

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12年度研究報告書

Annual Report of the Research Committee
of “Intractable Hydrocephalus”
The Ministry of Health Labour and Welfare of Japan, 2000

平成13年3月

March 2001

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	参 事
	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
	坂 本 博 昭	大阪市立総合医療センター 脳神経外科	部 長
	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	副 院 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	鳥根医科大学 脳神経外科	教 授	
研 究 協 力 者	稲 垣 隆 介	関西医科大学 脳神経外科	講 師
	高 橋 義 男	北海道立小児総合保健センター 脳神経外科	医 長
	田 代 弦	京都大学医学部 脳神経外科	助 手
	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
	(特定疾患の疫学に関する研究班)	土 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 臨床研究部 〒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12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の細胞内領域の機能解析	7
ー細胞骨格関連分子アンキリンBとの結合ー	

理化学研究所 脳科学総合研究センター
上川 裕之

2. Musashi (Msi1)の機能解析および同ノックアウトマウスにおける水頭症発症機序の解析	11
---	----

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
岡野 栄之^{1,6}、今井 貴雄^{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}、榊原 伸一^{1,6}

3. NMHC-Bミオシン遺伝子欠損マウスの神経上皮細胞の微細構造と水頭症発症機序	16
---	----

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. ヒト発育期脳における Tubulin beta II と VLDL receptor の発現	22
---	----

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

5. 脊髄髄膜瘤に伴うキアリII型奇形と水頭症の発生機序に関する研究	26
--	----

関西医科大学 脳神経外科
稲垣 隆介、山内 康雄、河本 圭司

6. 急性・亜急性新生児ラット水頭症モデルを用いた水頭症による 脳機能障害の病態解明に関する研究	29
---	----

京都大学医学部 脳神経外科
田代 弦、石崎 竜司、橋本 信夫

II. 遺伝子解析部門

1. X-linked hydrocephalusにおける*LICAM*遺伝子異常の解析…………… 33
— 新規遺伝子異常11家系の報告と欧米報告例との比較 —
国立大阪病院臨床研究部¹・脳神経外科²、大阪府立母子保健総合医療センター 企画調査部³、
脳神経外科⁴、兵庫医科大学 脳神経外科⁵、北海道立小児総合保健センター 脳神経外科⁶、
弘前大学医学部 小児科⁷、虎ノ門病院 小児科⁸、静岡こども病院 脳神経外科⁹、
徳島大学医学部 小児科¹⁰、広島赤十字・原爆病院 小児科¹¹
金村 米博¹、岡本 伸彦³、森本 一良⁴、森 鑑⁵、高橋 義男⁶、
藤田 浩史⁷、横谷 進⁸、佐藤 博美⁹、松田 純子¹⁰、西美 和¹¹、
有田 憲生⁵、山崎 麻美²、
2. 葉酸代謝酵素5,10 *methylenetetrahydrofolate reductase* (*MTHFR*) 遺伝子 C677T の解析 …………… 40
大阪市立総合医療センター 小児脳神経外科、脳神経外科¹、国立大阪病院 脳神経外科²、
同 臨床研究部³、大阪府立母子保健総合医療センター 企画調査部¹、
兵庫医科大学 脳神経外科⁵
坂本 博昭¹、山崎 麻美²、金村 米博³、岡本 伸彦⁴、森 鑑⁵、
北野 昌平¹、西川 節¹
3. 水頭症遺伝子バンクに登録された全前脳胞症患者5例における遺伝子変異の解析 …………… 45
京都府立医科大学附属脳・血管系老化研究センター 病態病理学部門¹、
国立大阪病院 脳神経外科²、国立大阪病院 臨床研究部³
伏木 信次¹、矢追 毅¹、金村 米博³、山崎 麻美²
4. 小脳形成異常症における*ZIC1*、*Engrailed-2*遺伝子異常の検索 …………… 48
大阪府立母子保健総合医療センター 企画調査部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、
岡本 伸彦¹、金村 米博²、山崎 麻美³
5. 神経管閉鎖不全症における癌抑制遺伝子*p53*の変異検索 …………… 51
兵庫医科大学 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、
森 鑑¹、金村 米博²、山崎 麻美³、有田 憲生¹

III. 臨床部門

1. 胎児頭蓋内動脈血流速度波形計測…………… 53
香川医科大学 母子科学講座周産(生)期学
金西 賢治、秦 利之
2. 三次元超音波法による胎児CNS奇形の診断…………… 57
香川医科大学 母子科学講座周産(生)期学
久野 敦、秦 利之
3. 推定発生時期からみた先天性水頭症患者の機能的予後…………… 60
聖マリア病院 脳神経外科¹・新生児科²
下川 尚子¹、林 隆上¹、古川 義彦¹、福田 清一²、橋本 武夫²

4. 胎生期診断された水頭症の治療上の問題点	67
静岡県立こども病院 脳神経外科 佐藤 博美、佐藤 倫子、木戸口慶司、伊澤 仁之	
5. 出生前診断された胎児脳室拡大(水頭症?)における現在の診断の意義	72
北海道立小児総合保健センター 小児脳神経外科 高橋 義男	
6. 全前脳胞症の臨床経過長期予後	79
—多施設共同研究による検討— 国立療養所香川小児病院 脳神経外科 中川 義信、犬 敬憲、西山 逸子	

IV. 疫学部門

1. 先天性水頭症全国疫学調査	83
名古屋大学大学院・医学研究科予防医学/医学推計・判断学 ¹ 、 京都大学・保健管理センター ² 、順天堂大学医学部・衛生学 ³ 、 鳥根医科大学・脳神経外科 ⁴ 、国立大阪病院・脳神経外科 ⁵ 中山登志子 ¹ 、玉腰 暁子 ¹ 、川村 孝 ² 、稲葉 裕 ³ 、 森竹 浩三 ⁴ 、山崎 麻美 ⁵	
国際二分脊椎・水頭症シンポジウム—患者のための集い—開催事業	95
(財)日本二分脊椎・水頭症研究振興財団 会長 松本 悟	
資料1 国際二分脊椎・水頭症シンポジウムプログラム 抄録集	96
資料2 平成12年度 第1回班会議プログラム	106
資料3 平成12年度 第2回班会議プログラム	108
研究成果の刊行に関する一覧表	112

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

主任研究者 山崎麻美

研究要旨

平成11年度に開始した本研究班も中間年を終えようとしている。初年度は、水頭症バンクの準備と立ち上げを行い、班会議の組織作りを行なった。中間年は、臨床グループの充実を図り、基礎的研究・遺伝子解析・臨床解析・疫学調査などで多くの成果をあげることができた。水頭症研究の中に分子生物学的アプローチを盛り込むことは、今日最も要請されていることで、これまでの成果を整理しさらに発展させることでありと益々確信するようになった。最終年度の目標を先天性水頭症の診断基準・重症度判定を制定し、予後評価に基づいた治療指針を作成すること、また発症リスクの同定や予防法の開発につとめることとした。

研究目的

平成6年度難治性水頭症調査研究班（森惟明班長）報告書によると、水頭症とは脳脊髄液（髄液）の循環障害に起因し、髄液が脳室内に貯留し、その結果進行性脳室拡大をきたす病態と定義されている。このように水頭症はあくまでも病態であり、単一疾患ではない。また同報告書で水頭症を8型に分類した。胎児性水頭症・先天性水頭症・脳瘤脊髄髄膜瘤に合併する水頭症・新生児頭蓋内出血後水頭症・髄膜炎後水頭症・くも膜下出血後水頭症・特発性成人型水頭症・外傷後水頭症である。この中でいわゆる続発性（二次性）水頭症である出血後・髄膜炎後・外傷後水頭症に関しては、病態等は十分に把握されてきた。それ以外の水頭症の中で先天性水頭症と特発性成人型水頭症（いわゆる正常圧水頭症）は、いまだに病態が混沌としている。後者については前回当班会議（森惟明班長）らの研究成果により、診断基準・重症度判定などが制定された。平成11年度から開始した本研究班に与えられた責務は、水頭症研究の中に分子遺伝子学的手法を取り入れることによって、先天性水頭症の発症機序を明らかにし、病態を整理し、診断基準・重症度判定を制定し、予後評価に基づいた治療指針を作成することである。また発症リスクの同定や予防法の開発につとめ、また将来的には水頭症治療の中にも遺伝子治療や再生医学の可能性を追及していくことである。

