

develop in the brain following ablation of the gene encoding nonmuscle myosin II-B heavy chain. *J. Comp. Neurol.* 2001, 433 62-74.

- 4) Uren, D., Hwang H., Hara, Y., 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.

DNA polymerase λ ($\beta 2$)ノックアウトマウスにおける 水頭症発症メカニズムの解析と 水頭症DNAバンクにおける遺伝子異常の解析

国立長寿医療研究センター老年病研究部¹ 中外製薬株² 北海道大学医学部分子細胞病理³
産業技術総合研究所ティッシュエンジニアリング⁴ 国立大阪病院脳神経外科⁵

小林 洋介¹ 渡部 美穂² 岡田 由紀³ 澤 洋文³ 鈴木 宏志²
金村 米博⁴ 山崎 麻美⁵ 長嶋 和郎³ 池田 恭治¹ 本山 昇¹

研究要旨

DNA polymerase λ (Pol λ)は、DNA polymerase β (Pol β)と相同性を有するfamily Xに属する新規DNA polymeraseである。Pol λ はN末端にタンパク相互作用に関与するBRCTモチーフを有している。Pol λ ノックアウトマウスは、生後発育遅延と頭部肥大が認められ水頭症を発症して死亡した。また、臓器逆位、慢性副鼻腔炎などの所見も認められた。このような水頭症・慢性副鼻腔炎・臓器逆位という点からPol λ ノックアウトマウスは、Kartagener's syndromeなど、繊毛・鞭毛の運動異常をしめすimmotile cilia syndromeのモデルマウスと考えられる。そこで、脳室上衣細胞及び気管支上皮細胞の繊毛の構造を電子顕微鏡で検討した結果、繊毛のinner dynein armが欠損していることが明らかになった。これらの知見と一致して、雄では精子の運動異常により不妊であった。これらの結果から、Pol λ ノックアウトマウスでは、脳室上衣細胞の繊毛の運動異常が原因で水頭症を発症すると考えられた。また、ヒト水頭症患者においてPol λ 遺伝子の異常の有無について水頭症DNAバンクを用いて解析した結果、3例においてヘテロ接合体点変異を認めしたが、この意義については今後の検討が必要であると思われる。

A. 研究目的

DNA polymeraseは、DNAの複製・修復・組換え・減数分裂においてゲノム情報のintegrityを維持するのに重要な機能を果たしている。近年10種以上のDNA polymeraseが新たに同定されてきたが、その生理学的機能や疾病との関係は明らかにされていない。私たちはDNA polymerase Xファミリーに属するPol λ を同定し、その生理機能を明らかにするためにPol λ ノックアウトマウスを作成した。Pol λ ノックアウトマウスは、生後発育遅延と頭部肥大が認められ水頭症を発症して死亡した。そこで、Pol λ ノックアウトマウスにおける水頭症発症メカニズムを明

らかにするために、Pol λ ノックアウトマウスを詳細に検討し、脳室上衣細胞の繊毛の運動異常が水頭症発症の原因である可能性を明らかにした。また、水頭症DNAバンクを用いてPol λ 遺伝子の異常についても検討した。

B. 研究方法

胚性幹 (ES) 細胞における相同性組換えを用いエクソン1~6を欠損するPol λ ノックアウトマウスを3系統樹立した(図1)。3系統は同じ表現形を示した。

組織病理解析のため、組織は4%パラフォルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定し、パラフィン包埋し、薄切片を作成し、HE染色を行った。電子顕微鏡用の試料作

成は、組織を2%グルタルアルデヒドで固定し、1%オスミウム酸処理した。精巣の組織はブアン溶液で固定した。

C. 研究結果

Polλノックアウトマウスは水頭症・内臓逆位・慢性副鼻腔炎を示す

Polλノックアウトマウスは、生後発育遅延を示し3週までに約半数、さらに9週では約70%が死亡した(図2)。生後すぐは見かけ上異常は認められなかったが、2から4週までに頭部肥大が認められ、ドーム型の頭部を特徴とする水頭症を発症していた(図2)。側脳室が著しく拡張しており、また第3脳室も若干の拡張が認められ、著しい大脳皮質の薄化が観察された。水頭症の発症時期を明らかにするために、胎児及び新生児の脳を組織化学的に検討した。胎生13.5日から18.5日までは、脳室の拡張は認められなかった。生後1日目において側脳室の拡張が認められる個体が少数存在していた。この結果から、Polλノックアウトマウスは生後1日目から水頭症を発

症することが明らかになった。さらに、Polλノックアウトマウスは、脾臓・肝臓などの内臓全逆位及び心臓の逆位など臓器逆位、すなわち左右軸の決定に異常が生じていることが明らかになった(図2)。これらの所見は、繊毛の運動異常を原因とするimmotile cilia syndromeの所見と類似していた。そこで、immotile cilia syndromeの特徴である気管支関係の異常を検討した結果、Polλノックアウトマウスは慢性副鼻腔炎を呈していることが分かった(図3)。

Polλノックアウトマウスの繊毛はinner dynein armを欠損している

水頭症・臓器逆位・慢性副鼻腔炎などの所見から、Polλノックアウトマウスはimmotile cilia syndromeの症状を呈していることが明らかになった。immotile cilia

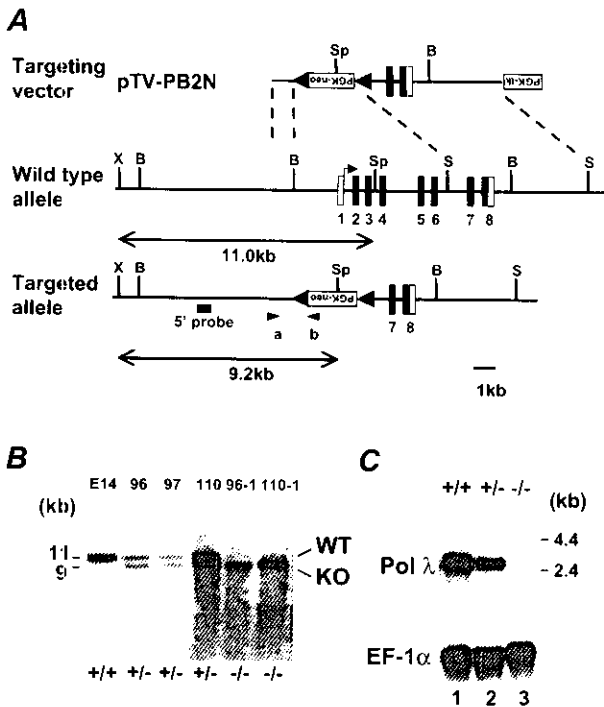


図1. ES細胞を用いたPolλ遺伝子の相同組換え (A) Polλ遺伝子座・ターゲティングベクター・組換えPolλ遺伝子座の構造。Polλ遺伝子のエクソン1-6をネオマイシン耐性遺伝子で置換した。(B) サザン解析による相同組換えの検出。野生型は11Kb、組換え体は9kbのバンドである。(C) ノザン解析。Polλノックアウトマウスでは、PolλのmRNAの発現は認められず、nullであることを示している。

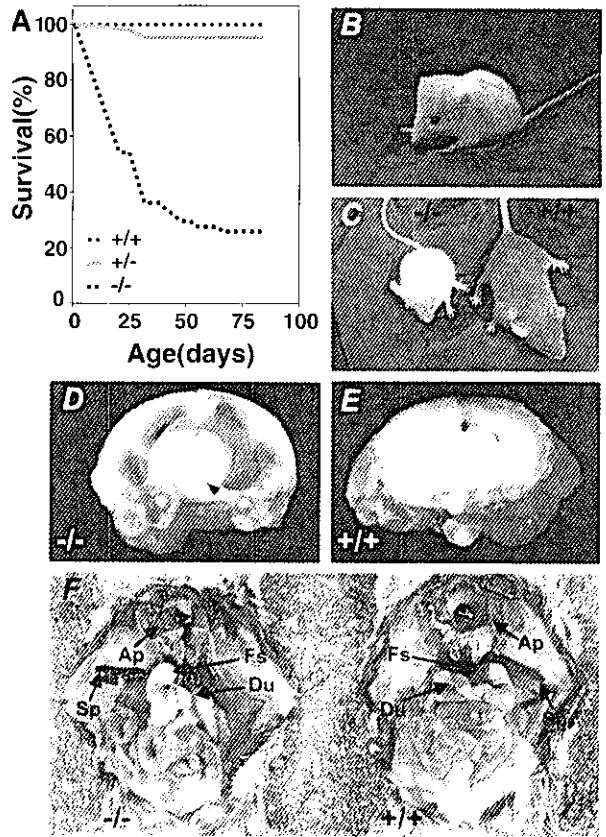


図2. Polλノックアウトマウスにおける発育遅延・水頭症・臓器逆位 (A) 生後の生存曲線。Polλノックアウトマウスは、生後3週で約半数になり、生後9週までに約70%が死亡する。(B) ドーム型を特徴とする水頭症を呈する。(C) Polλノックアウトマウスは野生型と比較して発育遅延が起こる。5週齢のPolλノックアウトマウス(左)と野生型マウス(右)。(D、E) Polλノックアウトマウス(D)は、著しい側脳室の拡張が認められる。(F) Polλノックアウトマウスは臓器全逆位が認められる。

