

厚生科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業

難治性水頭症調査研究班

平成11年度研究報告書

Annual Report of the Research Committee
of "Intractable Hydrocephalus"
The Ministry of Health and Welfare of Japan, 1999

平成12年3月

March 2000

主任研究者 山崎麻美

Chairman : Mami Yamasaki, M.D.

厚生科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業

難治性水頭症調査研究班

平成11年度研究報告書

Annual Report of the Research Committee
of “Intractable Hydrocephalus”
The Ministry of Health and Welfare of Japan, 1999

平成 12 年 3 月

March 2000

主任研究者 山崎麻美

Chairman: Mami Yamasaki, M.D.

難治性水頭症調査研究班 構成員名簿

区 分	氏 名	所 属 施 設	職 名
主任研究者	山崎麻美	国立大阪病院 脳神経外科	医 長
分担研究者	有田憲生	兵庫医科大学 脳神経外科	教 授
	岡野栄之	大阪大学大学院医学系研究科 神経機能解剖	教 授
	岡本伸彦	大阪府立母子保健総合医療センター 企画調査部	主 幹
	上口裕之	理化学研究所 脳科学総合研究センター	上級研究員
	佐藤博美	静岡県立こども病院 脳神経外科	医 長
	中川義信	国立療養所香川小児病院 脳神経外科	医 長
	中村康寛	聖マリア病院 病理部	部 長
	秦利之	香川医科大学 母子科学講座周産(生)学	教 授
	原嘉信	東京医科歯科大学 疾患遺伝子実験センター 分子神経変性研究部門	助 教 授
	伏木信次	京都府立医科大学付属脳・血管系老化研究センター病態病理部門	教 授
	森竹浩三	島根医科大学 脳神経外科	教 授
研究協力者	高橋義男	北海道道立小児総合保健センター 脳神経外科	医 長
	林隆士	聖マリア病院 脳神経センター	副 院 長
	森本一良	大阪府立母子保健総合医療センター 脳神経外科	部 長
	山下伸子	名古屋市立東市民病院 脳神経外科	副 部 長
	(特定疾患の疫学に関する研究班)	玉腰暁子	名古屋大学医学部予防医学教室
(事務局) 経理事務連絡担当責任者	奥田小百合	国立大阪病院 脳神経外科 〒545-0006 大阪市中央区法円坂2-1-14 TEL(06)6942-1331(3321) FAX(06)6943-3437	

目 次

平成11年度総括研究報告	1
--------------	---

国立大阪病院 脳神経外科
主任研究者 山崎 麻美

I. 基礎・病理部門

1. 神経接着分子L1の細胞内局在異常 —細胞生物学的解析およびX連鎖性遺伝性水頭症の2例の報告—	9
--	---

理化学研究所脳科学総合研究センター¹、国立大阪病院脳神経外科²、
聖マリア病院病理部³、大阪大学大学院医学系研究科脳神経外科⁴、佐賀医科大学病理⁵、
上口 裕之¹、山崎 麻美²、中村 康寛³、金村 米博⁴、泉本 修一⁴、
宮原 晋一⁵

2. ノックアウトマウスを用いたMusashi1(Msi1)の機能および水頭症発症機序の解析	16
--	----

大阪大学大学院医学系研究科 神経機能解剖¹ 同 第一解剖²、東大医科研病理学研究部³、
癌研究所細胞生物⁴、東北大学医学部⁵、科学技術振興事業団CREST⁶、
榊原 伸一^{1,6}、中村 由紀¹、小池 正人²、高野 洋志^{4,5}、佐藤 均³、
内山 安男²、野田 哲生^{4,5}、岡野 栄之^{1,6}

3. NMHC-Bミオシン遺伝子欠損マウスの水頭症発症機序	26
-------------------------------	----

東京医科歯科大学 疾患遺伝子実験センター 分子神経変性研究部門
原 嘉信、原 由紀子

4. 胎生期正常脳発育におけるRadial fiberの免疫組織化学的検討	30
---------------------------------------	----

聖マリア病院病理部¹、久留米大学化学²
中村 康寛¹、山本 統彦²、熊丸えり子²

5. 正常胎児、新生児脳におけるL1、MSI1発現様式の免疫組織学的検討	35
--------------------------------------	----

大阪大学大学院医学系研究科脳神経外科¹、国立大阪病院臨床研究部²、国立大阪病院
脳神経外科³、聖マリア病院病理部⁴、大阪大学大学院医学系研究科 神経機能解剖⁵
金村 米博^{1,2}、山崎 麻美³、中村 康寛⁴、榊原 伸一⁵、岡野 栄之⁵

II. 遺伝子解析部門

1. L1CAM異常によるX-linked hydrocephalusの遺伝子解析	39
---	----

大阪府立母子保健総合医療センター企画調査部
岡本 伸彦

2. 水頭症バンク設立の経過と遺伝子解析	43
国立大阪病院 脳神経外科 ¹ 、臨床研究部 ² 、兵庫医大脳神経外科 ³ 山崎 麻美 ¹ 、金村 米博 ² 、森 鑑二 ³ 、有田 憲生 ³	

Ⅲ. 臨床部門

1. 高周波細径プローブを用いた子宮腔内超音波法による妊娠早期(6-9週)の胎芽脳胞計測.....	57
-妊娠早期の中樞神経系異常の出生前診断をめざして- 香川医大・母子科学講座周産(生)期学 田中 宏和、秦 利之	
2. 当科における水頭症を中心とした中枢神経系奇形の出生前診断の最近の動向	61
香川医科大学母子科学講座周産(生)期学 柳原 敏宏、秦 利之	
3. Dandy-Walker 症候群の臨床的検討	65
静岡県立こども病院脳神経外科 佐藤 博美、佐藤 倫子	
4. 水頭症患児に併発したてんかんその臨床像および脳波学的特徴の検討	69
国立療養所 香川小児病院 脳神経外科 西山 逸子、夫 敬憲、中川 義信	
5. Spinal dysraphismを除く脳奇形を伴う水頭症症例の長期予後	74
聖マリア病院脳神経外科 林 隆士、古川 義彦、下川 尚子	

Ⅳ. 臨床部門

1. 先天性水頭症の全国疫学調査	77
島根医科大学脳神経外科 ¹ 、名古屋大学医学部予防医学教室 ² 、 香川医科大学母子科学講座周産(生)期学 ³ 、京都大学保健管理センター ⁴ 、 順天堂大学医学部衛生学 ⁵ 、国立大阪病院脳神経外科 ⁶ 森竹 浩三 ¹ 、玉腰 暁子 ² 、秦 利之 ³ 、川村 孝 ⁴ 、 稲葉 裕 ⁵ 、山本 佳昭 ¹ 、山崎 麻美 ⁶	

研究成果の刊行に関する一覧表	83
----------------------	----

平成11年度研究成果報告

主任研究者 山崎麻美

はじめに

厚生省水頭症研究班は、昭和53年に森安信雄班長によって特発性脳室拡大調査研究班として成人の正常圧水頭症を研究対象に始められたものである。昭和59年より松本悟班長に引き継がれ研究対象を全年齢に拡大した。昭和62年には菊池晴彦班長が、難治性要因を最も多く抱えていると思われる胎生期～乳児期に発症する先天性水頭症を主な研究対象として新たな班会議を発足された。平成2年度は乳児期発症の水頭症における難治性要因の予防除去を目的として菊池班の第2次として発足した。また成人の正常圧水頭症との比較も行った。平成4年度から森惟明班長のもとで再び小児に限定せずすべての年齢層に発症する水頭症を対象として難治性水頭症の分類と診断基準の作成にも着手された。この20年以上の水頭症研究の歴史の中で、着手され明らかにされてきたことは膨大であり、又未解決の問題も多くある。そのすべてを国立病院の一臨床医が引き受けるというのはあまりに重責でおこがましい限りである。しかしながら今回主任研究者となる機会をいただいたので、これまでの歴史を損なうことなく、水頭症という難病に悩む患者・家族・医療従事者に少しでも貢献できるように、21世紀の水頭症研究の幕開けとして本研究班の活動を開始した。

