

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業

先天性水頭症に関する調査研究：  
分子遺伝子学アプローチによる診断基準・  
治療指針の策定と予防法・治療法の開発

## 平成15年度総括・分担研究報告書

平成 16 年 3 月

主任研究者 山 崎 麻 美

## 難治性水頭症調査研究班 構成員名簿

区 分	氏 名	所 属 施 設	職 名
主 任 研 究 者	山 崎 麻 美	国立病院大阪医療センター 臨床研究部・脳神経外科	室長(医長)
分 担 研 究 者	岡 野 栄 之	慶應義塾大学医学部生理学教室	教 授
	岡 本 伸 彦	大阪府立母子保健総合医療センター 企画調査部	参 事
	金 村 米 博	独立行政法人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	研 究 員
	上 口 裕 之	理化学研究所 脳科学総合研究センター 神経成長機構研究チーム	チ-ムリ-ダー
	坂 本 博 昭	大阪市立総合医療センター 小児脳神経外科	部 長
	佐 藤 博 美	静岡県立こども病院 脳神経外科	医 長
	白 根 礼 造	東北大学大学院医学系研究科 神経外科学	助 教 授
	鈴 森 薫	名古屋市立大学医学部医学研究科 生殖・発生医学講座	教 授
	中 川 義 信	国立療養所香川小児病院 脳神経外科	院 長
	秦 利 之	香川大学医学部 母子科学講座周産期学婦人科学	教 授
	伏 木 信 次	京都府立医科大学大学院医学研究科 分子病態病理学	教 授
	本 山 昇	国立長寿医療センター研究所 老年病研究部	室 長
	森 竹 浩 三	島根大学医学部 脳神経外科	教 授
	師 田 信 人	国立成育医療センター 脳神経外科	医 長
吉 峰 俊 樹	大阪大学大学院医学系研究科 神経機能制御外科学	教 授	
研 究 協 力 者	稲 垣 隆 介	関西医科大学 脳神経外科	講 師
	宇都宮 英 綱	福岡大学医学部 放射線科	助 教 授
	佐 藤 孝 道	聖路加国際病院産婦人科・生殖医療センター	部 長
	高 橋 義 男	北海道立小児総合保健センター 脳神経外科	医 長
	伊 達 裕 昭	千葉県こども病院 脳神経外科	診 療 部 長
	富 和 清 隆	大阪市立総合医療センター 小児神経内科	部 長
	中 村 康 寛	聖マリア病院 病理部	部 長
	長 坂 昌 登	愛知県心身障害者コロニー中央病院 脳神経外科	手 術 部 長
	林 隆 士	聖マリア病院 脳神経外科	副 院 長
	原 嘉 信	神経発生研究所	研 究 所 長
	夫 律 子	国立療養所香川小児病院 総合周産期母子医療センター 産婦人科	医 長
	中 西 範 幸	大阪大学大学院医学系研究科社会環境医学(公衆衛生学)	助 教 授
事 務 局 経理事務連絡担当責任者	桒 中 正 博 奥 田 小 百 合	独立行政法人 国立病院機構 大阪医療センター 脳神経外科 臨床研究部 〒540-0006 大阪市中央区法円坂2-1-14 TEL(06)6942-1331(3321) FAX(06)6943-3437	医 員

# 目 次

## I. 総括研究報告

平成15年度総括研究報告 .....	1
国立病院大阪医療センター 臨床研究部・脳神経外科 主任研究者 山崎 麻美	

## II. 分担研究報告

### 基礎・病理・遺伝子部門臨床部門

1. RNA結合蛋白質Musashiによる先天性水頭症発症の分子生物学的なメカニズムの解明 .....	5
慶應義塾大学医学部生理学教室 岡野 栄之	
2. DNA polymerase $\lambda$ 遺伝子の近位の新規未知遺伝子の同定 .....	7
—水頭症との関連— 国立長寿医療センター老年病研究部 <sup>1</sup> 、国立病院大阪医療センター 臨床研究部・脳神経外科 <sup>2</sup> 小林 洋介 <sup>1</sup> 、山崎 麻美 <sup>2</sup> 、本山 昇 <sup>1</sup>	
3. Purkinje cellの新しいマーカーとしてのKIAA0864 proteinについて .....	10
聖マリア病院病理部 <sup>1</sup> 、久留米大学医学部化学 <sup>2</sup> 、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 <sup>3</sup> 、国立成育医療センター研究所 生殖医療研究部生殖細胞機能研究室 <sup>4</sup> 、熊本大学生命資源研究・支援センター 動物資源開発研究部門技術開発分野 <sup>5</sup> 、国立病院大阪医療センター 臨床研究部・脳神経外科 <sup>6</sup> 、慶應義塾大学医学部生理学教室 <sup>7</sup> 中村 康寛 <sup>1</sup> 、山本 統彦 <sup>2</sup> 、小田えり子 <sup>2</sup> 、金村 米博 <sup>3</sup> 、山本 英幸 <sup>3</sup> 宮戸 健二 <sup>4</sup> 、鈴木 操 <sup>5</sup> 、山田 源 <sup>5</sup> 、山崎 麻美 <sup>6</sup> 、岡野 栄之 <sup>7</sup>	
4. L1CAM遺伝子改変マウスにおける末梢神経系発達異常に関する研究 .....	13
京都府立医科大学大学院医学研究科 分子病態病理学 伊東 恭子、矢追 毅、山中 巧、伏木 信次	
5. 神経接着因子L1CAM遺伝子異常を有するヒト神経幹細胞/前駆細胞の生物学的特性の解析 .....	16
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 <sup>1</sup> 、名古屋市立大学大学院医学研究科 生殖・遺伝医学講座 生殖・発生医学分野 <sup>2</sup> 、理化学研究所・脳科学総合研究センター <sup>3</sup> 、慶應義塾大学医学部・生理学教室 <sup>4</sup> 、国立病院大阪医療センター 臨床研究部 <sup>5</sup> ・脳神経外科 <sup>6</sup> 金村 米博 <sup>1,5</sup> 、正札 智子 <sup>1</sup> 、森 英樹 <sup>1</sup> 、種村 光代 <sup>2</sup> 、上口 裕之 <sup>3</sup> 岡野 栄之 <sup>4</sup> 、鈴森 薫 <sup>2</sup> 、山崎 麻美 <sup>5,6</sup>	

6. 神経接着分子L1の細胞内局在を制御する軸索起始部拡散障壁……………	19
理化学研究所 脳科学総合研究センター 神経成長機構研究チーム <sup>1</sup> 東京工業大学 生命理工学研究科 <sup>2</sup> 上口 裕之 <sup>1</sup> 、西村 一成 <sup>1</sup> 、駒田 雅之 <sup>2</sup>	
7. 脳梁欠損症のMR tractography：Probst bundleの解析を中心に……………	22
福岡大学医学部放射線科 <sup>1</sup> 、帝京大学医学部放射線科 <sup>2</sup> 、兵庫医科大学放射線科 <sup>3</sup> 宇都宮英綱 <sup>1</sup> 、大場 洋 <sup>2</sup> 、安藤久美子 <sup>3</sup> 、黒岩 大三 <sup>1</sup> 、高野 浩一 <sup>1</sup>	
8. 高周波細径プローブを用いた子宮腔内超音波法による胎芽頭部脳室間孔および中脳水道計測…	25
香川大学医学部母子科学講座周産期学婦人科学 田中 宏和、金西 賢治、秦 利之	
9. LICAM異常によるX-linked hydrocephalusとヒルシュスプルング病……………	28
大阪府立母子保健総合医療センター企画調査部 <sup>1</sup> 、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 <sup>2</sup> 、国立病院大阪医療センター 臨床研究部・脳神経外科 <sup>3</sup> 岡本 伸彦 <sup>1</sup> 、金村 米博 <sup>2</sup> 、山崎 麻美 <sup>3</sup>	