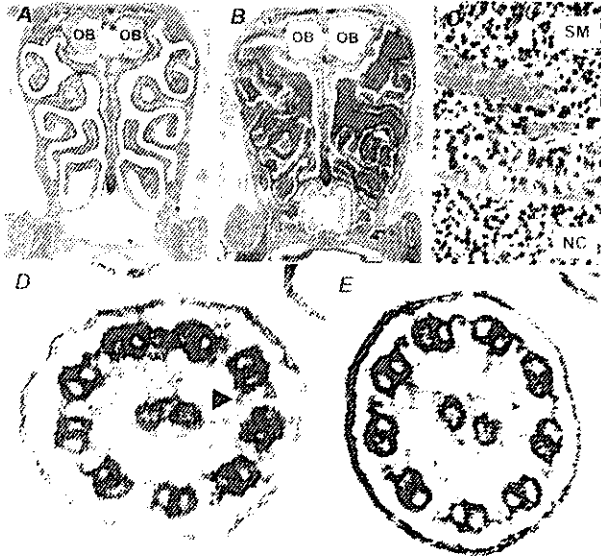


図3. Pol λ ノックアウトマウスにおける慢性副鼻腔炎と繊毛の異常

(A~C) Pol λ ノックアウトマウス (B, C) では、炎症性の細胞の浸潤が見られる。(D, E) Pol λ ノックアウトマウスの気管支上皮細胞の繊毛はinner dynein armが欠損している (E)。

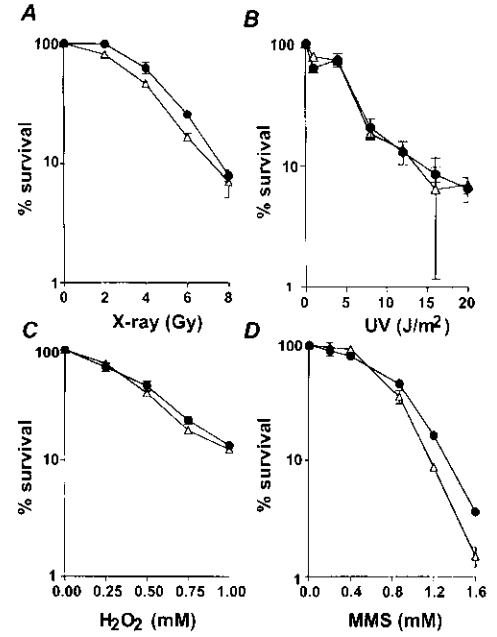


図5. Pol λ 欠損ES細胞の種々のDNA傷害に対する感受性 (A) X線、(B) UV、(C) 過酸化水素、(D) MMSに対する感受性。Pol λ 欠損ES細胞は野生型と同じ感受性を示した。

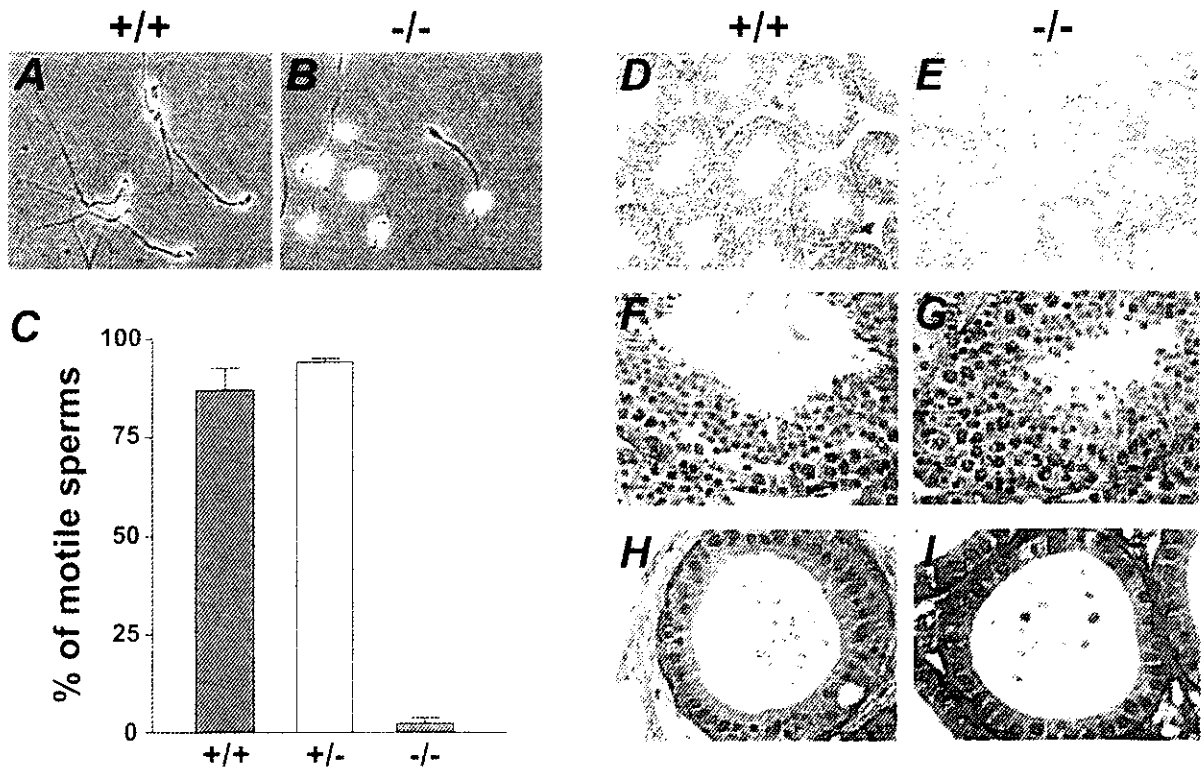


図4. Pol λ ノックアウトマウスにおける精子の形態異常と不運動性

(A, B) 精巣上部より取り出した精子。(C) 精子の運動性。Pol λ ノックアウトマウスの精子は運動性を示さない。(DからI) 精巣及び精巣上部の組織化学。Pol λ ノックアウトマウスの精巣管では、成熟精子が見られない (G)。

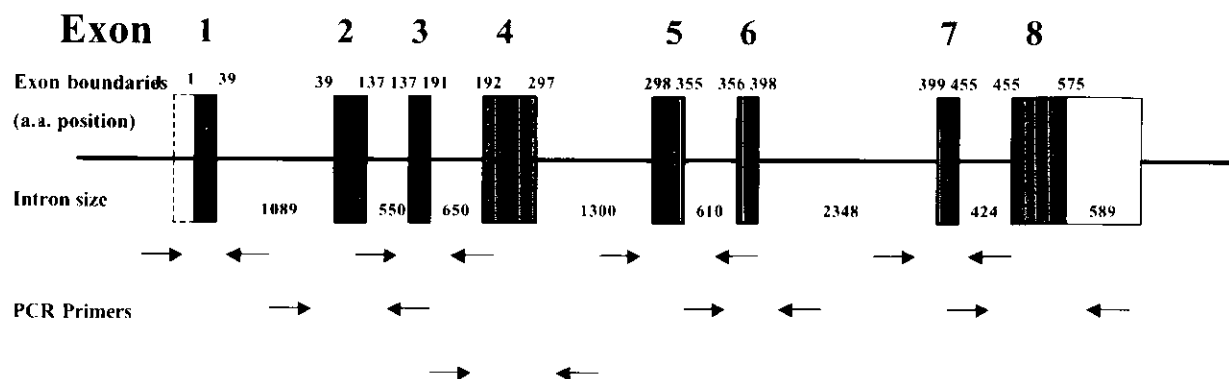


図6. ヒトPol λ 遺伝子の構造とPCRプライマー

ヒトPol λ 遺伝子はマウス同様8個のエクソンから構成されている。それぞれのエクソンを増幅するためのプライマーを示した(矢印)。

syndromeは繊毛の構造異常などによる繊毛不動性が原因となっているので、Pol λ ノックアウトマウスにおける繊毛の構造を電子顕微鏡で検討した結果、inner dynein armが欠損していることが明らかになった(図3)。Inner dynein armは特に運動性に重要で、ヒトの疾患の場合、inner dynein armが欠損していると繊毛は完全に運動性を失っている。以上の結果より、Pol λ ノックアウトマウスの繊毛は、inner dynein armを欠損することによって運動性を失っていると考えられた。

雄のPol λ ノックアウトマウスは不妊である

immotile cilia syndromeのもう一つの特徴は、精子の鞭毛の異常により不妊になることである。そこで、Pol λ ノックアウトマウスの繁殖能を検討した結果、雄は不妊であることが明らかになった。雌に関しては正常であった。精巣上体より精子を取り出し観察した結果、Pol λ ノックアウトマウスの精子は運動性を示さなかった(図4)。また、精巣を組織化学的に検討した結果、精子形成過程の後期に正常の精子がほとんど認められなかった(図4)。また、Pol λ ノックアウトマウスの精子頭部を顕微受精することにより正常に仔が生まれたことより、減数分裂には異常がないと考えられた。以上の結果より、Pol λ ノックアウトマウスの精子は鞭毛の運動異常を示し、その結果として不妊であると考えられた。

