

NMHC-Bミオシン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

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 由紀子 原 嘉 信

研究要旨

マウスの脳室形成は、胎生8.5日神経板の腹側正中部で神経溝の形成に始まり、左右神経板が背側正中で融合し神経管となり、胎生12.5日には、側脳室、第三脳室、中脳水道、第四脳室、脊髄中心管の基本構造が確立する。この時期にnonmuscle myosin heavy chain II-B (NMHC-B)は、神経上皮の脳室壁面と軟膜下壁面に強く発現し、脳胞および脳室の形態形成に重要な役割を持つことが示唆される。これまで我々は、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部およ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。これらの結果は、水頭症の一次原因として胎生初期の脳室形成異常を強く示唆している。本報告では、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。

A. 研究目的

脳脊髄液の循環する脳室系は、神経板が背側正中で融合し、神経管の内腔が巧妙にその形を変化させて形成される。一層の神経上皮細胞が、多層化し複雑な脳実質へと発生していく過程で、分裂期の神経上皮細胞は、脳室壁面と軟膜下壁面の間で、細胞周期に同調してエレベーター運動し、神経細胞やグリア細胞へと分化する事が知られている。神経上皮細胞のうち後に脳室腔に面する細胞は、脈絡叢や脳室壁の上皮細胞へと分化し、脳脊髄液の産生、および循環に関与する。従って発生初期における神経上皮細胞の構造は、その後の神経系の形態形成と脳脊髄液の循環の両面においてきわめて重要な役割を持

つことが明らかである。

ミオシンは細胞骨格形成に関わる蛋白である。ミオシンファミリーに属するnonmuscle myosin heavy chain II-B (NMHC-B) 遺伝子の産物は、発生初期の胎児神経上皮細胞の脳室壁面に強く発現する。これまで我々は、NMHC-B遺伝子欠損マウスの解析から、この遺伝子の欠損が胎生12.5日から出生直後にかけて脳室壁の破壊、脳室の狭窄や閉塞、さらに異常脳室の形成等を引き起こし、水頭症をひきおこす事を光顕的解析結果を基に報告してきた^{1,2)}。しかし、こうした組織レベルでの変化が、どのような微細構造の変化に誘引されて起こるのかは未だ明らかになっていない。そこで我々は、胎生10.5日のNMHC-B遺伝子欠損マウスの神経上皮細胞層を走査電子顕微鏡

を用いて解析し、水頭症発症の初期過程と、脳室系形成における*NMHC-B*遺伝子の役割を明らかにした。

B. 研究方法

*NMHC-B*ミオシン遺伝子欠損マウスは、既に報告したようにエクソン2のATGコドンの下流にネオマイシン耐性遺伝子を相置換により挿入し作製した。以下に述べるマウス胎児の形態学的解析には、正常マウスのC57BL/6と*NMHC-B*遺伝子欠損マウスとそのヘテロマウスを使用した。

光学顕微鏡用の試料作製には、マウス胎児を95%エタノール、5%酢酸で固定後、パラフィン包埋し、薄切片を、HE (hematoxylin-eosin) 染色、又は*NMHC-B*蛋白に対する特異抗体を用いて免疫染色した。そしてこれらの試料を、組織学的、又は免疫組織化学的に解析した。

電子顕微鏡用の試料作製には、マウス胎児の脳組織を2.5%グルタルアルデヒド、0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.2)と1%オスミウム酸で固定し、エタノール系列で脱水、酢酸イソアミルで処理後、臨界点乾燥し、オスミウムでコートした。これらの試料は走査電子顕微鏡(日立S 4500)で解析した。

C. 研究結果および考察

胎生11.5日マウス脳組織における*NMHC-B*蛋白の発現様式

*NMHC-B*蛋白は胎生11.5日から胎生14.5日ではマウス全組織の全細胞に発現している。しかし、その発現レベルや局在は、発生に伴い大きく変化する。まず我々は、神経管が閉鎖しダイナミックな脳室系の形成がすすむ胎生11.5日、12.5日の神経系組織における*NMHC-B*蛋白の発現様式を、野生型マウス胎児の脳切片を*NMHC-B*蛋白に対する特異抗体を用いて、免疫組織化学的に解析した(図1)。胎生11.5日の神経上皮細胞はすでに局所的に多層化しており、各細胞は脳室壁面と軟膜壁面に垂直な一方向に整列している。*NMHC-B*蛋白は、観察される全細胞に発現しているものの、神経上皮細胞の脳室壁面(ventricular surface)と軟膜下壁面(subpial surface)に特に強く発現していた。さらに、脳室壁面、軟膜下壁面を高倍率で観察すると、*NMHC-B*蛋白は隣接細胞との接着面に網目のごとく分布していた。脳室壁面における*NMHC-B*蛋白の発現は、胎生14.5日以後、次第に減弱する。

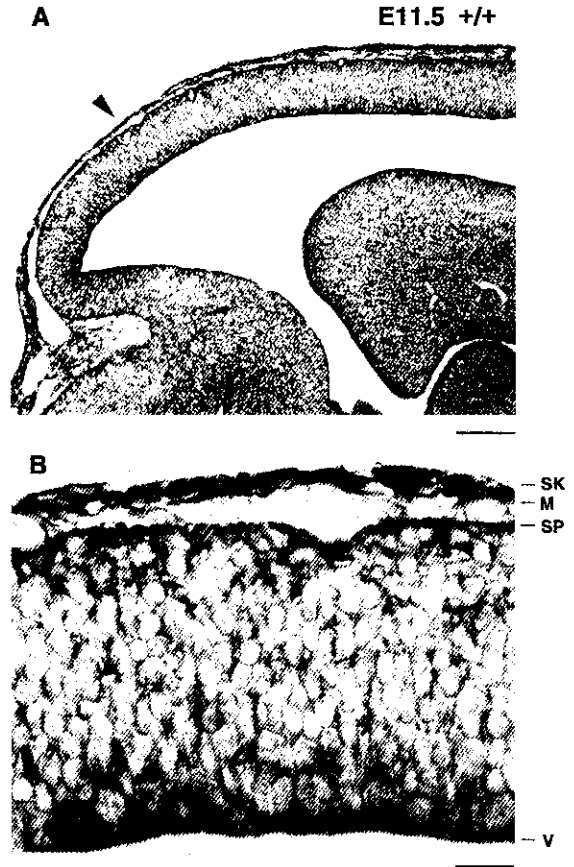


図1 胎生11.5日マウス脳における*NMHC-B*ミオシンの免疫組織化学染色

(A)：胎生11.5日中脳矢状断切片の低倍顕微鏡像。脳後部は、図の左に示されている。*NMHC-B*蛋白は、対比染色せず免疫組織学的に染色した。(B)：中脳背側部の高倍顕微鏡像。神経系において*NMHC-B*蛋白は、神経系細胞および非神経系細胞のすべてに発現している。*NMHC-B*蛋白は、脳室形成が活発な胎生11.5日には、とりわけ脳室壁面と軟膜下壁面に最も顕著に局在する。*NMHC-B*蛋白は、頭部において発生途上の皮膚や脳髄膜にも発現している。SK: skin (皮膚); M: meninges (髄膜); SP: subpial surface (軟膜下壁面); V: ventricular surface (脳室壁面)。目盛線：(A) 100 μ m、(B) 20 μ m。

胎生12.5日の*NMHC-B*遺伝子欠損マウスの脳室壁破壊像とその好発部位

胎生12.5日のマウス胎児脳を組織学的に解析すると、正常及び*NMHC-B*ヘテロマウスでは、最内層の神経上皮細胞は平滑な脳室壁面を形成し、その細胞突起は脳室壁面に伸展し強く接着している。それに対し、*NMHC-B*欠損マウスでは脳室壁面が局所的に破壊され、神経上皮細胞の細胞突起が退縮し、細胞間接着が阻害されている。こうした脳室壁の破壊像は、第3脳室、中脳水道、第4脳室で高頻度に認められ、特に第4脳室背側正中においては、脳室壁面が破壊され脳室腔内に細胞が増殖してく

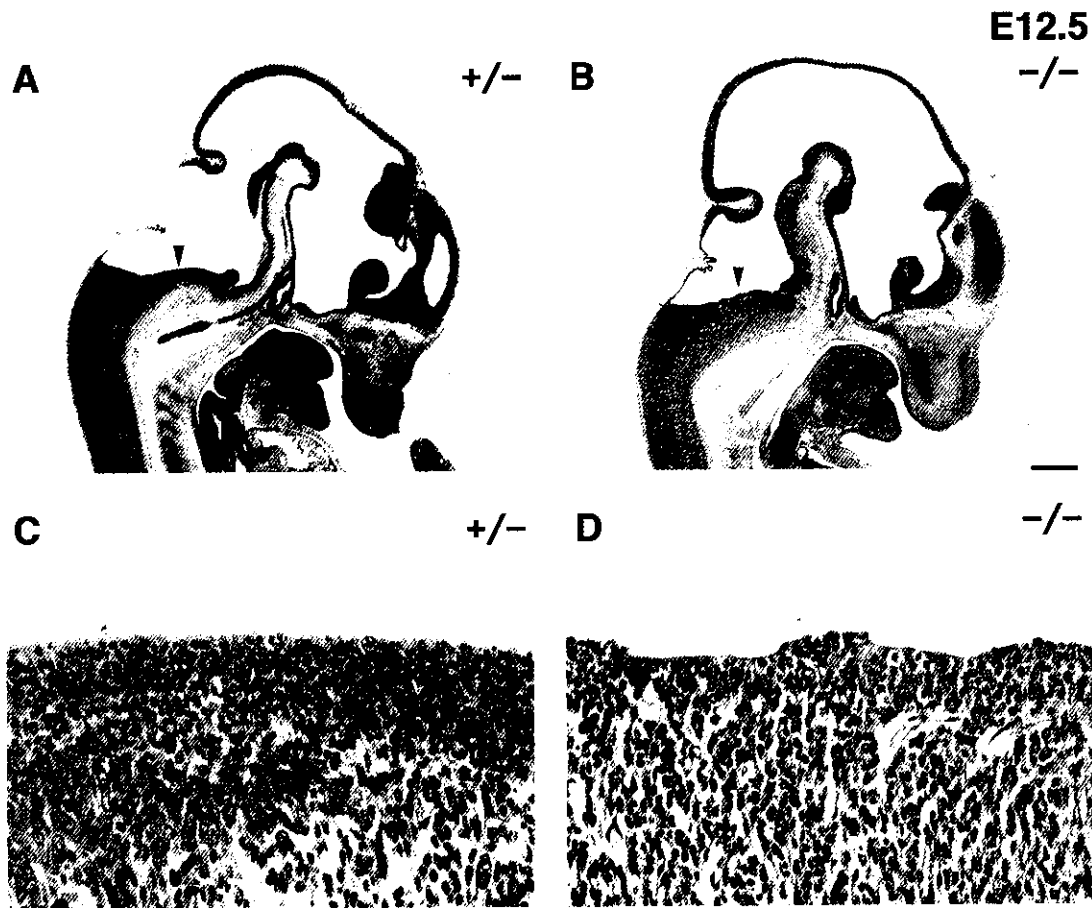


図2 胎生12.5日のNMHC-B欠損マウス (B⁻/B⁻) における脳室壁面の局所破壊

(A)(C) : NMHC-Bヘテロマウス (B⁺/B⁻) の脳矢状断切片。(B)(D) : NMHC-B欠損マウス (B⁻/B⁻) の脳矢状断切片。NMHC-Bヘテロマウスは、脳室壁面が緻密で平滑であるが、NMHC-B欠損マウスは、脳室壁面が局所的に破壊され、神経上皮細胞が脳室内に嵌入している像が認められる。目盛線 : (A, B) 500 μ m、(C, D) 50 μ m。