## 臨床部門

### ■ 先天性水頭症プロトコール作製にむけて part 1 総論・倫理・支援

1. 先天性水頭症における脳室拡大の程度が転帰に及ぼす影響……………	33
ー2000年全国疫学調査結果からー 島根大学医学部脳神経外科 <sup>1</sup> 、国立病院大阪医療センター 臨床研究部・脳神経外科 <sup>2</sup> 宮崎 健史 <sup>1</sup> 、森竹 浩三 <sup>1</sup> 、永井 秀政 <sup>1</sup> 、上村 岳士 <sup>1</sup> 、長廻 紀子 <sup>1</sup> 、 赤水真希子 <sup>1</sup> 、朝山 玲子 <sup>1</sup> 、山崎 麻美 <sup>2</sup>	
2. 先天性水頭症と奇形症候群：脳の発達についての検討……………	37
大阪大学大学院医学系研究科 神経機能制御外科学 香川 尚己、丸野 元彦、吉峰 俊樹	
3. 18才以上になった水頭症患者の転帰からみた小児水頭症の急性期から慢性期治療のありかた…	39
北海道立小児総合保健センター 小児脳神経外科 高橋 義男	
4. 先天性水頭症の患者および家族への包括的支援に関する研究……………	43
ーアンケート調査からー 大阪市立総合医療センター 小児神経内科 <sup>1</sup> 、産科保健相談室 <sup>2</sup> 富和 清隆 <sup>1</sup> 、渡辺 通子 <sup>2</sup>	
5. 出生前診断のガイドラインとその問題点……………	47
聖路加国際病院 産婦人科 齊藤 理恵、佐藤 孝道	

6. 胎児頭部形態異常の出生前診断と周産期管理	50
名古屋市立大学大学院医学研究科生殖発生医学分野 鈴森 薫、種村 光代	
7. 超音波胎児脳計測の基準値について	52
香川大学医学部母子科学講座周産期学婦人科学 金西 賢治、秦 利之	
8. 胎児中枢神経系異常の診断機構の構築に向けて	57
—わかりやすいシェーマの作成— 国立療養所香川小児病院 総合周産期母子医療センター 産婦人科 <sup>1</sup> 、同脳神経外科 <sup>2</sup> 夫 律子 <sup>1</sup> 、夫 敬憲 <sup>2</sup> 、中川 義信 <sup>2</sup>	
<b>■ 先天性水頭症プロトコール作製にむけて part2 各論</b>	
1. 先天性水頭症の治療指針：出生前診断された脊髄髄膜瘤に伴う水頭症の 治療指針作成に向けて	61
大阪市立総合医療センター 小児脳神経外科 坂本 博昭、北野 昌平、森川 俊江、吉村 政樹	
2. Dandy-Walker 症候群の診断と治療ガイドライン作成に向けて	66
静岡県立こども病院脳神経外科 佐藤 博美、佐藤 倫子	
3. 出生前診断されたくも膜嚢胞の診断・治療指針に向けて	70
千葉県こども病院 脳神経外科 伊達 裕昭	
4. 胎児頭蓋内出血後水頭症について	73
国立成育医療センター 脳神経外科 <sup>1</sup> 、胎児診療科 <sup>2</sup> 、特殊診療部 <sup>3</sup> 師田 信人 <sup>1</sup> 、平本 準 <sup>1</sup> 、三島 牧 <sup>1</sup> 、左合 治彦 <sup>2</sup> 、林 聡 <sup>2</sup> 、 千葉 敏雄 <sup>3</sup>	
5. 胎児期水頭症ガイドライン作成にむけて（脳腫瘍）	77
東北大学大学院医学系研究科 神経外科学 白根 礼造、日下 康子	
6. 本邦における頭蓋縫合早期癒合症に伴う水頭症の実態調査	79
愛知県心身障害者コロニー中央病院 脳神経外科 長坂 昌登	
7. 水無脳症 (Hydranencephaly) の実態調査から—診断指針の作成に向けて	83
関西医科大学 脳神経外科 稲垣 隆介、山内 康雄、河本 圭司	

8. ガレン大静脈瘤および先天性硬膜動静脈瘻の出生前診断例の治療指針に向けて……………	85
大阪市立総合医療センター 小児脳神経外科、脳神経外科	
北野 昌平、坂本 博昭、森川 俊枝、吉村 政樹、小宮山雅樹	
9. 先天性水頭症「単純性水頭症」の診断・治療のガイドライン作成に向けて……………	90
国立病院大阪医療センター 脳神経外科	
梶中 正博、山崎 麻美	

## 資料

第1回報告会プログラム……………	95
第2回報告会プログラム……………	98
研究成果の刊行に関する一覧表……………	103

# 先天性水頭症に関する調査研究；分子遺伝子学的アプローチによる診断基準・治療指針の策定と予防法・治療法の開発

主任研究者 山崎麻美

## A. 研究目的

先天性水頭症は、種々の原因による症候群というに相応しく、合併する病態により転帰は様々である。その、診断基準・治療指針は確固としたものが存在しない。平成11年度からの水頭症研究班において、分子遺伝子学的アプローチを取り入れることによって水頭症研究に新たな展開をもたらしてきた。予後不良因子である遺伝的素因の探索あるいは母親への葉酸投与による神経管閉鎖不全症の予防効果の検証、また遺伝子欠損動物を用いた水頭症の分子遺伝子学的病態を明らかにしてきた。これらの知見をもとに、さらに整理して診断基準の作製と治療指針の策定と水頭症の画期的な治療法の開発することが目的である。

## B. 研究方法

- (ア) 診断基準の作製；特定疾患の疫学に関する研究班と共同で実施した先天性水頭症第3次全国疫学調査の分析、これまでの多施設共同研究で実施した臨床データ（中脳水道狭窄症、ダンディウォーカー症候群、全前脳胞症、脊髄髄膜瘤、脳瘤）に、対象を胎児期脳腫瘍、胎児期血管障害・水無脳症、頭蓋縫合早期癒合症、胎児期頭蓋内出血に拡大し実施した再調査の分析、これまでの文献報告例の評価を行い、画像診断・遺伝子解析の結果も加えて診断基準の作成を行う。また産科医を中心に胎児診断コンサルテーション機構を立ち上げる。
- (イ) 治療指針の策定；分析されたデータをもとに胎児性水頭症の治療指針を策定する。

- (ウ) 遺伝子バンクにおける遺伝子解析；水頭症原因遺伝子検索をおこなう。単純性水頭症(L1)脊髄髄膜瘤(*MTHFR*, *ZIC2*, *PLL1*)全前脳胞症(*ZIC2*, *SHH*)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(*ZIC1*, *Engrailed2*, *WNT1*)頭蓋骨早期癒合症(*FGFR*)、L1遺伝子異常と同様の臨床像を呈するもL1遺伝子異常を認めない家系についてL1の局在に関与する分子アンキリンGと $\beta$ -IVスペクトリンについての解析を進める。
- (エ) 水頭症の画期的な治療法の開発に向けた基礎研究；神経接着分子L1CAM、RNA結合蛋白質Musashi、Nonmuscle myosin heavy chain-B(NMHC-B)、DNA polymerase $\lambda$  ( $\beta$ -2)の遺伝子欠損マウスを解析し、神経幹細胞を用いた難治性水頭症の遺伝子治療への方向を模索する。

