼠的模型中發現維他命 A 的缺乏會使先天性巨大結腸症的外顯率以及嚴重度增加，是少數環境因子對此疾病發生率有影響的證明(Fu et al. 2010)。在此前提下，*CYP2B6* 被懷疑跟先天性巨大結腸症或許有關連而被加以分析。過去針對三個比較重要的多型性在亞洲的先天性巨大結腸症患者身上做比較，結果發現 rs707265 (G>A)的改變會導致得到先天性巨大結腸症的勝算比 (Odds Ration) 提高。在 AA 的同型合子較 GG 的同型合子得到先天性巨大結腸症的風險提高六倍之多(Xu et al. 2014)。

#### 1-2-15 *KIAA1279*

*KIAA1279* 位於第 10 號染色體上，過往對於此基因對先天性巨大結腸症的研究發現其表現屬於體染色體隱性遺傳。若在 p.Arg90X, p.Ser200X 或 p.Arg202IlefsX2 產生了同型合子的變異，病患會產生極為罕見的 Goldberg-Shprintzen megacolon syndrome(Brooks et al. 2005; Drevillon et al. 2013)。

#### 1-2-16 其他

上述所提之基因，在臨床上只能解釋 50%~60%的病患，且主要集中在兩個主要的 gene pathway 中，第一個為 *RET/GDNF/GFRA1* signaling pathway; 例如 *NTRK1*




(Alberti et al. 2003)、*PAX3* (Lang et al. 2000)、*TTF-1* (Garcia-Barcelo et al. 2005)、*NTF-3* (Ruiz-Ferrer et al. 2008)、*NTRK3* (Sanchez-Mejias et al. 2009)、*NRG1* (Garcia-Barcelo et al. 2009; Luzón-Toro et al. 2012)、*NRG3* (Tang et al. 2012; Yang et al. 2013)、*PROKR1*、*PROK1*、*PROKR2* (Ruiz-Ferrer, Torroglosa, Nunez-Torres, et al. 2011)、*SEMA 3A*、*SEMA 3C* 和 *SEMA 3D* (Jiang et al. 2012)等是和 *RET* 表現路徑相關的基因。第二個為 *EDN3 /EDNRB* signaling pathway，像是 *END3*，以及 *ECE1* 就歸屬此 pathway (Karim, Tang, and Tam 2021)。另外也存在一群和有症候群的先天性巨大結腸症相關的基因，例如 *TCF4*(Zweier et al. 2007)等。最近的研究更指出除了上述的途徑之外，*DNMT3B* 也透過調控 DNA 的甲基化而影響神經細胞的發育，進而影響先天性巨大結腸症的發生 (Torroglosa et al. 2014)。除了 DNA 本身，一些微 RNA(microRNA)的改變，如 miR-141 (Tang et al. 2013)和 miR-146a (Zhu et al. 2014)等，也可能因其影響腸道神經細胞的移動與分化而導致先天性巨大結腸症。

### 1-3 與先天性巨大結腸症相關的藥物及環境因子

先天性巨大結腸症在臨床上多樣的表現除了複雜的胚胎發育路徑以及多樣的相關基因之外，環境因子也一直被列在頭號嫌犯的位子，但始終沒有明確的藥物或環境因素被確定與此疾病相關。

第一個被發現的是維生素 A 酸。最早在 2001 年，Pitera 等人發現給予過量的 A 酸會導致小鼠的下肢及腸道發育異常(Pitera et al. 2001)。之後，Fu 等人發現維生素 A 的缺乏會導致磷酸酶基因蛋白 (phosphatase and tensin homolog) 在腸道神經的濃度上升，導致移行中的神經細胞不再受 GDNF 的驅動，影響神經的分布，進一步可能提高先天性巨大結腸症的表現率以及嚴重度(Fu et al. 2010)。

接著在 2013 年，Lake 等人在斑馬魚以及老鼠的研究證實 mycophenolic acid (MPA)，一種臨床上常用的免疫抑制劑會經由抑制肌苷單磷酸脫氫酶 (inosine



monophosphate dehydrogenase (IMPDH)) 而降低 GMP 的合成。GMP 是基因能夠複製以及表現的基本要素，而 GMP 的減少會使的神經脊來的神經元細胞減少，進而導致先天性巨大結腸症。隨著藥物濃度的改變，從藥物濃度低劑量時會增加先天性巨大結腸症的表現度 (penetrance) 以及嚴重度 (length of affected bowel)，到高劑量時直接抑制神經脊細胞的移動。這是第一個被證實跟巨大結腸症相關的藥物 (Lake et al. 2013)。最近的研究也發現廣效性抗生素的使用會改變腸道的微生物像，並導致有基因缺陷的小鼠腸道神經的數量更稀少，分布範圍也更少 (Toure et al. 2019)。

另外，也有研究發現懷孕婦女的尿液中二苯酮-3 (Benzophenone-3 (BP-3)) 偏高時，胎兒罹患先天性巨大結腸症的風險也會相對升高 (Huo et al. 2016)。BP-3 具有吸收紫外線的功效，是防曬乳及保養品中常見的成分。BP-3 能經由皮膚吸收並通過胎盤進而導致胎兒的血中濃度升高。在體外的細胞實驗發現 BP-3 會抑制 *RET* 的表現進而導致神經細胞的發育異常 (Huo et al. 2016; DiNardo and Downs 2019)。

藥物之外，腸道本身的環境也有可能影響神經的移行與發育。在唐氏症的患者中，有 1-2% 的患者會有先天性巨大結腸症，而先天性巨大結腸症的患者中有 10% 是唐氏症。在 21 號染色體上並未直接發現會導致神經發育缺失的基因，但有兩個和第六型膠原蛋白生成相關的基因：*COL6A1* 和 *COL6A2*。在唐氏症的胚胎的皮膚中可見第六型膠原蛋白被過度合成。在巨腸症患童的腸道檢體中可以發現其神經節周圍的第六型膠原蛋白表現量為正常人的兩倍，而同時伴隨唐氏症以及巨腸症的患童，其腸道神經節周圍的第六型膠原蛋白表現量則為正常人的三倍。同時第六型膠原蛋白的表現量和年紀沒有相關。而推測腸道中如果膠原蛋白過多，會讓腸道神經細胞的移行變慢，進而導致使先天性巨大結腸症發生的機會變大 (Heuckeroth 2015)。





## 1-4 先天性巨大結腸症的動物模型

動物模型能夠協助我們了解基因的功能，疾病相關的生理、病理機轉，以及可能的治療方式(Mukherjee et al. 2022)。常用於先天性巨大結腸症的動物模型主要有大小鼠以及斑馬魚。


### 1-4-1 小鼠

小鼠以及大鼠由於其解剖構造、生理機轉及基因跟人類相似，在許多的基因研究中扮演的重要的腳色。人類、小鼠及大鼠各約有三萬個基因，其中有 95% 的基因在三個物種間是相似的(Bryda 2013)。過去也有多個先天性巨大結腸症的小鼠模型被發現或製造(Bondurand and Southard-Smith 2016; Zimmer and Puri 2015)。

在 *RET* 以及 *EDNRB* 產生功能缺失的變異有極高的可能會導致先天性巨大結腸症已經是眾所周知的了。*RET* 的變異在小鼠以及斑馬魚的動物模型中也都有發現腸道的神經發育會被影響，而有類似巨腸症的表現(Bondurand and Southard-Smith 2016)。*EDNRB* 的突變同樣在大鼠以及小鼠都有對應巨腸症的動物模型(Bondurand and Southard-Smith 2016)。然而部分我們在病人身上找到的基因仍缺乏足夠的證據而需進一步證實。在 NGS 定序的結果中，如果發現 *RET* 和 *EDNRB* 之外的基因有明顯會產生基因功能缺失的變異，如 frameshift 或 stop codon；且為患者本身新產生的變異，而非遺傳自父母；同時該基因變異過去並未有動物的巨腸症模型。則該進一步視情況利用小鼠來模擬人體內發現的變異是否對腸道神經的發育有影響，甚至致病。

### 1-4-2 斑馬魚模型

斑馬魚有著受精卵大量且容易操作，發育快速，魚體初期透明可以直接進行活體觀察，容易飼養且較小鼠便宜，具有高度發展的基因編輯工具等優勢，是為基因及發育研究的良好模型。過去也經常被用於先天性巨大結腸症的研究。如



Heanue 等人利用 *ret* 功能缺失斑馬魚進一步發現了 *mapk10* 可能是影響臨床嚴重度的 modifier gene 之一。在過去的研究裡，也有詳細的描述了如何觀察，紀錄斑馬魚的腸道蠕動以及 WT 的正常表現(Heanue et al. 2016)。在適合的篩選基因變異之後，可用於進一步驗證該基因是否和腸道神經發育相關。

## 1-5 研究目標

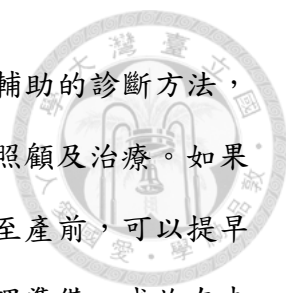
目標 1：比對台灣地區先天性巨大結腸症患者可能之基因致病變異和過往其他國家的研究結果是否一致

目標 2：找出新的可能之基因致病變異

目標 3：利用不同的動物模型進一步分析於病患身上找到的基因變異是否有致病性及其可能的致病機轉

## 1-6 研究之重要性及影響

先天性巨大結腸症在亞洲人種的發生比率是最高的，且有家族傾向。根據台灣健保資料庫的數據，在台灣每一萬個新生兒中有 2.2 人罹患先天性巨大結腸症 (Chia et al. 2016)。在手術以及營養照護不佳的年代，許多罹患此疾病的小孩會因腸阻塞無法進食以及腸炎等問題而死亡。但隨著醫學的進步，在現代的台灣，得到此疾病的患者要長大成人進而結婚生子已經是超過九成五的病患可以輕易達到的目標。也因此，與此疾病相關的基因會較以往更容易被保留下來，而可能在未來造成家族內的再現性比率更高。此外，目前臨床上診斷先天性巨大結腸症有一定的困難度，無論下消化道攝影以及直腸的抽吸切片均高度依賴放射科醫師以及病理科醫師的經驗及專業度。不可避免的會有一定比例的病患會經過多家醫院的轉診治療及一段不確定診斷及治療方向的時間，使得病患在未確診之前生長發育



變的延遲且對整個家庭造成極大的心理及經濟的負擔。若能有輔助的診斷方法，進而減少被誤診的比率及診斷所需的時間，就能給病患更好的照顧及治療。如果經由基因可以診斷此疾病，我們甚至可以將此疾病的診斷提早至產前，可以提早對病患出生後可能產生的症狀做出應變以及讓家屬有充分的心理準備。或許在未來，針對特定的家族可以使用人工受孕及胚胎選殖的方式生出健康的下一代。

## 第二章 研究方法



### 2-1 臨床個案基因體研究

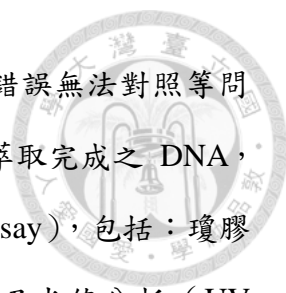
#### 2-1-1 研究對象

本計畫收案對象為在臺灣地區經過病理診斷確診為先天性巨大結腸症的患者本人及其父母、手足。如果不是在台大醫院或長庚醫院診斷的患者，為確認病理報告之正確性，需瀏覽其診斷醫院之影像及病理報告，以確認其分類型及診斷的正確性，如病理報告有疑問，必要時會請病患或其家屬調蠟塊切片再經過林口長庚的病理科做確認。

參與試驗的在經過詳細解釋試驗內容之後，同意參加試驗之病患及家屬需簽署林口長庚試驗倫理委員會審核通過之受試者同意書及剩餘檢體同意書。未成年之受試者則須取得其監護人之書面同意後收案。病患之父母親、兄弟姊妹，無論是否患病均納入試驗。若有其他旁系血親同樣患有先天性巨大結腸症者，在取得同意後亦可納入本試驗。每一年預計收納 20 個患者家庭，約 100 名受試者。收案人數的計算依據為台灣地區最近十年新生兒人數每年約 18 萬人次，以五千分之一的發生率來計算，每年約有 36 位新病患。長庚過去兩年定期舉辦先天性巨大結腸症的病友座談會，能夠聚集約一半左右的病友參加試驗，故每年希望能夠納入 20 位的新患者家庭，以每個家庭五位成員計算，共 100 名的受試者。

##### 2-1-1-1 DNA 採集及保存

針對 DNA 的部分，每位受試者抽取 20 毫升的周邊血液，分裝於兩管含肝素之試管，並於採血後五天內由不同人或於不同時間完成 DNA 的萃取。萃取 DNA 的試劑統一使用 QIAamp-Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany)。經過統一的試劑，不同的操作者是希望能確保抽取之 DNA 的品質，避免採血後 DNA 已經被分解



(degrade)，或實驗時發生步驟錯誤導致全部的檢體損失以及錯誤無法對照等問題。若受試者小於一歲，因採血不易，可將採血量降至 10 毫升。萃取完成之 DNA，需要進一步作品質上定性及定量的控制分析 (Quality Control Assay)，包括：瓊膠電泳分析 (Agarose Gel Electrophoresis Analysis)，與紫外光吸光值分析 (UV Absorption Analysis)。瓊膠電泳分析需看到 DNA 之大小約為 23Kb，且沒有明顯的被分解。而紫外光吸光值分析則利用 Nanodrop 2000 測定，看到的 OD ratio (A260/A280) 需大於 1.7，同時 DNA 的濃度高於 200ng/μl。之後 DNA 保存於零下八十度，直到收案數累積到 15 至 20 個病患時，便可以準備下一步的試驗。

#### 2-1-1-2 手術檢體之採集與保存

除了 DNA 的收集，在林口長庚手術的患者，我們同時有簽署剩餘檢體同意書。標準的手術治療，在術中我們會將病患的腸道檢體部分送到病理科，利用冷凍切片告訴手術醫師腸道沒神經節的區段，以及開始出現神經節的區段位置。在確認開始有神經節後，通常會在往腸道近口端有神經節的部分多切三到五公分，以確保接回肛門的腸道神經節的數量及功能都相對正常，而不是處在雖然有神經細胞，但或許數量不足或形態不佳等所謂的 transitional zone 上。所以手術檢體會包含部分有神經節及無神經節的腸道。

在林口長庚接受經肛門大腸牽出手術 (transanal pull through) 治療的患者，其切除之腸道檢體會從頭到尾取下一寬約 5mm 直條，以確保從無神經節到有神經節的腸段都有包含。切下之檢體依據術中的發現 (腸道由粗轉細的位置) 以及病理科冷凍切片的結果區分為有神經節、transitional zone 以及無神經節三區段。每一區段各取一公分的腸道組織保存於 RNA later 中，並冰存於-80，未來可用於相關 RNA 或蛋白質的分析。剩下的則用於神經細胞的培養試驗。有部分的研究發現在患者無神經節的腸道仍有少量的神經母細胞而能進一步培養出神經細胞，甚至能在無神經節的腸道移行生長。相關的神經培養及移植技術在未來或有希望能降低患者

需要手術的比例、次數或是減少術後的併發症(Metzger et al. 2009; Rollo et al. 2016; Wilkinson et al. 2015)。



### 2-1-1-3 其他檢體之採集與使用


除了固定會收集所有受試者的 DNA 以及在長庚手術患者的腸道組織外，針對特定有找到基因突變點的患者，視情況收集其口腔黏膜的細胞，以便進一步探討蛋白質表現的差異是否存在。

此外，針對已參與本試驗，而再度懷孕之家族，若其婦產科醫師有建議作進一步羊水檢查，如高齡孕婦，或唐氏症母血篩檢異常等狀況下，其剩餘之羊水檢體我們也將用於分析目前的胎兒是否帶有其家族之前所檢測到之異常基因。以期將診斷提升到產前的可能。

### 2-1-2 次世代基因定序

基因的定序在過去數十年一直是由自動化的 Sanger's 定序扮演重要腳色。第一次的人類全基因定序也是由其完成(Human Genome Sequencing 2004)。自動化的 Sanger's 定序被認為是初代的定序技術。進行 Sanger 定序時，必須要先將欲分析的目標基因，分區一段一段的放大出來，若目標區域較長或較多就必須進行多次的放大，定序完成後再進行比對或組裝，整個實驗步驟繁瑣、費時且昂貴。而次世代的基因定序，則是將核酸全面片段化後同時進行大規模的定序分析。由於不需額外先行放大目標，且同時將整個區域進行定序後再透過比對或組裝來找出研究者感興趣的區域或完整的序列資訊，也因此能夠更加快速。除了更快得到序列的訊息外，次世代定序也將單一核苷酸的定序成本大為降低 (Metzker 2009)。

次世代基因定序的主要實驗流程包含核酸片段化 (Fragmentation)、建庫 (Library Construction)、高通量定序 (High-throughput Sequencing)、分析 (Analysis)




共四個步驟。目前 NGS 定序儀速度可比傳統 Sanger 定序快 6 萬倍 (200 Gbp vs 3 Mbp)。對比第一次的人類全基因定序為例，整個定序由全世界超過 20 個機構，耗費超過十年 (1990 到 2003)，花費了約三十億的美元才完成(Petersen et al. 2017)。而 NGS 技術則只需要一千美元左右就可以在幾天內定出 10x coverage 的全基因體序列。也因此 NGS 能做到傳統 Sanger 定序儀無法提供的分析，像是全基因體定序 (Whole genome sequencing)、新基因定序 (De-Novo sequencing) 或是利用轉錄體定序 (Transcriptome sequencing) 進行 mRNA、miRNA 表現量分析或 RNA splicing 研究等。特別適合用於偵測多基因的疾病，針對單一基因做多個外顯子片段分析，探索疾病相關的未知基因等(Metzker 2009; Petersen et al. 2017)。

過去陸續有人將次世代基因定序應用在先天性巨大結腸症的研究上。首先利用 bench-top 454 GS Junior platform 針對 *SEMA3* 家族作分析。對於定序的準確度可以達到每一千個鹼基只有 0.26 的錯誤率。在分析了 47 個病人的檢體後發現了發現了五個突變點(Jiang et al. 2012)。另外 Gui 等人針對 20 個先天性巨大結腸症的患者設計了 62 個基因的 panel。利用 PCR-based RainDance technology (RDT) 進行定序，但最終對於罕見變異點 (rare variant) 的診斷敏感度及特異性各為 65.5% 及 61.3%(Gui et al. 2014)。之後的研究，則多使用 Illumina 系統，其穩定度及準確性均相當可靠。

### 2-1-2-1 Captured based NGS panel

針對研究目標 1：比對台灣地區先天性巨大結腸症患者可能之基因致病變異和過往的報導是否一致，我們使用 Captured based NGS panel。針對 MEDLINE, PubMed, and the Cochrane Library 等資料庫進行英文文獻及其參考資料的搜尋。我們選取了 31 個在過去的文獻中被提及懷疑與先天性巨大結腸症相關或是與腸道神經發育路徑相關的基因。其致病之可能路徑已於研究背景中詳述。根據這 31 個基因，我們進一步設計了次世代基因定序所需要的 panel。由於一些基因，如 *RET* 已



被發現可能之致病點位在內含子中，故我們設計之 panel 是做全基因的定序，也將基因涵蓋至上游 10M 以及下游的 5M。只有 NRG3 例外，因為其基因之大小過大，且目前所報導因其致病的案例極少，也沒有明確指出有內含子的變異有可能和先天性巨大結腸症相關，故我們針對 NRG3 的分析只在其外顯子的部分。除了 DNA 之外，我們也將微 RNA 以及粒線體的基因加入我們分析的 panel 之中，試著將研究的範圍拓展到未知的可能。(表三)

第一步，我們將之前由患者周邊血取得之 genomic DNA 用 Covaris M220 震碎 (fragmentation) 至 350bp 的片段大小。將震碎後之 DNA 做 library preparation (使用 Library preparation/barcoding kit, Illumina)。再以 MiSeq 桌上型定序機以及我們自行設計的 panel 針對目標基因進行 pair-end 的定序。定序後得到之原始資料 (raw sequence) 上傳至國家高速網路計算中心進行分析。藉由 BWA software (version 0.5.9)，我們將定序後基因的片段資料和參考資料庫 human genome (Feb. 2009, GRCh37/hg19) 比對進而拼出整段基因序列。再使用 SAMtools (version 0.1.18) 及 Picard (version 1.54) 進行資料類型的轉換及整理。轉換好的資料進一步利用 GATK software package (version 1.2-59-gd74367c1) 找出有 insertion 或 deletion 等的突變點。ANNOVAR (version 2012-03-08) 則被用來整理和變異基因相關的資料，如該變異是否有造成胺基酸的改變。若有胺基酸的改變，就進一步利用 SIFT scores 及 PolyPhen2 scores 來預測此改變是否會造成有害於人體的蛋白質改變。另外，此變異點若在 1000 Genomes Project allele frequencies 以及 NHLBI-ESP 5400 exome project 這兩個資料庫中任一個出現頻率大於 5% 時，此變異點就視為不會導致先天性巨大結腸症，因其出現在正常人中的頻率過高，如果該基因變異會直接致病，則先天性巨大結腸症之發生率應會高於 1/5000。最後，利用 IGV (version 2.1.16) 我們將基因的變異為同型合子 (homozygous) 或異型合子 (heterozygous) 甚至是嵌合子 (mosaicism) 均能以圖像化的方式表現。

除了外顯子的部分，我們針對此 31 個基因各個剪接位點 (splicing site) 前



後 20 個核苷酸有出現變異的，則利用 Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF3/HSF.html>) 進行分析，預估該變異點是否有可能造成剪接錯誤進而影響蛋白質的功能。

第二步，我們針對經由第一步找出之可能致病點設計適合的 primer，並利用病患的第二份 DNA 檢體，以及其家屬之檢體先進行聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 將突變之基因片段放大。放大後之基因片段同樣需經過瓊膠電泳分析，確認 PCR 所得到的基因片段長度和我們設計之片段長度一致，再進行 Sanger's sequencing。藉由定序病人的第二份檢體，我們可驗證經由次世代定序得到的突變點是否正確無誤。而在其家屬包含父母及其他兄弟姊妹間的定序則可以幫助我們得知此突變點的來源是遺傳自父母或是新產生的 (de novo mutation)，同時也有機會推測其遺傳及表現的機率 (penetrance rate)。如果經由 Sanger sequencing 無法在病患的父母身上看到的同樣的基因變異，則會利用 8 組的短串聯重複序列 (STR) 比對確認檢體間的親屬關係 (Sparkes et al. 1996)，以確保在病患身上看到的變異的確是新發生的突變，而不是誤植檢體的結果。

### 2-1-2-2 全外顯子定序

針對在 panel 中找不到基因變異的患者，其 DNA 會進一步進行全外顯子的定序 (whole exome sequencing, WES)。和全基因體相比，外顯子只佔了基因體不到 2% 的序列，但卻和 85% 的遺傳性疾病相關 (Rabbani, Tekin, and Mahdieh 2014)。全外顯子定序可以涵蓋約 95% 以上的外顯子以及影響外顯子識別的基因剪切位點 (Kong et al. 2018; Zhang et al. 2023)，同時相較於全基因體定序 (whole genomic sequencing) 使用 WES 可以降低研究經費的需求，同時簡化分析。WES 本身則是委託圖爾斯 ([https://www.toolsbiotech.com/product\\_service\\_detail.php?id=392&cateId=1461](https://www.toolsbiotech.com/product_service_detail.php?id=392&cateId=1461)) 或是長庚基因體中心進行定序。



### 2-1-2-3 患者檢體的 RNA 及蛋白質分析

若是在林口長庚醫院手術的患童，會在近端有神經節處以及遠端無神經節的腸段各保存部分切除的腸道剩餘檢體。利用 Qiagen AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit 從腸道組織中萃取 RNA 以及蛋白質，並保存在零下八十度的冰箱中。如此便可以在找到基因變異的位置之後，進一步在腸道組織中比較 mRNA 以及蛋白質的表現量變化。

## 2-2 小鼠模型

### 2-2-1 小鼠模型設計

根據第一步從臨床檢體上看到的病患基因變異，如果是患者本身新產生的基因功能缺失的突變，且和目前已知的巨腸症小鼠模型在不同的基因上，就會進一步比較該基因在人類和小鼠之間的相似度，以及委託台大 Transgenic Mouse Core Lab 評估在小鼠同樣的基因位點上利用 CRISPR，knock-in 同樣的突變的可能。設計突變位點附近先天或人工產生的限制酶切割區，讓後續的 genotyping 可以快速的進行，而不需每隻小鼠都經過 sanger 定序來確認是否有帶到我們需要的變異位點。

經由幾乎一樣的變異位點，我們希望了解該基因是否的確有影響腸道神經發育，甚至直接可以導致先天性巨大結腸症的可能。同時對於不同基因在腸道神經發育的腳色可以更加得清楚，對此疾病的病生理也會有更多的了解。

### 2-2-2 小鼠 Genotyping

實驗本身包含了胎鼠及仔鼠的分析。胎鼠是在配種 14 天後犧牲母鼠，取出個別的胎鼠(E14)，並使用 0.5cm<sup>3</sup> 的胎鼠組織做性別及基因分析。仔鼠則是在四周大時，剪取 0.5 公分的小鼠尾巴。DNA 的抽取是使用 200  $\mu$ l Lucigen QuickExtract™



DNA Extraction solution 混和小鼠組織後 vortex15 秒，之後加熱到 65°C，15 分鐘，再混合 vortex15 秒後加熱到 95°C 來萃取 DNA。胎鼠的性別則是利用 SRY PCR method 做鑑定(Wilhelm, Palmer, and Koopman 2007)。

