

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16年度総括・分担研究報告書

平成 17 年 3 月

主任研究者 山 崎 麻 美

## 先天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	独立行政法人 国立病院機構 大阪医療センター 先進医療部・脳神経外科	部 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 セルエンジニアリング研究部門 組織・再生工学研究グループ	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	チームリーダー
	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	宮城県立こども病院 脳神経外科学	部 長
	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	独立行政法人 国立病院機構 香川小児病院 脳神経外科	院 長
	中 村 康 寛	聖マリア病院 病理部	部 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	院 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
	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	臨床第八部長
	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	独立行政法人 国立病院機構 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
	松 井 潔	神奈川県立こども医療センター 周産期医療部新生児未熟児科	医 長
事 務 局 経理事務連絡担当責任者	山 田 淳 二 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16年度総括研究報告 .....	1
独立行政法人 国立病院機構 大阪医療センター 先進医療部・脳神経外科 主任研究者 山崎 麻美	

## II. 分担研究報告

1. 哺乳類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 ...	7
慶應義塾大学医学部生理学教室 芝田 晋介、岡野 栄之	
2. NMHC-Bミオシン変異マウスの水頭症発症機序.....	9
ー神経細胞の移動異常と橋核、顔面神経核、小脳の形成不全ー 神経発生研究所 <sup>1</sup> 、杏林大学医学部病理学 <sup>2</sup> 原 嘉信 <sup>1</sup> 、原 由紀子 <sup>2</sup>	
3. KIAA0864 protein (RIP3)のトランスジェニックマウス、ノックアウトマウス作製 .....	14
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> 、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>3</sup> 、産業技術総合研究所 セルエンジニアリング 研究部門 <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> 、 独立行政法人 国立病院機構 大阪医療センター <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> 、宮戸 健二 <sup>3</sup> 、宮本 潔子 <sup>3</sup> 、金村 米博 <sup>4</sup> 小田えり子 <sup>2</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. L1細胞内領域リン酸化による神経軸索成長の制御機構.....	17
理化学研究所 脳科学総合研究センター 仲田明日香、上口 裕之	
5. L1CAM遺伝子改変マウスにおける中枢神経系発達異常に関する研究.....	20
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、伏木 信次	
6. 神経接着因子L1CAM遺伝子異常を有するヒト神経幹細胞/前駆細胞における細胞接着能異常の検討 ...	23
産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門 <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> 、 独立行政法人 国立病院機構 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 祐之 <sup>3</sup> 岡野 栄之 <sup>4</sup> 、山崎 麻美 <sup>5,6</sup>	

7. 小脳形成異常症における責任遺伝子の検索（続報） ..... 26

大阪府立母子保健総合医療センター 企画調査部  
岡本 伸彦

**資料**

研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 29

# I. 総括研究報告

# 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

## 研究要旨

第2期の最終年度に当たる本年は、臨床部門では6年間のまとめとして胎児期水頭症の診断と治療ガイドラインの作成に取り組んだ。この内容はこれまでの研究成果を総括するものであり、臨床的にも倫理的にも難題である胎児期水頭症に関して初めての総合的なガイドラインである。また基礎部門においてはX連鎖性遺伝性水頭症の原因分子と同定されている神経接着因子L1CAMや遺伝子欠損マウスが水頭症を発症する *msi1*, Nonmuscle myosin heavy chain-B (NMHC-B) などの分子における水頭症発症機序の研究を行った。また神経幹細胞を用いて難治性水頭症の遺伝子治療への方向を模索した。

## 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。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。これらを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

①【胎児期水頭症の診断基準と治療指針のガイドライン】作製；小児脳神経外科医・新生児科医・産科医・臨床疫学・小児神経科医・疫学の専門家で現在プロジェクトチームを形成する。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（単純性水頭症、Dandy-walker症候群、全前脳胞症、脊髄髄膜瘤、脳瘤、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）の整理

や、あるいはこれまでの文献的のレビューを行う。

②先天性水頭症の成因解明に関する基礎的研究を行う。

③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。*L1CAM*遺伝子解析は、病態分析から診断基準の作成、臨床の中での出生前診断の意義について提唱していく。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*) などについても進めていく。

④水頭症の画期的な治療法の開発に向けた基礎研究；X連鎖性遺伝性水頭症の原因分子と同定されている神経接着因子L1CAMや遺伝子欠損マウスが水頭症を発症する *Musashi*, Nonmuscle myosin heavy chain-B (NMHC-B) などの水頭症発症機序の解明を行う。また神経幹細胞を用いて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、承認された。

### C. 研究結果

#### ①胎児期水頭症のガイドライン策定；

まずガイドラインに必要な基礎資料として胎児期水頭症の予後調査を行った。全国こども病院脳神経外科医会を中心とした先生に協力していただき、約200名の非常に貴重な基礎データを集積した。各疾患の担当者を決め、これらのデータをもとに作業に取り掛かった。かつ胎児期水頭症に関するこれまでの報告論文をレビューした。それらを持ちよる形で、総勢30名からなる作業部会は、平成16年7月から3回会議を持ち、別に編集委員会は4回と、画像診断に関する小委員会は8月に2日間にわたり会議を持った。編集者と印刷所に無理を言い、何度も何度も書き換え、やっと完成のめどが立ってきているところである。ガイドラインは大きく総論と各論に分かれる。総論は「先天異常の中で胎児期水頭症の占める位置」「胎児期水頭症の診断から治療まで」が含まれる。画像診断は宇都宮英綱、松井潔、夫律子、金西賢治らが担当し、今回特に力を注ぎ画像やシェーマを多くした。8月には小委員会を1泊でもち、症例を見ながら夜遅くまで議論を尽くした。また胎児期水頭症の治療の中で大切なカウンセリングについてはその専門家である齊藤理恵、佐藤孝道、富和清隆らが当たり、4施設58人の胎児期水頭症家族からアンケート調査を行った結果をもとに作成した。また「出生後の社会的支援」についての情報も重要である。各論の各項目の担当者は次に示す。単純性水頭症（山崎麻美）、脊髄髄膜瘤に合併する水頭症（坂本博昭）、Dandy-Walker症候群（佐藤博美、佐藤倫子）、全前脳胞症（夫敬憲）、二分頭蓋（下川尚子、林隆士）、胎児頭蓋内出血後水頭症（師田信人）、胎児期くも膜嚢胞（伊達裕昭）、胎児期脳腫瘍（白根礼造）、頭蓋縫合早期癒合症（長坂昌登）、水無脳症（稲垣隆介）、胎児期血管障害（北野昌平）、脳梁欠損（夫律子）である。各項目は3年間にわたり担当者がレビューや全国疫学調査の結果やガイドライン作成に