Pol λ は細胞増殖及びDNA損傷におけるDNA修復には必須ではない

細胞増殖及びDNA修復におけるPol λ の機能を検討するために、Pol λ 欠損ES細胞を樹立した。Pol λ 欠損ES

細胞は増殖及び見かけ上も野性型と比べて異常は認められなかった。電離放射線・UV・酸化ストレス・アルキル化剤に対する感受性を検討したが、野性型と同様であった。以上の結果から、Pol λ は塩基除去修復・スクレオチド除去修復・相同組換えなどのDNA修復には必須でないことが明らかになった(図5)。

水頭症DNAバンクを用いたPol λ 遺伝子の異常

水頭症遺伝子バンクの家族性水頭症(X連鎖性以外)及び先天性中脳水道狭窄症(個発例)のDNAサンプルにおけるPol λ 遺伝子の異常を検討した。Pol λ 遺伝子は8個のエクソンからなり図6に示すようにエクソン・イントロンの構造も明らかになっている。そこで、図6に示した様に、全てのエクソンをPCRで増幅しダイレクトシーケンシングを行った。30例中3例において一塩基置換の変異が認められたが全てヘテロであった。今後、この変異がPol λ の機能にどのような影響を及ぼしているか検討する必要がある。

D. 結語

Pol λ ノックアウトマウスは生後ドーム型の頭部を特徴とする水頭症を発症し、9周齢までに約70%が死亡する。脳室上皮細胞の繊毛においてinner dynein armが欠損しておりその結果として繊毛不動性となり、水頭症を発症するものと考えられた。また、水頭症DNAバンクを用いたPol λ 遺伝子の解析によりヘテロの一塩基置換変異を同定したが、今後その意義について検討していく必要がある。また、Pol λ 遺伝子以外の近傍の遺伝子についても解析する必要がある。

F. 文献

- 1) Kobayashi Y, Watanabe M, Okada Y, Sawa H, Takai H, Nakanishi M, Kawase Y, Suzuki H, Nagashima K, Ikeda K, Motoyama N. Hydrocephalus, Situs Inversus, Chronic Sinusitis, and Male Infertility in DNA Polymerase λ - Deficient Mice: Possible Implication for the Pathogenesis of Immotile Cilia Syndrome. *Mol. Cell. Biol.*, 2002, in press.

ヒト正常発育脳および水頭症脳における脳構築の変化

聖マリア病院病理部¹ 久留米大学医学部化学² 産業技術総合研究所ティッシュエンジニアリング研究センター³
国立大阪病院 脳神経外科⁴ 慶應義塾大学医学部 生理学教室⁵

中村 康寛¹ 山本 統彦² 熊丸えり子² 金村 米博³ 山崎 麻美⁴ 岡野 榮之⁵

研究要旨

ヒト正常発育脳での種々の発育マーカーの発現を総括し、特にGFAPは胎齢14週以前では発現してなく、radial glial fiberの存在根拠がなく、今後この間違った用語は使用すべきでない事を指摘した。また神経幹細胞説のin vivo版とも言えるマトリックス細胞説の正当な再評価を促したい。また水頭症例における発育マーカー発現の異常に関しても言及した。

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がtubulin beta IIであることを確認し、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) はvariant formであることを指摘し、それに対する抗体を作製し、その免疫組織化学的検索を行い、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³⁾。

平成13年度は、今までのヒト正常発育脳での、免疫組

織化学的検索結果を総括し、さらにGFAPが第Ⅰ期、第Ⅱ期脳では存在しない事を証明するとともに、ヒト水頭症脳での異常の有無に関して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

平成11年度、12年度に検索した奇形等の重症の合併症のないヒト胎児新生児脳13例に加えて、その後国立大阪病院より提供された胎齢9、14、15、18週脳、当院剖検で得られた17-30週例5例、成人例2例が追加され、計34例の正常発育脳と生後早期に死亡し剖検された水頭症例8例（神経細胞遊走障害を伴わない例5例、神経細胞遊走障害を伴う例3例）のパラフィン包埋切片を免疫組織化学的検索対象とした。症例に関する倫理面への配慮は後述する。使用した抗体は、市販抗体として抗-vimentin, GFAP, tubulin beta III, neurofilaments protein, galactocerebroside抗体、提供された抗体としてMusashi I, GLAST（北大渡邊雅彦博士より供与）抗体、新たに作製したものとしてKNY-379 (anti-tubulin beta II)、VLDLR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

表1 種々のマーカーの発育時期による細胞発現

	Musashi 1	Vimentin	Tubulin beta II	Tubulin beta III	VLDLR	GLAST	GFAP	NF	GC
第I期(～胎齡6週)									
Matrix cell	+	+	+	-	+	±?	-	-	-
Matrix cellの突起(RF)	-	+	+	-	-	-	-	-	-
第II期(7～15-17週)									
Migrating neuroblast	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Neuroblast in CP	-	-	+	+	+	-	-	-	-
第III期(18週～)									
Ependymoglioblast	+	+	+	-	+	+	±	-	-
Glioblast	+	+	+	-	+	+	±	-	-
Astrocyte	±?	+	-	-	+	+	+	-	-
Oligodendrocyte	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Myelin	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Neuron	-	-	+	+	-	-	-	+	-

表2 部検例に見られた水頭症

13トリソミー	14例
Holoprosencephaly	6
Arnold-Chiari奇形	6
骨格系奇形	6
中脳水道の狭窄が確認された例	6
Dandy-Walker奇形	4
特殊例	2
Pierre-Robin症候群	2
X-linked	1
その他	15
計	62例

TGTGGAGGGCGATGTAGTAGGT) でRT-PCRを行いGFAPのmessage (1345~1640, 295bp)の有無を検討した。(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト胎児、新生児脳を研究に用いるため倫理的配慮を要する点がある。そのために病理解剖例に関しては、聖マリア病院倫理委員会の審議をとおして、剖検承諾書に世界医師会のヘルシンキ宣言に基づき医学研究に供される旨、家族に承諾を得たうえで本研究にもちいた。また国立大阪病院症例に関しては平成12年の報告書に記載されている通り⁵⁾。

RT-PCR

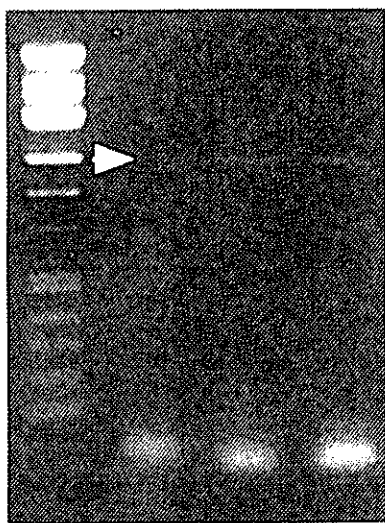


図1：GFAPに関するRT-PCR：胎齡9週脳ではシグナルが全く見られない。胎齡15週脳で295bpの所にシグナルが見られ23週脳では強くなる(白矢印)。M：マーカー

C. 研究結果

正常発育脳での種々のマーカーの免疫組織化学的検索結果

過去2年間の報告の結果と、今回症例、および検索抗体を増やしての結果を総合して表にしたのが表1である。Musashi 1は主としてmatrix cell, glial lineageに、vimentinはmatrix cell、その突起であるいわゆるradial fiber、glial cell lineageに、tubulin beta IIは幼弱なependymoglioblast, glioblastにも一時的に発現するが、主としてmatrix cell, radial fiber, neuronal lineageに、それに対しtubulin beta IIIは neuroblast, neural lineageに、variant VLDLRはmatrix cell, neuroblastに発現しているが、第III期ではglia、さらにはmyelinに発現し、neuronal, glialの両方のlineageに発現している。GLASTはmatrix cell, glial lineageに発現し、GFAP, neurofilament, gangliocerebrosideはそれぞれ分化したastrocyte, neuron, oligodendrocyteに発現している事がわかる。

GFAPの発現に関して

平成11年度にGFAPは免疫組織染色上では、胎齡15週

は、あらかじめマイクロウェーブ処理を行った。

9週、15週、23週例脳では、RNAzolTM B reagent (biotex) でtotal RNAを抽出し、RT-PCRkit (Takara)を用い、GFAPに対するprimer set (CCCGAGCAGAAGCAGGATAGTT、

までは陰性である事を報告したり。その後胎齢14、17、18、19週の脳で検索したが、14週では大脳には完全に陰性。17週脳ではradial fiberのmatrix layer側に陽性所見がみられ、18週では陽性所見が強くなる。

RT-PCRの結果では、9週脳では完全に陰性で、15週ではシグナルがみられ、23週脳では強くなる(図1)。先天性水頭症例での種々のマーカーの免疫組織化学的検索結果