在 F0 及 F1 的 genotyping，除了使用限制酶的方式快速找出實驗需要的小鼠外，也會再次以 Sanger 定序確認序列。

### 2-2-3 小鼠腸道組織神經節染色

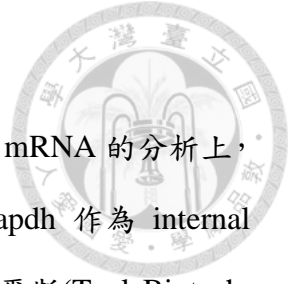
四周大的小鼠犧牲後，取下從盲腸一路到肛門的全部大腸後，用生理食鹽水將腸道內的糞便洗淨。將腸道從近端到遠端捲起形成類似”瑞士捲”的腸道組織(圖五)後以 4% 的多聚甲醛(paraformaldehyde)浸泡整晚以固定組織(Bialkowska et al. 2016; Yang et al. 2022)，之後再以石蠟包埋保存。

蠟塊切成 10  $\mu$ m 的厚度，固定在玻片上後以 pH6.0 citrate buffer 加熱至 95°C 一小時使抗原修復(antigen retrieval)。一抗的部分，使用了可以凸顯神經的 Human anti-Hu (Gift from Kryzer Thomas J, 1:2000) 以及 chicken anti-Tubb3 (Millipore, ab9354, 1:1000) antibodies 以利辨識神經元和神經突觸。同時根據突變的基因位點不同，使用特定的單株抗體確認我們在 knock-in 的小鼠身上是否還有該蛋白質的存在。

染色時，經過抗原修復的切片用一抗在 4°C 避光過夜染色，第二天以 PBS 洗去一抗後，加入二抗在室溫避光染色兩小時。之後利用 Zeiss LSM800 confocal microscope 分別用低倍以及 40X 油鏡來檢視神經節以及蛋白質的分布。

### 2-2-4 小鼠腦部及腸道組織的 mRNA 分析

取用 E14 的胎鼠以及四周大的小鼠的腦部及腸道組織，使用 AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen) 抽取 RNA，之後每個檢體用 0.5 to 1  $\mu$ g 的 RNA 檢體，以 1 First Strand D.N.A. Synthesis Kit (AM0675-0050, BIONOVAS)合成



cDNA。

根據不同的基因變異，確認小鼠該基因不同的 transcripts。在 mRNA 的分析上，我們針對不同的轉錄產物有其對應的專屬 primer，同時利用 Gapdh 作為 internal control，而胎鼠腦部則用於 inter-run 的校正。實驗本身委託由圖爾斯(ToolsBiotech, Taiwan, qPCR service)完成。

#### 2-2-5 小鼠其他表現的分析

根據產生的小鼠，除了腸道神經的分析之外，如果有其他除了巨腸症之外的表現型，也會一併紀錄並做初步可能的分析。

### 2-3 斑馬魚模型

#### 2-3-1 斑馬魚模型的建立

根據從臨床檢體上看到的病患基因變異，如果在患者身上看到點突變，但不確定該基因對腸道神經發育的影響，則會考慮使用斑馬魚針對該基因做功能缺失或是功能增加的實驗來確認該基因對腸道神經發育的影響。

功能缺失方面，斑馬魚有三種主要的方式可以達成。第一是利用過去 ENU 產生大量的突變魚種找尋是否已經有我們想要研究的基因的 knock-out 的 fish line 可以復育。第二種則是使用 CRISPR/Cas9 導致基因本身的斷裂重組，並從中尋找產生 gene loss of function 的突變斑馬魚。第三種則是以嗎啉基 (Morpholino) 直接阻斷蛋白質的行程。也要從 ZFIN 資料庫確認該基因是否有 paralog，以便挑選適合的方式。以上三種方法至少會以其中兩種來重複驗證不同方式產生的基因功能缺失對腸道神經發育的影響。

此外，為了方便觀察腸道神經，也會引進 Tg(*phox2b*:EGFP)<sub>w37</sub> 這種在神經細胞會產生 GFP 螢光的基因轉殖魚。經過和前一步驟產生的基因功能缺失的魚做配



種，可以得到腸道神經會發光的基因缺失子代，以利在活體觀察腸道神經的發育。

### 2-3-2 Tg(*phox2b*:EGFP)*w37* 斑馬魚腸道神經結數量分析

飼養時，在斑馬魚幼體的飼養液中添加 1-phenyl 2-thiourea (PTU)以減少魚體的黑色素生成，以利後續神經節的觀察(Chen et al. 2021)。

在斑馬魚幼體五天大時，將其放入麻醉劑中 (0.16mg / mL Tricaine) 麻醉後，以 low melting gel (包含 1% Tricaine)固定幼體確保其側身朝上。之後從其洩殖腔開口計算其上四個體節所有的神經數量。只取最後四個體節的原因是因為大部分的先天性巨大結腸症患者表現於大腸後段，少數延伸至整個大腸，而整個腸道沒有神經節的狀況目前只有案例報導。斑馬魚並無法明確區分大腸的位置，但最後四個體節包含了腸道的後半部分，僅計算這部分的神經節數量，較能反應先天性巨大結腸症的病理特徵(圖六)。

### 2-3-3 斑馬魚腸道蠕動分析

斑馬魚幼體飼養於未添加 PTU 的環境下，以避免腸道的蠕動受到影響。在第 5 天和第 6 天餵食草履蟲後，幼體在第 6 天晚上轉移到淨水中，以避免第 7 天觀察腸道蠕動時受到未排出的草履蟲的干擾。

七天大的斑馬魚幼體個別轉移到麻醉劑中 (0.16mg / mL Tricaine) 麻醉後，再以 low melting gel (with 1% Tricaine)固定幼體確保其側身朝上，並進行每秒 24 張，一共 5 分鐘的影片拍攝。影片使用 Image J 分析，生成腸壁收縮與時間的 Spatiotemporal maps，用於確定腸道收縮的存在和方向以及收縮頻率(Holmberg, Olsson, and Hennig 2007; Heanue et al. 2016)。可以確認除了神經節數量這種解剖構造的改變之外，腸道功能是否也有被影響。

## 第三章 研究成果



### 3-1 臨床個案基因體研究成果

林口長庚定期有舉辦先天性巨大結腸症病患的病友會，使我們有機會認識在不同醫院治療的患者，增加此研究計畫在患者間的知名度，也因此我們在研究開始的第一年就收到了 29 位病患。這些患者多為過去五年內的病患，或許因為較為嚴重的或是有併發症的患者家庭會更需要病友會間的彼此支持，故我們的收案初期以長型的先天性巨大結腸症患者居多。隨著新受試者的加入，短型的比例逐漸提高。截至目前為止，共有 87 個家庭，293 位受試者納入研究案。後續一個家庭因為 DNA 檢體的品質檢測(QC)未通過而被排除，一位家屬簽了同意書之後因害怕抽血而退出研究。最後進入分析的共 86 個家庭，289 位受試者，其中有 90 位患者。

短型巨腸症受試者有 49 人 (41 位男性，8 位女性病患，佔 54.44%)、長型受試者 16 位 (11 位男性，5 位女性，佔 17.78%)、全大腸型受試者 25 位 (17 位男性，8 位女性，佔 27.78%)。

在研究初期，針對 45 名患者完成了 panel 的 31 個基因分析。在完成 panel 分析的這些病患中，有 8 位家族性的病人 (17.78%) 分屬四個不同家族，其餘的 37 位 (82.22%) 則為偶發性的患者。男性病患有 34 人 (75.56%)，約為女性患者(11 人)的三倍之多。在表現型方面，長型和短型的患者分別為 22 人和 23 人，約各佔一半(圖七)。後期以 WES 分析了 39 位患者的 DNA 檢體，並比對其中是否有位在 panel 中 31 個基因上的罕見變異位點。目前仍有六位患者及其家屬尚未完成 NGS 的分析。

在定序結果方面，在 8 個家族性病患中，有 87.5% (7 人)在 panel 上的基因有找到變異點，在偶發性的 76 位病患中則有 67.11% (51 人) 在 panel 中的 31 個基因上有找到罕見變異點(rare variant)，高出過往所報導在家族中有 50%的發現率，以及偶發病患中有 10~20%的發現率。詳細的基因及變異位點以及出現頻率另列於



表四、表五及圖八中。

即使在 NGS 的協助下，利用目前 31 個基因的 panel，仍有 26 個患者找不到任何的罕見變異。出現頻率最高的仍和過往一樣是 *RET*，有 15 位，其次是有 11 人帶有的 *SEMA3C*。在長型中有 6 位可以找到致病位點，比率為 14.63%。短型的患者中同樣也有 6 位可以找到致病位點，比率為 12.24%。

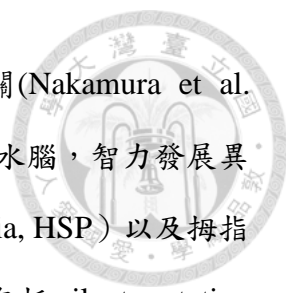
依據上述的基因檢測結果，我們選用了不同的動物模型做進一步的驗證。在明顯 loss of function，de novo mutation 的長型病患身上，我們試著用基因突變小鼠做進一步證實。由於 *RET* 突變的致病性已經有小鼠以及斑馬魚等等不同的動物模型及研究做過反覆的探討，故我們研究的方向主要針對 *RET* 之外的基因變異。根據表四，我們認為 *LICAM* 以及 *NRG1* 這兩個基因有必要釐清該變異是否會影響腸道神經的發育及導致先天性巨大結腸症。

### 3-2 *Llcam* knock in 小鼠模型研究成果

由臨床個案基因體試驗的結果，首先進行的是 *LICAM* 的小鼠模型。所有小鼠相關的動物實驗均由長庚實驗動物照護及使用委員會同意，同意案號為 IACUC No. 2019022202。

#### 3-2-1 *Llcam* 變異小鼠模型背景

*LICAM* 位在 X 染色體上，曾被懷疑或許和先天性巨大結腸症的病患以男性為主相關，不過從 27 個病人的分析上並未獲得證實(Hofstra et al. 2002)。由這個基因所產生的 *L1CAM* 蛋白質是一個在細胞膜上，包含了六個 immunoglobulin-like domain，五個 fibronectin type III repeats，鑲嵌在細胞膜上的 transmembrane domain 以及一個雖然短，但在不同哺乳類物種間序列有高度保留的 cytoplasmic domain(Moos et al. 1988; Hortsch 1996)。*L1CAM* 和神經細胞的移行，附著，神經



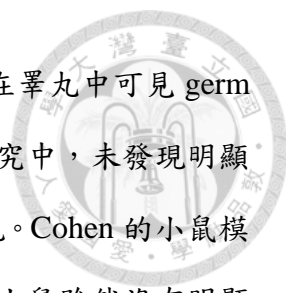
突觸的生長，神經髓鞘的形成，以及神經分化都有高度的相關(Nakamura et al. 2010)。*LICAM* 的變異在臨床上和 L1 症候群相關，患者常見有水腦，智力發展異常，失語，遺傳性痙攣性下身麻痺 (Hereditary Spastic Paraplegia, HSP) 以及拇指內收等症狀(Vits et al. 1994)。任何形式的 *LICAM* 的變異，甚至包括 silent mutation 都有可能導致 L1 症候群(Sun et al. 2019)，而且同樣的變異跟也有可能在臨床上導致 L1 症候群不同的嚴重度(De Angelis et al. 2002)。

過去，在少數 L1 症候群的患者身上發現同時有先天性巨大結腸症的狀況，被認為是 L1 症候群的嚴重表現(Takenouchi et al. 2012)。這些病例(Okamoto, Wada, and Goto 1997; Jackson et al. 2009; Fernández et al. 2012)，多由帶 heterozygous 基因變異的母親將有問題的 X 染色體傳給兒子。我們的病人和過往的病例報告有相似的臨床症狀，包含了水腦，些微的智力發展遲緩，以及先天性巨大結腸症。但不同的是我們的病患是女性，而且其 *LICAM* 的變異是 heterozygous，在 exon18 上第 2155 個核苷酸 deletion，導致 frameshift 的變化 (g.2155delG: p.V719fs)，同時她所罹患的巨大結腸症型別也是極為少見的跳躍式神經節。

最初 Dahme 等人利用置入 thymidine kinase 以及 neomycin-resistance gene 的方式將小鼠 *L1cam* 的第八個 exon 破壞。相對正常小鼠在西方點墨法上可以見到 200, 180, 140 以及 80KD 等 *L1cam* 蛋白異構體，突變的小鼠只會表現少量 190KB 的 *L1cam* 蛋白質。這些小鼠只有 23% 可以活過八天，一些會表現出後肢拖行，另一些則有觸覺及痛覺降低的現象。至於水腦的部分，在 B6 的小鼠可以發現嚴重的水腦，但在 129Sv 的小鼠則看不到明顯的水腦。他們進而假設 *L1cam* 的表現也可能深受多個 modifier 基因的影響(Dahme et al. 1997)。而在後來的研究中發現其中一個 modifier 位在第五號染色體上(Tapanes-Castillo et al. 2009)。

在 Dahme 之後，Cohen 等人將 *L1cam* 的第六個 Ig domain 以 selectable drug-resistance cassette 置換，進而產生 *L1cam* 功能缺失的 129Sv 或 129Sv X B6 的小鼠。這些小鼠體型較小，可以活到成年，在一歲後部分小鼠會有後肢拖行的現





象，在脊髓可以發現 axon 在 pyramidal decussation 異常。雖然在睪丸中可見 germ cell，但絕大多數的公鼠不孕(Cohen et al. 1998)。在 Cohen 的研究中，未發現明顯的水腦，也並未提及在小鼠身上發現有先天性巨大結腸症的表現。Cohen 的小鼠模型之後被 Fransen 等人做了進一步的行為模式的分析，發現這些小鼠雖然沒有明顯的水腦，但會有行為異常的表現，包含了在開放空間時會有固定的移動模式以及社會行為上不會探索異性等(Fransen et al. 1998)。

之後 Nakamura 等人則是針對 L1cam 蛋白質在細胞內的 domain 做了三個不同位點的突變（其中兩個為 loss of function 的變異，一個為 single nucleotide substitution），試圖找出不一樣長度的 truncate protein 會造成怎樣不同的影響。和之前的小鼠模型不一樣，在 cytoplasmic domain 發生功能缺失變異的小鼠並未產生水腦等的症狀，而是在成年後表現出 L1cam 蛋白質不足以及運動障礙的表現(Nakamura et al. 2010)。從過去的研究可知，*L1cam* 在不同位點上的變異可能產生極為不同的表現型，而變異位置在細胞膜外造成的嚴重度會超過在細胞膜內的功能區變異。此外，過去 *L1cam* knock out 或 knock down 的小鼠模型並非依照在患者身上所發現的變異來設計。我們希望藉由在小鼠身上模擬患者的變異位點，進一步找出在病人身上發現的 *LICAM* 變異和先天性巨大結腸症之間的關係以及可能的遺傳型式。

### 3-2-2 FVB/NJ-*L1cam*<sup>emfs1</sup> 小鼠模型設計

由於過往的研究發現同樣的變異在 B6 品系會有較為嚴重的水腦，同時存活率較低。而 129Sv 小鼠雖然可以存活，但公鼠明顯不孕，且目前已有的小鼠模型未提及有先天性巨大結腸症的表現，故我們選用過去未使用過 FVB 品系。且 FVB 母性相對較好，一胎仔鼠數量較多，希望在實驗上會有跟過去不一樣的發現。

我們使用 Sanger's 定序以及 8 組 STR 確認了受試者 9\_4 上的 *LICAM* exon 18, g.2155 delG 為 de novo 的突變(圖九)。接著，我們比較了 *LICAM* exon18 在人和 FVB

小鼠間的序列，除了發現在人與小鼠間有高度相似的基因以及胺基酸序列外，也找到在我們目標的突變位點前三個核苷酸的位置有一個和 Cas9 作用的 protospacer adjacent motif (PAM) 序列: NGG (圖十)。我們以 CRISPR endonuclease 的方式來製造 *Llcam* 單點的 deletion，進而形成和病患一樣的 frame-shift (圖十一)。

方法上，利用 microinjection 將 CRISPER/CAS9 蛋白，sgRNA，以及 ssODN 序列送進小鼠受精卵中以達到在小鼠序列上模擬病患基因變異的效果(Chen et al. 2016)。同時在突變點前產生一個 g.2151T>A 的 silent mutation 形成一個讓 NcoI 限制酶可以作用的序列。實驗中使用的 sgRNA 序列為 5'-CTTCCCCTCTCACATCCACA-3'，本身是利用 CRISPick 所設計的(Doench et al. 2016)。而 ssODN 的序列則為 5'-TTCAGGAGTCAGAATGGGCCATTTGTTTCCTTGTCCTTGCTACAGCACTGATAGGTTGACACATTACTTTCCAGCCCCAGAGAA GAACCCATGGATGTGAGAGGGGAAGGGAATGAGACCAACAATAT-3'。其中畫底線的 CCATGG 即為我們需要的突變，同時也是 NcoI 限制酶作用的序列。

### 3-2-3 FVB/NJ-*Llcam*<sup>emfs1</sup> 小鼠 Genotyping 及成果

在確認基因型時時，使用的 *Llcam* primers forward 及 reverse 分別為 5'-ATGTCCACTACACCTTTTCGG-3' 及 5'-CAGGCTCACTCCAATACTCA-3'。如果有成功攜帶變異點的小鼠，可以 PCR 到 829bp 的片段，此產物和 NcoI 在 37°C 下作用一小時後可以被切成 356 bp 和 473 bp 兩個長度的短片段。反之，如果小鼠不帶有我們想要的變異點，其 DNA 的 PCR 產物便會是不受 NcoI 限制酶影響，長 830bp 的產物。這樣的設計方便我們後續使用 PCR 及跑膠便能對後代的小鼠快速檢測是否帶有我們想觀察的變異。

在 F0 及 F1 的 genotyping，除了使用限制酶的方式快速找出實驗需要的小鼠外，也會再次以 Sanger 定序確認序列。

經由 CRISPR/Cas9 microinjection，一共產生了 20 隻小鼠。在定序後發現其中

六公一母的小鼠在 *L1CAM* 產生了完全的 frameshift，另外七母一公雖帶有我們想產生的 frameshift，但訊號是 mix signal (圖十二)。這樣的性別差異應該是因為此基因位在 X 染色體上，使得母鼠幾乎都是 mix-signal，而公鼠則有可能是少部分形成了嵌合子的效果 (mosaicism)。剩下的五隻則不帶有我們設計的基因變異，故未加以保留。

將 15 隻 FVB/NJ-*L1cam*<sup>emfs1</sup> 小鼠和 FVB 的 WT 配種以產生子代，然而在過程中發現 *L1cam*<sup>emfs1</sup> 公鼠有不孕的現象，故後續均以 *L1cam*<sup>emfs1</sup> heterozygous 的母鼠配 WT 的公鼠產生的子代做保種以及實驗。也因為公鼠不孕，我們並沒有 homozygous 的母鼠，故所有的實驗分析均以 hemizygous 的公鼠來對照 WT 的公鼠。其中 F0 的小鼠只有用於一開始的基因分析以及臨床表現型的觀察，其餘的腸道染色，mRNA 表現量，蛋白質表現，以及精子分析均使用 F1 或 F2 的小鼠以避免 F0 有可能有嵌合子的影響。

在表現型方面，我們觀察了三代，一共 62 隻 hemizygous 的公鼠，和 114 隻 heterozygous 的母鼠。除了其中一隻 F0 的公鼠有產生後肢拖行的症狀外，其餘的小鼠並未產生吃不下，發育不良，便秘腹脹或早夭等臨床上類似先天性巨大結腸症的表現。成鼠的腦部切片也並沒有明顯的水腦現象。在免疫染色下，不論 WT 或是 hemizygous 的 *L1cam*<sup>emfs1</sup> 公鼠，在低倍數顯微鏡下都可以看到 myenteric plexus 一路延伸到肛門，並沒有產生無神經節的病理診斷(圖十三)。

#### 3-2-4 *L1cam* mRNA 在小鼠腦部及腸道組織表現量

從小鼠的臨床表現以及免疫染色我們確認了腸道神經節仍有近乎正常的發育，且 *L1cam* 蛋白仍會表現在腸道的神經節中。小鼠的 *L1cam* 一共有六種不同的轉錄產物(transcripts)(Yates et al. 2019)。為了進一步了解這些蛋白質來自哪裡，以及在胚胎發育第 14 天以及出生四周時有沒有差異，我們針對了 *L1cam* 六種不同的 transcript 分別設計了其對應的專屬 primer，並做了腦部以及腸道的 mRNA 表現

量分析。利用 Gapdh 作為 internal control，而 *L1cam*<sup>emfs1</sup> 的胎鼠腦部則用於 inter-run 的校正(表六)。實驗本身委託由圖爾斯(ToolsBiotech, Taiwan, qPCR service)完成。

由表六可以發現有三個 transcripts，分別簡稱為 T49，T50，T51 會做出全長，也就是包含了完整細胞膜外 11 個 domain，transmembrane sequence 以及位在細胞膜外的 cytoplasmic domain。相對的，T53，T58 以及 T61 則會做出只有部分長度的較短蛋白。而 *L1cam*<sup>emfs1</sup> 小鼠所帶有的 frame shift 變異會讓其在 p.720 的位置形成終止碼(圖十四)，並進一步導致全長的 transcripts 包括 T49，T50，T51 的 mRNA 因為 non sense mediated decay 而被破壞，反之對 T53 以及 T61 沒有直接影響。分析了 *L1cam*<sup>emfs1</sup> 以及 WT 公胎鼠以及成鼠的腦部還有腸道組織的 mRNA 表現量後發現，在 *L1cam*<sup>emfs1</sup> 公鼠腦部，不分年紀，幾乎所有的 mRNA 存量都遠低於 WT，甚至完全不存在。反觀腸道組織，可以發現短片段的 T58 和 T61 在 *L1cam*<sup>emfs1</sup> 的表現量反而高於 WT 的小鼠(圖十五)。

### 3-2-5 FVB/NJ-*L1cam*<sup>emfs1</sup> 小鼠腸道組織神經節染色

為了瞭解 L1cam 蛋白質在 FVB/NJ-*L1cam*<sup>emfs1</sup> 小鼠腸道神經的表現，我們用了兩種不同的 L1cam 抗體，rabbit anti-L1cam polyclonal antibody 6096, a gift from John Hemperly (BD Technologies)(Thelen et al. 2002; Anderson et al. 2006)，以及針對之前設計的變異位點做結合的單株重組抗體 anti-L1cam monoclonal (Abcam, ab208155, 1:500)。在 FVB/NJ-*L1cam*<sup>emfs1</sup> 的假設是不會有完整的 L1cam 蛋白，故針對我們變異位點做結合的單株抗體應該會染不到 L1cam 蛋白，但多株抗體仍有機會發現其他長度的 L1cam 蛋白。二抗的部分使用的是 AF594-conjugated donkey anti-human (Molecular Probes, 1:500)，AF488-conjugated donkey anti-chicken (Jackson, 1:500)，and AF647-conjugated donkey anti-rabbit (ThermoFisher, 1:1000) antibodies。

染色時，經過抗原修復的切片用一抗在 4°C 避光過夜染色，第二天以 PBS 洗

去一抗後，加入二抗在室溫避光染色兩小時。之後利用 Zeiss LSM800 confocal microscope 分別用低倍以及 40X 油鏡來檢視神經節以及 L1cam 蛋白質的分布。

在高倍之下比較不同基因型的腸道神經是否能被不同的抗體染色(圖十六)。結果可以發現在 WT 的小鼠腸道，無論使用哪種抗體，都可以呈現出 L1cam 蛋白質。而在 *L1cam*<sup>emfs1</sup> 小鼠的腸道，只有 polyclonal 的抗體可以染到 L1cam 蛋白，而針對變異位點的單株抗體則無法染到 L1cam 的蛋白質。

### 3-2-6 *L1cam*<sup>emfs1</sup> 小鼠不孕分析

在犧牲成年小鼠後，取出副睪加入預先加熱的 Whitten's medium 中十分鐘讓精子游存於其中。之後稀釋十倍，再取 7.5  $\mu$ l 包含精子的 Whitten's medium，以 iSperm™ sperm analyzer (Aidmics Biotechnology Co., Ltd., Taipei, Taiwan)分析精子的數量，活動力等來尋找 *L1cam*<sup>emfs1</sup> 小鼠不孕的可能原因。實驗一共用了三隻 WT 小鼠，八隻 *L1cam*<sup>emfs1</sup> 小鼠，每個樣品進行了四重複。


實驗包含了 WT 以及 *L1cam*<sup>emfs1</sup> 小鼠副睪的精液分析。兩者在精子數量，活動力等方面均無統計上的差異(表七)。

## 3-3 *nrk1* knock out 斑馬魚模型研究成果

### 3-3-1 *nrk1* 功能缺失斑馬魚背景討論

從表四中我們可以發現臨床上有一個家族(7\_11', 8\_15')，父女均帶有 *NTRK1* exon7 的變異。其中女兒也自母親遺傳了 *SEMA3C* V337M 的變異，表現出較父親的長型巨大結腸症更為嚴重的全大腸無神經節。女兒的先天性巨大結腸症的更為嚴重是否與同時帶有 *NTRK1* 及 *SEMA3C* 的變異有關仍未有定論。

*NTRK1*(又被稱為 TrkA)和 RET 一樣是一個 tyrosine kinase (RTK) 接受蛋白。和神經生長因子(nerve growth factor)結合後會調控中樞和周邊神經的生長，分化，



及凋亡(Kaplan and Miller 2000)。由於 NTRK1 和 RET 的相似，我們假設了 NTRK1 在功能缺失時會對腸道神經的發育產生不良的影響。*NTRK1* 變異過去並未在巨腸症的患者身上發現，同時在我們的受試者身上看到的只是單一核苷酸的改變，而非一個明顯造成基因功能喪失的變化，因此我們選擇使用斑馬魚作為初步判定 *NTRK1* 基因的功能喪失是否有可能導致腸道神經發育異常的動物模型。

