

- 8) Li K, Zheng D, Xue Y, Sun Y, Chen L, Guo J, Zhang G, Li P: The common C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with neural tube defects and preeclampsia. (in Chinese) *Chung Hua I Hsueh I Chuan Hsueh Tsa Chih* 17: 76-78, 2000.
- 9) Martinez de Villarreal LE, Delgado-Enciso I, Valdez-Leal R, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martinez A, Limon-Benavides C, Sanchez-Pena MA, Ancer-Rodriguez J, Barrera-Saldana HA, Villarreal-Perez JZ. Folate levels and N(5),N(10)-methylenetetrahydrofolate reductase genotype (MTHFR) in mothers of offspring with neural tube defects: a case-control study. *Arch Med Res* 32: 277-282, 2001.
- 10) Morita H, Taguchi J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Kurihara Y, Maemura K, Shindo T, Minamino T, Ohno M, Yamaoki K, Ogasawara K, Aizawa T, Suzuki S, Yazaki Y: Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. *Circulation* 95: 2023-2036, 1997.
- 11) MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects. results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 338: 131-137, 1991.
- 12) Mutchinick OM, Lopez MA, Luna L, Waxman J, Babinsky VE, FYVEMCE collaborative group; High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico, a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Mol Genet Metab* 68: 461-467, 1999.
- 13) 中川登志子, 玉腰暁子, 川村一孝, 他: 先天性水頭症全国疫学調査成績. 厚生省特定疾患難治性水頭症研究班. 平成12年度研究報告書, 2001, 83-86
- 14) Ou CY, Stevenson RE, Brown VK, Schwartz CE, Khoury MJ, Rosen R, Oakley GP Jr, Adams MJ Jr: 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects. *Am J Med Genet* 63: 610-613, 1996.
- 15) Rady PL, Tying SK, Hudnall SD, Vargas T, Kellner LH, Nitowsky H, Matalon RK. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): the incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Med Genet*. 86: 380-384, 1999.
- 16) Richter B, Stegmann K, Roper B, Boddeker I, Ngo ET, Koch MC. Interaction of folate and homocysteine pathway genotypes evaluated in susceptibility to neural tube defects (NTD) in a German population. *J Hum Genet* 46:105-109, 2001.
- 17) 坂本博昭, 山崎麻美, 金村米博, 岡本伸彦, 森 鑑二, 北野昌平, 西川 節: 葉酸代謝酵素5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 遺伝子 C677T の解析. 厚生省科学研究補助金 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, 40-44pp, 2000.
- 18) Shields DC, Kirke PN, Mills JL, Ramsbottom D, Molly AM, Burke H, Weir DG, Scott JM, Whitehead AS: The thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects. an evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother. *Am J Hum Genet* 64: 1045-1055, 1999.
- 19) Stegmann K, Ziegler A, Ngo ET, Kohlschmidt N, Schroter B, Ermert A, Koch MC. Linkage disequilibrium of MTHFR genotypes 677C/T-1298A/C in the German population and association studies in probands with neural tube defects(NTD). *Am J Med Genet* 87: 23-29, 1999.
- 20) Trembath D, Sherbondy AL, Vandyke DC, Shaw GM, Todoroff K, Lammer EJ, Finnell RH, Marker S, Lerner G, Murray JC. Analysis of select folate pathway genes, PAX3, and human T in a Midwestern neural tube defect population. *Teratology* 59: 331-341, 1999.
- 21) Ubbink JB, Christianson A, Bester MJ, Van Allen MI, Venter PA, Delport R, Blom HJ, van der Merwe A, Potgieter H, Vermaak WJH: Folate status, homocysteine metabolism, and methylene tetrahydrofolate reductase genotype in rural south africa blacks with a history of pregnancy complicated by neural tube defects. *Metabolism* 48: 269-274, 1999.
- 22) van der Molen EF, Arends GE, Nelen WLDM, van der Put NJM, Heil SG, Eskes TKAB, Blom HJ: A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene as a new risk factor for placental vasculopathy. *Am J Obstet Gynecol* 182: 1258-1263, 2000.
- 23) van der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels FJM, Eskes TKAB, van den Heuvel LP, Mariman ECM, den Heyer M, Rozen R, Blom HJ: Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor of spina bifida. *Lancet* 346: 1070-1071, 1995.
- 24) van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 62: 1044-1051, 1998.
- 25) Volcik KA, Blanton SH, Tyerman GH, Jong ST, Rott EJ, Page TZ, Romaine NK, Northrup H. Methylenetetrahy-

drofolate reductase and spina bifida: evaluation of level of defect and maternal genotypic risk in Hispanics. *Am J Med Genet* 95: 21-27, 2000.

- 26) Whitehead AS, Gallagher P, Mills JL, Kirke PN, Burke H, Molloy AM, Weir DG, Shields DC, Scott JM: A genetic defect in 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects. *Q J Med* 88: 763-766, 1995.
- 27) Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 64:169-172, 1998.
- 28) 山崎麻美, 金村米博, 森 鑑二, 有田志生: 水頭症バンク設立の経過と遺伝解析. 厚生省科学研究補助金 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, 43-56pp, 2000.
- 29) Zuo M, Nishio H, Lee MJ, Maejima K, Mimura S, Sumino K: The C677T mutation in the methylene tetrahydrofolate reductase gene increases serum uric acid in elderly men. *J Hum Genet* 45: 257-262, 2000.

## 先天性水頭症全国疫学調査 —出生時期と手術時期による臨床像の比較—

島根医科大学・脳神経外科<sup>1</sup> 名古屋大学大学院・医学研究科予防医学／医学推計・判断学<sup>2</sup>  
京都大学・保健管理センター<sup>3</sup> 順天堂大学医学部・衛生学<sup>4</sup> 国立大阪病院・脳神経外科<sup>5</sup>

上村 岳士<sup>1</sup> 森竹 浩三<sup>1</sup> 中山登志子<sup>2</sup> 玉腰 暁子<sup>2</sup> 川村 孝<sup>3</sup>  
稲葉 裕<sup>4</sup> 山崎 麻美<sup>5</sup>

### 研究要旨

今年度は第二次調査で個人票が返送された422例を対象に出生時期、手術材料が患児の臨床像や転機にどのように影響するかについて検討を行ったのでその結果を報告する。

シャント術が80%を占め、ほぼ全例でVPシャントが行われていた。シャント術以外の治療法としては脳室ドレナージの頻度が高かったが、これら全例でシャント術に移行しており、脳室ドレナージではシャント術を行うまでの一時的な治療として行われていると考えられた。使用されたシャントバルブの種類については、低圧バルブ、圧可変式バルブが多くその中でも初回手術の第一選択は低圧バルブとする傾向にあった。

シャント術施行の有無での転帰の比較では、シャント術を施行した症例で良好な転帰を示した。分娩時期と手術時期については、水頭症の診断時期と合わせて早期診断されている症例が37週以前に分娩された場合、必ずしも早期に手術を施行されていなかった。また37週以前に分娩された場合、早期に手術することが良好な転帰を示すことはなかった。37週以降に出生した症例では、早期に手術を施行することで良好な転帰が得られていた。使用されたシャントバルブとシャント合併症については、初診症例のみを検討対象とすると、programmable pressure valve群の方がnon-programmable pressure valveに較べ明らかに合併症の割合は低かった。

### A. 研究目的

先天性水頭症の多くは成因が不明であり、予後不良である。今後の診断や治療の指針とすべく、特定疾患の疫学に関する研究班と共同で全国疫学調査を実施した。第一次調査として先天性水頭症の患者数を推計し、第二次調査として臨床像を把握、検討した。

### B. 研究方法

出生前（胎生期）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年間に受診（初診、再診含む）したものを対象とし調査を行った。「難

病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル」の推計方法に基づき、全国の小児科、脳神経外科、産婦人科6726施設から2440施設を抽出し、これらの施設を対象に郵送法により、2000年1月に水頭症の診断時期を出生前と出生後に分けて患者数を調査した（第一次調査）。患者ありと返送のあった施設には個人票を送付して臨床像を調査した（第二次調査）。以上の結果は本研究班平成12年度報告書にて報告した。今年度は第二次調査で個人票が返送された422例を対象に出生時期、手術材料が患児の臨床像や転機にどのように影響するかについて検討を行ったのでその結果を報告する。