研究方法

対象は胎児期あるいは出生後1年以内に診断された先天性水頭症に限定した。いわゆる出血後水頭症・髄膜炎後水頭症・外傷後水頭症・外水頭症は除外した。

A 分子遺伝子学的メカニズムの解析

1 神経細胞接着因子*L1*遺伝子に関する研究

ヒトの水頭症をきたす原因遺伝子として同定された神経細胞接着因子*L1*遺伝子に関して、基礎的研究、遺伝子解析、臨床学的分析を行なう。

2 ノックアウトマウスの研究

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、水頭症を発症してくることが明らかになっている。神経幹細胞の分化に関わる*Musashi1* (*Msi1*) や、神経上皮細胞の接着・移動・分裂・分化に関わる*nonmuscle myosin heavy chain II-B* (*NMHC-B*) や*DNA polymerase λ (β 2)* などである。これら遺伝子のノックアウトマウスの解析をおこない、水頭症の発症機序について解析していく。

3 病理学的検索

水頭症胎児剖検脳を用いて、*L1*、*Msi1*、*NMHC-B*抗体を用いた免疫組織学的検索を行ない、ヒトの疾患との関係の手がかりを得ていくとともに、さらに水頭症を脳室側、髄液循環側のみからみるのではなく、脳実質の発育、特に*radial fiber*との関係からアプローチを行う。

B 遺伝子解析

1 臨床データおよびDNAを集積し水頭症遺伝子バンクを形成

2 *L1*遺伝子解析・全前脳胞遺残症の候補遺伝子といわれている、*Sonic Hedgehog* (*SHH*) gene、*Zic2*解析、小脳形成不全を伴う水頭症については*Zic1*遺伝子解析を行なう。

3 水頭症症候群の臨床データの分析

X連鎖性伴性遺伝性水頭症・*Dandy-Walker*症候群・全前脳胞遺残症の臨床データの分析を行なう。

4 葉酸と神経管閉鎖障害発症リスクに関する研究

妊娠初期に葉酸を投与すれば神経管閉鎖障害発症のリスクが低減するという報告が、欧米からなされてきたが、そのメカニズムに関して葉酸代謝酵素5、*10methylentetrahydrofolate reductase* (*MTHFR*) の遺伝子異常が関与していると報告されている。本邦における*MTHFR*遺伝子解析を行なう。

C 先天性水頭症の全国疫学調査の実施と分析

厚生科研(特定疾患対策研究事業)特定疾患の疫学に関する研究班(主任研究研究者 稲葉裕)と共同で行われた全国疫学調査の2次調査の臨床的分析を行う。

D 先天性水頭症の診断および治療プロトコールの作製にむけて

1 精度の高い出生前診断法の開発

超音波診断などによる画像診断の進歩により、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っているが、さらに早期の確実な診断方法の開発を行う。

2 出生前診断された水頭症の予後評価及び分析

① 水頭症の発症時期の分析

② 水頭症の治療時期の分析

③ 治療効果の分析

結 果

A 分子遺伝子学的メカニズムの解析

1 神経細胞接着因子*L1*遺伝子に関する研究

上口は、*L1*細胞内領域に直接結合する細胞骨格関連分子アンキリンBの遺伝子変異動物も、X連鎖性遺伝性水頭症とよく似た症状を呈するため、アンキリンBの役割と*L1*-アンキリンB結合の制御機構について検討した。金村らはX-linked hydrocephalusが疑われた21家系について遺伝子解析を行い、11家系に新規*L1CAM*遺伝子異常を同定した。その発見率は全体で52.5%で、欧米からの報告より高率で

あった。欧米からの報告と比較すると、翻訳領域異常が少なく、調節領域・スプライス部位の異常が多い傾向があった。また翻訳領域の中でも、細胞内領域の異常や細胞外領域のミスセンス異常が少なく、細胞外領域でのtruncationをきたす異常が多かった。これら遺伝子解析の特徴は本邦XLH症例が臨床的に重症であることを示唆していた。

2 ノックアウトマウスの研究

岡野らは神経幹細胞に強く発現するRNA結合蛋白質であるMusashi1（以下、Msi1）のノックアウトマウスが中脳水道狭窄による水頭症を呈することをすでに報告した。msi1の代償作用を有する、第2のmusashi遺伝子であるmusashi2（msi2）をクローニングし、msi1とmsi2のアンチセンス法を用いた機能的なdouble knockout実験を行った。その結果msi1とmsi2は協調して神経幹細胞の増殖あるいは生存維持に必須な役割を担っていることを示した。またMsi1の標的配列とin vivoでの標的分子を検索した。Msi1はin vivoでNotch細胞内アンタゴニストであるm-NumbのRNAと複合体を形成し同分子の翻訳を抑制することによって、Notch-シグナルを活性化することがMusashiファミリー（特にMsi1）の神経幹細胞の生存と自己複製における作用メカニズムであることを示した。

原由・原嘉らはnonmuscle myosin heavy chain II-B（NMHC-B）欠損マウスが胎生12.5日に脳室壁面の局所破壊を示し、その後次第に重度の脳室奇形へと進行し、最終的には第三脳室背側部及び中脳水道の閉塞から水頭症を発症する事を明らかにしてきた。NMHC-B欠損による脳室形成異常の初期過程を明らかにするために、胎生10.5日の正常およびNMHC-B欠損マウスの神経上皮および脳室壁面の微細構造を走査電子顕微鏡で解析した。その結果、NMHC-B欠損マウスでは、神経上皮細胞層内に脳室様の微小管腔を示す異常構造が認められた。またその神経上皮細胞の脳室壁面は、正常マウスと比較すると凸凹が顕著で、広い細胞間隙をもち、脳室壁面の細胞膜に膨隆や微小穿孔が高頻度に認められ、脳室壁の破壊が細胞単位で始まることを明らかにした。

3 免疫組織化学的検索

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、特にradial fiberとの関係からアプローチを行った。胎齢14日の胎仔ラット脳を免疫原として得られたモノクローナル抗体KNY-379を作製し、Radial fiberでの免疫染色性を検討した。本年度はKNY-379抗体によって認識される抗原蛋白の同定を行い、tubulin beta IIである事が判明した。更には最近Reelin receptorの1つとして注目され、cortical plateの形成に重要な役割をはたすとされるvery low density lipoprotein receptor (VLDLR)に対する抗体を作製し、その免疫組織化学的検索を行なった。Tubulin beta IIはヒト発育脳のradial fiberにassociateし、後にgrowing axonやdendriteに分布するようになる。variant VLDL receptorは発育脳第II期においてはmatrix cell, neuroblastsに分布しReelin receptorとして機能していると考えられるが、第III期になるとastrocyte, oligodendrocyte, myelinに分布する。これらの事は、中枢神経系のすべての構成細胞（Radial fiberも含む）が、matrix cellより発生するとする藤田の一元説を支持するものと考えられた。

4 脊髄髄膜瘤におけるキアリ奇形および水頭症の発症機序に関する研究

稲垣らは手術的に作成した脊髄髄膜瘤を有するニトリとマウスを用いて脊髄髄膜瘤に伴うキアリII型奇形と水頭症の発症機序に関して検討した。その結果、キアリ奇形は、胎生初期に存在する脊髄髄膜瘤から髄液が流出し、後頭蓋窩の発達が障害され、くも膜下腔も狭小化し正常の髄液循環動態の発達が妨げられることで生じる可能性のあることが示唆された。

B 遺伝子解析

1 臨床データおよびDNAを集積し水頭症遺伝子バンクを形成

まずこれらの研究にあたってもっとも重要なことは、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、平成11年第1回班会議で水頭症バンクプロトコルを提案し、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。これまでに全国17施設