向けたこども病院へのアンケート調査をもとにして検討を加えて、作成した。単なる分担執筆ではなくて、お互いに内容について討論し、画像を出し合い、作り上げたものである。資料のところには森竹浩三先生を中心に1999年に当班が実施した先天性水頭症の全国疫学調査結果の一部を掲載した。

#### ②水頭症の成因に関する基礎的研究；

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X連鎖性遺伝性水頭症の原因分子である神経接着分子L1の機能解析を行った。L1は神経軸索に選択的に発現し、軸索突起の成長に重要な役割を担っている。L1細胞内領域はアンキリン（スペクトリン-アクチン骨格結合蛋白）と結合する。1）X連鎖性遺伝性水頭症の原因となるL1細胞内領域遺伝子変異はL1とアンキリンの結合を阻害すること、2）アンキリンBはL1依存性神経突起成長を制御すること、3）アンキリンGは神経突起の極性維持に関与することを明らかにした。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った。msi1遺伝子欠損マウスでは、標的mRNAであるmNumbの転写後に翻訳を抑制するMsi1の機能が減弱されることにより、結果的にNotchシグナルが抑制され、中脳水道付近に存在している神経幹細胞の未分化性が維持できなくなり、分化が早期に進行することで、増殖制御の異常によりポリープ様構造物が形成された結果、中脳水道狭窄症をきたしたものであると考えられた。また相同性の高いMsi2の標的mRNAを探索したところpleiotrophin (ptn)が同定された。ほとんどすべての個体が成体まで生き残る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、DRGの発生分化異常による成長不良や感覚・運動神経障害をきたすことが観察されたことから、個体発生過程におけるPtnを介したMsi2独自の関与が示唆された。msi1およびmsi2遺伝子の二重欠損マウスでは重度な中脳水道閉塞症状を呈することから、標的遺伝子であるmNumbやPtnの発現異常が、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。原嘉信らは、神経組織の発生過程で神経組織の主要なアクチン結合モーターとして、多様な役割を果たしているNonmuscle myosin heavy chain II-B (NMHC-B)の遺伝子欠損マウスと遺伝子変異マウス (NMHC-Bのモーター活性の低いR702C) を作成した。いずれも胎

児性水頭症を示し、いずれの場合も脳室壁の破壊を起因として脳奇形を発症し最終的に第3脳室と中脳水道の境界部位の閉塞により脳脊髄液の循環が障害され水頭症になる事を明らかにした。またNMHC-Bの活性が低下すると神経細胞の移動や突起伸張が高度に複雑な顔面神経核、橋核、小脳にとりわけ顕著な形成不全を示す事を明らかにした。これらの結果はNMHC-Bが神経組織の細胞移動と突起伸張の複雑な制御に重要な役割を果たしている事を示している。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なった。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。その結果、C57BL/6を遺伝背景としたL1-6Dマウス(B6-L1-6D)では、高頻度(>40%)に水頭症、皮質下白質の減少、皮質脊髄路の低形成、視床正中の交連線維の異常をきたすことが見出した。中村康寛らは、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抗体が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見出した。HFB16抗体がKIAA0864proteinを認識している事が解かり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。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。また約10家系の頭蓋骨早期癒合症においてFGFR11遺伝子異常を同定した。

#### ④水頭症の画期的な治療法の開発に向けた基礎研究；

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。

## D. 考察

フランスやイギリスでは、胎児が重篤な異常の場合、妊娠のいかなる時期においても選択的妊娠中絶が許されている。しかしながら、胎児期水頭症の61%が選択的妊娠中絶されたシリーズにおいて、出生した先天性水頭症の予後が、わが国の疫学調査の結果よりも悪いという皮肉な結果になっている。このような状況から、諸外国では我々が参考にしうるようなガイドラインはなく、正しい予後評価を導くデータベースすら存在しないという状況であり、我々のガイドラインは、世界的にも貴重なものといえる。また、X連鎖性遺伝性水頭症の遺伝子解析は諸外国からも依頼されており、その診断的意義は高い。胎児期水頭症において今後の問題は、ネットワークを利用した胎児期水頭症の画像診断システムの開発であり、胎児が水頭症の疑いがあると診断された妊産婦を支える支援のシステムの構築である。また水頭症の発症の基礎的研究から明らかになってきたことは、先天性水頭症の予防法・治療法の研究へと進展いく方向性を少しずつ明らかにしてきた。水頭症研究に臨床・基礎・疫学の専門家が一堂に会して、多くの班内共同研究を通じ、効率的に成果を上げることができた。

## E. 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・発症リスクなど明らかにする方向で様々の成果を挙げてきた。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の成果は特に大きい。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症水頭症児の家族・患者・治療者に大きな光明となる。



## Ⅱ. 分担研究報告

# 哺乳類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

芝田 晋介 岡野 栄之

## 研究要旨

哺乳類のRNA結合蛋白質Musashi (Msi) ファミリー蛋白質の機能解析を通して、先天性水頭症の発症機序を解明し、治療法を確立することを目指している。神経幹細胞に強い発現のみられるRNA結合蛋白質としてMusashi1 (Msi1) が1996年に同定され、Msi1と相同性の高い配列を持つMusashi2 (Msi2) が続いて同定された。これらの解析により、Msiファミリー蛋白質の機能と先天性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、より高率に、より早期に存在す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た。

## 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って、閉塞性の先天性水頭症モデル動物*msi1*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

*msi1*遺伝子欠損マウスの病態の詳細な解析により、閉塞性の先天性水頭症の発症機序の一つを既に明らかにした。今年度は、このMsi1と類似した構造を持つMsi2が先天性水頭症の発症に関与しているか調べるため、*msi2*遺伝子欠損マウスを作成して解析を行った。具体的には、*msi2*遺伝子欠損マウスの発生各段階の組織学的異常を調べるために、組織切片を作成し染色による組織学的解析、免疫組織学的解析を行い、分子生物学的な手法を用いて

結合する標的遺伝子mRNA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解析、さらに行動学的異常のスクリーニングを行った。

## C. 結果

- (1) *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。しかし、成体まで成長する*msi2*遺伝子欠損マウスは野生型に比べて有意に体重増加が不良であり、感覚神経障害や運動神経障害を伴うことが観察されたため、中枢神経から末梢神経まで詳細な解析を行った。その結果、背側神経節 (Dorsal Root Ganglia; DRG) の発達不全のために脊髄との線維連絡が低下していることが明らかとなった。
- (2) RNA結合蛋白質であるMsi2の標的遺伝子の解析を行ったところプライオトロピン (Pleiotrophin; Ptn) が同定され、*ptn*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。

