

今後別の遺伝子に変化が水頭症をひきおこすことが明らかになれば、さらに検索させていただくかもしれません。

<ZIC1, Engrailed2, WINT1>

今回行なったという遺伝子検索の結果について説明させていただきます。

ZIC1, Engrailed2, WINT1という遺伝子について検索を行いました。これらは、この遺伝子を欠損したネズミが小脳の異常を伴う病気を発症する事がわかったので、小脳に異常を伴う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。現在わかってる範囲でこの病気を引き起す遺伝子異常は認められないという結果です。

<ZIC2, SHH>

今回行なったという遺伝子検索の結果について説明させていただきます。

ZIC2, SHHという遺伝子について検索を行いました。外国では余前脳胞症の患者さんにこの遺伝子の異常を伴う事がわかったので、今回遺伝子を検索しました。これまでのところ、〇〇さんはこれらに遺伝子異常は認められませんでした。現在わかってる範囲でこの病気を引き起す遺伝子の異常は認められないという結果です。

患者・家族への説明文

<説明文1>LICAMについて

今回の遺伝子検索をした結果、貴方（貴方のお子さん）はLICAM遺伝子に異常があることがわかりました。このことはどのような意味をもつのかということの説明いたします。

② LICAMとは何ですか？

LICAM（エル・ワン・カム）は、胎児の脳がつくられる時に大切な働きをしているタンパク質の一つです。このタンパク質の設計図の働きをしているものが、LICAM遺伝子と呼ばれているもので、この遺伝子の異常が原因で、先天性（生まれつきの）水頭症になるということが最近発見されました。この遺伝子はX染色体という染色体の上にあります、X染色体と一緒に遺伝する（子供に伝えられる）ことから、X連鎖性遺伝性水頭症とよばれています。X染色体は、Y染色体とともに、性染色体と呼ばれており、男性になるか、女性になるかを定める役割をしています。X+Yタイプでは男子、X+Xタイプだと女子になります。男子は、LICAM遺伝子を一つ、女子は、LICAM遺伝子を2つ持っているということです。従って女性の場合2つの染色体を持っているので、片方のLICAM遺伝子に異常があっても、もう一方のLICAM遺伝子に問題がなければ、正常なLICAMタンパク質が作られるので病気になることはありません。ところが、男性ではLICAM遺伝子が一つしかないため、遺伝子の異常がすぐに、病気の発症につながるわけです。このため、この疾患は男性にしか発病しないわけです。

③ LICAM遺伝子の遺伝

子供は生まれる時に、性染色体をお父さんとお母さんからそれぞれ1本ずつ受け渡されますので、男の子はお母さんから受け渡されたLICAM遺伝子（を運ぶX染色体）のみを、女の子は、お父さんとお母さんから受け渡されたLICAM遺伝子（を運ぶX染色体）を一つずつ持っていることになります。いいかえると、男の子はLICAM遺伝子（母）のみのタイプで、女の子はLICAM遺伝子（父）+LICAM遺伝子（母）タイプで生まれてくるということです。お母さんの持っている2つのLICAM遺伝子のうち一つに異常があったとき、お母さんはLICAM遺伝子異常の保因者ということになります。そのとき生まれる子供さんは、女の子であれば50%が保因者で、50%がLICAM遺伝子異常のないことになります。しかし、LICAM遺伝子（母）タイプのみを受け継ぐ男の子に異常なLICAM遺伝子が伝わった場合には、水頭症を発症することになります。LICAM遺伝子異常のないほうのX染色体を受継いだ男の子は、水頭症になることはありません。お母さんの持っている2本のX染色体のうちどちらが受け渡されるかは、およそ50%の確率で決まります。生まれてくる男の子がX連鎖性遺伝性水頭症である可能性はおおよそ50%です。

④ 次の子供が生まれる前に胎内診断は出来ますか。

今回の検査で遺伝子異常の部位がはっきりしたので、妊娠中で遺伝子診断をすれば水頭症を発症するかどうかの診断はできます。その方法は羊水診断と絨毛診断があります。詳しいことは遺伝カウンセリングを受けて相談されることをお勧めします。

⑤ はかの姉妹がこの病気の子供を妊娠する可能性があるかどうかを調べるべきでしょうか。

この診断は発症前診断（遺伝子異常があれば将来子供が出来るときに水頭症の子供が出来る確率が高くなるということ）になります。その方がしっかりとこの事実を受け止めることが出来るように援助するために、十分なカウンセリングを受けることができます。どちらか知りたくない、検査を受けたくないという権利は守られるべきで、決して他人が強制してはいけません。

<説明文 2>MTHFRについて

今回の検索でMTHFR遺伝子について、このような結果が認められました。これはどういう意味があるのかということの説明いたしましょう。

① MTHFR（メチル4水素化葉酸還元酵素）とは何ですか。

MTHFRは葉酸が利用されるために大切な働きをしている酵素です。今回調べさせていただいたのはこの酵素を作るためのMTHFR遺伝子です。

葉酸は神経管閉鎖障害（胎内で神経管は閉鎖して脳や脊髄をつくり上げていきますが、うまく閉鎖しないために起こる病気の総称で、通常二分脊椎症・脳瘤などをさしますが、広い意味では、水頭症もこれに含むこともあります。）という先天性の病気と関わりがあると考えられています。

妊娠初期にお母さんが葉酸を多く摂取すると、この病気の発生が減る、という調査結果があります。なぜ葉酸を摂取すると神経管閉鎖障害の発生が減るのかというメカニズムを明らかにするためにこの研究をしています。

② MTHFR遺伝子のSNP<スニップ>について調べました。SNPとは何ですか。

人の遺伝情報はDNA<ディー・エヌ・エイ>という物質に存在します。DNAは生物を構成するのに必要なすべての情報を含む、まさに生物の設計図で4種類の塩基の並び方が決められています。遺伝に関する情報は30億有るといわれこの上に書かれています。この30億の遺伝に関する情報のなかに、1つだけ塩基が他の多くの人と入れ替わっているのです。その個所が、10万から30万箇所あるといわれています。これはsingle nucleotide polymorphism（1塩基多型）と呼ばれ、その頭文字を取ってSNP<スニップ>と呼ばれています。この違いによって顔貌や体型、髪の毛の色などが千差万別のヒトができるわけです。それはまた薬に対する感受性の違いや、何らかの疾患に対して罹患しやすさの違いなどになってでてくることもあります。最近このSNP解析が盛んになってきました。これは疾患へのかかりやすさを示しています。そういう塩基の違い（塩基の置換）を持っている人は持っていない人に比べて疾患に罹患する確率が数倍から数十倍の確率で高くなるというもので、疾患に対する危険因子といえます。

③ MTHFR遺伝子のSNP

MTHFR遺伝子には677番目の塩基がCの人とTの人がいることがわかっています。遺伝子は2つありますから、C+C、C+T、T+C、T+Tと4つのタイプがあることになりましたが、C+TとT+Cは区別しないことから、CC、CT、TTの3つのタイプとして考えます。

また、1298番目でもAの人とCの人がいます。同様にA+A、A+C、C+A、C+Cの4つのタイプがあることになりましたが、A+CとC+Aは区別しないことから、AA、AC、CCの3つのタイプとして考えます。

この3つのタイプ間でMTHFRの働きに差があるといわれています。最近、神経管閉鎖障害の患者さんやお母さんにTTのタイプが多いという調査結果がいくつか、外国から報告されました。日本では同じような調査研究は行われたことがなかったのですが、今回の皆様のご協力で初めて行ないました。その結果、日本ではこれまでのところ脊髄髄膜瘤・脳瘤・水頭症の患者さんや家族に、MTHFR遺伝子の677番目と1298番目の塩基の置換が特に多いという結果は認められませんでした。

④ 神経管閉鎖障害と葉酸

脊髄髄膜瘤はいろいろな原因が組み合わさって起こると考えられており、その原因をめぐって様々な研究をしていますが、未だはっきりとした原因はつかめていません。葉酸を多くとれば、病気の発生が少ないという報告が出ています。妊娠する可能性のある若い女性は、妊娠前1ヶ月から妊娠3ヶ月までの間、1日0.4mgの葉酸を飲まれることをおすすめします。葉酸はスーパーや薬局の健康薬品売場で手に入ります。大塚製薬が出しているネイチャーメイド（葉酸）という商品です。1粒0.4mgなので毎日一錠飲めばいいです。（葉酸のお話は別のパンフレットがあります。）