より207検体を集積している。専任のバンク登録責任者をおき、データの厳正な管理を行なっている。

2 遺伝子解析

L1遺伝子解析については先に述べた。伏木らは全前脳胞症患者5例を対象に、原因遺伝子としてすでに報告されている二つの遺伝子*Sonic Hedgehog* (*SHH*) gene, *ZIC2*に着目し、それらにおける変異を解析した。その結果これまでのところ、両遺伝子中に、疾患原因とみなしうる変異は見出されていない。岡本らは小脳低形成を呈する疾病Dandy-Walker奇形、Joubert症候群、Cranio-Cerebello-Cardiac症候群において候補遺伝子 (*ZIC1*, *Engrailed-2*) の変異を検索した。両遺伝子はそのノックアウトマウスにおいて小脳低形成を生じ、候補遺伝子と考えられる。水頭症バンクに登録された、Dandy-Walker症候群5例、Joubert症候群2例、Cranio-Cerebello-Cardiac症候群1例、原因不明の小脳形成不全2例について検索したが、今回の検索ではアミノ酸置換を伴う変異は検出されなかった。Cranio-Cerebello-Cardiac症候群症例では、ホモボックス内にTTG→CTGの塩基置換を認めたが、Leuをコードすることになりなく、病因ではないと考えられた。小脳形成不全を呈する疾患群は遺伝的異質性を持つと考えられ、さらに検討を続けている。森らはヒト悪性腫瘍の約50%で変異が見いだされている癌抑制遺伝子p53のノックアウトマウスの一部に脳瘤が発生するという報告を受けて神経管閉鎖不全症におけるp53遺伝子の変異を検索を開始している。現在までに解析を行った8例(脳瘤1例、二分脊椎7例)ではp53遺伝子の塩基変異は認められなかった。

3 水頭症症候群の臨床データの分析

金村・山崎らはX連鎖性伴性遺伝性水頭症に関して遺伝型と表現型の相関について分析した。本邦症例にはI群に属するものがなく、II群の割合も相対的に低かった。(本邦18.6%、欧米36.5%)それとは反対に、III群の割合は本邦でやや高かった。(本邦37.2%、欧米33.3%) L1タンパクの表現を考えれば、スプライス異常もIII群と同様であり、III群とスプライシング異常を加えた値は、本邦では高かった。(本邦74.7%、欧米54.4%)。遺伝子解析の結果と同様臨床的表現型でも重症例がほとんどであり、人種の特徴である可能性も示唆された。中川らは多施設共同研究で全前脳胞遺残症29症例について分析した。診断時期は出生前が9例、新生児時期が18例、乳児期以降が2例であった。全前脳胞症の分類では無葉型が6例、半葉型、葉型がそれぞれ11、12例であった。水頭症は全例において認められている。胎児期に全前脳胞症と診断された症例では同時に水頭症も指摘されているが、新生時期に全前脳胞症と診断された18例中11例ではそれよりも早く胎児期に水頭症と診断されている。脳室の進行性の拡大傾向は21例に認められ、4例では認められていない(他4例は無記入)。治療には主としてVP shuntが用いられているが治療効果にはばらつきが認められ、改善14例、不変10例、悪化が1例であった。発達は悪くIQ=100以上はわずかに1例にすぎなかった。

4 葉酸と神経管閉鎖障害発症リスクに関する研究

妊娠初期に葉酸を投与すれば神経管閉鎖障害発症のリスクが低減するという報告が、欧米からなされてきたが、そのメカニズムに関して葉酸代謝酵素5、12methylentetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) の遺伝子異常が関与していると報告されている。本邦ではまだこれについての検討はなされていないので*MTHFR*遺伝子解析を行なった。*MTHFR*遺伝子の677番目のcytosine塩基からthymine塩基への置換(C677T)が発生すれば、この酵素活性が低下し、この遺伝子異常は神経管癒合不全の発生の遺伝的な危険因子として注目されるようになったが、今回坂本らは、脊髄髄膜瘤患児、患者の母親・父親で*MTHFR*遺伝子のC677Tの異常について検索した。homozygoteを持つ頻度はそれぞれ対照群12%、患者15%、患者の母親31%、父親10%で、対照群に対し患者の母親のodds ratioは3.2と有意(p=0.027)に高かった。本邦においても母親の遺伝的危険因子の可能性が示唆された。このことに関して、平成12年11月6日付で班会議として厚生省健康危機管理調整官宛てに健康危険情報通報として、妊娠初期の葉酸投与が神経管閉鎖障害の発生の危険性を減ずることができる可能性について報告した。

C 先天性水頭症の全国疫学調査の実施と分析

森竹らは厚生科研（特定疾患対策研究事業）特定疾患の疫学に関する研究班（主任研究研究者 稲葉裕）と共同で先天性水頭症の全国疫学調査を行った。出生前（胎児期）あるいは出生後1年以内に診断された先天性水頭症患者のうち、1999年1年間（1999年1月1日～12月31日）に受診した患者（新規、再来を含む）を対象とした。対象とした2440施設中、1861施設から返送があった（返送率76.3%）その結果1999年1年間の全国病院の推計受診患者数は出生前診断患者が770例（95%信頼区間720～820）、出生後患者が620例（95%信頼区間560～690）となった。2次調査結果についても現在分析中である。

D 先天性水頭症の診断および治療プロトコールの作製にむけて

1 精度の高い出生前診断法の開発

久野・秦らは妊娠17週から37週までのCNS奇形を持つ胎児14例を対象として、三次元超音波診断装置を用いて胎児中枢神経系（CNS）奇形における頭蓋内構造を描出し、従来の二次元超音波法との比較、検討を行った。三次元超音波法は胎児CNS奇形を出生前診断するうえで二次元超音波法を補助する優れた手段であることが示唆された。また金西・秦らはカラードブラを併用した超音波ドブラ法を用い、中枢神経奇形（ガレン動静脈奇形・Dandy-Walker症候群・小脳低形成・全前脳胞症・水頭症の胎児頭蓋内血流計測血流速度波形を計測し、正常胎児と比較検討し形態異常に加えより正確な病態把握への貢献について検討した。

2 出生前診断された水頭症の予後評価及び分析

(イ) 水頭症の発症時期の分析

下川・林らは先天性水頭症の胎内での発生時期を予測するために脳梁の形態を脳梁欠損型・脳梁部分欠損型・脳梁損傷重症型・脳梁損傷軽症型に分けて、シャント手術がなされた43例の先天性水頭症についてIQ・DQ検査を検討した。先天性水頭症43例の機能評価は、水頭症発症時期でそれぞれ早期26.7・中期均23.5・後期E32.0・後期L65.3で、水頭症発症時期が早いほど予後不良の傾向が認められた。また、予後に関連する因子としては在胎週数・頭囲・胎児仮死・呼吸窮迫症候群・症候性てんかん・再手術の回数・細胞移動障害などを指摘した。

(ロ) 水頭症の治療時期の分析

佐藤倫・佐藤博らは胎児超音波検査により脳室拡大を認め計画的早期出生した水頭症児について合併症、予後を中心に検討した。対象は11例で、出生時期は平均35週2日（32週1日から38週0日）、出生体重は平均2489g（1800gから3310g）。予後は手術時期が妊娠35週以下の症例が38週以上の例と比較し良好な傾向にあった。

(ハ) 治療効果の分析のためのモデルマウス

田代らは新生児ラットに初めて、明確に識別可能な急性と亜急性の2種類の水頭症モデルを作成し、この2つの水頭症モデルにおける臨床症状と高次脳機能をつかさどる神経伝達系機能障害の差異について検討した。

E 患者団体・家族への遺伝等に関する理解を深めるために

平成12年8月19日から20日に日本二分脊椎・水頭症研究振興財団と共催で国際二分脊椎・水頭症シンポジウム・患者のための集いを開催した。開催にあたっては特定疾患に関する評価研究班に開催補助申請を行い採択され補助を受けた。台湾と韓国から2名の、国内からは12名の講師を迎え、遺伝や出生前診断等に関する講演や医療相談などを22都道府県から325人の患者・家族に対して行なった。（p95参照）

考 察

多くの先天性疾患において分子生物学的メカニズムは解明され、すでに通常医療として診断に用いられ、治療への応用の試みが開始されているものもある。しかしながら水頭症の原因は多様であると考えられ、また症例が集約されなかったことにより、このようなアプローチが遅れてきた。水頭症研究に分子遺伝学的アプローチを取り入れ、基礎・臨床・病理・臨床遺伝・疫学の研究者が、一堂に会して、nation-wideに集積されたDNAバンクを中心とした研究組織は、世界でも類を見ない画期的なものである。

葉酸代謝酵素*MTHFR*の遺伝子解析は先日厚生省より通達された「神経管閉鎖障害の発症リスク低減のための妊娠可能な女性等に対する葉酸の摂取に係わる適切な情報提供の推進について」の本邦での推進のデータ裏付けになっていく重要な研究である。