C. 研究結果

1. 病因と転帰の比較

水頭症を病因別に原発性 (primary) のものと二次性 (secondary) のものに分けた。primary のものは、他の中枢神経奇形を伴わない単純 (simple) 型のもものと、他の中枢神経奇形を合併する合併 (complicated) 型に分け、後者は合併奇形により Dandy-Walker syndrome, myelomeningocele, occult spinal dysraphism, cranium bifidum, Chiari malformation, holoprosencephaly, arachnoid cyst, hydranencephaly, agenesis of corpus callosum, craniosynostosis に分類した。一方 secondary は intracranial hemorrhage, infection, brain tumor に分類した (Table 1)。転帰については、normal range (work or studying possible), slightly disturbed (no necessary helpful regarding day life), moderately disturbed (a little necessary helpful regarding day life), severely disturbed (necessary complete helpful regarding day life), および dead の5つに分類し、それぞれについて比較した (Fig. 1)。それぞれの成因群で症例数が10例未満のものは除外した。moderately disturbed 以上のものが60%以上を占め比較的転帰良好であったのは、primary では、simple, Dandy-Walker syndrome, myelomeningocele, Chiari

malformation の1つであり、secondary では intracranial hemorrhage のみであった。

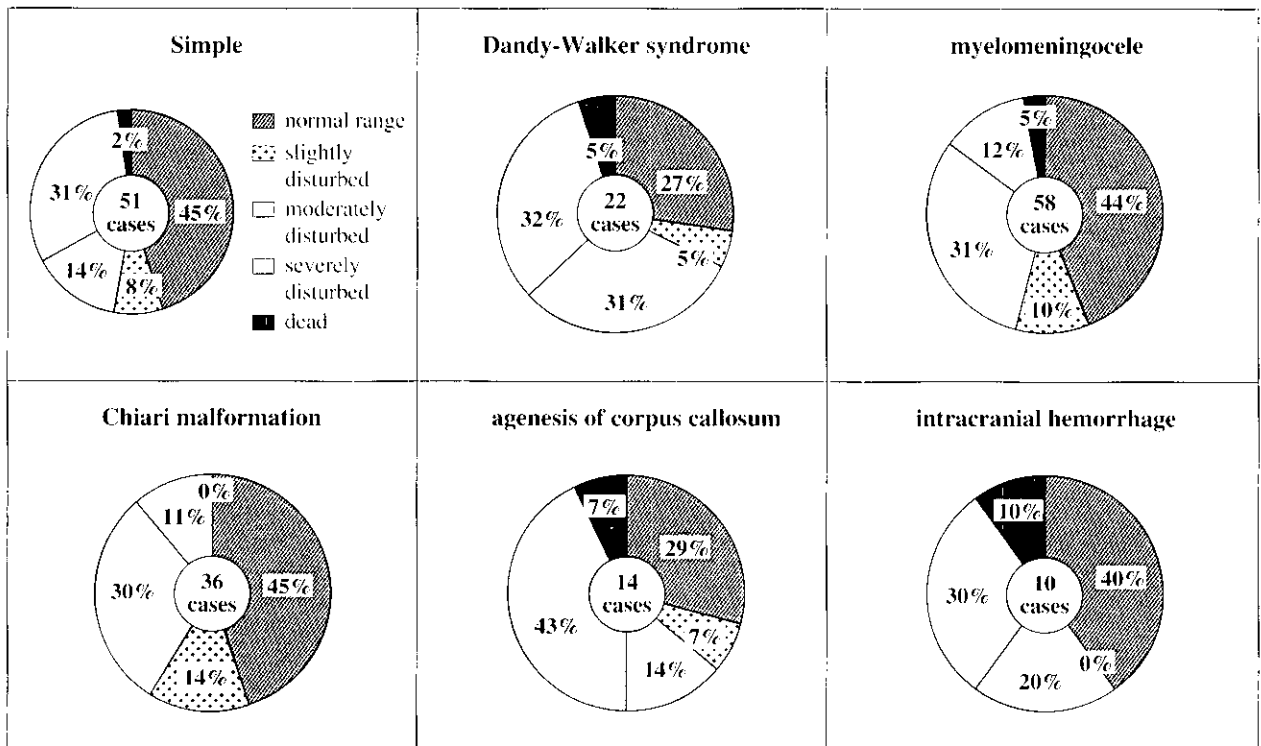
2. 診断時期

出生前に診断された水頭症について診断時期 (Fig. 2)

Table 1

Primary Hx.	Number of cases
simple	87
Dandy-Walker syndrome	27
myelomeningocele	137
occult spinal dysraphism	1
cranium bifidum	12
Chiari malformation	63
holoprosencephaly	8
arachnoid cyst	6
hydranencephaly	6
agenesis of corpus callosum	35
craniosynostosis	2
others	58
<b>Subtotal</b>	<b>349</b>
Secondary Hx.	
intracranial hemorrhage	21
infection	4
brain tumor	5
others	15
<b>Subtotal</b>	<b>42</b>
<b>Total</b>	<b>391</b>

Fig. 1

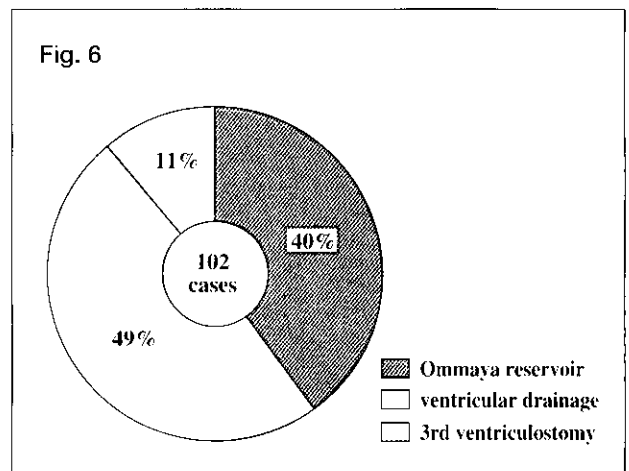
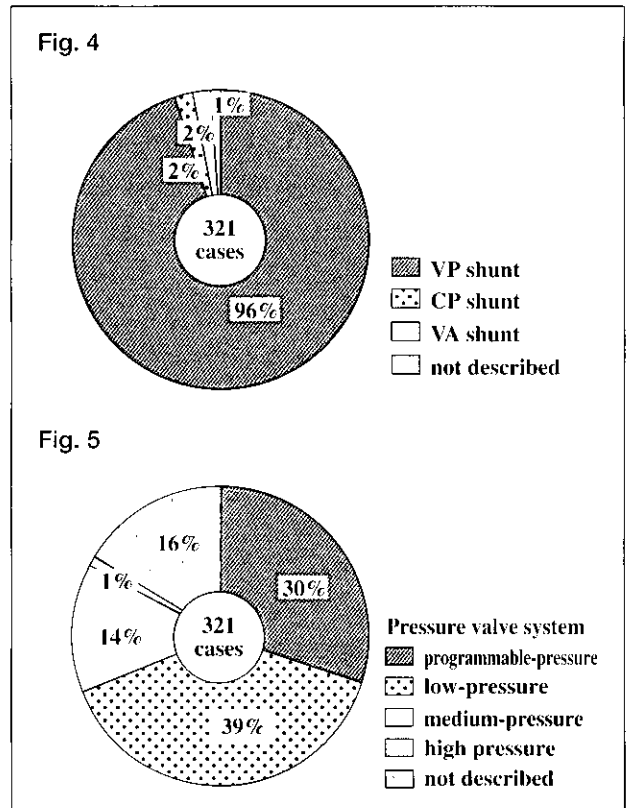
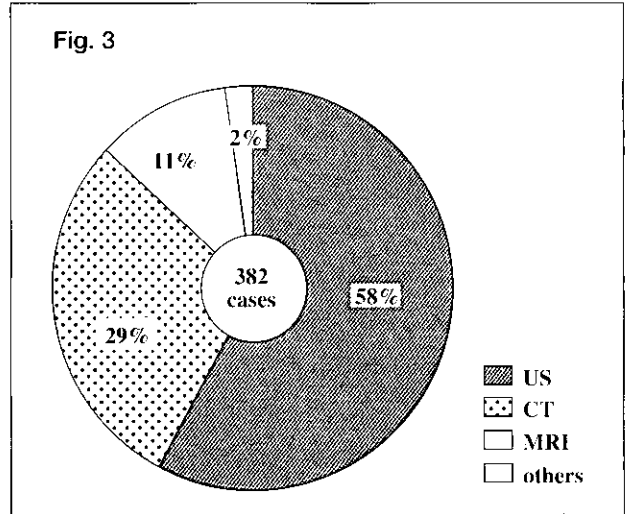
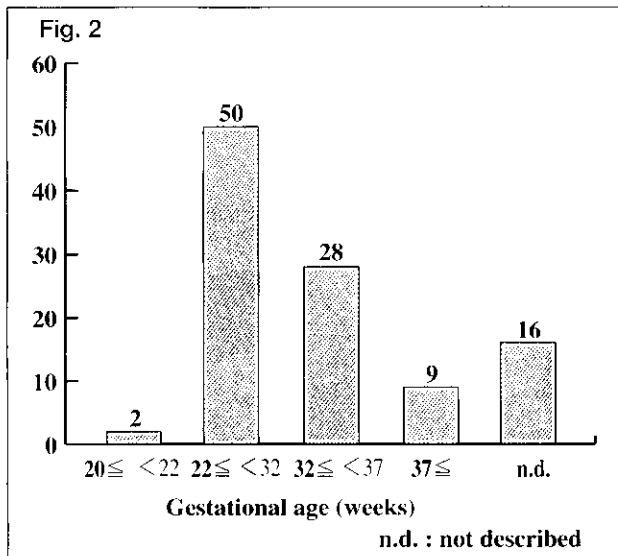