水頭症バンク全前脳胞症患者5例における遺伝子異常の解析

京都府立医科大学附属脳・血管系老化研究センター病態病理学部門¹ 国立大阪病院脳神経外科² 国立大阪病院臨床研究部³

伏木 信次¹ 矢追 毅¹ 金村 米博³ 山崎 麻美²

研究要旨

前脳胞が左右の大脳半球へ分化する過程で生じる障害により顔面正中部の奇形を高率に合併する中枢神経系先天異常の一つに、全前脳胞症と総称される一群の奇形がある。我々は、本研究班により設立された水頭症DNAバンクに収集された全前脳胞症患者において、本疾患の原因もしくは責任遺伝子(SHH, ZIC2)における配列異常の解析を行っている。前年度の班研究では、GCに富む部分配列をかなり多く含む両遺伝子配列を、直接塩基配列決定法によって効率よく正確に解析するために、プライマー配列等の設定について見直しを行ったこと、患者7人(1-E7,1-F7,1-G5,1-J4,2-A3,2-G7,2-J7)のZIC2遺伝子について変異を検索したものの、いかなる変異も見出されなかったことを報告した。その後、これら患者におけるSHH遺伝子についても検索を行ったが、いかなる変異も見出されなかった。加えて、新たに登録された2人の患者(3-H7,3-J1)とそれぞれの両親(3-H8, 3-H9,3-J2,3-J3)について、両遺伝子の変異解析を同様に行った。その結果、家系3-Jの父親が、アミノ酸変異を伴わない1塩基配列多型をSHH exon1にホモで有する他は、いかなる変異も見出されなかった。

A. 研究目的

前脳胞が左右の大脳半球へ分化する過程の障害により、高率に顔面正中部の奇形を合併する重症の中枢神経系先天異常の一つに全前脳胞症（以下、HPE）と総称される一群の奇形がある。本疾患は、前脳が左右に分割されて終脳が形成される際に、その分割が不完全であるために生じるが、遺伝疫学的研究からは少なくとも5つのサブタイプ(HPE1～HPE5)に分類される。

近年の分子生物学的研究により、HPE2からHPE5までの4つについては、原因もしくは責任遺伝子とその変異が同定されている。本年度、我々は、それら遺伝子のうち、HPE3及びHPE5それぞれの原因遺伝子であるSHH及びZIC2遺伝子を対象に、本研究班によって設立された水頭症バンクに収集された全前脳胞症患者全9例

における遺伝子異常の解析を終了し、変異の有無や塩基配列多型を最終的に確定することを目的に取り組んだ。

B. 研究方法

全前脳症原因遺伝子としてこれまでに同定されている5つの遺伝子のうち、Sonic hedgehog(SHH)およびZIC2の2つの遺伝子に着目し、昨年度までにバンクに登録された全前脳症患者5例(1-E7,1-F7,1-G5,1-J4,2-A3)新たに登録された2人の患者(3-H7,3-J1)とそれぞれの両親(3-H8, 3-H9,3-J2,3-J3)のゲノムDNAを用いて、変異の有無を検索した。SHH, ZIC2各遺伝子はともに3つのエクソンからなり、配列も明らかにされていることから、基本的には、イントロン部分の配列を元にしたPCRプライマーにより、エクソン領域を増幅し、得られた産物を鋳型とするPCR直接シーケンス法を行い、蛍光DNAシク

エンサーにより配列を決定した。

以下に、配列決定のための鋳型となる各遺伝子断片のPCR増幅、およびそのシーケンス反応に用いたプライマー配列を示す。シーケンス反応用プライマーは鋳型増幅用プライマーの他、断片の内側に位置するプライマーを設計した。

(SHH exon1)

鋳型用遺伝子断片兼シーケンス反応用増幅プライマー

SHHPCR1s, 5'-AGGAAGAGAAAGAGCGAGGCAGC-3'

SHHPCR1as, 5'-TAAGTCTGGAAGTGTTCGGCTT-3'

(SHH exon2)

鋳型用遺伝子断片増幅兼シーケンス反応用プライマー

SHHPCR2s, 5'-ATGGCCCTCGCGCCTTGAGACTG-3'

SHHPCR2as, 5'-TTCCACCGCGAAACGCAGTCATC-3'

(SHH exon3)

鋳型用遺伝子断片増幅兼シーケンス反応用プライマー

SHHPCR3s, 5'-GCACCAAGCGTGCGCCCTCCTC-3'

SHHPCR3as, 5'-TTCCTTAGAGTCTACTTTGGACTGTCCTAC-3'

シーケンス反応用プライマー

SHHPCR3as, 5'-TCGGCCACCACGTACACGCGCT-3'

SHHPCR4s, 5'-AGCGCGTGTACGTGGTGGCCGA-3'

SHHPCR4as, 5'-ATTATAACTCAGTCTGGTTCGT-3'

(ZIC2 exon1)

鋳型用遺伝子断片増幅兼シーケンス反応用プライマー

ZIC2-G1, 5'-AGAGCGGCTCCCAGGGCTGAAGTG-3'

ZIC2-G8, 5'-AAAAACACCTCCCATCCCAGGTCC-3'

シーケンス反応用プライマー

ZIC2-G2, 5'-TGAGCTTTAAGGCTCCCAFTGTGCG-3'

ZIC2-G3, 5'-GCAGGACCGTGAAGTGCCTG-3'

ZIC2-G4, 5'-GAGCACATTCTGCGAGCCGTGC-3'

ZIC2-G7, 5'-CAGTGCATCAAGCAGGAGCTAATC-3'

ZIC2-G13, 5'-AACTCCACCCGGGACTTCCTG-3'

ZIC2-G14, 5'-TCGTGCATGGTGTCTGAAAGT-3'

(ZIC2 exon2)

鋳型用遺伝子断片兼シーケンス反応用増幅プライマー

ZIC2-G9, 5'-TGAGTGGGGGCTCTGCAGGCTCTGG-3'

ZIC2-G10, 5'-TCCCAGGCCGGCTGAGGTGGTCCGG-3'

(ZIC2 exon3)

鋳型用遺伝子断片兼シーケンス反応用増幅プライマー

ZIC2-G11, 5'-CTGCACTCCACCCAGTCCCCTCTG-3'

ZIC2-G12, 5'-CATGATCACAAAGGTGCCCTCGCTGC-3'

次に各遺伝子断片のPCR増幅条件を示す。反応はすべてLA Taq Polymerase (宝酒造) を用いてPE-2400サーマルサイクラーにて行った。

(SHH exon1,2)

96°C, 1min → (96°C, 15sec; X°C, 30sec; 72°C, 1min) x each 3cycles [X=74 → 72 → 70 → 68 → 66 → 64 → 62] → (96°C, 15sec; 60°C, 30sec; 72°C, 1min) x 30cycles

(SHH exon3)

96°C, 1min → (96°C, 15sec; X°C, 30sec; 72°C, 1.5min) x each 3cycles [X=74 → 70 → 66 → 62 → 58] → (96°C, 15sec; 55°C, 30sec; 72°C, 1.5min) x 30cycles → 72°C, 5min

(ZIC2 exon1)

96°C, 3min → (96°C, 30sec; X°C, 30sec; 72°C, 1 min 45 sec) x each 3cycles [X=74 → 72 → 70 → 68] → (96°C, 30sec; 65°C, 30sec; 72°C, 1 min 45 sec) x 30cycles → 72°C, 5min

(ZIC2 exon2, 3)

96°C, 3min → (96°C, 30sec; X°C, 30sec; 72°C, 1 min) x each 3cycles [X=74 → 72 → 70 → 68] → (96°C, 30sec; 65°C, 30sec; 72°C, 1 min) x 30cycles → 72°C, 5min

反応後に、1.5%アガロースゲル電気泳動を行い、大きな欠失もしくは挿入変異の有無を確認した。次に増幅産物をQiaquick Gel Extraction kit (キアゲン社)にて精製後、Big Dye Terminator DNA Sequencing kit (アプライドバイオシステムズジャパン社)によりシーケンシング反応を行い、PRISM310 Genetic Analyzerにより、配列決定を行った。この際、サイクルシーケンス反応液は、鋳型DNAの他、プライマー終濃度0.32 μ M、Big Dye Terminator DNA Sequencing reaction PreMix終濃度1xを基本に、プライマーごとに下記の反応添加物を加えた組成で、全液量10 μ lとして調整した。反応はすべてPE-2400サーマルサイクラーにて、各々に示すサイクル条件にて反応を行った。ただし、SHHに関しては全て次のサイクル条件に従った。

98°C, 10min → (98°C, 10sec; 50°C, 5 min) x 25cycles

SHHPCR1s

- MgCl₂ 0.35mM, SEQUENCERx Enhancer Solution C or F (Invitrogen社、以下同様) 0.25x

SHHPCR1as, SHHPCR2as,

MgCl₂ 0.35mM, DMSO 5%

SHHPCR2s

MgCl₂ 0.35mM, SEQUENCERx Enhancer Solution E 0.25x
SHHPCR3s

MgCl₂ 0.35mM, SEQUENCERx Enhancer Solution A 0.25x
SHHPCR3as

MgCl₂ 0.35mM, DMSO 5%
SHHPCR4s

MgCl₂ 0.35mM
SHHPCR4as

MgCl₂ 0.35mM, DMSO 5%
SHHPCR5as

MgCl₂ 0.35mM, SEQUENCERx Enhancer Solution D 0.25x
ZIC 2 G1,G2,G3,G8

MgCl₂ 0.35mM
98°C,10min→(98°C,10sec; 50°C, 5 min) x 25cycles

ZIC 2 G4

MgCl₂ 0.35mM, SEQUENCERx Enhancer Solution E
0.5x
98°C,10min→(98°C,10sec; 50°C, 5 min) x 25cycles

