

陽性線維も対照と同様に発達したが、前頭葉皮質の神経細胞は成人期に、Purkinje細胞は新生児期から成人期まで一貫して、対照に比べ強い免疫反応性を呈した。また、小脳顆粒細胞層では乳幼児期に対照よりも速い発達を示した。老人斑では、DSCAM 免疫反応性はしばしば老人斑の周辺の神経突起に認められ、また時には、そのcoreの中心部やcore内部に認められた。

#### D. 考察

髄鞘形成は神経伝達を促進し、知的発達にも大きく関与するが、過剰発現の研究はほとんどない。発達期の虚血性壊死のあとに、髄鞘の過剰形成が起こり、大理石斑紋が知られている。DSにおける髄鞘形成の異常を詳細に調べた研究はない。21番染色体DS責任領域にあるDSCAMが髄鞘形成に関与するという事はDSの発達障害に重要な意味をもつ。

Western blotting の3本のバンドは、ヒトのみならず、マウスやラット脳では、いずれもDSCAM遺伝子産物と考えられた。190 kDa のバンドは加齢とともに強くなり、免疫組織化学における白質の免疫反応性の変化と一致している。成熟に伴い発現が増強するDSCAM 分子の主成分と推測された。白質および皮質内線維における発現は軸索周囲に存在し、髄鞘形成と共に増加した。このDSCAM の軸索周囲局在はtorpedoやspheroidでも確認された。DS脳における発現の増強、また老人斑とのトポグラフィカルな関係が確認され、DSにおける精神遅滞の病態にDSCAM が関与していることが示唆された。今後、軸索伸展、シナプス形成や軸索修復、老人斑形成における同分子の役割の解明が期待される。

#### E. 結論

21番染色体、DS責任領域に遺伝子が確認

されたDSCAM 蛋白はダウン症候群では若年では髄鞘に過剰発現し、DSにおける生後の精神運動発達遅滞やシナプス形成の低下に関与していると考えられた。

#### F. 研究発表

- 1) Obonai T, Mizuguchi M, Takashima S : Developmental and aging changes of Bak expression in the human brain. *Brain Res* 783:167-170, 1998
- 2) Oka A, Kurachi Y, Mizuguchi M, Hayashi M, Takashima S: Expression of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN2) gene product in human brains. *Neuroscience Letters* 256:1-3, 1998
- 3) Takashima S, Mizuguchi M, Arii N: Neuronal migration disorder: expression of gene products in the neocortex. *Neuropathology* 18:427-432, 1998
- 4) Oka A, Takashima S: Induction of cyclo-oxygenase 2 in brains of patients with Down's syndrome and dementia of Alzheimer type: specific localization in affected neurons and axons. *NeuroReport* 8: 1161-1164, 1997
- 5) Arai Y, Suzuki A, Mizuguchi M, Takashima S: Developmental and aging changes in the expression of amyloid precursor protein in Down syndrome brains. *Brain Dev* 19:290-294, 1997
- 6) Arai Y, Uchida Y, Takashima S: Developmental immunohistochemistry of growth inhibitory factor in normal brains and brains of patients with Down syndrome. *Pediatr Neurol* 17:134-138, 1997

## 脳の発達障害に関する遺伝子群を解明するための研究

分担研究者 難波栄二 鳥取大学 遺伝子実験施設

**研究要旨** セロトントランスポーター遺伝子と精神遅滞、自閉症の関連を研究した。まず、セロトントランスポーター遺伝子調節領域の解析において、新しい繰り返し配列多型 (12 アレルと g アレル) を発見した。この多型は非常に稀で、正常日本人にも認められるものであった。精神遅滞と自閉症は ICD-10 に従って正確に診断を行った。これらの症例で検討すると自閉症患者では、LPR は 1 アレルがやや少ない傾向があり、VNTR は 10 アレルがやや多い傾向がみられた。しかしこれらは統計学的には有為でなく、さらに検討が必要と考えられた。

### A. 研究目的

自閉症や精神遅滞の遺伝的背景を検討するために、我々は脳内の neurotransmitter に関連のある遺伝子に注目して association study を進めている。1997 年に米国ならびにドイツから自閉症とセロトントランスポーター遺伝子の関連が報告され注目されている。我々は、この遺伝子の調節領域多型 (LPR) に注目して研究を進めているが、日本人の多型のパターンは欧米人とは異なることを明かにしている。それを基に日本人の自閉症患者ならびに精神遅滞患者の解析をおこなった。また、これらの解析の過程において日本人に独特の多型を発見したので報告する。