從 ZFIN 上可以看到斑馬魚的 *nrk1* 並沒有 paralog，同時魚的 *nrk1* 蛋白質氨基酸序列和人類有 53.7% 的一致性。在 ZFIN 中可以看到 sa14955 品系，是經過 ENU 處理的成年公魚，在 *nrk1* exon7 上形成了 heterozygous 的 G>T 的單點突變。這會造成原先轉錄出之 Serine 變為 Stop codon (Busch-Nentwich 2013)。正好符合了我們對於實驗的需要。

除了 sa14955 之外，我們還使用了 Tg(phox2b:EGFP)<sub>w37</sub> 的基因轉殖魚。這品系的魚會在其後腦以及神經節中表現出 GFP 的螢光(Roy-Carson et al. 2017)，有助於我們利用活體觀察神經節的發育及分布。

### 3-3-2 *nrk1* 功能缺失斑馬魚復育及基因定序成果

以冷凍的 *nrk1*\_sa14955 精子解凍後與 WT 的母魚卵子進行受精。在經過約三個月的飼養後待斑馬魚體型夠大時進行剪尾。之後將尾鰭置入 100  $\mu$ L 50 mM 之 NaOH 中，加熱至 95°C 30 分鐘後再加入 10  $\mu$ L 1M Tris-HCl 後 pipetting 確保尾鰭完全溶解並釋放出 gDNA。利用 PCR 將變異位點的前後序列作放大，使用的 primer 為 *nrk1\_ex7\_HRM2\_F*:TACTGTTCGTGAAAGCCGAATA)及 *nrk1\_ex7\_HRM2\_R* (CAGGTTGTCAGCAGAAGACACA)。放大的片段長度為 225 個鹼基。WT 的產物可以被限制酶 SAU3AI 或是 Mb01 作用，進而形成長度分別為 173 和 52 個鹼基的短片段。但若為 sa14955，因其變異位點會導致限制酶無法作用，故 PCR 產物經過限制酶作用後仍會保持為 225 鹼基。除了利用限制酶搭配毛細管電泳做快速的檢測外，也有利用 Sanger's 定序來確認序列(圖十七)。

利用冷凍的 *nrk1*\_sa14955 精子解凍後與 WT 的母魚卵子進行受精得到約 200 個受精卵。照標準程序進行飼養三個月後僅存活了 37 隻。進一步剪尾基因定序確認了只有四隻斑馬魚為 *nrk1*\_sa14955/+，heterozygous 之比例為 10.8%。

### 3-3-3 Tg(*phox2b*:EGFP)*w37* ; *nrk1*sa14955/+斑馬魚種建立

將上述步驟中得到的四隻 *nrk1*sa14955/+斑馬魚和 Tg(*phox2b*:EGFP)進行配種。同樣在子代三個月左右時進行尾鰭的 genotyping 以獲得神經節有螢光表現的 WT 以及 *nrk1*sa14955/+子代，並以此子代為實驗品系互配。

針對斑馬魚的幼體做基因定序則是在其四天大時移至包含 40  $\mu$ l DNA collect solution (DNA collect buffer, Proteinase K)的 96 孔盤中，確保一魚一室。再以 500 rpm 於 37°C 搖晃 60 分鐘，完成後 pipette 約 10 次以混合溶液，再取 30  $\mu$ L 溶液至 PCR tube 中並以 98°C 培養 5 分鐘使 proteinase K 失活同時讓細胞中的 DNA 被釋放。同時添加 100  $\mu$ l 的 recovery solution 於 96 孔盤中以確保斑馬魚幼體的存活及復原。取得的 DNA 則同樣以限制酶及毛細管電泳的方式快速找出帶有 sa14955 變異的斑馬魚幼體。

經過多次互配，初步得到了 27 隻 sa14955 homozygous，78 隻 sa14955 heterozygous，以及 40 隻 *nrk1* 無變異的 Tg(*phox2b*:EGFP)*w37* 螢光魚用於神經節的數量分析。

### 3-3-4 Tg(*phox2b*:EGFP)*w37* ; *nrk1*sa14955/+斑馬魚腸道神經結數量分析

如方法學中所述，我們計算了斑馬魚從肛門開始往上的四個體節內腸道的神經數量。利用 GFP 螢光可以看到神經所在的位置，同時可以發現不同的基因型在 27 隻 sa14955 homozygous 的斑馬魚平均有  $29.56 \pm 7.48$  個神經，78 隻 sa14955 heterozygous 的斑馬魚平均有  $39.56 \pm 8.26$  個神經節，而 40 隻 *nrk1* 無變異的斑馬魚則是平均有  $45.6 \pm 8.42$  個神經節。利用無母數分析，可以發現任兩組之間 P 值

都 $<0.001$ (圖十八)。



### 3-3-5 Tg(*phox2b*:EGFP)*w37*; *ntrk1**sa14955*/+斑馬魚腸道蠕動分析

斑馬魚幼體飼養於未添加 PTU 的環境下，以避免腸道的蠕動受到影響。在第 5 天和第 6 天餵食草履蟲後，幼體在第 6 天晚上轉移到淨水中，以避免第 7 天觀察腸道蠕動時受到未排出的草履蟲的干擾。

七天大的斑馬魚幼體個別轉移到麻醉劑中 (0.16mg / mL Tricaine) 麻醉後，再以 low melting gel (with 1% Tricaine) 固定幼體確保其側身朝上，並進行每秒 24 張，一共 5 分鐘的影片拍攝。影片使用 Image J 分析，生成腸壁收縮與時間的 Spatiotemporal maps，用於確定腸道收縮的存在和方向以及收縮頻率 (Holmberg, Olsson, and Hennig 2007; Heanue et al. 2016)。

斑馬魚的腸道在近端會有 retrograde 的蠕動，而遠端則為 anterograde 的蠕動。經過影像軟體 Image J 的 Spatiotemporal maps，可以生成如圖十九的結果。至於在不同基因型間的蠕動表現則發現除了 wave interval 之外，其餘不論蠕動的速度，蠕動的頻率等，在不同的基因型之間都沒有統計差(圖二十)。



## 第四章 討論




### 4-1 臨床個案基因體研究成果討論

一如過往的研究，*RET* 佔了最重要的地位。我們在 *RET* 上看到有變異的患者有 15 人。超過 1/4 有找到變異的患者都帶有 *RET* 的變異 ( $15/58 = 25.86\%$ )。在 *RET* 有變異的病患身上，有四人發生了 frame shift 的變異，分別位於 exon7, exon10 及 exon11，且此四人均為長型甚至是全大腸型的先天性巨大結腸症。其中最特別的莫過於一對父女同樣為 *RET* 的 frame shift 的長型病患，而媽媽再度懷孕時，因為是高齡孕婦所以婦產科醫師進行了羊水染色體檢查。我們利用剩餘的羊水檢體進行胎兒的基因檢測，發現即將出生的胎兒也同樣帶有此變異（圖二十一），但目前為止，第二胎已經五歲，並未發生任何巨腸症相關的症狀。過去也有文獻提及，*RET* 的變異在女性，其外顯率僅有 50% (Gabriel et al. 2002)，或許可解釋在這家族看到的情形。

除了 frame shift 以及 Stop codon 這兩種明確會造成 loss of function 的變異之外。我們也在病人中發現了 *RET* 有兩個重複出現的變異點：*RET*:NM\_066124.1:exon3: g.G341A:p.R114H 以及 *RET* NM\_020975:exon10: p.C620R 或 S。根據香港在 2010 年發表的研究發現(Cornes et al. 2010)，*RET*:NM\_066124.1:exon3: g.G341A:p.R114H 是一個亞洲患者常見的變異點。此變異點在正常的亞洲對照組身上或是患有先天性巨大結腸症的歐洲病患均未發現，但在亞洲患者約占了 6~7%，被懷疑是 founder mutation。在我們的病患身上，一共有 4 人同樣有此變異，佔所有病患的 4.7%。其中兩人為短型的患者，一位是長型的先天性巨大結腸症患者，一位全大腸無神經節的患者。其中三人的變異點均遺傳自表現型正常的父親或母親，還有一人仍待 Sanger 確認基因變異的來源（表八）。

在我們的受試者中，有兩個人有位於 *RET* 上 p.C620 的變異。這個位點位於 *RET* 細胞膜外的功能區，此變異位點過去在一些同時患有第二型多發性內分泌腺



瘤病以及先天性巨大結腸症的患者或家族中有見到(Moore and Zaahl 2010)。多為 p.C620R, 部分為 p.C620S, 極少數為 p.C620W。這是一個很特別的現象, 因為第二型多發性內分泌腺瘤病是由於 *RET* 的功能增加 (Gain of function), 而先天性巨大結腸症則是由於 *RET* 的功能缺失 (Loss of function)。但在同一個病患或是家族中可以看到這兩個疾病同時存在, 也讓這個位點被認為如同是 "Janus gene" mutation, 可以開啟雙向 (增強或缺失) 的變化。也因為這個變異點的存在, 或許可以提醒臨床醫師在追蹤先天性巨大結腸症的同時, 也需要增加對於患者甲狀腺方面的檢查與追蹤, 因為這個變異點屬於多發性內分泌腺瘤病的高風險變異位點, 最小在六歲就有可能產生甲狀腺的病變(Machens et al. 2005)。

除了 *RET* 之外, 我們的結果發現最多病患共同的突變點位是 *SEMA3C*: NM\_006379: exon11: g.G1009A: p.V337M。一共有 11 個病人, 9 男 2 女帶有此變異點, 占了 13.10%。其中 5 個人為長型或全大腸無神經結型, 6 人為短型的先天性巨大結腸症患者。根據過往的研究, 此變異的 minor allele frequency 在 1000 genomes 的數據為 0.0399, 且在中國南方的人種出現頻率可高達 0.0952。在我們的 11 個病人中, 有五位病人的基因來源是無患病的父親, 五位是來自無患病的母親。最後一位患者雖然父母都未參與試驗, 但在其無患病的妹妹身上也有看到此變異點, 故推測此基因極有可能來自雙親的遺傳 (表九)。

除了台灣地區, *SEMA3C*: NM\_006379: exon11: g.G1009A: p.V337M 也在 9.1% 的印尼巨腸症患者身上發現(Gunadi et al. 2021)。而在 Jiang 等人的研究中發現, *SEMA3C*: NM\_006379: exon11: g.G1009A: p.V337M 的改變會導致其蛋白質的穩定性降低, 進而使的蛋白質的產量降低 40%~80%, 同時也會影響到 *SEMA3C* 蛋白質的結構, 使其和 *Nrp1* 的親和度 (binding affinity) 降低, 進而影響神經的發育。同時, 此基因和 *RET* 之間會相互作用進一步增加罹患先天性巨大結腸症的風險。在分析了兩百多位歐美的巨腸症患者 (其中短型 95 人, 長型包含全大腸型有 156 人) 以及四千三百位的對照組後發現此變異在短型的病患 allele frequency 是 2.1%, 長

型的病患是 1.4%，而在對照組中則為 0.49%。在短型的先天性巨大結腸症患者中，此突變遺傳自父親或母親的比率接近，但在長型的患者則發現自母親的比率較高 (Jiang et al. 2015)。


這和我們得到的數據正好相反。在我們的病人中，短型的病患中，*SEMA3C* 的變異較多遺傳自母親，而長型的病患都較多源於父親。此外 allele frequency 也有 10~20 倍的差距。有可能的原因包含了我們的病患全都是台灣地區的病人，其基因和歐美的患者本身就有着極大的差異；同時我們能夠得到的病患數量相對極少，也因此存在著統計上的缺陷。但可以確定的是，此變異點在台灣先天性巨大結腸症患者中占有重要甚至是不輸給 *RET* 的位置，同時增加更多的受試者是必要的研究方向。

除了第一例利用羊水分析先天性巨大結腸症的基因，以及找到台灣地區的患者有更高比率之 *SEMA3C* 之變異外；經由這次的研究還有發現如果患者產生的是 frameshift 或是 stop codon 這兩種明顯導致蛋白質功能異常的突變時，患者有較高機率表現出長型的先天性巨大結腸症。從表四及表五可以看出我們的病患中，一共有九個人發現了 frameshift 或是 stop codon 的變異。除了兩個 *EDNRB* 上的 stop codon(分別為 Exon3 和 Exon7)，以及一個 *ZEB2* 的 frameshift 是短型的先天性巨大結腸症，剩下的六個人均為長型的巨大結腸症患者。

相較於過去一個病患一次只能做少數基因分析的時代，使用次世代基因定序針對多個可能相關的基因作分析明顯提高了基因變異的偵測率，也和我們原始的假設相符合。部分早期經由 capture based 的 NGS 之相關結果也於 2019 年發表於 *Neurogastroenterology and Motility* 的期刊中，全文詳附件一 (Yang et al. 2019)。

## 4-2 *L1cam* 小鼠模型研究討論

### 4-2-1 *L1cam* 缺失小鼠的腸道神經



過去雖然有不同的 *L1cam* 功能缺失的小鼠模型，但如同前面的討論所提，過去的小鼠模型分別針對了 exon8，IG6 domain 以及 cytoplasmic domain 做功能缺失的突變，而我們的患者所帶有的變異則是造成 Fn-3 domain 開始形成 stop codon；而在 Fn domain 開始功能缺失會導致什麼樣的變化並不明確，過去也沒有小鼠模型。同時，從過去的小鼠研究中可以發現，小鼠極有可能表現出水腦以及行為模式的異常，但鮮少有研究針對小鼠腸道的神經作分析。

Anderson 等人首先利用 *L1cam* polyclonal 的抗體加在細胞培養液中，可以發現腸道神經細胞移行的速度變慢。而在 Cohen 的小鼠模型中則是發現在 E11.5 的時候，*L1cam* 功能缺失的小鼠腸道神經移行明顯較 WT 慢，但在 E15 之後，這樣 *L1cam* 功能缺失的小鼠仍能完成全部腸道的神經分布，而在出生後並未表現腸道蠕動的異常(Anderson et al. 2006)。可以發現 *L1cam* 的缺失的確會對腸道神經的發育過程有一定的影響，但最後的結果或許差別不大。反觀 *L1cam* 缺失對腦部的影響，則是無論水腦是否明顯，對小鼠的行為表現都會有一定程度的損害。

過去對於 *L1cam* 缺失小鼠的蛋白質及 mRNA 分析目的僅為確認的確有造成表現量降低或是根本偵測不到，來確認 knock down 或是 knock out 有成功。也因此使用的 primer 或是抗體均為針對全長的 *L1cam* 蛋白質，對於不同 transcript 並沒有列入考慮。

我們的實驗和過往不同的地方在於我們針對不同的組織，年齡，以及 transcripts 做分析。試圖了解小鼠沒有發病的原因是由於 truncate protein 的存在仍保留的部分的 *L1cam* 蛋白質功能，或是有不同的 transcript 存在彌補了 *L1cam* 全長蛋白質不足的問題。而在結果的部分，可以發現無論哪種 transcript，也不分胎數或成鼠，在 *FVB/NJ-L1cam<sup>emfs1</sup>* 腦部表現量都遠較 WT 低。但腸道則相反，全長的 mRNA 在 *FVB/NJ-L1cam<sup>emfs1</sup>* 胎鼠腸道幾乎沒有表現，但在成鼠的腸道則有少量的表現；短片段的 transcript 則在胎鼠有接近 WT 的表現量，到成鼠之後，T58 以及 T61 更遠高於 WT 的表現量。這個現象的成因不明，但或許和 alternative splicing 的調控，



以及 non-sense mediated decay 有關。


Alternative splicing 大量增加了真核細胞中單一基因能夠表現蛋白質的複雜度及功能性(Baralle and Giudice 2017)。這樣的調控深受多種因素，包含了不同的組織，不同的年齡，不同的環境壓力等均會影響 RNA-binding proteins (RBPs)和 mRNA 之間的結合以及後續不同 transcript 的表現(Baralle and Giudice 2017; Zhu and Li 2022)。

當 mRNA 帶有過早出現的終止碼 (premature termination codons)時，non-sense mediated decay (NMD)會被啟動，分解錯誤 mRNA，避免體內產生錯誤蛋白質的一種保護機制。然而 NMD 的效率會依據終止碼出現的位置以及組織而有不同的結果。位置部分，若終止碼出現的位置在最後一個 exon-exon junction 上游 50-55 鹼基之上時，NMD 就會被啟動，反之，則錯誤的 mRNA 就容易逃脫 NMD 而被保留 (Maquat 2004)。而組織部分，NMD 在中樞神經以及生殖系統中效率最高，反之在身體其他的組織，則有較高容忍錯誤 mRNA 存在的可能(Zetoune et al. 2008)。

在小鼠六個不同的 transcript 中，T53 以及 T61 不帶有會造成 premature termination codon 的變異，而 T58 所形成的終止碼則未在最後一個 exon-exon junction 上游 44 個鹼基的位置，因此 NMD 對錯誤的 T58 有多少的作用難以預估。同時也可以看到全長的 mRNA 在 *FVB/NJ-L1cam<sup>emfs1</sup>* 成鼠腸道的表現量遠高於腦部的表現量，則應是跟組織的特性相關。

在 *FVB/NJ-L1cam<sup>emfs1</sup>* 腸道的 mRNA 表現量可能也呼應了 Anderson 等人的研究：在 E11.5 天時腸道神經移行雖然慢，但在出生後都能完成腸道的神經發育。這樣的現象和 *L1cam* mRNA 的表現量升高是否有關值得進一步釐清。實驗進一步想要了解這些 mRNA 是否有被轉譯成 *L1cam* 的蛋白質。可以看到腸道的免疫染色，polyclonal 抗體所呈現的有可能是這些短片段或是 truncate 的 *L1cam* 蛋白質，而完整全長的蛋白質則只在 WT 中可見(圖十四)。

小鼠的三個短 transcripts 各自對應了不同的 domain。T61 包含了最前方的 N

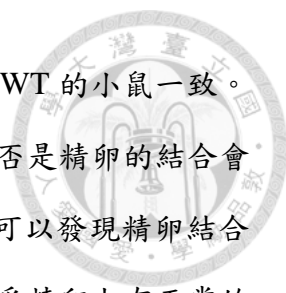


端以及 Ig-1 domain，T58 主要為 Fn-III domain，而 T53 則從最後一個 Fn domain 到 cytoplasmic domain 但不包含 transmembrane 序列(圖十三)。雖然不確定每個 Transcript 各自的功能為何，但 T58 包含了兩個 RGD sequence，是 L1cam 蛋白和其他 integrin 之間重要的 binding site，和促進神經細胞移行(Thelen et al. 2002)，neurite outgrowth(Romano, Madl, and Heilshorn 2015)，以及 nuclear signaling(Gast et al. 2008)有舉足輕重的影響。

在人的 *LICAM* 基因一共有 12 個不同的 transcripts，其中包含了六個全長的 transcripts，四個類似 T61，一個接近 T58，一個等同 T53 的短 transcripts。在假設這些短片段的 L1cam 蛋白質或許有保護腸道神經發育的假設前提下，我們重新審視了過去的小鼠模型，並發現這些小鼠模型中，*L1cam* 被影響的位置均未影響到這些短片段的 transcripts。我們也統計了過去有報導 L1 症候群伴隨先天性巨大結腸症患者的變異位點(表十)。目前為止，文獻中提及的患者共有 16 人 (15 個不同位點)，其中 11 位患者(68.7%)其變異也位於可能影響這些短 Transcripts 的位點上。有一位患者雖然 *LICAM* 的變異位點不會影響這些短片段，但他的 *LICAM* 變異是來自未罹病的母親以及外祖母，同時，患者的外祖父具有先天性巨大結腸症，但不帶有 *LICAM* 的變異。這些短片段的 transcripts 對於腸道神經發育的影響值得進一步探討。

#### 4-2-2 *L1cam* 缺失小鼠的不孕討論

*L1cam* 功能缺失的公鼠有著生殖力顯著低下甚至不孕的狀況。在過去的小鼠模型中多有描述。Dahme 等人未對他們的小鼠模型做生殖力的描述，但有提到使用 heterozygous 的母鼠和 WT 的公鼠進行保種方式一致，且未提到 homozygous 母鼠的表現，有可能 hemizygous 公鼠的生殖力也低於正常小鼠。Cohen 等人同樣有提到 hemizygous 的公鼠有著不孕的現象，同時睪丸的切片顯示有正常的 germ cell，但未進一步討論。在我們的小鼠身上，同樣有著公鼠不孕的現象。經經由精



液分析，可以了解 hemizygous 公鼠精子的數量以及活動力均和 WT 的小鼠一致。由於 L1cam 蛋白和細胞間 adhesion 有關，讓我們一開始懷疑是否是精卵的結合會被影響而導致不孕的現象。然而我們利用傳統體外受精的方式可以發現精卵結合並沒有問題，並不需要單一精蟲顯微注射術(ICSI)。體外受精的受精卵也有正常的分裂，經過凍胚之後也能成功的復育出小鼠。我們分別利用了 hemizygous 公鼠精子搭配 WT 母鼠的卵子以及 hemizygous 公鼠精子搭配 heterozygous 母鼠卵子均有同樣成功的結果。可惜在我們復育出來的小鼠中並沒有得到 *FVB/NJ-L1cam<sup>emfs1</sup>* homozygous 的母鼠。

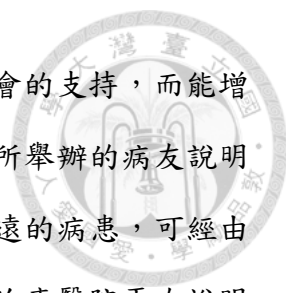
由於精子分析正常，同時利用體外受精也能成功，這樣我們不禁懷疑公鼠不孕的原因是否和之前 Fransen 所提及的異常行為模式相關。Fransen 等人發現將母鼠放在中間的籠子，公鼠在外圍時，WT 的公鼠會繞著有母鼠的中央籠子探索。然而 *L1cam* 功能缺失的公鼠則會有固定的繞著最外圍的行走模式，對有母鼠存在的籠子並沒有反應。我們的實驗由於針對的是腸道的神經表現，並沒有針對行為模式做紀錄分析，故並沒有這部分的資料，或許要進一步探討 *L1cam* 功能缺失的公鼠不孕的問題時可以考慮進一步對其行為模式做探討。

這是第一次完全仿照患者的變異做的 *L1cam* 功能缺失的小鼠模型，也是第一個針對不同 transcripts 可能產生的影響作的實驗。初步的結果也於 2023 年發表於 *Gene* 的期刊中，全文詳附件二(Yang et al. 2023)。

## 4-3 研究過程中遭遇之困難及解決途徑

### 4-3-1 收案不易。

說明：先天性巨大結腸症本身發生率較低，加上近年出生率下降，患者的數量並不多。加上患者多為嬰幼兒，家長多不願小朋友多抽血，因而參與研究的意願相對低。



解決方案：在學會的研討年會中發表初步的成果並尋求學會的支持，而能增加在其他醫院診斷治療之病患參加此試驗的可能。持續前兩年所舉辦的病友說明會，招募全台有意願的受試家庭。此外，有意願參加但住的較遠的病患，可經由電聯說明並確認其參與試驗之意願後，由研究助理前往其追蹤治療醫院再次說明並取得同意書後收集檢體。

除了讓研究本身能夠讓更多患者及家屬了解之外，針對在長庚開刀的患童，我們利用開刀前後本來就需要打針抽血的時機同時採血，避免患童需要因為參加試驗而需要多扎一針，也增加了家屬願意參加的可能。

#### 4-3-2 有一定比例的病人找不到變異點

說明：利用 31 個基因 panel 本身就有其侷限。過去未被討論或懷疑的基因並不在此次的試驗中，然而過去已知的基因只能解釋臨床上不到一半的患者，可以預期必然有些基因不在目前的已知範圍，也會導致我們的患者並沒有辦法全部都能找到可以解釋的變異位點。

解決方案：在經費許可之下，後續進行父母以及病患間三人的全外顯子定序(Trios)分析甚至是全基因組定序(WGS)，以期能找到可能致病的新基因。



## 第五章 未來展望



### 5-1 本論文在該領域之貢獻


#### 5-1-1 臨床方面

先天性巨大結腸症一直是兒童外科重要的指標性疾病之一。雖然隨著手術技術以及靜脈營養的進步，大部分的患童可以和正常人有著一樣的平均壽命，卻沒有一樣的生活品質。本論文是目前台灣針對先天性巨大結腸症基因研究收案最多也最完整的研究，也發現了台灣地區的患者和國外所報導的基因變異有些微差異。而隨著對基因的進一步了解，或許有機會在預防，診斷及治療等不同的方向上努力改善目前的困境。

1. 預防方面，我們有約 15% 的患者可以找到明確 loss of function 的致病變異。這些患者在未來做生育規劃時，或許可以考慮利用人工授孕的方式做胚胎的檢測來確保該致病基因不會繼續在家族中出現，進而降低下一代罹病的機率。
2. 診斷方面，雖然同樣的基因變異可能存在不同的表現型，部分長型甚至全大腸無神經節的患者，其臨床表現反而沒有短型的患者來的明顯，如果有家族中的基因檢測確認帶有致病的變異基因，或許可以增加臨床醫師的警覺性，例如提早做腸道神經切片，縮短診斷所需的時間，讓患童能及時接受適當的治療，減少長期對生長發育的影響。
3. 治療方面，目前多個團隊希望藉由神經細胞培養，移植，再生等方式來改善這些患者的生活品質，減少手術的需要，降低相關的併發症。隨著對基因變異的了解，神經細胞的再生或許更能做到針對每個患者規畫專屬的精準醫療，而有更好的結果。

#### 5-1-2 疾病機轉方面

目前針對各基因先天性巨大結腸症之間的關係，研究多停留在該基因形成的



主要蛋白質對疾病的影響，但少有針對各 transcripts 對於不同組織的影響。也或許使因為這樣，許多時候產生的變異並沒有適度的反應臨床上看到的變化。經過 *Llcam* 功能缺失的小鼠研究發現了不同的 transcripts 對於疾病的表現可能有著決定性的影響。未來在設計其他的基因功能研究時，或許將所有不同的 Transcript 列入考慮會得到更精確的結果。