我々の施設で剖検した先天性水頭症例は62例で、種々の合併奇形、症候群に伴ってみられる事が多い(表2)。このうち種々の脳発育マーカーを用いて検索し、異常の有無を対照例と比較検討できたのは生後早期に死亡した症例8例に限られる。このうち神経細胞遊走障害を伴わない5例では、対照例に比して免疫組織化学的に特に異常を指摘できなかつた。神経細胞遊走障害を伴う3例(多小脳回症2例、脳同肥厚症1例)では、いずれも脳室上衣細胞でのtubulin beta IIの発現が強く、また対照例では大脳皮質分子層にtubulin beta IIの強い発現があるのに比して、神経細胞遊走障害のある部分ではこの発現が殆どみられなかつた(図2)。また多小脳回症の神経細胞遊走障害部では、matrix layerではvimentinのびまん性の発現が強いがradial fiber状の発現は殆どみられなかつた(図3)。

D. 考察

種々のヒト脳発育マーカーを検討した結果、いくつかの発育、分化lineageに沿った発現を確認できた。すでに述べたように、ヒト脳発育は藤田による第I期-III期に基づいて検索するのが妥当と考えられるが^{2,3}、Musashi

1, vimentin, GLASTは第I期、II期ではmatrix cell、第III期ではglioblast lineageに発現する。tubulin beta IIは第I期、II期ではmatrix cell、neuroblastに第III期では一時的に幼弱なependymoglioblasts, glioblastに、更にneuronal lineageに発現する。variant VLDLRは第I期、II期にはmatrix cell, neuroblastsに、第III期にはglioblast, astrocyte, oligodendrocyte, myelinに発現する。GFAP, neurofilament, gangliosideはそれぞれ分化した組織マーカーである。これらの多分化lineageのマーカーの発現を無理なく説明できるのは、脳神経組織発生の一元説を基礎として発育時期を第I期から第III期に分けて考える、藤田によるマトリックス細胞説であって、グリア系母細胞と神経細胞系母細胞は異なり胎生早期より両者の共存を唱える二元説⁹⁾では説明がつかない。in vitroでは、自己複製能と多分化能を有する神経幹細胞が存在し、グリア系と神経細胞系の両方の母細胞である事はほぼ確定した事実であるのに^{7,8)}、in vivoではいまだに神経幹細胞説のin vivo版とも言えるマトリックス細胞説が正当に評価されているとは言えない。in vivoでの誤解の1つの大きな原因はradial glial fiberという概念にある。前述の二元説の大きなよりどころは、胎生早期よりGFAPに陽性のradial glial fiberがあり、したがってマトリックス細胞説での第I期、第II期は成立せずに、グリア系の母細胞は別にありspongioblastと呼ばれる。またこの概念にそって胎生期脳の解剖学的用語がBoulder委員会の名の元に規定された¹⁰⁾。今回の我々の免疫組織化学的検索、RT-PCRによる検索、そして藤田によるnorthern blotのデータ¹⁰⁾を総合すると胎齢14週まではGFAPの発現はないと考えられ、14週以前でradial glial fiberは存在しな

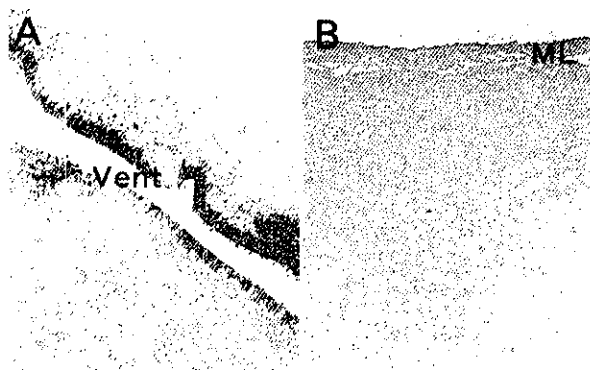


図2：胎齢38週、6生目で死亡した多小脳回症を伴う水頭症脳でのtubulin beta II抗体を用いた免疫染色。A) 脳室(vent)壁での脳室上衣細胞に強く発現している。B) 分子層(ML)では殆ど発現していない。

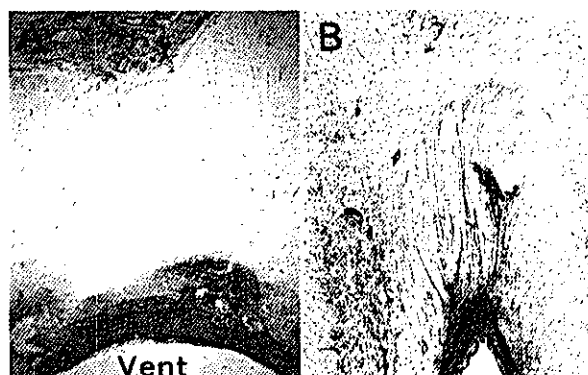


図3：胎齢31週、0生目で死亡した多小脳回症を伴う水頭症脳(A)、対照正常発育脳(B)でのvimentin抗体を用いた免疫染色。A)ではmatrix layer、その周辺には強い発現があるが、B)で見られるradial fiber状の発現は、殆ど見られない。

い事になる。最近ようやくradial glial fiberの存在自体に関する疑問がなげかけられてきており¹¹⁾、これは神経幹細胞の細胞突起ではないかとされて来ているが、マトリックス細胞説では以前から、radial fiberはマトリックス細胞の突起であり、グリア系母細胞という異なった由来ではないことを明解に指摘している。したがって今後は誤解を生ずるようなradial glial fiber (またはcells) という用語は廃止してradial fiberまたはより正確にマトリックス細胞の突起と呼ぶべきと考える。また間違った根拠に基づくBoulder委員会による解剖学的用語も修正すべきであろう。

正常発育脳における種々の免疫組織化学的検索の結果、および問題点に関しては、この3年間でかなり整理されたと考えられるが、水頭症例脳における脳実質発育からみた異常の有無の検索に関しては、いくつかの困難が生じた。すなわち、検索対象例の多くが生後かなり時間が経って死亡しており、同時期の正常対照例が少ない事。検討した発育マーカーの殆どが、胎生期の変化を捉えるにはよいが、生後しばらく経つと組織的特徴が捉えにくくなる事等である。したがって62例の水頭症剖検例のうちで生後早期に死亡した8例のみが検索対象となった。このうち神経細胞遊走障害を伴う3例のみに異常所見が見られた。全例で見られた脳室上衣細胞でのtubulin beta IIの過剰な発現は、報告されている同様の細胞のnestin, vimentinの過剰発現¹²⁾と共に水頭症例における脳室上衣の未熟化、再生性変化を示唆するものであるばかりではなく、神経細胞遊走障害における脳室上衣の関与をも示唆する。また正常では強くtubulin beta IIが発現している分子層で、神経細胞遊走障害がある例では陰性であった事。またvimentinのradial fiber状の発現もみられなかった事は、神経細胞遊走における、radial fiberまた分子層の重要性を示唆するものであった。

E. 結論

種々の脳発育マーカーはヒト正常発育脳では、発育の第I-III期にいくつかの発育細胞lineageに沿って発現しており、これを無理なく説明するには、in vitroでの神経幹細胞説と同じく、in vivoでのマトリックス細胞説という神経発生の一説に基づいて考えるしかない。また水頭症においてもいくつかの脳発育マーカーの発現異常がみられた。今後はさらに発育マーカーの数を増やして検索する必要がある、特にneuroblast, glioblastのマーカー

が必要と考えられる。

F. 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。厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業 難治性水頭症調査研究班 平成11年度研究報告書 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) 中村康寛、山本統彦、熊丸えり子：ヒト発育期脳におけるTubulin beta IIとVLDL receptorの発現。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 22-25, 2001.
- 4) Nakamura Y, Yamamoto M, Kumamaru E: Significance of the variant and full-length forms of the very low density lipoprotein receptor in brain. Brain Research 922: 209-215, 2001.
- 5) 山崎麻美：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。倫理面への配慮。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 6, 2001.
- 6) Rakic P, Radial glial cells: scaffolding for brain construction. In H. Kettenmann and B.R. Ransom (Ed.), Neuroglia. Oxford University Press, New York: 1995, pp. 746-762.
- 7) 岡野栄之：神経幹細胞。蛋白質核酸酵素 45: 69-82, 2000.
- 8) Temple S: The development of neural stem cells. Nature 414: 112-117, 2001.
- 9) The Boulder Committee: Embryonic vertebrate central nervous system: Revised terminology. Anat Rec 166: 257-262, 1969.
- 10) 藤田哲也、福田隆一、中西和夫：細胞骨格蛋白と神経系細胞の発生。代謝 22: 43-59, 1985.
- 11) Parnavelas JG, Nadarajah B: Radial glial cells: Are they really glia? Neuron 31: 881-884, 2001.
- 12) Takano T, Rutka JT, Becker LE: Overexpression of nestin and vimentin in ependymal cells in hydrocephalus. Acta Neuropathol 92: 90-97, 1996.