### B. 研究方法

ICD-10 に従って診断した自閉症患者 44 例、行動異常を伴わない原因不明の精神遅滞 58 例の末梢血から DNA を分離した。セロトントランスポーター遺伝子はプロモーター領域の多型 (LPR) とイントロン 2 の VNTR 多型 (VNTR) を PCR 法にて解析した。

### C. 研究結果

正常日本人の LPR は、528bp のバンド (1 アレル) と 484bp のバンド (s アレル) が観察され、欧米人に比較して 1 アレルが少なかった。VNTR の数は 12 と 10 のアレルのみで、9 アレルは検出されず、12 アレルが多い傾向であった。自閉症患者では、LPR は 1 アレルがやや少ない傾向があり、VNTR は 10 アレルがやや

多い傾向がみられた。これらの差は、統計学的には有為ではなかった。また、これらの患者を含め約 4000 例の日本人の解析を行った結果、1 アレル、s アレルの他に 568bp の 12 アレルと 611bp の g アレルが発見された。12 アレルの頻度は 0.08%、g アレルの頻度は 0.3% であり、ともに稀であった。シーケンス解析の結果、これらのアレルは新しい繰り返し配列を有しており、報告のないものであった。これらの新しい多型は正常人にも認められており、疾患との関連は明かではなかった。

### D. 考察

セロトントランスポーター遺伝子は、一度放出されたセロトニンの吸収に関連しており、その調節領域の多型は Anxiety-related traits や自閉症と関連していることが報告されている。まず、日本人において稀なポリモルフィズムが発見された。現在までに 1 アレル、s アレルとより長い XL アレルの報告がなされていた。この XL アレルは、12 アレルと繰り返し配列の長さは似ていたが、塩基配列が一部異なっており、12 アレル、g アレルともに新しい多型と判明した。今回発見されたアレルは非常に稀であり、他の民族の検討も必要になる。また、疾患との関連を今後検討してゆく予定である。

自閉症と精神遅滞は、ICD-10 の診断基準に従って厳密に分類した症例で検討した。自閉症ではやや特徴のある傾向が見られたが、有為でなかったためにさらに症例を増やして検討する必要がある。また患者家族の協力を得

て、transmission disequilibrium test (TDT) も行ってゆきたい。

1998年7月1日・2日  
福岡

#### E. 結論

セロトニントランスポーター遺伝子の調節領域の新しいポリモルフィズムを発見した。日本人精神遅滞、自閉症との関連はさらに検討を要する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Saji M, Kimura M, Maki H, Nakayama K, Nomura T, Nanba E, Ohno K. Tuberous sclerosis 2 gene is expressed at high levels in specific types of neurons in the mouse brain. Yonago Acta medica 1998; 41: 55-63

Ichisaka S, Ohno K, Yuasa I, Nanba E, Sakuraba H, Suzuki Y. Increased expression of  $\beta$ -hexosaminidase  $\alpha$  chain in cultured skin fibroblasts from patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. Brain and Development 1998; 20:302-306.

Murakami F, Shimomura T, Kotani K, Ikawa S, Eiji Nanba, Kaori Adachi. Anxiety traits associated with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region in the Japanese J Hum Genet 1999;44 (1):15-17

Haidi Zhang, Toshiyuki Yamamoto, Eiji Nanba, Yukisato Kitamura, Tadashi Terada, Shinjiro Akaboshi, Isao Yuasa, Kyoichi Ohtani, Shu Nakamoto, Kenzo Takeshita, Kousaku Ohno  
A novel TSC2 Mutation in a Patient With Pulmonary Tuberous Sclerosis: Lack of LOH in a Lung Cyst.  
Am J Med Genet (in press)

##### 2. 学会発表

第5回日本遺伝子診療学会

主任研究者 新井 一 順天堂大学脳神経外科 助教授

研究要旨 ラット羊膜細胞は神経細胞様に分化誘導されることが明らかとなり、神経再生あるいは神経保護を目的とした神経移植治療のドナー細胞となる可能性が示唆された。

#### 分担研究者

屋田 修 順天堂大学脳神経外科 講師  
大川英徳 順天堂大学医学研究科 大学院生  
荻野郁子 順天堂大学脳神経外科 私設技術員

#### A.研究目的

ヒト羊膜細胞は抗原性が微弱なため、これを同種間移植に用いても急性拒絶が生じにくい。また、本細胞は外胚葉由来ではあるが、幹細胞としての特性を有しており様々な細胞へ分化する可能性が指摘されている。今回、我々はラット羊膜より初代培養細胞を樹立し、これを神経様細胞へ分化誘導せしめることを試みた。さらに、これらの細胞を用いて脳内移植実験を行い、神経移植治療のドナー細胞として羊膜細胞を活用しうるかについても検討した。