ZIC 2 G7

SEQUENCERx Enhancer Solution D 0.5x
98°C,10min→(98°C,10sec; 50°C, 5 min) x 25cycles

ZIC 2 G9

MgCl₂ 0.35mM
98°C,10min→(98°C,10sec; 50°C, 5 sec; 60°C, 5 min) x 25cycles

ZIC 2 G10

添加物なし
96°C,10min→(96°C,10sec; 50°C, 5 sec; 60°C, 5 min) x 25cycles

ZIC 2 G11

MgCl₂ 0.35mM, SEQUENCERx Enhancer Solution A 0.125x
98°C,10min→(98°C,10sec; 50°C, 5 min) x 25cycles

ZIC 2 G12

MgCl₂ 0.35mM, SEQUENCERx Enhancer Solution D 0.125x
98°C,10min→(98°C,10sec; 50°C, 5 min) x 25cycles

ZIC 2 G13,G14

MgCl₂ 0.35mM, DMSO 5%
98°C,10min→(98°C,10sec; 50°C, 5 sec; 55°C, 5 min) x 25cycles

このようにして決定された配列は、2 Sequences BLAST ソフトウェア (NCBI) を用いて、各野生型遺伝子配列と比較し、変異・多型の有無を検索した。
(倫理面への配慮) 患者からの末梢血採取およびゲノムDNA抽出は本研究分担者からは独立して実施された。

さらに本遺伝子解析を行うにあたっては、患者の個人情報に触れることなく匿名化された患者ゲノムDNAを本バンクから受け取り、変異の検索を行った。したがって、解析の担当者は、患者の個人情報と解析結果を結びつけることのできる立場にはない。

C. 研究結果および考察

前年度までに登録された患者7人 (1-E7,1-F7,1-G5,1-J4,2-A3,2-G7,2-J7) の SHHとZIC2の両遺伝子について、新たに設定されたプロトコールによって変異を検索したものの、欠失・挿入やミスセンス変異、さらにはアミノ酸変異を伴わない点突然変異も見出されなかった。エクソン-イントロン接合部の配列にも変異は見出されなかった。加えて、新たに登録された2人の患者 (3-H7,3-J1) とそれぞれの両親 (3-H8, 3-H9,3-J2,3-J3) について、両遺伝子の変異解析を同様に行ったものの、いかなる変異も見出されなかった。

昨年度のSHH遺伝子の解析では、アミノ酸変異を伴わないサイレントな変異として、以下の2例が見出された。

患者1-F7 Gly201(GGC→GGC/T)

患者1-G5 Asn189(AAC→AAC/T)

今年度の解析の結果、家系3-Jの父親が、SHH exon1の5'非翻訳領域中に、G28→Aの一塩基置換をホモで有することが見出された。これによって新たな開始コドンが生じることはないことから、この変異は、アミノ酸変異を伴わない一塩基多型と判断した。さらに、ヘテロ二重鎖の鋭敏な検出方法に基づいた、シーケンス解析とは原理的に異なる、WAVE法と呼ばれる方法を用いても、この多型の存在は確認され、家系サンプルを用いた解析結果も矛盾のないことが確認された。

D. 考察

GCに富む部分配列をかなり多く含む両遺伝子配列を、直接塩基配列決定法によって効率よく正確に解析するために、プライマー配列等の設定について見直しが必要であることを、昨年度の報告書において考察した。これを受けて、今年度のシーケンス反応条件等の全面的な見直しを行ったことにより、この問題は大幅に改善され、GCの極めて豊富な部分配列を除いた、対象配列の全領域において、DNAの両鎖の配列を決定することが可能となった。また、4日間で、SHHについて10検体、ZIC2

については8検体について、両DNA鎖の塩基配列を決定できることから、エクソン領域およびスプライシング・シグナルの配列に限れば、今後の検体数の増加にも十分対応できるものと考えられる。したがって、診断確定のために十分な信頼度をもったプロトコルを確立し得たと考える。

実際に登録された患者からは両遺伝子にアミノ酸変異を伴うような遺伝子変異は、検索した範囲では見出されなかった。1塩基配列多型については、昨年の患者1-F7と1-G5のSHHで見出されたものに加えて、家系3-Jの父親が、アミノ酸変異を伴わない1塩基配列多型をSHH exon1の5'非翻訳領域中にホモで有することを新たに見出した。この多型では、患者1-F7と1-G5におけると同様、サイレント変異の周囲の配列がスプライシング・シグナル配列と相同性を持つことはなく、それ自身によっても新たな開始コドンを生じる変異でもないことから、本来とは異なるスプライシングなどにより異常な翻訳読み取り枠を生じたmRNAが合成され、発症にいたるという可能性はないと考えられる。ただし今回の研究結果は、SHH,ZIC2の両遺伝子に限れば、プロモーター領域やイントロン中に潜在する発現調節領域中にこれらの患者の変異が存在する可能性を否定するものではない。

現在のアプローチで、これらの領域についても効率よく変異を解析するためには、配列決定すべきDNAサイズが大きすぎることから現状の塩基配列解析能力では困難を極めるものと容易に推察できる。また、他の全前脳胞症の原因、もしくは責任遺伝子は、更にサイズの大きな遺伝子である。したがって、今後は、塩基配列決定法のみには頼らない、より効率よく精度の高いアプローチを考えていくことも必要であろう。さらに、本バンクにおけるサンプル収集は末梢血由来ゲノムDNAに限られているため、転写産物の配列解析を行うことができないことから、転写活性やスプライシングの異常で起こる可能性にも対応できる方法であれば、なお望ましいといえよう。

D. 結論

今年度は、シーケンス反応液の組成と反応条件、鋳型DNAの調製について、見直し、最適化した結果、多検体の配列を効率よく正確に解析する系を作ることができた。

昨年度までに登録されていた患者7人(1-E7,1-F7,1-

G5,1-J4,2-A3,2-G7,2-J7)、加えて、新たに登録された2人の患者(3-H7,3-J1)とそれぞれの両親(3-H8, 3-H9,3-J2,3-J3)について、SHH、ZIC2の両遺伝子について変異を検索したものの、いかなる変異も見出されなかった。

先天性（胎児性）水頭症の治療指針作製に向けて — 脊髄髄膜瘤の予後決定因子の検討 —

大阪市立総合医療センター 小児脳神経外科、脳神経外科

坂本 博昭 北野 昌平 森川 俊枝 西川 節

研究要旨

1994年から2000年までに経験した脊髄髄膜瘤37例を対象に、出生前に診断され計画出産された11例と出生後に診断された26例との2群に分け、在胎週数がその後の機能的予後（発達指数）に影響するかどうかを検討した。出生後の経過観察期間（年齢）は2年から7年である。合併するキアリ奇形、脳梁部分欠損など脳の形態学的異常が発達指数に影響するかどうかを検討した。出生前に診断された群の在胎週数は平均37.9±1.5週、発達指数は平均67.4±35.5であり、出生後に診断された群の在胎週数は平均39.1±1.1週、発達指数は平均97.6±23.4であった。在胎週数は両群間に有意な差を認めしたが、発達指数には有意な差を認めなかった。大きい頭囲、著明な脳室拡大もしくは程度が強いキアリ奇形を合併する例では、合併しない例に比べ発達指数が有意に低かったが、脳梁欠損の合併の有無で有意な差は認めなかった。出生前に診断可能であった群と出生後に診断した群では発達指数の有意な差はなかったのは、前者の群には重症な水頭症がより多く含まれていたためと思われる。結論として、出生前診断された脊髄髄膜瘤の例で、早期に出生させて治療を行っても明らかに機能予後を改善させるとは言えなかった。発達指数に影響する因子は、水頭症の程度、キアリ奇形の程度など、個々の症例で検討を行うことが重要と思われる。今後、対象を同程度の水頭症例として検討する必要がある。また、本研究で扱った症例の在胎週数は31週以降と後期であったため、これより早期の時期の治療例の検討が必要となる。

A. 研究目的

平成11年度より開始した先天性（胎児性）水頭症の研究班の目標の一つとして、先天性（胎児性）水頭症の治療プロトコルの作製がある。現在のところ、出生前に診断された先天性水頭症例の至適な出生時期や発達面での予後に及ぼす因子について、充分には検討されていない。これらの点は、臨床の現場で医療側から家族へインフォームする情報の正確度を高め、より良い治療を患者に提供する上で、最も不足している情報の一つである。これらの点を考慮し、先天性（胎児性）水頭症の治療プロトコル作製に向けて予後決定因子について検討し

