

2. 頭部周囲長；head circumference (HC)の計測

久野らが日本人単胎児の頭部周囲長(HC)の計測値を報告している。HCの計測はBPDと同様の計測断面を描出し頭部周囲をトラッキングする。妊娠15週から40週までのHCの計測では、妊娠経過にともない10cmから30cmの幅で緩やかに増加を示す。

3. 側脳室／大脳半球比；lateral ventricular ratio (LVR)の計測

客観的に側脳室の拡大を観察する指標として側脳室／大脳半球比(lateral ventricular ratio; LVR)の計測が用いられる。側脳室を通る断面を描出し、正中線エコーから平行な側脳室の外側壁までの最大距離をlateral ventricular width (LVW)、平行な頭蓋骨内側までをcerebral hemispheric width (HW)として計測し、LVW/ HWとして算出する。日本人での報告は竹内らの報告があり、これも含めいずれの報告も妊娠初期ではばらつきが多く基準値の評価は困難である。しかしながら、25週をすぎてもLVRが50%以上を示す場合は側脳室の拡大が疑われ、将来の水頭症を示唆する所見とし妊娠経過を通じて注意深い観察が必要である。

また、直接側脳室atriumを計測し、その拡大を評価する方法もある。側脳室が描出される断面で計測し、妊娠中期から後期にかけて一定である(10mm未満)から10mm以上を拡大と考え、水頭症の可能性も含め注意深い観察を要する所見といえる

4. 小脳横径(CD)の計測

秦らが日本人での基準値を報告しており、またcisterna magnaの幅が10mm以上で拡張と考えられる。

5. 胎児中大脳動脈pulsatility index (PI)の計測

中大脳動脈PIは収縮期最高速度と拡張期最低速度の差を速度平均値で割り求められる。秋山らが正常妊娠の単胎児、双胎児のMCAのPI値を報告している。正常妊娠の単胎児、双胎児のMCAのPIは27～28週をピークにした緩やかな放物線を描いたが、品胎のMCAのPIは直線状となった。しかしながら、これらの値に有意な差は認められなかった。

D. 研究結果

超音波を用い胎児脳測定する意義は、計測値が示す値が、平均値よりどのくらい離れているかという偏差がわかれば超音波計測値による胎児の正常発育評価が理解しやすくなり、水頭症などの異常の時間経過のなかでの変

化や予後予測に有用と考えられる。今後も、胎児の先天性水頭症などの観察には形態学的な変化の把握は重要であるが、それに各基準値をあわせることで、診断精度の向上がはかれるものと期待される。

E. 総括

妊娠初期の胎芽頭部計測では妊娠初期における脳室間孔と中脳水道の発育に関する特徴が示され、将来の非交通性水頭症の発症予測に役立つ可能性が示唆された。三次元超音波法を用いた胎児小脳体積計測では、小脳の発育パターンの基準値が決定された。また、これまでに報告されている胎児脳における各パラメーターについても検討し、日本人での基準値と考えられるものを提示した。

これまでに我々は妊娠の各ステージにおいて最新の超音波技術を用い各種パラメーターとなりえるものを計測してきた。今後も技術的な進歩も含め非侵襲的な超音波診断が先天性中枢神経異常の早期診断、機能評価に大きな役割を果たして行くものと考え、さらなる症例の蓄積、検討を行っていく予定である。

拡散テンソルMR tractographyによる脳梁の発達解析

福岡大学医学部 放射線科

宇都宮英綱

研究要旨

MR tractographyにより正常小児の脳梁発達を解析した。脳梁軌跡の解析から脳梁峽を構成する線維は主として運動野（中心前回）から投射されると考えられた。また、脳梁膨大は他の部位よりも出生後精力的に発達すると思われた。さらに、脳梁のFA (fractional anisotropy) は年齢と共に上昇することが示された。このことから、脳梁の成長には脳梁線維からの側枝の発達が大きく関与するものと推察された。MR tractographyは脳梁の発達解剖の研究に大きく寄与すると期待される。

A. 研究目的

MR tractographyを用いて小児期脳梁の発達についてMR解剖学的な検討を行った。

B. 研究方法

対象は神経学的に明らかな異常を認めず、Routine MRIにて明らかな異常所見の見られなかった正常小児20例（5ヶ月～13歳；平均4.4歳）、男児9例、女児11例を対象とした。MRIはPhilips社製Gyrosan NT (1.0T)用い、拡散テンソル収集はSingle shot EPI, 4mm厚, FOV; 24cm, Matrix; 128×128, b=700, 6軸で行った。画像解析は東大医学部附属病院放射線科画像情報処理・解析研究室において開発されたVolume-oneとdTV1.5の組み合わせで行った。b=0画像の矢状断で脳梁全体にROIを設け脳梁の軌跡を描かせた。続いて脳梁を五等分し、それぞれのパート（①吻・膝部、②幹前部、③幹後部、④幹峽部、⑤膨大部）を目的ROIとして各々色分けした軌跡を描かせた。解析項目は（1）各パート軌跡が到達する大脳皮質

領域（前頭前野、運動前野、運動野、感覚野、頭頂連合野、後頭連合野、視覚野、側頭連合野）を同定した。（2）脳梁各パート軌跡数の脳梁全体の軌跡数に対する割合を算出し、年齢に伴う変化を解析した。（3）各パートのFA (fractional anisotropy) とADC (拡散係数) を計測、年齢に伴う変化を解析した。