る像が高頻度に認められた (図2)。これに対し、胎生12.5日から14.5日において、側脳室では脳室破壊像は認められない。このような好発部位の存在は、発生過程における脳室壁の弾性や加わる力が領域により違う事を示唆している。

胎生10.5日のNMHC-B欠損マウスの神経上皮細胞の異常

(1) 神経上皮細胞の配列異常

胎生10.5日のNMHC-Bヘテロマウスの脳を走査電顕で観察すると、野生型マウスと同様、一層の神経上皮細胞が脳室壁面、軟膜下壁面に垂直な一定の方向に並び、両壁面に突起を伸展させていた。脳室壁と軟膜下壁の間に存在する細胞体周囲には、広い細胞外間隙が認められ、これは移動細胞の為の空間と考えられる。これに対し、脳室壁面、軟膜下壁面においては隣接する細胞が互いに強く接着しており、移動運動する細胞は両壁面でしっか

り支持されていると考えられる。特に脳室壁面においては、隣接している細胞が分岐した微小突起を交錯させ、より接着強度を高めているものと思われる (図3A, B)。

一方、NMHC-B欠損マウスでは、神経上皮細胞の配列異常が認められ上皮細胞層内に脳室様微小管腔を形成していた。環状の細胞集塊の中心部には、細胞突起が伸展し密に接着しており、脳室壁面の表面構造に類似した構造が認められる (図4A, B)。

(2) 脳室壁面構造の異常と線毛、微絨毛の減少

マウス胎児の神経上皮細胞層の脳室壁面を観察すると、脳室面に接した上皮細胞の形態や、線毛や微絨毛の形成に、部位特異的な差違が認められる。個々の神経上皮細胞の脳室壁面単位は、背側正中中部では、前後に長く、脳室側に隆起しているが、外側部においては、扁平な敷石様構造で重なり合っている。ここでは、胎生10.5日のNMHC-Bヘテロマウス (図5A) と欠損マウス (図5B)

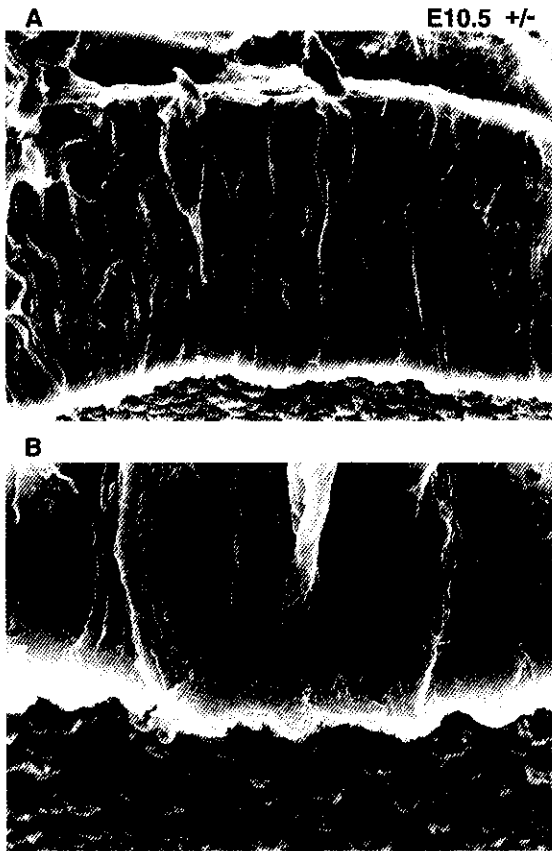


図3 胎生10.5日のNMHC-Bヘテロマウス (B⁺/B⁻) における神経上皮細胞の走査電顕像
(A)：中脳後背側部の低倍走査電顕像。(B)：脳室壁面の高倍走査電顕像。神経上皮細胞の尖状突起は脳室壁面に、また基底突起は軟膜下壁面に突起を伸展している。特に脳室壁面においては、隣接している細胞が分岐した微小突起を交錯させ、密に接着している像が認められる。目盛線：(A) 20 μ m、(B) 7.5 μ m。

を用い、側脳室外側部の神経上皮細胞の表面構造を走査電顕で観察し比較した。

NMHC-Bヘテロマウスの側脳室壁面では、神経上皮細胞の脳室壁面細胞膜が、野生型マウスと同様扁平な敷石様構造で重なり合い、狭い細胞間隙で接着していた。ヘテロマウス胎児脳の水平断面を透過電顕で観察すると、脳室壁面の細胞間隙に閉鎖堤などの接着構造が認められる。また、この時期のマウスの神経上皮細胞の脳室壁面は、後に分化する上皮細胞と比較するとごく少数であるが、形成過程の線毛と微絨毛が認められる (図5A)。

NMHC-B欠損マウスの側脳室壁面では、神経上皮細胞の脳室壁面細胞膜が、ヘテロマウスと比較すると凸凹が顕著で、広い細胞間隙で接着していた。また、線毛と微絨毛の数は、ヘテロマウスと比較すると明らかにすくない (図5B)。

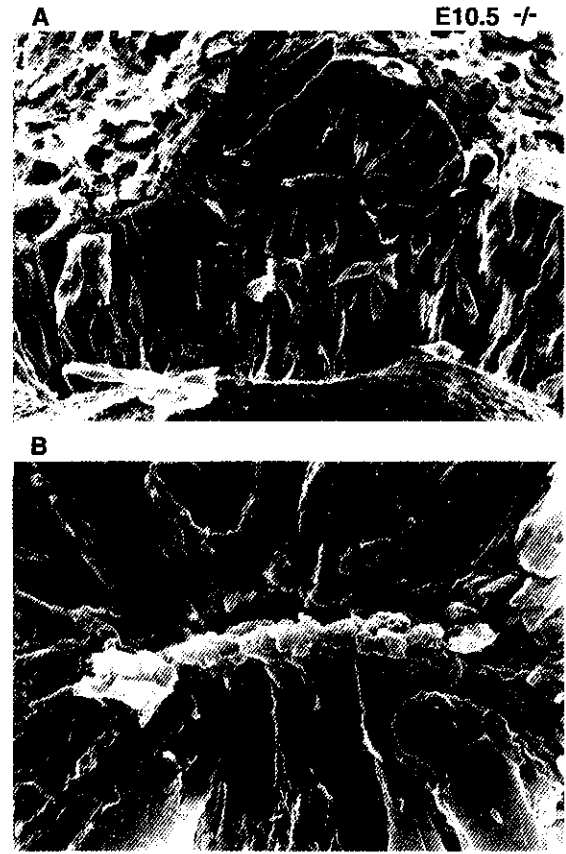


図4 胎生10.5日のNMHC-B欠損マウス (B⁻/B⁻) における神経上皮細胞の配列異常の走査電顕像
(A)：間脳後背側部の脳室様微小管腔の低倍走査電顕像。(B)：脳室様微小管腔の高倍走査電顕像。NMHC-B欠損マウスでは、神経上皮細胞層内に微小管腔を形成し、その中心部には、細胞突起が密に伸展、接着し、脳室壁面の表面構造に類似した構造が認められる。目盛線：(A) 50 μ m、(B) 7.5 μ m。

(3) 脳室壁の穿孔を伴った膨隆細胞と微小破壊像

マウス胎児の脳室壁表面には、正常マウスにおいても、脳室側に膨隆した死細胞が認められる。このような膨隆死細胞は神経管が形成される際に神経板が融合した背側正中部に多く存在する。NMHC-Bヘテロマウスと欠損マウスを比較すると、双方の脳室表面にこのような膨隆死細胞が認められたが、その頻度はNMHC-B欠損マウスにおいてより顕著であった (図6A)。膨隆した細胞の表面には複数の微小な穿孔 (直径約0.3 μ m) が認められた (図6B)。またNMHC-B欠損マウスの脳室表面には、ヘテロマウスには認められない脳室壁の微小破壊像が認められた。あるものは直径約2 μ mの破壊穿孔部の周囲に同心円上の隆起を伴っており、隆起部にも微小な穿孔を伴っていた。これは、前述の膨隆死細胞の微小穿孔の一つが、直径約2 μ mにまで拡大したのではないかと推

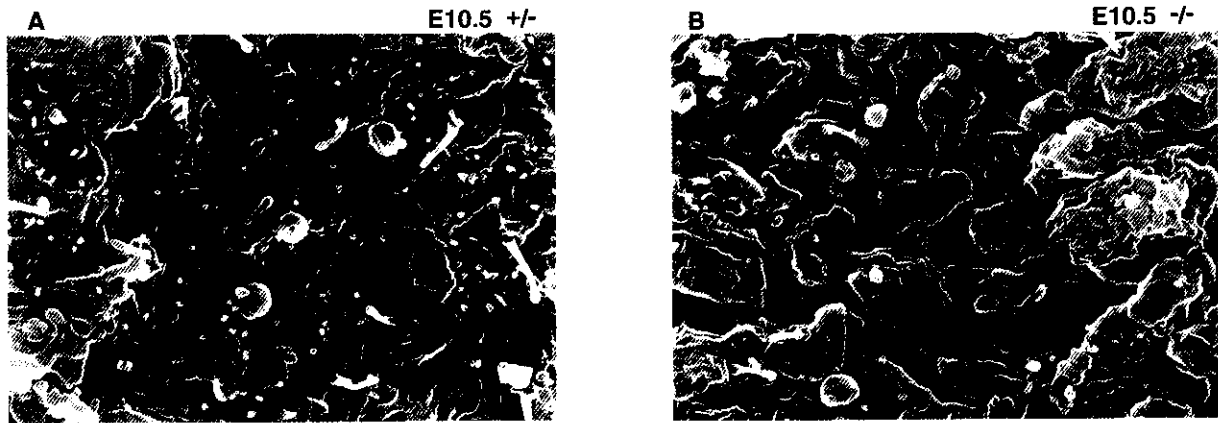


図5 胎生10.5日のNMHC-Bヘテロマウス (B^{+}/B^{-}) とNMHC-B欠損マウス (B^{-}/B^{-}) における側脳室神経上皮細胞壁面の走査電顕像