と全症例の診断方法 (Fig. 3) を検討した。診断時期は我が国において法的に墮胎の認められている妊娠22週未満、呼吸機能が未発達である32週未満、成熟児となる37週未満で区切り4期に分類した。出生前に診断された症例は105例 (26.9%) で、そのうち時期不明のものが16例含まれていた。妊娠中絶が可能な22週未満に診断されたものは2例 (0.02%) のみであった。22週-32週未満が最も多く50例 (47.6%) がこれに属した。診断は全例が超音波により行われていた。

3. シャント術式とその他の治療方法

シャント手術が行われた症例について、手術方法を比較検討した (Fig. 4)。また、シャント術に使用されたシャントバルブについても検討した (Fig. 5)。シャントバルブはprogrammable pressure valve, low-pressure valve, medium-pressure valve, high-pressure valveの4種類に分類した。シャント術以外の水頭症に対する手術について術式とシャント術の併用の有無について検討した。

水頭症に対して外科的処置を行ったのは328例 (83.9%) で、その内シャント術を行ったものは、321例 (82.1%) であった。その内訳は不明の2例を除き脳室腹腔 (VP) シャントが309例 (96.3%)、そして囊胞腹腔 (CP) シャント、脳室心房 (VA) シャントがそれぞれ5例 (1.6%) ずつであった。VAシャントは全例VPシャント術後に合併症を生じたため再手術として行われたものである。シャント術に使用されたバルブの種類については不明の52例を除き269例 (68.8%) で検討した。programmable pressure valveは95例 (35.3%)、low-pressure valveは124例 (46.1%)、medium-pressure valveは46例 (17.1%)、



high-pressure valveは4例(1.5%)であった。シャント術以外の手術については102例で行われていた (Fig. 6)。その内訳はオンマイヤーリザーバーが41例(40.2%)、脳室ドレナージが50例(49.0%)、第三脳室開窓術が11例(10.8%)であった。そのうちシャント術へ移行した症例はオンマイヤーリザーバー39例(95.1%)、脳室ドレナージ50例(100%)、第三脳室開窓術6例(54.5%)であった。オンマイヤーリザーバー、脳室ドレナージはほぼ全例シャント術が必要であった。オンマイヤーリザーバーのシャントを行っていない2症例は予後良好であり脳室拡大も軽度であった。

4. シャント術の有無と転帰の比較

全症例においてシャント術を行った群、行わなかった群に分けそれぞれの転帰を比較した (Fig. 7)。転帰について有用な回答があったのは全症例中233例(59.6%)であった。その内シャント術を行ったものでは321例中173例(53.9%)であった。シャント術を行っていないものでは63例中60例(95.2%)であった。転帰はシャント術を行った方が明らかに良好であった。

5. 出生時期と手術時期における転帰の比較

過去の論文からシャント時期を出生から1週間以内、1週間から1ヶ月以内、1ヶ月以上に分類した。また出

Fig. 8

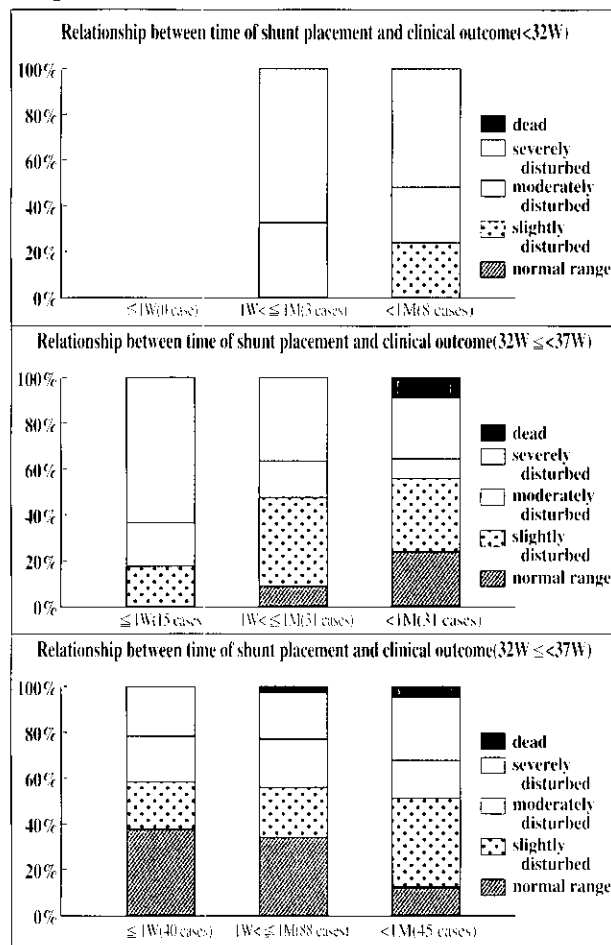


Fig. 7

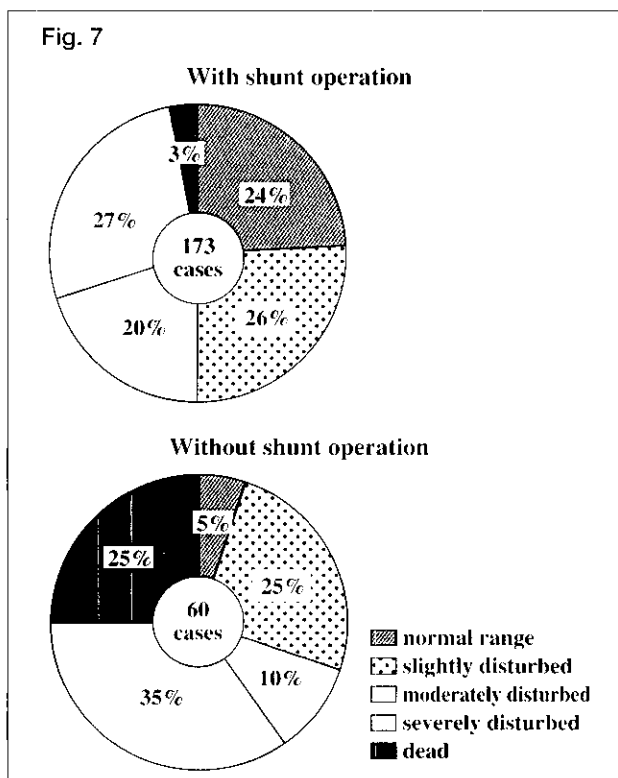
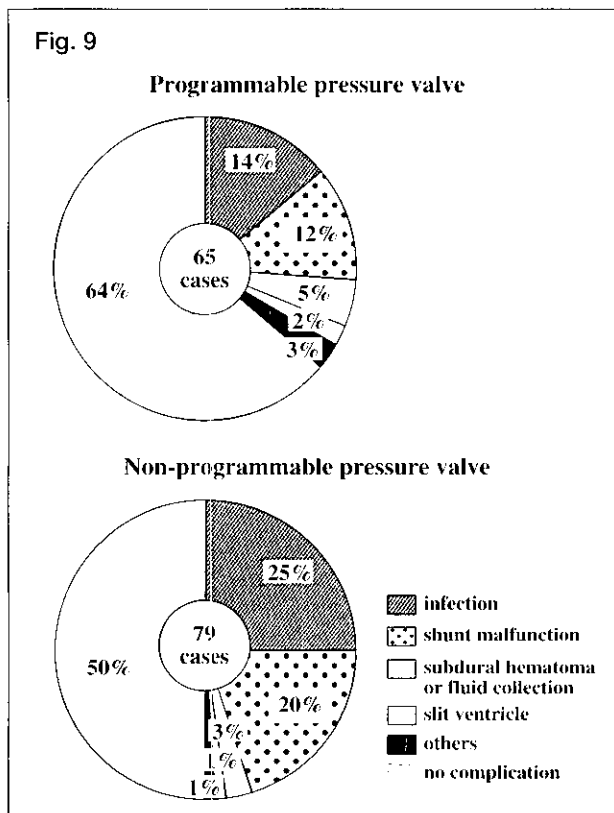


Fig. 9



生時期は32週未満、32週から37週未満、37週以降に分類した。それぞれにおいて、転帰について比較検討し、出生時期と手術時期の違いによる転帰の比較を行った (Fig. 8)。

シャント術を行った症例中、出生時期およびシャント時期について有用な回答があったのは284例 (72.6%)であった。そのうち転帰について有用な回答があったものは141例 (36.1%)であった。出生時期及びシャント時期については出生時期が32週未満では出生より一週間以内にシャント手術を行った症例はなく、正期出産では40例 (20.5%)が一週間以内にシャント手術を行っていた。シャント時期と転帰の関係では、妊娠37週以降に出生したものでは早期に手術を行った方が良好な転帰を示した。

#### 6. シャントバルブの種類と合併症

対象とした症例は初診患者のみとした。シャントバルブはprogrammable pressure valve群とnon-programmable pressure valve群の2つに大別した。シャント手術の合併症としてはinfection, shunt malfunction, subdural hematoma or fluid collection, slit ventricle, othersの5つに分類した。programmable pressure valve群とnon-programmable pressure valve群で合併症の頻度を比較した (Fig. 9)。

programmable pressure valveとnon-programmable pressure valveはそれぞれ65例、79例であった。シャント合併症を認めたのはprogrammable pressure valveでは23例 (35.5%)、non-programmable pressure valveでは40例 (50.6%)であった。programmable pressure valveで合併症はそれぞれinfection 9例 (13.8%)、shunt malfunction 8例 (12.3%)、subdural hematoma or fluid collection 3例 (4.6%)、slit ventricle 1例 (1.5%)、others 2例 (3.1%)であった。non-programmable pressure valveで合併症発生はinfection 20例 (25.3%)、shunt malfunction 16例 (20.3%)、subdural hematoma or fluid collection 2例 (2.5%)、slit ventricle 1例 (1.3%)、others 1例 (1.3%)であった。programmable pressure valveはnon-programmable pressure valveと比較し明らかに合併症発生の割合が低かった。