### 5-1-3 找出之變異點無法確認為致病變異

從臨床基因體研究可以發現絕大多數的罕見變異位點只能歸類為”不確定意義”的變異。要進一步確認變異位點是否會改變蛋白質的表現，可以考慮使用神經母細胞瘤的細胞株，將臨床檢體上看到的變異位點代入細胞株並比較蛋白質的表現。相較動物模型，雖然這種方法並不能直接看到致病與否，但可以較快的得到一個變異位點是否會實質的影響到神經細胞中蛋白質的表現。

除了細胞株之外，利用不同的動物模型，尋找更明確的證據。有時礙於外顯率不高，在病患及其家人可能看到同樣的變異但有不同的表現型，動物模型可以較大規模的產生子代，也對了解外顯率的表現模式有一定的幫助。即便在動物身上的表現型不一定以先天性巨大結腸症的方式出現，仍能知道一個基因位點的變異是否會影響該基因的表現。

## 5-2 未來的研究:全基因組定序和全外顯子定序分析

在目前的收案中，有一對同卵雙胞胎，但只有其中一人(受試者 11\_16)為全大腸無神經節的患者，而其雙胞胎哥哥則是完全正常。懷疑在胚胎發育的早期，患病的弟弟可能有基因的變異發生，而導致了先天性巨大結腸症的發生。同時在目前的 panel 上並沒有找到弟弟帶有的變異點。希望藉由比較這對雙胞胎的全基因組定序(Whole Genome Sequencing)，找出可能存在的新的致病基因。



除了這對雙胞胎之外，受試者 1\_40 以及 2\_43 為一對姊妹且同為長型的患者。且在 Panel 分析時，只在姊姊身上找到一個遺傳自未罹病父親的 *CYP2B6* 的 single nucleotide variant，而妹妹則未找到任何可能的變異位點。同樣希望藉由比較這對姊妹的全基因組定序(Whole Genome Sequencing)，找出其他可能的致病基因。

其他長型但未能找到任何變異位點的受試者，則會利用父母以及患者一起進行全外顯子定序，希望能增加我們對先天性巨大結腸症的了解。

### 5-3 未來的研究: *Nrg1* Conditional knock out 小鼠模型

從表四可以看到受試者 13\_32 帶有 *NRG1* exon2 的 de novo stop codon variation。*NRG1* 最早是藉由 GWAS 發現和先天性巨大結腸症相關(Garcia-Barcelo et al. 2009)。陸續有論文指出 *NRG1* 上的 SNP 有可能增加先天性巨大結腸症的可能性，但明確的基因與疾病相關性並沒有完全建立。過去在班馬魚身上發現如果把 *NRG1* knock out 或是 knock down 都有可能導致斑馬魚產生類似先天性巨大結腸症的症狀，包括腸胃道的蠕動次數降低，或是神經節發育不完全(Pu et al. 2017)。在過去小鼠的動物模型中發現，若 *NRG1* 在被 knock out 會導致心臟發育異常而無法出生(Odiete, Hill, and Sawyer 2012)，也因此不會觀察到出生後是否有先天性巨大結腸症的表現。隨著 conditional knock out 的技術逐漸成熟，現在我們有機會能發展出只在小鼠腸道或是只在神經系統表現出和病人一樣有 *NRG1* 變異的小鼠，讓我們能夠進一步了解這個基因對疾病的影響。

目前委託台大基因轉殖鼠核心實驗室協助 *NRG1* 在腸道 conditional knock out 的小鼠，但受限於人力及經費，故目前先進行了 *Llcam* 小鼠的相關實驗，而 *Nrg1* conditional knock out 小鼠目前以凍胚的形式保存，預計未來在人力及經費允許時復育，並進行類似 *Llcam*<sup>emfs1</sup> 小鼠的研究，從臨床症狀，腸道神經節的分布，到 mRNA 以及蛋白質的等方面作完整的分析，應可進一步了解 *NRG1* 和先天性巨大結腸症之間的關係。



## 5-4 未來的研究:斑馬魚模型

### 5-4-1 *ntnk1* 功能缺失斑馬魚後續實驗

在 *ntnk1* 功能缺失斑馬魚初步可以看到神經節的數量減少。至於這樣的數量減少但初步並沒有反應在蠕動的功能變差。但目前的實驗是以不同的魚在計數神經的數量以及蠕動的功能。未來會在進行同一隻魚在第五天時觀察神經的數量，第七天時紀錄蠕動，之後才做 genotyping。這樣一方面可以了解神經的數量是否反應在蠕動的功能上，另一方面最後才做 genotyping 可以避免因為心理預期神經數量應該減少而有觀察上的誤差。

除了腸道神經的數量變少，homozygous 的 *ntnk1* 缺失也會導致斑馬魚早期的死亡，以及游動方面的異常。*Ntnk1* 對斑馬魚其他的神經系統所造成的影響也會是接下來觀察的方向之一。

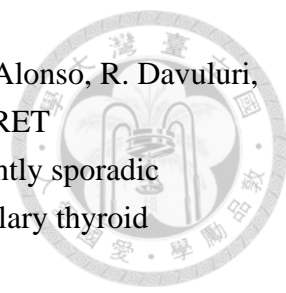
除了在 sa14955 這隻經由 ENU 產生變異的品系外，接下來會進一步使用嗎啉基 (Morpholino) 在 *Tg(phox2b:EGFP)w37* 的斑馬魚上做實驗，確認是否由不同方式造成的 *ntnk1* 功能缺失均會導致腸道神經發育的異常。


蠕動方面，如果重複觀察後，在不同基因型間仍然沒有蠕動功能上的差異，則會進一步考慮增加環境壓力，例如在水中添加增加腸道蠕動的 metoclopramide，或是降低腸道蠕動的 atropine 來區分不同的 *ntnk1* 基因型是否有腸道功能上不一樣的表現(Zhou et al. 2014)。

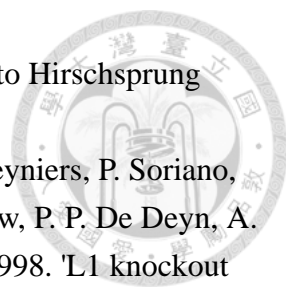
## 第六章 參考文獻



- Abe, Y., T. Sakurai, T. Yamada, T. Nakamura, M. Yanagisawa, and K. Goto. 2000. 'Functional analysis of five endothelin-B receptor mutations found in human Hirschsprung disease patients', *Biochem Biophys Res Commun*, 275: 524-31.
- Alberti, L., C. Carniti, C. Miranda, E. Roccato, and M. A. Pierotti. 2003. 'RET and NTRK1 proto-oncogenes in human diseases', *J Cell Physiol*, 195: 168-86.
- Amiel, J., E. Sproat-Emison, M. Garcia-Barcelo, F. Lantieri, G. Burzynski, S. Borrego, A. Pelet, S. Arnold, X. Miao, P. Griseri, A. S. Brooks, G. Antinolo, L. de Pontual, M. Clement-Ziza, A. Munnich, C. Kashuk, K. West, K. K. Wong, S. Lyonnet, A. Chakravarti, P. K. Tam, I. Ceccherini, R. M. Hofstra, R. Fernandez, and Consortium Hirschsprung Disease. 2008. 'Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review', *J Med Genet*, 45: 1-14.
- Anderson, R. B., K. N. Turner, A. G. Nikonenko, J. Hemperly, M. Schachner, and H. M. Young. 2006. 'The cell adhesion molecule 11 is required for chain migration of neural crest cells in the developing mouse gut', *Gastroenterology*, 130: 1221-32.
- Angrist, M., E. Kauffman, S. A. Slaugenhaupt, T. C. Matise, E. G. Puffenberger, S. S. Washington, A. Lipson, D. T. Cass, T. Reyna, D. E. Weeks, and et al. 1993. 'A gene for Hirschsprung disease (megacolon) in the pericentromeric region of human chromosome 10', *Nat Genet*, 4: 351-6.
- Badner, J. A., W. K. Sieber, K. L. Garver, and A. Chakravarti. 1990. 'A genetic study of Hirschsprung disease', *Am J Hum Genet*, 46: 568-80.
- Baralle, F. E., and J. Giudice. 2017. 'Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18: 437-51.
- Basel-Vanagaite, L., R. Straussberg, M. J. Friez, D. Inbar, L. Korenreich, M. Shohat, and C. E. Schwartz. 2006. 'Expanding the phenotypic spectrum of L1CAM-associated disease', *Clin Genet*, 69: 414-9.
- Benailly, H. K., J. M. Lapierre, B. Laudier, J. Amiel, T. Attie, M. C. De Blois, M. Vekemans, and S. P. Romana. 2003. 'PMX2B, a new candidate gene for Hirschsprung's disease', *Clin Genet*, 64: 204-9.
- Bialkowska, A. B., A. M. Ghaleb, M. O. Nandan, and V. W. Yang. 2016. 'Improved Swiss-rolling Technique for Intestinal Tissue Preparation for Immunohistochemical and Immunofluorescent Analyses', *J Vis Exp*.
- Bondurand, Nadege, and E. Michelle Southard-Smith. 2016. 'Mouse models of Hirschsprung disease and other developmental disorders of the enteric nervous system: Old and new players', *Developmental Biology*, 417: 139-57.

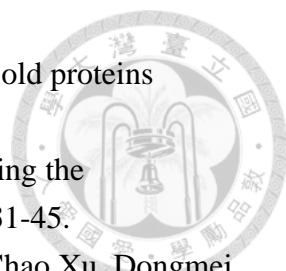
- 
- Borrego, S., F. A. Wright, R. M. Fernandez, N. Williams, M. Lopez-Alonso, R. Davuluri, G. Antinolo, and C. Eng. 2003. 'A founding locus within the RET proto-oncogene may account for a large proportion of apparently sporadic Hirschsprung disease and a subset of cases of sporadic medullary thyroid carcinoma', *Am J Hum Genet*, 72: 88-100.
- Brooks, A. S., A. M. Bertoli-Avella, G. M. Burzynski, G. J. Breedveld, J. Osinga, L. G. Boven, J. A. Hurst, G. M. Mancini, M. H. Lequin, R. F. de Coo, I. Matera, E. de Graaff, C. Meijers, P. J. Willems, D. Tibboel, B. A. Oostra, and R. M. Hofstra. 2005. 'Homozygous nonsense mutations in KIAA1279 are associated with malformations of the central and enteric nervous systems', *Am J Hum Genet*, 77: 120-6.
- Bryda, E. C. 2013. 'The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research', *Mo Med*, 110: 207-11.
- Busch-Nentwich, E., Kettleborough, R., Dooley, C. M., Scahill, C., Sealy, I., White, R., Herd, C., Mehroke, S., Wali, N., Carruthers, S., Hall, A., Collins, J., Gibbons, R., Puzstai, Z., Clark, R., and Stemple, D.L. 2013. "Sanger Institute Zebrafish Mutation Project mutant data submission. ZFIN Direct Data Submission. . (<http://zfin.org>)." In.
- Cacheux, Valère, Florence Dastot-Le Moal, Helena Kääriäinen, Nadège Bondurand, Risto Rintala, Brigitte Boissier, Meredith Wilson, David Mowat, and Michel Goossens. 2001. 'Loss-of-function mutations in SIP1 Smad interacting protein 1 result in a syndromic Hirschsprung disease', *Hum Mol Genet*, 10: 1503-10.
- Chen, S., B. Lee, A. Y. Lee, A. J. Modzelewski, and L. He. 2016. 'Highly Efficient Mouse Genome Editing by CRISPR Ribonucleoprotein Electroporation of Zygotes', *J Biol Chem*, 291: 14457-67.
- Chen, X. K., J. S. Kwan, R. C. Chang, and A. C. Ma. 2021. '1-phenyl 2-thiourea (PTU) activates autophagy in zebrafish embryos', *Autophagy*, 17: 1222-31.
- Chia, S. T., S. C. Chen, C. L. Lu, S. M. Sheu, and H. C. Kuo. 2016. 'Epidemiology of Hirschsprung's Disease in Taiwanese Children: A 13-year Nationwide Population-based Study', *Pediatr Neonatol*, 57: 201-6.
- Cohen, N. R., J. S. Taylor, L. B. Scott, R. W. Guillery, P. Soriano, and A. J. Furley. 1998. 'Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1', *Curr Biol*, 8: 26-33.
- Cornes, B. K., C. S. Tang, T. Y. Leon, K. J. Hui, M. T. So, X. Miao, S. S. Cherny, P. C. Sham, P. K. Tam, and M. M. Garcia-Barcelo. 2010. 'Haplotype analysis reveals a possible founder effect of RET mutation R114H for Hirschsprung's disease in the Chinese population', *PLoS One*, 5: e10918.
- Croaker, G. D., E. Shi, E. Simpson, T. Cartmill, and D. T. Cass. 1998. 'Congenital

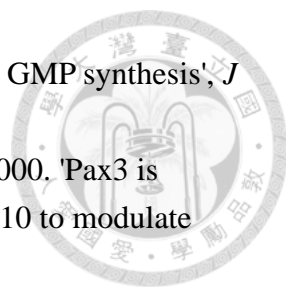
- 
- central hypoventilation syndrome and Hirschsprung's disease', *Arch Dis Child*, 78: 316-22.
- Dahme, Miriam, Udo Bartsch, Rudolf Martini, Brigitte Anliker, Melitta Schachner, and Ned Mantei. 1997. 'Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system', *Nat Genet*, 17: 346-49.
- De Angelis, E., A. Watkins, M. Schäfer, T. Brümmendorf, and S. Kenwrick. 2002. 'Disease-associated mutations in L1 CAM interfere with ligand interactions and cell-surface expression', *Hum Mol Genet*, 11: 1-12.
- DiNardo, J. C., and C. A. Downs. 2019. 'Can oxybenzone cause Hirschsprung's disease?', *Reprod Toxicol*, 86: 98-100.
- Doench, John G., Nicolo Fusi, Meagan Sullender, Mudra Hegde, Emma W. Vaimberg, Katherine F. Donovan, Ian Smith, Zuzana Tothova, Craig Wilen, Robert Orchard, Herbert W. Virgin, Jennifer Listgarten, and David E. Root. 2016. 'Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9', *Nature Biotechnology*, 34: 184-91.
- Doray, B., R. Salomon, J. Amiel, A. Pelet, R. Touraine, M. Billaud, T. Attié, B. Bachy, A. Munnich, and S. Lyonnet. 1998. 'Mutation of the RET ligand, neurturin, supports multigenic inheritance in Hirschsprung disease', *Hum Mol Genet*, 7: 1449-52.
- Drevillon, L., A. Megarbane, B. Demeer, C. Matar, P. Benit, A. Briand-Suleau, V. Bodereau, J. Ghoumid, M. Nasser, X. Decrouy, M. Doco-Fenzy, P. Rustin, D. Gaillard, M. Goossens, and I. Giurgea. 2013. 'KBP-cytoskeleton interactions underlie developmental anomalies in Goldberg-Shprintzen syndrome', *Hum Mol Genet*, 22: 2387-99.
- Edery, P., A. Pelet, L. M. Mulligan, L. Abel, T. Attié, E. Dow, D. Bonneau, A. David, W. Flintoff, and D. Jan. 1994. 'Long segment and short segment familial Hirschsprung's disease: variable clinical expression at the RET locus', *J Med Genet*, 31: 602-06.
- Emison, Eileen Sproat, Andrew S. McCallion, Carl S. Kashuk, Richard T. Bush, Elizabeth Grice, Shin Lin, Matthew E. Portnoy, David J. Cutler, Eric D. Green, and Aravinda Chakravarti. 2005. 'A common sex-dependent mutation in a RET enhancer underlies Hirschsprung disease risk', *Nature*, 434: 857-63.
- Fernández, R. M., R. Núñez-Torres, L. García-Díaz, J. C. de Agustín, G. Antiñolo, and S. Borrego. 2012. 'Association of X-linked hydrocephalus and Hirschsprung disease: report of a new patient with a mutation in the L1CAM gene', *Am J Med Genet A*, 158a: 816-20.
- Fernandez, Raquel M., Macarena Ruiz-Ferrer, Manuel Lopez-Alonso, Guillermo Antiñolo, and Salud Borrego. 2008. 'Polymorphisms in the genes encoding the 4

- 
- RET ligands, GDNF, NTN, ARTN, PSPN, and susceptibility to Hirschsprung disease', *Journal of Pediatric Surgery*, 43: 2042-47.
- Fransen, E., R. D'Hooge, G. Van Camp, M. Verhoye, J. Sijbers, E. Reyniers, P. Soriano, H. Kamiguchi, R. Willemsen, S. K. Koekkoek, C. I. De Zeeuw, P. P. De Deyn, A. Van der Linden, V. Lemmon, R. F. Kooy, and P. J. Willems. 1998. 'L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns', *Hum Mol Genet*, 7: 999-1009.
- Fu, M., Y. Sato, A. Lyons-Warren, B. Zhang, M. A. Kane, J. L. Napoli, and R. O. Heuckeroth. 2010. 'Vitamin A facilitates enteric nervous system precursor migration by reducing Pten accumulation', *Development*, 137: 631-40.
- Fu, M., P. K. Tam, M. H. Sham, and V. C. Lui. 2004. 'Embryonic development of the ganglion plexuses and the concentric layer structure of human gut: a topographical study', *Anat Embryol (Berl)*, 208: 33-41.
- Gabriel, S. B., R. Salomon, A. Pelet, M. Angrist, J. Amiel, M. Fornage, T. Attie-Bitach, J. M. Olson, R. Hofstra, C. Buys, J. Steffann, A. Munnich, S. Lyonnet, and A. Chakravarti. 2002. 'Segregation at three loci explains familial and population risk in Hirschsprung disease', *Nat Genet*, 31: 89-93.
- Garcia-Barcelo, M., R. W. Ganster, V. C. Lui, T. Y. Leon, M. T. So, A. M. Lau, M. Fu, M. H. Sham, J. Knight, M. S. Zannini, P. C. Sham, and P. K. Tam. 2005. 'TTF-1 and RET promoter SNPs: regulation of RET transcription in Hirschsprung's disease', *Hum Mol Genet*, 14: 191-204.
- Garcia-Barcelo, M. M., C. S. Tang, E. S. Ngan, V. C. Lui, Y. Chen, M. T. So, T. Y. Leon, X. P. Miao, C. K. Shum, F. Q. Liu, M. Y. Yeung, Z. W. Yuan, W. H. Guo, L. Liu, X. B. Sun, L. M. Huang, J. F. Tou, Y. Q. Song, D. Chan, K. M. Cheung, K. K. Wong, S. S. Cherny, P. C. Sham, and P. K. Tam. 2009. 'Genome-wide association study identifies NRG1 as a susceptibility locus for Hirschsprung's disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 2694-9.
- Garcia-Barcelo, M., M. H. Sham, W. S. Lee, V. C. Lui, B. L. Chen, K. K. Wong, J. S. Wong, and P. K. Tam. 2004. 'Highly recurrent RET mutations and novel mutations in genes of the receptor tyrosine kinase and endothelin receptor B pathways in Chinese patients with sporadic Hirschsprung disease', *Clin Chem*, 50: 93-100.
- Garcia-Barceló, M., M. H. Sham, V. C. Lui, B. L. Chen, J. Ott, and P. K. Tam. 2003. 'Association study of PHOX2B as a candidate gene for Hirschsprung's disease', *Gut*, 52: 563-7.
- Gast, Daniela, Svenja Riedle, Helena Kiefel, Susanne Sebens Mürköster, Heiner Schäfer, Michael K. E. Schäfer, and Peter Altevogt. 2008. 'The RGD integrin binding site in human L1-CAM is important for nuclear signaling', *Experimental*




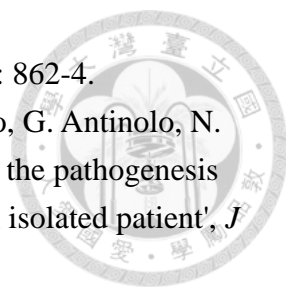
- Cell Research*, 314: 2411-18.
- Gu, S. M., U. Orth, A. Veske, H. Enders, K. Klunder, M. Schlosser, W. Engel, E. Schwinger, and A. Gal. 1996. 'Five novel mutations in the L1CAM gene in families with X linked hydrocephalus', *J Med Genet*, 33: 103-6.
- Gui, H., J. Y. Bao, C. S. Tang, M. T. So, D. N. Ngo, A. Q. Tran, D. H. Bui, D. H. Pham, T. L. Nguyen, A. Tong, S. Lok, P. C. Sham, P. K. Tam, S. S. Cherny, and M. M. Garcia-Barcelo. 2014. 'Targeted next-generation sequencing on Hirschsprung disease: a pilot study exploits DNA pooling', *Ann Hum Genet*, 78: 381-7.
- Gunadi, F. Ryantono, R. Sethi, Marcellus, A. S. Kalim, P. Imelda, D. Melati, S. Simanjaya, W. Widadjarso, R. T. Pitaka, N. Arfian, K. Iskandar, A. Makhmudi, and P. S. Lai. 2021. 'Effect of semaphorin 3C gene variants in multifactorial Hirschsprung disease', *J Int Med Res*, 49: 300060520987789.
- Heanue, T. A., W. Boesmans, D. M. Bell, K. Kawakami, P. Vanden Bergh, and V. Pachnis. 2016. 'A Novel Zebrafish ret Heterozygous Model of Hirschsprung Disease Identifies a Functional Role for mapk10 as a Modifier of Enteric Nervous System Phenotype Severity', *PLoS Genet*, 12: e1006439.
- Heanue, Tiffany A., and Vassilis Pachnis. 2007. 'Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies', *Nature Reviews Neuroscience*, 8: 466-79.
- Heuckeroth, R. O. 2015. 'Hirschsprung's disease, Down syndrome, and missing heritability: too much collagen slows migration', *J Clin Invest*, 125: 4323-6.
- Hirsh, E. H., K. S. Hodges, T. Hersh, and W. C. McGarity. 1980. 'Anorectal manometry in the diagnosis of Hirschsprung's disease in adults', *Am J Gastroenterol*, 74: 258-60.
- Hoehner, Jeff C., Tomas Wester, Sven Pählman, and Leif Olsen. 1996. 'Alterations in neurotrophin and neurotrophin-receptor localization in Hirschsprung's disease', *Journal of Pediatric Surgery*, 31: 1524-29.
- Hofstra, R. M., P. Elfferich, J. Osinga, E. Verlind, E. Fransen, J. Lopez Pison, C. E. de Die-Smulders, I. Stolte-Dijkstra, and C. H. Buys. 2002. 'Hirschsprung disease and L1CAM: is the disturbed sex ratio caused by L1CAM mutations?', *J Med Genet*, 39: E11.
- Hofstra, R. M., O. Valdenaire, E. Arch, J. Osinga, H. Kroes, B. M. Loffler, A. Hamosh, C. Meijers, and C. H. Buys. 1999. 'A loss-of-function mutation in the endothelin-converting enzyme 1 (ECE-1) associated with Hirschsprung disease, cardiac defects, and autonomic dysfunction', *Am J Hum Genet*, 64: 304-8.
- Holmberg, A., C. Olsson, and G. W. Hennig. 2007. 'TTX-sensitive and TTX-insensitive control of spontaneous gut motility in the developing zebrafish (*Danio rerio*) larvae', *J Exp Biol*, 210: 1084-91.

- 
- Hortsch, M. 1996. 'The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks', *Neuron*, 17: 587-93.
- Human Genome Sequencing, ConsortiumInternational. 2004. 'Finishing the euchromatic sequence of the human genome', *Nature*, 431: 931-45.
- Huo, Weiwei, Peng Cai, Minjian Chen, Hongxing Li, Junwei Tang, Chao Xu, Dongmei Zhu, Weibing Tang, and Yankai Xia. 2016. 'The relationship between prenatal exposure to BP-3 and Hirschsprung's disease', *Chemosphere*, 144: 1091-97.
- Ikawa, H., H. Kawano, Y. Takeda, H. Masuyama, K. Watanabe, M. Endo, J. Yokoyama, M. Kitajima, K. Uyemura, and K. Kawamura. 1997. 'Impaired expression of neural cell adhesion molecule L1 in the extrinsic nerve fibers in Hirschsprung's disease', *J Pediatr Surg*, 32: 542-5.
- Jackson, S. R., Y. S. Guner, R. Woo, L. M. Randolph, H. Ford, and C. E. Shin. 2009. 'L1CAM mutation in association with X-linked hydrocephalus and Hirschsprung's disease', *Pediatr Surg Int*, 25: 823-5.
- Jiang, Q., S. Arnold, T. Heanue, K. P. Kilambi, B. Doan, A. Kapoor, A. Y. Ling, M. X. Sosa, M. Guy, Q. Jiang, G. Burzynski, K. West, S. Bessling, P. Griseri, J. Amiel, R. M. Fernandez, J. B. Verheij, R. M. Hofstra, S. Borrego, S. Lyonnet, I. Ceccherini, J. J. Gray, V. Pachnis, A. S. McCallion, and A. Chakravarti. 2015. 'Functional loss of semaphorin 3C and/or semaphorin 3D and their epistatic interaction with ret are critical to Hirschsprung disease liability', *Am J Hum Genet*, 96: 581-96.
- Jiang, Q., T. Turner, M. X. Sosa, A. Rakha, S. Arnold, and A. Chakravarti. 2012. 'Rapid and efficient human mutation detection using a bench-top next-generation DNA sequencer', *Hum Mutat*, 33: 281-9.
- Kamiguchi, Hiroyuki, Mary Louise Hlavin, and Vance Lemmon. 1998. 'Role of L1 in Neural Development: What the Knockouts Tell Us', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 12: 48-55.
- Kaplan, David R., and Freda D. Miller. 2000. 'Neurotrophin signal transduction in the nervous system', *Current Opinion in Neurobiology*, 10: 381-91.
- Karim, A., C. S. Tang, and P. K. Tam. 2021. 'The Emerging Genetic Landscape of Hirschsprung Disease and Its Potential Clinical Applications', *Front Pediatr*, 9: 638093.
- Khan, A. R., G. M. Vujanic, and S. Huddart. 2003. 'The constipated child: how likely is Hirschsprung's disease?', *Pediatr Surg Int*, 19: 439-42.
- Kong, S. W., I. H. Lee, X. Liu, J. N. Hirschhorn, and K. D. Mandl. 2018. 'Measuring coverage and accuracy of whole-exome sequencing in clinical context', *Genet Med*, 20: 1617-26.
- Lake, J. I., O. A. Tusheva, B. L. Graham, and R. O. Heuckeroth. 2013.