### 倫理面への配慮

この研究には、多施設からの患者DNAを中心とした生体資料を集積するバンクを形成すること・遺伝子解析を行うことなどいくつかの倫理的配慮を要する点が含まれている。前回の倫理委員会承認後、平成13年3月29日の文部科学省・厚生労働省・経済産業省より施行された【ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針】を遵守し、平成14年4月6日国立大阪病院医学倫理委員会に「先天性水頭症の分子生物学的メカニズム解明と治療法開発」研究における倫理審査を申請し、平成15年1月7日承認された。

## C. 研究結果及び考察

- ① 診断基準の作製；診断基準と治療指針策定；小児脳神経外科・産科・臨床遺伝・小児神経内科・神経放射

線科・疫学の専門家よりなるプロジェクトチームを結成した。単純性水頭症（塾中正博、山崎麻美）、ダンディウォーカー症候群（佐藤倫子・佐藤博美）、全前脳胞症（夫敬憲・中川義信）、脊髄髄膜瘤（坂本博昭）、二分頭蓋（下川尚子・林隆士）、胎児期脳腫瘍（白根礼造）、胎児期くも膜嚢腫（伊達裕昭）、頭蓋縫合早期癒合症（長坂昌登）、胎児期頭蓋内出血（師田信人）、水無脳症（稲垣隆介）、胎児期血管障害（北野昌平）と各疾患の担当者を決め、文献的考察および方視的調査結果を集積・分析し、胎児期水頭症の診断基準と治療指針の作成を開始した。宮崎健史、森竹浩三らは2000年全国疫学調査の374例の結果から脳室拡大の程度が転帰に及ぼす影響について考察した。また金西賢治、秦利之らは、超音波胎児脳計測の基準値について検討を加え指標を提示した。また夫律子らは胎児中枢神経系異常の診断機構の構築に向けてわかりやすいシエマの作成を提唱した。高橋義男らは、自験例141例の18歳を越えた小児水頭症の患者の転帰を分析した。また種村光代・鈴木薫、香川尚己・吉峰俊樹らはそれぞれ自験例の胎児水頭症の解析を行った。また、富和清隆・渡辺通子らは58例の先天性水頭症患者・家族に対するアンケート調査により診断告知、遺伝相談、療育や教育に対する満足度など包括的支援に関する研究を行った。また齊藤理恵・佐藤孝道らは水頭症の出生前診断のガイドライン作成にあたっての倫理的問題点についての考察を行った。今回臨床疫学の専門家である大阪大学公衆衛生学中西範幸の参加を得て、ガイドライン作成の問題点を抽出し、まとめの段階の準備が整ってきた。

- ② 水頭症の基礎的研究においても目覚ましい進歩が見られている。上口裕之は神経接着分子L1CAMの軸索起始部での拡散を制御する分子メカニズムを解明した。軸索起始部に集積する $\beta$ IVスペクトリンあるいはアンキリンGに注目し、特に $\beta$ IVスペクトリンが軸索起始部での分子拡散障壁を構成することを見出した。現在L1の神経細胞内局在異常に起因すると考えられた先天性水頭症の1家系についてその $\beta$ IVスペクトリンおよびアンキリンG遺伝子異常の有無について検索する準備を開始している。また岡野栄之らはRNA結合蛋白質Musashiの水頭症発症機序の解明を行い、msi1はmNumbを、msi2はpleiotrophinを標的としていることを明らかにした。小林洋介、本山昇らはDNA

polymerase  $\lambda$ の上流に水頭症発症に関与する新規遺伝子DKFZP566F08を同定した。またL1遺伝子異常の見出されなかった家族性水頭症および先天性中脳水道狭窄症37人についてこの新規遺伝子異常の解析を行った。伊藤恭子・伏木信次らは、L1の6番目のIgドメインのみを欠如した改変マウスを作成し末梢神経の発達異常について解析した。岡本伸彦らはX連鎖性遺伝性水頭症とヒルシュスプルング氏病を合併した3家系（スペイン人・カナダ人・日本人）4例にL1遺伝子異常を同定した。金村米博らはX連鎖性遺伝性水頭症の神経機能の修復・再生を目指すための基礎研究として、L1CAM遺伝子異常を有する症例の病理解剖標本より樹立されたヒト神経幹細胞/前駆細胞を用いて、その分子生物学的特徴を解析し、増殖能の異常を見出した。また宇都宮英綱はMR tractographyにより、脳梁欠損症に見られる特異的白質線維束であるProbst bundleを解析し、その発生学および形態学的意義について検討した。また田中宏和・秦利之は高周波細径プローブによる子宮内腔超音波法により胎芽頭部脳室間孔および中脳水道の詳細な計測を行い胎児（芽）超早期の脳脊髄液交通路について検討した。中村康寛らは、昨年度開発した小脳のプルキンエ細胞の発育マーカーとして有効であるHFB16抗体がKIAA0864proteinを認識している事を明らかにし、機能解析のためにそのトランスジェニックマウスを作製している。

### ③ 遺伝子バンクの進行状況

これまでに全国約40施設より450検体を集積している。遺伝子解析をすすめ、新規のL1遺伝子異常を30家系以上で見だし、わが国でのL1遺伝子異常の特徴、遺伝型と表現型の相関関係、放射線学的特徴について検討した。また約10家系の頭蓋骨早期癒合症においてFGFR II遺伝子異常を同定した。

## D. 結論

水頭症研究における分子遺伝学的アプローチは、水頭症研究に新たな展開に必須であり、水頭症の発症機序の解明・病態把握・診断精度への貢献・発症リスクなどを明らかにする方向で様々な成果を挙げてきている。これまでの資料を蓄積し、第2期の最終年度はさらに胎児期水頭症の診断基準と治療指針のガイドライン策定に向けた具体的なまとめの作業に入っていく予定である。さらにこの手法を突き進めていけば、適切な治療でも予後

の向上が望めない遺伝的難治性水頭症については、遺伝カウンセリングを含めた適切な情報提供を行えると共に、将来的には遺伝子診断・治療をも可能にするものと考えられる。このような研究が進展することは重度水頭症児の家族・患者・治療者に大きな光明となる。

## RNA結合蛋白質Musashiによる先天性水頭症発症の 分子生物学的なメカニズムの解明

慶應義塾大学医学部生理学教室

岡野 栄之

### 研究要旨

哺乳類のMusashi (Msi) ファミリー蛋白質は、1996年に神経幹細胞に強い発現のみられるRNA結合蛋白質として同定された。現在までにMusashi1 (Msi1) および高い相同性を持つMusashi2 (Msi2) の解析により、Msiファミリー蛋白質のそれぞれの機能と水頭症発症メカニズムとの相関が明らかになってきた。マウスにて *msi1* 遺伝子を欠損させたところ、先天性の閉塞性水頭症を発症して生後2ヶ月以内に死亡することが分かった。また *msi1* および *msi2* 遺伝子の二重欠損マウスを作成したところ、先天性水頭症の原因となる異常が促進され、より高率に、より早期にみられることが明らかになった。本研究では、哺乳類Msiファミリー蛋白質の *in vitro* および *in vivo* における機能を解析し、先天性水頭症の発症機序を分子生物学的に解明して、治療法を確立することを目指している。