#### D. 考 察

最終診断では原発性が多くを占め、中でも中枢神経の合併症のある症例が多かった。水頭症の転帰については

水頭症病態そのものの誘因ではなく原疾患の重症度に左右される傾向を認めた。

診断時期では、出生後に診断された症例が多くを占めた。その原因としては、一般医において出生直前に診断され大学病院などの高次機能病院に紹介されるケースが多いためと考えられた。水頭症の出生前診断は全例超音波により行われており、診断時期が24週以降で多いことは超音波での診断可能時期とほぼ一致した。

治療法は成人例と同様にシャント術が80%を占め、ほぼ全例でVPシャントが行われていた。シャント術以外の治療法としては脳室ドレナージの頻度が高かったが、これら全例でシャント術に移行しており、脳室ドレナージではシャント術を行うまでの一時的な治療として行われていると考えられた。第三脳室開窓術施行例も少数ながら認められたが約半数がシャント術に移行しており、これは成人例とほぼ同様な傾向を示した。

使用されたシャントバルブの種類については、低圧バルブ、圧可変式バルブが多くその中でも初回手術の第一選択は低圧バルブとする傾向にあった。

シャント術の施行の有無での転帰の比較では、シャント術を施行した症例で良好な転帰を示した。しかし手術適応については言及されておらず、何らかの理由で手術が不可能の症例を除外して検討する必要があると考えられた。

分娩時期と手術時期については、水頭症の診断時期と合わせて早期診断されている症例が37週以前に分娩された場合、必ずしも早期に手術を施行されていなかった。この時期に出生した症例は未熟児などの全身的な要因で早期の手術が不可能であることが示唆された。また37週以前に分娩された場合、早期に手術することで良好な転帰を示すことはなかった。37週以降に出生した症例では、早期に手術を施行することで良好な転帰が得られていた。早期に手術されていない理由としては施設間の方針の違いや家族へのインフォームドコンセントに要する期間などが関与していると考えられた。

使用されたシャントバルブとシャント合併症については、初診症例のみを検討対象とすると、programmable pressure valve群の方がnon-programmable pressure valve群に較べ明らかに合併症の割合は低かった。

#### E. 結 論

最終評価は、moderately disturbed以上の良好な転帰を

示した症例は全体で30%程度であったが、原疾患の種類、手術時期により差違が認められた。しかし判定保留症例が多く、今後経過を追跡調査することも必要と考えられた。

#### 文 献

- 1) 中山登志子, 玉腰暁子, 川村 孝, 他: 先天性水頭症全国疫学調査成績, 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, 2001, 83-86



## 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

慶應義塾大学医学部

岡野 栄之

### 研究要旨

哺乳類の未分化な神経幹細胞に強い発現がみられるRNA結合蛋白質としてMusashiファミリーが同定されている。Musashi1遺伝子が欠損したマウスは、生後まもなく水頭症が発症し、重篤な個体は死に至る。本研究は、*musashi1*遺伝子欠損動物個体およびMusashi1の分子機能を解析し、先天性致死水頭症の発生メカニズムのひとつを解明し、有効な治療法の開発を目指すものである。

### A. 研究目的

*musashi1*遺伝子欠損マウスにみられる水頭症について発生メカニズムを明らかにし、有効な治療法を開発を行う。

### B. 研究方法

水頭症を呈する*musashi1*遺伝子欠損マウスについて、病体発生の各段階において組織化学的手法、MRI法、電子顕微鏡法を用いて形態学的解析を行った。また、細胞内におけるMusashi1蛋白質の正常機能について、生化学的手法を用いて検討した。また、Musashi1と蛋白質構造が極めて類似したMusashi2も存在する。これら2種の蛋白質が欠落した個体の作成を行い、その表現型の解析を行った。

### C. 研究結果

1. *musashi1*遺伝子欠損マウスを解析した結果、中脳水道付近に存在する細胞の異常増殖によって水頭症を発症していることが明らかとなった。2. RNA結合蛋白質Musashi1は、Notchシグナルの阻害因子であるm-Numb、細胞の増殖に関与するサイトカインの一種であるプレイオトロピンのmRNAに結合し、それらの蛋白質の発現量を制御していることが明らかとなった。m-

Numbの場合は、Musashi1が翻訳抑制を行っていることが明らかとなった。3. *musashi2*遺伝子の発現を抑制するアンチセンス核酸アナログを含む培地において、*musashi1*遺伝子欠損マウス由来の神経幹細胞を培養したところ、神経幹細胞の増殖能が著しく低下した。4. *musashi1*、*musashi2*の二重欠損マウスを作成したところ、出生前後に致死となることが明らかとなった。また、この個体は水頭症が発症するまで生存できないため、二種の遺伝子が欠損したことによる症状の変化は観察出来なかったが、胎生期の発生段階の脳神経系を組織化学的手法で解析したところ、大脳皮質・海馬などにおいて層構造の乱れ、および細胞数の減少などの異常が観察された。

### D. 考察

Musashi1は、細胞増殖を促すサイトカインの一種であるプレイオトロピン、細胞の未分化状態および増殖活性を促進すると考えられるNotchシグナルの阻害剤m-Numb、のmRNAに結合してこれらの遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。Notchシグナルは細胞の分化・増殖を規定する重要な因子であり、Musashi1は、そのシグナルを正に制御している働きを有するものと考えられる。したがって、仮説の段階に過ぎないが、*musashi1*遺伝子の欠損が、Notchシグナルの均衡の乱れにつながり、水頭症の発症を招いたのではないかと予想

できる。

## E. 結論

*musashi1* 遺伝子は、重篤な先天性水頭症の原因遺伝子である可能性がある。その病態発生のメカニズムは、異常な細胞増殖に因る中脳水道の閉塞による脳脊髄液の循環不全が原因である。Musashi1 蛋白質は、神経系前駆細胞の分化・増殖を制御するシグナルに関わる因子である。

## L1細胞内領域遺伝子変異による神経軸索形成異常の分子機構

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

神経接着分子L1は、神経軸索路の形成異常を伴う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。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・軸索形成・軸索伸長に重要な役割を担っている。L1細胞内領域と直接結合する細胞骨格関連分子アンキリンBの遺伝子欠損マウスも、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明らかになっている。さらに、L1細胞内領域アンキリン結合ドメインのアミノ酸変異 (Y1229H、S1224L、del 1181-end) の臨床例も、同様の軸索路形成異常を伴うことが知られている。そこで我々は、神経軸索成長過程におけるL1細胞内領域とアンキリンBの分子間結合の機能的意義を解析した。アンキリンB遺伝子欠損マウス由来神経細胞あるいは変異型L1 (Y1229H、S1224L、del 1181-end) を発現する神経細胞では、L1依存性軸索形成能が有意に低下していた。しかし、一度形成された軸索の伸長は、アンキリンB欠損により有意な影響を受けなかった。軸索形成過程にある神経細胞体周囲の膜様部にはアンキリンBの集積が認められ、この部位でのL1-アンキリンB結合がFRET microscopyにより可視化された。多くの場合、このアンキリンB集積部から軸索が形成された。一方、軸索先端部 (成長円錐) では、アンキリンBの集積は認められたがL1-アンキリンB結合は検出できなかった。

以上の結果より、L1は軸索形成過程にある細胞体周囲膜様部でアンキリンBと結合・集積し、軸索形成を促進することが明らかになった。また、一部のヒトL1細胞内領域の遺伝子変異は、L1-アンキリンB結合を阻害することにより神経軸索路の発生に抑制的な作用を及ぼすことが示唆された。

### 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 (Kamiguchi and Lemmon, 2000)。ヒトでのL1遺伝子異常に特徴的な臨床・病理所見として、X連鎖性遺伝性水頭症・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・小脳虫部低形成などがあげられる (Kamiguchi et al., 1998b)。L1ノックアウトマウスもこれに類似した表現型を示す (Kamiguchi et al., 1998a)。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 (Yamasaki et al., 1997)。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両者の中間である。しかし、神経軸索路の形成異常はL1遺伝子変異の部位に関わらずほぼ全症例に認められる。以上より、L1細胞外領域の機能異常すなわちL1依存性細胞接着の阻害は、水頭症の発症・増悪と深い関わりがある反面、神経軸索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。

多くのヒトL1細胞内領域遺伝子変異では、ミスセンス変異あるいはフレームシフト変異によりそのC末端側が欠損する (例えばdel 1181-end) (Kenwrick et al., 2000)。Vann Bennettらの生化学的実験により、L1細胞内領域C

