

129/SvJを遺伝背景としたL1-6Dマウス(以下、129-L1-6Dと略す)の脳は、肉眼的に正常構造を示し、水頭症、小脳低形成は見られなかった。組織学的には、大脳皮質の層構造、海馬、基底核、視床、脳幹諸核、小脳、脊髄神経に異常は見られなかった。免疫組織化学的にも、大脳皮質神経細胞の樹状突起、軸索の発達、GABA作動性ニューロンの分布、海馬錐体細胞の軸索、樹状突起の形態、脳幹のドーパミン作動性ニューロンの分布、小脳プルキンエ細胞の樹状突起発達、脊髄後根神経節細胞の軸索投射は正常であった。大脳白質、脳梁、交連線維、内包、延髄錐体、脊髄上行および下行路は正常に形成されていた。

C57BL/6を遺伝背景としたL1-6Dノックインマウス(以下、B6-L1-6Dと略す)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。B6-L1-6Dでは、大脳皮質の6層構造は形成されており、第2層から第4層までの小型ないし介在神経細胞の数は正常であるが、第5層、6層の大型錐体神経細胞は対照に比して有意な減少を示した。さらに継代を繰り返し、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。

### 3. DiIおよびDiAによる軸索標識

129-L1-6Dの脳では、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、投射には異常がなく、軸索ガイダンス、束形成は正常と考えられた。B6-L1-6Dでは、皮質脊髄路の低形成をみるが、錐体交叉は正常に形成されていた。

### 4. 末梢神経電子顕微鏡的検索

129-L1-6D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。

## D. 考察

129-L1-6Dマウスの脳は、神経細胞構築、投射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発達していることを示した。一方、B6-L1-6Dマウスでは、高度の水頭症、皮質脊髄路の低形成をみるが、錐体交叉は正常に形成されていた。以上のことから、L1の第6番Igドメインは水頭症の原因に関与するが、皮質脊髄路の交叉に関わる軸索ガイダンスには直接関与がないと考えられる。さらに、バックグラウンドとなっているマウスの系統を反映した表現型の違いは、導入されたL1遺伝子変異が表現形質の異常として現れるかどうかを規定する、いわゆるmodifier genesの存在を推定させるものであり、今後の分子遺伝学的研究が期待される。一方、129-L1-6Dマウスの末梢神経系では、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異常は、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。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。

## E. 結論

神経細胞接着分子L1蛋白の細胞外に位置する6番目のイムノグロブリン(Ig)ドメインのみを欠如したマウス：B6-L1-6Dでは、高度の水頭症、皮質脊髄路の低形成、胎生致死に陥ることが示された。L1分子の第6番Igドメインは水頭症の原因に関与するが、皮質脊髄路の交叉に関わる軸索ガイダンスには、直接関与がないと考えられる。また、129-L1-6Dマウスの坐骨神経では、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。L1の第6番Igドメインの機能と水頭症の発生病理を明らかにするためには、胎生期脳発達を詳細に検索することが必須である。

付記：

本研究は米国Case Western Reserve大学 Department of Neurosciences,Vance Lemmon教授との共同研究である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Itoh K, Cheng L, Kamei Y, Fushiki S, Kamiguchi H, Gutwein P, Stoeck A, Arnold B, Altevogt P, Lemmon V (2004) Brain development in mice lacking L1-L1 homophilic adhesion. *J Cell Biol* 165:145-154.
- 2) 伊東恭子 中枢および末梢神経系発達における神経細胞接着分子(L1CAM)の意義 (2004) 京府医大誌 113(2): 69-82.
- 3) 伊東恭子、上口裕之 (2004) X連鎖性遺伝性水頭症のモデル動物 細胞工学 23(12):1414-1417.

##### 2. 学会発表

- 1) Itoh K, Fushiki S, Kamiguchi H, Herrup K, Arnold B, Altevogt P, Lemmon V. Development of axon pathways in mice lacking normal L1 adhesion. The 31st annual meeting of the Society for Neuroscience (San Diego, U.S.A) 2001
- 2) Itoh K, Fushiki S, Kamiguchi H, Herrup H, Arnold B, Altevogt P, Lemmon V. Abnormal brain development in L1CaM mutant mice. The 32nd annual meeting of the Society for Neuroscience Nov. 2-7. (Orlando, U.S.A) 2002
- 3) Itoh K, Fushiki S, Kamiguchi H, Arnold B, Altevogt P, Lemmon V. 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) 2003