(A) : NMHC-Bヘテロマウス (B^{+}/B^{-})。 (B) : NMHC-B欠損マウス (B^{-}/B^{-})。 NMHC-Bヘテロマウスの側脳室壁面では、個々の神経上皮細胞が扁平な敷石様構造に重なり合っており、細胞間隙が狭い。 NMHC-B欠損マウスの側脳室壁面では、ヘテロマウスと比較すると、個々の神経上皮細胞の凸凹が不規則で、細胞間隙が広く、また形成過程の線毛、微絨毛の数が少ない。 目盛線 : $3\mu\text{m}$ 。

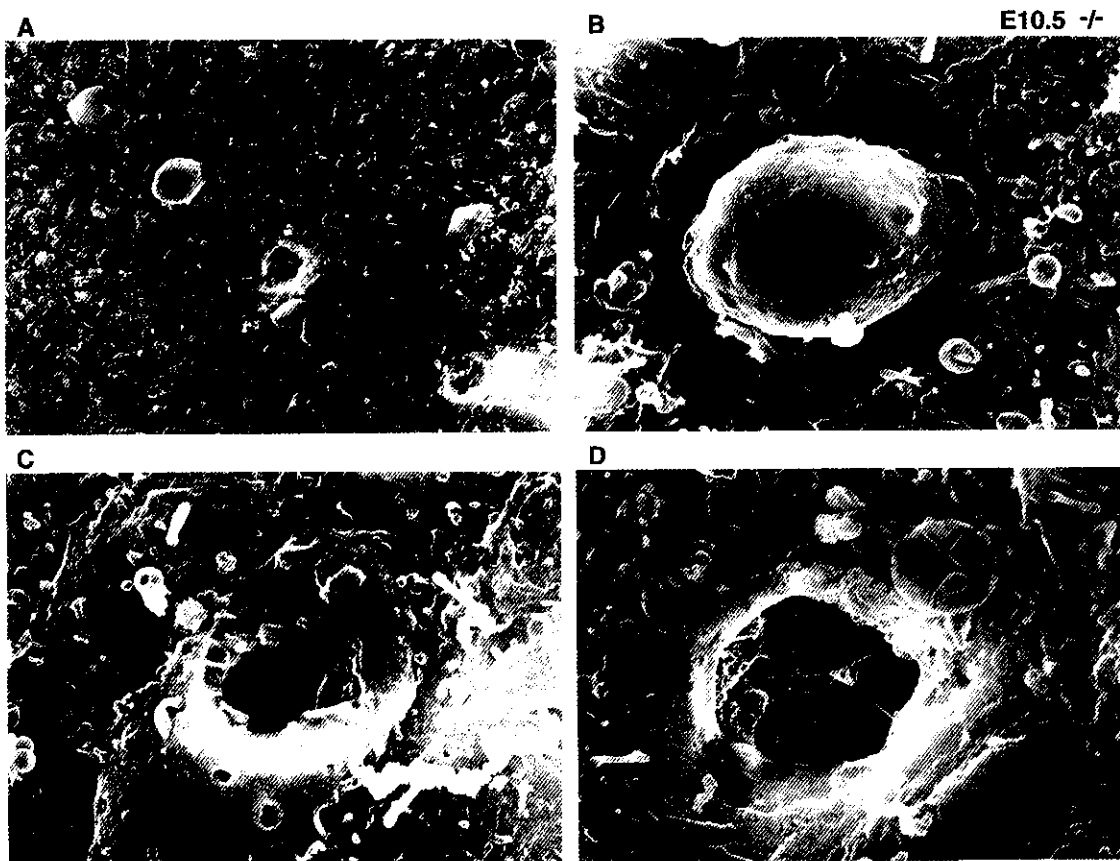


図6 胎生10.5日のNMHC-B欠損マウス (B^{-}/B^{-}) における中脳脳室壁面の微小破壊の走査電顕像

(A) : 中脳後背側部の脳室壁面微小破壊を示す低倍走査電顕像。 (B-D) : 神経上皮細胞の脳室壁面微小破壊を示す高倍走査電顕像。 図A内の神経上皮細胞の異常像3例を軽度 (B)、中度 (C)、重度 (D) の順に示している。 脳室壁面の微小破壊は、個々の神経上皮細胞単位でおこり、細胞膜の膨隆もしくは種々の大きさの穿孔が認められる。 目盛線 : (A) $15\mu\text{m}$ 、(B-D) $3\mu\text{m}$ 。

測される (図6C)。また、破壊穿孔部の大きなものは直径 $3\mu\text{m}$ 以上にもおよび、穿孔部から脳室壁の重層構造や脳室壁内部を観察することができた。脳室壁は表面が滑、又は粗な敷石状の構造物が7層から10層重なりあって形成されており、脳室壁内部は、細かい網状の構造物が何重にも重なり合って脳室壁を裏打ちしていた (図6D)。

D. 結 論

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。欠損マウス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細胞単位で膨隆や微小穿孔が高頻度に認められる。また、神経上皮層内に脳室様の微小管腔を示す異常構造がみとめられる。今回の走査電顕の結果とこれまでの光顕による解析結果を総合すると、NMHC-B欠損マウスは、初期神経発生における神経上皮細胞の脳室壁面の微小破壊および配列異常から、重度の脳室壁破壊、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したものと推察される。

謝辞

本研究は、米国NIH, Robert S. Adelstein博士、東京医科歯科大学機器分析センター、市野瀬志津子博士との協同研究の成果である。

文 献

- 1) Hara, Y., Uren, D., Hwang H., Takeda, K., Kawamoto, S., Tullio, A., Yu, Z., Ferrans V., Tresser, N., Grinberg, A., Preston Y., Adelstein, R. Gene dosage affects the cardiac and brain phenotype in nonmuscle myosin II-B depleted mice. *J Clinical Investigation* 2000, 105 (5) 663-671.
- 2) Tullio, A., Bridgman P.C., Tresser, N.J., Chan, C., Conti, M.A. Adelstein, R.S., Hara, Y. Structural Abnormalities develop in the brain following ablation of the gene encoding nonmuscle myosin II-B heavy chain. *J. Comp. Neurol.* 2001, in press.

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

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

研究要旨

Tubulin beta IIはヒト発育期のradial fiberにassociateし、後にgrowing axonや dendriteに分布するようになる。variant VLDL receptorは発育期第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る。

A. 研究目的

平成11年度に、脳発育の指標としてのRadial fiber (RF) に着目し、vimentin, GFAPそして胎齢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を用いて免疫組織化学的検索を行い、Radial fiberでの免疫染色性を検討した¹⁾。その結果、vimentinは藤田による第Ⅰ期、第Ⅱ期、第Ⅲ期²⁾のすべてにRFに発現しており、GFAPは第Ⅲ期にのみ、一時的にRFに発現し、KNY-379は第Ⅰ期にはvimentinとほぼ同じ染色性を示すが、第Ⅱ期になるとRFと共に、growing axon, dendriteに分布するようになる事を見いだした。

平成12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、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い、知見を得たので報告する。

B. 研究方法

KNY-379抗体が認識する抗原蛋白を同定する為に、expressional cloningを行った。用いたcDNA libraryは胎

齢19-23週の人胎児脳からのもので (Stratagene, La Jolla, USA, Catalog #937227)、host bacteriaとしてXL1-Blue MRF-strainsを使い、lambda phagesのtiteringを説明書通りに行い、titered phages と host bacteria の mixtureを37℃、15分incubateし 4 ml LB top agaroseをくわえ、LB agar platesの上流し、逆さまにして42℃、一晚incubateし、更に IPTG-saturated filters をのせ37℃で3-4時間 incubateした。この filterをblock solutionに1時間、次に KNY-379の1:1000 solution に1時間、peroxidase conjugateした2次抗体 (anti-mouse Ig, Dako, Carpinteria, USA) 1:1000 solutionに1時間、最後にDAB溶液で染色し陽性 plaqueを拾い、さらに3回 subcloningを行った。陽性cloneを T1, T3 primersを用いPCRで増幅し、pT7BlueTM T-vectors (Novagen) にいれE. coliにtransfectし得られたcDNAのsequenceを行った。

VLDLR抗体作製に関しては、VLDLRにユニークなN末のfirst ligand binding domain³⁾の17amino acidsの合成ペプチドを作製し (GRKAKCEPSQFQCTNGR conjugated with KLH, Peptide Institute Inc. Osaka) 免疫原とし、Ribiアジュバントとのエマルジョンを、BALB/cマウスの足皮下に3回注射した。腫大した鼠径部リンパ節から得られたリンパ球とマウス形質細胞腫株FO1細胞とを細胞

融合して得られたハイブリドーマ細胞の培養上清を用い、胎齢12週の子鼠胎児脳とAlzheimer患者脳のパラフィン包埋切片で、組織的スクリーニングを行った。12週胎児脳で、cortical plateを認識していると思われるクローンとAlzheimer病脳で、老人斑を認識していると思われるクローンを3回サブクローニングし、マウス腹腔に植え、腹水を得た。

得られた抗体、及びvimentin, GFAP, neurofilaments protein, galactocerebroside市販抗体を用いて2段階avidin-biotin法(ニッスイ社製)により免疫組織化学的染色を行った。なお核染は原則として行っていない。またvimentin及びGFAP抗体検索切片は、あらかじめマイクロウエーブ処理を行った。また必要に応じてWestern blotを行い、VLDLRでは、各種primerを作製し、胎齢20週脳と成人脳からtotal RNAを抽出し、RT-PCRを行い、DigoxigeninでラベルしたPCR probeを用いたNorthern blotも行った。

C. 研究結果

KNY-379が認識する抗原蛋白について

KNY-379を用いて行ったExpressional cloningで、最終的に3つの陽性クローンが得られ、各々600-700bpのsequenceを行い、BLASTIN 2.0.11でhomology searchを行った所、3つのクローン共に99-100%の相同性でtubulin beta IIである事が判明した。市販のtubulin beta抗体も用いてimmunoprecipitation後にWestern blotを行いtubulin beta IIであることを確認した(図1)。