C. 研究結果

- （1）脳梁膝の軌跡は前頭前野に、脳梁幹（前部、後部）は運動前野に、脳梁峽は運動野に分布した。脳梁膨大は感覚野、頭頂連合野、後頭連合野、視覚野、および側頭葉連合野に分布した。
- （2）各パート軌跡数の全脳梁に占める割合（パート率）は脳梁吻・膝部、脳梁幹（前部、後部、峽部）、脳梁膨大部でそれぞれ約1/3を占めた。脳梁吻・膝部と脳梁幹のパート率は年齢と共に減少したが、膨大部のパート率は年齢とともに増大した。
- （3）各パートのFAは脳梁膨大部で最も高く、次に脳梁吻・膝部で高く、脳梁幹で最も低かった。ADCは

これと逆の結果であった。また、FAは各パートで年齢と共に上昇した。尚、髄鞘形成の未熟な1歳未満の乳児を除いた16例でも年齢と共に上昇した。

D. 考察

脳梁線維は大脳新皮質の3層と6層の錐体細胞より投射される。皮質の各部位からの投射が脳梁のどの部位を構成しているかは未だ不明な部分が多く、特にヒトでは一定した見解がない。今回の研究では脳梁峡の部分が中心前回（運動野）から投射される可能性が示され、従来報告にはない新たな知見と思われた。また、このことから脳梁は膨大を除くほとんどの領域が前頭葉からの線維を含んでいることが示された。一方、各パート率の年齢に伴う変化から脳梁膨大は他の部位よりも年齢と共に増大することが示された。このことは、主として頭頂葉、後頭葉皮質の脳梁線維が前頭葉からの脳梁線維よりも年齢を追うごとに精力的に発達することを示唆するものと思われた。

FA値の年齢に伴う上昇は脳梁の拡散異方性が成長と共に増していることを示している。この原因としては、一つに脳梁の髄鞘形成の発達が考えられるが今回の検討では脳梁の髄鞘形成が完了した1歳以降においてもFAの上昇が認められた。したがって、FAの上昇には髄鞘形成以外の因子が関連していると考えられる。他の可能性のある説明としては、脳梁線維が年齢と共に密になることが考えられる。しかし、脳梁の基本構造は胎齢20週で決定するため、脳梁となる軸索は胎生期にすでに脳梁原基を通過を完了している。また、神経細胞の数も胎齢20週より増えないため、軸索が出生後増加するとは考えにくい。したがって、年齢に伴うFAの上昇は脳梁線維（軸索）からの側枝が生後も成長し続けていることを示しているものと考えられた。この結果はMR tractographyが出生後の脳の構造化の一部を捉えているものと考えられ、発達解剖学的に極めて重要な知見と考えられた。

E. 結論

- 1) MR tractographyにより脳梁の発達を解析した。
- 2) 脳梁峡は運動野（中心前回）からの線維により構成されると考えられた。
- 3) 脳梁膨大は他の部位よりも年齢と共に精力的に発達すると考えられた。
- 4) 脳梁線維（軸索）は出生後も側枝を伸ばし、成長を

続けると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) 画像診断に必要な脳脊髄の発生と発達。臨床指南小児神経放射線学 pp20-37、2004
 - 2) 全前脳胞症における全球脳の形態発生とMRI所見。脳神経外科ジャーナル 13(6), 454-464, 2004.
2. 学会発表
 - 1) シンポジウム1「拡散テンソル画像法の基礎と臨床」－脳梁欠損症のMR tractography：Probst bundleの解析を中心に。第33回日本神経放射線学会
 - 2) 神経系の発達：神経放射線診断に必要な解剖学1. JCR 2004年度 ミッドサマーセミナー

先天性水頭症ガイドライン作成に向けての 全国疫学調査結果総括

島根大学医学部 脳神経外科¹ 名古屋大学大学院・医学研究科予防医学・医学推計・判断学²
香川大学医学部母子科学講座周産期学婦人科学³ 国立病院大阪医療センター 臨床研究部・脳神経外科⁴

森竹 浩三¹ 宮崎 健史¹ 永井 秀政¹ 長廻 紀子¹
玉腰 暁子² 秦 利之³ 山崎 麻美⁴

研究要旨

研究班最終年度にあたり先天性水頭症全国疫学調査結果に改めて分析を加え臨床転帰と先天性水頭症患者の分娩・手術時期ならびに脳室拡大の程度との関係を調べガイドライン作成の資料の一部とした。疫学調査研究への協力を得た施設に疫学調査結果の報告書を送付し謝意を表した。

1. 臨床転帰から見た先天性水頭症患者の分娩・手術時期

前年度までの先天性水頭症全国疫学調査（2000）の結果を踏まえ、患者の分娩・手術時期と臨床転帰との関係をさらに詳しく分析した。そして、肺未熟段階で出生した患者のシャント治療の転帰は明らかに不良で、未熟児では晚期シャント手術例ほど、また成熟児では早期シャント手術例ほど転帰は良好との結果を得た。

この結果から、

- 1) 肺成熟段階以前の超早期出産による出生後手術は避け、在胎期間をできるだけ延長し肺成熟段階に入ってからシャント術を施行すべきである。
- 2) シャントに使用するシステムは、圧可変式のものが新生児期の水頭症病態、手術合併症発生率などの観点から最も適している。

と結論した。

2. 先天性水頭症における脳室拡大の程度と臨床転帰の関係

先天性水頭症全国疫学調査（2000）結果を改めて分

析し、脳室拡大の程度がシャント術後成績に及ぼす影響を胎児期に診断されたもの（胎児期水頭症）と出生後12ヶ月までに診断されたもの（乳児期水頭症）に分けて検討した。

その結果、胎児期水頭症、乳児期水頭症いずれにおいても、

- 1) 脳室拡大の高度例は中等度例と比較し転帰不良例が有意に高率に存在した。
- 2) 脳室拡大の軽度～中等度例ではシャント術による臨床転帰の有意な改善は示さなかったが、高度脳室拡大例では転帰不良の例の割合が有意に減少していた。