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## X連鎖性劣性遺伝性水頭症患者におけるLICAM遺伝子解析と LICAM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解析

産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門

金村 米博

### 研究要旨

X連鎖性劣性遺伝性水頭症(X-linked hydrocephalus;XLH)の2家系においてLICAM遺伝子の翻訳領域の silent mutationであるエクソン8のC924T(G308G)、エクソン18のG2274A(G758G)の遺伝子異常を同定した。LICAM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(XLH-human neural stem/progenitor cells;以下XLH-hNSPC)の生物学的特性を解析し、イントロン6がスプライスアウトされない異常なmRNAを形成し、その結果、完全長LICAM蛋白質の発現喪失が見られることを確認した。このXLH-hNSPCの細胞倍加速度の増大と、細胞外マトリックスのfibronectin, lamininに対する細胞接着能の低下を確認した。これらLICAM遺伝子異常ならびにXLH-hNSPCの細胞特性はXLH発症に何らかの関連性を有している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

現在でも根治的治療法が存在しないXLHの神経機能の修復・再生を目指すための基礎研究として、XLH患者におけるLICAM遺伝子異常の検索と、LICAM遺伝子異常を有するXLH-hNSPCの細胞生物学的特徴を検討した。

### B. 研究方法

#### 1) LICAM遺伝子解析

平成11年に班会議で設立した水頭症遺伝子バンクに登録された症例の中から、家族歴や臨床像よりXLHが疑われる2家系に関して、ダイレクトシーケンス法でLICAM遺伝子解析を実施した。

#### 2) XLH-hNSPCの細胞特性の解析

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(産婦人科)ならびに国立病院機構大阪医療センター臨床研究部が共同で樹立したLICAM

遺伝子異常(intron 6; 694+6 g→a)を有するXLH-hNSPCの提供をうけ、そのLICAM遺伝子mRNA、蛋白質解析、増殖能解析、細胞接着能解析を実施した。

### C. 研究結果

#### 1) silent mutationの同定

精神運動発達障害を伴う生後9ヶ月の男児水頭症児が発端者の家系で、エクソン8のC924T(G308G)、軽度の精神発達障害を認める3歳の男児水頭症児が発端者の家系でエクソン18のG2274A(G758G)のsilent mutationを同定した。

#### 2) XLH-hNSPCの細胞特性

XLH-hNSPCでは、イントロン6がスプライスアウトされない異常なmRNAを形成し、その結果、完全長LICAM蛋白質の発現喪失が見られた。このXLH-hNSPCの細胞倍加速度(64.2時間:培養開始後147日目)は正常hNSPC(82.5時間:培養開始後181日目)より増大していた。さ

らに細胞外マトリックスのfibronectin, lamininに対する細胞接着能の低下が見られ、それにはintegrin $\alpha 2, \alpha 3, \alpha 6, \alpha v, \alpha 5 \beta V$ が関与している可能性が示唆された。

#### D. 考察

本邦XLH症例において、*LICAM*遺伝子のsilent mutationの2家系を同定したが、*LICAM*遺伝子のsilent mutationはスプライシング異常を引き起こす可能性あり、その部位により比較的軽微な水頭症例から重症の水頭症例まで多彩な臨床症状を呈する可能性が示唆された。今後、*LICAM*遺伝子異常の検索において、silent mutationの存在を念頭に置いた考察が必要であると考えられる。

XLH-hNSPCでは*LICAM*遺伝子のイントロン6の694+6g→aの1塩基異常はイントロン6のスプライスアウトを障害し、その結果、異常mRNAが合成され、不完全*LICAM*たんぱく質の発現と完全長*LICAM*たんぱく質の発現喪失に至ることが確認された。細胞特性として、増殖能異常、細胞接着能異常が確認された。XLH-hNSPC並びにXLH-hNSPC由来細胞では*LICAM*遺伝子の機能が喪失していると予想され、この*LICAM*遺伝子機能の喪失が細胞特性異常にいたるメカニズムは現段階では不明である。正常*LICAM*が積極的にhNSPCで何らかの役割を担っており、その機能喪失がXLH-hNSPCの細胞特性に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられ、今後のhNSPCにおける*LICAM*の役割に関する研究の必要性が示唆された。

#### E. 結論

*LICAM*遺伝子におけるsilent mutationはその異常部位により、多彩な臨床症状を引き起こすことが判明し、今後の遺伝子解析において注意が必要であることが示された。XLH-hNSPCの細胞特性の異常が示唆された。今後、XLH-hNSPCの特性と水頭症発症との関連性について更なる検討を加えることは有意義であると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kanemur Y, Takuma Y, Kamguchi H, Yamsaki M, The first case of *LICAM* gene mutation identified in MASA syndrome in Asia Congenital anomaly (in press)

2) 岡本伸彦, 金村米博, 山崎麻美. 小脳形成異常症における遺伝子異常の検索. 臨床細胞分子遺伝 8, 26-29,

2003.