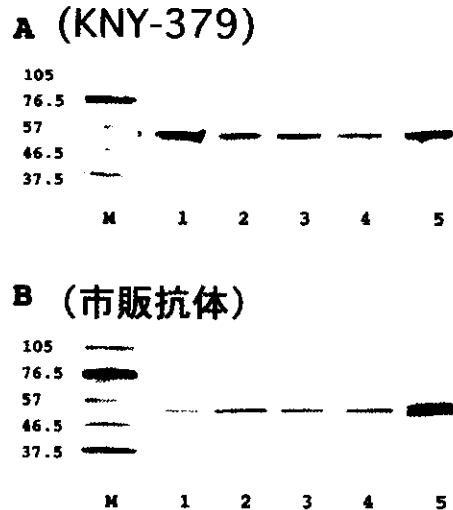


図1：胎齢22週剖検例組織のTubulin beta IIの Western blot
A:KNY-379抗体で染色。B:市販のtubulin beta抗体で染色。M:分子重量マーカー;1-4:KNY-379抗体で、immunoprecipitateした試料 1:脳、2:肺、3:腎、4:横紋筋 5:市販抗体でimmunoprecipitateした脳試料。A)のKNY-379抗体で染色した分では、いずれの試料でも~53kDに単一バンドで見られる。B)の市販抗体で染色した分では、KNY-379でimmunoprecipitateした試料(1-4)では単一バンドで、市販抗体で immunoprecipitateした試料(5)では2~3本のバンドが見られる。

抗 VLDLR モノクローナル抗体に関して

前述の合成ペプチドを免疫原として、2種類のモノクローナル抗体が得られた。KNY-379と同じ様にexpressional cloningを行い、1つはVLDLRのO-linked sugar domainの84bpの欠損したvariant VLDLRを認識する抗体で(VLDLR 1)、もう一つは、その欠損のない full-length

VLDLR

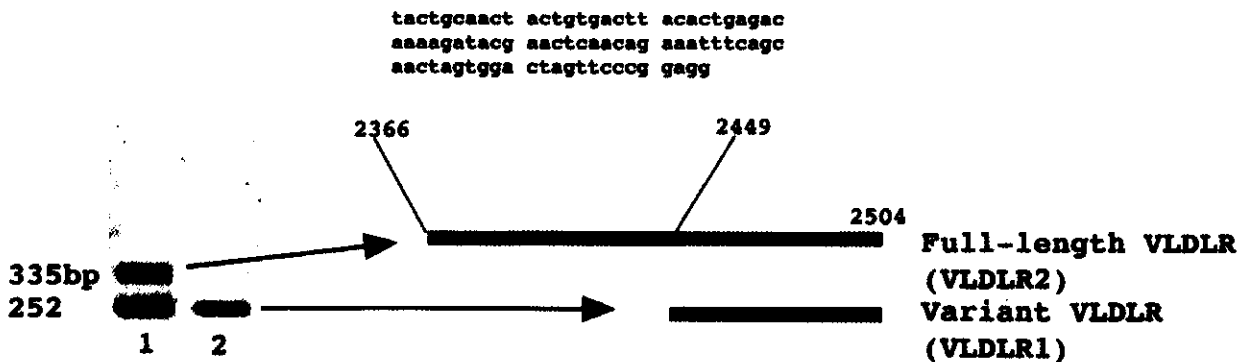


図2：VLDLR ヒトVLDLRのO-linked sugar domainは2367から2504の間で、それが存在するfull-length formと、84bpが欠損したvariant formが存在する。VLDLR 1抗体はvariant formを、VLDLR 2抗体はfull-length formを認識する。67才脳のtotal RNAのRT-PCRでの検索では、full-lengthとvariantの両方が存在し、胎齢20週脳ではvariant formしか存在しない。欠損したsequenceを一番上に記載している。

VLDLRを認識する抗体 (VLDLR 2) である事が判明した(図2)。またRT-PCRの結果、胎齢20週脳ではvariant VLDLRしか発現していないのに対して、成人脳ではvariant, full-lengthの両方のVLDLRが発現していることを確認できた。

VLDLRの免疫組織化学的検索結果

VLDLR 1抗体を用いると、胎齢12週脳では、cortical plate (CP)のneuroblastsの表面と共に、ventricular zone (VZ)のmatrix cells及びintermediate zone (IMZ)のmigrating neuroblastsの表面にも陽性所見が見られる(図3)。VLDLR 2抗体では、全く陽性所見が得られず、この抗体では、高齢者及びAlzheimer病の脳で見られる老人斑および神経細胞、グリアの一部に陽性所見が得られた。

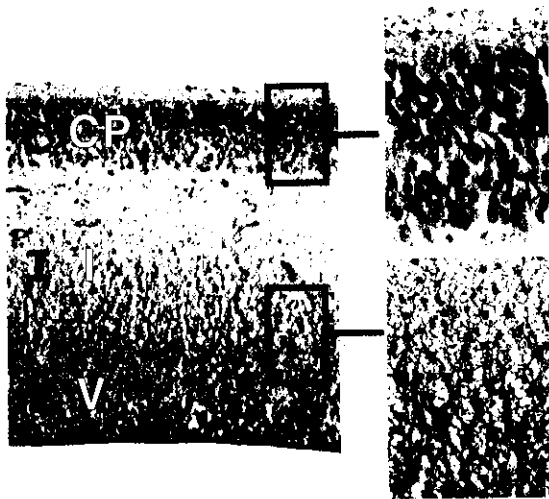


図3：胎齢12週脳のVLDLR 1抗体を用いた免疫染色。ventricular zone (V)のmatrix cells, intermediate zone (I)のmigrating neuroblasts, cortical plate (CP)のneuroblastsに陽性所見を見る。

VLDLR 1の分布を経時的に見ていくと、15週脳では、12週脳と同じような分布を示し、20週脳では、CPのneuroblastsには陽性所見は残っているが、VZ, IMZは陰性となり、35週脳では、IMZのastrocyte, oligodendrocyteに陽性になってくる(図4)。それ以後は、髄鞘化に伴い髄鞘に陽性となる。

種々のマーカーの発育脳での細胞、組織分布

表1に脳発育の第I-III期におけるvimentin, tubulin beta II, variant VLDLR, GFAP, neurofilaments proteinの細胞、組織分布を示した。

D. 考 察

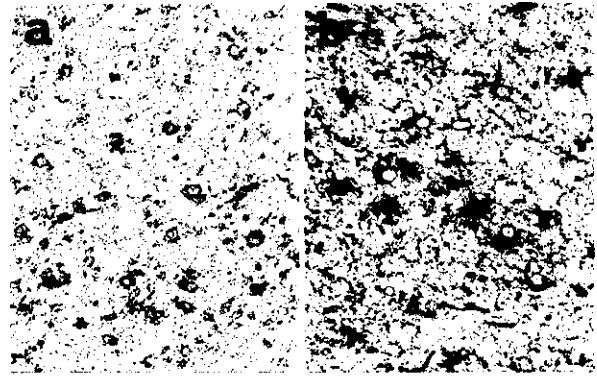


図4：胎齢30週脳のVLDLR 1抗体を用いた免疫染色。a) oligodendrocyteの胞体内に陽性。b) astrocyteの胞体内に陽性。

Tubulinは微小管の主要構成蛋白で、alphaとbetaの2つのsubunitからなるheterodimerで、betaでは7つのsubunitsが知られている。そのうちbeta IIは脳に多く存在し、ウシ脳のtubulinの58%を占めるとされる⁴⁾。動物脳では、発育期脳や軸索再生の際に著明に発現するが⁵⁾、ヒト発育脳に関しては殆ど仕事がない。我々の検索で、tubulin beta IIが、ヒト発育脳で、早期から発現し、第I期では、vimentinと同じように脳の全長にわたってRFに分布し、第II期になるとVZ, IMZの深部では主としてRFに分布し、CP, IMZの表層部ではgrowing axon, dendriteに分布するようになり、第III期では広範にaxonにassociateするが、次第に陰性化する事が解った¹⁾。Tubulin beta IIは発育期脳において、まずRFに発現し、脳の構築形成、neuroblastsのmigrationのguidanceに、さらにはaxon, dendriteの発育に関与している事が考えられる。

VLDLRはLDL receptor familyに属し、VLDLに特異的で、apoE代謝に重要なreceptorとして見いだされた⁶⁾。しかしTransgenic mouseやKnock out mouseを用いた実験で、その特異性や独立した機能に疑問がもたれていた。その後VLDLRと、それによく似たapoE receptor 2のdouble knock out mouseを用いた研究で、両者がReelin receptorであり、発育期脳におけるneuroblastsのmigrationとCPの形成に重要である事が解った⁷⁾。ヒトのVLDLR cDNAではO-linked sugar domainの84bpの欠損したvariant form VLDLRがあり、多くの臓器で、full-length formと共存している事が知られている。我々の今回の検討では、発育期脳に存在するのはvariant VLDLRであり、full-length VLDLRは存在せず、しかもvariant VLDLRはmigrating及びCPのneuroblastsの表面に存在し、Reelin receptorであるVLDLRはvariant formである事が示唆された。また

表1 種々の蛋白の発育時期による細胞発現

	Vimentin	Tubulin beta II	VLDLR	GFAP	NF
第I期(～胎齡6週)					
Matrix cell	+	+	-	-	-
Radial fiber	+	+	-	-	-
第II期(7～17-20週)					
Migrating neuroblast	-	-	+	-	-
Neuroblast in CP	-	+	+	-	-
第III期(20週～)					
Ependymoglioblast	-	-	+	+	-
Glioblast	+	-	+	+	-
Astrocyte	+	-	+	+	-
Oligodendrocyte	-	-	+	-	-
Myelin	-	-	+	-	-
Neuronal components	-	+	-	-	+

variant VLDLRは第I, II期ではmatrix cell, 第III期ではastrocyte, oligocyteに陽性で、さらに髄鞘化にともなって髄鞘にも陽性となる⁸⁾。

これらの事は、variant VLDLRはneuroblastsではReelin receptorとして、astrocyte, oligodendrocyte, myelinにおいてはapoE代謝に重要であろう事を示唆している。