水頭症におけるドーパミン系神経路の軸索輸送、 および後シナプス受容体の障害に関する研究

京都大学医学部脳神経外科

田代 弦

研究要旨

我々は水頭症による脳障害の進行過程を示す重要な病理所見として、脳内神経伝達系神経核の種々の変化をこれまで報告してきた。今回は、水頭症によるドーパミン作働性黒質-線条体神経路の伝達機能変化に着目した。まず前シナプス機能として、軸索輸送をanatomical tracerを用いて検索したところ、水頭症の進行に相関して、線条体内のterminal数が減少していくのが観察された。次いで、神経伝達物質を受け取る側の機能、すなわち後シナプス機能として、D1、D2 receptorの機能変化を両受容体蛋白のmRNAを用いたin situ hybridization法によって検討した。D1 receptorは早期よりそのmRNA合成能を減退させたのに対し、D2 receptorは8週日以降の後期に機能障害を認めた。本研究により、水頭症の進行はドーパミン作働性神経伝達路を全周にわたって個々に損傷させていくことが判明した。

A. 研究目的

今回我々は、水頭症の進行とともに神経核を起点とするサーキットとしての神経伝達機能が、いかに変化していくかを検討することとした。ここではその一例として、シナプス前後のドーパミン系神経路の機能変化を観察した。まず前シナプス機能として軸索輸送を、そして、後シナプス機能としてドーパミン (D1、D2) 受容体を各々定性・定量的に実験的水頭症ラット脳で評価した。

B. 研究方法

水頭症モデルは、生後6週目、体重約200gのオス成人ウイスターラット大槽内に、全身麻酔下で25%カオリン(kaolin)溶液、0.05mlを注入して作成した。また、コントロール群C群として、同種ラット大槽内に生食0.05mlを注入した。カオリン注入後2週、4週、8週、そして12週目に、各固体ラットの臨床的症状から水頭症

に陥っていることを確認した後、それぞれを水頭症群N2、N4、N8、N12群とした。

(1) ドーパミン軸索輸送の変化

水頭症群N2、N4、N8群およびコントロール群C群の各3匹ずつに対して、全身麻酔下で脳定位的にanatomical tracer: biotin dextran amine (BDA)を一側中脳黒質内に微量注入した。注入後7日を経て、全身深麻酔下に全ラットを経心的に灌流固定後、各々の脳切片を作製して、BDAに対する抗体を用いて免疫組織化学染色した。

(2) 後シナプス受容体の変化

N2、N4、N8、N12群およびC群の各ラットを全身深麻酔下で経心的に灌流固定し、D1、D2受容体蛋白のmRNAに対するdigoxigenin labeled anti-sense RNA probeを用いたin situ hybridization法により、各群の線条体内に存在する2種類のドーパミン受容体の免疫染色性と、その免疫陽性を示す神経細胞の単位面積当たりの数を算出し、比較検討した。

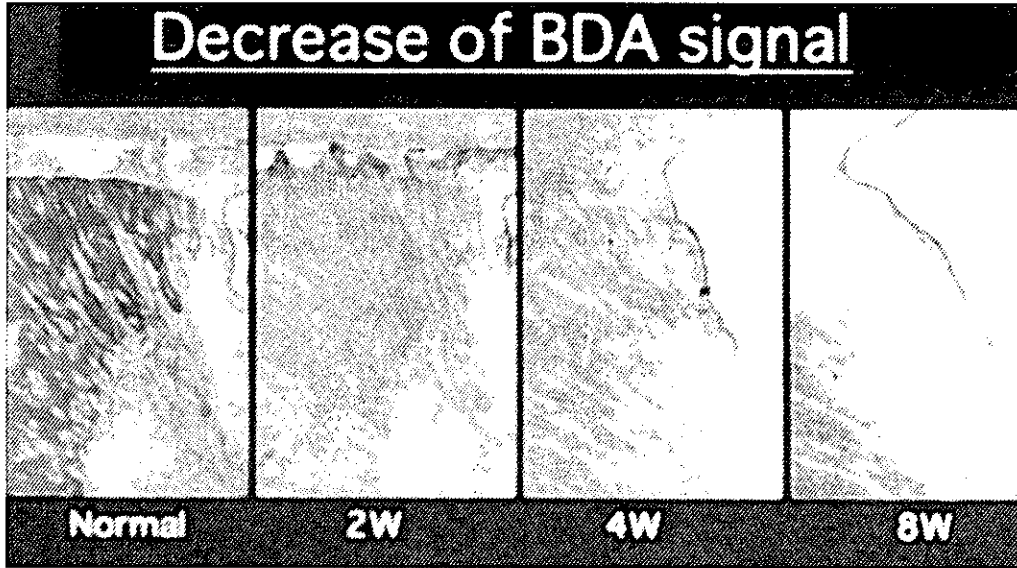


Fig. 1 水頭症の進行による線条体のBDA標識の変化。

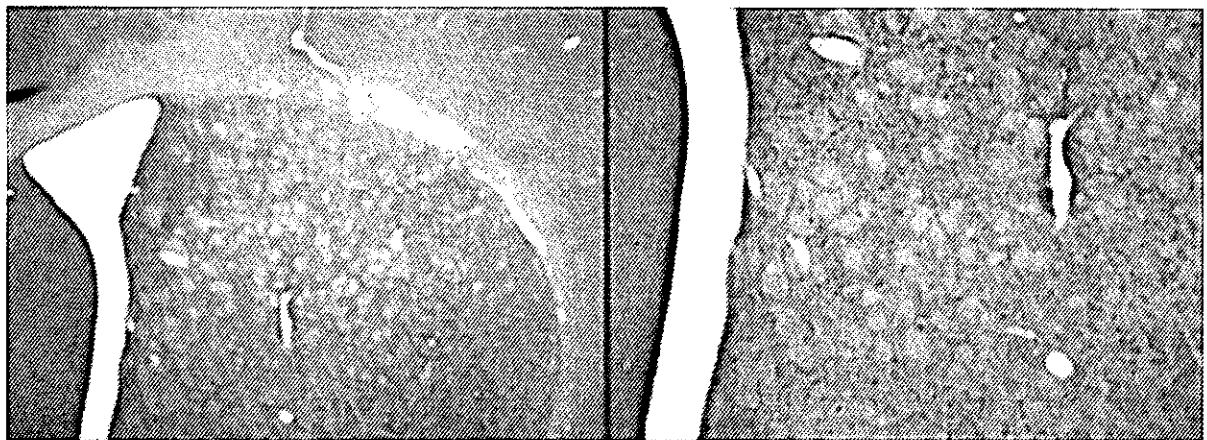


Fig. 2 コントロール群における線条体D1, receptor mRNA発現細胞。左：低倍率、右：高倍率

(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

(1) 中脳黒質から軸索輸送されたBDAは、線条体内の神経終末および線維で免疫染色法により標識された。これらの標識の密度および染色性は4週目より減少し、8週目で著明に消退した。またその染色性の減少は、脳室に面する内側より早期に出現した (Fig. 1)。

(2) 水頭症の進行によって、線条体内のD1、D2受容体mRNAを有する細胞はその免疫染色性が減少していった (Fig. 2)。D1受容体は水頭症作成後早期(2、4週目)より発現細胞数の減少が認められ、引き続き8、12週とその数は徐々に低下した (Fig. 3)。これに対して、D2受容体は水頭症作成後早期には変化なく、8週目に至っ

て初めて有意にその発現細胞数が減少した (Fig. 4)。次いで、線条体を脳室との位置関係により4部位に分け、部位間で発現細胞数の減少を比較したが、D1、D2受容体共に、部位による有意な差異は認められなかった (Fig. 3, 4)。

D. 考察

水頭症によるドーパミン作働性神経系の変化は、線条体内の神経線維、およびその上の終末部が先ず2～4週目に障害され、4週目に神経伝達路である軸索輸送が障害され、そして中脳の神経核が8週目に障害されていった。脳室拡大による圧迫が、神経線維と終末から逆行性に神経核へと影響していったものと考えられた。

以前我々は、実験的に作成した水頭症ラットにおいて、基底核に存在するアセチルコリン系、GABA系、ドーパミン系各ニューロンの免疫染色性が、水頭症の進行に応

Fig. 3 D1 receptor in striatum

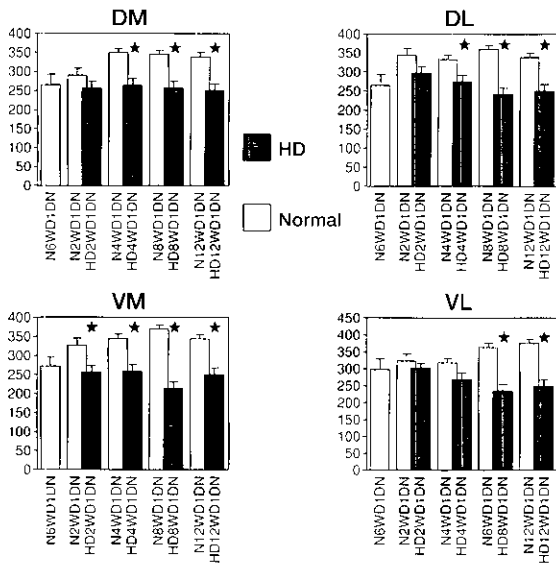


Fig. 3 水頭症の進行におけるD1 receptor mRNA発現細胞数の変化。線条体を上下左右で4分割した (DM: dorsomedial, DL: dorsolateral, VM: ventromedial, VL: ventrolateral)。★: 同年齢C群の細胞数 (白棒グラフ) に比して統計学的に有意に減少 ($p < 0.0001$)