今後の方向性

本年度の研究計画を、水頭症治療プロトコル作成を目標に、全国疫学調査2次調査の分析、水頭症バンクでの遺伝子解析と臨床分析より遺伝型と表現型の解析、原因分子の機能解析、およびノックアウトマウス解析、病理学的免疫組織学的検索、などにわけてすすめていく。葉酸代謝酵素*MTHFR*の遺伝子異常の更なる大規模調査を行い、わが国における妊娠初期での葉酸投与の有効性に関するデータを提供していく。

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。そのため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『先天性水頭症患者・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。

神経接着分子L1の細胞内領域の機能解析 －細胞骨格関連分子アンキリンBとの結合－

理化学研究所 脳科学総合研究センター

上 口 裕 之

研究要旨

ヒトX連鎖性遺伝性水頭症の原因遺伝子産物として注目されている神経接着分子L1は、主として発生過程の神経細胞に発現し、神経細胞移動・軸索ガイダンス・軸索伸長に重要な役割を担っている。L1細胞内領域に直接結合する細胞骨格関連分子アンキリンBの遺伝子変異も、X連鎖性遺伝性水頭症に酷似した神経軸索路の形成不全を示すことが動物実験により明らかにされている。そこで、神経軸索の形成・伸長過程におけるアンキリンBの役割を解析した。培養細胞を用いた実験系により、L1細胞内領域とアンキリンBの結合がL1依存性細胞接着により誘起され、アンキリンBはL1依存性軸索突起形成過程に必要な機能分子であることが明らかになった。以上、L1細胞内領域アンキリン結合部位の遺伝子変異によるX連鎖性遺伝性水頭症の発症機序を示唆する知見を得た。

A. 研究目的

神経接着分子L1は主として発生過程の神経細胞に発現し、神経細胞移動・軸索ガイダンス・軸索伸長に重要な役割を担っている⁽¹⁾。ヒトでのL1遺伝子異常に特徴的な臨床・病理所見として、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・小脳虫部低形成などがあげられる⁽²⁾。L1ノックアウトマウスもこれに類似した表現型を示す⁽³⁾。水頭症および精神発達遅滞の重症度と生存率は、ヒトL1遺伝子変異の部位・タイプと強い相関がある⁽⁴⁾。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。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細胞内領域も重要な役割を担っていることが示唆されている。

Vann Bennettらの生化学的実験により、L1細胞内領域

は細胞骨格関連分子であるアンキリンBと直接結合することが証明されている⁽⁵⁾。アンキリンBノックアウトマウスはL1ノックアウトマウスと同様、脳室拡大および脳梁・錐体路低形成を伴うことから、L1とアンキリンBとの結合の機能的重要性が示唆されている⁽⁶⁾。本研究は、L1細胞内領域とアンキリンBの結合の制御機構とその生物学的意義を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1. 実験動物および試薬

アンキリンBノックアウトマウスおよび440-kDアンキリンB cDNAはVann Bennett教授 (Howard Hughes Medical Institute, Duke University, USA) より供与された。アンキリンBノックアウトマウスの遺伝子型の判定はPolymerase chain reaction法により行った⁽⁶⁾。440-kDアンキリンB cDNAをpEGFP-N1 (Clontech) のマルチクローニングサイトへ挿入し、440-kDアンキリンBのC末端側にenhanced green fluorescent protein (EGFP) を付加した融合蛋白の発現ベクターを得た。ヒトL1 cDNAお

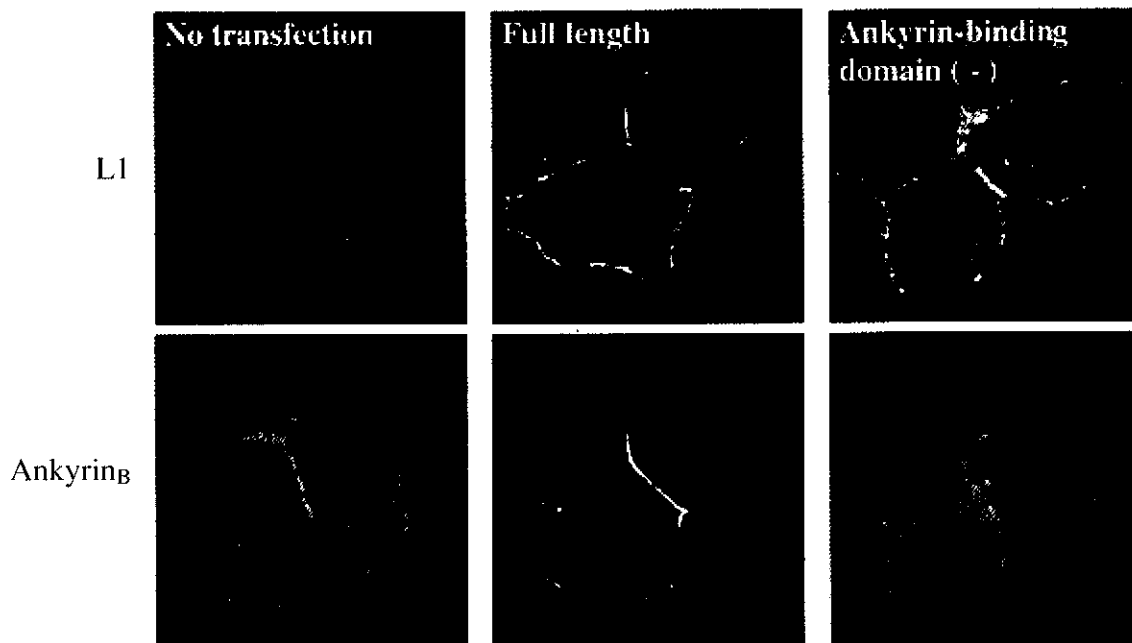


図1 L1 (野生型あるいは変異型) およびアンキリンB-EGFPを遺伝子導入した293細胞の共焦点蛍光像。L1の発現は間接蛍光抗体法により可視化し、アンキリンBの局在はEGFPの蛍光シグナルの検出により可視化した。図に示した293細胞培養系は全てコンフルエントの状態であるが、L1あるいはアンキリンB陽性細胞のみが可視化されている。L1を発現しない293細胞では、アンキリンBは細胞質内にはほぼ均一に分布する。Full-length L1を発現する293細胞同士の接着面にはアンキリンBの強い集積が認められたが、L1発現細胞とL1非発現細胞との接着面にはアンキリンBの集積は認められなかった。アンキリン結合ドメインを欠失したL1を発現する293細胞では、細胞接着面においてもアンキリンBの強い集積は認められなかった。

よびウサギポリクローナル抗ヒトL1抗血清はVance Lemmon教授 (Case Western Reserve University, USA) より供与された⁽⁷⁾。ニワトリN-カドヘリンとヒトIgG Fcフラグメントの融合cDNAはPatrick Doherty教授 (King's College, United Kingdom) より供与された⁽⁸⁾。L1-Fc 融合蛋白およびN-カドヘリン-Fc 融合蛋白は、それぞれのcDNAを遺伝子導入したCOS細胞の培養上清から精製した⁽⁹⁾。

2. 293細胞への遺伝子導入と免疫蛍光染色

ヒトL1および440-kDアンキリンB-EGFPの293細胞への遺伝子導入は、FuGENE6 transfection reagent (Roche) を用いて行った。遺伝子導入36時間後に、4%パラフォルムアルデヒドにて固定し、細胞表面のL1を抗ヒトL1抗血清およびAlexa 594標識2次抗体 (Molecular Probes) で可視化した。L1およびアンキリンB-EGFPの局在は、Bio-Rad共焦点顕微鏡 Radiance 2000 (Argon / Kryptonレーザー) により解析した。

3. マウス脊髄後根神経節細胞培養と軸索突起形成・伸長の解析

生後0日齢のマウスの脊髄後根神経節を無菌的に摘出し、DispaseおよびDNaseにて分散後、L1-Fc、N-カドヘリン-Fcあるいはラミニン (Gibco) をコートしたスライドガラス上に培養した。4%パラフォルムアルデヒドにて固定後、神経突起形成の有無および神経突起の長さを解析した。

C. 研究結果

1. L1細胞内領域とアンキリンBの結合制御

アンキリンBは、多くの膜蛋白の細胞内領域と結合すると同時に、スペクトリン-アクチン骨格とも結合する。これによりアンキリンBは、細胞表面の機能分子と細胞骨格とを結ぶリンカー分子として機能する。L1細胞内領域のC末端側にアンキリン結合ドメインが同定されているが⁽¹⁰⁾、このL1-アンキリンBの結合の制御機構に関しては不明な点が多い。そこで293細胞にL1およびアンキリンB-EGFPを共発現させ、アンキリンBの細胞内局在を解析した (図1)。L1を発現しない293細胞では、アンキリンBは細胞質内にはほぼ均一に分布する。Full-length