表1にまとめたように、今まで検討した種々の抗原蛋白に関しては、vimentinはRFからependymoglioblast, glioblast, astrocyteというglial lineageのマーカーとして、tubulin beta IIはRFからgrowing axon, dendriteというneuronal lineageのマーカーであり、variant VLDLRは第I, 第II期においてはneuroblastsの、そして第III期においてはependymoglioblasts, glioblast, astrocyte, oligodendrocyteそしてmyelinというglial lineageのマーカーとなる。GFAPは第III期にしか存在せず、RFをradial glial fiberと呼べるのは、第III期に入ってからのみであり、第II, 第III期は単にradial fiberと、glialを落とした名が正しいと考えられると同時に、RFも共通の母細胞であるmatrix cellから発生し、それが時期によって(藤田の第I-III期)neuronalそしてglial differentiationをするという一元説に基づいて考えるほうが、前述の種々のマーカーの発現の差を無理なく説明できると考えられる。

E. 結論

KNY-379抗体はtubulin-beta IIを認識している事が解った。またvariant VLDLRはReelin receptorとしてneuroblastに発現しているのみならず、それ以後はglia系細胞、髄鞘に分布している事を見いだした。これらの事は、すべての中樞神経系細胞は共通の母細胞であるmatrix cellから発生し、3つの時期を経て分化、発育し

ていくとする藤田の一元説の妥当性を裏付けるものと考えられた。今後は、水頭症等の脳発育異常での、RFを中心とした脳構築の異常の有無を検討していく予定である。

文献

- 1) 中村康寛、山本統彦、熊丸えり子：胎生期正常脳発育におけるRadial fiberの免疫組織化学的検討。厚生省特定疾患 難治性水頭症調査研究班 平成11年度研究報告書 30-34, 2000.
- 2) Fujita S: Transitory differentiation of matrix cells and its functional role in the morphogenesis of the developing vertebrate CNS. In: Current Topics of Developmental Biology (ed. TS Okada), Academic Press, N.Y., 1986, pp223-242
- 3) Sakai J, Hoshino A, Takahashi S, Miura Y, Ishii H, Suzuki H, Kawarabayasi Y, Yamamoto T: Structure, chromosome location, and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene. J Biol Chem 269:2173-2182, 1994.
- 4) Banerjee A, Roach MC, Wall KA, Lopata MA, Cleveland DW, Luduena RF: A monoclonal antibody against the type II isotype of b-tubulin. Preparation of isotypically altered tubulin. J Biol Chem 263:3029-3034, 1988.
- 5) Hoffman PN, Cleveland DW. Neurofilament and tubulin expression recapitulates the developmental program during axonal regeneration: induction of a specific beta-tubulin isotype. Proc Natl Acad Sci USA 85:4530-4533, 1988.
- 6) Takahashi S, Kawarabayasi Y, Nakai T, Sakai J, Yamamoto T: Rabbit very low density lipoprotein receptor: A low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. Proc Natl Acad Sci USA 89:9252-9256, 1992.
- 7) Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, et al: Reeler/disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and apoE receptor 2. Cell 97:689-701, 1999.
- 8) Nakamura Y, Yamamoto M, Kumamaru E: A variant very low density lipoprotein receptor lacking 84 base pairs of O-linked sugar domain in the human brain myelin. Brain Res 793:47-53, 1998.

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

関西医科大学脳神経外科

稲垣 隆介 山内 康雄 河本 圭司

はじめに

二分脊椎とくに脊髄髄膜瘤はキアリ奇形に代表される頭蓋内の異常を合併することはよく知られている。しかし、脊髄髄膜瘤とキアリ奇形などの頭蓋内病変との関連については明らかでない。臨床的に、脊髄髄膜瘤の患児はキアリ奇形や水頭症を伴うことはよく知られている¹⁾²⁾。また動物実験系においても脊髄髄膜瘤様の奇形を有する個体では、胎生期のある時期において正常の胎児に比べ後頭蓋窩の発達が悪いことが知られ^{3,4,5,7,8,9)}、将来水頭症へ移行する可能性も示唆されている。しかし、これらはある一つの遺伝子情報が表現型を変えて同時に出現しているものなのか、あるいはいずれかの奇形が他の奇形に先行し、かつ原因となっているかは明らかでない。また、キアリ奇形は四つのタイプに分類されている¹⁰⁾が、何故II型奇形のみが脊髄髄膜瘤に合併することが多いかも明らかでない。McLoneらは胎生初期に存在する脊髄髄膜瘤から髄液が流出することが、キアリII型奇形の原因ではないかと推測している¹¹⁾。動物実験で得られた結果から脊髄髄膜瘤に伴うキアリ奇形・水頭症の発生機序につき検討を加える。

A. 方 法

ニワトリはin ovoで培養し、培養開始から約48時間後に一旦閉鎖した後の神経管を外科的に再開放した。ついで外科的処置を加えた卵を再び培養した。培養14H日もしくは16日目まで培養した後に、胎児を取り出しホルマリン固定を行った。手術的に作成した脊髄髄膜瘤を有するニワトリの後頭蓋窩を正中矢状断し、正常のニワトリの後頭蓋窩と比較した。

マウスは生後約8週の雄と雌を一昼夜同じ檻に入れ、翌朝臍栓の有無を調べた。臍栓の認められた雌を別の檻に移し、妊娠第0日とした。妊娠12日目に、母体を腹腔麻酔後、腹壁を正中切開し子宮を取り出した。ついで子宮に縦切開を加え羊膜に包まれた胎児を子宮外へ取り出した。細い注射針を用いて完全に閉じている脊髄を再開

放した。胎生期14日までexo uteroに培養した。手術を施行し脊髄髄膜瘤を作成したマウスの後頭蓋窩を正常のマウスの後頭蓋窩と比較した。

B. 結 果

ニワトリ・マウスともに手術にて脊髄髄膜瘤様の変化を作成することの出来た個体では、胎生期の早い時期において(ニワトリでは胎生14日もしくは16日、マウスでは胎生14日)、正常の個体に比べ後頭蓋窩の発達は悪く、くも膜下腔も狭小化している例があった。これらの変化は、Spd/Spdマウスにおける後頭蓋窩の変化とほぼ同じ所見であると考えられた。

C. 考 察

キアリがキアリ奇形についての報告をして以来、これらの奇形の発現機序に関する論文は多数ある。その代表例はhydrodynamic theory^{12,13,14,15,16)}、traction theory^{17,18)}、dysgenesis of the hindbrain /developmental arrest theory^{19,20,21,22)}、その他^{23,24,25,26,27)}などである。しかし、これらの説でも完全にその機序を解明できず、また脊髄髄膜瘤に何故キアリⅡ型奇形が合併するのかは明らかでない。McLoneとKnepperはUnified theoryを発表し、先行する脊髄髄膜瘤からの髄液の流出がキアリ奇形の原因であるとしている。Desmondらは、胎生初期において、神経系の正常な発達には髄液の存在、髄液によるprimitive ventricleの急速な拡大が不可欠であるとしている^{28,29,30)}。われわれも、髄液が脊髄髄膜瘤から早期に流出することで正常な後頭蓋窩の発育が阻害され、その後で後頭蓋窩内容積が増大するときに入れ物である骨組織よりも容積が大きいために後頭蓋窩からはみ出しキアリ奇形が起こるのではないかと推測した。薬物でも脊髄髄膜瘤とキアリ奇形を合併する動物例があることは良く知られているが、薬物での実験動物では、薬物が直接すべての奇形に作用しているのか、合併する奇形のうちでどれかが先行し、他の奇形が二次的に生じるのかどうかまでは明らかでない。そのために、外科的に作成した脊髄髄膜瘤を実験モデルとした。今回の実験結果からは、やはり先行する脊髄髄膜瘤が合併するキアリ奇形の原因である可能性が高かった。最近になり米国では脊髄髄膜瘤の患児にたいし、胎内手術が行われるようになってきているが、その結果、合併するキアリ奇形の程度が軽くなる可能性のあることも報告されている³¹⁾。われわれは、脊髄髄膜瘤の患児の水頭症もキアリ奇形が存在するために生じると考えているが、今回の実験結果からはその点は明らかとならなかった。今後の検討が必要であると考えられる。

E. まとめ

今回の検討の結果、手術的に作成した脊髄髄膜瘤の個体においても先天的な奇形マウスと同様の異常が得られた。このことより、ヒトにおいても脊髄髄膜瘤に伴う水頭症は、脊髄髄膜瘤から胎生初期に髄液が流出することで後頭蓋窩の発達が悪くなり、その結果、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。

付記：なお、この研究の一部はNorthwestern University, Children's Memorial Hospital of Chicago小児脳神経外科教授、David G. McLone教授、University of Utah解剖学教授、Gary C. Schoenwolf教授との共同研究の結果得られたデータである。また、一部の研究は科学研究費(1997年)の補助を得た。

文 献

- 1) McLone DG: Treatment of myelomeningocele : arguments against selection. Clin Neurosurg.1986;33:359-370.
- 2) Reigel DH, McLone DG: Myelomeningocele: Operative treatment and results. Concepts Pediatr Neurosurg.1987;8: 41-50.
- 3) ビタミンA誘発マウスに二分脊椎に合併するChiari Ⅱ奇形について中原成浩、田中英明、松本賢芳、中沢克彦、Takayuki Inagaki、David G. McLone、Paul A. Knepper小児の脳神経 17 :135-142 ,1992
- 4) Gunberg DL:Spina bifida and the Arnold-Chiari malformation in the progeny of typan blue injected rats. Anat Rec 1956;126: 343-367.
- 5) Warkany J, Wilson JG, Geiger JF: Myeloschisis and myelomeningocele produced experimentally in the rat. J Comp Neurol 1958;109: 35-64.
- 6) Rokos J, Cekanova E, Kithierova E: pathogenesis of trypan-blue-induced spina bifida. J Pathol 1976;118: 25-34.
- 7) Warkany J, Takacs E: Experimental production of congenital malformations in rats by salicylate poisoning. Amer J Path 1959;35: 315-331.
- 8) Warkany J, O'Toole BA: Experimental spina bifida and associated malformations. Childs Brain 1981;8: 18-30.
- 9) Hung C-H, Nakagawa N, Sato K: The morphogenesis of hindbrain crowding associated with lumbosacral myeloschisis. Neurol Med Chir (Tokyo) 1989;29:981-988.
- 10) Chiari H:Über Veränderungen des Kleinhirns, des Pons und der Medulla oblongata infolge von Kongenitaler Hydrocephalie des Grosshirns. Denkschr Akad Wiss Wien 1896;63: 71-116.
- 11) McLone DG, Knepper PA: The cause of Chiari Ⅱ malformation: A unified theory. Pediatr Neurosci 1989;15: 1-12.
- 12) Weed LH: Development of the cerebrospinal fluid spaces in

pig and man. *Contrib Embryol* 1917;5: 1-16.