#### B.研究方法

妊娠WisterラットE17、18の羊膜より初代培養細胞を樹立、これを10% FCS/ D-MEMと B27/Neurobasal Medium(GIBCO)の2種類の培養液を用いて培養した。培養1週間後にそれぞれの細胞を、神経細胞および神経膠細胞のマーカーに対する抗体を用いて免疫染色した。また同時に、これらの細胞の細胞周期解析をフローサイトメトリーを用いたDNA含量測定により行った(FACS Vantage, ModFit LT)。さらに、B27/Neurobasal Mediumで培養した羊膜細胞については、培養開始4日後の細胞を正常ラット脳および一過性虚血後の砂ネズミ脳海馬CA1領域に定位的に移植した。

#### C.研究結果

10% FCS/D-MEMで培養したラット羊膜細胞は、平板な形態を呈し敷石状に配列するが、B27/Neurobasal Mediumで培養すると、数本の長い突起を有する細胞質の小さな細胞が網目状の配列した。免疫染色の結果は、10%FCS/D-MEMで培養した細胞はTyrosine hydroxylase (TH), GFAPに陽性、Neurofilament(NF)に陰性となったが、B27/Neurobasal MediumではMAP-2, Synaptophysin, TH, ChAT, NFいずれも陽性、GFAPには陰性となった。細胞周期解析の結果は、10% FCS/D-MEMで培養した細胞では、G1-G0期 52.43%、G2-M期 5.96%、S期41.6%となり、一方、B27/Neurobasal Medium ではG1-G0期 85.58%、G2-M期 0%、S期 14.42%となった。すなわち、ラット羊膜細胞をB27/Neurobasal Mediumで培養す

ると、細胞分裂が停止状態になることが明らかとなった。正常ラット脳へ羊膜細胞を移植すると、その後8週間にわたり生着することが確認された。さらに一過性脳虚血負荷を加えた成雄砂ネズミの海馬CA1領域に移植した羊膜細胞はより長期間にわたり生着し、一部の移植細胞は神経細胞様に形態変化することが確認された。

#### D.考察

羊膜細胞をB27/Neurobasal Mediumで培養すると、細胞増殖は停止し、形態学的さらには免疫染色上も神経細胞様に分化する可能性が示唆された。現在、培養羊膜細胞の微細構造を電子顕微鏡を用いて、さらに電気生理学的および分子生物学的手法を用いてその機能特性を同定中である。また、実験動物の脳内に移植した羊膜細胞については、免疫組織学的にその細胞特性を明らかにしているところである。将来的には、羊膜細胞に任意の遺伝子を導入し、これを各種神経栄養因子や神経伝達物質の産生細胞とした上で、脳内移植実験を行っていく予定である。

#### E.結論

ラット羊膜細胞は多能性神経幹細胞としての特性を有し、神経移植治療のドナー細胞となりうる可能性が示唆された。

#### F.研究発表

##### 論文発表

- 1) ラット羊膜細胞における神経細胞様分化の誘導とその脳内移植、屋田 修、大川英徳、新井 一、佐藤 潔、桜川宣男 神経組織の成長・再生・移植 Vol 10, No1, 1998

##### 学会発表

- 1) ラット羊膜細胞における神経細胞様分化の誘導とその脳内移植、屋田 修、大川英徳、新井 一、佐藤 潔、桜川宣男 神経組織の成長、再生移植研究会 第13回学術集会 (1998.6.6)
- 2) ラット羊膜細胞の神経細胞様分化の誘導とその脳内移植、屋田 修、大川英徳、新井 一、佐藤 潔 第57回 日本脳神経外科学会総会 (1998.10.14~16)
- 3) 一過性前脳虚血モデルへの培養ラット羊膜細胞の脳内移植、大川英徳、屋田 修、新井 一、佐藤 潔 第10回 日本脳循環代謝学会総会 (1998.11.17~18)