研究目標

平成11年度を初年度とする本研究班は、その研究テーマを先天性水頭症における分子生物学的メカニズムの解明と治療法開発と設定した。研究対象は、森班の中で明らかにされた分類に従えば、当面は胎児性水頭症と先天性水頭症に限り、これらの水頭症に分子生物学的手法でアプローチすることから開始した。先天性水頭症は現在胎生期に早期診断することが可能となり、出生後早期の短絡術によって治療成績も改善している。しかし精神運動発達遅滞など重篤な合併症を残す難治性で、予後の極めて不良な水頭症も少なくない。多くの先天性疾患において分子生物学的メカニズムが解明され、すでに臨床レベルで遺伝子診断法が確立した疾患や、遺伝子治療への応用の試みが開始されている疾患もある。しかしながら水頭症の原因は多因子であるとされ、このようなアプローチが遅れてきた疾患のひとつである。水頭症研究の中にこの分子遺伝子学的手法を取り入れ、新たな展開を築き、病態解明・診断法の確立のみならず新たな治療法の可能性まで追求していくことを研究目標としている。

研究方法

1992年X染色体劣性遺伝性水頭症の1家系に神経細胞接着因子L1遺伝子異常が発見されたことに端を発して、先天性水頭症における分子遺伝子学的メカニズム解明の研究は始まった。また一方では神経発生に重要ないくつかの分子のノックアウトマウスで、水頭症を発症してることが明らかになっている。哺乳類初期発生において中枢神経系未分化幹細胞において強く発現しているRNA結合蛋白質であるMusashi1 (Msi1) の遺伝子欠損マウス、神経上皮細胞の接着・移動・分裂・分化に関わるnonmuscle myosin heavy chain-B (NMHC-B) 遺伝子ノックアウト

トマウス、白質のミエリン化の異常を示すGFAP遺伝子ノックアウトマウス、くも膜下顆粒の発育形成不全によるforkhead/winged helix遺伝子Mf1ノックアウトマウス、脈絡叢細胞の脳脊髄液過剰産生を示す基本転写因子E2F-5遺伝子ノックアウトマウス、また癌抑制因子p53と高い相同性をもつp73ノックアウトマウスなどが水頭症を発症することが報告されている。

このように水頭症発生のメカニズムを遺伝子レベルで解明していく手がかりは、ここ数年来蓄積してきている。現在、水頭症の病態解析のアプローチとして、重要な点が2つあると思われる。ひとつは散逸しがちな、稀少難病である先天性水頭症の臨床データ集積および遺伝子バンクの形成である。そして今1つは立場の違う基礎や臨床の研究者が有機的に結合し、情報交換のみならず班内共同研究を組み、研究成果をあげていくことである。ノックアウトマウスの解析・候補分子の抗体を用いた免疫組織化学的研究・細胞生物学的手法などを駆使して水頭症発症の分子メカニズムを解析していく。それらを基礎とした先天性水頭症の全国疫学調査を展開し、症例の多い施設を中心とした水頭症症候群の臨床データの分析をすすめていくことなどを目標に研究を開始した。

研究成果

I. 基礎部門

基礎部門は、水頭症を起こすことが明らかになっている3種類の分子L1、Musashil (Msil)、nonmuscle myosin heavy chain-B (NMHC-B)についてそれぞれ研究成果が報告された。

神経接着分子L1CAM

神経系に発現する接着分子は、インテグリンファミリー、カドヘリンファミリーおよび免疫グロブリンスーパーファミリーに分類されるが、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する神経接着分子L1は、ヒトでの遺伝子異常が神経奇形の原因となることが知られている接着分子のひとつとして注目されている。

遺伝型と表現型の相関—自験例および報告例の解析

1992年X染色体劣性遺伝性水頭症において、神経細胞接着因子L1遺伝子が発見されて以降、CRASH症候群(X染色体劣性遺伝性水頭症、MASA症候群、X染色体劣性痙性麻痺1型、X染色体劣性脳梁欠損症の4つの症候群をL1遺伝子異常によるひとつの疾患単位という考え方で総称される症候群)の101家系において、94種類のL1遺伝子異常が報告されている。水頭症および精神発達遅滞の重症度と生存率は、L1遺伝子変異の部位・タイプと強い相関があることを山崎らは報告してきた。L1分子細胞内ドメインに限局する遺伝子変異はほとんどが軽症例であり、L1細胞外ドメインでの断裂は最も重症である。L1細胞外ドメインの点変異はそれらの中間である。L1細胞外ドメインを構成するアミノ酸は、ドメインの3次元構造に重要なkey residueとドメイン表面に存在するsurface residueとに分類される。L1細胞外領域のkey residueの点変異はsurface residueの点変異に比べてより重症となる。すなわち、水頭症および精神発達遅滞の重症度と生存率は、L1細胞外のドメイン構造に依存する。しかし、錐体路・脳梁低形成、母指内転屈曲といった神経路の発生異常は、L1遺伝子の変異の部位・タイプとは関係なくほぼ全例に認められる。以上より、L1細胞外領域の機能異常すなわちL1による細胞接着の阻害は、水頭症の発症・増悪と深い関わりがある反面、神経路の発生過程においては、L1による細胞接着のみならずL1細胞内領域を介するシグナル伝達系も重要な役割を担っていることが示唆された。

L1の機能解析

神経細胞膜表面に発現するL1は、隣接する他の神経細胞のL1とホモフィリックに結合することにより、これら細胞同士が接着する。また、軸索同士がホモフィリックなL1-L1結合により線維束を形成し、目的とする組織・細胞へ向かって伸長することも知られている。このようなホモフィリックなL1-L1結合による軸索突起伸長過程の分子機構の解明は、X染色体劣性遺伝性水頭症例の神経路の発生異常を理解する上できわめて重要である。上口らは、L1が数々の細胞内蛋白リン酸化酵素(キナーゼ)を活性化し、またこれらの活性型キナーゼによりL1細胞内領域がリン酸化されることを示した。さらに軸索突起の先端部(成長円錐)において、複雑な細胞内

膜輸送系を介して成長円錐表面のL1の発現量および接着性が制御されうることも示した。このように、L1細胞内領域が関与するシグナル伝達系が解明されつつあり、その神経路発生過程における機能的意義も明らかになりつつある。さらに今回の上口の報告では、L1分子の軸索への輸送(axonal sorting)を制御する分子機構に関する基礎的知見を明らかにしている。変異L1遺伝子を培養神経細胞へ遺伝子導入し、その発現を免疫組織学的に検出し、L1細胞内領域に存在する神経細胞に特異的なRSLE配列(exon 27)が、この直前のtyrosineとともにtyrosine-based motif(YRSLE)を形成し、L1が軸索に発現するのに必要な機能部位であることを見出した。またL1の発現が神経細胞体に限局し、軸索での発現がない細胞内局在異常を示すX染色体劣性遺伝性水頭症2例を示した。しかしながら、この症例ではL1の遺伝子変異が検出できず、L1の軸索へのsortingに関与する他の何らかの蛋白分子の異常が原因となっている可能性が示唆される。L1細胞内領域のYRSLE配列を認識してL1を軸索へsortingする分子群の同定が進めば、このような臨床例での原因遺伝子の解明の糸口となる。