た。

先天性水頭症の予後を決定する因子は大きく分けて次のような3つの要素がある。1次的要素は水頭症の原因になる疾患の種類や遺伝要因、染色体異常、多臓器の合併疾患である。2次的要素としては水頭症の進行や水頭症治療上の合併症である。3次的要素としては介護、教育、患児や家族を取りまく環境、支援体制、心理的問題などである。本研究では1次的要素として、先天性水頭症の中で最も頻度が高い脊髄髄膜瘤に伴う先天性水頭症をとりあげ、2次的要素として出生前における水頭症の進行や治療上の合併症に着目し、脳室腹腔短絡術による水頭症の治療の開始時期が早いほど知的予後をより改善

し得るかどうかを検討した。また、機能予後を左右する他の因子として、水頭症の程度、キアリ奇形、脳梁の低形成などについても検討した。

B. 研究方法

1994年から2000年までに、大阪市立総合医療センター小児脳神経外科において治療した脊髄髄膜瘤37例を対象とした。出生前に脊髄髄膜瘤と診断され、計画的に出生した群と出生前診断が行われずに出生した群の2群に分け発達予後を検討した。また在胎週数、頭囲などの出生時の状態ならびに画像診断による脳の形態異常と発達指数との関係を検討した。

1) 出生前診断の倫理面への配慮

出生前診断を行う上で、十分な説明に基づく両親の合意のもとに腹部超音波断層撮影もしくは胎児MRI検査が行われた。出生前診断の説明にあたっては両親の心理的な面を配慮し、検査の結果が妊娠の継続に影響を与えないよう十分に時間を費やして産科医、脳神経外科医より両親に説明した。

2) 出産方法

出生前に診断された例では、水頭症および脊髄髄膜瘤による神経症状が娩出に伴い増悪することを避けるため、両親の同意が得られれば帝王切開により出生した。

出生前に診断されなかった場合には、母子の状態に応じた出産方法が選択された。

3) 出生後の治療方法

脊髄髄膜瘤の修復（閉鎖術）は、感染を予防する目的で原則として出生後48時間以内に修復を行った。水頭症に対する治療は、脊髄髄膜瘤修復術の術後（術後数日以内）に頭部CTにより進行性に脳室拡大が見られる場合に脳室腹腔短絡術を施行した。出生時にすでに頭囲の増大が著しい場合には、脊髄髄膜瘤の修復術と同日に閉鎖術に引き続き脳室腹腔短絡術を施行した。

4) MRI所見

脊髄髄膜瘤に伴う水頭症の発達に与える影響を検討するため、出生後早期に頭部MRIの撮影を行った27例について、小脳扁桃の最下端部の位置、脳梁形成の異常の有無を検討した。

5) 発達の評価方法

発達科学研究教育センターによる乳幼児発達スケール Kinder Infant Development Scale（以後KIDSと略す）を用い発達を評価した。保護者に対する問診形式によりスケールの到達度を調べ、総合発達指数（DQ）を算出した。異なる2群間の発達指数の統計学的な差の検定には Mann-Whitneyの検定を用いた。

C. 研究結果

出生前に診断された出生前診断群は11例（女子7例、男子4例）であり、全例が帝王切開で出生した。出生後に脊髄髄膜瘤と診断された出生後診断群は26例（女子13例、男子13例）であった。出生前診断群と出生後診断群の両群間において、在胎週数、生下時体重、頭囲、短絡術までの日数、現時点（2歳から7歳）での発達指数を比較した（表1）。出生前診断群では在胎週数が有意に短かったが、発達指数は有意な差を認めなかった。また脊髄髄膜瘤修復術から髄液短絡術までの日数は、出生前に診断された群が有意に短かった。

脊髄髄膜瘤に合併する水頭症の程度を評価した。妊娠末期（31週から35週）から出生までの限られた期間内において、脳室拡大が急激に進行した例はなかった。著しい脳室拡大を示す高度な水頭症群（3例）、側脳室が中等度に拡大する水頭症群（26例）、軽度の側脳室後角の拡大は認められるが短絡術は必要としない例、もしくは脳室の拡大を認めない例からなる非水頭症群（8例）の3段階に分けて検討すると、著しい拡大を呈する3例は

表 1 出生前診断群と出生後診断群の比較

	出生前診断群	出生後診断群
症例数	11	26
在胎週数 *	37.9±1.5	39.1±1.1
（最低値-最高値）	(36-41)	(37-41)
出生体重 (g)	2783±323	2971±435
（最低値-最高値）	(2276-3408)	(1718-3740)
出生時頭囲	35.9±4.3	33.2±1.4
閉鎖術から短絡術までの日数 *	3.5±5.5	7.9±4.9
出生前診断週数	33.2±2.3	
（最低値-最高値）	(31-37)	
DQ	67.4±35.5	97.6±23.4
脊髄髄膜瘤レベル（例数）		
胸椎	2	1
腰椎	5	10
仙椎	4	15
脳室形態（例数）		
脳室拡大著明 **	3	0
後角拡大	8	21
シャント不要	0	5
キアリ奇形（例数）		
画像上	11(100%)	18(68%)
症候性	3	2

DQ：発達指数

*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$

全例が出生前に診断された。高度な水頭症を呈した例の割合は、出生後に診断された群と比べ、出生前に診断された群では有意に ($P < 0.01$) に高かった。また、これら著明な脳室拡大を呈する3例の発達指数の平均は、非水頭症群の8例を比べて有意に ($P < 0.05$) 低い値であった。新生児期では脳室の拡大の程度と頭囲の値とは比例することから、出生時の頭囲と発達指数との間には逆の相関関係が認められた (図1)。

小脳扁桃の下垂は、画像診断を検討した27例中16例 (約60%) に認められ、小脳扁桃の最下端の位置が第2頸椎までに認められた軽度下垂群は7例、第3頸椎以下と著明に下垂した例は9例であった。最下端がより低い位置にある群は、より高い位置にある軽度下垂群よりも発達指数が有意に ($P < 0.01$) 低かった (図2)。脳梁欠損を認めたものは27例中8例 (約30%) であり、すべて脳梁膨大部の部分欠損であった (図3)。脳梁部分欠損のある8例と脳梁欠損のない19例の2群の間には、発達指数に有意な差はなかった。

D. 考 察

1. 在胎週数と発達指数との関係

先天性水頭症の知能予後に関して、脊髄髄膜瘤という同一疾患で比較すると、出生前に診断がされ早期に計画的に出生して治療された方が、満期近くまで妊娠が継続され出生後に治療が行われた場合よりも発達や機能予後が良好であったとの報告がある¹¹⁾。また胎児水頭症の機能予後について手術の時期が35週以下の症例が38週以上の例と比較して良好であったという報告もみられる¹²⁾。

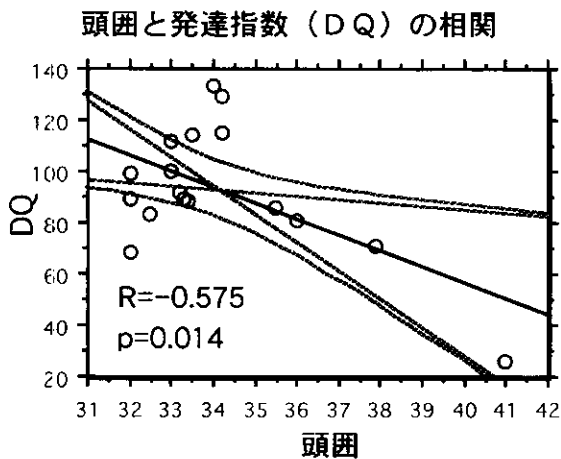


図1 出生時の頭囲と発達指数の関係
出生時の頭囲が大きいほど発達指数 (DQ) が低い相関関係が見られた ($P < 0.05$)。

そのため早期に出生すれば水頭症に対する治療開始が早められ、水頭症が大腦半球に与える抑制的な影響がより少なく、脳機能の予後が良いとの考えがある。しかし、在胎週数が早期になるほど、肺の未熟性から出生後に長期の呼吸管理を必要とする可能性が高く¹³⁾、髄液短絡術の後に感染を起こしやすい¹⁴⁾。結果的には、短い在胎週数のため新生児の未熟性に起因する重篤な病態によって死亡率が高くなると考えられる¹⁵⁾。また、胎児水頭症に対

脊髄髄膜瘤にともなう小脳扁桃下垂の程度とDQの関係

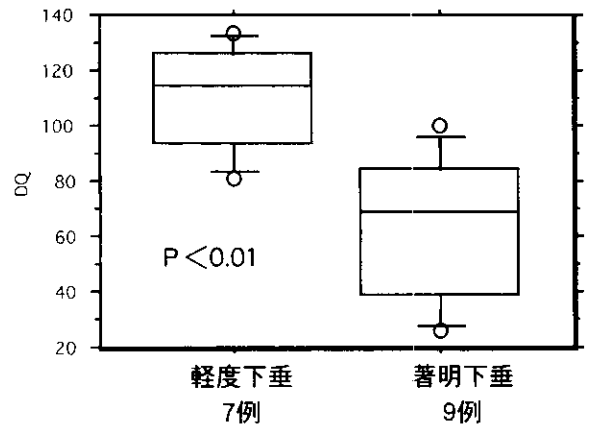


図2 脊髄髄膜瘤にともなう小脳扁桃の下垂の程度と発達指数 (DQ)
第3頸椎椎体よりも下に小脳扁桃の最下端がある著明下垂9例のDQは軽度下垂の7例よりも有意に ($P < 0.01$) 低かった。