### A. 研究目的

哺乳類Msiファミリー蛋白質の中樞神経系での機能を分子生物学的に解析することにより、先天性水頭症モデル動物である *msi* 遺伝子欠損マウスにおける先天性水頭症の発症メカニズムを明らかにし、有効な先天性水頭症の治療法の開発に寄与することを目的としている。

### B. 研究方法

先天性水頭症を発症する *msi1* 遺伝子欠損マウスの病態を詳細に解析した。また、Msi1と類似した構造のMsi2の機能を解明するために、*msi2* 遺伝子欠損マウスの形態異常を解析した。更に、それぞれの遺伝子欠損マウスの交配により *msi1* および *msi2* 遺伝子の二重欠損マウスを作成し、その表現型の解析を行った。

具体的には、それぞれの遺伝子欠損マウスの発生各段階の形態異常を調べるために、組織切片を作成し免疫組織化学および電子顕微鏡検査を行った。また、分子生物

学的手法を用いた結合するRNAについての解析、培養細胞や神経幹細胞を用いた解析によって機能的な側面からの分析を行った。

### C. 研究結果

(1) 先天性水頭症を発症して生後2ヶ月以内に9割のマウスが死亡する *msi1* 遺伝子欠損マウスの詳細な組織学的解析を行ったところ、脳室周囲に局在する神経幹細胞・神経前駆細胞の分化・増殖の制御異常による閉塞性水頭症であることが明らかとなった。*msi1* 遺伝子欠損マウスにみられる閉塞性水頭症の病因の一つは、脳室壁からポリープ様の構造物が発生することによる中脳水道の閉塞である。

(2) 生後数時間で死亡する *msi1* および *msi2* 遺伝子の二重欠損マウスは、*msi1* 遺伝子単独欠損マウスに比べてより高頻度で、より早期に、より大きなポリープ様構造物が発生する。先天性水頭症は重症化することが予想されたが、発症前に死亡するため水頭症の発症は確認できな

かった。このポリープ様の構造物は、Nestinなどの未分化細胞マーカーが陰性であり、PCNAやBrdUの分裂細胞マーカーが部分的に陽性であり、分化した神経細胞マーカーであるTuJ1やHuが陽性であるため、神経細胞へ分化した細胞塊の無秩序な増殖が病因と考えられる。

(3) *msi2*遺伝子欠損マウスは、野生型と同程度の寿命を持ち、先天性水頭症を発症しないため、Msi2単独での水頭症への関与は薄いことが分かった。

(4) RNA結合蛋白質であるMsi1は、その標的であるmNumbのmRNAの3'非翻訳領域に結合し、その発現を転写後レベルで調節していることが明らかになった。

(5) RNA結合蛋白質であるMsi2は、PleiotrophinのmRNAの3'非翻訳領域に特異的に結合し、その発現を転写後調節していることが明らかになった。

(6) 胎児期のマウス線条体から採取した神経幹細胞は、EGF・bFGF存在下で培養すると分裂をくり返して細胞塊 (Neurosphere) を形成する。*msi1*遺伝子欠損マウスにおいてはこのNeurosphere形成能に異常は認められないが、*msi1*遺伝子欠損マウスに対して*msi2*の発現を阻害するアンチセンスオリゴを導入したところ、Neurosphere形成能が低下した。しかしながら、*msi1*および*msi2*遺伝子の二重欠損マウスは、Neurosphere形成能が有意に亢進していることが分かった。

#### D. 考察

*msi1*遺伝子欠損マウスの先天性水頭症は、中脳水道付近の細胞の分化・増殖制御の異常によるものであると考えられる。これは標的mRNAであるmNumbの転写後に翻訳を抑制するというMsi1の機能が失われることに依る。つまり*msi1*遺伝子欠損マウスは、Notchシグナルを負に制御するmNumbのような因子の抑制が解除され、結果的にNotchシグナルが低下して神経幹細胞の未分化性が維持できなくなり、分化が早期に進行してしまうことで、中脳水道付近にポリープ様構造物が形成されるのだと考えている。このポリープ様構造物が、増殖の亢進によるものではなく、未分化性を喪失して分化が亢進した神経細胞の特徴を有していることは、染色の結果から明らかであった。

また相同性の高いMsi2の標的mRNAを探索したところpleiotrophinが同定された。pleiotrophin mRNAの3'非翻訳領域への結合や、pleiotrophinの翻訳を調節している事実が明らかになった。*msi2*遺伝子欠損マウスは先天

性水頭症の症状が確認されないものの、*msi1*および*msi2*遺伝子の二重欠損マウスが重度な中脳水道閉塞症状を呈することから、pleiotrophinの活性が変化することで先天性水頭症発症を増悪させる因子の一つである可能性が示唆された。

以上からMsi1蛋白質とMsi2蛋白質は、それぞれ時期および空間特異的にいくつかの標的遺伝子を調節し、先天性水頭症の発症機序に協調的に作用していることが考えられた。

#### E. 結論

先天性水頭症を発症する*msi1*遺伝子欠損マウスの組織学的、分子生物学的な解析から、*msi1*は重症の閉塞性先天性水頭症の原因遺伝子の一つであることが分かった。また*msi1*遺伝子欠損による先天性水頭症の発症メカニズムとして、神経幹細胞・前駆細胞の増殖や分化の制御の異常が考えられた。

Msi2蛋白質単独では先天性水頭症発症には関与していないが、Msi1とMsi2の両蛋白質の協調的な働きは水頭症発症機序に強く関与していることが、*msi1*および*msi2*遺伝子の二重欠損マウスの解析から明らかとなった。

## DNA polymerase $\lambda$ 遺伝子の上流の新規未知遺伝子の同定 —水頭症との関連—

国立長寿医療センター研究所老年病研究部<sup>1</sup> 国立病院大阪医療センター臨床検査部・脳神経外科<sup>2</sup>

小林 洋介<sup>1</sup> 山崎 麻美<sup>2</sup> 本山 昇<sup>1</sup>

### 研究要旨

DNA polymerase  $\lambda$  (Pol  $\lambda$ )、はDNA polymerase  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) と相同性を有する family X に属する新規DNA polymerase である。私たちが樹立したPol  $\lambda$  ノックアウトマウスは、脳室上皮細胞の繊毛の運動異常が原因で水頭症を発症する。Pol  $\lambda$  遺伝子近傍の上流に新規遺伝子を発見した。その遺伝子は、私たちの樹立したノックアウトマウスでも欠損しており、この新規遺伝子が水頭症の原因である可能性が示唆された。本研究においては、水頭症遺伝子バンクを用いて、この新規遺伝子DKFZP566F08の変異の有無について検討した。

### A. 研究目的

DNA polymerase  $\lambda$  (Pol  $\lambda$ ) 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  $\lambda$ <sup>1,2,3</sup>) を同定し、その生理機能を明らかにするためにPol  $\lambda$  ノックアウトマウスを作成したところ、Pol  $\lambda$  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死亡することを明らかにしてきた<sup>4)</sup>。しかしながら、Bertocciらが作成したDNA Polymerase  $\lambda$  KOマウスは見かけ上ほとんど異常が認められず、水頭症や雄の不妊は認められないと報告した<sup>5)</sup>。これらの表現型の違いから、私たちが欠失した領域に別の遺伝子が存在しているのではないかと考えて、DNAデータベースで解析を進めたところ<sup>6)</sup>上流1 kb以内から逆向きに6つのエクソンからなる遺伝子が存在することが明らかとなった<sup>6)</sup>。そこで、この新規遺伝子DKFZP566F08が水頭症の原因