- 13) Gardner WJ: Anatomic features common to the Arnold-Chiari and the Dandy-Walker malformations suggest a common origin. *Cleve Clin* 1959;26: 206-222.
- 14) Gardner WJ: Hydrodynamic mechanism of syringomyelia : its relationship to myelocele. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1965;28: 247-259.
- 15) Cameron AH, Osman Hill WC: The Arnold-Chiari malformation in a sacred baboon (*papio hamadryas*). *J Path. Bact.* 1955;70: 552-554.
- 16) Cameron AH: Malformations of the neurospinal axis, urogenital tract and foregut in spina bifida attributable to disturbances of the blastopore. *J path Bact* 1957;73: 213-221.
- 17) Penfield W, Cone W: Spina bifida and Cranium bifidum; results of plastic repair of meningocele and myelomeningocele by a new method. *JAMA* 1932;98: 454-461.
- 18) Lichtenstein BW: Distant neuroanatomic complications of spina bifida (spinal dysraphism). Hydrocephalus, Arnold-Chiari deformity, stenosis of the aqueduct of Sylvius, etc: Pathogenesis and pathology. *Arch Neurol Psychiat* 1942;47: 195-214.
- 19) Cleland J: Contribution to the study of spina bifida, encephalocele, and anencephalus. *J Anat Physiol.* 1883;17: 257-292.
- 20) Daniel PM, Strich SJ: Some observations on the congenital deformity of the central nervous system known as the Arnold-Chiari malformation. *J Neuropath Exp Neurol* 1958;17: 255-266.
- 21) Peach B: Cystic prolongation of fourth ventricle: An anomaly associated with the Arnold-Chiari malformation. *Arch Neurol* 1964;11: 609-612.
- 22) Peach B: Arnold-Chiari malformation: Anatomic features of 20 cases. *Arch Neurol* 1965;12:613-621.
- 23) Barry A, Patten BM, Stewart BH: Possible factors in the development of the Arnold-Chiari malformation. *J Neurosurg* 1957;14: 285-301.
- 24) Brocklehurst G: The pathogenesis of spina bifida: A study of the relationship between observation, hypothesis, and surgical incentive. *Dev Med Child Neurol* 1971;13: 147-163.
- 25) Padgett DH: Development of so-called dysraphism: with embryologic evidence of clinical Arnold-Chiari and Dandy-Walker malformations. *Johns Hopkins Med J* 1972;130: 127-165.
- 26) Padgett DH, Lindenberg, R: Inverse cerebellum morphogenetically related to Dandy-Walker and Arnold-Chiari syndromes: bizarre malformaed brain with occipital encephalocele. *Hohns Hopkins Med J* 1972;131: 228-246.
- 27) Marin-Padilla M, Marin-Padilla TM: Morphogenesis of experimentally induced Arnold-Chiari malformation. *J Neurol Sci* 1981;50: 29-55.
- 28) Desmond ME: Description of the occlusion of the spinal cord lumen in early human embryos. *Anat. Rec.*1982;204: 89-93.
- 29) Desmond ME, Jacobsen AG: Embryonic brain enlargement requires cerebrospinal fluid pressure. *Devl Biol.* 1977;57: 188-198.
- 30) Pacheco MA, Marks RW, Schoenwolf GC, Desmond ME: Quantification of the initial phases of rapid brain enlargement in the chick embryo. *Am J. Anat.* 1986;175: 403-411.
- 31) Tulipan N, Hernanz-Schulman M, Lowe LH, Bruner JP Intrauterine myelomeningocele repair reverses preexisting hindbrain herniation *Pediatr Neurosurg* 31:137-142, 1999

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

京都大学医学部脳神経外科

田代 弦 石崎 竜司 井 陽輝 橋本 信夫

研究要旨

新生児ラットを用いて、明確に識別可能な急性と亜急性の2種類の実験的水頭症モデルを作成した。急性群は急激な頭囲と脳室の拡大を認め、種々の症状と早期からの脳機能障害を示しながら4週間前後で全例死亡した。一方、亜急性タイプ群は緩やかな脳室の拡大を認めたが、ほぼ症状・脳機能障害共なく8週間後まで生き残った。水頭症の発生機序により、その臨床経過と予後には大きな差が認められ、脳機能障害のメカニズムにも差異があると推察された。

A. 研究目的

種々の動物モデルを用いて水頭症に対する研究が進む中、水頭症の発症年齢や発生機序によって脳機能障害のメカニズムに違いがあると示唆されるなど、まだまだその病態解明には解決されるべき点が多い。今回我々は、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得たので、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司る神経伝達系機能障害の差異について検討した。

B. 研究方法

人では新生児期に相当する生後数日目の20匹のウイスターラット脳槽内に、25%カオリンを0.02ml注入し水頭症を作成した。コントロールとして同時期ラット12匹に同量の生食を注入した。注入から2、4、8週間後に各個体の臨床的症狀とともに、体重・頭囲・脳室の大きさを測定した。経心的に脳を固定し免疫組織化学染色を用いて、線条体のコリンニューロンと黒質のドーパミンニューロンを算出し、高次脳機能を司る神経伝達系の定量的変化を追跡した。

(倫理面への配慮)

当研究の計画書は、予め当大学動物実験センターの審

査会に提出され、倫理面での承認を受けている。

C. 研究結果

カオリンを注入された新生児ラットは、急性タイプ群と亜急性タイプ群の水頭症モデルに分かれた。急性タイプ群は急激な頭囲と脳室の拡大を認め、活動性の低下、体重減少や振戦などの症状を示しながら注入4週間前後で全例死亡した (Fig. 1)。一方、亜急性タイプ群は緩やかな脳室の拡大を認めたが、ほぼ症状なく8週間後まで生き残った (Fig. 2 A, B)。線条体におけるコリン免疫陽性ニューロンの数は急性タイプ群では2週間後より有意な減少を認めたが、亜急性タイプ群では8週間後にのみ有意な減少を認めた。黒質におけるドーパミン免疫陽性ニューロンの数は急性タイプ群で4週間後に有意な減少がみられたが、亜急性タイプ群ではほとんど減少しなかった (Fig. 3 A, B)。

D. 考察

胎児期から新生児期の水頭症による脳機能障害の機序を考えるにあたっては、頭蓋縫合の未閉鎖・ミエリンの未形成など、成人とは異なる構造上そして発育/発達上の新生児脳の特徴を考慮に入れなければならない。今回我々は初めて、新生児ラットで急性・亜急性水頭症モデ

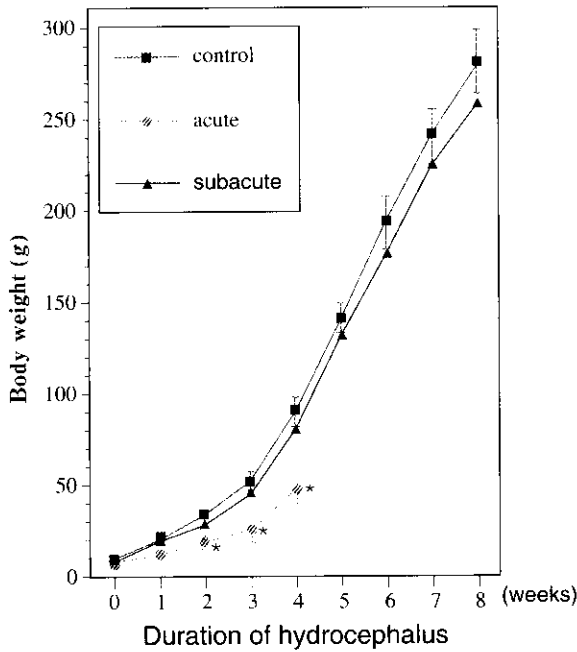


Fig. 1 経時的体重変化の比較。亜急性群 (▲) はコントロール群 (■) に比して有意な差はないが、急性群 (●) は2週目より有意な減少を認め (*)、4週目に全例死亡した。

ルの作成に成功し、その病態解明への手掛かりを得たのであるが、今後は両者を胎児期へ時間軸に沿って平行移動させることにより、先天性水頭症、すなわち胎内急

性・亜急性水頭症に対する治療方針の確立に役立つと考えられる。

同様の手技にて2種類の水頭症モデルが作成された点については、個体間による髄液循環動態の違いや、カオリンに対する反応性の違い、注入孔からのカオリンのleakage量の違いなどが原因と考えられる。灌流固定した標本脳を比較すると、急性タイプ群は脳幹部周囲にカオリンの沈着が多いのに対し、亜急性タイプ群では少ないとの所見の差があった。前者は第四脳室出口孔を塞いだ閉塞性水頭症モデルであり、後者は交通性水頭症モデルである可能性が考えられた。

E. 結論

新生児ラットを用いて、急性と亜急性の2種類の実験的水頭症モデルを作成した。水頭症の発生機序により、その臨床経過と予後には大きな差が認められ、脳機能障害のメカニズムにも差異があると考えられた。

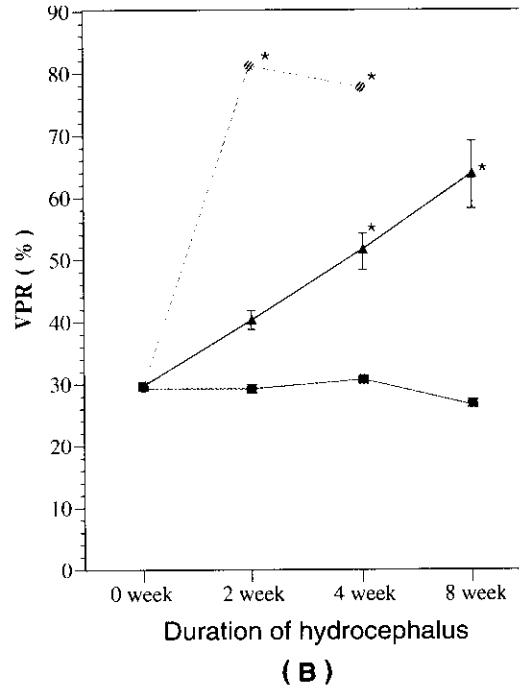
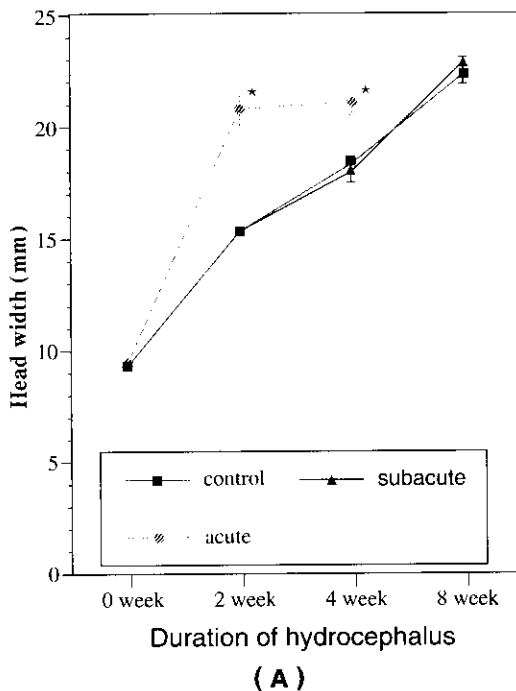


Fig. 2 (A) 経時的頭蓋最長幅変化の比較。亜急性群 (▲) はコントロール群 (■) に比して有意な差はないが、急性群 (●) は2週目より有意な増加を認めた (*).