Fig. 4 D2 receptor in striatum

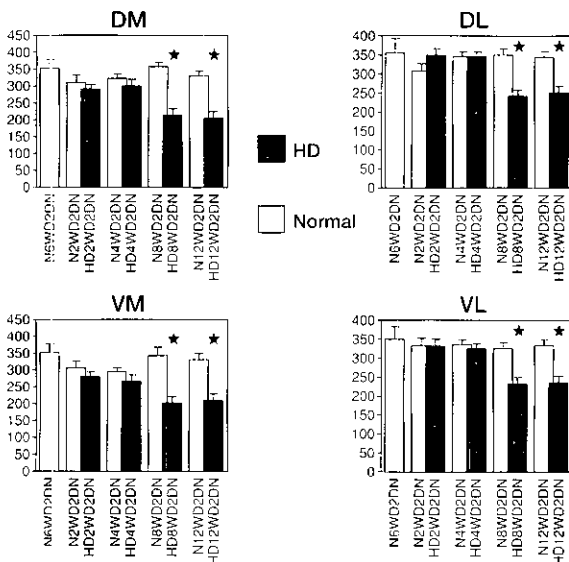


Fig. 4 水頭症の進行におけるD2 receptor mRNA発現細胞数の変化。線条体を上下左右で4分割した (DM: dorsomedial, DL: dorsolateral, VM: ventromedial, VL: ventrolateral)。★: 同年齢C群の細胞数 (白棒グラフ) に比して統計学的に有意に減少 ($p < 0.0001$)

じて特異的に低下していく事を示した³⁾。さらに、その免疫染色性の低下は各ニューロンの細胞死を表わすのではなく、水頭症による脳機能損傷を表わすものであり、その染色性 (すなわち脳機能) はシャント設置により回復し得ることを報告した³⁾。この結果は、水頭症が各

ニューロン細胞体における神経伝達物質の産生機能の損傷を引き起こし、外科的治療によりその機能が回復しうる事を示唆していると考えられた³⁾。以上の結果を本研究に置き換えて考えると、軸索輸送も受容体機能の低下も外科的治療によりその機能が回復しうる事を示唆していると予想される。

E. 結論

ドーパミン作働性神経路において、軸索輸送もシナプス後の受容体も水頭症の進行に伴い神経伝達路としての機能が低下・損傷を受けたが、有意な機能低下を示す時期については異なっていた。また、水頭症による損傷は、D1, D2サブタイプによってもその経過が異なることが明らかになった。これにより、水頭症によるドーパミン作働性神経回路の損傷・修復メカニズムの解明、また治療としてのドーパミン作働薬投与の検討が期待される。

F. 文献

- 1) Y Tashiro, JM Drake, S Chakraborty, T Hattori: Functional injury of cholinergic, GABAergic and dopaminergic systems in the basal ganglia of adult rat with kaolin-induced hydrocephalus. *Brain Research* 770: 45-52, 1997
- 2) Y Tashiro, JM Drake: Reversibility of functionally injured neurotransmitter systems with shunt placement in hydrocephalic rats: implications for intellectual impairment in hydrocephalus. *J Neurosurg* 88: 709-717, 1998
- 3) Y Tashiro, S Chakraborty, JM Drake, T Hattori: Progressive loss of glutamic acid decarboxylase, parvalbumin, and calbindin D28K immunoreactive neurons in the cerebral cortex and hippocampus of adult rat with experimental hydrocephalus. *J Neurosurg* 86: 263-271, 1997

水頭症遺伝子バンクを利用した先天性水頭症原因遺伝子の検索 — 3年間の活動の報告 —

水頭症遺伝子バンク解析部門 国立大阪病院 臨床研究部¹ 難治性水頭症調査研究班長 国立大阪病院 脳神経外科²
産業技術総合研究所ティッシュエンジニアリングセンター³

金村 米博^{1,3} 吉岡 絵麻^{1,3} 秀石 剛夫¹ 西川伊津子¹ 山崎 麻美^{1,2}

研究要旨

本班会議の目標の1つである、先天性水頭症の発症に関与する原因遺伝子検索を全国規模で行うために平成11年度に発足した水頭症遺伝子バンクの活動を総括する。現在まで、全国25施設より、合計271症例のDNAの提供を受けた。提供されたDNAの疾患と解析遺伝子はそれぞれ以下の如くである。X連鎖性劣性遺伝性水頭 [LICAM] 19家系49検体、先天性水頭症 [LICAM, MSI1,DNA polymerase λ (β 2)] 34家系59検体、家族性先天性水頭症[MSI1,DNA polymerase λ (β 2)] 3家系6検体、全前脳胞症 [ZIC2, Sonic Hedgehog (Shh)] 11家系15検体、Dandy-Walker症候群 [ZIC1, Engrailed-1, Engrailed-2, WNT-1]；9家系9検体、脊髄髄膜瘤 [MTHFR, p53,p73] 42家系91検体、その他36検体である。3年間の活動を通じて、本邦における先天性水頭症の原因遺伝子の組織的研究体制の確立に大きく貢献したものである。しかしすべての原因遺伝子が判明したわけではなく、バンクに集積された貴重な臨床サンプルを今後も活用するために、国のガイドラインを遵守した形での活動の継続が強く望まれるところである。

A. 研究目的

平成11年度に開始された本研究班の目標の1つは、X連鎖性劣性遺伝性水頭症を代表とする先天性水頭症の発症に関与する原因遺伝子を組織的・体系的に解析することである。そのために、本研究班員が中心となって、先天性水頭症例の臨床データおよび患者並びに家族の末梢白血球由来DNA検体の集積を行う、水頭症遺伝子バンクの設立が提唱され、その活動が開始された。今回、水頭症遺伝子バンク発足後3年に及ぶ活動の報告と今後の問題点について考察する。

B. 研究方法

1. 検体集積実績

平成11年9月の平成11年度第1回班会議で提案・承認

された水頭症遺伝子バンクの運営方針に基づき、研究班員の先生方の所属する施設を中心に、全国より先天性水頭症例の患者ならびにその家族の末梢白血球由来DNA検体の集積が開始された。

現在まで、全国25施設からのご協力をいただき、平成13年12月1日現在で、合計153家系270例の貴重なDNA検体の提供を受けることができた(表1)。検体の集積プロセスには大きなトラブルもなく、現在は研究班員の所属する施設以外からの多数の検体の集積も問題なく行える体制となっており、検体の集積に関しては、ほぼシステムの整備が終了したと思われる。

現在まで集積された270例の、各疾患別の内訳は以下のとおりである。

(1) X連鎖性劣性遺伝性水頭症

現在まで、全国11施設から19家系49検体の提供があ

った。(表2)

(2) 家族性先天性水頭症

現在まで、全国3施設から、男女同胞例での先天性水頭症の発症を見た3家系6検体の提供があった(表3)

(3) X連鎖性劣性遺伝性水頭症ならびに家族性先天性水頭症以外の先天性水頭症

現在まで、全国14施設から34家系59検体の提供があった(表4)。

(4) 全前脳胞症

現在まで、全国6施設から11家系15検体の提供があっ

病院名	集積		解析終了	
	検体数	家系数	検体数	家系数
国立大阪病院	56	37	15	7
大阪市立総合医療センター	99	35	13	3
大阪府立母子保健総合医療センター	9	8	2	1
北海道立小児総合保健センター	9	8	4	3
静岡こども病院	15	9	9	3
名古屋市立東市民病院	2	2	0	0
香川医科大学	7	5	2	2
国立療養所香川小児病院	9	8	5	4
聖マリア病院	22	9	2	0
関西医科大学付属病院	6	5	0	0
名古屋市立大学産科	3	1	3	1
聖隷三方原病院	1	1	1	1
聖友病院	5	5	0	0
沖縄県立那覇病院	1	1	0	0
弘前大学付属病院	3	1	3	1
虎ノ門病院	2	1	2	1
愛知県心身障害者コロニー中央病院	7	7	4	4
熊本大学	2	1	0	0
佐賀医科大学	2	2	1	1
千葉県立こども病院	2	1	0	0
東京都立清瀬小児病院	1	1	1	1
三重大学	2	2	1	1
滋賀医科大学	3	1	0	0
奈良医科大学	1	1	0	0
自治医科大学付属病院	1	1	0	0
その他	1	1	0	0
合計	271	154	68	34

た(表5)。

(5) Dandy-Walker症候群(小脳形成異常)