L1ノックアウトマウス解析による水頭症発症機序の解析

L1ノックアウトマウスの解析では、脳室拡大、錐体路低形成による対麻痺、脳梁低形成、小脳虫部低形成、記憶・学習障害といったヒトL1遺伝子変異ときわめて類似した表現型を示すことが明らかになった。髄液流出路の形態解析では、中脳水道が頭尾方向に引き延ばされたような形態を示したが、有意な狭窄・閉塞は認められず、中脳水道閉塞が脳室拡大の直接的な原因とは考えられなかった。L1による細胞接着の阻害と水頭症重症度との関連性から、発生過程にある神経軸索の接着能の低下は、脳組織のコンプライアンスを増大させ、結果として脳室内圧の増大を伴わずして脳室拡大を誘起する可能性が示唆された。そこで、上口らはL1ノックアウトマウスと対照野生型マウスとの間で脳組織コンプライアンスに有意差があるか否かを、Scanning Acoustic Microscopeを用いて解析中である。またL1遺伝子異常による神経奇形の各々の発生機序を理解するために、L1遺伝子に部分的な変異を導入したモデルマウスを作成するプロジェクトを検討中である。

Musashi1 (Msi1)

榊原・岡野らは神経発生過程における細胞の運命決定、特に細胞系譜の決定過程に必要と考えられているMusashi1 (Msi1)の機能解析を行うため*msi1*遺伝子欠損マウスを作製した。その結果、*msi1*欠損ホモ接合体は出生直後より高頻度に水頭症を発症し、重篤な個体は生後1-2ヶ月で死亡することを明らかとした。*msi1*遺伝子欠損マウスの脈絡叢細胞には電顕レベルでの形態異常は認められなかったが、中脳水道上衣細胞には異常な増殖による多層化がみられ、これに伴う中脳水道の狭窄、閉鎖による脳脊髄液の貯留、脳室内圧の上昇、側脳室拡大が考えられた。上衣は通常の上皮細胞と異なり基底膜を有していないため、脳脊髄液が容易に上衣下に拡散し、水頭症の進行に伴って、側脳室前角部から開始される上衣の破綻と上衣下実質の細胞間浮腫の増強、実質欠損が進行し、進行性頭囲拡大を示す水頭症に至ると考えられる。*msi1*は中脳水道部を含む上衣細胞で生後も持続的に強く発現していることから考えても、*msi1*遺伝子がこれらの上衣細胞の正常な分裂、分化、維持に必須の機能を有していることが推定できると報告している。そしてさらに岡野・榊原らは*msi1*相同性を示す新規RNA結合蛋白質*msi2*遺伝子を単離した。*msi*遺伝子ファミリー(*msi1*、*msi2*)が神経初期発生の過程で神経幹細胞の増殖、維持からその後の上衣細胞の分化に至るまで、神経系細胞の正常な増殖、系譜形成に重要な機能を果たしていることが予想される。現在、生体内での役割を明らかにするために、*msi2*遺伝子欠損マウスの作製を開始している。

Nonmuscle Myosin Heavy Chain II-B (NMHC-B)

原嘉・原由らは、Nonmuscle Myosin Heavy Chain II-A (NMHC-A)とNonmuscle Myosin Heavy Chain II-B (NMHC-B)の二つの遺伝子をマウスとヒトから単離し、NMHC-B遺伝子欠損マウスを樹立した。NMHC-Bミオシンが神経系の発生過程で神経上皮細胞の脳室壁膜に強く発現し、その細胞間接着に重要な役割を果たしていることを見出した。またNMHC-B遺伝子異常により神経上皮細胞の増殖、異所性分裂、細胞移動の異常、細胞間接着の阻害による脳室壁の破壊が進行し、細胞塊が脳室内に突出したり、脳深部に塊状に移動し異所性脳室を形成することなどを観察している。また第3脳室後背側部と中脳水道前部で、脳室狭窄、閉塞、融合等が起こり胎生15日から出生直後にかけて側脳室と第3脳室が異常に拡大し、重度の水頭症を発症し死に至る水頭症発症の

機序を詳細に報告している。しかし原らは水頭症発症機序についてこの閉塞だけではなく脳脊髄液の産生異常、脳室壁の絨毛と微絨毛の運動障害、さらには髄液の吸収障害の可能性についても言及し今後の課題を提示している。

II. 病理部門

病理学的研究としては、二つのプロジェクトを開始している。中村らは、水頭症を脳室側、髄液循環側のみからみるのではなく、脳実質の発育から見ていくという視点より脳発育の指標として、胎生期第I～第III期(藤田)まですべての時期に存在するradial fiberに着目した。radial fiberの免疫組織化学的マーカーとしては、nestin, GFAP, vimentinを用い、さらに独自にモノクローナル抗体(KNY-379)を作製した。今年度は正常発育脳(流産・剖検により得た胎齢6週から40週の人胎児及び新生児14例、生後1ヶ月、6ヶ月の乳幼児、5才、14才の小児例、36-82歳の成人例5例の計23例)での免疫組織化学的発現を検討した。その結果、radial fiberのマーカーとしてはvimentinが優れており、GFAPは不適當であった。今回中村らはradial fiberがneuroblastsのmigrationにおいて最も重要な役割を果たす時期を鋭敏に捕らえるために、独自にモノクローナル抗体KNY-379を開発し、その成果を報告している。ヒト脳発育の第III期において、役目を終えたradial fiberが消滅していくのにmarginal zone(M zone)のチロシンリン酸化が関与すると報告されている。KNY-379は第I, II期では、確かにradial fiberの全長で陽性であるが、第III期ではradial fiberと直接関係なくMzoneで強く発現するという特徴を有することより、このような過程に関与している可能性を示唆している。

さらに金村らは、水頭症関連分子L1およびMusashi-1の水頭症発症メカニズムを明らかにするために今年度は正常ヒト胎児脳での発現様式を、免疫組織学的に分析した。同時に神経幹細胞が神経前駆細胞へ分化していく過程で発現してくる別のRNA-binding protein familyに属するHu蛋白についてもその発現様式を検討した。その結果Musashi-1は上衣層から上衣下層に存在する神経幹細胞に発現し、Hu陽性細胞とは相補的な染色性を示した。小脳でも外顆粒層およびプルキンエ細胞層にMSI1陽性細胞が存在し、Huはプルキンエ細胞と内顆粒層の顆粒神経に発現した。L1は大脳皮質分子層(molecular layer)および上衣下層(subventricular zone)直下の深部白質において、脳室壁に平行に走行する形で層状に、さらに小脳では外顆粒層(external granular layer)の内側から小脳分子層にかけて強く発現することを報告している。これらは既に正常マウス胎児脳で報告されている発現パターンにほぼ一致した。今後これら水頭症関連分子のヒト水頭症での発現様式を検討することにより、水頭症発症機序の解明に貢献するものと思われる。

III. 遺伝子解析部門

遺伝子バンクの設立

まずこれらの研究にあたって重要なことは、稀少難病といわれる先天性水頭症の臨床データ集積および遺伝子バンクの形成であると考え、第1回班会議で水頭症バンクプロトコル(案)を提案し、班会議の事務局である国立大阪病院の付属施設である臨床研究部に水頭症バンクを設立した。その経過の詳細を山崎論文の中で報告している。特に遺伝子解析等をめぐる倫理規定には細心の注意を払い、検討会、医学倫理委員会に申請後、承認を得た。そして統一したインフォームドコンセントの書式および同意書を作成した。水頭症患者DNAの回収・抽出・搬送はエスアールエルに業務委託した。

遺伝子解析

12月始めより検体の集積を開始し、現在すでに20検体ほど集まっており、今年度はまずL1CAM遺伝子解析を、PCR-SSCP法により開始した。変異の報告は遺伝子の各領域に広く存在するため、効率的に遺伝子異常をみつけるためにSSCP法によるスクリーニングで変異のあるエクソンを同定し、塩基配列を決定する必要がある。