(B) 脳室割合 VPR = 両脳室最長幅 / 全脳最長幅 × 100 (%) と定めた時の、経時的 VPR 変化の比較。急性群 (●) はコントロール群 (■) に比して2週目より有意な急増を示した (*). 亜急性群も進行性に増加し、4週目以降有意な増加を認めた (*).

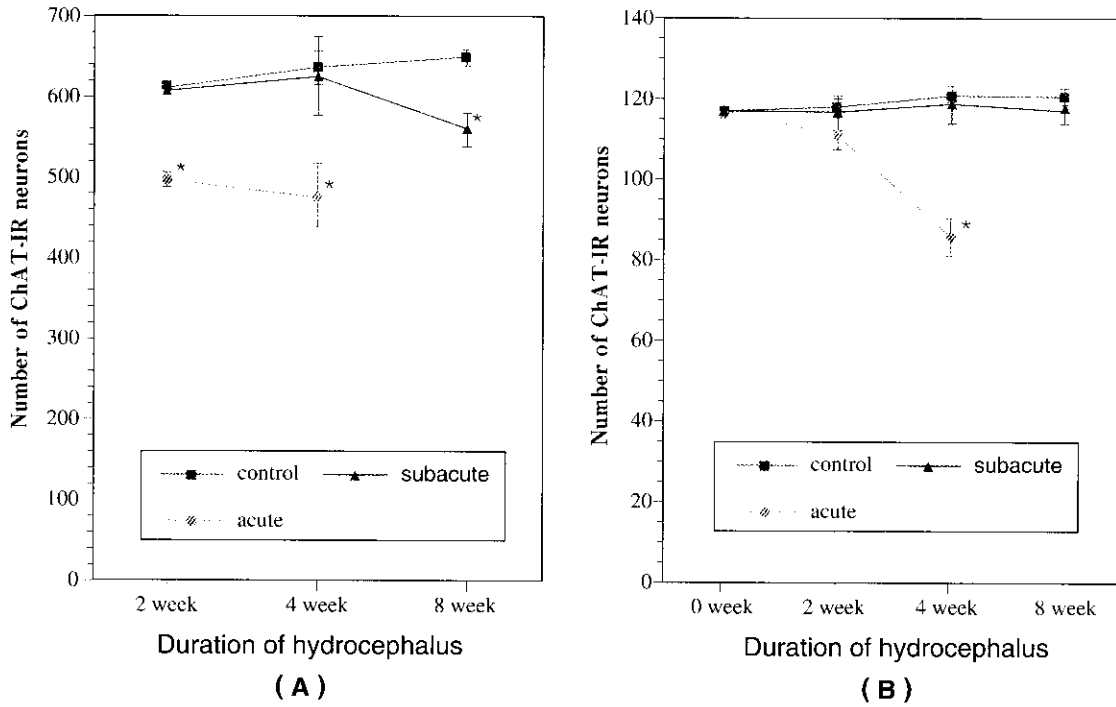


Fig. 3 (A) 線条体内 ChAT-IR (choline acetyltransferase 免疫陽性)ニューロン数の経時的変化の比較 (但し、出生時にはアセチルコリン系ニューロンの免疫染色性はまだ未確立のため0週目を除く)。急性群 (●) はコントロール群 (■) に比して2週目より有意な減少を示した (*)。亜急性群も8週目に有意な減少を認めた (*)。(B) 黒質内 TH-IR (tyrosine hydroxylase 免疫陽性)ニューロン数の経時的変化の比較。急性群 (●) はコントロール群 (■) に比して4週目で有意な減少を示した (*)。亜急性群は有意な減少を認めなかった。

X-linked hydrocephalusにおける*LICAM*遺伝子異常の解析 —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 鑑二⁵ 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

研究要旨

今回本邦においても新規に同定された11家系のX-linked hydrocephalus (以下、XLH) の*LICAM*遺伝子異常を報告した。21家系について遺伝子解析を行い、11家系に新規*LICAM*遺伝子異常が同定され、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。文献報告例を加えた本邦16家系の*LICAM*遺伝子異常の部位はすべて別部位で、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ると予測された。また高率の遺伝子異常の同定は、遺伝子解析法の相違・XLHの臨床的特徴や放射線学的画像診断へ関心の高さに起因すると考えられた。今後、より詳細な臨床像と遺伝子型の相関関係の分析、および*LICAM*遺伝子異常の見られない先天性水頭症におけるL1以外の責任遺伝子の同定が大きな課題と考えられた。

A. 研究目的

X連鎖性劣性遺伝性水頭症 (X-linked hydrocephalus ; 以下XLHと略す) は、MASA症候群、X連鎖性劣性痙性麻痺等とともに、細胞接着因子*LICAM*遺伝子異常による症候群CRASH症候群と呼ばれている。これは、その臨床的特徴であるCorpus callosum hypoplasia脳梁低形成、Retardation精神運動発達遅滞、Adducted thumbs拇指内転屈曲、Spastic paraplegia痙性対麻痺、Hydrocephalus水頭症の頭文字を取って命名されたものである。1992年、Rosenthal¹⁾らによってXLHの1家系に*LICAM*遺伝子異常が報告されてから現在まで、148家系から135タイプ (single nucleotide polymorphism[SNP]疑いは除く) のL1遺伝子異常が報告されている。*(LICAM Mutation Web Page,*

<http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/l1/>)²⁾ 難治性先天性水頭症の分子遺伝学的研究では最も進んでいる領域である³⁻⁸⁾。本邦においても、*LICAM*遺伝子異常の同定されたXLH症例の報告は散見されるが⁸⁻¹³⁾、それらを系統的に集積し、その分子遺伝学的特徴を解析した研究は未だ無い。特に欧米以外の国で大規模な調査は始めてである。そこで私達は本邦XLH症例の*LICAM*遺伝子の解析を行い、新規に同定された11例に文献報告例5例を加え、本邦における*LICAM*遺伝子異常の分子遺伝学的特徴を解析した。

B. 研究方法

1 症例

水頭症バンクに、登録された症例およびそれ以前に、

岡本、山崎にL1遺伝子検索を依頼された症例の中から、家族歴からX連鎖性劣性遺伝形式が予想される家系、および臨床像や神経放射線学的特徴からXLHが疑われる家系についてL1遺伝子解析を行った。解析にあたっては、インフォームド・コンセントを充分に行い同意が得られた上で、末梢血を採取した¹⁴⁾。

2 L1CAM遺伝子解析方法

① PCR反応

Genomic DNAは末梢血白血球より標準的な方法で採取した¹⁵⁾。L1CAM遺伝子・全28エクソンは、それぞれのエクソン・イントロン境界を含むように設定されたプライマーを用いて¹⁶⁾、PCR法にて増幅した。PCR反応はgenomic DNA 100ngをテンプレートにして、Takara *Ex Taq* (宝酒造)を用いてGeneAmp(r) PCR System 9700 (PE Biosystems)にてそれぞれ30サイクルの増幅を行った。PCR反応終了後、PCR生成物は2%アガロースゲルで電気泳動確認を行い、その後、CONCERTTM Gel Extraction System (GIBCO BRL)を用いてアガロースゲルより回収した。

② シークエンス反応

シークエンスは、アガロースゲルから回収されたPCR生成物を直接テンプレートとし、PCRプライマーをシークエンスプライマーにして、ABI Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)を用いた蛍光ダイターミネーター法によるダイレクトシークエンスにて行った。シークエンス反応終了後、生成物のスピナラム精製 (AutoSeqTM G-50, amersham pharmacia biotech)を行い、キャピラリーシークエンスサー (ABI PRISM 310, Applied Biosystems)にて解析を行った。シークエンスデータはGENETYX-MAC (ver 9.01)にて解析をした。シークエンス反応はそれぞれのテンプレートで順、逆の2方向を行い、遺伝子異常の同定された部位は、異なるPCR生成物をテンプレートとしたシークエンス解析を最低2セット、4回以上行い、確認を行った。

3 解析結果の分析

① 遺伝子異常の分類

L1CAM遺伝子異常は、その遺伝子異常の部位で1.アミノ酸配列を規定する塩基配列部位に異常を有するタイプ (翻訳領域異常)、2.翻訳領域以外の部位に異常を伴うタイプ (調節部位異常)の2群に大別し、翻訳領域異常は、a. ミスセンス異常、b. ナンセンス異常、c. フレー

ムシフト異常、(FS) d. アミノ酸欠失、の4つのサブタイプに、調節部位異常は、e. スプライス部位異常 および f. イントロン異常 (branching point) の2つのサブタイプ、合計6サブタイプに細分類した。また臨床的重症度を検討するために、L1の発現のパターンから遺伝子異常をI群からIII群に分類するYamasaki分類¹⁷⁾を用いた。すなわち遺伝子異常が細胞内ドメインに限られるもの (ミスセンス異常、ナンセンス異常、フレームシフト異常、アミノ酸欠失、調節部位異常の全てを含む)をI群、細胞外ドメインの点変異およびアミノ酸欠失をII群、細胞外ドメインでのナンセンス変異・フレームシフト異常などによりL1が断裂し、膜貫通部分を有しないものを、III群に分類した。

② コントロールの設定

これまでL1遺伝子異常が同定されている報告例 (148家系135種類)のうち、日本からの報告例4家系4種類を除いた144家系131種類は、すべて欧米からの報告なので、コントロールとして用いた。その内訳は翻訳領域の異常が96種類 (I群; 10種類, II群45種類<細胞外ミスセンス異常42種類, アミノ酸欠失3種類, > III群41種類< FS 26種類, ノンセンス異常15種類> 調節部位の異常が27種類< スプライス異常26種類, branching point 1種類>, 分類不能が8種類であった。