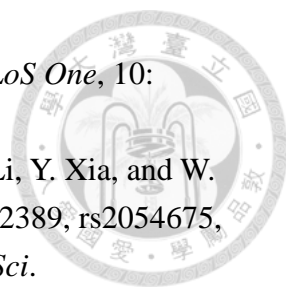
- 
- 'Hirschsprung-like disease is exacerbated by reduced de novo GMP synthesis', *J Clin Invest*, 123: 4875-87.
- Lang, D., F. Chen, R. Milewski, J. Li, M. M. Lu, and J. A. Epstein. 2000. 'Pax3 is required for enteric ganglia formation and functions with Sox10 to modulate expression of c-ret', *J Clin Invest*, 106: 963-71.
- Langer, Jacob C. 2012. 'PEDIATRIC SURGERY.' in MD Arnold G. Coran (ed.), *PEDIATRIC SURGERY* (Elsevier).
- Leon, T. Y., E. S. Ngan, H. C. Poon, M. T. So, V. C. Lui, P. K. Tam, and M. M. Garcia-Barcelo. 2009. 'Transcriptional regulation of RET by Nkx2-1, Phox2b, Sox10, and Pax3', *J Pediatr Surg*, 44: 1904-12.
- Liang, C. M., D. M. Ji, X. Yuan, L. L. Ren, J. Shen, and H. Y. Zhang. 2014. 'RET and PHOX2B genetic polymorphisms and Hirschsprung's disease susceptibility: a meta-analysis', *PLoS One*, 9: e90091.
- Liu, C. P., X. G. Li, J. T. Lou, Y. Xue, C. F. Luo, X. W. Zhou, F. Chen, X. Li, M. Li, and J. C. Li. 2009. 'Association analysis of the PHOX2B gene with Hirschsprung disease in the Han Chinese population of Southeastern China', *J Pediatr Surg*, 44: 1805-11.
- Luzón-Toro, Berta, Ana Torroglosa, Rocío Núñez-Torres, María Valle Enguix-Riego, Raquel María Fernández, Juan Carlos de Agustín, Guillermo Antiñolo, and Salud Borrego. 2012. 'Comprehensive Analysis of NRG1 Common and Rare Variants in Hirschsprung Patients', *PLoS One*, 7: e36524.
- Machens, A., J. Ukkat, M. Brauckhoff, O. Gimm, and H. Dralle. 2005. 'Advances in the management of hereditary medullary thyroid cancer', *J Intern Med*, 257: 50-9.
- Maquat, L. E. 2004. 'Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 89-99.
- Metzger, M., C. Caldwell, A. J. Barlow, A. J. Burns, and N. Thapar. 2009. 'Enteric nervous system stem cells derived from human gut mucosa for the treatment of aganglionic gut disorders', *Gastroenterology*, 136: 2214-25 e1-3.
- Metzker, Michael L. 2009. 'Sequencing technologies — the next generation', *Nature Reviews Genetics*, 11: 31-46.
- Moore, S. W. 2012. 'Total colonic aganglionosis in Hirschsprung disease', *Semin Pediatr Surg*, 21: 302-9.
- Moore, S. W., and M. Zaahl. 2010. 'Familial associations in medullary thyroid carcinoma with Hirschsprung disease: the role of the RET-C620 "Janus" genetic variation', *J Pediatr Surg*, 45: 393-6.
- Moos, Marion, Roland Tacke, Herta Scherer, David Teplow, Klaus Früh, and Melitta Schachner. 1988. 'Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin',

- Nature*, 334: 701-03.
- Mukherjee, P., S. Roy, D. Ghosh, and S. K. Nandi. 2022. 'Role of animal models in biomedical research: a review', *Lab Anim Res*, 38: 18.
- Nakamura, Y., S. Lee, C. L. Haddox, E. J. Weaver, and V. P. Lemmon. 2010. 'Role of the cytoplasmic domain of the L1 cell adhesion molecule in brain development', *J Comp Neurol*, 518: 1113-32.
- Odiete, O., M. F. Hill, and D. B. Sawyer. 2012. 'Neuregulin in cardiovascular development and disease', *Circ Res*, 111: 1376-85.
- Okamoto, N., R. Del Maestro, R. Valero, E. Monros, P. Poo, Y. Kanemura, and M. Yamasaki. 2004. 'Hydrocephalus and Hirschsprung's disease with a mutation of L1CAM', *J Hum Genet*, 49: 334-7.
- Okamoto, N., Y. Wada, and M. Goto. 1997. 'Hydrocephalus and Hirschsprung's disease in a patient with a mutation of L1CAM', *J Med Genet*, 34: 670-71.
- Parisi, M. A., R. P. Kapur, I. Neilson, R. M. Hofstra, L. W. Holloway, R. C. Michaelis, and K. A. Leppig. 2002. 'Hydrocephalus and intestinal aganglionosis: is L1CAM a modifier gene in Hirschsprung disease?', *Am J Med Genet*, 108: 51-6.
- Payen, E., C. Talbotec, C. Chardot, C. Capito, N. Khen-Dunlop, S. Sarnacki, F. Lacaille, C. Lambe, and O. Goulet. 2022. 'Outcome of Total Colonic Aganglionosis Involving the Small Bowel Depends on Bowel Length, Liver Disease, and Enterocolitis', *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 74: 582-87.
- Petersen, B. S., B. Fredrich, M. P. Hoepfner, D. Ellinghaus, and A. Franke. 2017. 'Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing', *BMC Genet*, 18: 14.
- Pingault, Veronique, Nadege Bondurand, Kirsten Kuhlbrodt, Derk E. Goerich, Marie-Odette Prehu, Aldamaria Puliti, Beate Herbarth, Irm Hermans-Borgmeyer, Eric Legius, Gert Matthijs, Jeanne Amiel, Stanislas Lyonnet, Isabella Ceccherini, Giovanni Romeo, Jill Clayton Smith, Andrew P. Read, Michael Wegner, and Michel Goossens. 1998. 'SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease', *Nat Genet*, 18: 171-73.
- Pitera, J. E., V. V. Smith, A. S. Woolf, and P. J. Milla. 2001. 'Embryonic gut anomalies in a mouse model of retinoic Acid-induced caudal regression syndrome: delayed gut looping, rudimentary cecum, and anorectal anomalies', *The American journal of pathology*, 159: 2321-29.
- Pu, J., S. Tang, Q. Tong, G. Wang, H. Jia, Q. Jia, K. Li, D. Li, D. Yang, J. Yang, H. Li, S. Li, and H. Mei. 2017. 'Neuregulin 1 is involved in enteric nervous system development in zebrafish', *J Pediatr Surg*, 52: 1182-87.
- Puffenberger, Erik G., Kiminori Hosoda, Sarah S. Washington, Kazuwa Nakao, Damiane deWit, Masashi Yanagisawa, and Aravinda Chakravarti. 1994. 'A

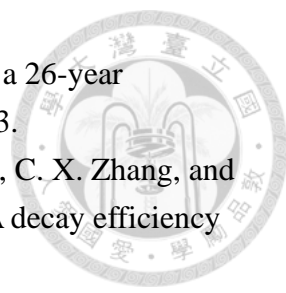
- 
- missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic hirschsprung's disease', *Cell*, 79: 1257-66.
- Rabbani, B., M. Tekin, and N. Mahdieh. 2014. 'The promise of whole-exome sequencing in medical genetics', *J Hum Genet*, 59: 5-15.
- Reategui, Cesar O., Chester A. Spears, and Gina A. Allred. 2021. 'Adults Hirschsprung's disease, a call for awareness. A Case Report and review of the literature', *International Journal of Surgery Case Reports*, 79: 496-502.
- Rollo, B. N., D. Zhang, L. A. Stamp, T. R. Menheniott, L. Stathopoulos, M. Denham, M. Dottori, S. K. King, J. M. Hutson, and D. F. Newgreen. 2016. 'Enteric Neural Cells From Hirschsprung Disease Patients Form Ganglia in Autologous Aneuronal Colon', *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2: 92-109.
- Romano, Nicole H., Christopher M. Madl, and Sarah C. Heilshorn. 2015. 'Matrix RGD ligand density and L1CAM-mediated Schwann cell interactions synergistically enhance neurite outgrowth', *Acta Biomaterialia*, 11: 48-57.
- Romeo, G., P. Ronchetto, Y. Luo, V. Barone, M. Seri, I. Ceccherini, B. Pasini, R. Bocciardi, M. Lerone, H. Kaariainen, and et al. 1994. 'Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease', *Nature*, 367: 377-8.
- Roy-Carson, S., K. Natukunda, H. C. Chou, N. Pal, C. Farris, S. Q. Schneider, and J. A. Kuhlman. 2017. 'Defining the transcriptomic landscape of the developing enteric nervous system and its cellular environment', *BMC Genomics*, 18: 290.
- Ruiz-Ferrer, M., R. M. Fernandez, G. Antinolo, M. Lopez-Alonso, and S. Borrego. 2008. 'NTF-3, a gene involved in the enteric nervous system development, as a candidate gene for Hirschsprung disease', *J Pediatr Surg*, 43: 1308-11.
- Ruiz-Ferrer, M., A. Torroglosa, B. Luzon-Toro, R. M. Fernandez, G. Antinolo, L. M. Mulligan, and S. Borrego. 2011. 'Novel mutations at RET ligand genes preventing receptor activation are associated to Hirschsprung's disease', *J Mol Med (Berl)*, 89: 471-80.
- Ruiz-Ferrer, M., A. Torroglosa, R. Nunez-Torres, J. C. de Agustin, G. Antinolo, and S. Borrego. 2011. 'Expression of PROKR1 and PROKR2 in human enteric neural precursor cells and identification of sequence variants suggest a role in HSCR', *PLoS One*, 6: e23475.
- Salomon, R., T. Attie, A. Pelet, C. Bidaud, C. Eng, J. Amiel, S. Sarnacki, O. Goulet, C. Ricour, C. Nihoul-Fekete, A. Munnich, and S. Lyonnet. 1996. 'Germline mutations of the RET ligand GDNF are not sufficient to cause Hirschsprung disease', *Nat Genet*, 14: 345-7.
- Sanchez-Mejias, A., R. M. Fernandez, M. Lopez-Alonso, G. Antinolo, and S. Borrego. 2009. 'Contribution of RET, NTRK3 and EDN3 to the expression of

- 
- Hirschsprung disease in a multiplex family', *J Med Genet*, 46: 862-4.
- Sanchez-Mejias, A., Y. Watanabe, M. Fernandez R, M. Lopez-Alonso, G. Antinolo, N. Bondurand, and S. Borrego. 2010. 'Involvement of SOX10 in the pathogenesis of Hirschsprung disease: report of a truncating mutation in an isolated patient', *J Mol Med (Berl)*, 88: 507-14.
- Sasaki, A., M. Kanai, K. Kijima, K. Akaba, M. Hashimoto, H. Hasegawa, S. Otaki, T. Koizumi, S. Kusuda, Y. Ogawa, K. Tuchiya, W. Yamamoto, T. Nakamura, and K. Hayasaka. 2003. 'Molecular analysis of congenital central hypoventilation syndrome', *Hum Genet*, 114: 22-6.
- Sparkes, R., C. Kimpton, S. Gilbard, P. Carne, J. Andersen, N. Oldroyd, D. Thomas, A. Urquhart, and P. Gill. 1996. 'The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. (II), Artefacts, casework studies and success rates', *Int J Legal Med*, 109: 195-204.
- Sun, Y., Y. Li, M. Chen, Y. Luo, Y. Qian, Y. Yang, H. Lu, F. Lou, and M. Dong. 2019. 'A Novel Silent Mutation in the L1CAM Gene Causing Fetal Hydrocephalus Detected by Whole-Exome Sequencing', *Front Genet*, 10: 817.
- Takahashi, M., T. Iwashita, M. Santoro, S. Lyonnet, G. M. Lenoir, and M. Billaud. 1999. 'Co-segregation of MEN2 and Hirschsprung's disease: the same mutation of RET with both gain and loss-of-function?', *Hum Mutat*, 13: 331-6.
- Takenouchi, Toshiki, Mie Nakazawa, Yonehiro Kanemura, Sachiko Shimozato, Mami Yamasaki, Takao Takahashi, and Kenjiro Kosaki. 2012. 'Hydrocephalus with Hirschsprung disease: Severe end of X-linked hydrocephalus spectrum', *American Journal of Medical Genetics Part A*, 158A: 812-15.
- Tang, C. S., G. Cheng, M. T. So, B. H. Yip, X. P. Miao, E. H. Wong, E. S. Ngan, V. C. Lui, Y. Q. Song, D. Chan, K. Cheung, Z. W. Yuan, L. Lei, P. H. Chung, X. L. Liu, K. K. Wong, C. R. Marshall, S. W. Scherer, S. S. Cherny, P. C. Sham, P. K. Tam, and M. M. Garcia-Barcelo. 2012. 'Genome-wide copy number analysis uncovers a new HSCR gene: NRG3', *PLoS Genet*, 8: e1002687.
- Tang, W., J. Qin, J. Tang, H. Zhang, Z. Zhou, B. Li, Q. Geng, W. Wu, Y. Xia, and X. Xu. 2013. 'Aberrant reduction of MiR-141 increased CD47/CUL3 in hirschsprung's disease', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 32: 1655-67.
- Tapanes-Castillo, Alexis, Eli J. Weaver, Robin P. Smith, Yoshimasa Kamei, Tamara Caspary, Kara L. Hamilton-Nelson, Susan H. Slifer, Eden R. Martin, John L. Bixby, and Vance P. Lemmon. 2009. 'A modifier locus on chromosome 5 contributes to L1 cell adhesion molecule X-linked hydrocephalus in mice', *neurogenetics*, 11: 53-71.
- Tegay, D. H., A. H. Lane, J. Roohi, and E. Hatchwell. 2007. 'Contiguous gene deletion involving L1CAM and AVPR2 causes X-linked hydrocephalus with nephrogenic

- diabetes insipidus', *Am J Med Genet A*, 143A: 594-8.
- Thelen, K., V. Kedar, A. K. Panicker, R. S. Schmid, B. R. Midkiff, and P. F. Maness. 2002. 'The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins', *J Neurosci*, 22: 4918-31.
- Torroglosa, A., M. V. Enguix-Riego, R. M. Fernandez, F. J. Roman-Rodriguez, M. J. Moya-Jimenez, J. C. de Agustin, G. Antinolo, and S. Borrego. 2014. 'Involvement of DNMT3B in the pathogenesis of Hirschsprung disease and its possible role as a regulator of neurogenesis in the human enteric nervous system', *Genet Med*, 16: 703-10.
- Toure, A. M., M. Landry, O. Souchkova, S. W. Kembel, and N. Pilon. 2019. 'Gut microbiota-mediated Gene-Environment interaction in the TashT mouse model of Hirschsprung disease', *Sci Rep*, 9: 492.
- Tüysüz, Beyhan, Anna Collin, Müjde Arapoğlu, and Nezir Suyugül. 2009. 'Clinical variability of Waardenburg–Shah syndrome in patients with proximal 13q deletion syndrome including the endothelin-B receptor locus', *American Journal of Medical Genetics Part A*, 149A: 2290-95.
- Vits, L., D. Chitayat, G. Van Camp, J. J. Holden, E. Fransen, and P. J. Willems. 1998. 'Evidence for somatic and germline mosaicism in CRASH syndrome', *Hum Mutat*, Suppl 1: S284-7.
- Vits, Lieve, Guy Van Camp, Paul Coucke, Erik Fransen, Kristel De Boule, Edwin Reyniers, Bernhard Korn, Annemarie Poustka, Golder Wilson, Connie Schrandt-Stumpel, Robin M. Winter, Charles Schwartz, and Patrick J. Willems. 1994. 'MASA syndrome is due to mutations in the neural cell adhesion gene L1CAM', *Nat Genet*, 7: 408-13.
- Vorobyov, G. I., S. I. Achkasov, and O. M. Biryukov. 2010. 'Clinical features' diagnostics and treatment of Hirschsprung's disease in adults', *Colorectal Dis*, 12: 1242-8.
- Wakamatsu, N., Y. Yamada, K. Yamada, T. Ono, N. Nomura, H. Taniguchi, H. Kitoh, N. Mutoh, T. Yamanaka, K. Mushiake, K. Kato, S. Sonta, and M. Nagaya. 2001. 'Mutations in SIP1, encoding Smad interacting protein-1, cause a form of Hirschsprung disease', *Nat Genet*, 27: 369-70.
- Wallace, A. S., C. Schmidt, M. Schachner, M. Wegner, and R. B. Anderson. 2010. 'L1cam acts as a modifier gene during enteric nervous system development', *Neurobiol Dis*, 40: 622-33.
- Wilhelm, D., S. Palmer, and P. Koopman. 2007. 'Sex determination and gonadal development in mammals', *Physiol Rev*, 87: 1-28.
- Wilkinson, David J., George S. Bethell, Rajeev Shukla, Simon E. Kenny, and David H. Edgar. 2015. 'Isolation of Enteric Nervous System Progenitor Cells from the

- 
- Aganglionic Gut of Patients with Hirschsprung's Disease', *PLoS One*, 10: e0125724.
- Xu, C., P. Chen, H. Xie, H. Zhu, D. Zhu, P. Cai, W. Huo, Y. Qin, H. Li, Y. Xia, and W. Tang. 2014. 'Associations Between CYP2B6 rs707265, rs1042389, rs2054675, and Hirschsprung Disease in a Chinese Population', *Dig Dis Sci*.
- Yang, J., S. Duan, R. Zhong, J. Yin, J. Pu, J. Ke, X. Lu, L. Zou, H. Zhang, Z. Zhu, D. Wang, H. Xiao, A. Guo, J. Xia, X. Miao, S. Tang, and G. Wang. 2013. 'Exome sequencing identified NRG3 as a novel susceptible gene of Hirschsprung's disease in a Chinese population', *Mol Neurobiol*, 47: 957-66.
- Yang, W., S. C. Chen, J. Y. Lai, Y. C. Ming, J. C. Chen, and P. L. Chen. 2019. 'Distinctive genetic variation of long-segment Hirschsprung's disease in Taiwan', *Neurogastroenterol Motil*, 31: e13665.
- Yang, W., S. C. Chen, T. E. Wang, P. S. Tsai, J. C. Chen, and P. L. Chen. 2023. 'L1cam alternative shorter transcripts encoding the extracellular domains were overexpressed in the intestine of L1cam knockdown mice', *Gene*, 881: 147643.
- Yang, Wendy, Jenny Pham, Sebastian K. King, Donald F. Newgreen, Heather M. Young, Lincon A. Stamp, and Marlene M. Hao. 2022. 'A Novel Method for Identifying the Transition Zone in Long-Segment Hirschsprung Disease: Investigating the Muscle Unit to Ganglion Ratio', *Biomolecules*, 12.
- Yates, Andrew D, Premanand Achuthan, Wasii Akanni, James Allen, Jamie Allen, Jorge Alvarez-Jarreta, M Ridwan Amode, Irina M Armean, Andrey G Azov, Ruth Bennett, Jyothish Bhai, Konstantinos Billis, Sanjay Boddu, José Carlos Marugán, Carla Cummins, Claire Davidson, Kamalkumar Dodiya, Reham Fatima, Astrid Gall, Carlos Garcia Giron, Laurent Gil, Tiago Grego, Leanne Haggerty, Erin Haskell, Thibaut Hourlier, Osagie G Izuogu, Sophie H Janacek, Thomas Juettemann, Mike Kay, Ilias Lavidas, Tuan Le, Diana Lemos, Jose Gonzalez Martinez, Thomas Maurel, Mark McDowall, Aoife McMahon, Shamika Mohanan, Benjamin Moore, Michael Nuhn, Denye N Oheh, Anne Parker, Andrew Parton, Mateus Patricio, Manoj Pandian Sakhivel, Ahamed Imran Abdul Salam, Bianca M Schmitt, Helen Schuilenburg, Dan Sheppard, Mira Sycheva, Marek Szuba, Kieron Taylor, Anja Thormann, Glen Threadgold, Alessandro Vullo, Brandon Walts, Andrea Winterbottom, Amonida Zadissa, Marc Chakiachvili, Bethany Flint, Adam Frankish, Sarah E Hunt, Garth Iisley, Myrto Kostadima, Nick Langridge, Jane E Loveland, Fergal J Martin, Joannella Morales, Jonathan M Mudge, Matthieu Muffato, Emily Perry, Magali Ruffier, Stephen J Trevanion, Fiona Cunningham, Kevin L Howe, Daniel R Zerbino, and Paul Flicek. 2019. 'Ensembl 2020', *Nucleic Acids Res*, 48: D682-D88.
- Yeh, Y. T., H. L. Tsai, C. Y. Chen, J. B. Wang, T. W. Chin, C. F. Wei, and C. S. Liu. 2014.



- 
- 'Surgical outcomes of total colonic aganglionosis in children: a 26-year experience in a single institute', *J Chin Med Assoc*, 77: 519-23.
- Zetoune, A. B., S. Fontaniere, D. Magnin, O. Anczukow, M. Buisson, C. X. Zhang, and S. Mazoyer. 2008. 'Comparison of nonsense-mediated mRNA decay efficiency in various murine tissues', *BMC Genet*, 9: 83.
- Zhang, L., M. Shen, X. Shu, J. Zhou, J. Ding, C. Zhong, B. Pan, B. Wang, C. Zhang, and W. Guo. 2023. 'Intronic position +9 and -9 are potentially splicing sites boundary from intronic variants analysis of whole exome sequencing data', *BMC Med Genomics*, 16: 146.
- Zhou, J., S. -Y Guo, Y. Zhang, and C. -Q Li. 2014. 'Human prokinetic drugs promote gastrointestinal motility in zebrafish', *Neurogastroenterology & Motility*, 26: 589-95.
- Zhu, Hairong, Peng Cai, Dongmei Zhu, Chao Xu, Hongxing Li, Junwei Tang, Hua Xie, Yufeng Qin, Ankur Sharan, Weibing Tang, and Yankai Xia. 2014. 'A common polymorphism in pre-miR-146a underlies Hirschsprung disease risk in Han Chinese', *Experimental and Molecular Pathology*, 97: 511-14.
- Zhu, L., and W. Li. 2022. 'Roles of Physicochemical and Structural Properties of RNA-Binding Proteins in Predicting the Activities of Trans-Acting Splicing Factors with Machine Learning', *Int J Mol Sci*, 23.
- Zimmer, J., and P. Puri. 2015. 'Knockout mouse models of Hirschsprung's disease', *Pediatr Surg Int*, 31: 787-94.
- Zweier, C., M. M. Peippo, J. Hoyer, S. Sousa, A. Bottani, J. Clayton-Smith, W. Reardon, J. Saraiva, A. Cabral, I. Gohring, K. Devriendt, T. de Ravel, E. K. Bijlsma, R. C. Hennekam, A. Orrico, M. Cohen, A. Dreweke, A. Reis, P. Nurnberg, and A. Rauch. 2007. 'Haploinsufficiency of TCF4 causes syndromal mental retardation with intermittent hyperventilation (Pitt-Hopkins syndrome)', *Am J Hum Genet*, 80: 994-1001.