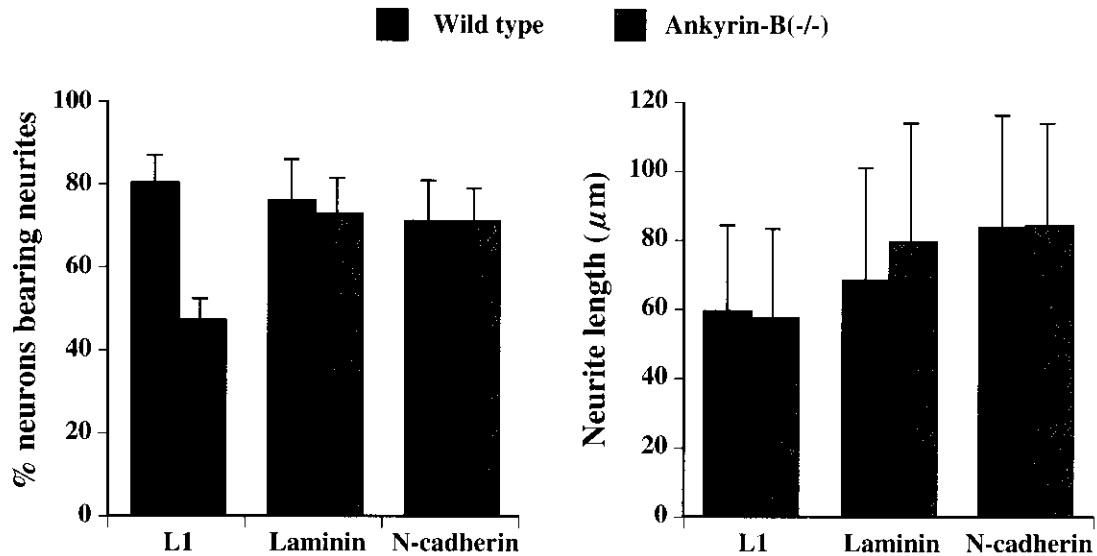


図2 野生型あるいはアンキリンBノックアウトマウス由来脊髄後根神経節細胞培養系における軸索突起形成・伸長の定量（平均値±標準偏差）。アンキリンBノックアウトマウスではL1依存性軸索突起形成能は有意に低下していたが、ラミニンあるいはN-カドヘリン基質上での軸索突起形成能には変化は認められなかった。アンキリンB遺伝子ノックアウトは、いずれの培養基質上においても軸索突起伸長能には影響をおよぼさなかった。

L1を発現する293細胞同士の接着面にはアンキリンBの強い集積が認められたが、L1発現細胞とL1非発現細胞との接着面にはアンキリンBの集積は認められなかった。アンキリン結合ドメインを欠失したL1を発現する293細胞では、細胞接着面においてもアンキリンBの強い集積は認められなかった。以上の結果より、1) 細胞接着面へのアンキリンBの集積はL1細胞内領域のアンキリン結合ドメインを必要とすること、2) アンキリンBとL1細胞内領域との結合はL1細胞外領域を介する細胞接着により誘起されることが明らかとなった。

2. L1依存性軸索突起形成・伸長過程におけるアンキリンBの役割

X連鎖性遺伝性水頭症における神経軸索路形成不全がL1細胞内領域の遺伝子変異によって引き起こされ得ること、およびアンキリンBノックアウトマウスも同様の神経軸索路形成不全を示すことから、神経軸索路の発生過程におけるL1細胞内領域とアンキリンBの結合の重要性が示唆される。そこで、アンキリンBノックアウトマウス由来培養神経細胞を用いて、L1依存性軸索突起形成および伸長を解析した（図2）。培養開始12時間後の脊髄後根神経節細胞からの軸索突起形成を解析したところ、野生型神経細胞に比較してアンキリンBノックアウト神経細胞では軸索突起を有する神経細胞の割合が有意に低下していた。培養開始2、4、8時間後も同様の結

果であった。しかしながら、培養開始12時間後における軸索突起の長さには、野生型とアンキリンBノックアウト間で有意差を認めなかった。以上の結果より、L1依存性軸索突起形成過程におけるアンキリンBの重要性が明らかとなった。小脳顆粒細胞培養系でも同様の結果が得られた。

D. 考察

1980年代には、神経接着分子の細胞外領域を介する細胞接着の強弱が、細胞移動あるいは神経突起伸長の速度・方向を制御する重要な因子であると考えられていた。しかし1990年頃からは、神経接着分子の細胞内領域を介するシグナル伝達の重要性も指摘されるようになった。神経接着分子の細胞内領域と細胞骨格との結合は、その接着分子による細胞接着能および細胞内シグナル伝達の両者を制御しうるプロセスであり、接着分子と細胞骨格には極めて密接な機能的関連性が存在する。L1細胞内領域には2カ所のアクチン骨格結合部位が同定されている。C末端側の領域はアンキリンを介してアクチン-スベクトリン骨格と結合し⁽¹⁰⁾、細胞膜貫通領域近傍部は何らかのリンカー分子を介してアクチンストレス線維と結合する⁽¹¹⁾。しかしながら、L1と細胞骨格との結合の制御機構および神経発生過程における機能的意義に関しては不明な点が多い。

L1細胞内領域アンキリン結合ドメイン内のアミノ酸点変異 (Y1229H) は神経軸索路形成不全を伴うX連鎖性遺伝性水頭症を引き起こすことから⁽¹²⁾、L1とアンキリンの結合の機能的重要性が強く示唆された。そこで、培養細胞を用いた実験系により、L1とアンキリンの結合の制御機構および神経突起の形成・伸長過程における役割を解析した。L1とアンキリンGとの結合はL1細胞外領域へのリガンド結合を必要としないが(上口ら、未発表)、L1とアンキリンBとの結合はL1細胞外領域ホモフィリック結合により誘起された。L1細胞外領域を介するヘテロフィリック結合によるL1-アンキリンB結合制御に関しては、現時点では結論は得られていない。脊髄後根神経節細胞および小脳顆粒細胞の培養系を用いた実験により、アンキリンBはL1依存性軸索突起形成過程に必要な分子であることが判明した。以上により、ホモフィリックL1結合により誘起されるL1-アンキリンB結合は、神経細胞体から軸索突起が形成される過程で重要な役割を担っていることが強く示唆された。

現在、米国Case Western Reserve UniversityのVance Lemmon教授との共同研究により、L1細胞内領域の各機能ドメインを部分欠失した変異型L1を発現するマウスを作成・解析中である。これにより、L1細胞内領域と細胞内機能分子との相互作用の役割を個体レベルで明らかにしていく。

E. 結論

本研究により、1) 神経接着分子L1と細胞骨格関連分子アンキリンBの結合はL1細胞外領域ホモフィリック結合により誘起されること、2) L1依存性軸索突起形成過程におけるアンキリンBの重要性が明らかとなった。これらの知見は、L1細胞内領域アンキリン結合ドメインの遺伝子変異によるX連鎖性遺伝性水頭症およびアンキリンBノックアウトマウスにおけるX連鎖性遺伝性水頭症様奇形の発症機序の理解に貢献するものと考えられた。