岡本らは日本におけるL1CAM遺伝子異常8例についてまとめている。ホットスポットはなかったが、fibronectin domain 1-4に5種の変異が存在した。今後順次遺伝子解析をすすめ、症例数を増やし欧米からの報

告に対して人種的特異性が認められるかどうかについて検索していく必要がある。

Ⅳ. 臨床部門

出生前診断

柳原・秦らは香川医科大学母子センターにおける超音波診断装置による水頭症の出生前診断とその精神運動発達の前後について報告している。1984年10月～1999年12月の分娩統計では、全分娩数は3981例（妊娠12週以後）であり、このうちなんらかの胎児奇形を認めた症例は163例（4.09%）であり、中枢神経系の奇形症例は37例（0.93%）であった。胎児奇形症例に対する中枢神経系奇形の割合は27.2%（37/163）であった。これらのうち無脳児についてはやや減少傾向を認めるが、水頭症については減少傾向は認めず、水頭症の発症は減っているのではないかという予想とは異なった。正確には疫学調査の結果が待たれる。37例中不明の2例を除く35例中3例のみが生存し、全て重度精神運動発達遅滞を後遺したと報告されている。これは脳外科医の経験するよりはかなり悪い結果という印象を受けた。

また田中・秦らはさらに中枢神経系奇形の胎芽期における診断の可能性を探るために、わが国初の細径プローブを用いた子宮腔内超音波法により、従来の経腹・経膈超音波法では正確な描出が困難であった妊娠9週以前の胎芽頭部を観察し、胎芽期の中枢神経系の発育に関して検討した。妊娠9週以前（妊娠6週3日～妊娠9週5日）で母体保護法にもとづく治療的な中絶手術を要する妊娠女性58例を対象とした。それによると胎芽脳胞の描出は、58例中55例（95%）で可能であった。妊娠6週前半に1次脳胞の描出がsingle ventricleとして可能となり、妊娠6週後半には前脳・中脳・後脳が同定された。妊娠7週で前脳より発生した終脳も確認され、2次脳胞が観察された。妊娠7週以降の2次脳胞について各脳胞の大きさ（長さ・幅・高さ）を計測し、妊娠日数と各計測値との関係を求め、胎芽の中枢神経系の発育に関する検討を行ない、ほとんどのパラメータで信頼性の高い発育曲線が得られた。この方法が確立すれば、特に無脳児や全前脳胞症などの早期診断に有用であり、画期的な出生前診断法であると思われる。

臨床病態

Dandy-Walker症候群

臨床病態・治療効果についての分析では3つの研究成果が報告された。

佐藤倫・佐藤博らはDandy-Walker症候群の15例（男児6例、女児9例）について、他の先天異常の合併の有無、V-P,C-P両側シャントとV-Pシャントのみでの治療法の違いによる前後との関連について検討した。近年この症候群の臨床的前後の再評価に注意が向けられ、正常知能例や小脳機能障害のごくわずか、またはない例の比率が増加している。他の先天異常合併例は15例中13例にみられ、中枢神経系合併症では髄膜瘤を伴う二分頭蓋、全前脳胞症、脳梁欠損を伴う三角頭蓋、脊髄脂肪腫などがみられた。中枢神経系以外の異常では先天性心疾患、ダウン症、先天性鎌状網膜剥離、Kasabach-Meritte症候群、超未熟児などであった。合併症のない例は2例のみであった。知的発達は4例が正常で、3例で境界から軽度のおくれがみられ、3例で中等度の、2例で重度の発達遅滞を後遺し、3例が死亡した。治療法の違いによる知的発達の差異は明らかでなかった。知的発達と小脳機能障害はほぼ相関し、正常な知能発達例では小脳機能障害はみられなかったと報告している。

水頭症患者に合併したてんかん

また西山・中川らは103例（男児60例、女児43例）の水頭症患者に合併したてんかんについて臨床脳波学的に検討した。水頭症患者103例中、経過中に痙攣発作を認めたものは49例（47.6%）であった。このうち、脳波検査や臨床経過により、てんかんと診断したものは、36例（35.0%）であった。先天性水頭症や頭蓋内感染症後の水頭症患者ではてんかん合併率が高く、発作の抑制が困難であるのに対し、原因不明のいわゆる特発性水頭症や、髄膜瘤を伴う水頭症患者ではてんかんの合併率は低く、発作は容易に抑制されていた。水頭症患者のてんかんは、局在関連性てんかんの占める割合が高く、発作型は、複雑部分発作や部分運動発作が主体であった。シャント術が

てんかん発症の要因になっている可能性があると思われた。水頭症患児98例の知能指数の平均は65.2で、てんかんを合併した症例の知能指数の平均は44.7であり、てんかんを合併しなかった症例の知能指数の平均値78.8に比し有意に知能予後が不良であったと報告している。

脳梁形成不全と水頭症

林・古川らは水頭症の長期予後の分析を脳梁の形態に着目して、その程度で分析し評価する方法を提案した。林らは前回の森班の班会議で水頭症の手術症例124例についての予後を分析した際に、予後決定因子のひとつに水頭症の発生時期があげられたため、水頭症発症の時期を推察する指標として脳梁形成の程度を選んだ。報告は次回になるが、脳梁の形態が、予後判断の指標になれば診断的意義は高い。

V. 疫学部門

先天性水頭症の全国疫学調査を実施する。森竹らはこれまで胎児期水頭症の実態を把握し、その管理と治療法を検討してきた。今回はその対象を先天性水頭症に定め特定疾患の疫学に関する研究班（主任研究者：稲葉 裕、担当研究者：玉腰暁子）の協力を得て、全国疫学調査を行うこととなった。先天性水頭症の全国疫学調査調査はこれで3回目になる。第1回は平成1年菊地班で行われた調査で、第2回は平成5年森班で行われた胎児性水頭症の調査である。少しずつ対象が異なるが、水頭症の疫学的推移を知る上で価値あるデータになる。

対象患者は平成11年1月1日～平成11年12月31日（1年間）に受診した先天性水頭症患者で、第一次調査、第二次調査を行なう。調査対象施設は以下の4条件を満たすように設定する。(1)全病院を対象、(2)抽出率を全体で約20%、(3)抽出は層化無作為抽出とし、層は8つ（大学付属病院、500床以上、400-499床、300-399床、200-299床、100-199床、99床以下の一般病院、とくに患者の集中すると考えられる特別な病院）、(4)各層の抽出率は、100%、100%、80%、40%、20%、10%、5%、100%。調査対象診療科は先天性水頭症患者の主な受療診療科を考慮して小児科、産婦人科、脳神経外科とし、計2475科が調査対象となった。

倫理面への配慮

この研究には、多施設からの患者DNAを中心とした生体資料を集積するバンクを形成すること、遺伝子解析を行うこと、正常胎児脳（流産あるいは中絶胎児脳）を研究に用いることなどいくつかの倫理的配慮を要する点が含まれている。臨床研究を行っていく上での医学倫理問題について見識を深め、平成11年9月30日国立大阪病院医学倫理委員会に「先天性水頭症の分子生物学的メカニズム解明と治療法開発」研究における倫理審査を申請し、10月18日に院外学識者3名を含む医学倫理委員会が開催され、4時間にわたる審議を経て、11月17日承認された。また研究班では、独自の『先天性水頭症患児・家族に対する研究協力についてのインフォームドコンセント』および『同意書』、『中絶された胎児・家族に対する研究協力についてのインフォームドコンセント』および『同意書』を作製し、研究協力におけるインフォームドコンセントの徹底には、細心の注意を払っている。