末端側は細胞骨格関連分子アンキリンと直接結合することが証明されている (Davis and Bennett, 1994)。このアンキリン結合部位内のアミノ酸点変異 (Y1229H、S1224L) も神経軸索路の形成異常をきたすことが知られている。さらに、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との結合の機能的な重要性が示唆されている (Scotland et al., 1998)。本研究では、軸索成長過程におけるL1-アンキリンB結合の機能的意義を明らかにし、ヒトL1細胞内領域遺伝子変異 (Y1229H、S1224L、del 1181-end) の軸索成長に及ぼす影響を解析する。

## 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 (Scotland et al., 1998)。440-kDアンキリンBのN末端側にenhanced yellow fluorescent protein (EYFP) を付加した融合蛋白 (アンキリンB-YFP) の発現ベクターを作製した。Vance Lemmon教授 (Case Western Reserve University, USA)

より供与されたヒトL1cDNAを改変し、そのC末端側にenhanced cyan fluorescent protein (ECFP) を付加した融合蛋白 (L1-CFP) を得た。変異型L1 (Y1229H、S1224L) はoligonucleotide-directed mutagenesis kit (Clontech) を用いて作製した。変異型L1 (del 1181-end) は報告済みである (Kamiguchi and Lemmon, 1998)。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プロテインAアフィニティーカラムで精製した (Kamiguchi and Yoshihara, 2001)。

### 2. マウス神経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あるいは小脳を無菌的に摘出し、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。抗Fc抗体をコートしたスライドガラスにL1-FcあるいはN-カドヘリン-Fcを添加することにより、L1/N-カドヘリン基質を作製した。4%パラフォルムアルデヒドにて細胞を固定後、軸索突起形成の有無および軸索の長さを定量した。

### 3. 遺伝子導入

293細胞および神経細胞への遺伝子導入はLipofectamine2000 (Life Technologies) を用いて行った。導入した遺伝子産物を十分に発現する神経細胞からの軸索成長を解析するために、軸索形成の遅延した神経細胞培養系

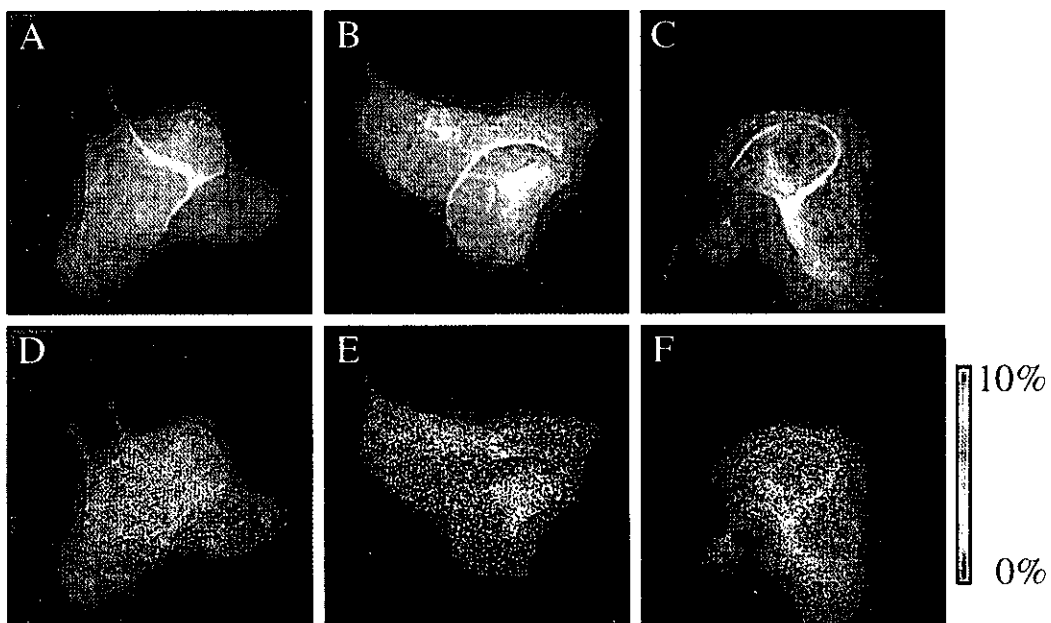


図1 L1細胞内領域アミノ酸変異 (Y1229H、S1224L) によるL1-アンキリンB結合阻害。293細胞に野生型L1-CFP (A,D)、Y1229H変異型L1-CFP (B,E)、S1224L変異型L1-CFP (C,F) とアンキリンB-YFPを共発現させ、L1-CFPの蛍光像 (A-C) およびFRET効率の擬似カラー表示 (D-F) を示す。

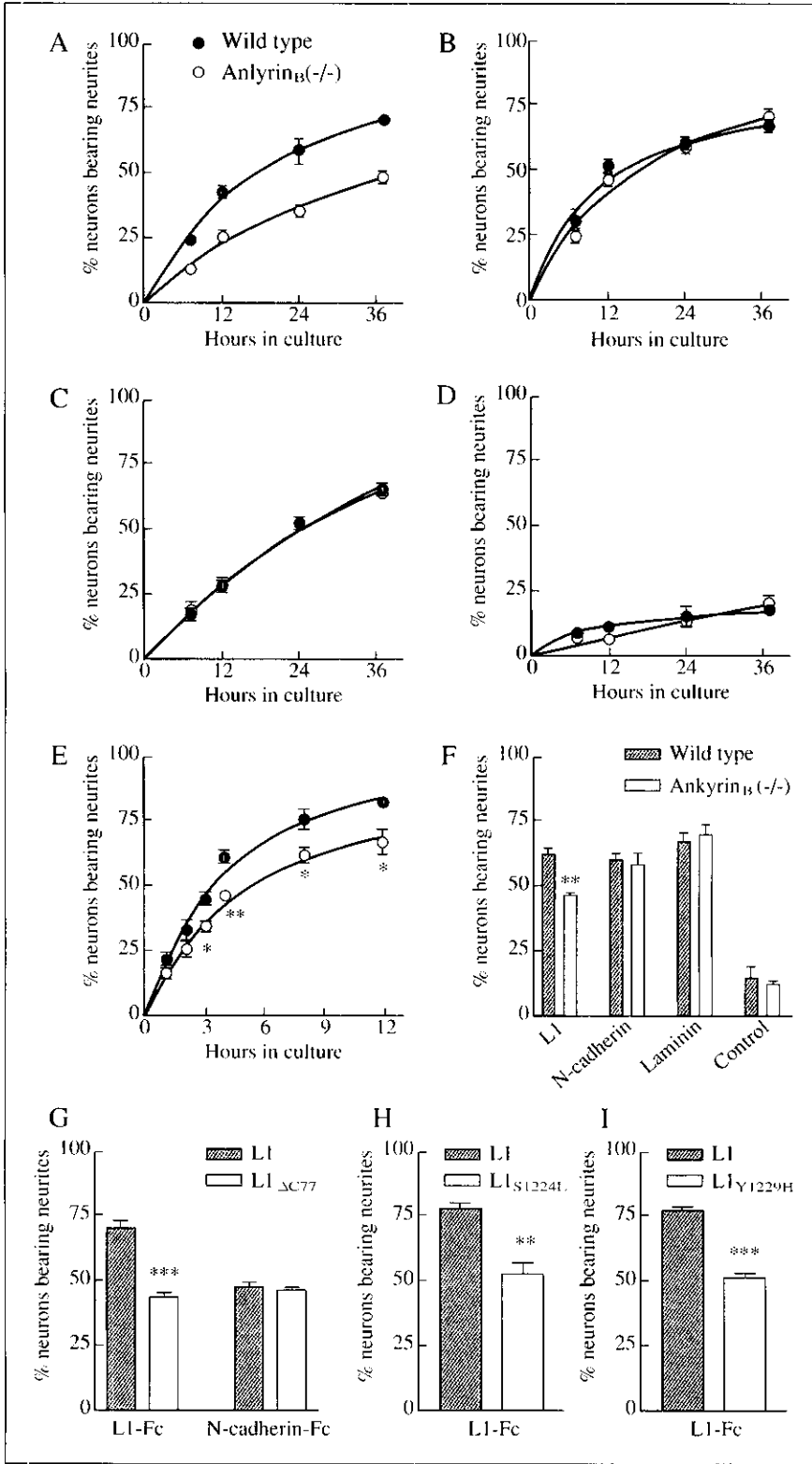


図2 アンキリンB欠損あるいはL1細胞内領域アンキリン結合部位アミノ酸変異の軸索形成に及ぼす影響。A-F、野生型マウスおよびアンキリンBノックアウトマウス由来小脳顆粒細胞 (A-D) あるいは脊髄後根神経節神経細胞 (E,F) を分散し、以下の基質上に培養した。L1基質 (A,E,F)、N-カドヘリン基質 (B,F)、ラミニン基質 (C,F)、抗Fc抗体のみでコートした基質 (D)。神経突起を有する神経細胞の割合と培養時間との関係を示した。G-I、野生型マウス脊髄後根神経節神経細胞に野生型L1あるいは変異型L1を遺伝子導入し、L1-FcあるいはN-カドヘリン-Fcで軸索形成を誘導した。その4時間後に、導入遺伝子を発現する神経細胞のみを対象として、軸索突起を有する細胞の割合を定量した。