#### D. 考察

*msi1* 遺伝子欠損マウスの先天性水頭症は、中脳水道付近に存在している神経幹細胞の分化・増殖制御の異常による。*msi1* 遺伝子欠損マウスでは、Notchシグナルを負に制御するmNumbのような標的遺伝子の発現抑制が解除され、結果的にNotchシグナルが抑制されることにより神経幹細胞の未分化性が維持できなくなり、分化が早期に進行することで、中脳水道付近に異常なポリープ様構造物が形成されるのだと考えている。今年度、相同性の高いMsi2の標的mRNAを探索したところPtnが同定され、*ptn* mRNAの3'非翻訳領域への結合や、*ptn* の翻訳を調節している事実が生化学的に明らかになった。ほとんどすべての個体が成体まで生き残る*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、DRGの発分化異常による成長不良や感覚・運動神経障害をきたすことが観察されたことから、個体発生過程におけるPtnを介したMsi2独自の関与が示唆された。

これらの結果と、*msi1* および*msi2* 遺伝子の二重欠損マウスでは重度な中脳水道閉塞症状を呈することを考え合わせると、標的遺伝子であるmNumbやPtnの発現異常が、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。Msi1および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関与していることが考えられた。

#### E. 結論

先天性の閉塞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り、その先天性水頭症発症メカニズムとしては、神経幹細胞の多分化能や増殖能の制御異常が示された。また、成長不全や感覚・運動神経障害をきたす*msi2* 遺伝子欠損マウスの組織学的、分子生物学的な解析からMsi2蛋白質単独では先天性水頭症発症に積極的には関与していないことが示された。しかし、重症な閉塞性先天性水頭症の原因病変がより早期により重篤に観察される*msi1* および*msi2* 遺伝子の二重欠損マウスの解析から、Msi1とMsi2蛋白質の協調的な働きが水頭症発症機序に強く関与していることが分かった。

#### F. 文献

- 1) Sakaguchi H, Yaoi T, Suzuki T, Okano H, Hisa Y, Fushiki N.: Spatiotemporal patterns of Musashi1 expression during inner ear development. *Neuroreport* 15: 997-1001, 2004.
- 2) Tokunaga A, Kohyama J, Yoshida T, Nakao K, Sawamoto K, Okano H: Mapping spatio-temporal activation of Notch signaling during neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse brain. *J Neurochem* 90: 142-154, 2004.
- 3) Murata J, Murayama A, Horii A, Doi K, Harada T, Okano H, Kubo T.: Expression of Musashi1, a neural RNA-binding protein, in the cochlear of young adult mice. *Neurosci Lett* 354: 201-204, 2004.
- 4) Akamatsu W, Fujiwara H, Mitsunashi T, Yano M, Shibata S, Hayakawa Y, Okano HJ, Sakakibara S, Takano H, Takano T, Takahashi T, Noda T, Okano H: RNA-binding protein HuD regulates neuronal cell identity and maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 in press

# NMHC-Bミオシン変異マウスの水頭症発症機序

## — 神経細胞の移動異常と橋核、顔面神経核、小脳の形成不全 —

神経発生研究所<sup>1</sup> 杏林大学医学部病理学<sup>2</sup>

原 嘉信<sup>1</sup> 原 由紀子<sup>2</sup>

### 研究要旨

Nonmuscle myosin heavy chain II-B (NMHC-B) は、神経組織の主要なアクチン結合モーターであり、神経組織の発生過程で多様な役割を果たしている。NMHC-Bを完全に欠損しているマウスを作成すると、神経上皮細胞の接着異常により脳室壁が破壊され、胎生12日から脳奇形と水頭症が発症し胎生15日から出生直後にかけて死亡する。次にNMHC-Bのモーター活性を下げるためにミオシン頭部のATPase活性部位でR702Cのアミノ酸変異を導入すると、マウスは欠損マウスに比較してより軽度の遅発性脳奇形と水頭症を発症し生後15日まで生存する。いずれの場合も第3脳室と中脳水道の境界部位の閉塞により脳脊髄液の循環が障害され水頭症を発症する。

R702Cマウスを用いて周生期の脳の発生異常を解析すると、顔面神経核、橋核、小脳の形成不全が認められ、これらの前駆細胞が最終部位まで正常に移動できずに、発生部位や細胞移動経路の途上で異所性に集積していた。顔面神経核、橋核、小脳顆粒層の細胞は、複雑な構造を持つ第4脳室の神経上皮から発生し、方向変換を伴う移動、辺縁部での移動、外増殖層から内層への移動など複雑で特徴的な細胞移動と突起伸展を示す。このためこれらの細胞では、NMHC-Bの活性が低下すると、細胞突起の伸展、方向変換、退縮や細胞核の移動で高度な制御ができなくなったものと推定される。これまで欠損マウスの解析からNMHC-Bが、未分化な神経上皮細胞（神経幹細胞）の細胞周期に同期した細胞核移動と細胞分裂に重要な役割を果たす事を明らかにしてきた。これに加えて今回の解析結果は、NMHC-Bが高度に複雑な神経細胞の移動と組織形成においても重要な役割を果たしている事を示唆している。

### A. 研究目的

これまでNMHC-Bミオシン完全欠損マウスを用い、進行の早い胎児性脳奇形と水頭症の発症機序を明らかにしてきた<sup>1-6)</sup>。今回は周生期に発症する遅発性脳奇形と水頭症の発生機序を明らかにするためにNMHC-Bミオシンのモーター活性の低いR702Cアミノ酸変異マウスの解析を重点的に進めた<sup>4,7)</sup>。

### B. 研究方法

NMHC-Bミオシン遺伝子欠損マウスは、既に報告したようにエクソン2のATGコドンの下流にネオマイシン耐性遺伝子を相同置換により挿入し樹立した。またNMHC-Bミオシン頭部のATPase活性部位にR702Cの点突然変異を持つマウスを相同置換により作成した。光学顕微鏡用の試料作製には、マウス組織を、4%パラフォルムアルデヒド-リン酸緩衝液、5%酢酸-95%エタノール液の

いずれかで固定し、連続パラフィン切片を作成し、HE染色して解析した。

### C. 研究結果

#### 1 遅発性水頭症と運動障害

NMHC-Bミオシン頭部のATPase活性部位にR702Cの点突然変異を相同組換えにより導入すると、ミオシン頭部のモーター活性が機能的に障害される。このマウスは完全欠損マウスと異なり胎生期の発生異常が軽度でほとんどのマウスが出生する。しかしながら出生後次第に歩行障害と発育異常を示し遅発性水頭症を発症し生後15日ではほぼ全例死亡する。このマウスの脳を組織学的に解析すると欠損マウスに比べて軽度であるが同様の発生異常が脳の各部位で認められる。そのなかでも第4脳室の神経上皮細胞から発生する構造、特に顔面神経核、橋核、小脳顆粒細胞に最も顕著な異常が認められる。