以上の結果より水頭症診断時の脳室拡大の程度は、有効な予後判定因子となりうることを示唆され、i) 少なくとも脳室拡大が軽度～中等度の段階では性急にシャントを実施すべきでなく、ii) 経過観察しつつ脳室拡大が進行した場合にシャントに踏み切るべきで、また、iii) 高度脳室拡大例では早期シャント施行によりその転帰の悪化を軽減しうる、と結論した。

3. 「先天性水頭症」調査研究班疫学調査研究15年の軌跡

これまで、菊池、森、そして山崎の各難治性水頭症研究班を通し行われてきた疫学調査を概観した。次いで山崎班では初めて班構成員に出生前、周産期の診療、医の倫理、患者・家族支援などをそれぞれ専門とする研究者の参加を得ていることを念頭にこれまでの調査結果を再度見直し、共通部分は経年的推移の解析に、それ以外はそれぞれの観点から改めて検討し直した。そしてより広いコンセンサスで今回のガイドライン作成の際の根拠を提供し得たと考えている。先天性水頭症のこの15年間の年間発生率は上記結果から出生1000当たり患者数として0.2~0.4で大きい変化のないことも明らかにした。

4. 疫学調査協力施設への研究報告書送付

疫学調査に特に協力して頂いた施設、具体的には二次調査（個人票調査）に対して回答のあった154施設に、研究班平成14年度ならびに平成15年度の総括・分担研究報告書を送付（平成16年9月24日）し、疫学調査への協力を深謝した。

研究発表：学会発表

- 1) 上村岳士、森竹浩三、玉腰暁子、山崎麻美：先天性水頭症全国疫学調査・出生時期と手術時期による臨床像の比較。第30回日本小児神経外科学会、平成14年6月（旭川）
- 2) 上村岳士、宮寄健史、森竹浩三、玉腰暁子、山崎麻美：先天性水頭症における全国疫学調査・出生時期および手術時期による臨床像の比較。第61回日本脳神経外科学会総会、平成14年10月（松本）
- 3) Moritake K, Uemura T, Tamakoshi A, Yamasaki M: Comparison of clinical outcome of fetal hydrocephalus in Japan in relation to time of delivery and time of operation. The 30th Annual Meeting of International Society for Pediatric Neurosurgery, Kyoto, 2002.
- 4) 宮寄健史、上村岳士、森竹浩三、宮嶋雅一、大井静男、山崎麻美：臨床転帰からみた胎児期水頭症の分娩・手術時期 —全国疫学調査結果から—。第7回日本水頭症治療シンポジウム、平成15年6月（出雲）
- 8) 宮寄健史、森竹浩三、長廻紀子、赤水真希子、朝山玲子、山崎麻美：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—先天性水頭症調査研究班全国疫学調査（2000）結果より—、第32回日本小児神経外科学会、平

厚生労働科学研究費補助金「先天性水頭症」調査研究班
平成14年度～16年度総合研究報告書

胎児中枢神経系エコーの系統的観察法の確立に関する研究

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

松井 潔

研究要旨

背景：胎児中枢神経系エコーの系統的観察法は確立されていない。

方法：（１）測定項目は透明中隔腔最大幅、側脳室前角・半球比、体部・半球比、後角・半球比、第三脳室最大幅、第四脳室縦・横幅、小脳半球横径、大槽の９項目の妊娠週数別（15～20週未満、20～25週未満、25～30週未満、30～35週未満、35週以降）の基準値を作成する。（２）主要な胎児期水頭症・脳奇形の異常パターンを分析する。

結果：（１）455例の正常例より測定項目の10%タイル値、50%タイル値、90%タイル値を作成できた。（２）二分脊椎、二分頭蓋、致死性四肢短縮、中脳水道狭窄、胎児脳室内出血、孤立性脳梁欠損、全前脳胞症、18トリソミー、Dandy-Walker奇形・異型の異常パターンを明らかにすることができた。

結論：形態的観察に加えて脳室系を中心とする諸計測を行うと、より正確な胎児期水頭症・脳奇形の診断が可能となる。

A. 研究目的

胎児中枢神経エコーの系統的観察の確立のため基準値を作成し、Evidence-basedな胎児期水頭症・脳奇形の診断プロセスを確立すること。

B. 研究方法

・スクリーニング検査でおこなった胎児中枢神経系エコーで異常所見を認めなかった例を対象に基準値を作成する。測定項目は透明中隔腔最大幅、側脳室前角・半球比、体部・半球比、後角・半球比、第三脳室最大幅、第四脳室縦・横幅、小脳半球横径、大槽の9項目とする。15～20週未満、20～25週未満、25～30週未満、30～35週未満、35週以降の5群に分類し、10%、50%、90%タイル値を作成する。

・中脳水道内腔は測定が困難なため観察項目とし、内腔虚脱(線状・点状)、内腔確認(正常)、内腔拡大の3つに分類して評価した。

・頻度の高い二分脊椎、二分頭蓋、致死性四肢短縮、中脳水道狭窄、胎児脳室内出血、孤立性脳梁欠損、全前脳胞症、18トリソミー、Dandy-Walker奇形・異型の9疾患について上記検査項目の異常パターンを明らかにする。

C. 研究結果

1. 基準値の作成と判定（産婦人科の実際2004；53：1503-1510参照）：90%タイル値より大きいとき、10%タイル値より小さいときに異常所見とした。
2. 異常パターンからみた診断の実際：透明中隔腔が確認できれば孤立性脳梁欠損と全前脳胞症は否定でき