図3 脳梁の部分欠損のある例のMRI
T1強調画像の矢状断面において脳梁膨大部に部分欠損がみられた (矢印)。

する早期出産の有効性が現在のところ証明されていない¹⁰⁾。したがって、水頭症が進行性でなければ36週以降での出産が容認されているのも事実である⁹⁾。

本研究では、在胎週数が短い出生前診断群と在胎週数がより長い出生後診断群の両群の間には発達指数の有意な差を認めなかった。この結果は、これまでの報告とは異なる結果であった¹¹⁾。本研究で従来の報告との間に違いを生じた原因について考察した。水頭症が発見されるには、頭囲の増大や脳室の拡大が妊娠早期から診断可能な程度に大きな場合であり、軽い脳室拡大は的確に診断されずに見過ごされる可能性がある。すなわち、在胎週数が早期に診断された例は水頭症の程度が重症な例が含まれる確率が高いといえる。この研究では出生前診断の有無により2群に分けて検討した。出生前診断群には重症または中等度の水頭症がより多く診断される結果、より重症の水頭症が含まれた可能性がある。今後、対象を同程度の水頭症例として検討していく必要がある。また、本研究で扱った症例の在胎週数は31週以降と後期であったため、これより早期の時期の例の検討が重要と思われる。

2. 出生時の頭囲と発達指数の関係

出生体重と在胎週数の関係は、週数が遅いほど体重が重くなる相関関係にある。本研究では、在胎週数と出生時の頭囲の値には逆の相関があり、在胎週数が短い例、すなわち早期に出生した例ほど頭囲が大きかった。この結果から、頭囲が大きく、脳室拡大が明かな例は早期から診断され、頭囲や脳室の大きさが正常の例では妊娠末期まで診断されないことが示唆される。出生時の頭囲と発達指数との関係をみると逆相関がみられ、頭囲が大きいほど発達指数は低値であった(図1)。出生時の頭囲は脳室拡大の程度と比例することを考慮すると、この相関は十分理解できる。

3. 脳室拡大の程度と発達指数との関係

脊髄髄膜瘤の閉鎖術から髄液短絡術までの日数は、出生前診断群が出生後診断群より有意に短かった。この原因は出生前から著しい水頭症を呈する例がより早い時期に診断されるためと思われる。これら著しい脳室拡大を呈する3例はいずれも発達指数が低い値であった。大脳実質の厚さ(brain mantle)が2cmよりも薄いものは、知能予後が不良であるとの説^{6,12)}があり、これらの症例の結果は脳室形態が発達予後に影響することを示唆している。脊髄髄膜瘤に伴う脳室の拡大は診断が遅延したた

めに著しい拡大を招いたとは考え難く、妊娠末期に限られた期間内において脳室拡大が急激に進行した例がなかったことから、より早い時期に水頭症が進行するものと思われた。この結果から、水頭症の発生時期が早期であるほど短絡術後の機能予後が不良であり、脊髄髄膜瘤に合併する水頭症に見られる著明な脳室拡大は、胎生の早期から発生するという説を支持している⁵⁾。脊髄髄膜瘤の修復術の後に脳室拡大が進行する例では、短絡術により良好な機能予後を呈する^{4,7)}。妊娠早期に著明な脳室拡大を呈する例は、これらの出生後に脳室拡大が進行するものとは異なる脳室拡大の機序が存在している可能性があると思われた。

4. 脳の形態異常の合併と発達予後の関係

小脳扁桃の下垂の程度と発達指数の関係を検討したところ、小脳扁桃が低い位置まで下垂するほど発達指数が有意に低かった。しかし、脳梁の形態異常を持つ例では発達指数は低下せず、むしろ頭囲が大きい例、もしくは水頭症が重症な例で小脳扁桃の位置が低かったことに関係していると思われる。脳梁は左右の大脳を繋ぐ交連繊維であるので、この部の障害が発生した場合には脳の高次機能障害をきたすため、発達指数よりも年長者における知能指数(IQ)の差として認められることは考えられる。

本研究で使用したKIDSの発達指数の評価は総合評価で行われているため、両下肢に加えて上肢や体幹機能に障害をもつ症候性キアリ奇形の患児では運動面での評価が著しく低くなる傾向がある。この運動面での著しい遅れが全体の評価を低くさせ、キアリ奇形の程度と発達指数の関係が増強された可能性があると思われた。

E. 結 論

脊髄髄膜瘤では、出生時の頭囲が大きい例、もしくは脳室拡大の程度が著しい例において、発達指数が有意に低かった。また、第3頸椎以下まで小脳扁桃の最下端が下垂するキアリ奇形を合併する場合には発達指数の低下に影響した。出生前に診断可能であった群と出生後に診断した群とを比較すると、発達指数には有意な差はなかった。これは前者の群には重症な水頭症がより多く含まれていたためと思われる。そのため、個々の症例で予後の決定因子の検討を行うべきである。今後、対象を同程度の水頭症例として検討する必要がある。

文 献

- 1) Foynton BR, Boynton CA, Merritt TA, Vaucher YE, James HE, Bejar RF: Ventriculoperitoneal shunts in low birth weight infants with intracranial hemorrhage: Neurodevelopmental outcome. *Neurosurgery* 18: 141-145, 1986.
- 2) Copper RL, Goldenberg RL, Creasy RK, Dubard MB, Davis RO, Entman SS, Iams JD, Cliver SP: A multicenter study of preterm birth weight and gestational age-specific neonatal mortality. *Am J Obstet Gynecol* 168: 78-84, 1993.
- 3) Escobar GJ, Littenberg B, Petitti DB: Outcome among surviving very low birth weight infants: A meta-analysis. *Arch Dis Child* 66: 202-211, 1991.
- 4) McLone DG, Dias MS: Complications of myelomeningocele closure. *Pediatr Neurosurg* 17: 267-273, 1991-92.
- 5) Oi S, Honda Y, Hidaka M, Sato O, Matusmoto S: Intrauterine high-resolution magnetic resonance imaging in fetal hydrocephalus and prenatal estimation of postnatal outcomes with "perspective classification". *J Neurosurg* 88: 685-694, 1998.
- 6) Riva D, Milani N, Giorgi C, Pantaleoni C, Zorzi C, Devoti M: Intelligence outcome in children with shunted hydrocephalus of different etiology. *Child's Nerv Syst* 10: 70-73, 1994.
- 7) Roseau GL, McCullough DC, Jopseph AL: Current prognosis in fetal ventriculomegaly. *J Neurosurg* 77: 551-555, 1992.
- 8) 佐藤博美、佐藤倫子、木戸口慶司、井澤仁之：胎生期診断された水頭症の治療上の問題点 厚生科学研究費補助金「難治性水頭症」調査研究班 平成12年度研究報告書67-71, 2001.
- 9) 下川尚子、林 隆士、吉川義彦、福田清一、橋本武夫：推定発生時期からみた先天性水頭症患児の機能的予後. 厚生科学研究費補助金「難治性水頭症」調査研究班 平成12年度研究報告書 60-66, 2001.
- 10) Sutton LN, Sun P, Adzick NS: Fetal neurosurgery. *Neurosurgery* 48: 124-144, 2001.
- 11) 高橋義男：出生前診断された胎児脳室拡大（水頭症？）における現在の診断の意義 厚生科学研究費補助金「難治性水頭症」調査研究班 平成12年度研究報告書72-78, 2001.
- 12) Young HF, Nulsen FE, Weiss MH, Thomas P: The relationship of intelligence and cerebral mantle in treated infantile hydrocephalus. (IQ potential in hydrocephalic children.) *Pediatrics* 52: 28-54, 1973.