#### 2 顔面神経核の形成不全と細胞移動異常

顔面神経核の細胞は、胎生11-13日に第4脳室底の正中溝近くで菱脳のR4の神経上皮細胞から生まれる。この細胞は、はじめ延髄内を後方に水平移動し外転神経核の位置で向きを変え外腹側方向へと移動し、髄脳のR6の位置で底部に巨大な神経核を形成する。顔面神経線維は、延髄底部の核から細胞移動と逆方向に向かい出生部位の菱形窩に伸展し、外転神経核を回って折り返し再び腹外側方向に下行しR4の位置で脳幹を出て行く。

NMHC-B欠損マウスの脳を解析すると、顔面神経核の発生部位に近い第4脳室の菱形窩正中部位では、胎生11.5日にすでに脳室壁が破壊され細胞が脳室内に突出している像が観察される。胎生15日になると大型神経細胞が異所性に集積し脳室内に巨大な細胞塊を形成している像が全例で観察される。これほど巨大な細胞塊は、他の脳室部位では認められない。しかしながらこの異常が胎生早期にしかも広い領域で進行するために、細胞塊の起源を同定できなかった。そこで生後P0-P15のR702C変異マウスを用い発生がより進行した段階で脳を解析すると、欠損マウスと同じ部位で同様の大型神経細胞からなる異所性の細胞集積が観察された。そこでこの部位から発生する神経核を調べると、顔面神経核の大きさは正常の10%以下で顕著な形成不全が認められた。しかしながらこの近くで発生する三叉神経運動核、外転神経核、舌下神経核には異常が認められない。この事から第4脳室菱形窩正中部位に突出する異常細胞塊は、顔面神経核前

駆細胞が正常に移動できずに発生部位にとどまり集積して形成されたものと推定される (Fig 1)。

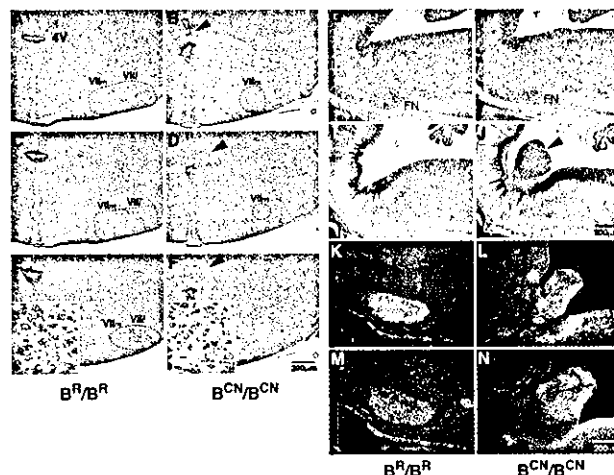


Fig 1 変異マウスの顔面神経核の形成不全と細胞移動異常 (A-F) 生後0日の顔面神経核の冠状断切片: R702C変異マウス (BCN/BCN) の顔面神経核は、野生型マウス (BR/BR) に比べて顕著な形成不全が見られる。(G-J) 胎生13.5日の矢状断切片: 変異マウスでは、菱形窩正中の屈曲部位の脳室壁が破壊され巨大な細胞塊が脳室内に突出している。(K-N) 胎生16.5日の矢状断切片: 脳室に突出している細胞は、野生型マウスの顔面神経細胞と同様にHoxb1(K,L)とPhox2b(M,N)を強く発現している。

#### 3 橋核の欠損と細胞移動異常

橋核は後菱唇から発生する小脳前核のひとつで大脳皮質から小脳への中継核として重要な役割をもつ。橋核細胞は胎生後期14-17日に第4脳室底の外側部を形作る髄脳背側部の小脳前神経上皮から発生する。この細胞は脳幹の外縁を前腹側方向に移動し橋底部の正中部位に高密度に集積し大型の神経核を形成する。R702C変異マウスの脳連続切片を解析すると、移動中の橋核細胞と推定される細胞が小脳前神経上皮から橋核への細胞移動経路の各部位に異所性に集積している像が認められる。胎生13.5日の段階では、まだ異常が認められないが、胎生16.5日になると、三叉神経と前庭神経が延髄に出入する部位の近傍に異常な細胞集積が認められる。正常マウスでは、出生直後 (P0) に橋核細胞の移動がほぼ完了しているが、変異マウスでは、細胞移動が遅れて進行し、橋核細胞は橋外縁部に少数認められるものの最終部位の橋腹側正中部位でほとんど欠失している。そこで菱唇から発生するすべての小脳前核の形成を詳細に解析してみた。後菱唇の前部からは、橋核と橋網様体被蓋核の細胞が、後部からは、外側網様体核、外楔状束核、下オリブ核の細胞が発生する。このうち橋核に最も顕著な形成不全が認められるが、橋網様体被蓋核、外側網様体核、

外楔状束核にも軽度の形成不全が認められる。これらの4神経核の前駆細胞はいずれも、延髄の外縁をぐるりと移動し最終部位に到着するという特徴的な移動様式を示す。これに対し脳実質内を移動する下オリブ核にはほとんど異常が認められない (Fig 2)。

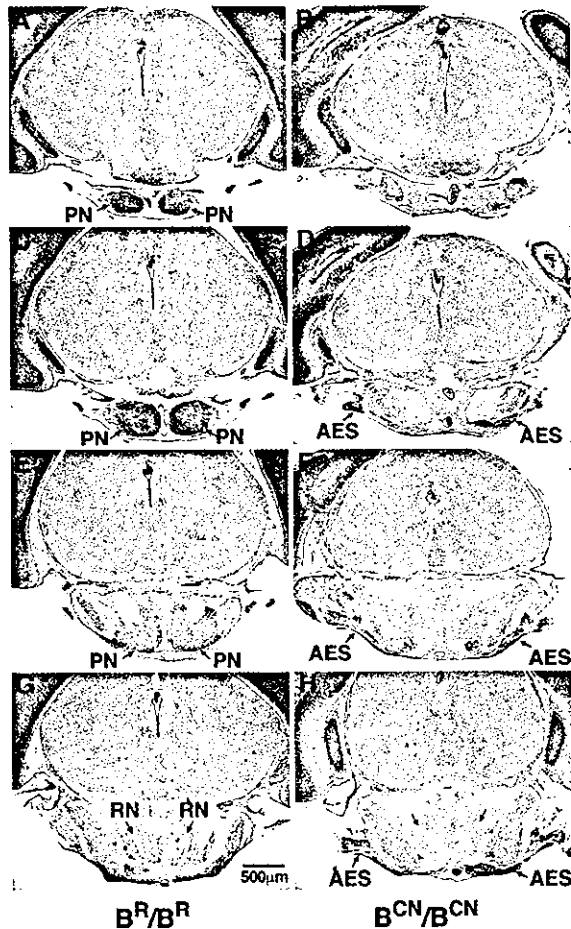


Fig 2 変異マウスの橋核の形成不全と細胞移動異常

生後0日の橋核の冠状断切片:野生型マウス (BR/BR) では橋核 (PN) への細胞移動をほぼ完了し、橋底部に大きな神経核を形成している (A,C,E,G)。R702C変異マウス (BCN/BCN) では橋核細胞が細胞移動経路 (AES) の途上にあり橋底部正中部の最終到着部位に達していない (B,D,F,H)。