今後の方向

今年度は実質上約半年足らずで、ほとんど組織体制の準備に終わったが、言い換えれば当初予定した方向での出発は出来るところまでこぎ着けた。まず大きな課題に据えている遺伝子バンクの設立の組織的倫理的準備は整い、次は中身の充実である。その意味でこのバンクの設立が水頭症研究の今後に関してどういう意味をもって来るのか、について当事者である患者さん・家族そして主治医にわかっていただく努力をしていくことが慣用である。今年度は特定疾患に関する評価研究班（主任研究者坂根剛）よりの補助金援助を得て、日本二分脊椎症・水頭症研究財団（会長松本悟）との共催で、国際水頭症二分脊椎症患者のためのシンポジウムを開催することになった。そのテーマは遺伝・予防・出生前診断であり我が班より岡本、山崎が遺伝相談等の内容について講演・医療相談を行う予定である。日本小児科学会・日本小児脳神経外科学会・こども病院脳神経外科医会などを通じて研究協力を依頼していく予定である。

基礎的研究は、L1・Musashil (Msi1)・nonmuscle myosin heavy chain-B (NMHC-B)・などの基礎研究をこれま

で同様進めていただき、forkhead/winged helix遺伝子Mf1や E2F-5遺伝子にも注目していきたい。L1以外の分子がヒトの疾患としての水頭症とどうかかわりがあるのか、免疫組織学的研究や遺伝子解析を通じて明らかにしていく。また分子生物学的に水頭症発症の危険因子の探索に関する研究を進めていく。臨床部門では、水頭症症候群であるDandy-Walker症候群、Holoprosencephalyについて臨床病態をまとめ、遺伝子解析と平行して予後評価の指標を探索していく。また脳梁形成やミエリン形成と水頭症の予後評価についての検索を行う。これらの臨床および基礎データと疫学調査の結果を解析して、さらに難治性水頭症発症の要因を明らかにしていく。将来的にはこれらを基礎にした修復・再生を射程に入れた新たな治療法の確立に向けていきたい。

厚生省特定疾患 難治性水頭症調査研究班（主任研究者 山崎麻美）
平成11年度研究報告書 平成12年3月

神経接着分子L1の細胞内局在異常 —細胞生物学的解析およびX連鎖性遺伝性水頭症の2例の報告—

理化学研究所脳科学総合研究センター¹ 国立大阪病院脳神経外科²
聖マリマ病院病理³ 大阪大学大学院医学系研究科脳神経外科⁴ 佐賀医科大学病理⁵

上 口 裕 之¹ 山 崎 麻 美² 中 村 康 寛³
金 村 米 博⁴ 泉 本 修 一⁴ 宮 原 晋 一⁵

緒 言

免疫グロブリンスーパーファミリーに属する神経細胞接着分子L1は、神経系の発生過程に重要な役割を担っている膜貫通型蛋白である^{1,2)}。ヒトL1遺伝子の変異は、X連鎖性遺伝性水頭症・脳梁低形成・錐体路低形成・母指内転屈曲といった神経系の奇形をきたす^{3,4,5)}。さらにL1遺伝子をノックアウトしたマウスも同様の表現型を示すことが知られている^{6,7,8,9,10)}。今回我々は、L1の神経細胞内発現分布の異常を示したX連鎖性遺伝性水頭症の2例を経験したので報告する。さらにL1分子の軸索への輸送(axonal sorting)を制御する分子機構に関する基礎的知見を得たので報告する。

方 法

I. 対象

本報告書に記載する症例の家系図、臨床経過、臨床所見および一部の病理所見はすでに報告されている¹¹⁾。患児はL1の遺伝子変異に特徴的な臨床所見（水頭症、脳梁低形成・錐体路低形成・母指内転屈曲・左右の視床癒合）を示し、血縁内の女性から出生した男児のみにこれらの奇形が発生している。以上よりX連鎖性遺伝性水頭症と診断し、臨床所見よりL1の遺伝子異常が強く疑われた。これらの男児5症例のうち、1例は長期生存、1例は乳児期に死亡、3例は胎内死亡した。胎内死亡した3例のうち2例（妊娠23週および28週）の剖検脳を免疫組織化学的に解析した。

II. 免疫組織化学

10%ホルマリン固定し、その後パラフィン包埋して永久標本を作製、切片は5 μ mに薄切した標本をAPSコートスライドガラス上にのせ作成した。組織切片をキシレンで脱パラフィン化した後、アルコール濃度を段階的に下げて中和した。0.3%過酸化水素水/メタノールで内因性ペルオキシダーゼを不活化した。5%正常血清（ヤギ）でブロッキング後（室温20分）、1次抗体（rabbit anti-L1 polyclonal antibody、Case Western Reserve 大学 V. Lemmon 教授より贈与）を室温で1時間反応させた。PBSでの洗浄後ビオチン化2次抗体（ヤギ）を室温で1時間反応させた。PBSでの洗浄後、ABC試薬（VECTASTAIN Elite ABC kit、フナコシ）を室温で30分間反応させ、0.05% DAB/0.01%過酸化水素水にて発色させた。

III. L1遺伝子解析

同一家系内で遺伝性水頭症を有する生存例のリンパ球由来L1 mRNAを鋳型として、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法によりcDNAフラグメントを生成し、これの塩基配列をL1 coding region全長にわたり解析した¹²⁾。リンパ球由来のL1では、2番目と27番目のエクソンがスプライスアウトされているため、これらエクソンとその近傍のイントロンを含むgenomic DNAの塩基配列も解析した。

IV. 変異L1 cDNA コンストラクトの作成および培養神経細胞への遺伝子導入

ヒトL1 cDNA¹³⁾を鋳型として、PCR法あるいはsite-

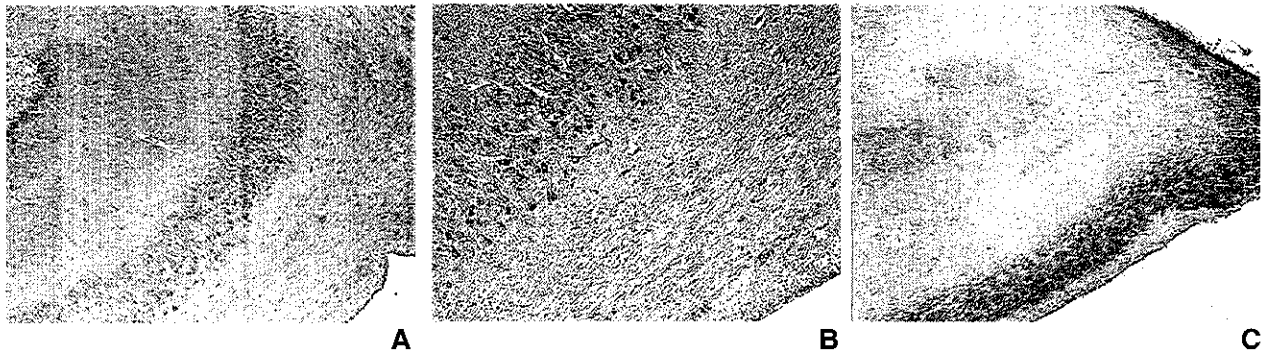
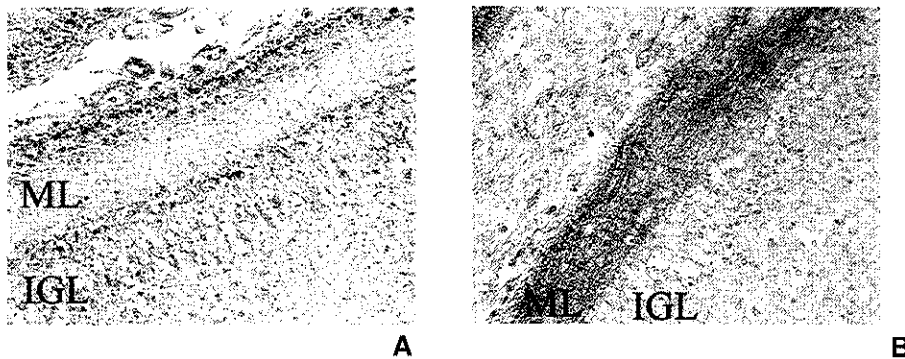


Fig. 1 Light micrographs of coronal sections of the hippocampus obtained from a 23 W human embryo with X-linked hydrocephalus (A, B) and from a 23 W control embryo (C). L1 localization was visualized by immunocytochemical staining using polyclonal anti-human L1 antibody. In the X-linked hydrocephalus embryo, L1 is highly expressed by the cell bodies of pyramidal and granular neurons (B, higher magnification). In contrast, strong L1 expression is detected along the axonal tracts from the pyramidal and granular cell layers in the control hippocampus.