小脳形成異常症における遺伝子異常の検索 —WNT1を主として—

大阪府立母子保健総合医療センター 企画調査部¹ 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²
国立大阪病院 脳神経外科³

岡本 伸彦¹ 金村 米博² 山崎 麻美³

研究要旨

小脳低形成を呈するヒトの先天性疾患にはDandy-Walker奇形、Joubert症候群等が知られているが、責任遺伝子は同定されていない。我々は、昨年度の研究で小脳低形成を呈する先天性疾患群において候補遺伝子（*ZIC1*、*Engrailed-2*）の変異の有無の検討を行った。両遺伝子はそのノックアウトマウスにおいて顕著な小脳低形成を生じるが、ヒトの疾病においては変異は同定されていない。今年度はこれに加えてやはり小脳の発生と関係する*WNT1*遺伝子の変異の有無についても検討した。

A. 研究目的

我々は、Dandy-Walker奇形、Joubert症候群、Cranio-Cerebello-Cardiac症候群等、小脳低形成を呈する先天性疾患群において候補遺伝子の検討を行った。ノックアウトマウスにおいて小脳低形成を生じることが証明されている*ZIC1*、*EN2*、*WNT1*遺伝子を候補遺伝子として変異の有無を検討した。

*ZIC1*遺伝子は小脳顆粒細胞系列に強く限局し小脳のパターンを決定するZn finger型転写因子である¹⁾。*Drosophila*の*odd-paired*遺伝子と相同な遺伝子としてクローニングされた。小脳外顆粒層に発現する。そのノックアウトマウスは異常行動、小脳の低形成、小脳小葉構造の異常を呈する²⁾。神経症状からJoubert症候群のモデルと考えられている³⁾。*ZIC1*についてはエクソン2-3に存在するDNA結合領域を中心に解析を行った。

Engrailed-2（以下*EN2*）は胎児期に中脳、小脳領域に発現し、中枢神経の発生に重要な転写因子のひとつである。2個のエクソンからなり、第2エクソンにはホメオボックスを持つ。ノックアウトマウスは生存可能であ

るが小脳組織の欠損、葉構造の異常等がみられる⁴⁾。しかし、*Zic1*ノックアウトマウス等と異なり、運動機能に大きな影響はない。昨年度の研究では両遺伝子についてスクリーニングを行ったが、有意な結果は得られなかった⁵⁾。

*WNT*遺伝子群はマウスの乳ガン細胞でmouse mammary tumor virusが染色体にintegrationされることにより活性化されるターゲット遺伝子（*int-1*）として同定された。ショウジョウバエの*wingless*遺伝子と相同な遺伝子であり、両者を合成して*WNT*と呼ばれるようになった。*WNT*は個体発生において重要な役割を持つが、*WNT1*は特に神経系の発生に重要である。*Wnt1*のノックアウトマウスは2グループで作成された^{6,7)}。ヘテロの状態では特に異常はなかったが、ホモ接合では死産や生後の運動失調を認めた。ノックアウトマウスは中脳の後部、中脳と後脳の境界部、後脳前部での欠失が見られる。他の神経系や神経系以外の部分には異常は認めなかった。ノックアウトマウスとは別に、*swaying* (*sw*) という自然発症のマウスがいる。このマウスでは失調、筋緊張増加があり、小脳前方の異常に加えて、その前後の中脳や

後部小脳にも異常が波及していた。このswマウスにおいて*Wnt1*遺伝子が1塩基欠失している⁸⁾。このため、早期ストップコドンが生じ、ノックアウトマウスと同様に*Wnt1*蛋白の機能が失われる。Pellegrinoらは、Joubert症候群における*WNT1*遺伝子変異を検索したが、異常は同定できなかった⁹⁾。本研究ではJoubert症候群以外にも対象疾病を広げ、*WNT1*遺伝子について、患者DNAを用いて変異の有無を検討した。

B. 研究方法

水頭症バンクに登録された、Dandy-Walker奇形、Joubert症候群、Cranio-Cerebello-Cardiac症候群、原因不明の小脳形成不全などの小脳の先天異常を呈する患者を対象にした。*ZIC1*、*EN2*については、昨年の方法と同様であり、数例の追加を行った⁵⁾。*WNT1*遺伝子についても末梢血リンパ球からDNAを抽出し、PCR法によってエクソン部分を増幅した。PCR産物を回収して塩基配列を決定した。ABI社のオートシーケンサーを用いた。PCR反応条件は、94℃2分加熱後94℃1分、57℃1分、72℃2分のサイクルを30回繰り返し、最後に72℃で10分延長反応させた。

PCR反応液をアガロースゲルで電気泳動し、目的のサイズのPCR産物を切り出して回収した。直接シーケンスで塩基配列を決定した。一部はサブクローニングを併用した。ABI社のオートシーケンサーを用いた。PCRに利用したprimerは下記に示す。これはPellegrinoらの方法に準拠したものである⁹⁾

WNT1-1F: 5'-AGCACAGAGCGGGCAAAGC
WNT1-1R: 5'-CGCGGAGGGAAGTCAGAGC
WNT1-2F: 5'-TGCCACAGTTTTTATGGT
WNT1-2R: 5'-CTGGGACACCTTCTCTGA
WNT1-3F: 5'-GAGTCGGGGGTGGGATTC
WNT1-3R: 5'-CTTCCCCAGCCCGAGGTT
WNT1-4F: 5'-CCCTGGGACACTCTTTCTTCC
WNT1-4R: 5'-AGAGATGGGATGCGTATGAAC

なお、検体採取の段階で患者家族にインフォームドコンセントを得、倫理面に十分配慮した。

C. 研究結果

ZIC1、*EN2*については14例について解析を終了したが、DNA結合領域、ホメオボックスに有意な変異は認めて

いない。*WNT1*はまだ全例解析できていないが、変異は同定されていない。今後も継続的に検討予定である。

D. 考察

小脳低形成を呈する疾患群には多くのものが知られているが、遺伝子レベルまで解明されたものは少ない。*Reelin*異常は小脳低形成だけでなく滑脳症を呈する^{10,11)}。*Hoyeraal-Hreidarsson*症候群は小脳低形成と再生不良性貧血、免疫不全、小頭症、成長障害を呈する多系統に異常を呈する常染色体性劣性遺伝性疾患で、先天性異角化症と同じく*DKC1*遺伝子の異常が原因である¹²⁾。*LICAM*異常による先天性水頭症も多くの場合小脳低形成を呈する。先天代謝異常症として、糖蛋白質の糖鎖の異常が原因であるCarbohydrate-Deficient-Glycoprotein症候群も小脳低形成を特徴とする。ただし、これらの疾病は小脳低形成以外にも多彩な異常を呈し、臨床的に鑑別可能である。*Zic1*、*En2*、*Wnt1*のノックアウトマウスは小脳は著しい低形成、葉構造異常を呈するが小脳以外には特別な異常は認めない。これらに相同なヒトの遺伝子異常による疾患があるとするややはり小脳低形成が主または唯一の臨床所見という可能性が高い。また、ノックアウトマウスのヘテロ接合体は異常所見を欠くため、常染色体性劣性遺伝性疾患であると考えられる。

Dandy-Walker奇形は小脳虫部の低形成がみられる。小脳失調症状や精神運動発達遅滞、他の奇形を合併する例や、小脳失調がめだたず発達も良好な例等、臨床的にはかなり幅広いものを含んでいる。*Zic1*ノックアウトマウスは神経症状が強く出現し、行動異常がみられる。Dandy-Walker奇形の子後良好例とは関連が少ないように思われる。*En2*ノックアウトマウスは神経症状が軽く、関連があるかも知れない。

Joubert症候群は小脳虫部低形成、眼底コロボーマ、生下時からの低緊張、新生児期の呼吸異常(多呼吸)、異常眼球運動を呈する疾患である。常染色体性劣性遺伝性であるが、責任遺伝子は不明である。*Wnt1*遺伝子のノックアウトマウスは小脳の低形成を生じる。Pellegrinoらは、この点に着目してJoubert症候群における*Wnt1*遺伝子変異を検索したが、異常は同定できなかった⁹⁾。Joubert症候群の一部は9q34.3に連鎖することが報告されているが、これは*WNT1*の座位とは異なり、遺伝的異質性が存在する。*Zic1*ノックアウトマウスは各種行動異常がみられることから、Joubert症候群のモデルとも考え

られる³⁾。しかし、今回の2例の解析では異常は同定できなかった。

Dandy-Walker奇形やJoubert症候群、その他の小脳形成不全の一部には*ZIC1*や*EN2*、*WNT1*遺伝子異常によるものも存在するとの仮説のもとに、さらに検討を続ける予定である。