##### 2. 学会発表

- 1) 山崎麻美, 金村米博, 岡本伸彦, 壺中正博, 北野昌平, 坂本博昭. *LICAM*遺伝子解析と水頭症発症要因としての検討-新規*LICAM*遺伝子異常24家系の報告. 第48回日本人類遺伝学会, 平成15年10月 (長崎)
- 2) 岡本伸彦, 金村米博, 山崎麻美. *LICAM*異常によるX-linked hydrocephalusとHirschsprung disease. 第48回日本人類遺伝学会, 平成15年10月 (長崎)
- 3) 山崎麻美, 金村米博, 壺中正博, 岡本伸彦, 坂本博昭. X連鎖性劣性遺伝性水頭症における*LICAM*遺伝子解析と水頭症発症要因としての検討-27家系の臨床解析. 第4回日本分子脳神経外科学会, 平成15年9月 (東京)
- 4) 山崎麻美, 金村米博, 壺中正博, 岡本伸彦, 坂本博昭, 北野昌平, 高橋義男, 長坂昌登, 夫敬憲, 森本一良, 佐藤倫子. *LICAM*遺伝子解析と水頭症発症要因としての検討-27家系の臨床解析-. 第31回日本小児神経外科学会, 平成15年7月 (新潟)
- 5) 坂本博昭, 北野昌平, 森川俊枝, 山崎麻美, 金村米博, 岡本伸彦, 森 鑑二, 西川 節. 本邦における葉酸代謝酵素methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) 遺伝子の1塩基置換の検討. 日本二分脊椎研究会, 平成14年6月 (名古屋)
- 6) 坂本博昭, 山崎麻美, 金村米博, 北野昌平, 西川 節. 脊髄膜瘤発生の遺伝的危険因子:葉酸代謝酵素MTHFR遺伝子の解析. 第17回日本脊髄外科学会, 平成14年6月 (静岡)
- 7) 岡本伸彦, 金村米博, 山崎麻美. 小脳形成異常症における責任遺伝子の検討. 第19回臨床細胞分子遺伝研究会, 平成14年6月 (大阪)

#### G. 知的所有権の取得状況

特に無し

## 小脳形成異常症における責任遺伝子の検索および X連鎖性水頭症とヒルシュスプルング病合併例の遺伝子解析

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

### 研究要旨

小脳形成異常を呈するヒトの疾病にはDandy-Walker症候群、Joubert症候群等が知られているが、我々は、小脳構造異常を呈する先天性疾患患者において候補遺伝子 (*ZIC1*、*Engrailed-1・2*、*WNT1*、*FGF8*) の変異の有無の検討を行ってきた。各遺伝子はそのノックアウトマウスにおいて小脳低形成を生じるが、患者においては変異は同定されなかった。

X連鎖性水頭症の中樞神経系以外の症状として、ヒルシュスプルング病 (HSCR) を合併する例が報告されている。XLHとHSCRを合併する症例、3家系4例において*LICAM*遺伝子の新変異を同定した。

### A. 研究目的

- ①小脳形成異常を呈するDandy-Walker症候群、Joubert症候群などについて、本研究班で*ZIC1*、*Engrailed-1*、*Engrailed-2*、*WNT1*、*FGF8*各遺伝子について、病因としての関与を調べることが目的である。これらの遺伝子は小脳発生に重要な役割を持ち、ノックアウトマウスでは小脳形成異常を呈することが報告されている。Grinbergらは染色体3q2に座位を持つ*ZIC1*と*ZIC4*両遺伝子欠失とDandy-Walker症候群の関連を報告した。この報告により、*ZIC1*遺伝子がDandy-Walker症候群と関係することは証明されたが、Dandy-Walker症候群は病因的には複数の疾患の集合と考えられ、まだ一部が解明されたに過ぎないと考えられる。
- ②*LICAM*異常による水頭症とヒルシュスプルング病 (HSCR) を合併した症例が報告されている。*LICAM*は中樞神経系だけでなく、消化管の神経芽細胞の遊走