を確立した。脊髄後根神経節細胞を抗Fc抗体のみでコートしたスライドガラス上で培養し、十分な外来遺伝子産物の発現を確認した後に、L1-FcあるいはN-カドヘリン-Fcを添加し軸索形成を誘導した。

4. 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の定量

CFP発現細胞・YFP発現細胞・CFP/YFP発現細胞の蛍光画像を、CFPチャンネル・YFPチャンネル・FRETチャンネルで取得した。これらの画像を理論的演算処理することによりFRET効率(%)を算出し (Gordon et al., 1998)、この値を擬似カラー表示した。

### C. 研究結果

#### 1. L1-アンキリンB分子間結合に及ぼすL1細胞内遺伝子変異の影響

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。そこで生細胞におけるL1とアンキリンBの結合を可視化するため、293細胞にL1-CFPおよびアンキリンB-YFPを共発現させ、そのFRET効率を定量した(図1)。野生型L1を発現する293細胞同士の接着面では10%程度のFRETが検出されたが、L1発現細胞とL1非発現細胞との接着面には有意なFRETは検出されなかった。Y1229HあるいはS1224Lの遺伝子変異を有するL1-CFPとアンキリンBを共発現する293細胞では、いずれも有意なFRETは検出されなかった。以上の結果より、1) L1細胞内領域とアンキリンB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、2) L1細胞内領域アミノ酸変異(Y1229H、S1224L)はL1-アンキリンB結合を阻害することが明らかとなった。

#### 2. L1依存性軸索形成過程におけるL1-アンキリンB結合の役割

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細胞内領域遺伝子変異(Y1229H、S1224Lなど)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小脳顆粒細胞および脊髄後根神経節神経細胞を用いて、軸索突起形成能および伸長能を解析した(図2A-F)。いずれの神経細胞においても、野生型に比較してアンキリンBノックアウトではL1基質上で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。しかし、N-カドヘリンおよびラミニン基質上での軸索形成には有意差を認めなかった。また、いずれの神経細胞においても野生型とアンキリンBノックアウト間で軸索の長さ(軸索伸長能)に有意差を認めなかった(データ示さず)。

つぎにL1細胞内領域アミノ酸変異(Y1229H、S1224L、del 1181-end)の軸索形成に及ぼす影響を明らかにするため、野生型あるいは変異型L1を強発現させた脊髄後根神経節神経細胞からの軸索突起形成を解析した(図2G-I)。いずれの変異型L1を発現する神経細胞も、野生型L1発現細胞と比較して軸索突起を有する割合が有意に低下していた。以上の結果より、L1依存性軸索形成はL1-アンキリンB結合を必要とするが、軸索伸長はアンキリンB非依存性であることが明らかになった。

そこで、軸索形成過程にある神経細胞体周囲の膜様部におけるL1-アンキリンB結合をFRET microscopyにより可視化した(図3A,B)。この膜様部の一部の領域にL1およびアンキリンBの集積が認められ、この部位で両蛋白が相互に結合することが示された。多くの場合、このアンキリンB集積部から神経軸索が形成された(データ示さず)。また、L1依存性軸索伸長がアンキリンB非依存性であったことから、伸長過程にある軸索先端部(成長

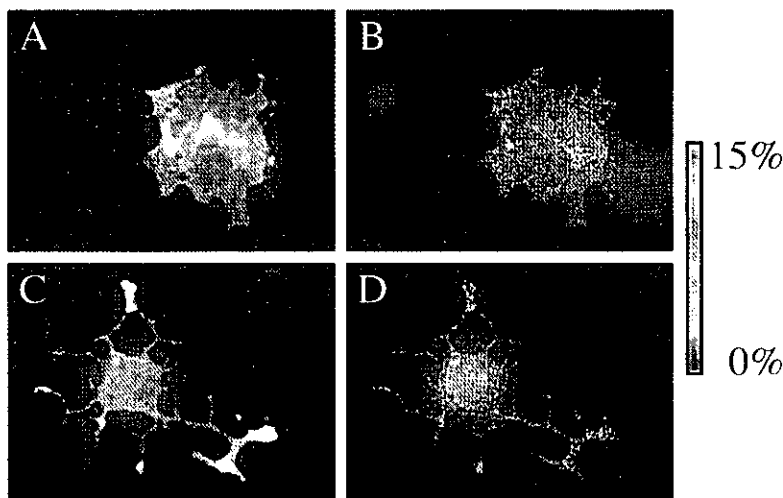


図3 軸索成長過程にある神経細胞でのL1-アンキリンB結合の可視化。培養脊髄後根神経節神経細胞にL1-CFPおよびアンキリンB-YFPを遺伝子導入し、それら遺伝子産物が発現した後にL1-Fcにより軸索成長を誘導した。軸索形成過程にある神経細胞(A,B)あるいは軸索伸長過程にある神経細胞(C,D)でのアンキリンB-YFP蛍光像(A,C)およびFRET効率(B,D)を示す。

円錐)におけるL1-アンキリンB結合の有無を解析した(図3C,D)。成長円錐では、アンキリンBの集積は認められたが、L1-アンキリンB結合は検出できなかった。

#### 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するプロセスであり、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(Zhang et al., 1998)、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繊維と結合する(Dahlin-Huppe et al., 1997)。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に影響を及ぼすアミノ酸変異(Y1229H、S1224L、del 1181-endなど)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(Kenwick et al., 2000)、L1-アンキリン結合の機能的な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-アンキリン結合の制御機構およびその神経軸索成長過程における役割を解析した。L1とアンキリンGの結合はL1細胞外領域へのリガンド結合を必要としなかったが(上口ら、未発表)、L1とアンキリン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。脊髄後根神経節神経細胞を用いたイメージング技術により、軸索形成過程にある神経細胞体周囲の膜様部にはアンキリンBの集積が認められ、この部位でL1はアンキリンBと結合することが示された。多くの場合、このアンキリンB集積部から軸索が形成された。また、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、L1依存性軸索形成はL1-アンキリンB結合を必要とすることが判明

した。

以上の結果より、L1は軸索形成過程にある細胞体周囲膜様部でアンキリンBと結合・集積し、軸索形成を促進することが明らかになった。また、一部のヒトL1細胞内領域の遺伝子変異は、L1-アンキリンB結合を阻害することにより神経軸索路の発生に抑制的な作用を及ぼすことが示唆された。

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はL1-アンキリンB結合を必要とする、3) 一部のヒトL1細胞内領域遺伝子変異(Y1229H、S1224L、del 1181-end)はL1-アンキリンB結合を阻害することにより神経軸索の形成に抑制的な作用を及ぼすことが判明した。これらの知見は、X連鎖性遺伝性水頭症に付随する神経軸索路形成異常の発症メカニズムの理解に貢献するものである。

#### F. 文献

- Dahlin-Huppe K, Berglund EO, Ranscht B, Stallcup WB (1997) 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* 9:144-156.
- Davis JQ, Bennett V (1994) Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules. *J Biol Chem* 269:27163-27166.
- Gordon GW, Berry G, Liang XH, Levine B, Herman B (1998) Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophys J* 74:2702-2713.
- Kamiguchi H, Lemmon V (1998) 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.
- Kamiguchi H, Lemmon V (2000) IgCAMs: bidirectional signals underlying neurite growth. *Curr Opin Cell Biol* 12:598-605.
- Kamiguchi H, Yoshihara F (2001) The role of endocytic L1

- trafficking in polarized adhesion and migration of nerve growth cones. *J Neurosci* 21:9194-9203.
- Kamiguchi H, Hlavin ML, Lemmon V (1998a) Role of L1 in neural development: what the knockouts tell us. *Mol Cell Neurosci* 12:48-55.
- Kamiguchi H, Hlavin ML, Yamasaki M, Lemmon V (1998b) Adhesion molecules and inherited diseases of the human nervous system. *Annu Rev Neurosci* 21:97-125.
- Kenwrick S, Watkins A, Angelis ED (2000) Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. *Hum Mol Genet* 9:879-886.
- Scotland P, Zhou D, Benveniste H, Bennett V (1998) 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* 143:1305-1315.
- Yamasaki M, Thompson P, Lemmon V (1997) CRASH syndrome: mutations in LICAM correlate with severity of the disease. *Neuropediatrics* 28:175-178.
- Zhang X, Davis JQ, Carpenter S, Bennett V (1998) Structural requirements for association of neurofascin with ankyrin. *J Biol Chem* 273:30785-30794.