ML:molecular layer IGL:internal granular layer

Fig. 2 Light micrographs of coronal sections of the cerebellum obtained from a 28 W human embryo with X-linked hydrocephalus (A) and from a 28 W control embryo (B). L1 localization was visualized by immunocytochemical staining using polyclonal anti-human L1 antibody. In the X-linked hydrocephalus embryo, L1 is highly expressed by the cell bodies located in the external and internal granule cell layers. In contrast, strong L1 expression is detected along the molecular layer, most likely on the axons of granule cells.

directed mutagenesis 法により、L1細胞内領域に遺伝子変異を導入した¹⁴⁾。得られた変異L1 cDNAを発現ベクター pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA)にサブクローニングし、培養神経細胞への遺伝子導入に用いた。ニワトリ (E9) の脊髄後根神経節細胞を dispase およびDNaseにて分散し、lamininをコートした培養用スライド上に培養を開始した。神経細胞への遺伝子導入は、DOTAP lipofection reagent (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) を用いて行った。

V. 培養神経細胞の免疫染色

培養神経細胞をBouin's fluid (75%飽和ピクリン酸、20%ホルマリン、5%水酢酸)にて20分間固定後、

導入遺伝子由来のヒトL1の発現をマウスモノクローナル抗ヒトL1抗体にて検出した。この抗ヒトL1は、ニワトリL1とは交差反応しないため、遺伝子導入したヒトL1のみを選択的に検出することが可能である。

結 果

1. X連鎖性遺伝性水頭症例の免疫組織化学的解析

胎生23週で死亡した症例の海馬の抗L1抗体による免疫組織化学所見を示す(図1A-B)。海馬錐体細胞あるいは顆粒細胞の細胞体に最も強いL1の発現が認められた。抗ニューロフィラメント抗体による免疫染色にて、これら神経細胞の軸索路に明らかな異常を認めなかったが(data not shown)、これら軸索路でのL1の発現はきわめ

て弱かった。しかし胎生23週の正常コントロールの海馬では、L1は錐体細胞あるいは顆粒細胞の軸索路に強く発現し、これら神経細胞の細胞体にはほとんど発現していなかった(図1C)。培養海馬神経細胞においても、L1は軸索のみに発現し神経細胞体および樹状突起には発現しなかった(data not shown)。以上より、本症例では海馬神経細胞におけるL1の細胞内の局在異常が明らかとなった。

次に、胎生28週で死亡した症例の小脳の抗L1抗体による免疫組織化学所見を示す(図2A)。本症例では外・内顆粒細胞層の神経細胞体に最も強いL1の発現が認められた。しかし胎生28週の正常コントロールの小脳では、L1は小脳皮質分子層(顆粒細胞の軸索路)に最も強く発現していた(図2B)。以上より、小脳においてもL1の神経細胞内の局在異常が示された。同様のL1の局在異常は大脳皮質においても確認された(data not shown)。

以上の所見より、本症例では何らかの機序によって神経細胞体で生合成されたL1が軸索へ sortingされなかったために、L1の機能異常に特徴的な神経奇形を呈したものと推察された。

II. L1 axonal sortingの細胞生物学的解析

L1は神経細胞においては選択的に軸索に sortingされることが知られているが、その分子機構には不明な点が多い。本症例において確認された、L1の神経細胞内の局在異常は、L1の軸索への sortingが何らかの機序により阻害された結果であると推察した。そこでL1の軸索への sortingに必要なL1のアミノ酸配列を決定すること

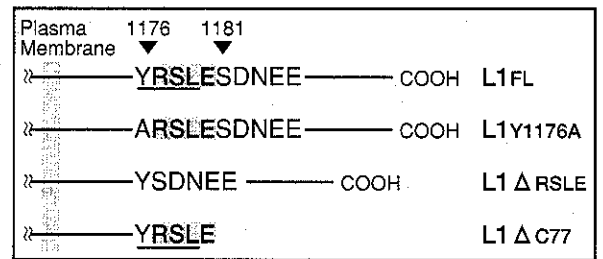


Fig.3 Schematic illustration of the cytoplasmic domain of wild-type and mutant forms of L1. A part of the L1 cytoplasmic domain is shown in the single-letter amino acid code. In the neuronal form of L1(L1FL), Tyr1176 is adjacent to the RSLE sequence (shaded region). The resulting sequence of YRSLE conforms to a tyrosine-based sorting motif, YxxØ (underlined region), where x is any amino acid and Ø is an amino acid with a bulky hydrophobic side chain. In the non-neuronal form of L1(L1ΔRSLE) that lacks the RSLE sequence, a hydrophobic amino acid leucine at position Y+3 is replaced by a polar amino acid asparagine. L1Y1176A has a single amino acid substitution(Y1176A) that mutates a critical tyrosine residue in the motif. L1ΔC77, that lacks the C-terminal 77 amino acids located immediately after the RSLE exon, still carries the YRSLE sequence.

を目的に、以下の実験を行った。多くの膜蛋白はその細胞内領域にある特異的なアミノ酸配列を有し、この配列がそれら膜蛋白の細胞内での発現分布を決定すると考えられている。このようなアミノ酸配列のうちで最も解析が進んでいるものが、tyrosine-based motifと言われる配列である。L1細胞内領域には神経細胞に特異的なRSLE配列(exon 27)が存在し、この直前のtyrosineとともにtyrosine-based motif (YRSLE)を形成する(図3)。このYRSLE配列を欠損する非神経細胞型L1(L1ΔRSLE)および変異型L1(L1Y1176A)、さらにYRSLE配列の直後にstop codonを挿入した変異型L1(L1ΔC77)を

Table 1. DRG neurons expressing transfected L1 in specific cell locations

Transfected L1	L1 _{FL}	L1 _{ΔRSLE*}	L1 _{Y1176A*}	L1 _{ΔC77}
Restricted to the cell body	0	11	11	0
In the cell body and proximal shaft				
Within a diameter of the cell body	0	8	6	0
Within a proximal half of the axonal shaft	0	4	6	1
Reaches the growth cone	11	0	0	19
Total	11	23	23	20

Subcellular localization of transfected L1 in dorsal root ganglion (DRG) neurons was categorized into four groups on the basis of the extent of L1 expression along the axonal shaft. Results are expressed as the numbers of DRG neurons expressing each form of L1. A Kruskal-Wallis test showed that there is a significant difference in L1 localization, depending on the form of transfected L1 ($p < 0.0001$).