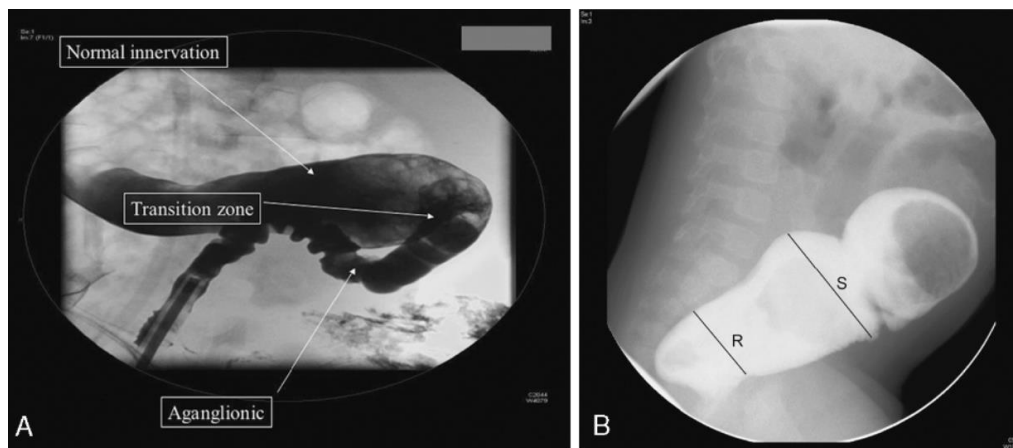


圖一 先天性巨大結腸症病患外觀

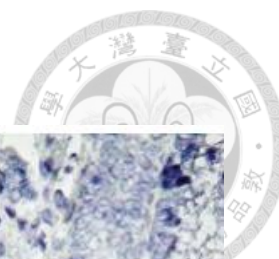


在對此疾病位有充分的了解前，少數存活至成年的巨腸症患者可見到典型極度脹大的腹部，但因長期無法正常進食，營養缺乏而四肢纖細 (Vorobyov, Achkasov, and Biryukov 2010)。

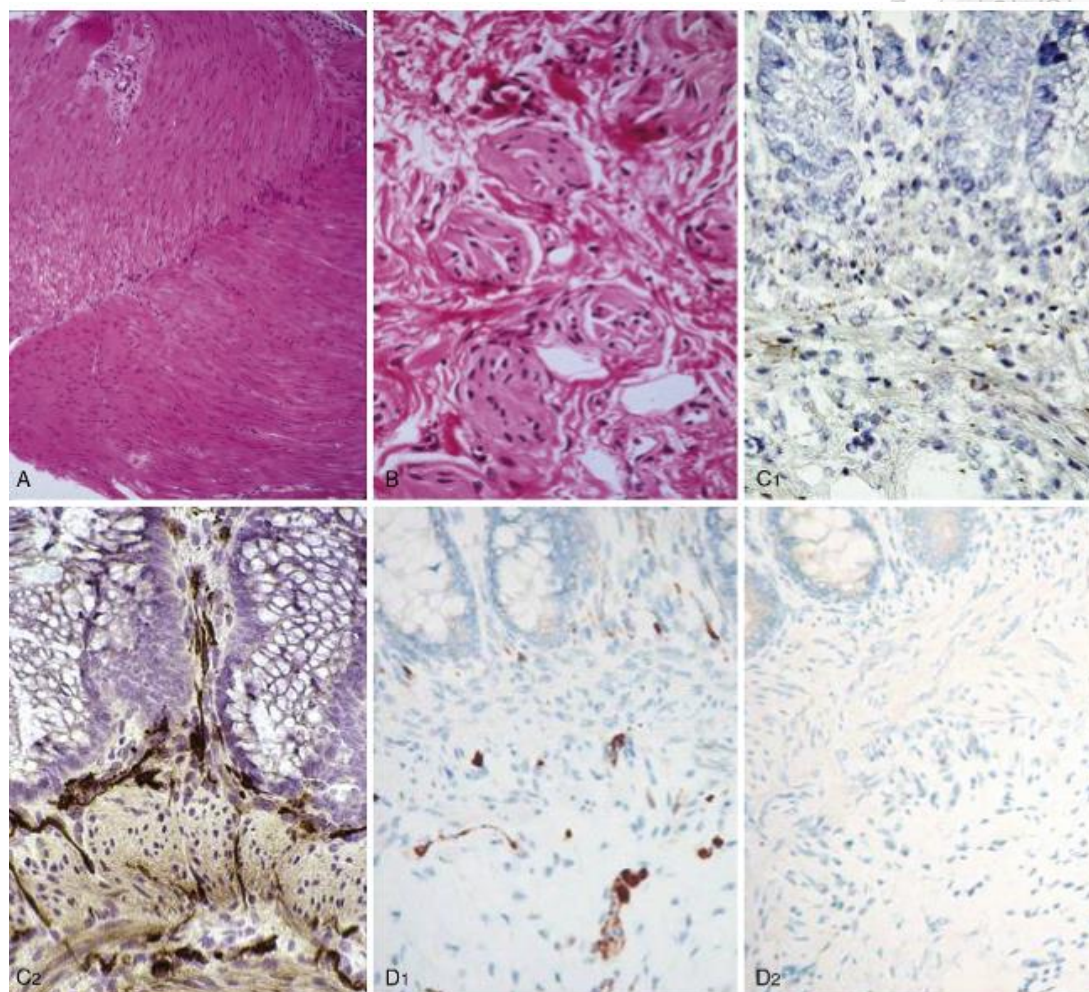
圖二 下消化道攝影



A 圖可以看到狹窄的直腸，以及乙狀結腸中段以上明顯的脹大，脹大開始的地方被認為是腸道有神經節以及沒有神經節中間的過渡區。B 圖可以看到患者的乙狀結腸較直腸更為寬大(reverse R/S ratio)。一般正常的人因為直腸有儲存糞便的功能，故直腸會較乙狀結腸寬大 (Langer 2012)。



圖三 巨大結腸症患者腸道組織的病理特徵

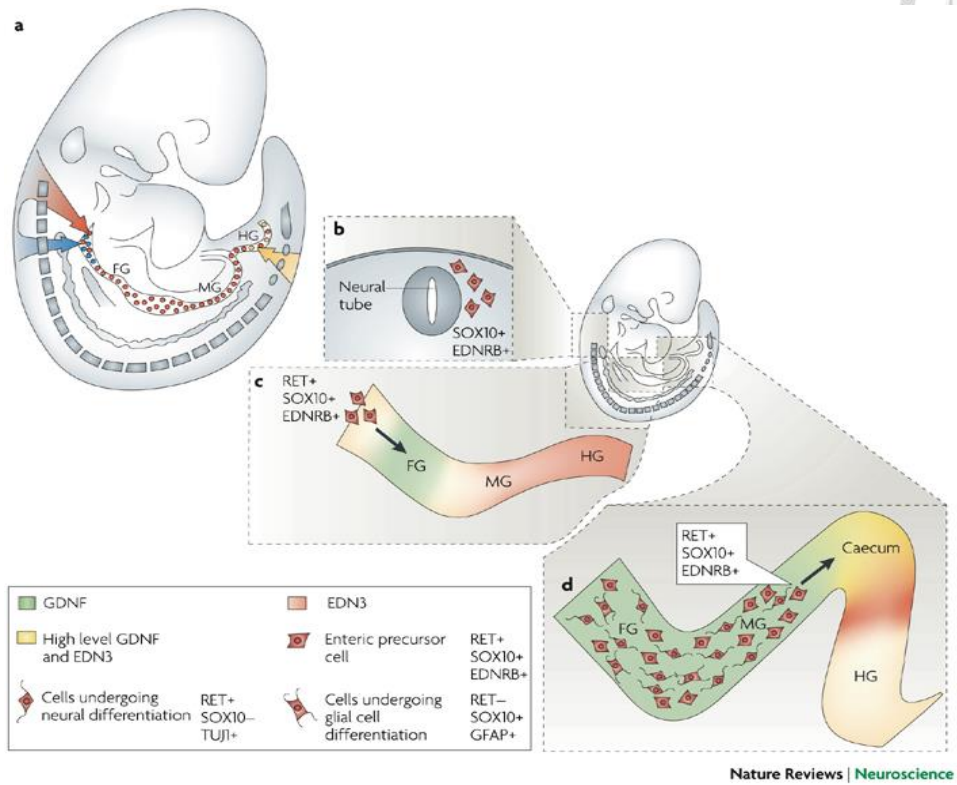


A 圖可以見到在腸道的兩層肌肉中間找不到應該出現的神經節細胞。B 圖可以見到在巨腸症的無神經節腸段常可以見到的異常肥大的神經束 (hypertrophic nerve bundles)。C 圖比較了正常人 (C1) 以及巨腸症患者 (C2) 在乙醯膽鹼表現量的差異，可以發現在巨腸症患者有大量的乙醯膽鹼表現。D 圖則是利用 Calretinin 染色來顯示神經細胞的存在與否，可以看到在正常人 (D1) 有明顯表現咖啡色 Calretinin 的神經細胞，但在巨腸症的患者 (D2) 則無法找到這樣的表現 (Langer 2012)。





圖四 腸道的神經發育過程



神經母細胞移行的過程，原圖出自 (Heanue and Pachnis 2007)

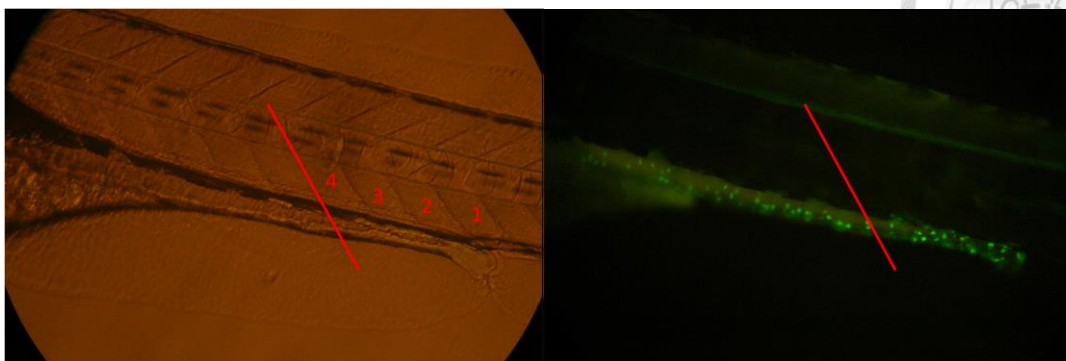
圖五 腸道由近端到遠端捲起固定成”瑞士捲”狀的檢體



利用捲起的腸道可以一起檢視整個大腸的神經節分布，而不易有遺漏的片段，尤其是對”跳躍式神經節缺失”會遠比一次看一小段的腸道來的完整、準確。

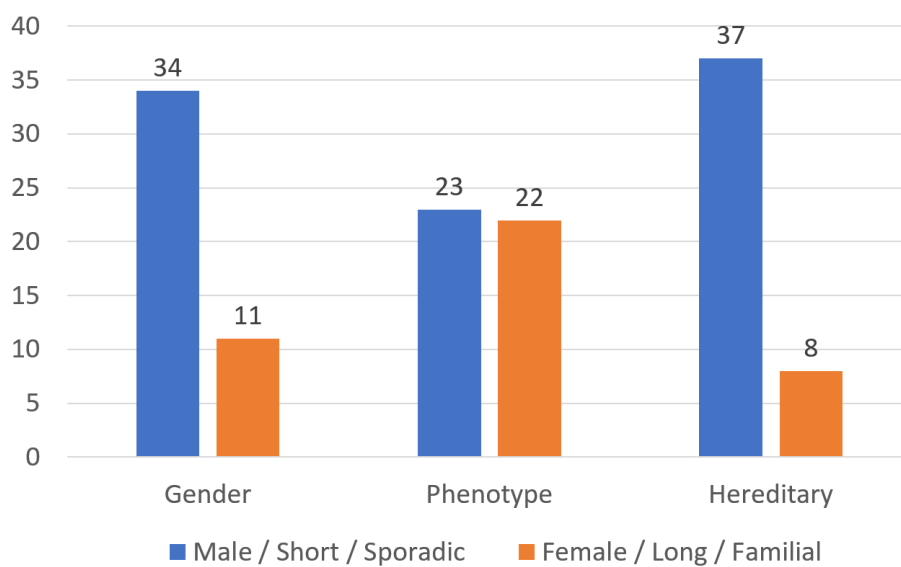


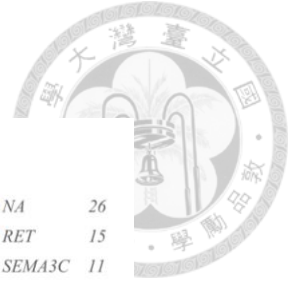
圖六 斑馬魚腸道神經節計算方式



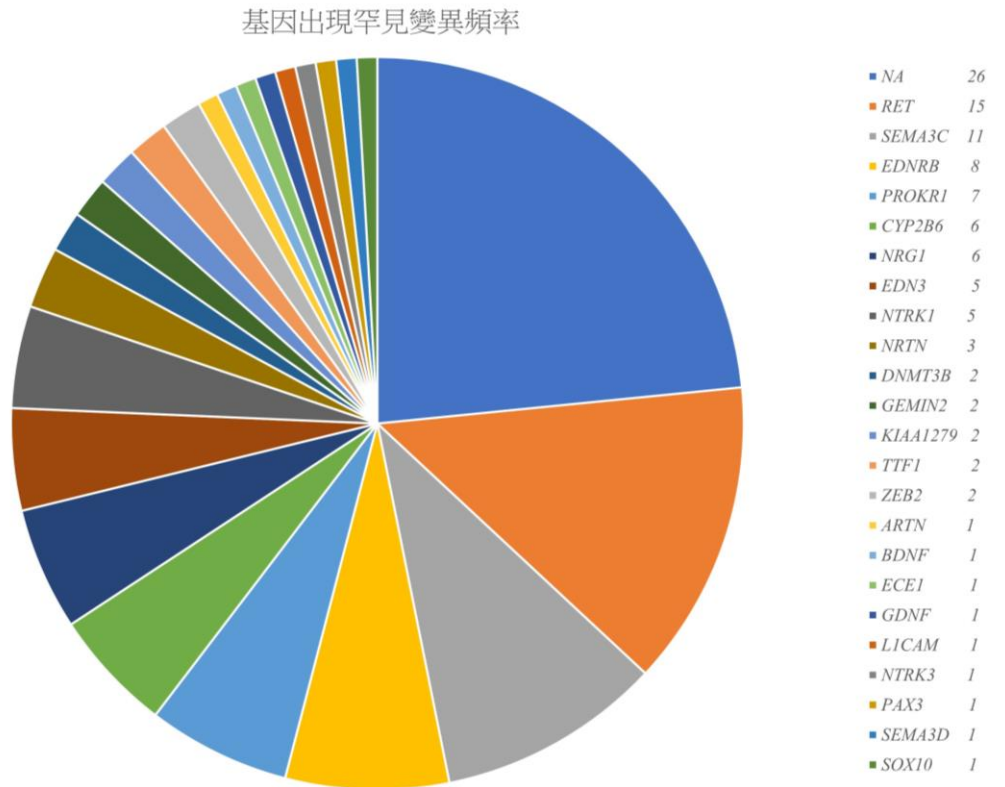
計算方式為泄殖腔開口之上的四個體節所包含的全部神經節。其中只要有碰到紅線的均列入統計。

圖七 完成 panel 分析的病患分群





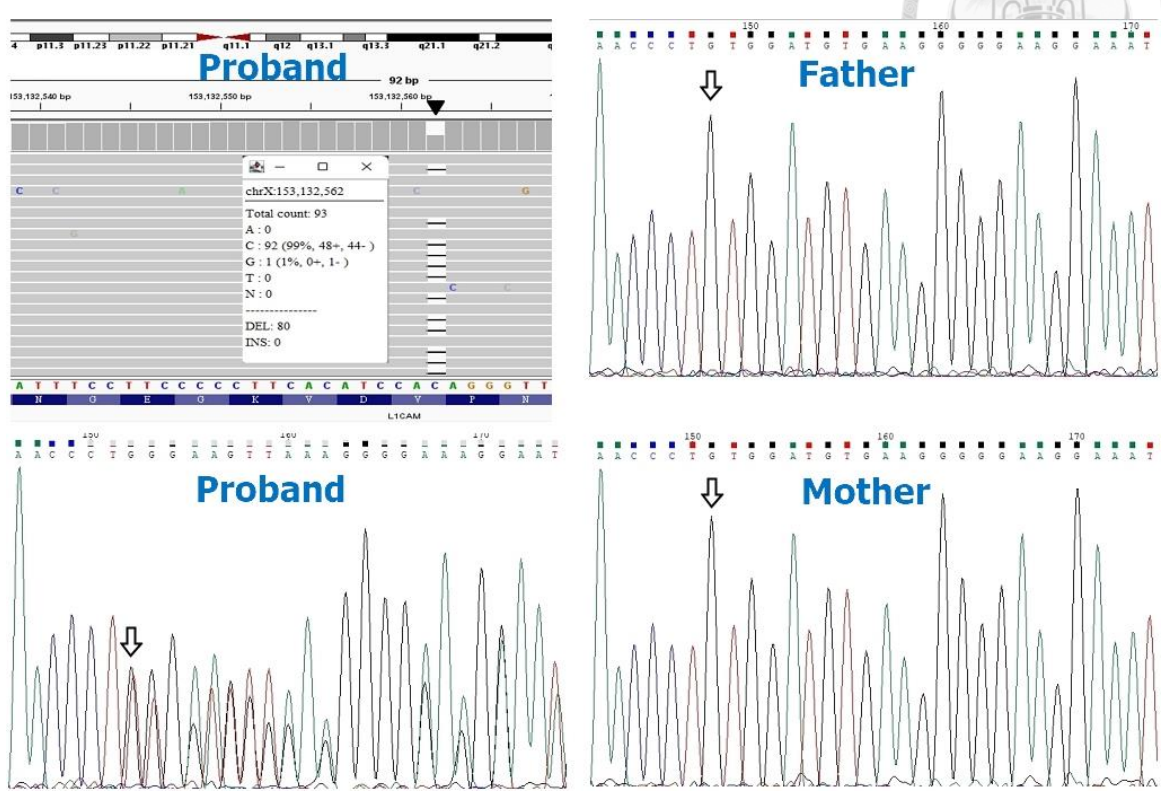
圖八 先天性巨大結腸症患者基因罕見變異出現的頻率



此為所有基因罕見變異出現的頻率，一個病人可能有不只一個基因。其中 26 個患者並未在 31 個 gene panel 中找到任何罕見變異位點。



圖九 LICAM De Novo Mutation



從 Sanger's 定序可以發現 Proband 本身為 De Novo 的變異。

圖十 FVB 小鼠和人在 LICAM 的序列比較

AACCCTGTGGATGTGAAGGGGGAAGGAAAT Human sequence  
 717 -N- -P- -V- -D- -V- -K- -G- -E- -G- -N- 726  
 c.2155G p.V719

AACCCTGTGGATGTGAGAGGGGGAAGGGAAT Mouse sequence (FVB/NJ)  
 716 -N- -P- -V- -D- -V- -R- -G- -E- -G- -N- 725  
 c.2152G p.V718

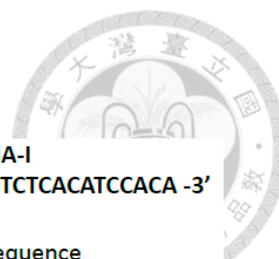
Data origin:

[http://asia.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000198910;](http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000198910;)

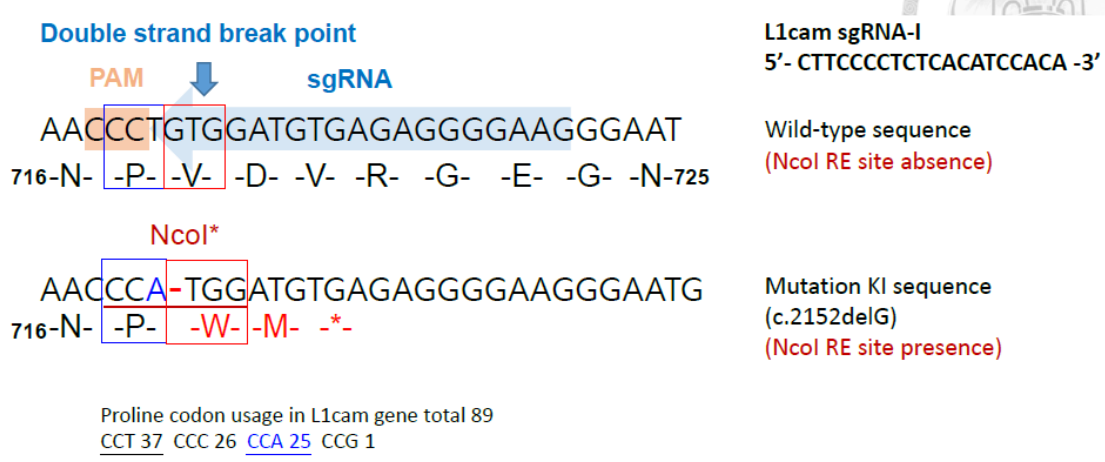
r=X:153861514-153886174

[http://asia.ensembl.org/Mus\\_musculus\\_FVB\\_NJ/Gene/Summary?db=core;g=MGP\\_FV](http://asia.ensembl.org/Mus_musculus_FVB_NJ/Gene/Summary?db=core;g=MGP_FV)

BNJ\_G0035570;r=X:68618366- 68662630;t=MGP\_FVBNJ\_T0095950



圖十一 FVB 小鼠 *L1cam* mutation 的位點設計

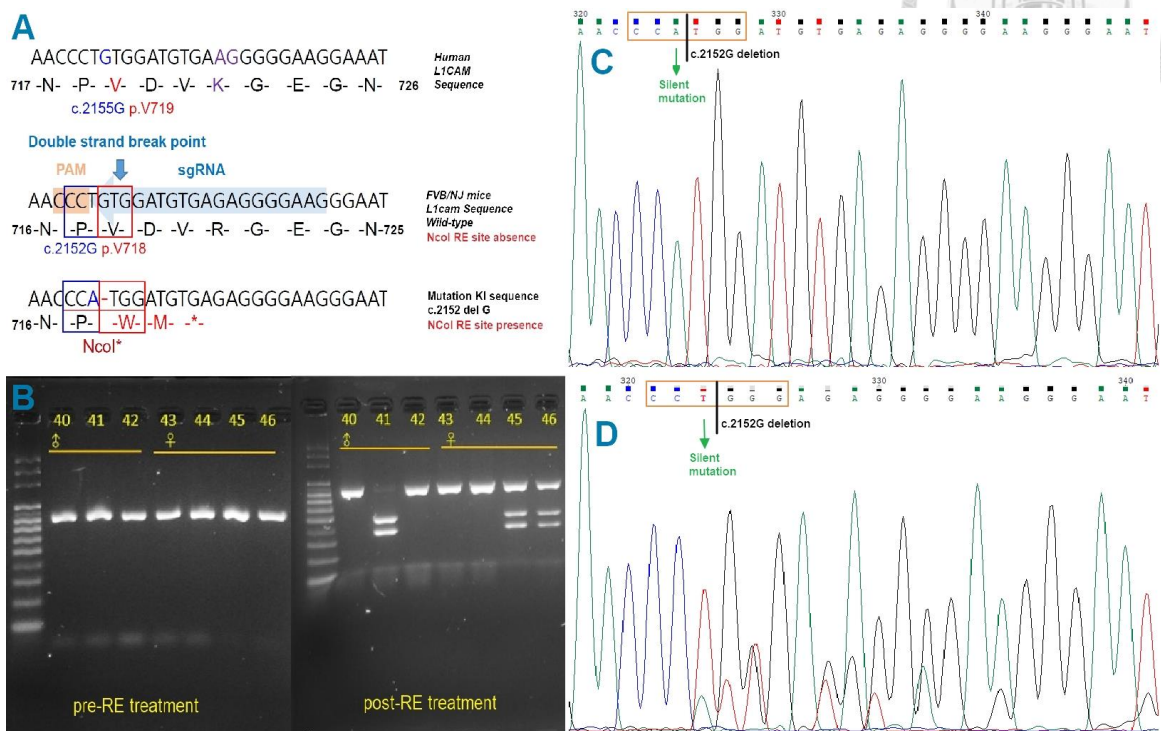


在 DNA 序列上，我們將 CCT 換成 CCA 對於小鼠的氨基酸不造成影響，卻能夠形成 NcoI 限制酶的切點，讓我們可以快速得知新生的小鼠是否帶有我們希望的變異點。