遺伝子となっているかどうかを明らかにするために、水頭症遺伝子バンクを用いて遺伝子の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、家族性水頭症 (X連鎖性以外) および先天性中脳水道狭窄症 (弧発例) の患者37検体を対象とした。患者由来のゲノムDNAを、新規遺伝子DKFZP566F08の6個のエクソンを挟むように設計したプライマー (表1) を用いてPCR法にて増幅し、精製した後にBig Dye Terminator Cycle Sequencing Kit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を実施した。

### C. 研究結果

新規遺伝子DKFZP566F08のゲノム構造を図1に示した。エクソン1に同定されたSNP (dsSNP:3730458) C/A: Ala/Asp21およびエクソン5に同定されたSNP (dsSNP: 7006) C/T Ser/Leu156は、アミノ酸置換を伴う。エクソン4に同定されたSNP (dsSNP: 7874) T/C: Asn/Asn133は、

アミノ酸置換を伴わない。エクソン6の3'UTにはSNP(dsSNP: 13246 G/A)が同定されている。

水頭症バンクに登録された、家族性水頭症(X連鎖性以外)および先天性中脳水道狭窄症(弧発例)の患者37検体を解析した結果、エクソン4のdsSNP: 7874、エクソン5のdsSNP: 7006及びdsSNP: 13246が検出された。1検体においてdsSNP: 7006が両遺伝子座においてCタイプとなっており、アミノ酸がSerとなっていた。その他のSNPについては、全てヘテロ接合体となっていた。また、これまで同定されているSNPの他に、エクソン4にT/G Ser117 Arg及びG/C Arg107Proのヘテロ変異が同定された。

#### D. 結論

この新規遺伝子DKFZP566F08は、下等なeukaryotesからヒトまで保存されており、少なくとも13のorthologuesが同定されている。また、鞭毛を持ったLeishmaniaや

表1. 新規遺伝子DKFZP566F08の各エクソンをPCR法にて増幅するためのプライマー

[Exon 1]	5' Primer Name: hmics gs 1-1(F) 5'-GCA GAG CCA ATG AGA GCG GAC GAA 3' Primer Name: hmics gs 1-2(R) 5'-GGT GAG GAG CAA ATG AGA TAA TGA
[Exon 2]	5' Primer Name: hmics gs 2-1(F) 5'-CAG CAG GGC AAA GAT G'IT CAA GGA 3' Primer Name: hmics gs 2-2(R) 5'-TAC TGG TCA AAA GGA CTC GCA TTC
[Exon 3]	5' Primer Name: hmics gs 3-1(F) 5'-ACA CTC CCA CTT TCA TCT TGT GCT 3' Primer Name: hmics gs 3-2(R) 5'-CCC TCT GAC GCT GCT ATT GCT ACA
[Exon 4]	5' Primer Name: hmics gs 4-1(F) 5'-TGA ATA CAG ACA TTT TGG CTT GAT 3' Primer Name: hmics gs 4-2(R) 5'-ACC CTA CAC CCC GCT CAT ACA CAA
[Exon 5]	5' Primer Name: hmics gs 5-1(F) 5'-TTC CCT TCT CCC TCT CTG CGT GTG 3' Primer Name: hmics gs 5-2(R) 5'-CCA CCG CTT CCC TTT CAC CCT CTA
[Exon 6]	5' Primer Name: hmics gs 6-1(F) 5'-AGG TCT GCT CCT ACT CAG GCA CAT 3' Primer Name: hmics gs 6-2(R) 5'-CTC CCA CCC TAT TCT CCC TTT TTG

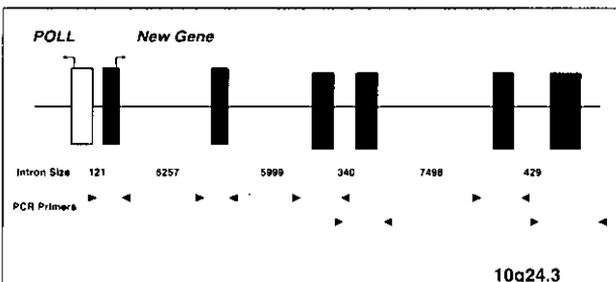


図1. ヒトPolλ遺伝子座上流の新規遺伝子DKFZP566F08の構造  
ヒトPolλ遺伝子座上流に存在する新規遺伝子DKFZP566F08の構造を示している。新規遺伝子DKFZP566F08は10q20.3にマップされている。また、各エクソンをPCR法により増幅するためのプライマーの位置を示した。

Trypanosomaにおいてもよく保存されており、精子の運動性に関するMajor Sperm Proteinと相同性をもつドメインを有している。これらのことからこの遺伝子が繊毛や鞭毛のDynein armの構成成分であり、この遺伝子の欠損がImmotile Cilia Syndromeの症状を呈する原因となっている可能性が高いと考えられる。最近新規遺伝子DKFZP566F08が繊毛の発達とともに発現が上昇するという報告があった<sup>7)</sup>。今回調べた検体において、1検体dsSNP: 7006がホモになっているのが明らかになったが、このSNPとImmotile Cilia Syndromeを伴う水頭症の発症との関連について検討する必要がある。

#### F. 文献

- 1) Aoufouchi S, Flatter E, Dahan A, Faili A, Bertocci B, Storck S, Delbos F, Cocea L, Gupta N, Weill JC, Reynaud CA. Two novel human and mouse DNA polymerases of the polX family. *Nucleic Acids Res.* 28: 3684-3693, 2000.
- 2) Garcia-Diaz M, Dominguez O, Lopez-Fernandez LA, de Lera LT, Saniger ML, Ruiz JF, Parraga M, Garcia-Ortiz MJ, Kirchhoff T, del Mazo J, Bernad A, Blanco L. DNA polymerase lambda (Pol lambda), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis. *J. Mol. Biol.* 301: 851-867, 2000.
- 3) Nagasawa K, Kitamura K, Yasui A, Nimura Y, Ikeda K, Hirai A, Matsukage A, Nakanishi M. Identification and characterization of human DNA polymerase beta 2, a DNA polymerase beta-related enzyme. *J. Biol. Chem.* 275: 31233-31238, 2000.
- 4) 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  $\mu$ -Deficient Mice: Possible Implication for the Pathogenesis of Immotile Cilia Syndrome. *Mol. Cell. Biol.* 22: 2769-2776, 2002.
- 5) Bertocci B, Smet AD, Flatter E, Dahan A, Bories JC, Landreau C, Weill JC, Reynaud CA. DNA Polymerase  $\mu$  and  $\lambda$  Are Dispensable for Ig Gene Hypermutation. *J. Immunol.* 168: 3702-3706, 2002.
- 6) 本山 昇. DNA polymerase I 遺伝子上流の新規未知遺伝子の同定—DNA polymerase I KOにおける水頭症との関連—. 厚生労働省特定疾患研究事業難治性水頭症調査研究班 平成14年度研究報告書 pp106-pp109AA2003.
- 7) Zariwala M, O'Neal WK, Noone PG, Leigh MW, Knowles

MR, Ostrowski LE. Investigation of the possible role of a novel gene, DPCD, in Primary Ciliary Dyskinesia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003, in press

## Purkinje cellの新しいマーカーとしての KIAA0864 proteinについて

聖マリア病院病理部<sup>1</sup> 久留米大学医学部化学<sup>2</sup> 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<sup>3</sup>  
国立成育医療センター研究所 生殖医療研究部生殖細胞機能研究室<sup>4</sup>  
熊本大学生命資源研究・支援センター 動物資源開発研究部門技術開発分野<sup>5</sup>  
国立病院大阪医療センター 臨床研究部・脳神経外科<sup>6</sup> 慶應義塾大学医学部生理学教室<sup>7</sup>