* $p < 0.0001$; Mann-Whitney *U* test compared with both L1_{FL} and L1_{ΔC77}

作成した(図3)。これらL1cDNAをニワトリ後根神経節由来培養神経細胞に導入し、その遺伝子産物の細胞内局在を免疫染色にて解析した。

神経細胞型L1(L1FL)は、軸索全長に発現がみられ、特に軸索先端部での発現が最も強かった。しかしながら、YRSLE配列をもたないL1 Δ RSLEとL1Y1176Aの発現は、神経細胞体と軸索近位部に限局し、軸索遠位部には検出されなかった。この発現パターンは、本報告書に記載した症例のL1の発現分布と同様である。さらに、YRSLE配列を有するL1 Δ C77は、L1FLと同様の発現パターンを示した。以上の所見を表1にまとめる。

以上の結果より、L1細胞内領域のYRSLE配列は、L1が軸索に発現するのに必須な機能部位であることが示された。

III. L1遺伝子解析

リンパ球由来L1mRNAを鋳型として、RT-PCR法によりcDNAフラグメントを生成し、L1mRNA全長にわたり塩基配列を解析した。しかしながら、リンパ球に発現するL1mRNAに塩基配列の変異は検出できなかった。リンパ球由来のL1では、2番目と27番目のエクソンがスプライスアウトされているため、これらエクソンとその近傍のイントロンを含む genomic DNAの塩基配列も解析したが、塩基配列の変異は検出できなかった。

考察および結語

L1は発生過程の神経細胞の軸索突起に発現し、目的とする組織・細胞への軸索の誘導・伸長を促すことが知られている^{7,15)}。このように、神経細胞体で生合成されたL1が軸索に発現するためには、細胞体から軸索へのL1の輸送機構が必要である。我々は、L1細胞内領域の神経特異的なYRSLE配列がL1の軸索へのsortingに必須であることを示し、さらにこのYRSLE配列を選択的に認識するアダプター分子も同定した¹⁶⁾。従って、YRSLE配列と細胞質に存在する何らかの分子との相互作用が、L1の軸索での発現を決定する鍵をにぎるものと考えられる。

今回報告したX連鎖性遺伝性水頭症2例では、いずれもL1の発現が神経細胞体に限局し、軸索での発現は検出されなかった。L1の遺伝子変異に特徴的な臨床・病理所見(X連鎖性遺伝性水頭症、脳梁低形成、錐体路低形成、母指内転屈曲、左右の視床癒合)を有することか

ら、L1の細胞内局在異常が本症例の病因となっていることが強く示唆される。我々の基礎研究から、L1の遺伝子異常がL1の神経細胞内局在の異常の原因となりうることは明らかである。しかしながら、本症例ではL1の遺伝子変異が検出できず、L1の軸索への sortingに関する他の何らかの蛋白分子の異常が原因となっている可能性が示唆される。L1細胞内領域のYRSLE配列を認識してL1を軸索へsortingする分子群の同定が進めば、このような臨床例での原因遺伝子の解明の糸口となる。

以上、L1の軸索での発現を制御するアミノ酸配列の同定、およびL1の軸索での発現が阻害されたX連鎖性遺伝性水頭症の2例を報告した。L1以外の何らかの蛋白分子の変異がL1の細胞内局在異常を引き起こし、これによりL1の遺伝子変異と類似した臨床所見を呈しうることが示唆された。

文 献

- 1) Moos M, Tacke R, Scherer H, Teplow D, Fruh K, Schachner M: Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 334: 701-703, 1988
- 2) Kamiguchi H, Lemmon V: Neural cell adhesion molecule L1: signaling pathways and growth cone motility. *J Neurosci Res* 49: 1-8, 1997
- 3) Rosenthal A, Jouet M, Kenwrick S: Aberrant splicing of neural cell adhesion molecule L1 messenger RNA in a family with X-linked hydrocephalus. *Nat Genet* 2: 107-112, 1992
- 4) Van Camp G, Vits L, Coucke P, Lyonnet S, Schrandt-Stumpel C, Darby J, Holden J, Munnich A, and Willems PJ: A duplication in the L1CAM gene associated with X-linked hydrocephalus. *Nat Genet* 4: 421-425, 1993
- 5) Kamiguchi H, Hlavin ML, Yamasaki M, Lemmon V: Adhesion molecules and inherited diseases of the human nervous system. *Annu Rev Neurosci* 21: 97-125, 1998
- 6) Dahme M, Bartsch U, Martini R, Anliker B, Schachner M, Mantei N: Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nature Genet* 17: 346-349, 1997
- 7) Cohen NR, Taylor JSH, Scott LB, Guillery RW, Soriano P, Furley AJW: Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Curr Biol* 8: 26-33, 1997

- 8) Fransen E, D'Hooge R, Van Camp G, Verhoye M, Sijbers J, Reyniers E, Soriano P, Kamiguchi H, Willemsen R, Koekkoek SKE, De Zeeuw CI, De Deyn PP, Van der Linden A, Lemmon V, Kooy RF, Willems PJ: L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns. *Hum Mol Genet* 7: 999-1009, 1998
- 9) Demyanenko G, Tsai A, Maness P: Abnormalities in neuronal process extension, hippocampal development, and the ventricular system of L1 knockout mice. *J Neurosci* 19: 4907-4920, 1999
- 10) Kamiguchi H, Hlavin ML, Lemmon V: Role of L1 in neural development: what the knockouts tell us. *Mol Cell Neurosci* 12: 48-55, 1998
- 11) 山崎麻美、中谷 進、林 隆士、河野勝一、中村康寛、宮原晋一、平賀章壽、有田憲生、早川 徹：伴性劣性遺伝性水頭症の1家系5症例。 *小児の脳神経* 18: 373-378, 1993
- 12) Izumoto S, Yamasaki M, Arita N, Hiraga S, Ohnishi T, Fujitani K, Sakoda S, Hayakawa T: A new mutation of the L1CAM gene in an X-linked hydrocephalus family. *Child's Nerv Syst* 12: 742-747, 1996
- 13) Hlavin ML, Lemmon V: Molecular structure and functional testing of human L1CAM: An interspecies comparison. *Genomics* 11: 416-423, 1991
- 14) Kamiguchi H, Lemmon V: A neuronal form of the cell adhesion molecule L1 contains a tyrosine-based signal required for sorting to the axonal growth cone. *J Neurosci* 18: 3749-3756, 1998
- 15) Lemmon V, Farr K, Lagenaur C: L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron* 2: 1597-1603, 1989
- 16) Kamiguchi H, Long KE, Pendergast M, Schaefer AW, Rapoport I, Kirchhausen T, Lemmon V: The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *J Neurosci* 18: 5311-5321, 1998

神経接着分子L1の基礎研究のまとめ

理化学研究所脳科学総合研究センター

上 口 裕 之

神経系に発現する接着分子は、インテグリンファミリー、カドヘリンファミリーおよび免疫グロブリンスーパーファミリーに分類され、いずれも神経細胞の移動、軸索伸長・線維束形成、シナプス形成といった神経発生の重要な現象に深く関わっている。免疫グロブリンスーパーファミリーに属する神経接着分子L1は、6つの免疫グロブリンドメインと5つのフィブロネクチンドメインからなる細胞外領域、膜貫通領域および細胞内領域より構成される蛋白である。L1は主として発生過程の神経軸索に発現し、ヒトでの遺伝子異常が神経奇形の原因となることが知られている数少ない接着分子のひとつとして注目されている。特徴的な臨床・病理所見としては、伴性劣性遺伝性水頭症、精神発達遅滞、錐体路低形成による対麻痺、脳梁低形成、母指内転屈曲、左右視床の癒合、小脳虫部低形成などがあげられる。水頭症および精神発達遅滞の重症度と生存率は、L1遺伝子変異の部位・タイプと強い相関がある。L1細胞内領域に限局する変異はほとんどが軽症例であり、L1細胞外領域のtruncationは最も重症である。L1細胞外領域の点変異はそれらの中間である。L1細胞外領域を構成するアミノ酸は、ドメインの3次元構造に重要なkey residueとドメイン表面に存在するsurface residueとに分類される。L1細胞外領域のkey residueの点変異はsurface residueの点変異に比べてより重症となる。すなわち、水頭症および精神発達遅滞の重症度と生存率は、L1細胞外領域のドメイン構造に依存する。しかし、錐体路・脳梁低形成、母指内転屈曲といった神経路の発生異常は、L1遺伝子の変異の部位・タイプとは関係なくほぼ全例に認められる。以上より、L1細胞外領域の機能異常すなわちL1による細胞接着の阻害は、水頭症の発症・増悪と深い関わりがある反面、神経路の発生過程においては、L1による細胞接着のみならずL1細胞内領域を介するシグナル伝達系も重要な役割を担っていることが示唆された。