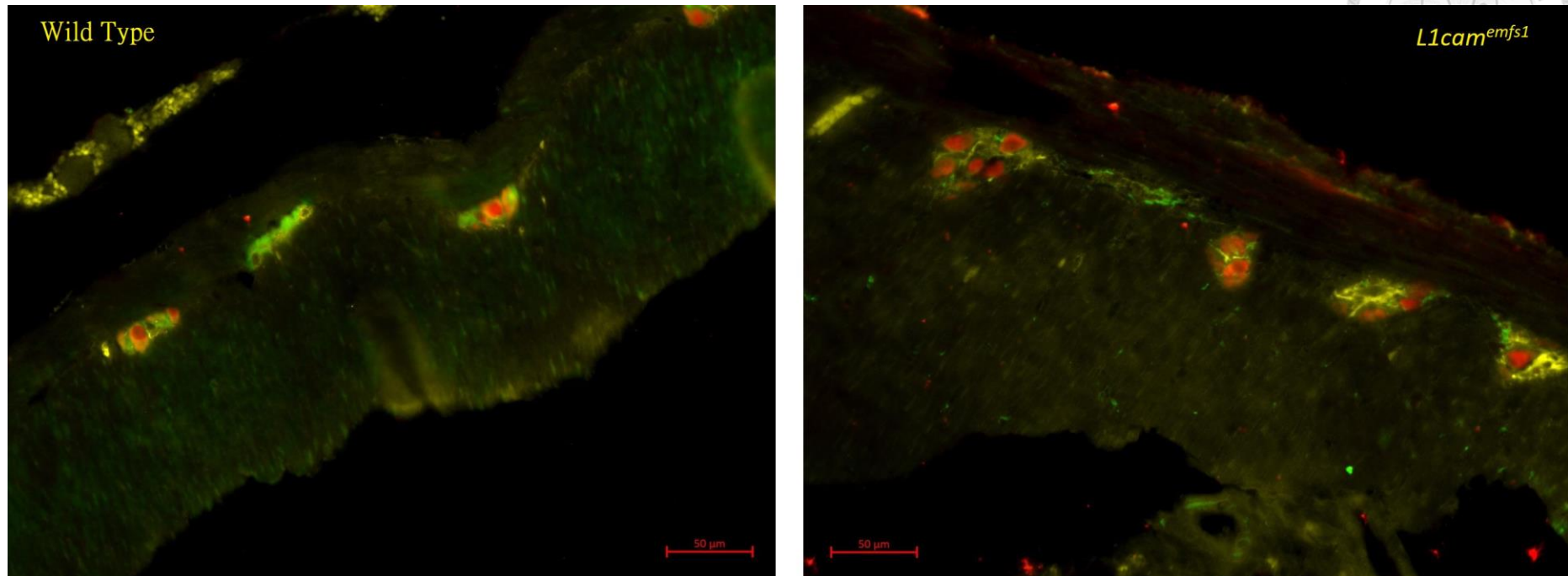


圖十二 小鼠的基因變異確認以及 Sanger's 定序結果



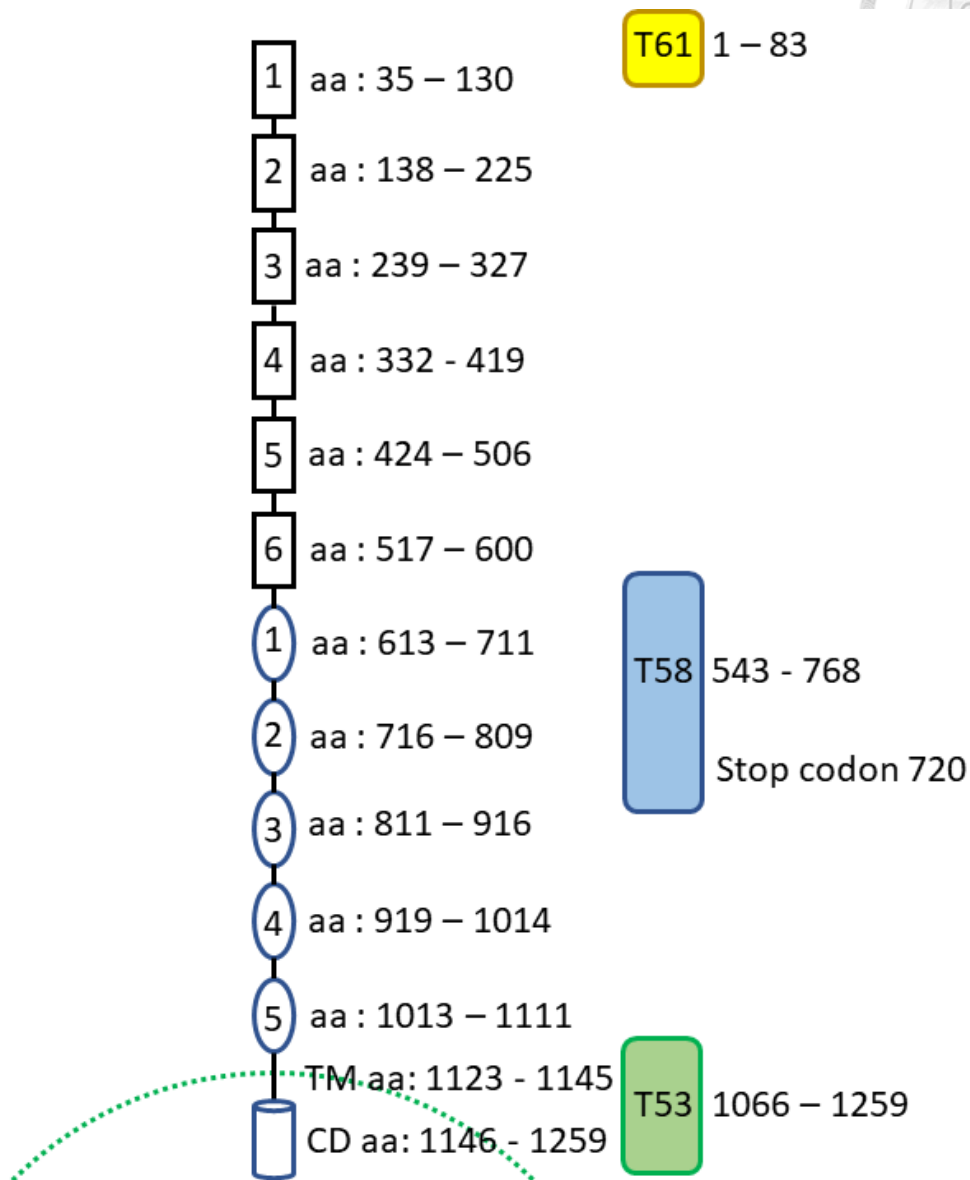
A 圖是小鼠變異位點的設計，方便比較 C/D 圖中的 Sanger's 定序結果。B 圖是在 NcoI 限制酶(RE)處理前後的差異：40-42 為公鼠，如果帶有變異位點，則 *L1cam* 的 PCR 產物會被切成兩條短的產物(如 41)。43-46 為母鼠，如果帶有變異位點，則由於是 heterozygous 的緣故，經過限制酶的作用後不帶變異位點的一股仍維持原長度，故一共會呈現三條不同長度的產物。C 圖是 hemizygous 公鼠的 Sanger's 定序，可以看到 silent mutation 以及 deletion，而 D 圖是 heterozygous 母鼠的 Sanger's 定序。

圖十三 小鼠腸道神經染色 (低倍)



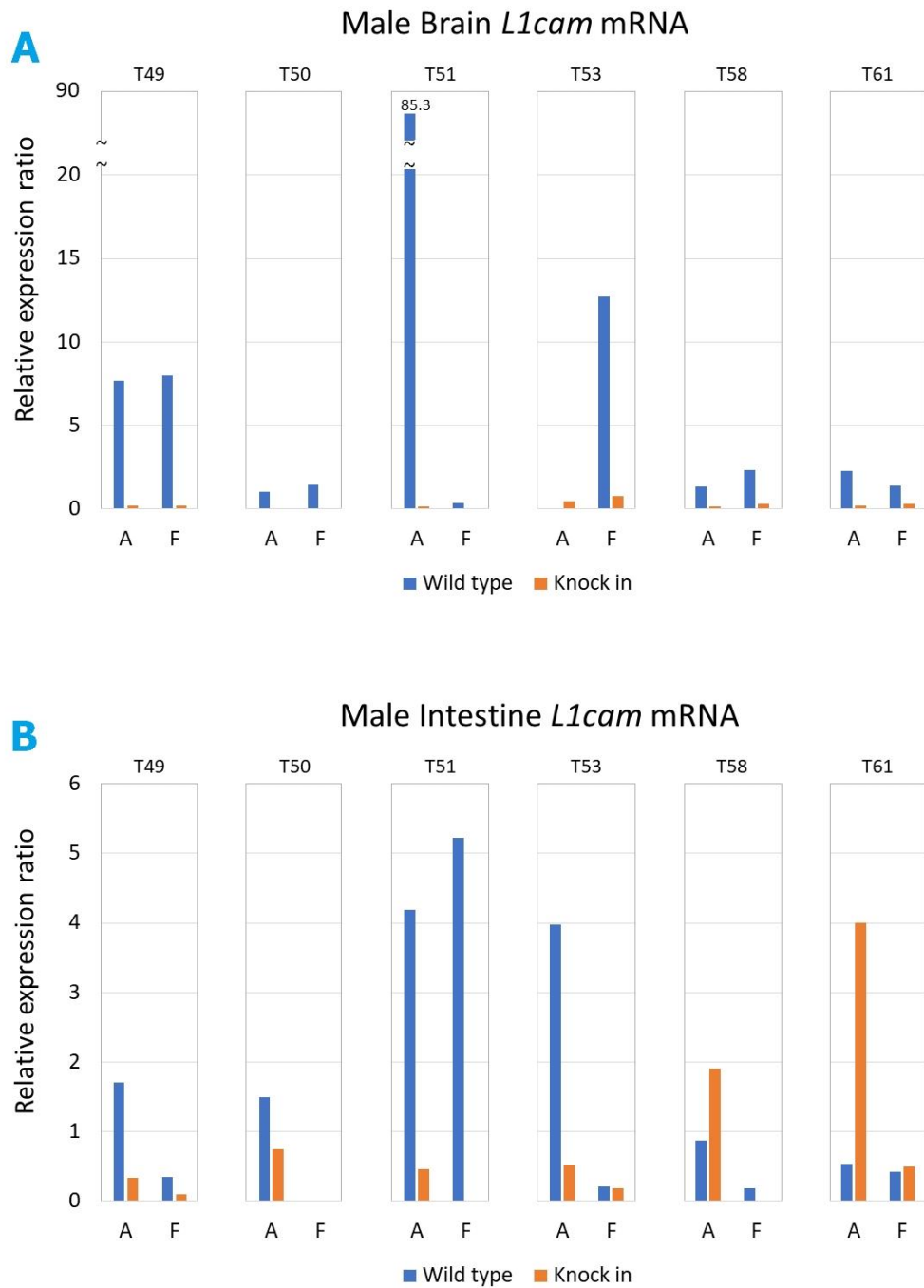
在免疫螢光染色下，紅色的是表現在神經元的 Hu，綠色則是 TUBB3。黃色是用 anti-L1cam polyclonal antibody 6096 呈現的 L1cam 蛋白。神經節需包含至少兩個以上的神經元。可以看到 FVB/NJ-*L1cam<sup>emfs1</sup>* 的公鼠在 myenteric plexus 上的神經節分布和 WT 沒有明顯不同，同時也可以看到 L1cam 蛋白質的表現。

圖十四 小鼠 L1cam 蛋白質結構



1. 全長的 L1cam 蛋白質包和了六個 Ig domain (長方形圖示), 五個 Fn domain (橢圓形圖示), 使其固定在細胞膜(綠色虛線)上的 transmembrane sequence, 以及一個位在細胞膜內的 cytoplasmic domain。
2. 短片段的 transcripts 形成的蛋白質只包含了部分 L1cam 蛋白的 domain。其中 T53 包含了部分細胞膜內外的 domain 但沒有 transmembrane sequence。
3. FVB/NJ-*L1cam*<sup>emfs1</sup> 的小鼠雖然全長的 L1cam 蛋白會被影響, 但 T61, T53 不包含變異位點, 而 T58 雖然含有變異位點, 但是在倒數第二個外顯子, 影響難以預期。

圖十五 *L1cam* mRNA 在不同基因型及年紀的公鼠表現量

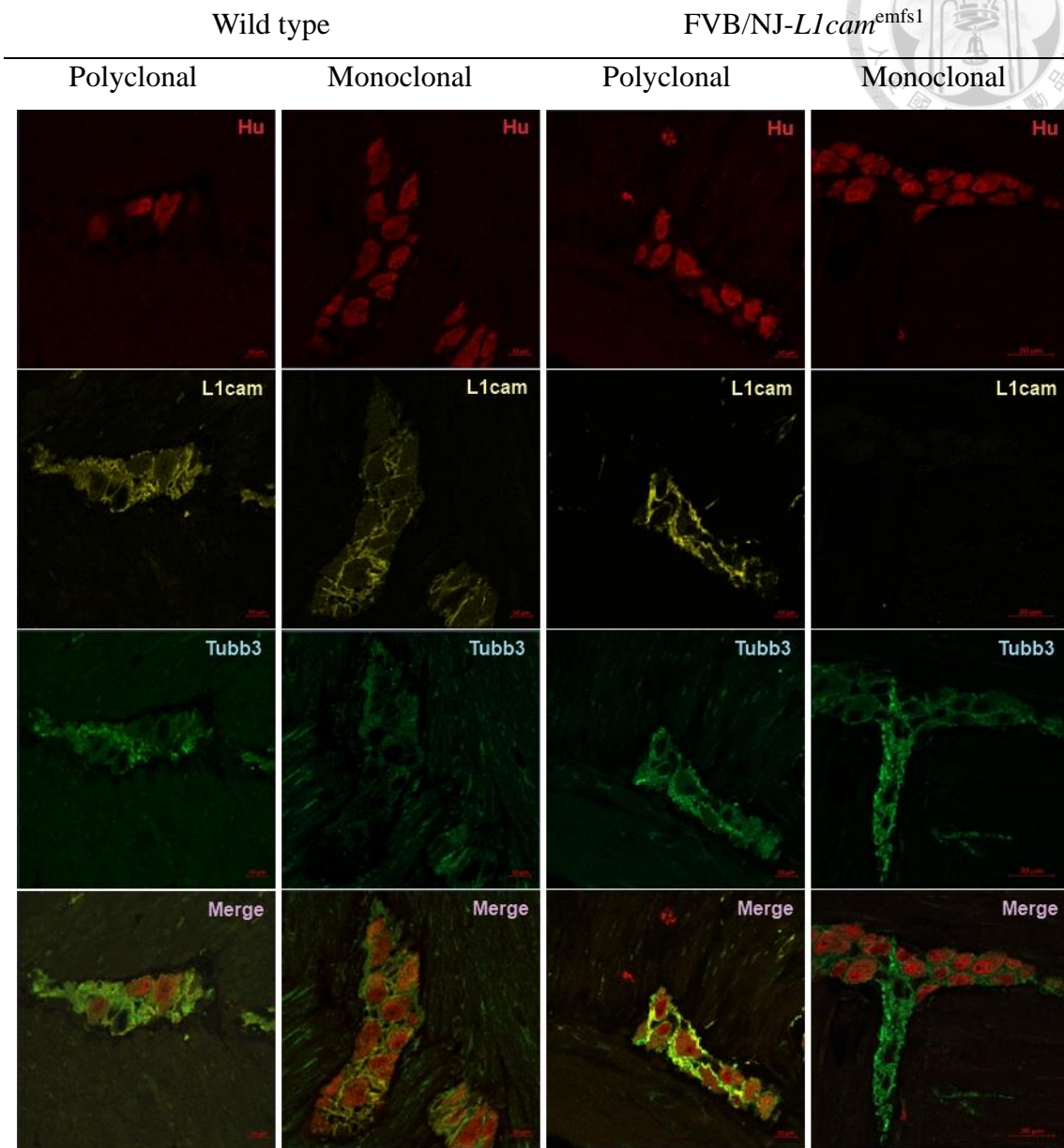


圖中簡寫的 A 代表成鼠，而 F 代表胎鼠

A 圖為小鼠腦部的 *L1CAM* mRNA 表現量比較。在腦部，無論是胎鼠或是成鼠，也不分長或短片段的 transcripts，*L1cam*<sup>emfs1</sup> 公鼠的表現量均遠低於 WT。

B 圖為小鼠腸道的 *L1CAM* mRNA 表現量比較。可以看到在全長的 transcripts 部分，成年的 *L1cam*<sup>emfs1</sup> 公鼠雖然表現量低，但仍有部分表現。而短片段的 T58 和 T61 transcripts，在成年的 *L1cam*<sup>emfs1</sup> 公鼠表現量高於 WT。

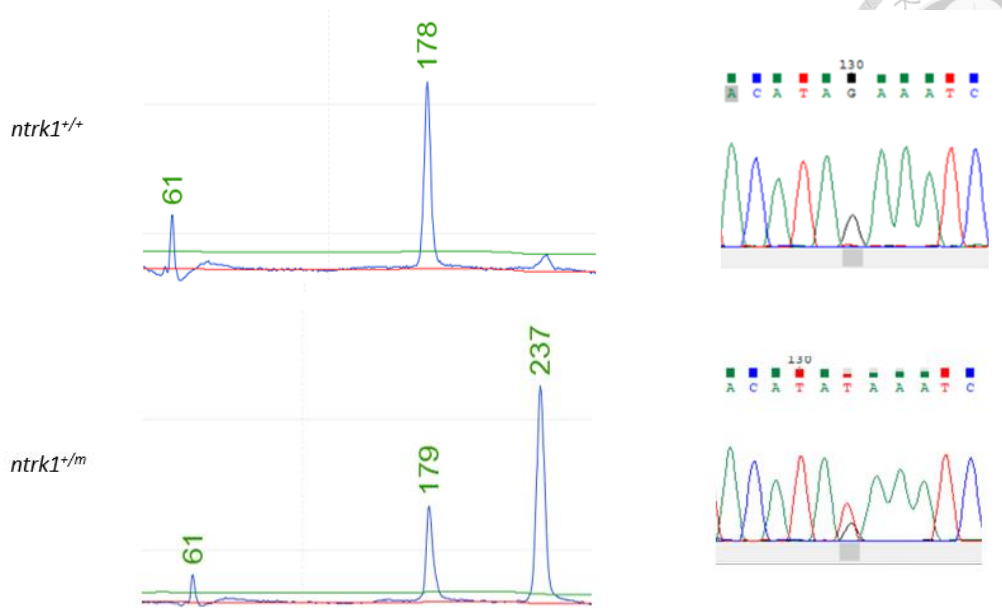
圖十六 小鼠腸道神經染色 (高倍)



左起兩組染色為 WT 小鼠的腸道神經染色，可以看到不論使用哪種 L1cam 抗體，都可以清楚的看到 L1cam 的表現。右邊兩組則是 *L1cam*<sup>emfs1</sup> 小鼠的腸道神經，可以看到雖然多株抗體可以成功染到 L1cam 抗體，但針對 aa600-850 區間的單株抗體無法染到 L1cam 的表現。



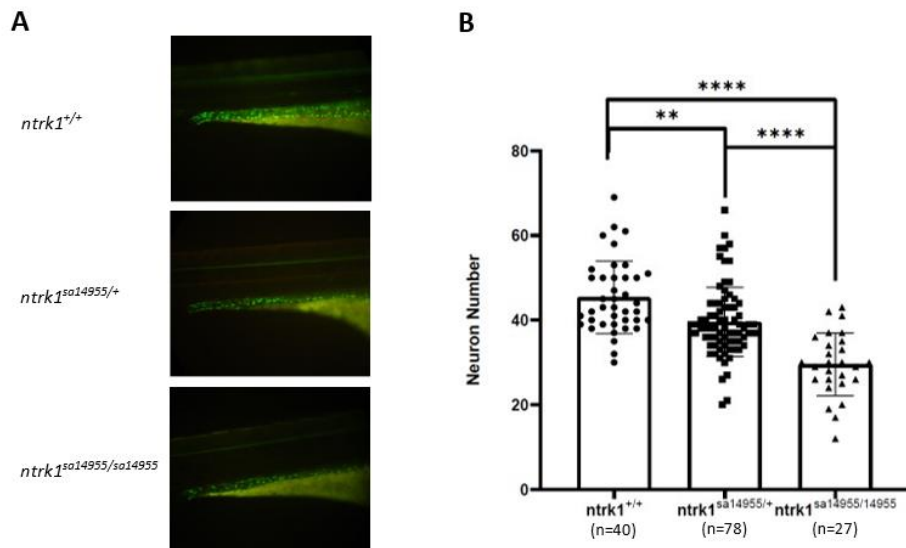
圖十七 *ntkr1\_sa14955* genotyping 結果



上圖為 WT 的斑馬魚經過限制酶作用後以毛細管電泳分析的結果。

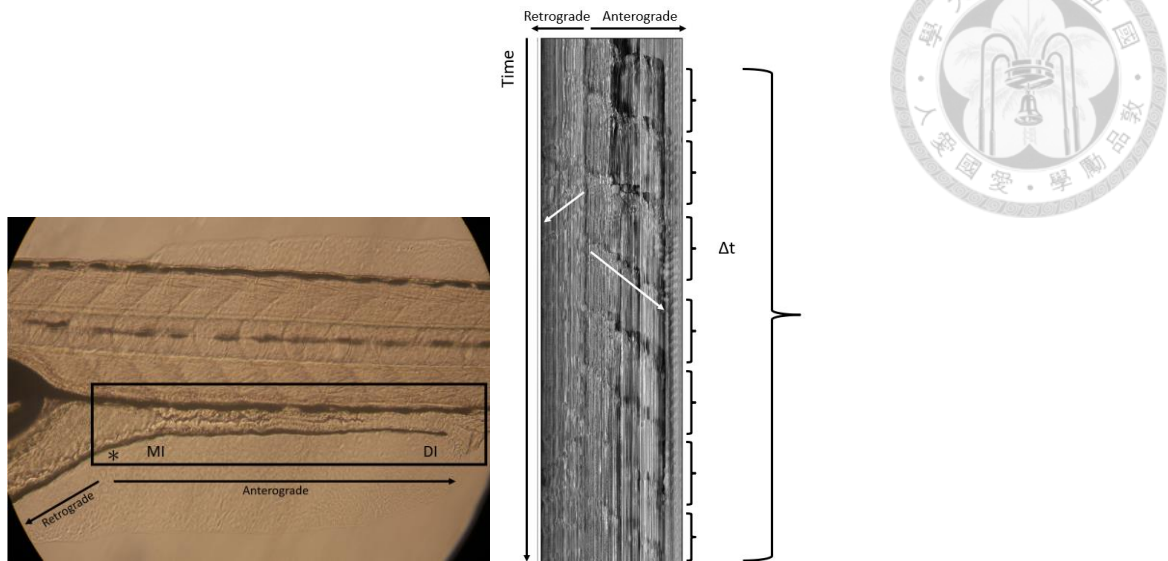
下圖為 *ntkr1\_sa14955* heterozygous 的毛細管電泳分析結果。

圖十八 斑馬魚腸道神經節螢光表現及數量統計



A 圖為斑馬魚腸道神經所表現的 GFP 螢光。可以明顯看到 WT 和 *ntkr1* 缺失的魚在神經的表現量上有明顯的差距。B 圖統計了斑馬魚最後四個體節的神經數量經過 ANOVAR 分析後有顯著的統計差。

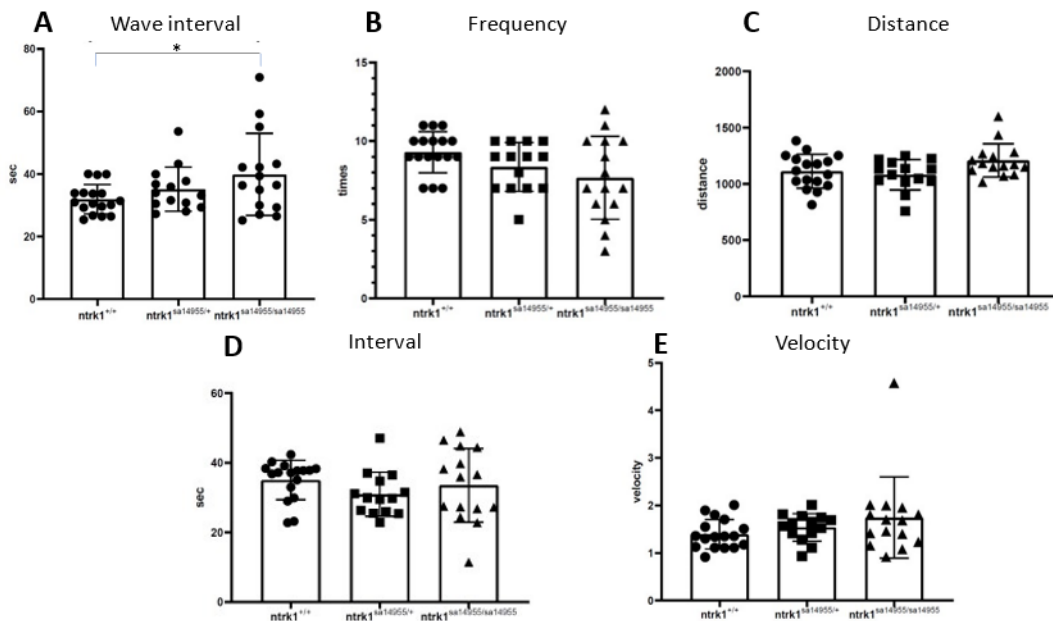
圖十九 腸道蠕動距離及時間的 Spatiotemporal maps



左圖顯示斑馬魚腸道的攝影影像。其中，腸道在\*之前會有 retrograde 的蠕動波，而\*之後則是蠕動實驗分析的 anterograde 的蠕動波。

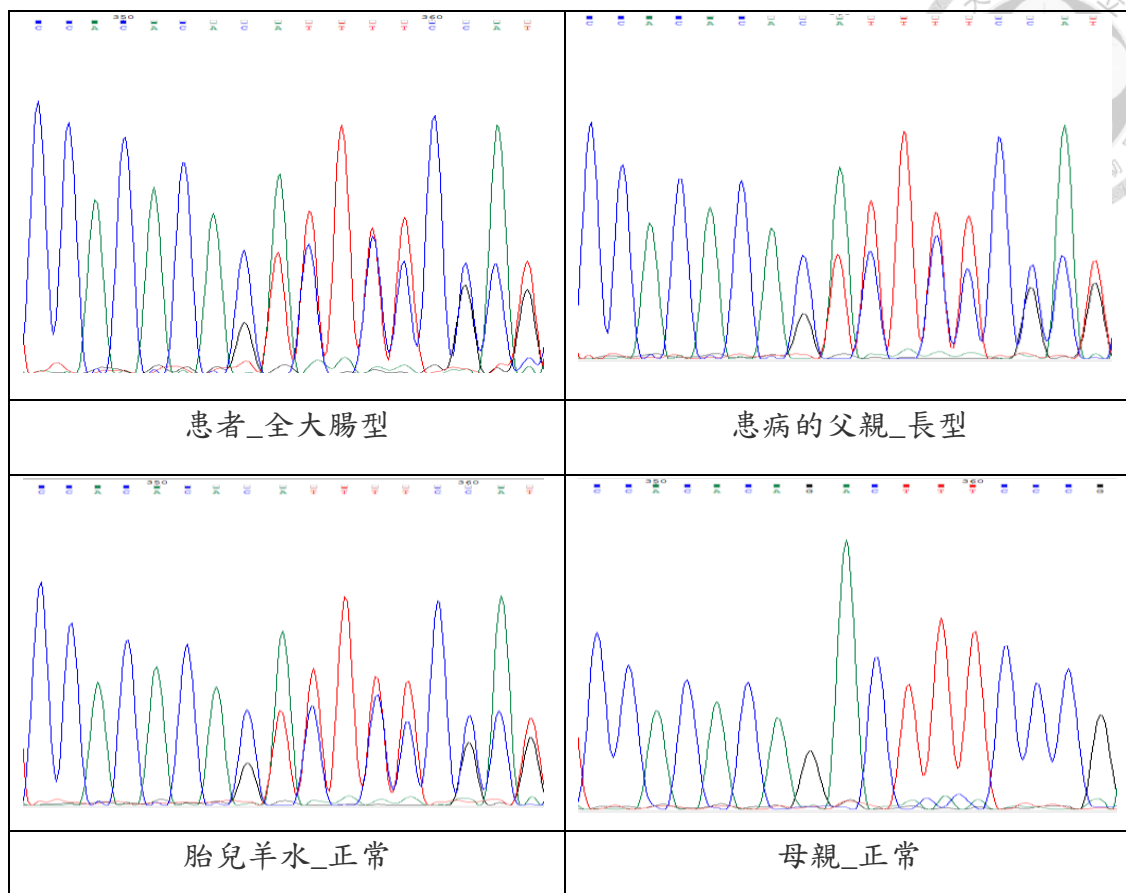
在右圖可以明顯區分兩個方向的蠕動波，每個完整的蠕動波在 Spatiotemporal maps 上會形成一道左上到右下的條紋(白色箭頭)。如右圖所示，五分鐘內完成了七次的收縮。

圖二十 斑馬魚腸道蠕動分析



從腸道蠕動的分析可以發現除了蠕動的 wave interval 有些微的統計差異，但其他的蠕動功能幾乎沒有區別。

圖二十一 家族性先天性巨大結腸症患者的基因變異，Sanger's 定序





表一 巨腸症在家族中再現比率

由 Badner 的統計可以看到越長型的患者，其表現越接近於顯性遺傳。(Badner et al. 1990)



**Risk (in %) to Relatives, as Calculated under the Most Parsimonious Genetic Model for the Different Forms of HRSD**

PARAMETER	RECTOSIGMOID HRSD				COLONIC-SEGMENT HRSD		LONG-SEGMENT HRSD	
	Multifactorial		Recessive		DOMINANT		DOMINANT	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Sibs of affected males . . . . .	4	1	4-5	1	9-10	7	9-12	7-9
Sibs of affected females . . . . .	6	2	5	1	12-13	10	21-24	17-19
Offspring of affected males . . . . .	~0	~0	1	<1	10-11	8-9	16-19	12-14
Offspring of affected females . . . . .	~0	~0	1	<1	14-15	11	27-29	21-22
Risk to second-degree relatives . . . . .	~0	~0	<1	~0	4-6	3-5	4-9	3-7
Risk in multiplex families <sup>a</sup> . . . . .	5-10	2-4	5-9	1-2	19	14	33	25

<sup>a</sup> Two sibs, a parent and sib, or a second-degree relative and sib affected.