る。透明中隔腔が確認できないときは、全前脳胞症と脳梁欠損の可能性がある。両者の鑑別は、視床癒合の有無、第3脳室の形成の有無、単一脳室の有無により可能である。二分脊椎では開窓化をきたす例があるため単一脳室様に見え、視床間橋肥大による視床癒合様所見が合わさると全前脳胞症と間違いやすく注意を要する。しかし、二分脊椎はキアリ奇形を示唆する中脳水道内腔虚脱・第四脳室虚脱・大槽消失の三徴があるので鑑別できる。全前脳胞症や中脳水道狭窄では水頭症が進行して小脳が下方へ圧排されても第四脳室虚脱・大槽消失はきたさない。大槽消失は後頭蓋窩狭小化する致死性四肢短縮や二分頭蓋の一部でも観察される。第三脳室は二分脊椎、中脳水道狭窄、二分頭蓋、胎児脳室内出血、一部の脳梁欠損等多くの疾患で拡大するのでスクリーニングに有用である。中脳水道は二分脊椎、中脳水道狭窄、多くの胎児脳室内出血で虚脱する。内腔拡大をきたす疾患は少ないが致死性四肢短縮、一部の胎児脳室内出血で認める。後者は第四脳室出口の閉塞によるため第四脳室も拡大する。第四脳室の拡大する疾患はDandy-Walker奇形と異型である。前者は第四脳室が大きな嚢胞状拡大を呈し、小脳虫部欠損と小脳テント挙上を認める。Dandy-Walker奇形・異型のテント上所見は様々である。大槽拡大はDandy-Walker異型、18トリソミー、脳梁欠損、くも膜嚢胞、巨大大槽で認める。小脳横径は正常であることが多く鋭敏度が低い。小脳横径短縮は二分脊椎、二分頭蓋、中脳水道狭窄、全前脳胞症、18トリソミー、Dandy-Walker奇形・異型の一部で認める。

D. 考察

胎児中枢神経系エコーの系統的観察は確立されていない。エコーをする医師・技師は自身の経験や典型的な例や最近経験した例からの発想といった「近道思考」によって「疾患」を診断しようとする。そうではなく主要な脳構造の「測定値の異常」として紹介していただくほうが二次病院としては有り難い。すなわち「第三脳室が4mmと拡大している」、「大槽が10mmと拡大している」といった所見で紹介されることが理想的である。

透明中隔腔、第三脳室、第四脳室、大槽の週数群別基準値は本邦に今までなかった。また、側脳室を前角、体部、後角に分けた基準値も存在しない。455例の正常例

から作成した基準値なので信頼性は高いと考える。

E. 結論

経験の浅い医師・技師でも安定した胎児エコーのスクリーニングができるような系統的アプローチ法を開発した。現在、神奈川胎児研究会に参加させていただき、講習会をおこなっている。適切な両親への説明と児の周産期管理を行うために役立つと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 松井潔、猪谷泰史、山中美智子、他。胎児中枢神経系エコーにおける基準値の作成と各種脳奇形の異常パターンの検討—近道思考から生体計測へ— 産婦人科の実際 2004;53:1503-1510.
- 2) 松井潔。脳神経系のMRI/周産期脳障害。小児科診療 2003;66:49-58.
- 3) 石原健一、松井潔、猪谷泰史。経時的第三脳室計測による水頭症治療効果の評価。小児科学会雑誌 (印刷中)。
- 4) 石原健一、松井潔、他。水頭症における経時的第三脳室計測の有用性について。第29回新生児神経研究会。
- 5) 松井潔。周産期センターに入院した抗てんかん剤による二分脊椎の頻度と特徴。第38回日本てんかん学会。
- 6) 太田真樹、松井潔、猪谷泰史、佐藤博信、関戸謙一。抗てんかん剤服薬妊婦から出生したNICU入院児の検討—てんかん女性に十分なカウンセリングは行われているか?—第40回小児神経学会関東地方会。
- 7) 松井潔、猪谷泰史、後藤彰子 (新生児未熟児科)、平吹知雄、山中美智子。胎児中枢神経系エコーにおける測定基準値の作成およびそれに基づく各種脳奇形の異常パターン。第39回日本新生児学会。
- 8) 松井潔、他。胎児脳エコー基準値に基づく脳奇形の異常パターン第2報：脳瘤と致死性四肢短縮。第40回日本周産期・新生児医学会。
- 9) 松井潔、他。胎児脳エコー基準値に基づく主要疾患の異常パターン第3報：胎児脳室内出血と全前脳胞症。第40回日本周産期・新生児医学会。
- 10) 松井潔、猪谷泰史、後藤彰子、山中美智子、平吹知雄、橋本栄、瀬戸山琢也、関戸謙一、佐藤博信、田中正顕、山崎雄一郎、前野豊、町田治郎。胎児二分脊椎の胎児中枢神経系エコーの検討—出生前からの包括医療— 第21回日本二分脊椎研究会。

- 11) 松井潔、関戸謙一、佐藤博信、田中正顕。周産期センターにおける先天性・後天性水頭症の検討（10年間の検討）第32回日本小児神経外科学会。
- 12) 松井潔、柴崎淳、渡辺達也、井合瑞江。周産期センターに入院した二分脊椎患児10年間のまとめ。第46回日本小児神経学会。

Ⅲ. 分担研究報告（基礎・病理・遺伝子解析部門）

厚生労働科学研究費補助金「先天性水頭症」調査研究班
平成14年度～16年度総合研究報告書

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

ショウジョウバエで1994年に初めて同定されたMusashi (Msi)は、末梢感覚神経の前駆細胞における非対称性分裂を担うRNA結合蛋白質としての機能が明らかになった。また、哺乳類における解析が行われ、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年に同定された。その後、Msi1と相同性の高い配列を持つMusashi2 (Msi2)が2001年に同定され、これらの機能解析によって、Msiファミリー蛋白質の機能と先天性水頭症の発症メカニズムとの相関が明らかになってきた。*msi1*遺伝子を欠損させたマウスを作成したところ、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の一つ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*遺伝子欠損マウスを作成し、交配によって*msi1*遺伝子のホモ欠損マウスを得たところ、生後2ヶ月以内に閉塞性の先天性水頭症を発症して死亡したため、この病態を組織学的・分子生物学的に詳細に解析した。また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、同様の解析を行った。また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、Msi1およびMsi2の協調的な役割の解析を行った。