中村 康寛<sup>1</sup> 山本 統彦<sup>2</sup> 小田えり子<sup>2</sup> 金村 米博<sup>3</sup> 山本 英幸<sup>3</sup> 宮戸 健二<sup>4</sup>  
鈴木 操<sup>5</sup> 山田 源<sup>5</sup> 山崎 麻美<sup>6</sup> 岡野 栄之<sup>7</sup>

### 研究要旨

ヒト胎児脳のhomogenatesを抗原として作製したモノクローナル抗体のうち、HFB16抗体では発育小脳のプルキンエ細胞の発育マーカーとして有効である事を昨年の班会議で発表した。その後の検索でこの抗体はKIAA0864proteinを認識している事が解った。KIAA0864proteinはヒト脳で発現している高分子量の蛋白のmRNA解析した結果得られたもので、その機能等の詳細は現在まで全く解っていない。その遺伝子構造よりこの蛋白はp116Ripに関連している事が示唆される。このような事項を背景に我々はKIAA0864proteinのトランスジェニックマウスを作製する事にした。現在はまだその過程でトランスジェニックマウスの解析までにはいたっていないが途中経過を発表する。

### A. 研究目的

平成14年度に、ヒト正常発育脳および13トリソミー例脳における2種類のモノクローナル抗体(HFB-16, HFB-27)をもちいた免疫組織化学的検討をおこなった<sup>1)</sup>。そのうちHFB-16抗体はPurkinje細胞の発育マーカーとして有効である事が解った。平成15年度はこのHFB-16抗体によって認識される抗原蛋白の同定を行い、更にはその遺伝子構造を解析し、機能分析まで行う事とした。

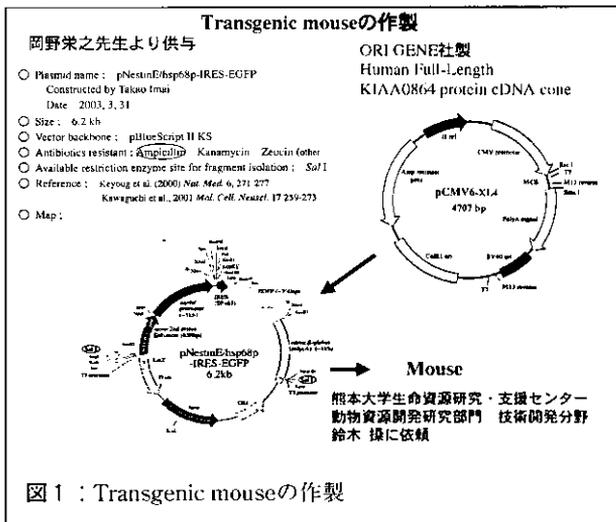
### B. 研究方法

HFB-16抗体が認識する抗原蛋白を同定する為に、expressional cloningを行った。用いたcDNA libraryは胎齢19-23週のヒト胎児脳からのもので(Stratagene, La

Jolla, USA, Catalog #937227)、host bacteriaとしてXL1-Blue MRF-strainsを使い、lambda phagesのtitringを説明書通りに行い、titered phagesとhost bacteriaのmixtureを37℃、15分incubateし4ml LB top agaroseをくわえ、LB agar platesの上に流し、逆さまにして42℃、一晩incubateし、更にIPTG-saturated filtersをのせ37℃で3-4時間 incubateした。このfilterをblock solutionに1時間、次にHFB-16抗体の1:1000 solutionに1時間、peroxidase conjugateした2次抗体(anti-mouse Ig, Dako, Carpinteria, USA) 1:1000 solutionに1時間、最後にDAB溶液で染色し陽性plaqueを拾い、さらに3回subcloningを行った。陽性cloneをT1, T3 primersを用いPCRで増幅し、pT7BlueTM T-vectors (Novagen) にいれE. coliにtransfectし得られたcDNAのsequenceを行っ

た。

結果の項で述べるが、抗原蛋白が機能未知のものであったので、その機能解析の第一歩としてトランスジェニックマウスを作製する事にした。ヒト抗原蛋白のcDNAの全長はOriGene Technologies, Inc.より購入し、岡野研より供与されたNestin promotorを組み込んだplasmid (pNestinE/hsp68p-IRES-EGFP) とを用いて導入DNAを構築した (図1)。この構築、調整、精製はタカラバイオ株式会社トランスジェノミックセンターに依頼した。このDNAを用いてのトランスジェニックマウス作製は鈴木により行われた。DNA組み込みのスクリーニングはヒト抗原蛋白に特異的でマウスDNAに存在しない複数の部位にプライマーを設定しPCR法 (nest PCRも併用) により行った。スクリーニング用のDNAは、離乳後のマウスの尾を約5 mmの長さで切断し、迅速DNA抽出Kit (Sigma) で抽出した。



(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。また国立病院(大阪医療センター)症例に関しては平成12年の報告書に記載した<sup>3)</sup>。使用した実験動物および遺伝子操作に関してはそれぞれのガイドラインに従いしかるべき施設で行った。

### C. 研究結果

HFB-16抗体が認識する抗原蛋白について

HFB-16抗体、ヒト胎児脳cDNA libraryを用いて行っ

た Expressional cloningで、最終的に2つの陽性クローンが得られ、各々600-700bpのsequenceを行い、BLASTIN 2.0.11でhomology searchを行った所、2つのクローン共に98-100%の相同性で、ヒトKIAA0864proteinである事が判明した。

ヒトKIAA0864proteinのトランスジェニックマウスの作製

DNA注入受精卵を用いて38匹の仔マウスが得られた。離乳後に尾部から抽出したDNAをPCR法でスクリーニングしたところ3匹(雌1匹、雄2匹)のトランスジェニックマウスが確認された(図2)。平成16年1月現在での研究の進展はこの段階までで、まだトランスジェニックマウスの異常の有無、その詳細に関しては解らない状況である。

### Primer 1 598bp

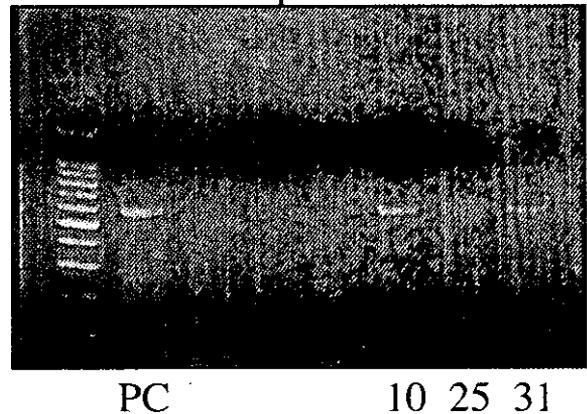


図2 : PCR法によるTransgenic mouseの確認。

ヒトKIAA0864に特異的な塩基配列でマウスDNAに存在しない同一exon部にプライマーを設定しPCR法により行った。PC: positive control (ヒト脳DNA)、陰性の3レーン(No10, 25, 31)は陰性であった35匹のマウスDNAのうち3匹。No10, 25, 31の3匹が陽性であった。他のprimer setを用いた検索でも同じ結果で、さらにNest PCRで確認した。