表二 已知和巨腸症相關的基因及小鼠模型

由 Ameil 等整理的和巨腸症相關之基因及小鼠模型(Amiel et al. 2008)

**Table 2** Genes involved in HSCR in humans and known mouse models of megacolon

Gene	Human				Refs	Mouse	
	Map location	Mode of inheritance	Phenotype in mutants	Penetrance of the HSCR trait		Natural mutant	Knockout
<i>RET</i>	10q11.2	AD	HSCR	70% in males and 50% in females for CDS mutations	43, 44, 60, 61	-	L Renal agenesis
<i>GDNF</i>	5p13	AD	HSCR	5 cases reported Low penetrance	102-104	-	L Renal agenesis
<i>NTN</i>	19p13	AD	HSCR	1 case reported	105	-	-
<i>SOX10</i>	22q13	AD	WS4	About 80%	122-124	Dom (AD)	L Coat spotting
<i>EDNRB</i>	13q22	AR/AD	WS4/HSCR	Low	118, 126-129	<i>s</i> <sup>l</sup> (AR)	S Coat spotting
<i>EDN3</i>	20q13	AR/AD	WS4/HSCR	1 case reported	130	<i>ls</i> (AR)	S Coat spotting
<i>ECE1</i>	1p36	AD	HSCR CF and cardiac defect	1 case reported	131	-	S Coat spotting Craniofacial defects
<i>ZFX1B (SIP1)</i>	2q22	AD	MCA-MR, facial gestal,	60%	133-135	-	Letal at gastrulation
<i>PHOX2B</i>	4p12	AD	CCHS	20%	137, 138	-	TIA No ANS Ventilatory anomalies in <i>Phox2b</i> <sup>-/-</sup>
<i>TCF4</i>	18q21	AD	Epileptic encephalopathy	1 case	141-143	-	Early lethality Abnormal maturation of lymphocytes

AD, autosomal dominant; ANS, autonomic nervous system; AR, autosomal recessive; CF, craniofacial; L, long-segment megacolon; MR, mental retardation; S, short-megacolon; Spo, sporadic; *s*<sup>l</sup>, *Piebald lethal*; *ls*, *lethal spotting*; TIA, total intestinal aganglionosis.

表三 NGS 選取之 gene panel

根據過去報導的相關基因所設計的 Panel，另有加入粒線體 DNA 以及 micro RNA。

<i>Gene</i>	Location	GRCh 37	Size
<i>RET</i>	10q11.2	43,572,475-43,625,799 (F)	53.33kb
<i>GDNF</i>	5p13.1	37,812,779-37,839,788 (R)	27.00kb
<i>EDN3</i>	20q13.2	57,875,482-57,901,047 (F)	25.55kb
<i>EDNRB</i>	13q22.3	78,469,616-78,493,903 (R)	24.29kb
<i>NRTN</i>	19p13.3	5,823,813-5,828,335 (F)	4.52kb
<i>DNMT3b</i>	20q11.2	31,350,191-31,397,162 (F)	46.97kb
<i>SOX 10</i>	22q13.1	38,368,307-38,380,544 (R)	12.24kb
<i>ARTN</i>	1p34.1	44,398,992-44,402,911 (F)	3.92kb
<i>PSPN</i>	19P13.3	6,375,159-6,379,069 (R)	3.91kb
<i>PHOX2B(PMX2B)</i>	4p13	41,746,099-41,750,987 (R)	4.89kb
<i>ECE1</i>	1p36.12	21,543,740-21,671,997 (R)	128.26kb
<i>ZEB2 (SIP1; SIP-1; ZFH1B)</i>	2q22.3	145,141,648-145,278,621 (R)	136.97kb
<i>NRG1</i>	8p12	32,405,728-32,622,548 (F)	216.82kb
<i>SEMA3A</i>	7q21.11	83,585,093-83,824,217 (R)	239.12kb
<i>NTRK1</i>	1q23.1	156,785,432-156,851,642 (F)	66.21kb
<i>GEMIN2</i>	14q21.1	39,583,427-39,606,177 (F)	22.75kb
<i>PAX3</i>	2q36.1	223,064,607-223,163,715 (R)	98.86kb
<i>CYP2B6</i>	19q13.2	41,497,204-41,524,303 (F)	27.10 kb
<i>NTRK3 (TRKC)</i>	15q25.3	88,418,230-88,799,999 (R)	381.75kb
<i>KIAA1279</i>	10q21.1	70,748,487-70,776,738 (F)	28.25kb
<i>TTF-1 (NKX2-1)</i>	14q13	36,985,622-36,990,354 (R)	4.73kb
<i>LICAM</i>	Xq28	153,126,969-153,151,600 (R)	24.63kb
<i>BDNF</i>	11p13	27,676,440-27,743,605 (R)	67.17kb
<i>NTF3 (NGF2)</i>	12p13.31	5,541,279-5,604,465 (F)	63.19kb
<i>TCF4</i>	18q21.2	52,889,562-53,332,018 (R)	442.46kb
<i>PROK1</i>	1p13.3	110,993,822-110,999,976 (F)	6.16kb
<i>PROKR1</i>	2p13.3	68,870,721-68,882,708 (F)	9.76kb

<i>PROKR2</i>	20p12.3	5,282,317-5,297,378 (R)	15.06kb
<i>SEMA3C</i>	7q21-q31	80,371,854-80,548,667 (R)	176.81kb
<i>SEMA3D</i>	7q21.11	84,624,869-84,816,171 (R)	191.3kb
<i>NRG3</i>	10q23.1	83,637,443-84,746,723 (F)	1.11Mb

表四 長型患者基因定序結果

	No_ID	Sex	Phenotype	Gene	Exon	Variations	AA <sup>1</sup> change	Origin	SIFT	Polyphen2	Note	ACMG
Familial cases	1_40	F	L-HSCR	<i>CYP2B6</i>	7	g.980 A>G	p.E327G	P <sup>2</sup>	0	0.999	Sisters	VUS <sup>3</sup>
	2_43	F	L-HSCR	NA								
	3_48	F	TCA	<i>RET</i>	7	g.1274_1275del	p.V425fs <sup>4</sup>	P			Daughter	Patho <sup>5</sup>
	4_49	M	L-HSCR	<i>RET</i>	7	g.1274_1275del	p.V425fs	U <sup>6</sup>			Father	Patho
	5_57	M	TCA	<i>NRG1</i>	3	g.823 C>T	p.R275C	P	0	1	Brothers	VUS
				<i>SEMA3C</i>	11	g.1009 G>A	p.V337M	P	0	1		VUS
				<i>NRG1</i>	3	g.823 C>T	p.R275C	P	0	1		VUS
				<i>SEMA3C</i>	11	g.1009 G>A	p.V337M	P	0	1		VUS
	7_11'	F	TCA	<i>NRG1</i>	3	g.823 C>T	p.R275C	P	0	1	Brothers	VUS
				<i>SEMA3C</i>	11	g.1009 G>A	p.V337M	P	0	1		VUS
<i>GEMIN2</i>				1	g. 133 C>A	p.P45T	P	0.22	1	VUS		
7_11'	F	TCA	<i>NTRK1</i>	7	g.824 A>C	p.E275A	P	0.048	0.952	Daughter	VUS	
			<i>SEMA3C</i>	11	g.1009 G>A	p.V337M	M <sup>7</sup>	0	1		VUS	
8_15'	M	L-HSCR	<i>NTRK1</i>	7	g.824 A>C	p.E275A	U	0.048	0.952	Father	VUS	
Sporadic	9_4	F	Skip*	<i>LICAM</i>	18	g.2155 del G	p.V719fs	N <sup>8</sup>				Patho
	10_9	M	TCA	NA								
	11_16	M	TCA	NA							Twin B*	

12_24	M	TCA	<i>RET</i>	3	g.341 G>A	p. R114H	P	0.12		VUS
13_32	F	TCA	<i>NRG1</i>	2	g.235 C>T	p.R79X	N			Patho
14_44	M	TCA	<i>NTRK1</i>	7	g.568 C>T	p.R190W	M	0.01	0.994	VUS
			<i>EDNRB</i>	3	g.823 G>A	p.V275M	M	0	1	VUS
15_51	M	TCA	<i>RET</i>	11	g.2066 del C	p.S689fs	N			Patho
16_64	F	TCA	<i>SEMA3C</i>	11	g.1009 G>A	p.V337M	P	0	1	VUS
17_75	M	TCA	<i>SEMA3C</i>	11	g.1009 G>A	p.V337M	U	0	1	VUS
18_103	F	TCA	NA							
19_111	M	L-HSCR	NA							
20_116	M	L-HSCR	NA							
21_124	M	L-HSCR	NA							
22_12'	M	L-HSCR	NA							
23_27'	M	TCA	<i>RET</i>	2	g.169C>T	p.R57W	M	0	0.999	VUS
24_38'	M	TCA	<i>PROKR1</i>	2	g.1135A>G	p.I379V	M	0.027	0	VUS
25_40'	F	TCA	<i>EDN3</i>	1	g.49G>A	p.A17T	P	0.145	0.998	VUS
26_48'	M	TCA	<i>NRG1</i>	1	g.300_302 del	p.100_101del				VUS
			<i>SEMA3A</i>	11	g.1243C>T	p.P415S		0	1	VUS





			<i>DNMT3B</i>		g.317G>A	p. R106Q		0.012	0.196	VUS
27_54'	F	L-HSCR	<i>EDN3</i>	1	g.49G>A	p.A17T	P	0.145	0.998	VUS
28_68'	M	TCA	<i>PROKRI</i>	2	g.1135A>G	p.I379V	P	0.027	0	VUS
29_74'	M	TCA	<i>PROKRI</i>	2	g.1135A>G	p.I379V		0.027	0	VUS
			<i>PAX3</i>	8	g.1375A>C	p.S459C	M	0.001	0.98	VUS
			<i>SEMA3D</i>	9	g.713A>C	p.K238T	P	0.476	0.997	VUS
			<i>EDNRB</i>	2	g.553G>A	p.C185M	P	0.053	1	VUS
30_80'	F	L-HSCR	<i>RET</i>	13	g.2348A>G	p.N783S		0.372	0.997	VUS
			<i>DNMT3B</i>	14	g.1516G>A	P. V506I		0.738	0.01	VUS
31_84'	M	TCA	<i>EDNRB</i>	2	g.553G>A	p.C185M		0.053	1	VUS
			<i>NRTN</i>	2	g.560A>C	p.H187P		0.456	0	VUS
			<i>TTF1</i>	2	g.931C>T	p.R311W		0.087	0	VUS
32_91'	M	L-HSCR	<i>NTRK1</i>	6	g.658C>T	p.220W		0.008	0.873	VUS
			<i>NTRK1</i>	8	g.968A>G	p.N323S		0.555	0.015	VUS
			<i>NTRK3</i>	1	g.61G>T	p.V21F		0.082	0.13	VUS
33_105'	M	L-HSCR	<i>RET</i>	3	g.341G>A	p.R114H		0.117	0.001	VUS
			<i>CYP2B6</i>	7	g. 1138T>C	p.Y380H		0.017	0.617	VUS

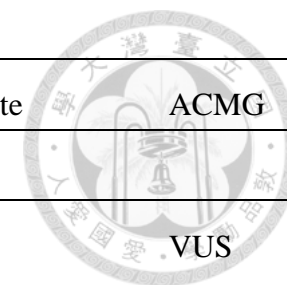


34_107'	M	L-HSCR	NA								
35_110'	M	TCA	<i>EDNRB</i>	1	g.268T>C	p.C90R		0.001	1		VUS
			<i>CYP2B6</i>	2	g.273G>C	p.K91N		0.25	0		VUS
36_116'	F	TCA	<i>RET</i>	5	g.905A>G	p.D302G		0.005	0.899		VUS
			<i>ARTN</i>	4	g.281C>G	p.S94C		0.019	0.924		VUS
37_125'	M	TCA	<i>RET</i>	10	g.2058 del	p.623 fs	N				Patho
38_126'	F	TCA	NA								
39_10''	M	TCA	<i>RET</i>	3	g.475T>C	p.S159P		0.007			VUS

1. 家族性患者中，同底色來自同一家族。
2. 縮寫說明：<sup>1</sup>AA 為 Amino Acid；<sup>2</sup>P 為 Paternal；<sup>3</sup>VUS 為 Variant of Unknown Significance；<sup>4</sup>fs 為 frameshift；<sup>5</sup>Patho 為 Pathogenic；<sup>6</sup>U 為 unknown；<sup>7</sup>M 為 Maternal；<sup>8</sup>N 為 De Novo mutation
3. Origin 空白代表有父母檢體但尚未完成 PCR 確認 variant 來源

表五 短型患者基因定序結果

No_ID	Sex	Gene	Exon	Variant	AA <sup>1</sup> change	Origin	SIFT	Polyphen2	Note	ACMG	
Sporadic cases	1_1	M	<i>SEMA3C</i>	11	g.1009 G>A	p.V337M	P	0	1		VUS
	2_13	M	NA								
	3_25	M	<i>RET</i>	3	g.341 G>A	p. R114H	P	0.12			VUS
	4_28	M	<i>RET</i>	3	g.341 G>A	p. R114H	M	0.12		Maternal	VUS
			<i>SEMA3C</i>	11	g.1009 G>A	p.V337M	M	0	1	Grandfather	VUS
	5_36	M	NA								
	6_54	F	<i>RET</i>	10	g.1858 T>C	p.C620R	N	0.01	0.994		Patho
	7_61	M	<i>RET</i>	19	g.3185 A>G	p.Y1062C	M	0	1		Patho
			<i>SEMA3C</i>	11	g.1009 G>A	p.V337M	P	0	1		VUS
	8_67	M	<i>SEMA3C</i>	11	g.1009 G>A	p.V337M	M	0	1		VUS
	9_71	M	<i>KIAA1279</i>	1	g.367 C>T	p.R123W	U	0.01	0.153		VUS
	10_77	F	<i>EDN3</i>	1	g.49 G>A	p.A17T	M	0.145	0.998		VUS
11_81	M	<i>EDNRB</i>	7	g.1212 G>A	p.W404X	M				Patho	
12_84	F	NA									







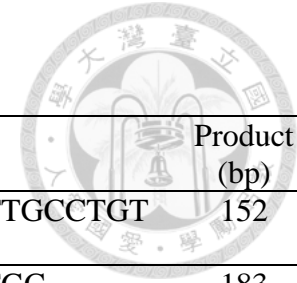
13_87	M	<i>CYP2B6</i>	1	g.64 C>T	p.R22C	P	0	0.981	
14_97	M	<i>RET</i>	10	g.1859 G>C	p.C620S	P	0.08	1	
		<i>CYP2B6</i>	1	g.64 C>T	p.R22C	M	0	0.981	
15_98	M	<i>ZEB2</i>	7	g.1345delA	p.R449fs	N			
16_107	M	<i>NRTN</i>	2	g.289 C>G	p.R97G	U	0.042	0.814	VUS
17_117	M	<i>SEMA3C</i>	11	g.1009 G>A	p.V337M	M	0	1	VUS
		<i>GEMIN2</i>	1	g.133 C>A	p.P45T	P	0.22	1	VUS
18_120	M	NA							
19_127	M	NA							
20_131	M	NA							
21_01'	F	<i>PROKRI</i>	2	g.985 T>A	p.C329S	M	0.023	0.137	VUS
		<i>NRTN</i>	2	g.374 T>C	p.V125A	U	0.001	0.963	VUS
22_04'	M	NA							
23_07'	M	NA							
24_21'	M	<i>NRG1</i>	2	g.152C>T	p.S51F	P	0.007	0.999	VUS
		<i>KIAA1279</i>	1	c.367C>T	p.R123W		0.014	0.978	VUS
25_24'	F	<i>PROKRI</i>	2	g.1135A>G	p.I379V	P	0.027	0	VUS



26_30'	M	<i>EDN3</i>	2	g.142_165del	p.48_55del	U				
27_33'	M	NA								
28_45'	M	<i>PROKRI</i>	2	g.1135A>G	p.I379V	P	0.027	0		
29_51'	M	NA								
30_58'	M	NA								
31_63'	F	<i>EDNRB</i>	3	g.757C>T	p.R253X	N				Patho
32_71'	M	<i>NRG1</i>	7	g.609C>A:	p.N203K	M	0.237	0.999		VUS
		<i>EDNRB</i>	2	g.553G>A	p.V185M	P	0.053	1		VUS
33_77'	M	<i>PROKRI</i>	2	g.1135A>G	p.I379V	M	0.027	0		VUS
		<i>SEMA3C</i>	11	g.1009 G>A	p.V337M	M	0	1		VUS
34_87'	M	NA								
35_94'	M	<i>BDNF</i>	1	g.157T>C	p.S53P		0.001	0.001		VUS
		<i>TTF1</i>	2	g.873G>C	p.L291F		0.073	0.939		VUS
36_98'	F	NA								
37_101'	M	<i>EDN3</i>	1	g.49 G>A	p.A17T		0.145	0.998		VUS
38_104'	F	NA								
39_113'	M	<i>EDNRB</i>	2	g.553G>A	p.V185M		0.053	1		VUS



40_119'	M	<i>ZEB2</i>	7	g.1932G>T	p.E644D		0.075	0.137	VUS
41_122'	M	<i>CYP2B6</i>	7	g.1169T>A	p.I382N		0		VUS
42_129'	M	NA							
43_01''	M	NA							
44_04''	M	<i>SOX10</i>	4	g.708A>C	p.H236Q	P	0.886		VUS
		<i>ECE1</i>	1	g.3C>T	p.M1I	M	0		VUS
45_07''	M	<i>GDNF</i>	3	g.400A>G	p.Y134H		0		VUS

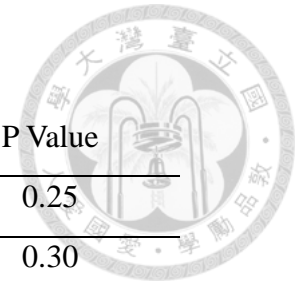


表六 MGP\_FVBNJ\_ *Llcam* 不同轉錄產物使用的 primer

Transcripts (Abbreviation)	Size (bp)	Protein (aa)	變異點	Primer_ Forward	Primer_ Reverse	Product (bp)
T0095949.1 (T49)	5153	1255	Y	CACTCTGCTGTGCTCCTGTC	CATTTCTAGGTTTTTATTTGCCTGT	152
T0095950.1 (T50)	5129	1259	Y	ACTGAGACTGAGCTGGCAAC	AGCATCACGACCATCTTGC	183
T0095951.1 (T51)	4116	1250	Y	CCAGACGAATTGCTAGAGCC	AAGCTGTTGTTGCCTTCGAT	227
T0095961.1 (T61)	595	83	N	GGGTGAGTGGAATCTGGCTA	TGGCTCTAGCACATGGTGTC	157
T0095958.1 (T58)	570	189	Y	AGGACAAGGAAATGGCTCCT	TGTTGGTCTCATTCCCTTCC	231
T0095953.1 (T53)	466	144	N	GAGACCTTCGGCGAGTACAG	AACTGTCATTGCCTCCTGCT	208
<i>Gapdh</i>				ACTCCACTCACGGCAAATTC	TCTCCATGGTGGTGAAGACA	

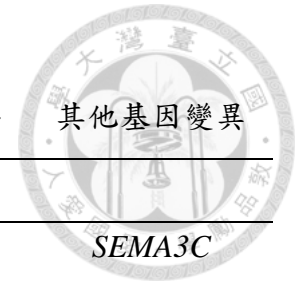
表七 Isperm 小鼠精液分析

	Wild type (n=3)	L1cam <sup>emfs1</sup> (n=8)	P Value
Sperm Concentration (million/ ml)	38.05 ± 7.28	44.13 ± 13.94	0.25
Motile (%)	12.8 ± 11.17	8.85 ± 4.79	0.30
VAP_Average path velocity (um/s)	16.91 ± 3.79	16.47 ± 4.15	0.84
VCL_Curvilinear velocity (um/s)	20.79 ± 3.63	20.16 ± 4.62	0.79
VSL_Straight line velocity (um/s)	12.76 ± 3.23	10.83 ± 4.56	0.40
LIN_Linearity (%)	65.55 ± 4.25	65.44 ± 15.51	0.99
STR_Righteousness movement(%)	56.86 ± 11.46 5	52.0 ± 7.55	0.30



表八 *RET* exon 3: c.G341A:p.R114H 在病人及家屬中的表現

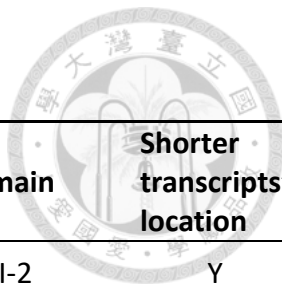
	病患	性別	父親	母親	姊妹	兄弟	其他基因變異
短型	3_25	男	V				
	4_28	男		V			<i>SEMA3C</i>
全大腸型	12_24	男	V		V		
長型	33_105'	男					<i>CYP2B6</i>



表九 *SEMA3C* exon 11: c.G1009A: p.V337M 在病人及家屬中的表現

	病患	性別	父親	母親	姊妹	兄弟	其他基因變異
長型	5_57	男	V			V_60	<i>NRG1</i>
	6_60	男	V			V_57	<i>NRG1</i>
	16_64	女	V				
	17_75	男	?	?	V		
	7_11'	女		V			<i>NTRK1</i>
短型	1_1	男	V				
	4_28	男		V		V	<i>RET</i>
	6_61	男		V			<i>RET</i>
	8_67	男		V			
	17_117	男		V			<i>GEMIN2</i>
	33_77'	男		V			<i>PROKR1</i>

表十 L1 症候群伴隨先天性巨大結腸症的案例報告統計



Case Reference	Mutations	Protein change	Location	Domain	Shorter transcripts' location
Okamoto (Okamoto, Wada, and Goto 1997)	c.2421_2422 delTG	p. Gly808Argfs9X	Exon 18	FnIII-2	Y
Vits (Vits et al. 1998)	c.1895G > C	p. Arg632Pro	Exon 15	FnIII-1	N <sup>a</sup>
Parisi (Parisi et al. 2002)	c.2254G > A	p. Val752Met	Exon 18	FnIII-2	Y
Hofstra (Hofstra et al. 2002)	IVS5+6 T > G		Intron 5		N
Okamoto (Case 1&2) (Okamoto et al. 2004)	IVS15+5 G > A		Intron 15		Y
Okamoto (Case 3) (Okamoto et al. 2004)	c.2974C > T	p. Gln992Stop	Exon 22	FnIII-4	N
Basel-Vanagaite (case 1) (Basel-Vanagaite et al. 2006)	c.719C > T	p.Pro240Leu	Exon 7	Ig-3	N
Tegay (Tegay et al. 2007)	Xq28 microdeletion				Y
Nakakimura (2008)	c.92T > C	p.Val31Ala	Exon 3	N-terminus	Y
Jackson (2009)	c.1672C > T	p.Arg558X	Exon 13	Ig-6	Y
Griseri (2009)	c.2265delC	p.Pro756Leufs95X	Exon 18	FnIII-2	Y
Fernandez (2012)	c.2092G > A	p.Gly698Arg	Exon 16	FnIII-1	Y
Takenouchi (2012)	c.61C > T	p.Gln21X	Exon 1	N-terminus	Y
Yang (2019)	c.2155delG	p.Val719fs3X	Exon 18	FnIII-2	Y
Gauntner (2021)	c.934T > C	p. Gly808Argfs9X	Exon 8	Ig-3	N

## 附件:修業期間相關發表論文



1. **Yang, W.**, S. C. Chen, J. Y. Lai, Y. C. Ming, J. C. Chen, and P. L. Chen. 2019. 'Distinctive genetic variation of long-segment Hirschsprung's disease in Taiwan', *Neurogastroenterol Motil*, 31: e13665.
2. **Yang, W.**, S. C. Chen, T. E. Wang, P. S. Tsai, J. C. Chen, and P. L. Chen. 2023. 'L1cam alternative shorter transcripts encoding the extracellular domains were overexpressed in the intestine of L1cam knockdown mice', *Gene*, 881: 147643.