## NMHC-Bミオシン欠損マウスの水頭症発症機序 —神経上皮細胞(神経幹細胞)の分裂・移動・分化の異常と細胞接着構造—

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<sup>1)</sup> 東京都神経科学総合研究所 微生物研究部門<sup>2)</sup>  
国立精神神経センター 神経研究所 疾病研究第5部<sup>3)</sup>

原 由紀子<sup>1,2)</sup> 原 嘉信<sup>1,3)</sup>

### 研究要旨

NMHC-B欠損マウスは、胎生期に水頭症を発症し出生直後までに死亡する。このマウスの水頭症の発症は、神経上皮細胞の接着異常による脳室壁の破壊に起因していると考えられる。そこで、胎生10.5-14.5日の神経組織を走査及び透過電子顕微鏡で観察し、NMHC-B欠損マウスの神経発生異常を細胞接着に注目して解析した。正常マウスの神経上皮細胞は、軟膜面と脳室面に突起を伸展し、その終端で密に接着し壁面を形成していた。とりわけ脳室面には特異的な細胞接着構造が発達していた。壁面を支持点として神経上皮細胞は、S期に軟膜面に、M期に脳室面に核移動する。有糸分裂期の細胞体は、脳室面に接して局在し、その脳室側の末端には、接着構造が認められた。一方NMHC-B欠損マウスでは、(1)胎生10.5-14.5日、神経上皮細胞の配列が乱れ、上皮層内で異所性のロゼットを形成し、その中心の管腔壁面には、脳室面と同様の細胞接着構造と線毛の形成が認められた。(2)胎生10.5-12.5日、神経上皮層内に異所性の有糸分裂像が認められた。有糸分裂期の細胞は、隣接細胞と脳室面同様の特異的接着構造を形成していた。(3)胎生10.5-14.5日、脳室壁が破壊し、脳実質の増殖細胞が脳室内へ突出していた。突出細胞には、脳室面に特異的な接着構造は認められなかった。(4)胎生14.5日、第三脳室と中脳水道の境界部位では、脳室面の変性が顕著で、多極性の異常細胞とマクロファージが脳室面を覆い、線毛、微絨毛の形成がほとんど認められなかった。これらの結果は、NMHC-B欠損マウスでは、水頭症の発症・進行が、神経上皮細胞の分裂・分化・移動と細胞接着制御の異常に起因していることを示唆している。

### A. 研究目的

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、神経上皮細胞は、脳室面と軟膜面の間で、細胞周期に同期してエレベーター運動を繰り返し、神経細胞やグリア細胞へと分化する事が知られている。NMHC-Bミオシンは細胞骨格形成に関わる蛋白で、エレベーター運動が活発な神経発生初期(胎生10.5-11.5日)では、神経上皮細胞の脳室面(ventricular surface)と軟膜面(pial surface)に特に高いレベルで発現している。

我々は平成11年度、NMHC-B欠損マウスの脳の発生を光学顕微鏡で解析し、これらのマウスが胎生12.5日に脳室壁の局所破壊を示し、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ことを報告したり。また平成12年度、胎生10.5日の神経上皮細胞を走査電子顕微鏡で観察し、NMHC-B欠損マウスの脳室壁破壊が個々の神経上皮細胞の細胞破裂から起こる事を示唆したり。NMHC-Bミオシンの発現パターンを考慮すると、こうした現象は、神経発生初期の脳室面と軟膜面における神経上皮細胞の

細胞接着の脆弱化に起因していると推測される。そこで本年度は、胎生10.5-14.5日の欠損マウスの神経組織を透過および走査電子顕微鏡で観察し、細胞接着構造に注目して解析した。

## 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。

透過電子顕微鏡用の試料作製には、マウス胎児の脳組織を2%パラホルムアルデヒド、2%グルタルアルデヒド、0.15Mカコジル酸緩衝液と1%オスミウム酸で固定し、エタノール系列で脱水後、エポン包埋した。これを超薄切片ウランと鉛で電子染色し、H-7100（日立）で観察した。走査電子顕微鏡用の試料作製には、同様に固定した試料を酢酸イソアミルで処理し、臨界点乾燥後、オスミウムでコートしS-4500（日立）で解析した。

## C. 研究結果および考察

### 1. 神経上皮細胞の配列異常（ロゼット形成）

昨年我々は、胎生10.5日の野生型マウスとNMHC-Bヘテロマウスの脳を走査電顕で観察し、神経上皮細胞が脳室面と軟膜面に突起を伸展させ、両面で隣接する細胞の突起が互いに強く接着している事を報告した<sup>2)</sup>。特に脳室面においては、隣接している細胞が分岐した微小突起を交錯させ、接着強度を高めていると考えられた。神経上皮層の断面を透過電顕で観察すると、脳室面と軟膜面



図1 胎生10.5日ヘテロマウス中脳の脳室面の透過電顕像

脳室面では、神経上皮細胞の細胞体や細胞突起が緻密に接触し壁面を形成している。とりわけ脳室面に接する末端の細胞接触部位では、adherent junction様の特異的な細胞接着構造が認められた。脳室壁側の細胞は、核が多様化しており、神経上皮細胞（幹細胞）が脳室側で分裂したものと推測される。

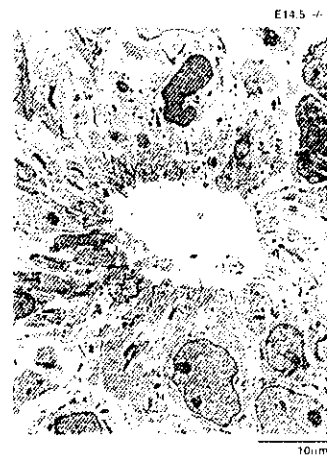


図2 胎生14.5日のNMHC-B欠損マウス中脳のロゼット形成を示す透過電顕像

NMHC-B欠損マウスでは神経上皮細胞が配列異常をおこし、胎生10.5日にロゼット形成が認められた。ロゼットの中心の微小管腔面には、脳室壁と同様の細胞接着構造が存在した。胎生14.5日には、ロゼット周囲の細胞接着構造はより顕著になり、ロゼット内部に線毛（cilia）の発生も認めた。

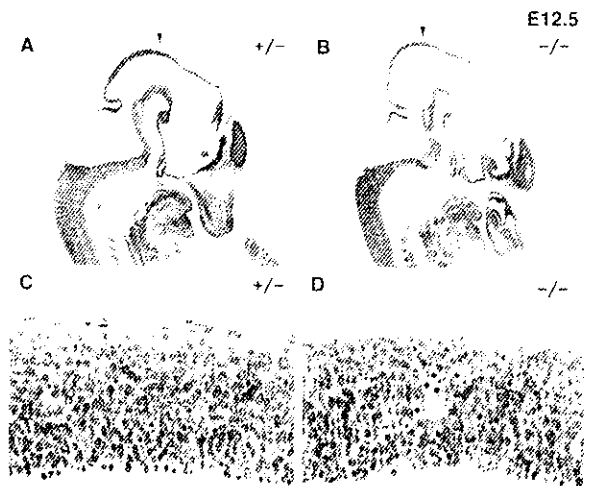


図3 胎生12.5日のNMHC-B欠損マウス中脳の異所性核分裂像

(A,C):NMHC-Bヘテロマウス (B,D):NMHC-B欠損マウスヘテロマウスでは核分裂像が脳室面で認められる。一方NMHC-B欠損マウスでは、異所性の核分裂像が神経細胞層の種々の部位で認められる。

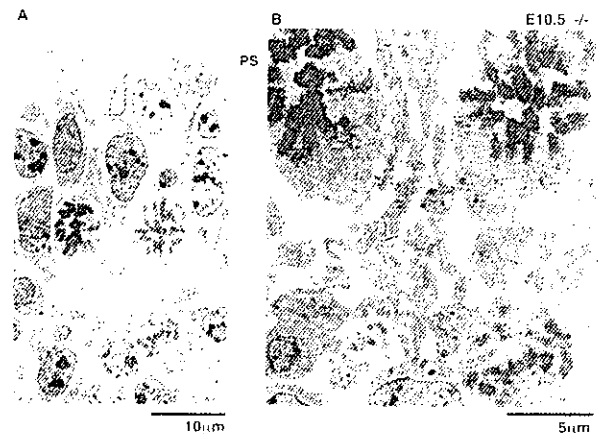


図4 胎生10.5日NMHC-B欠損マウス中脳の異所性有糸分裂細胞の透過電顕像

(A):低倍透過電顕像。(B):高倍透過電顕像。神経上皮細胞層内で異所性に有糸分裂期の細胞を認めた。有糸分裂細胞は、核膜を消失し花びら状の核クロマチンを持ち、互いに脳室面と同様の接着構造で接着していた。

では、神経上皮細胞の細胞体や細胞突起が緻密に接触し壁面を形成していた。とりわけ脳室面に接する末端の細胞接触部位では、adherent junction様の細胞接着構造が認められた(図1)。このような細胞接着構造は、脳室面に局在しており、軟膜面や上皮層内部の細胞接触部位には認められない。

一方、NMHC-B欠損マウスでは、胎生10.5日に神経上皮細胞に配列異常を来とし、上皮細胞層内に異所性のロゼット形成が認められた。ロゼットの中心に微小管腔が形成され、管腔面に細胞突起が密に接着し、脳室と同様の構造を示すことを走査電顕で観察し昨年報告した<sup>2)</sup>。ロゼットの管腔面をさらに透過電顕で観察すると、脳室面に特異的な細胞接着構造が確認された。胎生14.5日には、ロゼット形成がさらに進行し、発達した細胞接着構造と少数ながら線毛(cilia)が管腔面に認められた(図2)。

2. 異所性の有糸分裂

神経上皮細胞の核は、DNA合成期(S期)に軟膜面に、有糸分裂期(M期)に脳室面に移動し、細胞周期に

同期してエレベーター運動をすることが知られている。胎生10.5日の野生型とヘテロマウスでは、染色体が凝縮した核分裂期の細胞や細胞質分裂期の細胞像が、脳室面に局在して観察された。一方NMHC-B欠損マウスでは、有糸分裂期(M期)の細胞像が、脳室面のみならず、層内の種々の部位で高頻度に認められた(図3)。図4は、軟膜面の近くで異所性に分裂しているM期の細胞を示しており、核膜が消失し染色体が凝縮した像が認められる。興味深いことに、これらの異所性分裂細胞の突起間には、脳室に特異的な接着構造が高頻度に認められる。