現在まで、全国6施設から9家系9検体の提供があった(表6)。

(6) 脊髄髄膜瘤(神経管閉鎖不全症)

現在まで、全国5施設から42家系91検体の提供があった(表7)。

(7) その他

現在まで、その他検体36検体の提供があった。

これら先天性水頭症例およびその家族からの検体に加えて、水頭症遺伝子バンクの研究活動の趣旨に賛同が得られ、書面によるインフォームドコンセントが得られた健常人52名よりDNA検体の提供を得ることができ、これら検体は一塩基多型(single nucleotide polymorphism, 以下SNP) タイピングのコントロールとして使用した。

2. 検体の保管ならびに遺伝子解析施設への発送システム

病院名	集積		解析終了	
	検体数	家系数	検体数	家系数
国立大阪病院	9	2	9	2
大阪市立総合医療センター	14	4	12	3
大阪府立母子保健総合医療センター	3	2	2	1
北海道立小児総合保健センター	2	2	2	2
静岡こども病院	7	2	7	2
国立療養所香川小児病院	1	1	1	1
名古屋市立大学産科	3	1	3	1
弘前大学付属病院	3	1	3	1
虎ノ門病院	2	1	2	1
愛知県心身障害者コロニー中央病院	2	2	1	1
滋賀医科大学	3	1	0	0
合計	49	19	42	15

表3 先天性水頭症

病院名	疾患名	CH				CH			
		検体	家系	終了検体	終了家系	検体	家系	終了検体	終了家系
国立大阪病院		7	5	6	4	0	0	0	0
大阪市立総合医療センター		9	3	1	0	0	0	0	0
大阪府立母子保健総合医療センター		6	6	0	0	0	0	0	0
北海道立小児総合保健センター		1	1	1	1	2	1	1	0
静岡こども病院		4	4	1	1	2	1	1	0
名古屋市立東市民病院		0	0	0	0	0	0	0	0
香川医科大学		6	4	2	2	0	0	0	0
国立療養所香川小児病院		3	3	2	2	2	1	2	1
聖マリア病院		12	5	2	0	0	0	0	0
関西医科大学付属病院		2	2	0	0	0	0	0	0
聖隷三方原病院		1	1	1	1	0	0	0	0
愛知県心身障害者コロニー中央病院		3	3	3	3	0	0	0	0
佐賀医科大学		1	1	1	1	0	0	0	0
千葉県立こども病院		2	1	0	0	0	0	0	0
三重大学		2	2	1	1	0	0	0	0
合計		59	34	21	16	6	3	4	1

表4 全前脳胞症

病院名	集積		解析終了	
	検体数	家系数	検体数	家系数
国立大阪病院	2	2	0	0
大阪市立総合医療センター	6	2	0	0
北海道立小児総合保健センター	3	3	0	0
名古屋市立東市民病院	2	2	0	0
香川医科大学	1	1	0	0
愛知県心身障害者コロニー中央病院	1	1	0	0
合計	15	11	0	0

表5 Dandy-Walker 症候群

病院名	集積		解析終了	
	検体数	家系数	検体数	家系数
国立大阪病院	2	2	0	0
大阪市立総合医療センター	1	1	0	0
静岡こども病院	2	2	0	0
国立療養所香川小児病院	2	2	0	0
沖縄県立那覇病院	1	1	0	0
佐賀医科大学	1	1	0	0
合計	9	9	0	0

表6 脊髄髄膜瘤

病院名	集積		解析終了	
	検体数	家系数	検体数	家系数
国立大阪病院	24	15	0	0
大阪市立総合医療センター	61	22	0	0
関西医科大学付属病院	3	3	0	0
熊本大学	2	1	0	0
自治医科大学付属病院	1	1	0	0
合計	91	42	0	0

検体は全て国立大阪病院臨床研究部に集積させた。集積されたDNAサンプルのすべてに対し、国立大阪病院臨床研究部にて水頭症遺伝子バンク専属の情報管理担当者により、通し番号を用いた匿名化を行い、同施設内で一括保管・管理している。匿名化されてから以降の、検定提供施設との連絡の際は、全ての検体に関する情報の交換は匿名化された通し番号を用いて行われた。

遺伝子解析は、国立大阪病院臨床研究部、大阪府立母子保健センター、京都府立医科大学老化研病態病理学教室ならびに国立長寿医療センター老年病研究部の4施設で施行された。国立大阪病院以外の施設へは、匿名化された状態のDNAサンプルの一部を提供し、遺伝子解析実施施設内では連結不可能匿名化された状態で遺伝子解析を施行していただいた。

3. 解析遺伝子およびその選定方法

提供されたDNA検体は、患者の性別並びにDNAサンプルの提供を受けたときに同時にバンクに提供された病歴調査表に記載されている臨床症状の特徴から判断して、それぞれの疾患に応じて以下の如く遺伝子解析を行

った。

(1) X連鎖性劣性遺伝性水頭症ならびにその他の先天性水頭症

提供された検体の中、男児の先天性水頭症例であり、①男性先天性水頭症患者の発症の家族歴を有し、X連鎖性劣性遺伝形式が予想される症例、もしくは②単発例であるが水頭症以外にX連鎖性劣性遺伝性水頭症に特徴的な臨床症状（Corpus callosum hypoplasia脳梁低形成、Retardation精神運動発達遅延、Adducted thumbs拇指内転屈曲、Spastic paraplegia痲痺性対麻痺）を合併し、臨床的にX連鎖性劣性遺伝性水頭症が強く疑われる症例に関して、神経接着分子LICAM遺伝子の全長の解析を施行した。

次に、③LICAM遺伝子異常の同定されなかった男児先天性水頭症例、および④女児の先天性水頭症例、⑤男女の同胞内での先天性水頭症の発症をみた3家系6症例の家族性先天性水頭症発症例、に関しては、RNA結合蛋白質であるMusashi1 (MSI1) およびDNA polymerase λ ($\beta 2$)の全長の解析を施行した。

これら先天性水頭症患者であって、⑥水頭症に加えて狭頭症を合併する一部の症例に関しては、LICAM、MSI1あるいはDNA polymerase λ ($\beta 2$)の検索に加えて、FGFR2の一部領域の解析を行った。遺伝子解析施設は、LICAM、MSI1、FGFR2に関しては国立大阪病院臨床研究部、DNA polymerase λ ($\beta 2$)に関しては国立長寿医療センター老年病研究部にて施行された。

(2) 全前脳胞症

全前脳胞症に対しては、ZIC2ならびにSonic Hedgehog (Shh) の全長の解析を行った。遺伝子解析は、京都府立医科大学老化研病態病理学教室にて施行した。

(3) Dandy-Walker症候群

Dandy-Walker症候群に関しては、ZIC1、Engrailed-2、WNT-1の一部領域の解析を行った。遺伝子解析は大阪府立母子保健センターにて施行した。

(4) 脊髄髄膜瘤

脊髄髄膜瘤症例に関しては、患者本人とその両親も含めて葉酸代謝酵素methylentetrahydrofolate reductase (MTHFR) 遺伝子のC677TおよびA1298CのSNPのタイピングを行った。このSNPタイピングは国立大阪病院臨床研究部と大阪市立総合医療センターとの共同作業でおこなった。また患者検体のみについて、p53およびp73遺

伝子の一部領域について解析を行った。この解析は国立大阪病院臨床研究部と兵庫医科大学脳神経外科教室との共同作業でおこなった。

C. 考察

それぞれの解析結果に関する詳細は、本研究報告書の各班員の報告に委ねる。3年間の活動を通じて、本邦の先天性水頭症の発症に関与する分子生物学的メカニズム解明を目指し、その発症に関与する原因遺伝子を組織的に解析するための研究体制の構築の確立には大きく貢献できたものと思われる。今回の解析対象となった各種疾患は、今回の調査研究班に参加いただいているような小児神経疾患の症例数の多さに関しては国内でも有数の施設でさえ、症例数はそれほど多くはなく、単独の施設の症例のみでは十分な遺伝子解析は困難である。このたび、構築したシステムでは、北は北海道から南は沖縄まで、日本全土にわたっての検体の集積を行うことができ、X連鎖性劣性遺伝性水頭症、それ以外の先天性水頭症、脊髄髄膜瘤などのような疾患に関しては、一定数の症例数の集積に成功している。特にX連鎖性劣性遺伝性水頭症に関しては、新たに多くの新規遺伝子異常の同定された家系の報告ができ、本邦におけるこの疾患の臨床像の解析に大きく貢献したものと考えられる。しかし、X連鎖性劣性遺伝性水頭症以外の疾患に関しては、残念ながら新規の原因遺伝子の同定はなく、その多くは未だ原因が不明のままである。今回の研究班で集積されたDNAサンプルは、先天性水頭症の発症メカニズムの解明を遺伝子レベルで研究するには学術的にきわめて貴重なものであり、サンプル集積にご協力いただいた患者さんならびにご家族のお気持ちを最大限尊重するためにも、今後の継続した研究活動が強く望まれるところである。