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、分子生物学的な手法を用いて結合するRNAについての解析を行い、遺伝子欠損マウスから得られる初代培養細胞を用いた解析によって神経幹細胞や神経細胞の機能的な側面からの分析を行った。成体まで生きる遺伝子欠損マウスについては、行動学的解析も追加して行った。

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光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて行ったところ、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。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。

(4) RNA結合蛋白質であるMsi1の標的遺伝子の解析を行った。その結果、標的としてmNumbが発見され、mNumbのmRNAの3'非翻訳領域に結合して、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。

(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ものであると考えられた。これは標的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ると考えられた。*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っ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。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 (*ptn*) が同定された。*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。

以上から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は関与していないことは明らかとなったが、*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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakakibara, S., Nakamura, Y., Koike, M., Takano, H., Uchiyama, Y., Noda, T. and Okano, H.: RNA-Binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 99, 15194-15199, 2002.
- 2) Okano, H, Imai, T, Okabe, M: Musashi: a translational regulator of cell fates. *J Cell Sci.* 115, 1355-1359, 2002.
- 3) Ishizuya-Oka A., Shimizu K., Sakakibara SI., Okano H. and Ueda S.: Thyroid hormone-upregulated expression of Musashi-1 is specific for progenitor cells of the adult epithelium during amphibian gastrointestinal remodeling. *J. Cell Sci.* 116: 3157-3164, 2003.
- 4) Kayahara T., Sawada M., Takaishi S., Fukui H., Seno H., Fukuzawa H., Suzuki K., Hiai H., Kageyama R., Okano H., and Chiba T.: Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Letter* 535, 131-135, 2003.
- 5) Murata J, Murayama A, Horii A, Doi K, Harada T, Okano H, Kubo T.: Expression of Musashi1, a neural RNA-binding protein, in the cochler of young adult mice. *Neurosci Lett* 354: 201-204, 2004.
- 6) 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

2. 学会発表

- 1) SHIBATA S, SAKAKIBARA S, IMAI T, OKANO HJ, OKANO H. "in vivo function of Musashi family in mammalian CNS development" Society for Neuroscience 2004, 2004, San Diego, USA.
- 2) SHIBATA S, SAKAKIBARA S, IMAI T, OKANO HJ, OKANO H. "Roles of RNA-binding protein Musashi

family in mammalian CNS development." Annual meeting of Japan Neuroscience Society (Osaka, Japan), 2004.

- 3) SHIBATA S, SAKAKIBARA S, IMAI T, OKANO HJ, OKANO H. "Roles of RNA-binding protein Musashi family in mammalian CNS development." RNA International Symposium 2003 (Kyoto) "The New Frontier of RNA Science" 2003.
 - 4) SHIBATA S, SAKAKIBARA S, IMAI T, OKANO HJ, OKANO H. "Roles of Musashi family in mammalian CNS development." 26th Annual meeting of Japan Neuroscience Society (Nagoya), July, 2003.
 - 5) SHIBATA S, SAKAKIBARA S, NODA T, OKANO H. "Roles of Musashi family in mammalian CNS development." 25th Annual Meeting of The Molecular Biology Society of Japan (Yokohama), 2002.
- 他 多数

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案録 特になし
3. その他 特になし

神経接着分子L1とアンキリンによる神経突起成長・極性維持機構

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

研究要旨

神経接着分子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。本研究事業により、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が明らかになった。

A. 研究目的

神経突起成長・極性維持過程におけるL1とアンキリンの機能を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

アンキリンBあるいはアンキリンGノックアウトマウスおよび野生型マウス由来培養神経細胞を用いて、神経突起成長の定量的解析、蛍光標識蛋白の細胞内局在と動態の解析、蛍光共鳴エネルギー移動を指標とした細胞内蛋白分子間相互作用の定量的可視化、光ピンセットを用いた粒子追跡法などの細胞生物学的実験方法により研究を行った。

C. 研究結果

アンキリンBは、神経細胞体周囲膜様突起・糸状突起内を求心性に移動するアクチン線維(アクチン後方移動)とL1細胞内領域を連結し、アクチン後方移動により発生した牽引力を細胞外環境に伝達する役割を担う。このように、アンキリンBはクラッチ分子として機能して神経突起形成を促進することが示された。L1とアンキリン

Bの結合を阻害するL1細胞内領域の遺伝子変異は、クラッチ接続を阻害することにより神経軸索路の形成異常を引き起こすことが示唆された。

アンキリンGとその結合蛋白である β IVスペクトリンは、軸索起始部で物理的障壁を構成し、軸索突起形質膜に存在する膜蛋白が細胞体樹状突起へ拡散するのを抑制することにより神経突起の極性維持に関与することが示された。

D. 考察

L1細胞内領域遺伝子変異により誘起されるX連鎖性遺伝性水頭症の臨床病理学的所見の一部は、L1とアンキリンの結合阻害で説明できる。今後は、アンキリンの遺伝子変異が同様の神経発生異常の原因となるか否かを検証していく必要がある。

E. 結論

アンキリンBはクラッチ分子として神経突起成長を制御し、アンキリンG/ β IVスペクトリンは拡散障壁として神経突起極性維持に関与することが明らかになった。また、L1とアンキリンの結合阻害がX連鎖性遺伝性水頭