神経細胞膜表面に発現するL1は、隣接する他の神経細胞のL1とホモフィリックに結合することにより、これら細胞同士が接着する。また、軸索同士がホモフィリックなL1-L1結合により線維束を形成し、目的とする組織・細胞へ向かって伸長することも知られている。このようなホモフィリックなL1-L1結合による軸索突起伸長過程の分子機構の解明は、伴性劣性遺伝性水頭症例の神経路の発生異常を理解する上できわめて重要である。これまでに我々は、L1が数々の細胞内蛋白リン酸化酵素(キナーゼ)を活性化し、またこれらの活性型キナーゼによりL1細胞内領域がリン酸化されることを示した。さらに軸索突起の先端部(成長円錐)において、複雑な細胞内膜輸送系を介して成長円錐表面のL1の発現量および接着性が制御されうること示した。このように、L1細胞内領域が関与するシグナル伝達系が解明されつつあり、その神経路発生過程における機能的意義も明らかになりつつある。

L1遺伝子をノックアウトしたマウスを解析したところ、脳室拡大、錐体路低形成による対麻痺、脳梁低形成、小脳虫部低形成、記憶・学習障害といったヒトL1遺伝子変異ときわめて類似した表現型を示した。脳室拡大の程度はマウスの系統に依存するため、L1遺伝子の異常以外の何らかの遺伝的バックグラウンドが脳室系の発生に関与している可能性が示唆された。脳室拡大の原因を明らかにする目的で、髄液流出路の形態を詳細に解析したが、正常コントロール群と比較して有意な狭窄・閉塞は認められなかった。L1ノックアウトマウスでは、中

脳水道が頭尾方向に引き延ばされたような形態を示したが、これが脳室拡大の直接的な原因とは考えられなかった。しかし、このような中脳水道の形態異常が、中脳水道の2次的閉塞（機能的閉塞）に関わっている可能性は否定できない。また、L1ノックアウトマウスでは、大脳皮質運動領からの上位運動ニューロン（皮質脊髄ニューロン）が延髄下部で錐体交叉せず、胸髄以下の脊髄まで到達しないことが報告されている。このような錐体交叉部での軸索ガイダンスの異常が、錐体路低形成の原因であると考えられている。

L1遺伝子変異による伴性劣性遺伝性水頭症例のgenotype-phenotype相関解析の結果から、L1による細胞接着の阻害と水頭症重症度との関連性が示唆された。発生過程にある神経軸索の接着能の低下は、脳組織のコンプライアンスを増大させ、結果として脳室内圧の増大を伴わずして脳室拡大を誘起する可能性が示唆された。そこで、L1ノックアウトマウスと対照野生型マウスとの間で脳組織コンプライアンスに有意差があるか否かを、Scanning Acoustic Microscopeを用いて解析中である。さらにL1遺伝子変異のgenotype-phenotype相関解析の結果から、脳梁・錐体路の発生過程におけるL1細胞内領域の重要性が示唆された。このようにL1は複数の機能領域をもち、それぞれが神経発生において異なった役割を担っていると考えられる。L1遺伝子異常による神経奇形の各々の発生機序を理解するためには、L1遺伝子のノックアウトではなく、L1遺伝子に部分的な変異を導入したマウスモデルの作成が必須となる。現在、このプロジェクトの開始を検討中である。

ノックアウトマウスを用いたMusashil (Msi1) の機能 および水頭症発症機序の解析

大阪大学大学院医学系研究科 神経機能解剖¹ 同 第一解剖² 東大医科研病理学研究部³ 癌研究所細胞生物⁴
東北大学医学部⁵ 科学技術振興事業団CREST⁶

榊原伸一^{1,6} 中村由紀¹ 小池正人² 高野洋志^{4,5}
佐藤均³ 内山安男² 野田哲生^{4,5} 岡野栄之^{1,6}

緒言

Musashil (Msi1) は哺乳類初期発生においてventricular zoneの中樞神経系未分化幹細胞において強く発現しているRNA結合蛋白質である。生後においても、Msi1は脳室周囲のsubventricular zoneの分裂能を有するグリア前駆細胞や、未分化幹細胞と考えられる細胞、および上衣細胞を含むアストロサイトにおいて発現が持続する(図11)。以上のような発現パターンから、Msi1蛋白質は神経発生過程においてニューロンおよびグリア細胞の細胞系譜の形成を、転写後レベルで制御している可能性が考えられた。*msi1*遺伝子産物(Msi1)の生体内での役割を明らかにするために、相同組み換え法を用いて*msi1*遺伝子欠損マウスを作製した。*msi1*欠損マウスは高頻度で出生直後から水頭症を発症し重篤なものは生後2ヶ月以内に致死となることが明らかとなった。今回、その水頭症発症機序について詳細な組織学的検討を行ったので報告する。我々はさらに*msi1*遺伝子に高い相同性と発現パターンを有する*msi2*遺伝子を新規に同定した。中樞神経系未分化幹細胞初代培養における機能阻害実験の結果、*msi*遺伝子ファミリー(*msi1*, *msi2*)が中樞神経系未分化幹細胞の維持や分化にも必須の機能を持つことが示唆された。

方法

*msi1*遺伝子欠損マウスの作製

msi1 cDNAの5'側領域をプローブとしてマウス129/svJのゲノムライブラリーをスクリーニングし、*msi1*ゲノム

DNAを単離した。*msi1*遺伝子の開始コドンを含む4つのエクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換し、5'相同領域として1.5kb、3'相同領域として9.4kbの*msi1*ゲノムDNAを持ち、negative selection用にDT-A (diphtheria toxin A-fragment) を付加した置換型ターゲットベクターを構築した(図1)。エレクトロポレーションにより129/svJ1株ES細胞へ導入し、相同組み換え体をサザンブロットによりスクリーニングした。樹立した相同組み換え体ES細胞は胚盤胞へ移植後仮親を経てキメラマウスとした。キメラマウスにC57BL/6マウスを交配して*msi1*ヘテロマウスを作製し、組織学的解析にはヘテロマウスをC57BL/6マウスに6代戻し交配後使用した。ヘテロマウスの交配により得られたホモ接合体が*msi1*遺伝子産物を欠失したnull変異であることはMsi1特異的抗体によるウェスタンブロットにより確認した。*msi1*遺伝子欠損マウスの遺伝子診断には*msi1*野生型ゲノムのアレルを特異的に増幅するプライマーおよび、変異型ゲノムのアレルを特異的に増幅するプライマーを用いたPCR法により検定した。

組織学的解析

ヘテロマウスの交配により得られた*msi1*遺伝子欠損ホモ接合体個体およびその同腹の野生型、ヘテロ個体について組織学的観察を行った。胎児あるいは出生後個体の脳をBoiin固定後エタノール脱水しパラフィン包埋をい、5mmの矢状断あるいは冠状断切片を作成し、Nissl染色、HE (Hematoxylin-Eosin) 染色により光学顕微鏡的観察を行った。電子顕微鏡観察は、生後7日および14日の脳に