F. 文献

- 1) Aruga J, Yokota N, Hashimoto M, Furuichi T, Fukuda M, Mikoshiba K. A novel zinc finger protein, Zic, is involved in neurogenesis, especially in the cell lineage of cerebellar granule cells. *J Neurochem* 63:1880-1890, 1994.
- 2) Aruga J, Minowa O, Yaginuma H, Kuno J, Nagai T, Noda T, Mikoshiba K. Mouse Zic1 is involved in cerebellar development. *J Neurosci* 18:284-93, 1998.
- 3) Ogura H, Aruga J, Mikoshiba K. Behavioral abnormalities of Zic1 and Zic2 mutant mice: implications as models for human neurological disorders. *Behav Genet* 31:317-24, 2001.
- 4) Joyner AL, Herrup K, Auerbach BA, Davis CA, Rossant J. Subtle cerebellar phenotype in mice homozygous for a targeted deletion of the En-2 homeobox. *Science* 251: 1239-1243, 1991.
- 5) 小脳形成異常症における*ZIC1*、*Engrailed-2*遺伝子異常の検索 岡本伸彦、金村米博、山崎麻美。難治性水頭症調査研究班。平成12年度研究報告書 p48-50. 2001.
- 6) Thomas, K. R.; Capecchi, M. R. Targeted disruption of the murine *int-1* proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature* 346: 847-850, 1990.
- 7) McMahon AP, Bradley A. The Wnt-1 (*int-1*) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 62:1073-85, 1990.
- 8) Thomas KR, Musci TS, Neumann PE, Capecchi MR. Swaying is a mutant allele of the proto-oncogene Wnt-1. *Cell* 67:969-76, 1991.
- 9) Pellegrino JE, Lensch MW, Muenke M, Chance PF. Clinical and molecular analysis in Joubert syndrome. *Am J Med Genet* 72: 59-62, 1997.
- 10) Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JO, Martin ND, Walsh CA. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human *RELN* mutations. *Nat Genet*. 26:93-6, 2000.
- 11) Ross ME, Swanson K, Dobyns WB. Lissencephaly with Cerebellar Hypoplasia (LCH): A Heterogeneous Group of Cortical Malformations. *Neuropediatrics* 32:256-63, 2001.
- 12) Knight SW, Heiss NS, Vulliamy TJ, Aalfs CM, McMahon C, Richmond P, Jones A, Hennekam RC, Poustka A, Mason PJ, Dokal I. Unexplained aplastic anaemia, immunodeficiency, and cerebellar hypoplasia (Hoyeraal-Hreidarsson syndrome) due to mutations in the dyskeratosis congenita gene, *DKC1*. *Br J Haematol* 107:335-9, 1999.

本邦におけるX-linked hydrocephalusおよびMASA症候群の LICAM遺伝子解析

—新規遺伝子異常17家系と遺伝型・臨床型の相関について—

国立大阪病院脳神経外科¹ 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²
大阪府立母子保健総合医療センター企画調査部³ 大阪市立総合医療センター 小児脳神経外科⁴
北海道立小児総合保健センター脳神経外科⁵ 愛知県心身障害者コロニー中央病院脳神経外科⁶
国立療養所香川小児病院脳神経外科⁷ 大阪府立母子保健総合医療センター脳神経外科⁸
静岡こども病院脳神経外科⁹ 兵庫医科大学脳神経外科¹⁰

山崎 麻美¹ 金村 米博² 岡本 伸彦³ 坂本 博昭⁴ 高橋 義男⁵ 長坂 昌登⁶
中川 義信⁷ 森本 一良⁸ 佐藤 博美⁹ 森 鑑二¹⁰ 有田 憲生¹⁰

研究要旨

今回本邦においても新規に同定された17家系のX-linked hydrocephalus (以下、XLH) およびMASA症候群のLICAM遺伝子異常を報告した。29家系について遺伝子解析を行い、17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58.6%であった。家族歴のあるものでは66.6%、家族歴のないものでは50%の検出率であった。LICAM遺伝子異常の部位を欧米からの報告と比較すると、ホットポイントがないことは同様であったが、非翻訳領域とIII群が相対的に多い傾向があった。脳室拡大・脳室壁の波状変化・母指の内転屈曲・脳梁の低形成・小脳虫部前葉の萎縮・四丘体の変形は、いずれも高頻度で認められた。今回本邦で始めて同定されたMASA症候群の遺伝子異常はI群に属し、脳室拡大とシャント後の脳室壁の波状変化は認めなかった。LICAMの細胞内領域は、水頭症の発症には関与しないことが示唆された。小脳虫部前葉の萎縮・四丘体の変形などの所見は、神経放射線学的診断価値の高いものと考えられた。

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) およびMASA症候群は、X連鎖性劣性遺伝性麻痺等とともに、細胞接着因子LICAM遺伝子異常による症候群すなわちCRASH症候群 (Corpus callosum hypoplasia, Retardation, Adducted thumbs, Spastic paraplegia and Hydrocephalus) と呼ばれている¹⁾。XLHは、先天性水頭症の中でも、極めて予後不良の水頭症である。今回、我々は欧米以外の国で初めてのLICAM遺伝子異常の大規模な遺伝子解析を行い、臨床病態を分析し遺伝型と表現型の相関について検討することを目的に

本研究を行なった。

B. 研究方法

平成11年に班会議で設立した水頭症遺伝子バンク²⁾に登録された153家系270検体の症例の中から、家族歴や臨床像よりXLHが疑われる家系15家系と以前から、岡本、山崎にL1遺伝子検索を依頼された14家系の計29家系を対象とした。LICAM遺伝子検索を施行する基準は、X連鎖性遺伝様式が疑われる(男児兄弟例も含む)場合と、孤発例であっても臨床的にXLHが疑われるものを対象とした。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。末梢血より

Genomic DNAを抽出したあと、L1CAM遺伝子のエクソン・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PCR法にて増幅し、ABI Big Dye™ 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ケンスにて行った。L1CAM遺伝子異常は、翻訳領域異常と非翻訳領域異常の2群に大別し、翻訳領域異常は、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分類を用いた⁴⁾。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。また、今回L1遺伝子異常の見いだされた症例におよびこれまでの報告例のなかで著者らのグループの報告例3家系4症例^{5,6,7)}を加えた中で、CTおよびMRIなどが入手できた症例の画像診断および臨床分析を行った。

C. 研究結果

①29家系について遺伝子検索を行いXLH16家系MASA症候群1家系の17家系(患者21人・保因者12人)にL1CAM遺伝子異常を同定した。(表1) ②検出率は58.6%であった。家族歴のあるものでは66.6%、家族歴のないものでは50%の検出率であった。③L1CAM遺伝子異常の部位は17家系の中の2家系のみ同一で、その他はすべて異なっていた。また1家系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⁸⁾。これまでの報告と同様に特徴的な遺伝子異常部位は存在しなかった。④16種類の異常の内訳は、翻訳領域が9種類(I群;1種類、II群;2種類、III群;6種類)、非翻訳領域は7種類で、欧米からの報告⁹⁾と比較すると非翻訳領域とIII群が相対的に多い傾向があった。⑤25症例のCTと16症例のMRIを検討した。拇指の内転屈曲は20例中18例(90%)に、脳梁の低形成は15例中15例(100%)に、小脳虫部前葉の萎縮は15例中10例(66.6%)・四丘体の変形は15例中12例(80%)で、すべての群のL1遺伝子異常で観察された。⑥脳室拡大とシャント後の脳室壁の波状変化は25例中24例(96%)と、I群の1例以外のすべてにおいて認められた。

D. 考察

1) 本邦XLH症例におけるL1CAM異常の分子遺伝学的特徴

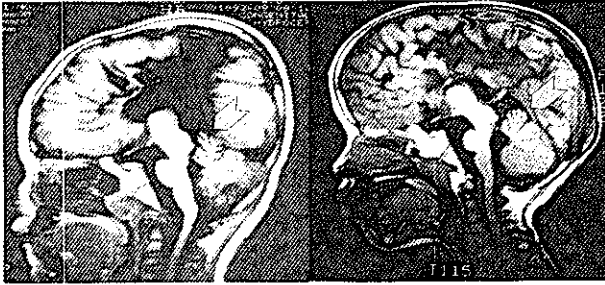
今回欧米以外の国では初めてのnation-wideなL1遺伝子解析を行った意義は大きい。本邦でも、これまでの諸外国からの報告と同様、L1CAM遺伝子異常部位はすべて別部位で、ホットポイントは存在しなかった。このことは人種差を越えたXLH家系におけるL1CAM遺伝子異常の1つの大きな特徴と考えられる⁸⁾。日本のXLH症例におけるL1CAM遺伝子異常は、海外症例に比べ相対的に翻訳領域の異常が占める割合が低く、かつI群、II群の割合が低く、逆にIII群やまたはこれら異常と同様に断裂したL1タンパクの発現をおこす可能性がある非翻訳領域のスプライス部位異常の割合が高い傾向があることは、昨年度の報告¹⁰⁾の中で明らかにした。今回症例

表1

L1CAM mutations in JAPAN

	exon/Intron	Domain	cDNA change	Consequence	Type	origin
A	Intron 2		92-1 g->a		splice site	Hokkaido CH
B	Intron 3		197+1 g->a		splice site	Hiroshima red cross
C	Intron 4		400+1 g->a		splice site	Osaka MC
D	Exon 5			1bp deletion	FS	Osaka city general
E	Intron 6		694+5 G->A		Intron	Nagoya city u
F	exon 8	Ig3	C870->A	Y290X	nonsense	Toranomon
G	exon 8	Ig3	C870->A	Y290X	nonsense	Kagawa CH
H	Intron 13		1704-1 g->a		splice site	Tokushima u
I	Intron 14		1829-12 de19bp		Intron	Hokkaido CH
J	exon 16	FN1	G2065->T	V689F	missense	Osaka National H
K	Exon 18	FN2	G2274->A	G758G	silent	Osaka city general H
L	Intron 18		2431+1 del gt		splice site	Osaka National H
M	exon 20	FN3	A2577->T	K860X	nonsense	Shizuoka CH
N	Exon 21	FN4	T2858->G	L953R	missense	Osaka city general
O	exon 22	FN4	G3022->T	E1008X	nonsense	Hirosaki U
P	Intron 22		3047-1 g->a		splice site	Osaka MC
Q	exon 26-7	CYTOPLASMIC	C3496->T	A1164X	nonsense	Kiyose CH