### D. 考察

平成14年度の研究で、ヒト胎児脳のhomogenatesを免疫原として得られた数種類のモノクローナル抗体のうちHFB-16は小脳の発育に関して有用かつユニークなマーカーとなりうる事が示唆された。この抗体が認識する抗原はhomology searchの結果ヒトKIAA 0864proteinである事が解った。このKIAA0864proteinは、50kD以上の比較的大きな蛋白をcodeしているcDNAをヒト脳cDNA librariesから決定したもののうちのの一つで、脳に比較的特異的な蛋白である<sup>4)</sup>。この蛋白の生理的機能に関しては解っていないが、cDNAの構造よりHuman p116Rip造

伝子のalternative splicing産物である可能性が高い。この遺伝子のゲノムは17番染色体にのっている。最近 p116Rip 遺伝子は新しい F-actin binding proteinだという報告がある<sup>5)</sup>。しかし脳での機能は解っていないし、Purkinje cell での局在の報告もない。

トランスジェニックマウス作製の途中であるので、結果は示せないが、今後トランスジェニックマウスの形態学的検討を含む解析を行い、平行してノックアウトマウスの作製を行う予定であり、これらの解析が出来れば、KIAA0864proteinの機能が解明されるものと期待される。

## E. 文献

- 1) 中村康寛、山本統彦、小田えり子、金村米博、山崎麻美、岡野栄之：ヒト発育小脳におけるモノクローナル抗体による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14年度研究報告書 110-113, 2003.
- 2) 中村康寛、山本統彦、小田えり子、金村米博、山崎麻美、岡野栄之：ヒト正常発育脳および水頭症脳における脳構築の変化。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13年度研究報告書 63-66, 2002.
- 3) 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.
- 4) Nagase T, Ishikawa K, Suyama M, Kikuno R, Hirosawa M, Miyajima N, Tanaka A, Kotani H, Nomura N, Ohara O: Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res* 5: 355-64, 1998.
- 5) Mulder J, Poland M, Gebbink MF, Calafat J, Moolenaar WH, Kranenburg O: p116Rip is a novel F-actin-binding protein. *J Biol Chem* 278: 27216-27223, 2003.

## L1CAM遺伝子改変マウスにおける末梢神経系発達異常に関する研究

京都府立医科大学大学院医学研究科 分子病態病理学

伊東 恭子 矢追 毅 山中 巧 伏木 信次

### 研究要旨

神経細胞接着分子L1は、その細胞外領域で、様々な細胞外リガンドと結合することにより、その細胞接着機能を発揮する。6番目のイムノグロブリン(Ig)はL1同士ホモフィリック結合、integrin $\beta$ とのヘテロフィリック結合に関与するドメインとして重要な機能を担っている。我々は、L1蛋白の細胞外に位置する6番目のIgドメインのみを欠如したマウス(6D)を作成し、末梢知覚神経の超微形態学的計測学的検索を行った。6Dノックインマウスの無髄線維では、Schwann細胞による軸索包囲が不良で、Schwann細胞突起の軸索束からの解離、Schwann細胞に包囲されないnaked axonの増加、軸索径の大小不同、fasciculation異常、軸索変性などが観察され、正常対照群との間で統計学的有意差が示された。有髄線維においては、太い軸索での髄鞘低形成や、20以上の軸索が単一Schwann細胞によって形成された髄鞘に取り囲まれた異常有髄線維の出現が見られた。このことは、末梢神経の形成・発達過程における知覚神経軸索のfasciculationとSchwann細胞との接着に、軸索上のL1分子の第6番IgドメインとSchwann細胞上の $\beta$ 1-integrinとの相互作用が不可欠であることを示唆する。

### A. 研究目的

神経細胞接着分子L1は、主として発生期中枢及び末梢神経系組織に発現し、神経細胞の遊走、軸索伸長とガイダンス、末梢神経では知覚神経軸索のfasciculationとSchwann細胞との接着などにおいて重要な役割を担っている<sup>1,2,3,4)</sup>。L1遺伝子はヒト、マウスなどではX染色体上に位置し、L1遺伝子ノックアウトマウスは、先天性水頭症、脳梁形成不全、皮質脊髄路異常、小脳虫部低形成など中枢神経系形成異常に加え、末梢知覚神経の機能的形態的異常を表現型として示すことが知られている<sup>4,5,6,7)</sup>。

L1は細胞外領域で、様々な細胞外リガンドと結合することにより、その細胞接着機能を発揮する。中でも6番目のイムノグロブリン(Ig)ドメインはL1同士のホモフィ

リック結合、integrin $\beta$ とのヘテロフィリック結合に関与するドメインとして重要な機能を担っている<sup>8)</sup>。我々は、L1遺伝子のexon 12、13、14を消去することによりL1蛋白の細胞外に位置する6番目のIgドメインのみを欠如したマウス(6D)を作成した。6Dマウスの中枢神経系発達は正常で、*in vivo*における正常な軸索ガイダンスには、6番目のIgドメインを介したL1同士のホモフィリック結合、integrin $\beta$ とのヘテロフィリック結合は重要でないことが示された<sup>9)</sup>。本研究は、6Dマウスの末梢神経系発生過程を、詳細かつ多角的に解析し、L1遺伝子異常に基づく末梢神経系発達異常のメカニズムを明らかにしようとするものである<sup>10)</sup>。

### B. 研究方法

## 1. 6Dマウスの作成

cre loxpアプローチを用いて、L1遺伝子のexon 12、13、14を選択的に消去し、その結果、L1-L1ホモフィリック結合部位のひとつであるL1蛋白の6番目のIgドメインのみを欠如したノックインマウス(6D)を作成した。FACS analysisでは、6Dマウスからの脾臓リンパ球は、L1の6番目のIgドメインを欠如しているが、L1の他の重要なドメインは正常に発現していた。コントロールはloxpサイトを有するが、正常に6番目のIgドメインを発現したマウスを用いた。6Dマウスは129/Svを遺伝背景として、8-10世代のもどし交配を行った。

## 2. 電子顕微鏡的検索

129/Svを遺伝背景とした6Dおよびコントロールマウスは生後0日、7日、14日、8週齢、各群3匹を用いた。1.0%グルタルアルデヒドを含有する固定液で灌流固定後中枢側坐骨神経を採取、数時間の後固定後、電子顕微鏡用超薄切片を作成した。超微形態的に神経軸索とSchwann細胞間の接着形成、軸索のfasciculationの発達、有髄線維の髄鞘化を経時的観察した。

## 3. 組織計測学的検索

組織計測は、中枢側坐骨神経横断面全領域において施行した。無髄線維では、単一Schwann細胞に束ねられた無髄神経の軸索総数、無髄線維周径、個々の軸索周径、無髄線維束から解離したSchwann細胞の突起数を計測した。有髄線維においては、髄鞘厚、軸索周径を計測し、6Dおよびコントロールマウス間で比較した。

## C. 研究結果

### 1. 電子顕微鏡的観察 (図1)

129/Svを遺伝背景とした6Dマウスの坐骨神経無髄線維においては、Schwann細胞による軸索包囲が不良で、Schwann細胞突起の軸索束からの解離、Schwann細胞に包囲されないnaked axonの増加、軸索径の大小不同、fasciculation異常、軸索変性などが観察された。有髄線維においては、より太い軸索での髄鞘低形成や、20以上の軸索が単一Schwann細胞によって形成された髄鞘に取り囲まれた異常有髄線維の出現が見られた。発達過程にある坐骨神経においても、有髄、無髄線維に類似の変化が見られたことから、これらの変化は変性ではなく、発達異常に起因するものと考えられた。