F. 文献

- 1) Kamiguchi H, Lemmon V: IgCAMs: bidirectional signals underlying neurite growth. *Curr Opin Cell Biol* 2000, 12:598-605.
- 2) Kamiguchi H, Hlavin ML, Yamasaki M, Lemmon V: Adhesion molecules and inherited diseases of the human nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1998, 21:97-125.
- 3) Kamiguchi H, Hlavin ML, Lemmon V: Role of L1 in neural development: what the knockouts tell us. *Mol Cell Neurosci* 1998, 12:48-55.
- 4) Yamasaki M, Thompson P, Lemmon V: CRASH syndrome: mutations in L1CAM correlate with severity of the disease. *Neuropediatrics* 1997, 28:175-8.
- 5) Davis JQ, Bennett V: Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules. *J Biol Chem* 1994, 269:27163-6.
- 6) Scotland P, Zhou D, Benveniste H, Bennett V: Nervous system defects of AnkyrinB (-/-) mice suggest functional overlap between the cell adhesion molecule L1 and 440-kD AnkyrinB in premyelinated axons. *J Cell Biol* 1998, 143:1305-15.
- 7) Hlavin ML, Lemmon V: Molecular structure and functional testing of human L1CAM: an interspecies comparison. *Genomics* 1991, 11:416-23.
- 8) Schnadelbach O, Blaschuk OW, Symonds M, Gour BJ, Doherty P, Fawcett JW: N-cadherin influences migration of oligodendrocytes on astrocyte monolayers. *Mol Cell Neurosci* 2000, 15:288-302.
- 9) Fransen E, D'Hooge R, Van Camp G, Verhoye M, Sijbers J, Reyniers E, Soriano P, Kamiguchi H, Willemsen R, Koekkoek SK, 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* 1998, 7:999-1009.
- 10) Zhang X, Davis JQ, Carpenter S, Bennett V: Structural requirements for association of neurofascin with ankyrin. *J Biol Chem* 1998, 273:30785-94.
- 11) Dahlin-Huppe K, Berglund EO, Ranscht B, Stallcup WB: Mutational analysis of the L1 neuronal cell adhesion molecule identifies membrane-proximal amino acids of the cytoplasmic domain that are required for cytoskeletal anchorage. *Mol Cell Neurosci* 1997, 9:144-56.
- 12) Van Camp G, Fransen E, Vits L, Raes G, Willems PJ: A locus-specific mutation database for the neural cell adhesion molecule L1CAM (Xq28). *Hum Mutat* 1996

厚生科学研究費補助金「難治性水頭症」調査研究班
分担研究報告書

Musashi1 (Msi1) の機能解析および 同ノックアウトマウスにおける水頭症発症機序の解析

大阪大学医学研究科 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

岡野 栄之^{1,6} 今井 貴雄^{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} 榊原 伸^{1,6}

研究要旨

Musashi1 (以下、Msi1) は、神経幹細胞に強く発現するRNA結合蛋白質である。同遺伝子のノックアウトマウスは、水頭症を示す。同マウスにおいては、中脳水道狭窄部において神経幹細胞活性があることが知られている上皮細胞の形態と数に異常があることが明らかとなった。しかし本来*msi1*が強く発現している胎生期においては、有意な表現型が認められないことから、第2の*musashi*遺伝子による代償作用が働いていることが示唆された。そこで第2の*musashi*遺伝子である*musashi2* (*msi2*) をクローニングした。

次に神経幹細胞の培養系であるneurosphereの系において*msi1*と*msi2*のアンチセンス法を用いた機能的なdouble knockout実験を行ったところ、*msi1*と*msi2*は協調して神経幹細胞の増殖あるいは生存維持に必須な役割を担っていることが示唆された。Musashiファミリー (特にMsi1) の神経幹細胞の生存と自己複製における作用メカニズムを明らかにするために、Msi1の標的配列と*in vivo*での標的分子を検索したところ、Msi1は*in vivo*でNotch細胞内アンタゴニストであるm-NumbのRNAと複合体を形成していることが明らかとなった。またMsi1はm-Numb mRNAの3'UTRと結合し、同分子の翻訳を抑制するとともに、Notch-シグナルを活性化することが示された。このNotch-シグナルの活性化は、Msi1による神経幹細胞の生存と自己複製能の活性化をよく説明できるものと考えられる。今後、同ノックアウトマウスにおける水頭症の発症との関連についての検討が必要である。

A. 研究目的

ヒトを含む哺乳類の中樞神経系は、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトといった多様な細胞集団から構成されている。発生過程において、多分化能と自己再生能力を有する神経幹細胞 (図1) から、非対称性分裂や分泌性因子を含む巧妙な細胞間相互作用の結果として、適切な数のこれらの多様な細胞系列に統する細胞群が生じてくる。胎生期にこの神経幹細胞の増殖と

分化の過程に異常が生ずると、無脳症あるいは二分脊椎症のような神経管閉鎖不全症 (Neural Tube Defect) を来す。また、神経幹細胞は胎生期ばかりでなく、ヒトを含む成体哺乳動物の脳にも存在することが明らかになっている (図2)。これらの事実は、神経発生の機構解明への寄与すると同時に、神経幹細胞の中樞神経機能再生に向けての臨床応用が期待される。さて幹細胞が存在しながらも成人中樞神経系の再生能力が低いのは何故か? ということを考えてみると、1. 内在性の神経幹細胞から

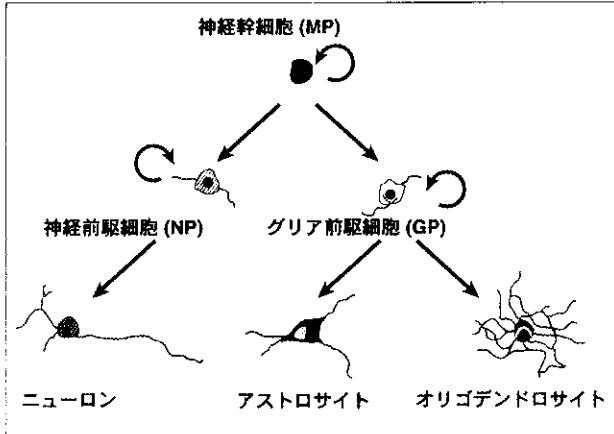


図1 神経幹細胞と分化系譜：神経幹細胞は神経前駆細胞やグリア前駆細胞などの中間の前駆細胞を介してニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへ分化していく（多分化能）。また、多分化能を有しながら未分化状態で分裂できる（自己複製能）。

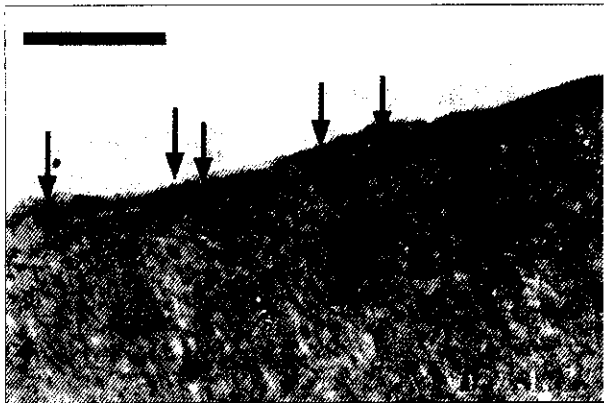


図2 成人脳における神経幹細胞：脳室下帯／上皮細胞層にMsi1陽性細胞が見られる。

のニューロン新生が抑制されている。2. 神経幹細胞の絶対数が不足している。という2つの理由が考えられ、これを克服し、損傷した成体の哺乳類中枢神経系の機能修復を行うためには、神経幹細胞の自己複製と分化調節機構を解明するとともに、神経幹細胞の分離法を確立し、損傷部位へ導入することが重要であるものと考えられた。この前半の目的のため、さらに神経管閉鎖不全症の分子機序を明らかにするために、我々は、Msi1およびNotchシグナルを中心に神経幹細胞の自己複製とfate determinationに関する解析を推し進めている。

B. 研究方法

[Neurosphere assayによる神経幹細胞活性の検討]

胎生14.5日終脳細胞を用いた定法(図3)に従ってneurosphere formation assayを行った。培養液はDMEM/F-12

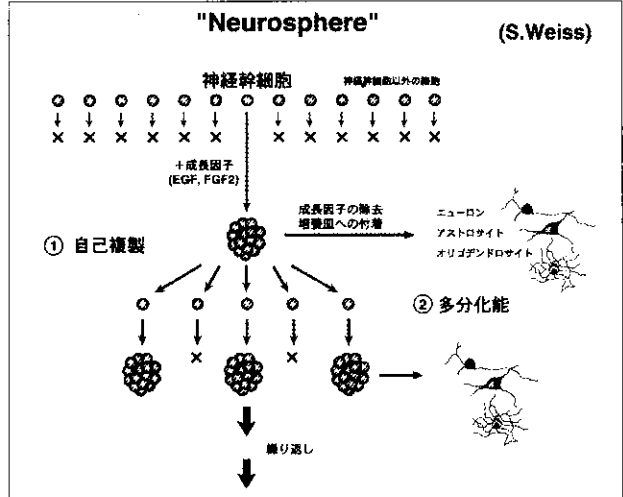


図3 Neurosphere形成法

(1:1) (GibcoBRL) に増殖因子としてbFGF 10 ng/ml、EGF 20 ng/ml、補助因子としてheparin 2 μg/mlを添加したものを、 1×10^5 cells/mlの細胞密度で一週間浮遊培養したのち形成されたneurosphere数を計測した。またこのようなneurosphereを集めて0.25% trypsin EDTA処理により単一細胞に分散し、 2.5×10^3 cells/ml (500 cells/0.2ml/well, 96well plate) で再び浮遊培養することを繰り返し継代培養を行った。分化アッセイにおいては、疎水性コーティング付きスライドガラス (Weaton) 上の半径4 mmの培養スペースを接着基質 (polyethylenimine) でコーティングし、各スペースにneurosphereをひとつずつ移植し、増殖因子を含まず1%のウシ胎児血清を含む分化誘導培地で培養した。一週間の培養後、4%パラホルムアルデヒド/PBSで10分間固定し、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトのマーカーとしてそれぞれanti TuJ1 (Berkley antibody company, 1:200希釈)、anti GFAP (DAKO, 1:10希釈)、anti O4 (Boehringer, 1:10希釈) を用いて定法2) に従い三重染色を行った。