#### 4 小脳形成不全と顆粒細胞の細胞移動異常

小脳は前菱唇の背側部に位置する小脳神経上皮から発生する。プルキンエ細胞と深部の小脳核細胞は、胎生期に脳室周囲の神経上皮で分裂増殖し内側から外側へと移動する。これに対し顆粒細胞、籠細胞、星細胞、ゴルジ細胞の細胞は、出生後P0-P20にかけて小脳外縁に形成される外増殖層で分裂増殖し外側から内側へと移動する。

R702C変異マウスの小脳連続切片を作成し組織学的に解析すると胎生13.5日では、小脳神経上皮に異常は認め

られない。しかしながら出生直後 (P0) では、小脳の大きさが小さく、小脳葉の発達が悪い。またP0、P8、P15の小脳皮質の層構造を解析すると外増殖層の形成と顆粒細胞の移動に顕著な異常が認められる。正常マウスの外増殖層は、P0から急速に増大し、P8-P10に最大となり、P15-20で1-2細胞層となり消失する。この時期に外増殖層で分裂を終えた顆粒細胞は、プルキンエ細胞の内側に移動し顆粒細胞層を形成する。これに対し変異マウスでは、P8で外増殖層の厚さは、正常マウスとほぼ同じだが顆粒細胞の厚さが正常値の30-50%である。P15になっても外増殖層がP8と同様に厚く、顆粒細胞層の厚さは、正常値の50-60%である (Fig 3 A-F)。

次にP6で外増殖層で分裂している細胞をBrdUで標識し、24時間後、72時間後の細胞移動を観察した。正常マウスでは、24時間後で標識細胞が外増殖層の最内側に移動し、72時間後で大多数が顆粒細胞層に移動している。一方変異マウスでは、24時間後で標識細胞が外増殖層で散在している。72時間後になっても標識細胞の50%は外増殖層の最内側にとどまり、顆粒細胞層に移動した細胞は50%にすぎない。これらの結果から変異マウスでは、顆粒細胞が外増殖層から内側の顆粒細胞層へと移動する過程に障害を持つ事が示唆される (Fig3 G-J)。

#### D. 考察

これまでNMHC-Bミオシン欠損マウスの解析から、神経発生の初期にNMHC-Bが細胞周期に同期しておこる神経上皮細胞の細胞核移動に重要な役割を持つ事を示してきた。さらに今回のR702C変異マウスの解析から、神経組織のなかでもとりわけ顔面神経核、橋核、小脳顆粒層の細胞が発生部位から最終到着部位へと細胞移動するのに重要な役割を果たしている事を明らかにしてきた。NMHC-Bは、神経組織のすべての細胞で発現しているのに、なぜこれらの細胞の移動に特異的な異常が起きるのであろうか。その理由をいくつか考察してみたい。顔面神経核、橋核、小脳の細胞は、脳幹のなかでも橋の屈曲により前後方向に最大の屈曲度を持つ部位から発生している。このため第4脳室は大きく変形しこの部位で背側が左右に開き菱形窩を形成する。この部位から発生する構造のなかで顔面神経核、橋核、小脳の3つの構造は、以下に示すように他の領域とは異なった特徴的な細胞移動により形成されている。