### 2. 組織計測学的検索

#### 1) 無髄線維

単一Schwann細胞に束ねられた無髄線維の軸索総数は、6Dマウスで分布のばらつきが広く、naked axonの増加が見られた。(6D:mean9.4/fiber(1-65)、コントロール:mean7.9/fiber(1-45)) 無髄線維周径、個々の軸索周径では、6Dマウスで分布のばらつきが大きかった。無髄線維束から解離したSchwann細胞の突起数は6Dマウスで0.81/fiber、コントロールマウスで0.14/fiberで、6Dマウスで有意に増加していた。

#### 2) 有髄線維

有髄線維の軸索周径と髄鞘厚の相関では、6Dマウスではコントロールマウスに比して、より薄い髄鞘を有する細い軸索が多くみられた。

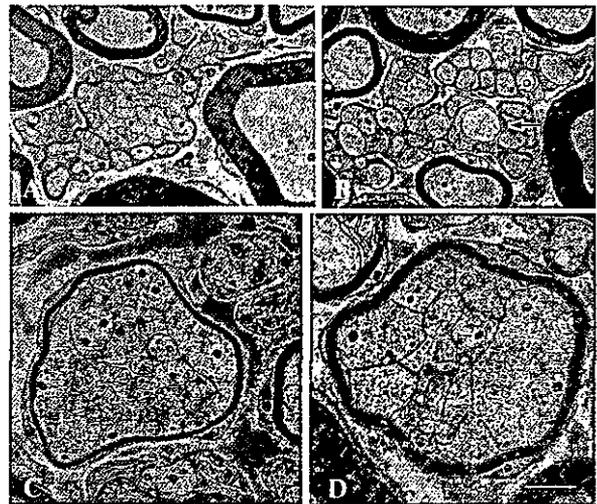


図1. 6Dマウスの坐骨神経：

A,B: 無髄神経では、軸索がSchwann細胞の細胞質に充分包囲されず、神経束辺縁部でnaked axonがendoneuriumに離れて存在する(A, 矢印)。無髄神経の軸索の大小不同が目立ち、変性した軸索が見られる(B, 矢印)。

C,D: 異常な有髄線維、C: 生後7日、D: 成マウス単一のSchwann細胞が形成するミエリン鞘内に20個以上の大小不同の軸索を見る。Schwann細胞と軸索の1:1の関係が失われている。

bar=2.0 $\mu$ m(A,B), 1.2 $\mu$ m(C,D)

## D. 考察

129/Svを遺伝背景とした6Dマウスの脳では、神経細胞構築、神経投射ならびに伝導路は正常に形成されており、脳形成過程における神経細胞遊走、軸索のガイダンスと伸長が正常に遂行されたことを示している。この事実は、L1の6番目のIgドメインはL1同士のホモフィリックな結合、integrin $\beta$ とのヘテロフィリックな結合に関与するドメインとして重要な機能を担っているという報告<sup>8)</sup>にもかかわらず、*in vivo*では、軸索ガイダンス

の正常な遂行に6番目のIgドメインは必要でないことを示唆している。一方、6Dマウスの末梢神経では、有髄線維、無髄線維双方において、発達異常が示された。本マウスの無髄神経においてみられた表現型に類似したものは、Schwann細胞の $\beta 1$ -integrinを特異的にノックアウトしたマウスの末梢神経で報告されている<sup>11)</sup>。このことより、末梢神経の形成・発達過程における知覚神経軸索のfasciculationとSchwann細胞との接着には、軸索上のL1第6番IgドメインとSchwann細胞上の $\beta 1$ -integrinの分子間相互作用が重要と考えられるが、現在その分子メカニズムを解明する実験が進められている。一方、ミエリン蛋白をコードするP0遺伝子のpromoterを用いて、ミエリン形成性Schwann細胞特異的にPOU transcription factor SCIPのドミナントネガティブ (P0- $\Delta$ SCIP) を遺伝子導入したマウスの末梢神経では、Schwann細胞のP0蛋白の過剰発現に伴った髄鞘過形成とともに、6Dマウスで見られたような異常有髄線維の出現が報告されている<sup>12)</sup>。そのメカニズムは不明であるが、発生ごく早期のpremyelinating stageのSchwann細胞の異常に起因する可能性が示唆されている。

## E. 結論

神経細胞接着分子L1蛋白の細胞外に位置する6番目のIgドメインのみを欠如したマウス (6D)の坐骨神経では、有髄線維、無髄線維双方に発達異常が見られた。このことは、末梢神経の形成・発達過程における知覚神経軸索のfasciculationとSchwann細胞との接着に、軸索上のL1分子の第6番IgドメインとSchwann細胞上の $\beta 1$ -integrinとの相互作用が不可欠であることを示唆する。

付記：

本研究は米国University of Miami School of Medicine, The Miami Project to Cure Paralysis, Vance Lemmon教授との共同研究である。

## F. 文献

- 1) Lemmon V, Farr K, Lagenaur C (1989) L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron* 2: 1597-1603.
- 2) Drazba J, Lemmon V (1990) The role of cell adhesion molecules in neurite outgrowth on Müller cells. *Dev Biol* 113: 755-765.
- 3) Kamiguchi H, Hlavin ML, Yamasaki M, Lemmon V (1998) Adhesion molecules and inherited diseases of the human nervous system. *Annu Res Neurosci* 21:97-125.
- 4) Hancey CA, Sahenk Z, Lemmon V, Roder J, Trapp BD (1999) Heterophilic binding of L1 on unmyelinating sensory axons mediates Schwann cell adhesion and is required for axonal survival. *J Cell Biol* 146: 1173-1183.
- 5) Cohen NR, Taylor JSH, Scott LB, Guillery RW, Soriano P, Furley AJW (1997) Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Curr Biol* 8:26-33.
- 6) Dahme M, Bartsch U, Martini R, Anliker B, Schachner M, Mantei N (1997) Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nature Genet* 17: 346-349.
- 7) 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 FR, Willems PJ (1998) L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia, and impaired exploration patterns. *Hum Mol Genet* 7: 999-1009.
- 8) Oleszewski M, Beer S, Katich S, Geiger C, Zeller Y, Rauch U, Altevogt P (1999) Integrin and neurocan binding to L1 involves distinct Ig domains. *J Biol Chem* 274: 24602-24610.
- 9) Itoh K, Fushiki S, Kamiguchi H, Herrup K, Arnold B, Altevogt P, Lemmon V (2001) Development of axon pathways in mice lacking normal L1 adhesion. The 31st annual meeting of the Society for Neuroscience Nov. 10-15. San Diego, U.S.A
- 10) Itoh K, Fushiki S, Kamiguchi H, Arnold B, Altevogt P, Lemmon V (2003) Disrupted Schwann cell-axon interactions in the peripheral nerve of L1-6D mice. The 33rd annual meeting of the Society for Neuroscience Nov. 8-12. New Orleans, U.S.A
- 11) Feltri ML, Porta DG, Previtali SC, Nodari A, Migliavacca B, Casseti A, Littlewood-Evans A, Reichardt LF, Messing A, Quattrini A, Mueller U, Wrabetz L (2002) Conditional disruption of  $\beta 1$  integrin in Schwann cells impedes interactions with axons. *J Cell Biol* 156: 199-209.
- 12) Weistein DE, Burrola PG, Lemke G (1995) Premature Schwann cell differentiation and hypermyelination in mice expressing a targeted antagonist of the POU transcription factor SCIP. *Mol Cell Neurosci* 6: 212-229.