Atrophy of anterior vermis



数の増加があったが、その傾向には変化はなかった。

2) 臨床型と遺伝型の相関

Ⅲ群は、Ⅱ群やⅠ群と比較して臨床的に重症であることはすでに報告してきた。今回本邦で初めての水頭症を伴わないMASA症候群の家系にL1CAM異常を同定した。この症例の遺伝子異常は細胞内領域のⅠ群に属するものである。この症例では、脳室拡大はなくIQも軽度発達遅滞域で、Ⅲ群やⅡ群のXLHが換算不能の重度の発達遅滞を示したのと比較して、臨床的には軽症であった。このことはこれまでの我々が報告してきたことと一致する¹¹⁾。

3) 本邦XLH症例におけるL1CAM遺伝子異常の同定率

今回、私達のグループで新たに行ったL1CAM遺伝子解析における遺伝子異常発見率は先天性水頭症患者発生の家族歴のない場合は50%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場合は、66.6%で全体で58.6%であった。昨年度の報告よりさらに同定率は高くなっておりXLHの臨床所見や神経放射線学的診断が、孤発例でもかなり正確に診断できるようになったと考えられる。しかしながら翻せば男児水頭症の家族歴がある症例の約3分の2にL1CAM遺伝子異常が見つかるということより、男児水頭症の家族歴がある場合は必ずL1CAM遺伝子検索を行なうべきであると考えられた。

4) 臨床的表現型とL1の機能解析

拇指の内転屈曲・脳梁の低形成などは、すべての群のL1遺伝子異常でみられ、脳室拡大とシャント後の脳室壁の波状変化は、Ⅰ群では見られずそれ以外のすべての症例において認められた。神経の突起伸展に関するL1CAMの機能には、細胞内領域も関与するが、水頭症の原因になるような神経接着の機能には、細胞内領域は関与しないのではないかという従来主張をうらみずける結果であった^{11,12)}。また、我々は小脳虫部前葉の萎縮(図1)と四丘体の変形がこのXLHの神経放射線

学的特徴であることを主張してきた¹³⁾が、今回の分析でこれらの所見はそれぞれ15例中10例(66.6%)・15例中12例(80%)と高頻度に見られたことは特記すべきである。またL1CAMノックアウトマウスでも同様の所見がみられた¹⁴⁾ことを考え合わせても、L1CAMの機能異常によるものと考えられる。

E. 結論

今回の研究で、男児先天性水頭症の中でのXLHの頻度は、予想したよりも高く、かつ本邦の症例は重症例が多いことなどが明らかになり、男児水頭症の家族歴のある家系や臨床的にXLHが疑われる症例ではL1遺伝子検索を行うべきだと考えられた。

文献

- 1) Rosenthal A, Jouet M, Kenwick S: Aberrant splicing of neural cell adhesion molecule L1 mRNA in a family with X-linked hydrocephalus. *Nature Genet* 2:107-112, 1992
- 2) Fransen et al. (1995) CRASH syndrome: clinical spectrum of corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraparesis and hydrocephalus due to mutations in one single gene, L1. *Eur. J. Hum. Genet.* 3:273-284.
- 3) 山崎麻美、金村米博、森鑑二、有田憲生: 水頭症バンク設立の経過と遺伝子解析. 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, pp43-56.
- 4) Yamasaki M, Thompson P, Lemmon V: CRASH Syndrome: mutations in L1CAM correlate with severity of the disease. *Neuropediatrics* 28 175-178, 1997
- 5) Izumoto S, Yamasaki M, Arita N, Hiraga S, Ohnishi T, Fujitani K, Sakoda S, Hayakawa T: A new mutation of the L1CAM gene in an X-linked hydrocephalus family. *Child's Nerv Syst* 12:742-747, 1996
- 6) Okamoto N, Wada Y, Goto M: Hydrocephalus and Hirschprung's disease in a patient with a mutation of L1CAM. *J Med Genet* 43: 670-671, 1997
- 7) Okamoto N, Wada Y, Kawabata H, Ishikiriyama S, Takahashi S: A clinical and molecular study on X-linked hydrocephalus. *Jpn J Hum Genet* 41: 431-437, 1996
- 8) Van Camp G, Fransen E, Vits L, Raes G, Willems PJ: A locus-specific mutation database for the neural cell adhesion molecule L1CAM(Xq28). *Hum Mutation* 8:391, 1996h

- 9) Finckh U, Schroder J, Ressler B, Veske A, Gal A: Spectrum and detection rate of L1CAM mutations in isolated and familial cases with clinically suspected L1-disease. *Am J Med Genet* 92: 40-46, 2000
- 10) 金村米博、岡本伸彦、森本一良、森鑑三、高橋義男、藤田浩史、横谷進、佐藤博美、松田純子、西美和、有田憲生、山崎麻美 X-linked hydrocephalus における L1CAM 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 — 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, pp33-39.
- 11) Kamiguchi H, Hlavin ML, Yamasaki M, Lemmon V: Adhesion molecules and inherited disease of the human nervous system. *Annu Rev Neurosci* 21:97-125, 1998
- 12) Kamiguchi H, Hlavin ML, Lemmon V: Role of L1 in neural development: what the knockouts tell us. *Mol Cell Neurosci* 12: 48-55, 1998
- 13) Yamasaki M, Arita N, Hiraga S, Izumoto S, Morimoto K, Nakatani S, Fujitani K, Sato N and Hayakawa T: A clinical and neuroradiological study of X-linked hydrocephalus in Japan. *J Neurosurg* 83: 50-55, 1995
- 14) Fransen E, D'Hooge R, Van Camp G, Verhoye M, Sijbers J, Reyniers E, Soriano P, Kamiguchi H, Willemsen R, Koekkoek SKE, De Zeeuw CI, De Deyn PP, Van der Linden A, Lemmon V, Kooy RF, Willems PJ: L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns. *Hum Mol Genet* 7:999-1009, 1998

研究成果の刊行に関する一覧

著者名	題名	書名(編集者名)	発行者名 (発行地名)	巻：頁 西暦年号
<u>有田 憲生</u>	下垂体腺腫	今日の治療指針2001年版 —私はこう治療している (多賀須幸男, 尾形悦郎, 山口 徹, 北原光夫 編)	医学書院(東京)	231-232, 2001
横田 正幸 藤川 浩一 山浦 生也 中野 敦久 林 宏 尾崎 功 蒲 忠蔵 <u>有田 憲生</u>	塩酸ニカルジピンのくも膜下出血後脳血管攣縮に対する治療効果	脳血管攣縮16 (安井信之編)	中外医学社	341-344, 2001
<u>有田 憲生</u> <u>池本 秀康</u>	下垂体腫瘍の診断・治療	日本脳事新報		4027, 18-26, 2001
Otsuki, M. Kasayama, S. Yamamoto, H. Saito, H. Sumitani, S. Kouhara, H. Saitoh, Y. Ohnishi, T. Arita, N.	Characterization of premature atherosclerosis of carotid arteries in acromegalic patients.	Clin. Endocrinol		54, 791-796, 2001
中野 敦久 池本 秀康 蒲 忠蔵 横田 正幸 <u>有田 憲生</u>	Picture in picture機能を備えた手術用顕微鏡使用の工夫	日本脳神経外科ビデオジャーナル		91(3): 2001
池本 秀康 長本 強 蒲 忠蔵 横田 正幸 山浦 生也 中野 敦久 尾崎 功 林 宏 <u>有田 憲生</u>	トルコ鞍部病変に対する顕微鏡下手術支援内視鏡の有用性	Advanced Technologyを用いた脳腫瘍の外科 (嘉山孝正 編)	メディカ出版 (東京)	242-248, 2001
森 鑑二 金村 米博 山崎 麻美 <u>有田 憲生</u>	神経管閉鎖不全症における癌抑制遺伝子p53の変異検索	厚生化学研究費補助金 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		51-56, 2001
<u>Inagaki T.</u> <u>Yamada A.</u> <u>Kato T.</u> <u>Yasuda T.</u> <u>Yamanouchi Y.</u> <u>Kawamoto K.</u>	The Management of Syringomyelia without Chiari Malformation	12th World Congress of Neurosurgery (McCulloch, Reilly, eds)		296-297, 2001
稲垣 隆介 山内 康雄 河本 圭司 神崎 秀陽	胎児診断における超音波診断装置の役割について—特にわれわれの施設での周産期カンファレンスを中心に—	Neurosonology		14: 6-9, 2001