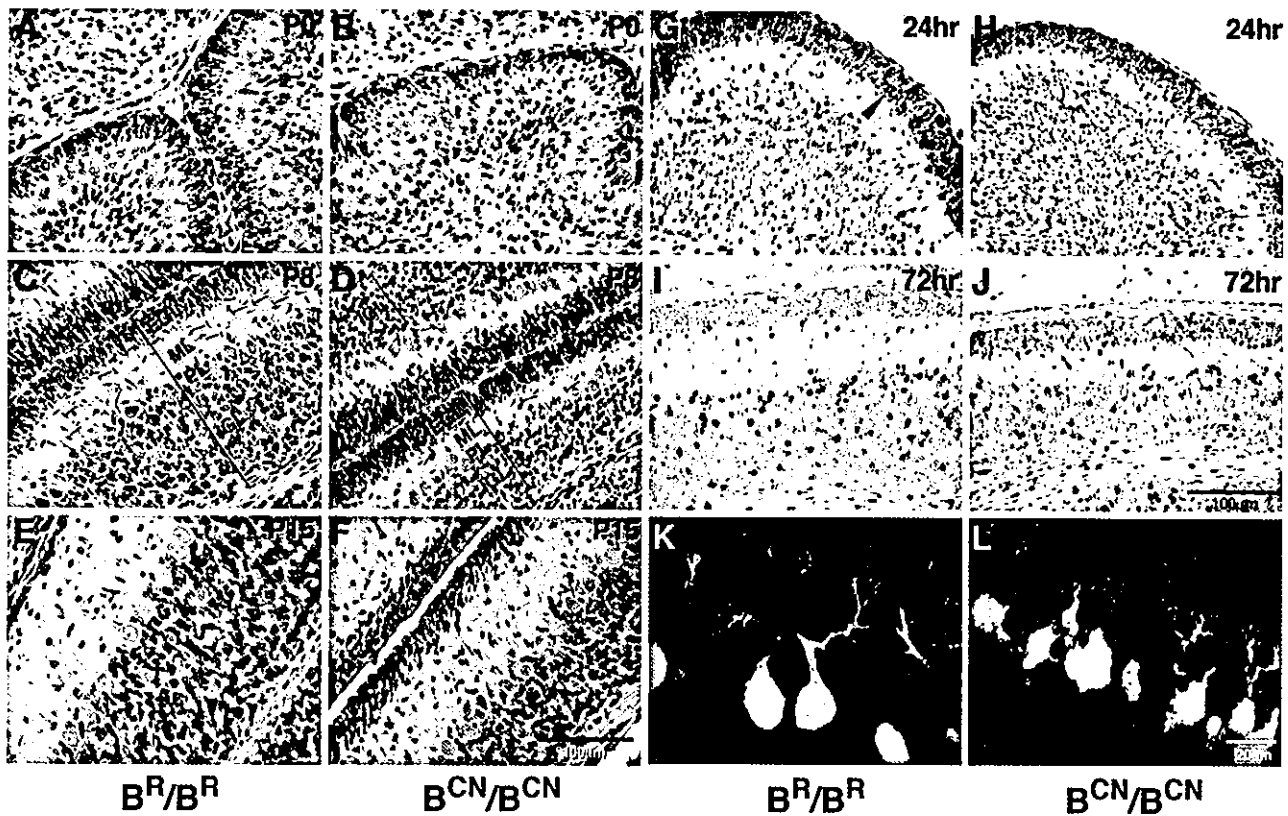


Fig 3 変異マウスの小脳顆粒細胞層の形成不全と細胞移動異常

(A-F) 生後0日、生後8日、生後15日の小脳の正中矢状断切片：野生型マウス (BR/BR) の外増殖細胞層の厚さは、P8で最大となりP15に2細胞層になり消失し顆粒細胞層が発達する。これに対しR702C変異マウス (BCN/BCN) の外増殖細胞層は生後15日なっても消失せずに残存し、顆粒細胞層の発達が悪い。(G-J) 生後6日にBrdU標識し、24時間、72時間後の小脳の矢状断切片：野生型マウスでは、BrdU標識細胞が標識後24-72時間の間に外増殖層から顆粒細胞層に移動する (G,I)。それに対し変異マウスでは、72時間後になっても標識細胞の50%は外増殖層の最内側にとどまり、顆粒細胞層に移動した細胞は50%にすぎない。(K-L)：生後8日の小脳矢状断切片のcalbindin免疫染色：正常マウスに比較して変異マウスのプルキンエ細胞は、樹状突起の分岐が悪く短い。

顔面神経核は菱形窩のなかでも最大の屈曲点から発生する。既に我々は、NMHC-Bが欠損すると細胞接着構造が消失し脳室壁が破壊され細胞が脳室内に突出する事を明らかにしてきた。この異常は脳室壁が屈曲する部位で最も高頻度に観察される。屈曲点では、神経上皮細胞の接着構造に強い力が作用しているためと推定される。脳室壁の屈曲による構造的な脆弱さが異常の第1原因と推定される。また顔面神経核の細胞は、はじめ延髄内を後方に水平移動し外転神経核の位置で向きを変え外腹側方向へと移動して形成される。移動細胞の後端突起は軸索として残り、その結果顔面神経繊維は延髄腹外側から背内側方向に走行し外転神経核をU字型に回って再び腹外側方向に向かい延髄をでる。このために神経繊維が伸びる時、外転神経核の背側で方向変換できなければ、軸索は背内側方向に圧力を形成する事になる。これが顔面神経細胞が脳室内に突出し細胞移動ができなくなった第2の原因と推定される。

橋核細胞は、胎生後期に後菱唇の発生部位から脳幹の外縁を回って菱脳前部の橋底部まで長い距離移動して形成される。胎生期の神経組織の外縁部は、細胞突起が分枝交錯し脳室壁に次いで細胞接着の強い領域である。移動細胞の先端突起は、この密に錯綜した細胞突起のなかで伸展し接着点を作り細胞核を引き寄せなければならない。そのため脳幹の外縁部を移動するには、脳実質内を移動するよりも強いミオシンモーター活性が要求されると推察される。事実R702C変異マウスでは、小脳前核のなかで外縁部を移動する橋核と橋網様体被蓋核、外側網様体核、外楔状束核の細胞が異常を示し、脳実質内を移動する下オリブ核の細胞にほとんど異常が認められない。

小脳は左右に広く開いた前菱唇から発生し、その細胞は脳室に面する神経上皮と表層の外増殖層で分裂増殖し複雑な細胞移動を経て形成される。R702C変異マウスを解析すると、外縁の外増殖層から発生する顆粒細胞には

大きな異常が認められるが、脳室に面する神経上皮から発生するプルキンエ細胞と深部の小脳核細胞には比較的異常が少ない。胎生期に外増殖細胞は菱唇の外側部から発生し小脳原基の表層を背内側へと移動し拡散する。この外増殖細胞が辺縁層を移動する様式は、橋核の移動様式と同じで、ミオシン活性が低下すると障害を受ける事が推察される。これが小脳形成不全の1つの原因と推察される。出生後外増殖細胞層で分裂を終えた顆粒細胞は内側へと移動するが、特徴的な突起伸長と細胞移動を示す。まず顆粒細胞の両側に皮質と平行に突起が伸び後の平行繊維を作る。その後細胞体は内側方向に向きを変え第3の突起先端が内側に伸び、細胞核を深部の顆粒細胞層へと牽引する。この複雑な細胞移動には、細胞突起や細胞核の高度な運動制御が必要であり、NMHC-Bミオシンが重要な役割を果たしている事が推察される。

#### E. 結論

NMHC-Bを完全に欠損しているマウスは、神経上皮細胞の接着異常により脳室壁が破壊され、胎生12日から脳奇形と水頭症が発症し胎生15日から出生直後にかけて死亡する。NMHC-Bのモーター活性の低いR702Cアミノ酸変異マウスは欠損マウスに比較してより軽度の選発性脳奇形と水頭症を発症し生後15日まで生存する。いずれの場合も第3脳室と中脳水道の境界部位の閉塞により脳脊髄液の循環が障害され水頭症を発症する。

R702Cマウスを用いて周生期の脳の発生異常を解析すると、顔面神経核、橋核、小脳の形成不全が認められ、これらの前駆細胞が正常に細胞移動できずに、発生部位や細胞移動経路の途上で異所性に集積している事が明らかとなった。第4脳室は、橋の屈曲により背側が左右に大きく開き複雑な構造をしている。この部位から発生する構造のなかでも、顔面神経核、橋核、小脳顆粒層の細胞は、複雑な方向変換を伴う移動、辺縁部での移動、外増殖層から内層への移動など複雑で特徴的な細胞移動と突起伸長を示す。このためこれらの細胞ではNMHC-Bの活性が低下すると、細胞突起の伸長、方向変換、退縮や細胞核の移動を高度に制御できなくなったものと推定される。

#### 謝辞

本研究は、米国NIH, Robert S. Adelstein博士との協同研究の成果である。

#### F. 文献

- 1) 原嘉信, 原由紀子; NMHC-Bミオシン遺伝子欠損マウスの水頭症発生機序 厚生省特定疾患難治性水頭症調査研究班 平成11年度研究報告書 2000, 26-29.
- 2) 原由紀子, 原嘉信; NMHC-Bミオシン遺伝子欠損マウス神経上皮細胞の微細構造と水頭症発症機序 厚生省特定疾患難治性水頭症調査研究班 平成12年度研究報告書 2001, 16-21.
- 3) 原由紀子, 原嘉信; NMHC-Bミオシン遺伝子欠損マウス水頭症発生機序 - 神経上皮細胞(神経幹細胞)の分裂・移動・分化の異常と細胞接着構造 - 厚生省特定疾患難治性水頭症調査研究班 平成13年度研究報告書 2002, 53-57.
- 4) 原嘉信, 原由紀子; NMHC-Bミオシン遺伝子欠損マウス水頭症発生機序 - 神経系細胞の細胞移動と組織形成における役割 - 厚生労働科学研究費先天性水頭症調査研究班 平成14年度研究報告書 2003, 102-105.
- 5) Tullio, A., Bridgman P.C., Tresser, N.J., Chan, C., Conti, M.A., Adelstein, R.S., Hara, Y. Structural Abnormalities develop in the brain following ablation of the gene encoding nonmuscle myosin II-B heavy chain. *J. Comp. Neurol.* 2001, 433 62-74.
- 6) 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.
- 7) Ma, X., Kawamoto, S., Hara, Y., Adelstein, R. A point mutation in the motor domain of nonmuscle myosin II-B impairs migration of distinct groups of neurons. *Molecular Biology of the Cell* 2004 15 2568-2579.