C. 研究結果

1) 新規L1CAM遺伝子異常の同定 (表1)

11家系の患児15人保因者11人に11種類の新規L1CAM遺伝子異常を同定した。その詳細を以下に記載する。

家系A 北海道立小児総合保健センター脳神経外科で治療され、水頭症バンクに登録された症例である。胎生35週に胎児エコーで脳室拡大を認め、36週で帝王切開にて娩出、すぐに脳室腹腔シャント術 (以下シャント術)を受けている。2歳の現在重度の精神運動発達遅滞を認める。家族歴は認めていない。L1遺伝子解析を行い、intron2にあたる92-1のg→aのpoint mutationを認めた。splice siteの異常である。

家系B 広島赤十字・原爆病院小児科より岡本にL1遺伝子解析を依頼された症例である。水頭症の男児兄弟例で、2人とも脳室拡大を認め、シャント術を受けている。L1遺伝子解析を行い、intron3 [Ig1]にあたる197+1のg→aのpoint mutationを認めた。

本邦におけるL1遺伝子異常の家系
今回同定された家系

(表1)

family	exon/intron	domain	cDNAchange	consequence	type	origin	diagnosis	year of birth	VPshunt	adducted thumb
A	intron2		92-1g→a		splice site	北海道	us (35w)	1998	yes (生後0日)	
B	intron3	Ig1	192+1g→a		splice site	広島		1986	yes	
								1994	yes	
C	intron4	Ig1?	400+1g→a		splice site	母子セ	us (24w)	1989	yes (28週)	no
								1984	no	
D	exon8	Ig3	C870→A	Y290X	nonsense	虎ノ門	us (27w)	1992	yes (生後8日)	
E	intron13	Ig6	1704-1g→a		splice site	徳島	us (24w)		yes	yes
F	intron14	Ig6	1829-12 DEL19bp		branch point	北海道		1986	yes (生後16日)	
G	exon16	FN1	G2065→T	V689F	missense	国立大阪	us (29w)	1992	yes (生後3ヶ月)	yes
							us (24w)	1999	yes (生後7日)	yes
H	intron18	FN2	2431+1deigt		splice site	国立大阪		1997	no	
I	exon20	FN3	A2577→T	K860X	nonsense	静岡こども	出生時	1986	yes (生後0日)	yes
							us (32w)	1988	yes (生後0日)	yes
J	exon22	FN4	G3022→T	E1008X	nonsense	弘前	us (31w)	1990	yes (生後2ヶ月)	yes
							us (30w)	1996	yes (生後6日)	yes
K	intron22	FN5	3047-1g→a		splice site	母子セ		1993	yes	
								1988	yes	

これまでに報告のあった家系

Mizugishi ⁹	exon6	Ig2	C550→T	R184W	missense	愛媛	us		yes (生後10日)	yes
Takechi ¹⁰⁾	exon8	Ig3	841 del 5	FS281	deletion 5bp	鹿児島	PEG	1973	yes (生後2ヶ月)	yes
								1969	no	yes
Izumoto ¹⁰⁾	exon16	FN1	A1963→G	K655E	missense	大阪市総合医セ	us (40w)	1985	yes (生後1日)	yes
							CT	1979	yes	yes
Okamoto ¹²⁾	exon18	FN2	2421 del TG	FS808	deletion 2bp	大阪母子	us (25w)	1993	yes	yes
Okamoto ¹³⁾	exon22	FN3	2999 del G	FS1000	deletion 1bp	旭川医大	us	1986	yes	yes

splice siteの異常である。家系C 大阪府立母子センター脳神経外科で治療された症例である。胎生24週で水頭症を指摘され、28週で娩出後シャント術を受けている。兄も生後2時間で水頭症のため死亡している。患児と母のL1遺伝子解析を行い、intron4にあたる400+1のg→aのpoint mutationを認めた。splice siteの異常である。母はヘテロで保因者と診断された。患児は5番染色体の短腕の異常も認めた。家系D 虎ノ門病院小児科の症例で臨床症状よりXLHを疑い、遺伝子バンクに登録された。胎生27週で水頭症を指摘され35週で娩出後、生後8日にシャント術を受けている。母方のおじが水頭症のため死亡している。患児と母のL1遺伝子解析を行い、exon 8 [Ig3] に870番目のDNAがCからAに変異し、その結果290番目のチロシンがstop codonになりtruncationをきたす遺伝子異常が同定された。母はヘテロで保因者であった。兄弟とも重度精神発達遅滞を認める。家系E 徳島大学小児科の症例である。胎生24週で著明な脳室拡大を呈し、33週で帝切後シャント術を施行された。47XYYの染色体異常を伴った、患児と母のL1遺伝子解析を行い、intron13

にあたる1704-1のg→aのpoint mutationを認めた。splice siteの異常である。母はヘテロで保因者と診断された。家系F 北海道立小児総合保健センター脳神経外科で治療され、水頭症バンクに登録された症例である。胎生35週で脳室拡大を認め生後16日にシャント術を受けている。家族歴は認めていないL1遺伝子解析を行い、intron14にあたる1829-12に19bpのdeletionを認めた。branch pointの異常である。家系G 発端者は胎生29週に胎児エコーで診断され大阪府立母子保健センター脳神経外科でシャント術を受けている。国立大阪病院脳神経外科へ転院した。弟も胎生24週で水頭症と診断された。母の兄も先天性水頭症で生後すぐに死亡している。患児2名および母とその妹のL1遺伝子解析を行った。exon 16 [FN1] の2065番目のDNAがGからTに変異し、その結果689番目のバリンがフェニルアラニンに置換するミスセンス変異を示した。母と母の妹は保因者であった。兄弟とも重度精神発達遅滞を認める。家系H 発端者は、胎生28週に水頭症と診断され死産になっている。この児の母の兄も2人水頭症で1人は胎生10ヶ月に死産であった。もう一人の兄は生

(表 2)

		欧米	%	本邦	%
翻訳領域					
I群	cytoplasmic	10	8.1	0	0
II群	missense	42	34.1	3	18.6
	del	3	2.4	0	0
III群	FS	26	21.1	3	18.6
	nonsense	15	12.2	3	18.6
調節部位					
splice site		26	21.1	6	37.5
branch point		1	0.8	1	6.3
		27	22	7	43.7
		123		16	
不明		8		0	
polymorphism		2		0	
		133		16	

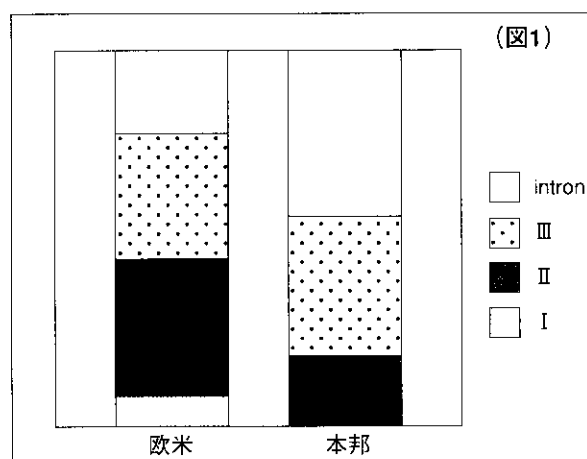
後5ヶ月でシャントをし、7ヶ月に死亡している。母と祖母が遺伝子検索を希望した。intron18にあたる2431+1のgtの2bpが欠失していた。splice siteの異常である。母、祖母ともにヘテロで保因者と診断された。**家系I** 静岡こども病院脳神経外科で治療を受けている。兄は出生後CTで著明な脳室拡大を認め生後1日でシャント術を受けた。弟は胎生32週にエコーで診断されたが、生後すぐにシャント術を施行されている。いずれも重度の精神運動発達遅滞を認める。2人の患児と母のL1遺伝子解析を行った。exon 20 (FN3) に2577番目のDNAがAからTに変異し、その結果860番目のリジンがstop codonになりtruncationをきたすことが明らかになった。母はヘテロで保因者であった。**家系J** 弘前大学小児科から水頭症バンクに登録された。胎生31週に胎児エコーで脳室拡大を指摘され、38週に娩出後、生後2ヶ月にシャント術を受けた。弟も30週に胎児エコーで脳室拡大を指摘され、37週で娩出され、6日でシャント術を受けた。兄弟とも重度の精神運動発達遅滞を後遺している。2人の患児と母のL1遺伝子解析を行った。exon 22 (FN4) に3022番目のDNAがGからTに変異し、その結果1008番目のグルタミン酸がstop codonになりtruncationをきたす結果となることが明らかになった。母はヘテロで保因者であった。**家系K** 兵庫の病院でシャントを受けた兄弟の水頭症例で、遺伝子検索を希望し大阪府立母子センターを受診した。兄弟と母と母の妹の遺伝子検索を行いintron22にあたる3047-1 (FN5) のg→aのpoint mutationを認めた。splice siteの異常である。

2) L1遺伝子異常の分類と発見率 (表 2)

新たに解析を行った21家系中、L1CAM遺伝子異常を認めたのは合計11家系(患児15例/保因者11例)で、全体の発見率は52.4%であった。L1CAM遺伝子異常の部位は11家系ともすべて別々の場所で、そのうち1例のみ(家系H)が海外で既に報告されている異常部位と同一のものであった。11種類の異常の内訳は、翻訳領域の異常は4家系のみでその他はスプライス部位が6例・branching pointが1例であった。翻訳領域のうちI群に属するものではなくII群が1例、III群が3例であった。先天性水頭症患者発生の家族歴のない9家系からは3例のL1CAM遺伝子異常が同定され、発見率は33.3%であった。一方、男児のみの水頭症患者発生の家族歴を有する12家系からは8家系のL1CAM遺伝子異常が同定され、その発見率は66.7%で3分の2であった。

3) 本邦L1CAM遺伝子異常例と欧米よりの報告例との比較

本邦におけるL1CAM遺伝子異常は、今回の11家系に他施設からすでに報告のあった2家系^{9,10)}と、本研究グループでの既報告の3家系¹¹⁻¹³⁾の合計16家系である(表1)。本邦16家系と、欧米からの報告例144家系131種類のL1遺伝子異常と比較した。比較するには分類不能の8種類を除いた123種類の異常をコントロールとした。(図1)



- ① これら本邦16家系のXLHにおけるL1CAM遺伝子異常の部位は全て別部位であり、特徴的な遺伝子異常部位は存在しなかった。本邦症例では、翻訳領域異常の割合が相対的に低く(本邦56.3%、欧米78.0%)、調節領域異常の割合が高い(本邦43.7%、欧米22.0%)。