症の発症機構に関わるものが強く示唆された。

F. 研究発表 (論文)

- 1) Nakai Y, Kamiguchi H: Migration of nerve growth cones requires detergent-resistant membranes in a spatially defined and substrate-dependent manner. *J Cell Biol* 159: 1097-1108, 2002.
- 2) Nishimura T, Fukata Y, Kato K, Yamaguchi T, Matsuura Y, Kamiguchi H, Kaibuchi K: CRMP-2 regulates polarized Numb-mediated endocytosis for axon growth. *Nat Cell Biol* 5: 819-826, 2003.
- 3) Nishimura K, Yoshihara F, Tojima T, Ooashi N, Yoon W, Mikoshiba K, Bennett V, Kamiguchi H: L1-dependent neuritogenesis involves ankyrinB that mediates L1-CAM coupling with retrograde actin flow. *J Cell Biol* 163: 1077-1088, 2003.
- 4) Itoh K, Cheng L, Kamei Y, Fushiki S, Kamiguchi H, Gutwein P, Stoeck A, Arnold B, Altevogt P, Lemmon V: Brain development in mice lacking L1-L1 homophilic adhesion. *J Cell Biol* 165: 145-154, 2004.

NMHC-Bミオシン変異マウスの水頭症発症機序に関する研究

神経発生研究所¹ 杏林大学医学部病理学²

原 嘉信¹ 原 由紀子²

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。胎児性水頭症を示すNMHC-B欠損マウスと遅発性水頭症を示すNMHC-Bのモーター活性の低いR702Cマウスを用いて脳奇形と水頭症の発症機序を解析した。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が明らかとなった。そこでNMHC-Bの神経組織の発生における役割を解析し、NMHC-Bが欠損すると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異常を示す事を明らかにした。またNMHC-Bの活性が低下すると神経細胞の移動や突起伸展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展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。

A. 研究目的

進行の早い胎児性脳奇形と水頭症を示すNMHC-Bミオシン完全欠損マウスと周生期に遅発性脳奇形と水頭症を発症するNMHC-Bのモーター活性の低い変異マウスを用いてその発症機序を明らかにする。

B. 研究方法

NMHC-Bミオシン遺伝子欠損マウスとNMHC-Bミオシン頭部のATPase活性部位にR702Cのアミノ酸変異を持ちモーター活性の低いマウスを作成して用いた。これらのマウスの脳連続切片をHE染色と免疫染色して解析した。

C. 研究結果

NMHC-Bを完全に欠損しているマウスは、胎生12日

から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、周生期に遅発性水頭症を発症し生後15日まで生存する。R702C変異マウスの脳の連続切片を組織学的に調べると完全欠損マウスに比べて症状が軽く遅く進行するが基本的によく似た異常を示す。すなわち最初に脳室壁の破壊が始まりその結果種々の脳奇形が進行するが、最終的には第3脳室と中脳水道の境界部位が狭く閉塞する。この部位が閉塞すると水頭症が急速に進行し脳室の拡大と脳組織の2次的な変性と破壊が観察された。この結果よりこのマウスでは脳室壁の発生異常と脳奇形が水頭症の第1原因と考えられる。

そこでまずNMHC-B欠損マウスの初期神経発生を解析した。このマウスは、胎生10.5日で既に脳室壁の細胞接着に異常を示し、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異常を示

した。胎生12.5日ではとりわけ第4脳室の屈曲部や第3脳室と中脳水道の境界部位に脳室壁の変性と破壊が顕著に観察される。これが原因でこれらの部位で重度な脳奇形や脳室閉塞が起きると推察される。

次にR702Cマウスを用いて周生期の脳の発生異常を解析すると、第4脳室の神経上皮から発生する顔面神経核、橋核、小脳に特異的な形成不全が認められ、脳の他の領域ではこれほど顕著な形成不全は認められない。そこでこれらの構造の発生過程を解析し、いずれの場合も前駆細胞が発生部位や細胞移動経路の途上で異常に集積し最終部位まで正常に移動していない事が明らかとなった。この細胞移動異常が形成不全の原因と考えられる。

D. 考察

NMHC-Bの欠損や活性低下により脳室壁の変性破壊が広く認められるが、脳室のなかでもとりわけ第3脳室と中脳水道の境界部や第4脳室の屈曲部位に最も顕著な異常が認められる。第3脳室と中脳水道の境界部は、胎生初期に広く開いているがその後急速に収縮する。また第4脳室は橋の屈曲により前後方向に鋭角で屈曲し、背側部が左右に開いて複雑な構造をしている。これらの部位では、NMHC-Bが関与する細胞接着機能の異常により、脳室壁が収縮や屈曲による圧力に耐えられず変性破壊されたものと推察される。

NMHC-B活性低下マウスでは、第4脳室の神経上皮から発生する顔面神経核、橋核、小脳に特異的な形成不全を示し、前駆細胞が最終部位へと移動する過程に障害を持つ。これらの前駆細胞は構造の複雑な第4脳室から発生するため特徴的な移動経路と突起伸展様式を持つ。顔面神経核の移動細胞は、外転神経核の背側で腹外側に方向を変えて移動し、後端突起は背内側に伸展し外転神経核の背側でU字上に回り腹外側に伸展する。また橋核の細胞は脳の実質内を移動する他の細胞とは異なって、細胞突起が密に分枝交錯している脳外縁部を移動する。さらに小脳顆粒細胞は小脳の外縁部を移動して形成される外増殖層で発生し、両側に小脳皮質と平行に突起を伸ばし、その後細胞体は内側のプルキンエ細胞の深部に移動する。これらの高度に複雑な細胞移動と突起伸展には、細胞突起と細胞核の運動に高度な制御が必要と考えられ、NMHC-Bが他の領域にまして重要な役割を果たしていると考えられる。

E. 結論

胎児性水頭症を示すNMHC-B欠損マウスと遅発性水頭症を示すNMHC-Bのモーター活性の低いR702Cマウスを用いて脳奇形と水頭症の発症機序を解析した。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を発症した。

NMHC-Bが欠損すると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異常を示す。またNMHC-Bの活性が低下すると神経細胞の移動や突起伸展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。これらの結果はNMHC-Bが神経組織の細胞移動と突起伸展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。

F. 研究発表

- 1) 原嘉信、原出紀子：NMHC-Bミオシン遺伝子欠損マウスの水頭症発生機序 - 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.
- 2) 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.