[アンチセンス法によるmsi1とmsi2のfunctional double knock outの試み]

in vitroでmsi2遺伝子の発現を阻害するために開始コドン近傍の17あるいは16塩基に対応するmsi2 mRNAのアンチセンス鎖をPNA (asPNA) により合成した (PE biosystems)。末端に細胞の透過性を高めるためのLys残基を付加した。胎生14.5日終脳細胞を用いて一週間の浮遊培養によってprimary neurosphereを形成し、前述の方

法で一回継代し、同時にasPNAを添加し、4日後に形成されたsecondary neurosphereの数を計測した。

[Msi1の標的RNAの同定]

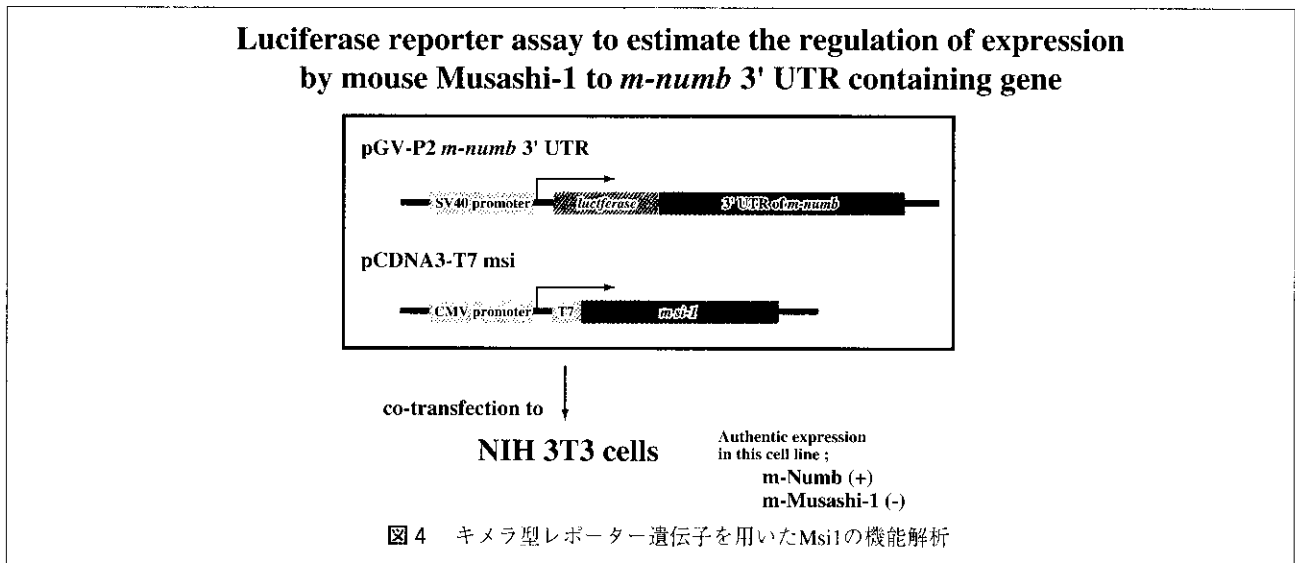
既報のRNA in vitro selection法に従い、Msi1の標的配列を同定した。ここで決定した配列を有すること、Msi1タンパク質とのin vivoでの同一細胞内でのco-localizationから、m-Numb mRNAがMsi1蛋白質のin vivo targetのひとつあると考え、免疫沈降実験とRT-PCR法により、Msi1蛋白質とm-Numb mRNAのin vivoでの結合を検討した。

[m-Numbの翻訳制御]

Msi1の標的配列と考えられる部分を含むm-Numb mRNAの3'-UTR部分に相当するcDNA断片をFirefly由来 luciferase cDNAのコーディング領域の3'側に連結させ、SV40プロモーター下におくキメラ型レポーター遺伝子を作製した。同レポーター遺伝子を、Msi1発現ベクターとともにNIH3T3細胞に導入し、Msi1の発現量依存的なluciferase活性を測定するとともにレポーター遺伝子由来の転写産物量を定量した(図4)。対照実験として1) RNA結合能のない変異型Msi1発現ベクターの導入をおこなう、2)あるいはm-Numb mRNAの3'-UTR部分を含まないレポーター遺伝子を使用した。

における機能解析を行った。

[Msi1ノックアウトマウスの作成と水頭症の表現型の解析]：*msi1*遺伝子欠損マウスのホモ接合体の出生前の胎児の剖検、組織学的観察からは*msi1*遺伝子欠損マウスにおける顕著な異常は観察されなかった。神経幹細胞の増殖や分化が活発で、Msi1の発現が最も高い胎生期の脳室周囲部のventricular zone (VZ)や脳室下帯のsubventricular zone (SVZ)においても組織構築の異常を認めることはできなかった。しかし出生後約一週齢でホモ接合体では頭部の膨大が始まり2-3週齢までにドーム型の頭部を特徴とする水頭症を高頻度で(ホモ接合体の約70-80%の個体)発症した。*msi1*遺伝子欠損マウスは高頻度で出生後水頭症を発症し、重篤な個体は約12ヶ月で死亡した。水頭症を発症した成体個体を組織学的に解析した結果、側脳室の対称性の激しい拡大、大脳皮質の薄化、白質、灰白質の浮腫を伴う実質の欠損、中隔の低形成が観察された。また頭蓋内圧の亢進によると考えられる嗅球、小脳、海馬の吻側、尾側方向への圧迫変性も観察された。拡大した側脳室上衣は一部破綻しており、上衣細胞の消失、上衣下海綿状変化が顕著であった。より症状が軽度の個体でも透明中隔腔の拡大を伴う側脳室の拡大が観察された。このような側脳室拡大と上衣の破綻、上衣下海綿状変化を伴う実質欠損は生後3日目の側脳室前角部周囲(特にSVZ領域)で開始さ



C. 結果・考察

Msi1は、我々が同定したRNA結合性蛋白質であり神経幹細胞に強く発現している。このMsi1の神経幹細胞

れる。次に、本水頭症の発症機序をより詳細に調べるためにより早期の日齢で組織学的検索を行った。その結果生後0日目で第三脳室から中脳水道への入り口の領域に、中脳水道上衣細胞のとポリープ形成、中脳水道内腔

の狭窄が認められた。中脳水道狭窄部位においては、上衣細胞の数の著しい減少と形態異常が観察された。*msi1* 遺伝子欠損マウスの水頭症は、出生後の中脳水道上衣細胞の数の減少、分化異常に伴う中脳水道の狭窄、閉鎖による脳脊髄液の循環傷害に起因する可能性が示唆された。この脳脊髄液の貯留が次に側脳室拡大、および前角部での上衣の破綻と、浮腫による上衣下実質の欠損を引き起こし、巨頭症を伴う水頭症が発症すると考えられる。興味深いことに最近のFrisenのグループの解析によると、生後の中脳水道領域における上衣細胞は、神経幹細胞活性を有していることが明らかとなっている。今後、*msi1*欠失につき、神経幹細胞活性の維持の視点から水頭症の発症機構についてアプローチしていきたいと考える。

しかしながら、*msi1*が胎生期において強く発現するものの、胎児期において顕著な異常が認められないことから、別の遺伝子産物が*msi1*の欠損を代償しているものと考え、次に第2の*musashi*遺伝子*msi2*のクローニングを行った。