## KIAA0864 protein (RIP3) のトランスジェニックマウス、 ノックアウトマウス作製

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> 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>3</sup>  
産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門<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 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> 宮戸 健二<sup>3</sup> 宮本 潔子<sup>3</sup> 金村 米博<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

平成14、15年度の本班での研究で、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抗体が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、またこの抗体はKIAA0864protein (RIP3)を認識している事が解った。KIAA0864protein (RIP3)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解っていない。その遺伝子構造よりこの蛋白はPH domainを有し、guanine nucleotide exchange factor (GEF), GAP 類似の機能が示唆された。このような事項を背景に我々はKIAA0864protein (RIP3)のトランスジェニックマウスを作製する事にした。得られたトランスジェニックマウス（ヘテロ）の脳の病理学的解析を行ったところ大きな異常は見られなかったため現在ホモマウスの系統を作製中である。またノックアウトマウスも作製する事にした。ノックアウトマウスに関してはまだ作製過程で解析までにはいたっていないが途中経過を述べる。

### 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を目的としてトランスジェニックマウスの作製に着手した<sup>2</sup>。平成16年度はトランスジェニックマウス脳の病理組織的検索を行い、次にコンディショナルベクターを作製しノッ

クアウトマウスの作製に着手した。

### B. 研究方法

トランスジェニックマウスの作製法に関しては平成15年度に報告した<sup>2</sup>。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5mmの長さで切断し、迅速DNA抽出Kit (Sigma) で抽出した。初代のトランスジェニックマウスと正常マウスを交配し得られた2代目のトランスジェニックヘテロマウスを病理学的検索に用いた。離乳後すぐ、3ヶ月後、6ヶ月後、

1年後のトランスジェニックマウスと同年齢の正常マウスからの摘出脳を中性ホルマリンに固定し、前額断切片により型通りに組織標本を作製し、比較検討した。またHFB-16抗体による免疫染色を行った。またホモマウスを得るために2代目のトランスジェニックマウス同志を交配し、得られた3代目トランスジェニックマウスがホモかどうかをサザンブロット法で現在検索中。

ノックアウトマウス作製に関しては、まずKIAA0864protein (RIP3)のアミノ酸配列より考えられる構造図を作製しその機能を推定した。そしてRIP3のエクソン2・3はスクリーニングによって取れた領域であり、この領域をもちいてターゲティングベクターを作製した。またCreマウスとの交配をする事にした<sup>3)</sup>。その際に目的はRIP3のコンディショナルノックアウトであるので、1：相互組換えを起こしたアレルが野生型RIP3を発現すること。2：Creマウスとの交配後、lox配列で挟んだ領域が切り取られ、RIP3の発現が無くなること。の2条件を満たすようなコンストラクトを考えた。

(倫理面への配慮)

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

RIP3 トランスジェニックマウス脳の病理形態的検索

今までに得られた2代目のヘテロマウスの脳の病理形態的検索では、肉眼的にも組織的にも対照群と離乳後すぐ、3ヶ月後、6ヶ月後、1年後のトランスジェニックヘテロマウスとの大きな差は見られなかった。ただ1匹のトランスジェニックマウスの小脳で顆粒層細胞の構築異常 (migrationの異常) が示唆される所見が見られたが(図1)、1匹のみであったので確信できなかった。このような異常の有無の確認のため、現在2代目のヘテロマウス同志を交配しホモのトランスジェニックマウスを作製中である。

ノックアウトマウス作製

図2はRIP3ののアミノ酸配列<sup>4)</sup>より考えられる構造図で、データベースから得たRIP3のアミノ酸配列をもとに、各ドメインを色別に表したものの。中でもPH domainが目される。図3にターゲティングの流れを示した。まずRIP3の発現を止めるために、エクソン3に人為的に変異をいれた(エクソン3のDNA配列に強制的にストップコドンを入れた)。ただしこのままだと、