遺伝子バンクの今後の活動を考えるとき、平成11年度の本研究班の発足当時と比較し、遺伝子解析研究に関しての社会情勢は大きく変化した。特に平成13年3月29日に、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省、経済産業省)が施行され、遺伝子解析研究に関する国のガイドラインが制定された。遺伝子解析研究に伴う個人情報の保護、ならびに倫理性の確保の点から、今後は本ガイドラインを遵守した形での水頭症遺伝子バンクの運営を行っていく必要性が示唆される。

E. 結論

3年間の活動を通じて、本邦における先天性水頭症の発症に関する分子生物学的メカニズムの研究開発体制の整備に大きく貢献できたものと思われる。バンクに集積された貴重な臨床サンプルを今後も活用するために、国のガイドラインを遵守した形での活動の継続が強く望まれるところである。

資料 2

遺伝子バンクにご協力いただいた皆様へ

このたびは、当研究班の水頭症遺伝子バンクに、ご協力頂きましてありがとうございます。皆様のご協力を持ちまして平成11年12月より開始して、これまで約2年間で約300検体集積することが出来ました。まずは、ご協力ご尽力に心より感謝申し上げます。

このたび当班会議の平成13年度総括会議がもたれまして、遺伝子解析結果の報告を迅速に徹底させることについてご指摘いただきました。この間、平成13年3月には、文部科学省・厚生労働省・経済産業省よりヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理委指針も提出され、遺伝子解析研究に対する厳格さも要求されるようになってきました。本遺伝子バンクは設立当初から倫理規定について詳細に検討し、討議を重ねてきたため、本研究が開始されて以後に概ねに於いて指針が制定されたことによる変更の必要は認められませんでした。ただ振り返ってみれば検査結果に対する説明に関する取り決めが不十分で、臨床の場で患者さまや家族の方々に直接協力をお願いしていただいた先生方に、多々ご迷惑をおかけしたと思います。失礼のほど深くお詫び申し上げます、その点について、補足資料を作成しましたので、送付させていただきます。

平成13年12月

厚生労働省特定疾患対策

先天性水頭症調査研究班

遺伝子解析ワーキンググループ

山崎麻美、坂本博昭、岡本伸彦、森艦二

遺伝子バンク

遺伝子解析責任者 金村米博

管理責任者 西川伊津子

遺伝子バンク補足資料

1、遺伝子検索の実施

送られてきたDNAについてどの遺伝子検索を行うかについては、下記のようにして行なっています。

	疾 患	検索する遺伝子	備 考
1	X染色体連鎖性遺伝性水頭症（家族歴・臨床症状から考えられるもの）	<i>LICAM</i>	<i>LICAM</i> に異常を同定できなかったときは、2へ
2	家族性水頭症（X連鎖性以外）	<i>MSH1</i> <i>DNApolymerase λ (β2)</i>	
3	先天性中脳水道狭窄症（孤発例）		
4	脊髄髄膜瘤	<i>MTHFR, ZIC2</i>	
5	全前脳胞症	<i>ZIC2, SHH</i>	
6	ダンディウォーカー症候群および小脳形成不全を伴うもの	<i>ZIC1, Engrailed2</i> <i>WINT1</i>	
7	脳瘤	<i>P73</i>	
8	頭蓋骨早期癒合症	<i>FGFR</i>	

2、結果の説明に関して

これまで遺伝子異常が同定されたのは、*LICAM*と*MTHFR*のみです。

1. LI遺伝子異常があるときの説明：*LICAM*はX連鎖性遺伝性水頭症の原因遺伝子として確立しており、臨床的意義がはっきりしています。（注1）臨床的意義について先生の方からお伝えしていただいても良いと思います。もし遺伝カウンセリングを希望される場合、あるいはその方がよいと主治医が判断された場合、当方にご連絡ください。（遺伝カウンセリングについては別項で記載しています。）患者さん自身が説明の文章などを希望される時は同封の文書（説明文1）をお渡し下さい。

2. LI遺伝子異常がないときの説明；注2の様に口頭でお答え下さい。

3. *MTHFR*のSNP解析結果；

677	CC；正常	CT；ヘテロ	TT；異常
1298	AA；正常	AC；ヘテロ	CC；異常

SNPは遺伝子多型で、病因遺伝子の遺伝子異常ではありません。しかし*MTHFR*の酵素活性は<677：CC→CT→TT> <1298：AA→AC→CC>の順で下がってくることは報告されています。また677TT,1298CCを示すことは神経管閉鎖障害発症の危険因子であるという報告が諸外国から出てきました。勿論それを否定する報告もあります。今回私達は本邦での検索を初めて行いましたが、神経管閉鎖障害の患者さんや母親・父親にこの遺伝子異常（SNP異常）の率が高いという結果は認められませんでした。患者さんには、たとえヘテロやホモの遺伝子変異をしてしても、遺伝的危険因子ではないことをお伝えください。また患者さん自身が説明の文章などを希望される時は同封の文書（説明文2）をお渡し下さい。いずれにしても葉酸を服用することはお勧めされた方がいいと思います。

4. それ以外の結果に関しては、遺伝子異常が認められたものはありません。すべて研究段階であり内容を開示する必要はありませんが、検査結果を希望される方には、注2のようにお伝えください。

注1 L1CAMの臨床的意義

a. 概略

X連鎖性劣性遺伝性水頭症（X-linked hydrocephalus；以下XLHと略す）は、X連鎖性劣性の遺伝様式をとる特異な水頭症です。水頭症のほかに、精神発達遅滞・下肢の痙性麻痺・拇指の内転屈曲を臨床的特徴とします。Habibによると先天性水頭症の2%、男児の中脳水道狭窄症による水頭症の25%の頻度であると述べられています。神経放射線学的特徴としては、脳梁低形成、視床癒合、シャント後の脳室壁の波状変化（rippled ventricular wall）、そして小脳虫部前葉の局所的萎縮を認め、病理学的には延髄錐体路の低形成を呈します。遺伝歴のない中脳水道狭窄症は適切な治療を行えば比較的良好ですが、XLHはたとえ早期に脳室腹腔シャント術を施行しても、重度の精神運動発達遅滞を後遺します。1992年にXLHの1家系にL1CAM遺伝子異常が同定され、それ以降世界で150家系以上の報告があり今やこの原因遺伝子と同定されているといえます。

b. L1遺伝子診断の適応・方法・時期

①. 適応

L1遺伝子検索は、家族歴からX連鎖性が疑われる場合（男児兄弟で水頭症の場合も含めて）、あるいは孤発例でも臨床所見よりXLHが疑われる場合、さらに確定診断をするために行なうか、家族歴からXLHが疑われる家系の女性が、育児を希望する時の保因者診断として、行なわれます。

②. 方法と時期

保因者と診断された女性が妊娠したとき、胎児がL1遺伝子異常を有するかどうかを知りたいという希望があれば、その出生前診断は可能ですが、その場合には十分量のDNAが羊水検査あるいは絨毛検査によって得られることが必要です。

家族歴がなく胎内で水頭症の診断がなされた症例で、L1遺伝子異常があるかどうかを出生前診断することは不可能ではありませんが、大きな問題があります。すなわちL1遺伝子異常はhot pointがなく家系ごとに異常の部位や種類が異なるので、4000bp近くの全エクソンをシーケンスする必要があり、最低採血してから1ヶ月位の時間を要することです。そのため確定診断できるのは、水頭症がわかってからその後1カ月を要しますから、かなり後期になります。

③. 遺伝カウンセリング

遺伝子診断を行うにあたっては、綿密な診断前カウンセリングや診断後カウンセリングを準備しておく必要があります。日本では遺伝料が少なく遺伝カウンセラーが不足しており、日本人類遺伝学会と日本臨床遺伝学会が共同で、臨床遺伝専門医を認定することで合意に達し、準備をすすめています。遺伝医療システムの構築と運用に関する研究班の開設したホームページ（<http://www.iden.gr.jp>）や、それとリンクしている信州大学衛生学福嶋義光教授が開設したGENETOPIA(<http://genetopia.md.shinshu-u.ac.jp>)では、遺伝カウンセリングに必要な基礎知識や事例集・サポートシステム・倫理ガイドラインまで非常に詳しく記載されています。また地域ごとにどこで遺伝相談が受けられるかに関しても、情報が公開されています。

L1CAM遺伝子異常を同定された患者さんやその家族への説明用のパンフレットを作成しました。これをお渡しする際には、遺伝カウンセリングの可能性も情報も提供ください。

注2. その他の遺伝子検索の結果につけて

<L1CAM, MSII>

今回行なった遺伝子検索の結果について説明させていただきます。

L1CAM、MSIIという遺伝子について検索を行ないました。L1CAMは遺伝性水頭症の原因遺伝子のひとつとして考えられています。MSIIは、この遺伝子を欠損した実験動物が水頭症を発症する事がわかったので、人の水頭症の原因遺伝子かもしれないと考えて、遺伝子を検索しました。これまでのところ、〇〇さんはこれらの遺伝子に異常は認められませんでした。現在わかっている範囲で水頭症を引き起す遺伝子異常は認められないという結果です。