[アンチセンス法による*msi1*と*msi2*のfunctional double knock outの試みと神経幹細胞機能の検討]：初代培養系を用いることにより*msi1*遺伝子欠損マウスの神経幹細胞の性質を詳細に検討した。まずneurosphere法を用いて神経幹細胞の数および自己複製能を検討した。神経系の幹細胞は増殖因子存在下で浮遊培養することにより、neurosphereと呼ばれる球状の細胞塊を形成することが知られている。一定数 (1×10^5 細胞) の胎生14.5日終脳細胞に由来するneurosphereの数は野生型および*msi1*遺伝子欠損マウスで差はみられず、約10回の継代によっても再びneurosphereを形成することから、*msi1*遺伝子単独欠損によって神経幹細胞の数と自己複製能は変化しないことが明らかとなった。

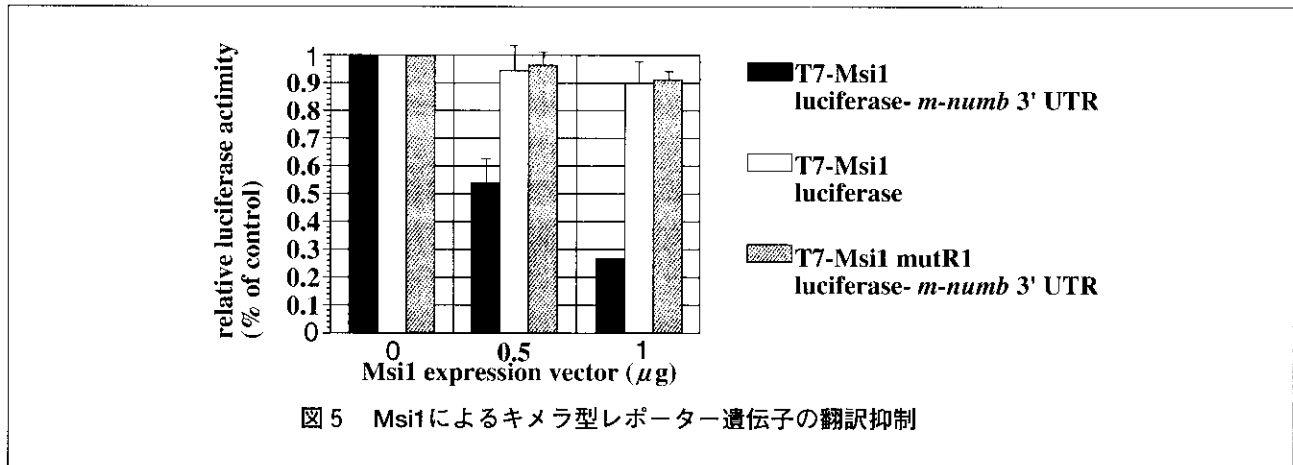
*msi1*および*msi2*遺伝子は重複した発現パターンを示しており、これらふたつの遺伝子が協同して神経幹細胞の性質を維持している可能性も考えられたため、*msi1*遺伝子欠損マウスのneurosphere assayにおいて*msi2*遺伝子の機能をアンチセンス (antisense peptide nucleic acids; asPNA) で抑制することにより、*msi1*、*msi2*両遺伝子を抑制した場合の神経幹細胞の性質を検討した。細胞は添

加した*msi2*のasPNAの濃度に依存してneurosphereの形成能を低下させることが明らかとなった。これに対して同腹の野生型由来の神経幹細胞は*msi2*のasPNAの濃度には関わらず一定のneurosphereを形成していた。よって*msi1*と*msi2*は協調して神経幹細胞の増殖あるいは生存維持に必須な役割を担っていると考えられた。

[Msi1の標的RNAの同定]：さらに、Msi1の神経系幹細胞における役割を推定する別のアプローチとして、我々RNA結合蛋白質としてのMsi1蛋白質に着目し、Msi1蛋白質が結合し制御していると考えられる下流標的RNAの同定を試みた。まずMsi1組み換え蛋白質が結合するRNAのコンセンサス配列をin vitroのSELEX法により明らかとし、その結合特性をゲルシフト法等により検討した。その結果、Msi1は特定のRNA配列 (G/A) UnAGU, n=2 or 3に強く結合することが明らかとなった ($K_d \sim 10^{-9} M$)。興味深いことに、このコンセンサス配列はMsi1と同様に神経系の前駆細胞に発現し細胞系譜の形成に関与していると考えられるm-NumbやHuB mRNAの3'-UTRに存在することが明らかとなった。さらにin vitroの系である filter binding assay等により、これらのmRNAの3'-UTRはMsi1蛋白質と相互作用することが確認された。

さらにNIH-3T3細胞に*msi1*遺伝子を導入し、免疫沈降後、沈降産物中にm-Numb mRNAが存在するかどうかを検討した結果、Msi1蛋白質とm-Numb mRNAはin vivo (細胞内)で複合体を形成していることが明らかとなった。

[m-Numbの翻訳制御とNotchシグナルにおけるMsi1の機能解析]：assayに用いたNIH3T3細胞においては、内在性のMsi1蛋白質が発現しておらず、外来性に発現させたMsi1遺伝子産物の効果を感度よく検討することができると考えられる。luciferase-mNumb 3' UTRキメラレポーター遺伝子由来のLuciferase活性は、外来性のMsi1の導入量依存的に低下することが明らかとなった。しかしながら、luciferase-mNumb 3' UTRキメラレポーター遺伝子由来の転写産物の量は、外来性のMsi1の導入量にかかわらず、一定であった。また、RNA結合能のない変異型Msi1発現ベクターの導入をおこなう、2)あるいはm-Numb mRNAの3'-UTR部分を含まないレポーター遺伝子を使用した対照実験では、Luciferase活性、レポー



ター遺伝子由来の転写産物の量とも一定であった (図5)。また、NIH3T3細胞に組み換えアデノウイルスベクターを用いてMsi1を強制発現させたところ、内在性のmNumb蛋白質の発現量が低下することが明らかとなった (未発表データ)。

このことは、Msi1蛋白質がm-Numb mRNAの3'-UTR部分に結合し、同RNAの翻訳を抑制していることを示唆する。

m-Numbは細胞内Notchアンタゴニストであるため、Msi1はm-Numbの翻訳抑制を介してNotchシグナルを活性化しているものと予想された。そこでHes1-luciferase活性を指標に、活性化型NotchとともにNIH3T3に導入した外来性Msi1によるNotchシグナルへの影響を検討したところ、外来性Msi1はNotchシグナルを活性化させることが明らかとなった。Notchシグナルは、神経幹細胞の生存と自己複製能に必須の役割をしているため、Msi1,2の機能的double ノックアウトによりneurosphereの形成効率の低下、すなわち神経幹細胞の生存と自己複製能が低下することは、これでよく説明できる。今後、これらとMsi1ノックアウトマウスにおける上衣細胞の異常や水頭症発症機構との関連につき検討したい。

D. 結論

Msi1は、RRM型のRNA結合ドメインを2つN末端側に有する塩基配列特異的に結合する。In vitro selection法により、その結合配列を探索し、1) Msi1蛋白質は、G/A Un AGUという配列とin vitroで高い親和性で結合すること、2) Msi1蛋白質とm-Numb mRNAはin vivoで複合体を形成していること、3) Msi1蛋白質はm-Numbの翻訳を抑制することが明らかとなった。m-Numbは、

Notch-シグナルの細胞内アンタゴニストであるため、Msi1蛋白質はm-Numbの翻訳抑制を介し、Notchシグナルを活性化するものと考えられる。この可能性は、Hes1-luciferaseを用いたレポーターアッセイから支持された。また、Musashi蛋白質のKOマウスやantisense ablationを用いた機能阻害実験から、Musashi蛋白質は神経幹細胞の自己複製能の維持に重要な働きをしていることが示唆された。このことは、Msi1によるNotch-シグナルの活性化による機能であるものと考えられた。今後この遺伝子カスケードをmanipulateすることにより、内在性神経幹細胞の活性化を引き起こすことが可能になるものと期待される。

尚、Msi1欠失変異マウスは、中脳水道領域における上衣細胞の形態と数の異常により遺伝性的水頭症を示す。興味深いことに最近のFrisenのグループの解析によると、中脳水道領域における上衣細胞は、神経幹細胞活性を有していることが明らかとなっている。今度、Msi1欠失につき、神経幹細胞活性の維持の視点から水頭症の発症機構についてアプローチしていきたいと考える。