厚生労働科学研究費補助金「先天性水頭症」調査研究班
平成14年度～16年度総合研究報告書

ヒト発育脳における新しい組織マーカーに関する研究

聖マリア病院病理部¹ 久留米大学医学部化学² 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³
産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門⁴
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⁵
国立病院大阪医療センター 脳神経外科⁶ 慶應義塾大学医学部生理学教室⁷

中村 康寛¹ 山本 統彦² 小田えり子² 宮戸 健二³ 宮本 潔子³ 金村 米博⁴
鈴木 操⁵ 山田 源⁵ 山崎 麻美⁶ 岡野 栄之⁷

研究要旨

ヒト発育脳の新しい組織マーカーを求めて、ヒト胎児脳のhomogenatesを抗原として数種類のモノクローナル抗体を作製した。そのうちHFB-16抗体は脳に比較的特異的に発現し、発育大脳での組織マーカーであるとともに、特に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がわかった。さらにこの抗体は機能が未知のKIAA0864protein (RIP3) を認識している事が解った。したがってこの蛋白の機能解明のためにトランスジェニックマウスとノックアウトマウスを作製する事とした。得られたトランスジェニックマウスでは一部に小脳の異常が見られたが、ノックアウトマウスはまだその作製過程である。

A. 研究目的

ヒト発育脳の新しい組織マーカーを得て、それを発育脳の解析に応用する事、そしてその機能を解析する事を目的とする。

B. 研究方法

ヒト胎児脳のhomogenatesを抗原としてモノクローナル抗体を作製し、それをを用いてヒト発育脳の組織切片を免疫染色しその組織分布を調べた。そのうち脳に特異的にかつ構成細胞・組織に特異的なものを選別し、その抗体が認識する抗原蛋白を同定するためにexpressional cloningを行った。その結果得られた抗原蛋白のcDNAを購入し、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、トランスジェニックマウスを作製し、脳の組織的検索を行った。またノックアウトマウス作製に関してはKIAA0864protein (RIP3) のエクソン2・3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。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。

C. 研究結果

HFB-16抗体を用いた免疫染色で、発育大脳のRadial fiberを含めた種々の構造認識するばかりでなく、小脳ではプルキンエ細胞、その樹状突起、軸索を特異的に認識

する事がわかった。したがってこの抗体を用いて正常発育小脳でのプルキンエ細胞の発育を詳細に検討できた。また小脳の異所性ニューロンでもプルキンエ細胞型のみを認識する事がわかった。

expressional cloningの結果HFB-16抗体が認識する抗原蛋白はKIAA0864protein(RIP3)であることがわかった。この蛋白の機能はまだわかっていないので、トランスジェニックマウス、ノックアウトマウスを作製して機能の解析を行う事としたが、トランスジェニックマウスは現在3代目が得られ、ホモマウスを同定し、ホモマウス同志を掛け合わせる系を得ようとしている所である。1代目、2代目のトランスジェニックマウス(多分ヘテロ)数匹からえられた脳の組織学的検索で、2匹の小脳に顆粒細胞層の形態異常がみられ、顆粒細胞のmigrationの異常が示唆された。詳細は今後解析の予定。

ノックアウトマウスに関しては、現在ベクターの作製中。

D. 考察

HFB-16抗体が認識する蛋白はKIAA0864protein(RIP3)であることがわかり、これはそのアミノ酸配列より考えられる構造よりguanine nucleotide exchange factor(GEF)、GAPと類似の機能を有する事が考えられる。またプルキンエ細胞で重要な機能を有することが考えられるが、トランスジェニックマウス脳の解析ではむしろ顆粒細胞のmigrationの異常と考えられる所見があり、プルキンエ細胞と顆粒細胞の相互作用に関与しているのかもしれない。ノックアウトマウスの解析、さらには両者を用いてのレスキュー解析で何らかの結論がでる事が期待される。

E. 結論

HFB-16抗体は発育小脳のプルキンエ細胞の良いマーカーであり、それが認識する抗原蛋白はKIAA0864protein(RIP3)であり、この蛋白の発育脳における機能解明が待たれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasuhiro Nakamura, Munehiko Yamamoto, Eriko Oda, Atsuyo Yamamoto, Yonehiro Kanemura, Masayuki Hara, Akira Suzuki, Mami Yamasaki, Hideyuki Okano: Expression of tubulin beta II in neural stem/progenitor

cells and radial fibers during human fetal brain development. Lab Invest 83:479-489 2003.