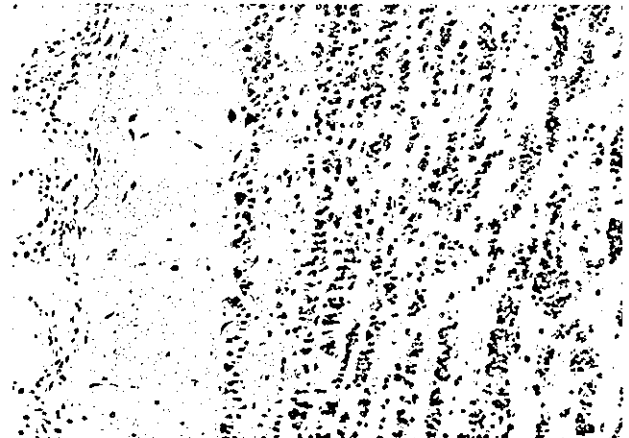


図1：1匹のトランスジェニックマウス小脳に見られた異常所見。

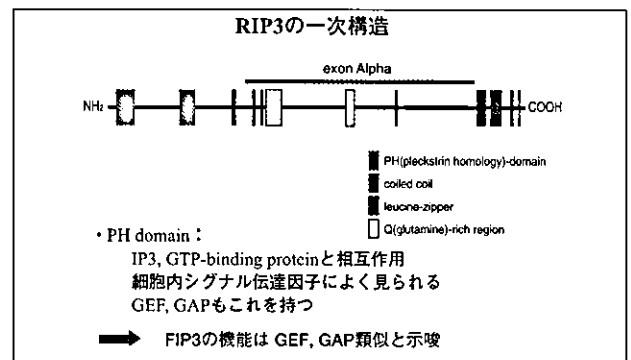


図2：RIP3のアミノ酸配列より考えられる構造図

図3

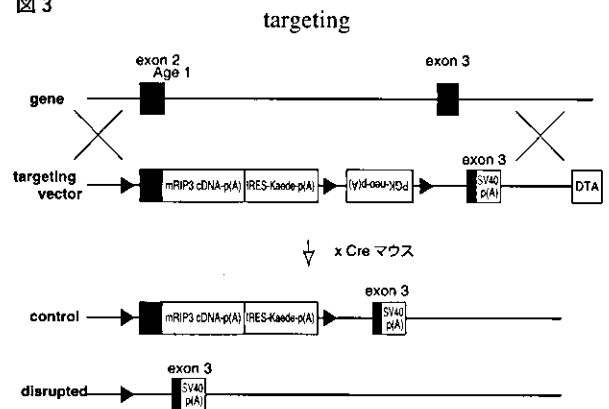


図3：ノックアウトマウス作製の為のターゲティングの流れ  
Creマウスと交配させる前の段階で野生型RIP3は発現しなくなり、conditionalにしたいという目的に適わないので、エクソン2の途中から繋がるようにRIP3 cDNA (エクソン2途中以降ストップコドンまで)を挿入することで、相互組換えを起こしただけのアレルからは野生型RIP3を発現するようにした。また、細胞運動の観察といったノックアウトマウスの解析に使用することを考えて、挿入するRIP3 cDNAに続けて蛍光タンパク質Kaedeを入れた。《エクソン2 +RIP3 cDNA+Kaede》

を lox 配列で挟んでおけば、Cre マウスとの交配後、この領域の DNA を持たないマウスを得られ、この領域をもたないマウスが、求める RIP3 conditional ノックアウトマウスということになる。現在はこのベクター作製の段階までである。使用予定の Cre マウスについては、nestin promoter - Cre と L7/pcp-2 promoter - Cre の 2 系統を考えている。

#### D. 考察

平成15年度の研究で、トランスジェニックマウス作製を行い、2代目マウスまでの解析を行ったが、1匹をのぞき生後1年まで脳の形態的異常は観察されなかった。したがって2代目のヘテロマウスを交配することによりホモマウスを得て、その分析を行う事にしたが、今回はまだその過程である。また KIAA0864 protein (RIP3) のアミノ酸配列より考えられる構造図で各ドメインを検索したが、中でも PH domain が注目される。これは IP3, GTP-binding protein と相互作用をし細胞内シグナル伝達因子によく見られるもので、guanine nucleotide exchange factor (GEF)、GAP もこれを持つ。したがって RIP3 の機能は GEF、GAP 類似と示唆される。GEF に関しては発育脳において神経細胞の発生、分化、移動等に重要な役割をもつ事が示唆されている<sup>5)</sup>。KIAA0864 protein (RIP3) 遺伝子に細工を施したアリルをもつマウスを nestin, L7/pcp-2 のプロモータを組み込んだ Cre 変異マウスと交配することにより、nestin は発生段階の中樞神経系前駆細胞などで発現が見られ、L7/pcp-2 はその機能は不明だが、出生後のプルキンエ細胞特異的に発現する遺伝子であるので nestin または L7/pcp2 の発現時期特異的に RIP3 を欠損するマウスを得ることができる。またさらにホモトランスジェニックマウスと交配させ、レスキューマウスを作製し分析することにより KIAA0864 protein (RIP3) 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、山本英幸、

宮戸健二、鈴木操、山田源、山崎麻美、岡野栄之：Purkinje cell の新しいマーカーとしての KIAA 0864 protein について。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 10-12, 2004.

- 3) Barski JJ, Dethleffsen K, Meyer M: Cre recombinase expression in cerebellar Purkinje cells. *Genesis* 28: 93-98, 2000.
- 4) Nagase T, Ishikawa K, Suyama M, Kikuno R, Hirose 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) Guo X, Stafford LJ, Bryan B, Xia C, Ma W, Wu X, Liu D, Songyang Z, Liu M: A Rac/Cdc42-specific exchange factor, GEFT, induces cell proliferation, transformation, and migration. *J Biol Chem* 2003 278:13207-15, 2003.

## L1細胞内領域リン酸化による神経軸索成長の制御機構

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

上口 裕之 仲田明日香

### 研究要旨

神経接着分子L1の細胞内領域には、少なくとも5カ所のリン酸化修飾部位が存在する。クラスリンアダプター分子AP2との結合領域（YRSL配列）近傍のセリン残基（1181番目）はカゼインキナーゼII（CKII）によりリン酸化されることが知られているが、このリン酸化の機能的意義は不明であった。今回我々は、CKIIの薬理的阻害剤（5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole）および変異型L1（S1181A、S1181E）を用いて、L1細胞内領域リン酸化の役割を明らかにした。

伸長過程にある軸索突起先端部（成長円錐）では、L1はアクチン線維と連結することにより細胞表面を後方に移動し、成長円錐中心部～後部でエンドサイトーシスされ、細胞内小胞輸送を介して成長円錐先端縁形質膜にリサイクルされる。このようなL1のエンドサイトーシスとリサイクルは、成長円錐の接着性の極性維持および軸索伸長に必須である。L1細胞内領域の1181番目のセリン残基のリン酸化を阻害すると、エンドサイトーシスされたL1が正常な輸送経路から逸脱し、かつL1による軸索伸長活性が減弱することが示された。よって、CKIIによるL1細胞内領域リン酸化は、L1エンドサイトーシス経路選択過程および軸索伸長に重要な役割を担うことが明らかになった。

### A. 研究目的

L1細胞内領域の遺伝子変異は、X連鎖性遺伝性水頭症および神経軸索路の発生異常を誘起することが知られている（Kamiguchi et al., 1998a）。L1細胞内領域には少なくとも5カ所のリン酸化修飾部位が存在する（Kamiguchi and Lemmon, 1997; Schaefer et al., 1999; Schaefer et al., 2002）。クラスリンアダプター分子AP2との結合領域（YRSL配列）近傍のセリン残基（1181番目）はカゼインキナーゼII（CKII）によりリン酸化されることが知られている（Wong et al., 1996）。平成16年度の研究は、このセリン残基リン酸化の機能的意義を明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

L1細胞内領域の1181番目のセリン残基をアラニンあるいはグルタミン酸に置換した変位型L1（L1SA、L1SE）を、一般的な遺伝子組み換え技術を用いて作製した。L1SAは非リン酸化型L1を模倣し、L1SEはリン酸化型L1を模倣すると考えられる。Hela細胞に野生型あるいは変異型L1を遺伝子導入し、細胞内での局在を間接免疫蛍光抗体法により解析した。細胞内に取り込まれたL1とトランスフェリンの局在解析は、過去に報告した実験方法を用いて行った（Kamiguchi et al., 1998b）。脊髄後根神経節神経細胞の培養および軸索突起伸長の定量的解析も、過去に報告した方法により行った（Kamiguchi and Yoshihara, 2001）。