移動にも重要な分子である。HSCRの大腸では*LICAM*の発現が減少しており、*LICAM*は消化管の神経芽細胞の遊走移動に重要な分子であることは証明されている。XLHとHSCRを合併するカナダ人兄弟例、スペイン人2家系で*LICAM*遺伝子の変異を検索し、両疾患の関連を検討した。

### B. 研究方法

インフォームド・コンセントを得て末梢血リンパ球からDNAを抽出し、PCR法によって各遺伝子を増幅した。PCR産物を回収して直接シーケンシングで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。

### C. 結果

*ZIC1*、*Engrailed-1*、*Engrailed-2*、*WNT1*、*FGF8*各遺伝子について、現在までに15例の解析を終了したが、有意な変異は同定されなかった。

XLHとHSCRを合併するカナダ人兄弟例、スペイン人

2家系で*LICAM*遺伝子の変異を同定した。

平成14年6月(大阪)

#### D. 考察

①Dandy-Walker症候群(DWS)は第4脳室の嚢胞状拡大、小脳虫部低形成を特徴とするが、水頭症も伴う。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予後良好な例等、臨床的にはかなり幅広いものを含んでいる。我々は、DWSにおいて、*ZIC1*遺伝子の変異の有無を解析したが、変異は同定できなかった。*ZIC1*と*ZIC4*両遺伝子欠失に関しては、FISH法やマイクロアレイを応用した解析によらなければ同定はできず、今後の検討が待たれる。*ZIC1*と*ZIC4*両遺伝子欠失例がDandy-Walker症候群の病因のどの程度を占めるのかは現時点では不明である。小脳の先天異常は病的には異質なものからなると考えられ、一部には*ZIC1*、*EN*、*WNT1*、*FGF8*遺伝子異常によるものも存在するとの仮説のもとに検討を続ける方針である。

②XLHとHSCRを合併するカナダ人兄弟例、スペイン人2家系で*LICAM*遺伝子の変異を同定した(Okamoto et al. J Hum Genet 2004)。XLH全体の約3%でHSCRを合併していることになる。*LICAM*異常は多因子遺伝のHSCRの病因の一端を担うことは間違いないが、他の遺伝因子や環境因子との複合作用がHSCR発症に必要と考えられる。XLHの早期死亡例や重度神経障害例では難治性便秘としてHSCRが看過されている可能性もあり、XLHでHSCRは注意すべき合併症である。HSCRは男児に有意に多いことは、常染色体上の遺伝子では説明がつかないが、*LICAM*遺伝子による修飾が性差の一原因である可能性もある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 岡本伸彦 X連鎖性水頭症の遺伝カウンセリング 日本遺伝カウンセリング学会誌 第27巻 p11-15 2002年
- 2) Okamoto N, Del Maestro R, Valero R, Monros E, Poo P, Kanemura Y, Yamasaki M. Hydrocephalus and Hirschsprung's disease with a mutation of *LICAM*. J Hum Genet. 2004;49:334-7.

##### 2. 学会発表

- 1) 小脳形成異常症における責任遺伝子の検討 岡本伸彦(企画調査部)、山崎麻美(国立大阪病院)、金村米博(産業技術総合研究所) 第19回臨床細胞分子遺伝研究会

- 2) 岡本伸彦、黒澤健司(神奈川県立こども医療センター)、松本直通(長崎大学) Submicroscopic subtelomeric chromosomal rearrangementsの遺伝カウンセリング 第27回日本遺伝カウンセリング学会 平成15年5月(東京)
- 3) 岡本伸彦(企画調査部)、荒井洋(ボバース記念病院)、山崎麻美(国立大阪病院)、金村米博(産業技術総合研究所) 小脳形成異常の責任遺伝子の検討 第45回日本小児神経学会 平成15年5月(福岡)
- 4) 岡本伸彦(企画調査部)、山崎麻美(国立大阪病院)、金村米博(産業技術総合研究所) *L1CAM*異常によるX-linked hydrocephalusとHirschsprung disease 第48回日本人類遺伝学会 平成15年11月(長崎)
- 5) 岡本伸彦 *FilaminA*遺伝子異常を同定したFrontometaphyseal dysplasiaの1例 第26回日本小児遺伝学会 平成15年11月(名古屋)

---

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」調査研究班  
平成14～16年度総合研究報告書

平成17年3月29日 印刷

平成17年4月10日 発行

**発行** 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」調査研究班

主任研究者 山崎 麻美

〒540-0006 大阪市中央区法円坂2-1-14

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・先進医療部

**製作** クォーター

〒558-0045 大阪市住吉区住吉2-5-28

---