- 2) Yasuhiro Nakamura, Munehiko Yamamoto, Eriko Oda, Yonehiro Kanemura, Eri Kodama, Atsuyo Yamamoto, Hideyuki Yamamoto, Kenji Miyado, Hiroataka James Okano, Ryouji Fukagawa, Koichi Higaki, Mami Yamasaki, Hideyuki Okano: A Novel Marker for Purkinje Cells, KIAA0864 Protein. An Analysis Based on a Monoclonal Antibody HFB-16 in Developing Human Cerebellum. J Histochem Cytochem 2005 in press

2. 学会発表

- 1) 中村康寛、山本統彦、小田えり子：Purkinje cellの新しいマーカーとしてのKIAA 0864 proteinについて。第93回日本病理学会総会 札幌 2004/6/9-12

G. 知的所有権の取得状況

HFB-16抗体を産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門より特許に申請中。

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

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

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IgドメインはL1同士ホモフィリック結合、integrin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。さて、われわれはL1のドメインごとの機能を個体レベルで解析するために、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(以下、L1-6Dマウスと略す)を作成し、解析を行った。

129/Svを遺伝背景としたL1-6Dマウス(129-L1-6D)の脳は、肉眼的、組織学的に形態学的異常は見られず、皮質脊髄路、皮質視床路および視床皮質路、網膜視蓋路の走行路、投射は正常に形成され、軸索ガイダンス、束形成は正常に進行したと考えられた。一方、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された。また、B6-L1-6Dと129-L1-6Dの2系統で遺伝子型ごとの出生率を比較検討すると、B6-L1-6Dでは- / Y : + / Y : - / + : + / + = 6% : 41% : 23% : 30%、129-L1-6Dでは、各々24% : 33% : 27% : 16%であり、L1-6Dマウスの出生率はB6-L1-6Dで低下し、胎生致死に陥ることが示唆された。末梢知覚神経の超微形態学的計測学的検索では、129-L1-6Dマウスの無髓線維では、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。有髓線維においては、太い軸索での髓鞘低形成や、20以上の軸索が単一Schwann細胞によって形成された髓鞘に取り囲まれた異常有髓線維の出現が見られた。L1蛋白の6番目のIgドメインは、中枢、末梢神経系発達に重要な機能を果たすと考えられた。

A. 研究目的

神経細胞接着分子L1は、主として発生期の中核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など神経発生過程において重要な役割を担っ

ている。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。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IgドメインはL1同士ホモフィリック結合^{5,6)}、integrin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^{7,8,9)}。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番目のイムノグロブリン(Ig)ドメインのみを欠如したマウス(L1-6D)を異なる遺伝背景(129/Sv、C57BL/6)で作成した。本研究は、遺伝背景の異なるL1-6Dマウスの中核、末梢神経系発生過程を、胎生期から成獣に至るまで時空間的に詳細に解析し、L1遺伝子異常に基づく水頭症発症のメカニズムを明らかにしようとするものである。

B. 研究方法

1. L1-6D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(L1-6D)を作成した。FACS analysisでは、L1-6Dマウスからの脾臓リンパ球は、L1の6番目のイムノグロブリン(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。L1-6Dマウスは129/SvJあるいはC57BL/6Jを遺伝背景として、5-10世代の同士交配を行った。

2. 培養細胞による細胞接着アッセイ

129/SvJを遺伝背景としたL1-6Dマウス及びコントロールマウスから分離された小脳顆粒細胞を、ラミニンあるいはL1-Fcをコートした培養皿に播き、細胞接着、軸索伸長を検索した。

3. 肉眼的、組織形態学的検索

成マウス脳(8週齢)は、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、脳および脊髄神経を摘出、数時間の後固定後、一部はパラフィン包埋し5 μ m連続切片を作成、他は10 μ m凍結切片を作成した。形態学的解析に関して、通常のヘマトキシリンエオジン染色、ニッスル染色に加え、免疫組織化学的染色を施行した。免疫組織化学は、神経細胞の分化、シナプス形成の指標として、Neurofilament、Tau1、MAP2、Synaptotagmin、Calbindin、Parvalbumin、Calretininを、特定のニューロトランスミッターを発現

した神経細胞への分化を見る指標として、Tyrosine hydroxylase、Substance P、CGRP、Neuropeptide Y、GluR2/3を、アストログリアの指標としてGFAPを用いた。大脳、海馬、視床、基底核、脳幹、小脳、脊髄神経に関して詳細に検索した。

4. DiIおよびDiAによる軸索標識

a. 皮質脊髄路

成マウス(8週齢)は麻酔下に、皮膚切開、頭蓋骨に骨窓を開け、一側の運動領皮質にごく少量のDiIクリスタルを注入、他側の運動領皮質に同量のDiAを注入後、皮膚を縫合した。術後6-8週間して動物を灌流固定後、脳、脊髄神経を摘出し、ビプラトームにて70-100 μ m切片を作成し蛍光顕微鏡で観察した。

b. 皮質視床路、および視床皮質路

成マウス(8週齢)は灌流固定後、脳を摘出、視床背側核あるいは後頭葉視覚領にごく少量のDiIクリスタルを注入、37 $^{\circ}$ Cで、固定液中に放置し、2-4週間後にビプラトームにて100 μ m切片を作成し蛍光顕微鏡で観察した。

c. 網膜視蓋路

成マウス(8週齢)は麻酔下に固定し、一側の網膜側頭部に0.01 μ lのDiI溶液を注入、術後1週間後に動物を灌流固定後、脳を摘出し、ビプラトームにて100 μ mの矢状断切片を作成し蛍光顕微鏡で観察した。

5. 末梢神経電子顕微鏡的検索

129-L1-6D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に観察した。

C. 研究結果

1. 培養細胞による細胞接着アッセイ

129/SvJを遺伝背景としたL1-6Dマウスの小脳顆粒細胞はラミニンをコートした培地皿上では、コントロールマウスと同様に接着し、軸索伸長を示したが、L1-Fcをコートした培地皿上では、全く細胞接着、軸索伸長を示さなかった。これは、L1-6Dマウスの神経細胞がL1-L1ホモフィリック結合能を欠いていることを意味する。

2. 肉眼的、組織形態学的検索