3. 神経上皮細胞の細胞接着構造の消失と脳室内への細胞突出

我々は、これまで光学顕微鏡による観察から、胎生12.5日、NMHC-B欠損マウスの脳室壁が局所的に破壊され、胎生13.5日以後、第三脳室、中脳水道、第四脳室で、細胞が脳室に突出し、神経上皮細胞や神経細胞とグリア細胞を含む巨大な細胞塊を形成する事を明らかにしてきた<sup>3)</sup>。

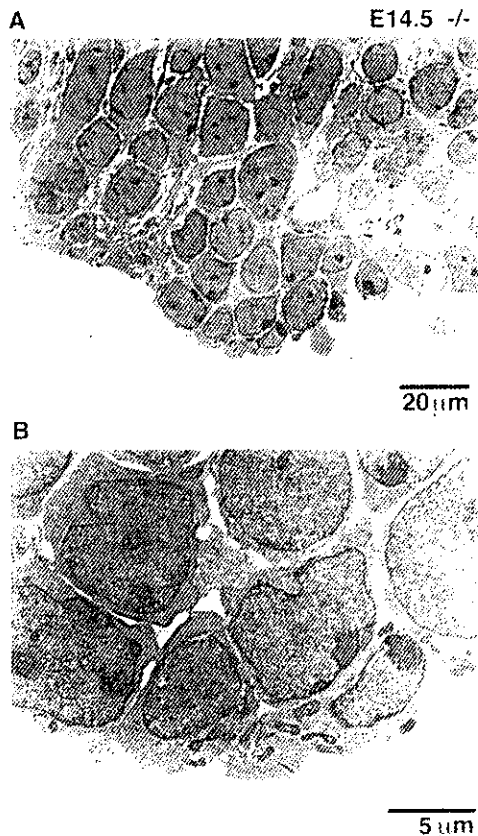


図5 胎生14.5日NMHC-B欠損マウスの中脳神経上皮細胞の接着構造の消失と脳室内への細胞突出  
NMHC-B欠損マウスの脳室面の接着構造は、胎生10.5日では、正常マウスと同様に形成されるが、発生が進行するとともに局所的に減少、消失し、胎生14.5日では、脳室に細胞が突出している像が高頻度に認められる。

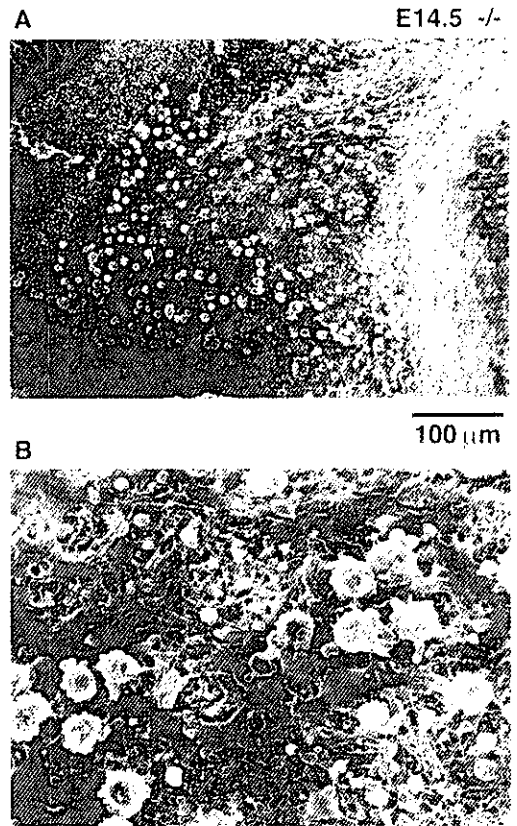


図6 胎生14.5日NMHC-B欠損マウスの第三脳室と中脳水道の境界部の脳室面の変性と破壊  
第三脳室と中脳水道の境界部は、脳室のなかで最も重度の変性破壊像を示す。胎生10.5日ではすでにこの部位で微小穿孔を伴う膨隆細胞とその破裂像が高頻度に観察される。胎生14.5日では、破壊と変性が広範囲に進行し、脳室面が網状に変性し、多数のマクロファージが脳室面に集積していた。

また走査電顕により胎生10.5日のより早期の神経上皮細胞を解析し、脳室面の破壊が細胞単位で始まり、次第に隣接する細胞に拡散していくことを報告した<sup>2)</sup>。NMHC-B欠損マウスの脳室面を透過電顕で観察すると、胎生10.5日では、脳室面の局所的な膨隆と微小穿孔が認められるものの、細胞接着構造の形成は、野生型マウスと同様に認められた。しかしながら、発生が進むにつれて脳室面の局所的な破壊と変性が進行し、しだいに接着構造が減少消失し、神経上皮細胞が脳室に突出している像が高頻度に観察された(図5)。

#### 4. 脳室表面の破壊と変性及びその好発部位

NMHC-B欠損マウスの脳室表面を走査電顕で観察すると、破壊と変性の進行度に部位特異的な差異が認められる。第三脳室と中脳水道の境界部は、脳室のなかで最も重度の破壊像を示す。胎生10.5日では、すでにこの部位で微小穿孔を伴う膨隆細胞とその破壊像が高頻度に観察される。胎生14.5日では、破壊と変性が広範囲に進行し、脳室面が網状に変性し、多数のマクロファージが脳室面に集積していた(図6)。また中脳水道では、多極性の異常細胞が脳室表面に広範囲に浸潤し、多層性に重なり突起を絡み合っている像が認められた。これらの領域では、線毛や微絨毛がほとんど形成されず、脳脊髄液の循環障害の直接的な原因になると考えられる。第四脳室では、腹側正中部位の脳室壁の局所的破壊が高頻度に認められ、細胞塊を形成し脳室に突出する事が多い。また第三脳室では、視床下溝の破壊と細胞塊の突出が少数認められるが、変性破壊は、上記の領域に比べて軽度である。側脳室は、脳室面の変性破壊が最も軽微で胎生14.5日までは比較的正常に近い脳室面を維持している。しかしながら胎生15.5日以後、第三脳室背側部と中脳水道が閉塞すると、側脳室や第三脳室でも脳室の破壊と変性が急速に進行する。

#### D. 結論

本年度我々は、胎生10.5-14.5日のNMHC-B欠損マウスの神経発生を透過及び走査電顕で観察し、神経上皮細胞の分裂、分化、移動における細胞接着の役割に注目して解析し、以下の結果が得られた。(1) 神経上皮細胞は、脳室面と軟膜面に突起を伸展し強く細胞接着しており、とりわけ脳室面では特異的なadherent junction用の細胞接着構造が発達している。(2) NMHC-B欠損マウスでは、胎生10.5日、脳室面に細胞接着構造の形成が認

められるが、発生の進行とともに局所的に接着構造が減少、消失し、この部位と一致して脳室面の変性と破壊が観察される。(3) 脳室面の変性破壊部位では、神経上皮細胞の突起が、核移動や細胞移動に必要な接着点を失い、迷走、退縮し、異所性に細胞接着構造を形成している像が観察される。(4) 神経上皮層内の種々の部位で異所性の有糸分裂細胞が高頻度に観察される。これらの細胞は、細胞周期に同期したエレベーター運動が完遂できず層内で停留し、異所性に有糸分裂を開始したものと推定される。(5) 異所性のロゼットは、同様のメカニズムで脳室に特異的な細胞接着構造が異所性に形成され、この部位を起点に細胞分裂が進行し、脳室面と同様の構造が形成されたものと推察される。(6) 脳室内に突出した細胞塊は、細胞接着構造を消失しており、細胞の分裂と移動が脳室面の制御を受けずに進行し形成されたものと考えられる。(7) 脳室面の変性破壊が更に進行すると、多極性の異常細胞が脳室表面に広範囲に浸潤し、線毛や微絨毛がほとんど形成されないことから、脳脊髄液の循環障害の原因となると考えられる。とりわけ第三脳室と中脳水道の境界部は、正常マウスでは、脳室系のなかでも線毛のよく発達している領域であるが、NMHC-B欠損マウスでは、この部位で最も重度の変性破壊が認められる。これらの結果は、NMHC-Bが、神経上皮細胞の細胞接着に重要な役割を担い、その欠損により神経上皮細胞の分裂、分化、移動に異常を来し、脳室形成異常と水頭症を発症する事を示唆している。

#### 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。

#### F. 文献

- 1) 原嘉信、原山紀子：NMHC-Bミオシン遺伝子欠損マウスの水頭症発生機序—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 2000, 26-29.
- 2) 原山紀子、原嘉信：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—厚生省特定疾患難治性水頭症調査研究班—平成12年度研究報告書 2001, 16-21.
- 3) Tullio, A., Bridgman P.C., Tresser, N.J., Chan, C., Conti, M.A., Adelstein, R.S., Hara, Y. Structural Abnormalities