

200936083A

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
Research Committee for Intractable Fetal Brain Malformation in Research  
of Intractable Disease Health and Labour Sciences Research Grants  
in 2009 by Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan

**胎児診断における  
難治性脳形成障害症の診断基準の作成**

**Establishment for fetal diagnostic criteria  
of intractable brain malformation**

(H21 - 難治 - 一般 - 028)

**平成 21 年度総括・分担研究報告書**

平成 22 年 3 月

March 2010

主任研究者 **山崎麻美**

Chairperson: Mami Yamasaki, M.D.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

Research Committee for Intractable Fetal Brain Malformation in Research  
of Intractable Disease Health and Labour Sciences Research Grants  
in 2009 by Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan

# 胎児診断における 難治性脳形成障害症の診断基準の作成

Establishment for fetal diagnostic criteria  
of intractable brain malformation

平成 21 年度総括・分担研究報告書

平成 22 年 3 月  
March 2010

主任研究者 **山崎 麻美**  
Chairperson: Mami Yamasaki, M.D.

## 胎児診断における難治性脳形成障害症の診断基準の作成研究班 名簿

区 分	氏 名	所属等	職 名
研究代表者	山崎 麻美	独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター 脳神経外科	副 院 長 分子医療研究室長
研究分担者	伊東 恭子	京都府立医科大学大学院医学研究科 分子病態病理学	准 教 授
	宇都宮英綱	国際医療福祉大学大学院	教 授
	岡本 伸彦	地方独立行政法人 大阪府立病院機構 大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療科	副 部 長
	加藤 光広	山形大学医学部附属病院 小児科	講 師
	金村 米博	独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター 臨床研究センター再生医療研究室	室 長
	小崎 健次郎	慶應義塾大学医学部小児科学教室	准 教 授
	斉藤 伸治	北海道大学病院 小児科	診療准教授
	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
	白根 礼造	宮城県立こども病院 脳神経外科	副 院 長
	夫 律子	クリフム夫律子マタニティクリニック臨床胎児医学研究所	院 長
	師田 信人	国立成育医療研究センター 脳神経外科	医 長
研究協力者	相田 典子	神奈川県立こども医療センター 放射線科	部 長
	荒井 洋	森ノ宮病院 小児神経科	部 長
	井関 祥子	国立大学法人東京医科歯科大学大学院	教 授
	大場 洋	帝京大学医学部 放射線科	准 教 授
	大橋 博文	埼玉県立小児医療センター 遺伝科	科 長
	香川 尚己	大阪大学医学部附属病院 脳神経外科	助 教
	黒澤 健司	神奈川県立こども医療センター 遺伝科	科 長
	下川 尚子	医療法人雪の聖母会 聖マリア病院 脳神経外科	医 長
	竹本 理	大阪府立母子保健総合医療センター 脳神経外科	主任部長
	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	副 院 長
	西山 健一	新潟大学脳研究所 脳神経外科	助 教
	埜中 正博	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	医 員
	夫 敬憲	独立行政法人国立病院機構 香川小児病院 脳神経外科	医 長
	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
	松阪 康弘	大阪市立総合医療センター 小児脳神経外科	副 部 長
	丸山 幸一	愛知県心身障害者コロニー中央病院 小児神経科	医 長
	宮嶋 雅一	順天堂大学医学部附属病院順天堂医院 脳神経外科	先任准教授
森 壘	東京大学医学部附属病院 放射線科	講 師	
吉岡 進	大分県立病院 脳神経外科	部 長	
事務局	埜中 正博	独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター 〒540-0006 大阪市中央区法円坂2-1-14 TEL 06-6942-1331 FAX 06-6943-6467	医 員
経理事務担当者	原 暢 応	同 上	業務班長

# 目 次

## I. 総括研究報告

- 胎児診断における難治性脳形成障害症の診断基準の作成 .....9  
独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター  
山崎 麻美

## II. 分担研究報告

1. 胎児脳発達異常の出生前診断と病理に関する研究 ..... 23  
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
2. 難治性脳形成障害症の病態解析と治療法開発 ..... 29  
国際医療福祉大学大学院  
宇都宮 英綱
3. MLPA 法などによる小脳形成異常症の解析 ..... 33  
大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療科  
岡本 伸彦, 松田 圭子, 秋丸 憲子
4. 大脳皮質形成障害の原因遺伝子解析に関する研究 ..... 37  
山形大学医学部小児科学講座  
加藤 光広
5. 難治性脳形成障害症患者由来生体試料の収集とそのバンク化に関する研究 ..... 41  
国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター 再生医療研究室  
金村 米博
6. 難治性脳形成障害症の胎児診断におけるアレイ CGH 解析の有用性の検討 ..... 47  
慶應義塾大学医学部小児科学教室  
小崎 健次郎
7. アンジェルマン症候群の病因に関する研究 ..... 51  
北海道大学病院小児科  
齋藤 伸治

8. 難治性脳形成障害症の病態解析と治療法の開発に向けての臨床情報の蓄積に関する研究 .....	55
大阪市立総合医療センター 小児医療センター 小児脳神経外科	
坂本博昭, 松阪康弘	
9. 胎児診断された先天性中枢神経疾患の検討 .....	59
宮城県立こども病院 脳神経外科	
白根礼造	
10. マイクロアレイ CGH による染色体微小異常と胎児期発症脳発育異常との検討 .....	61
クリフム夫律子マタニティクリニック 臨床胎児医学研究所	
夫 律子	
11. 胎児期頭蓋内出血と脳形成障害 .....	65
国立成育医療研究センター 脳神経外科	
師田信人	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	71

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

## 胎児診断における難治性脳形成障害症の診断基準の作成

研究代表者

山崎麻美

独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター

研究分担者

伊東 恭子	京都府立医科大学
宇都宮英綱	国際医療福祉大学
岡本 伸彦	大阪府立母子保健総合医療センター
加藤 光広	山形大学
金村 米博	国立病院機構大阪医療センター
小崎健次郎	慶應義塾大学
齋藤 伸治	北海道大学
坂本 博昭	大阪市立総合医療センター
白根 礼造	宮城県立こども病院
夫 律子	クリフム夫律子マタニティクリニック
師田 信人	国立成育医療研究センター

### 1. 研究目的

本研究の目的は、①胎児診断における難治性脳形成障害症の診断基準の作成、及び②新規治療法開発に向けた病態解析研究を支援する、臨床病態、画像情報、遺伝子情報、患者由来生体試料（組織・細胞・DNA）などのデータバンクの構築である。

超音波診断などの画像診断の進歩により、先天性水頭症をはじめとした難治性脳形成障害症は現在、胎生期に早期診断することが可能となり、一部の症例では出生後早期に外科的治療が実施されその治療成績は改善している。主任研究者は、1999年から開始した特定疾患対策研究事業（のちに難治性疾患克服研究事業）の「先天性水頭症」調査研究班の成果として、2005年に『胎児期水頭症診断と治療ガイドライン』を刊行した。このガイドラインは、出生前診断にかかわる初めてのガイドラインであるが、産科、小児科、新生児科、脳神経外科、遺伝診療科など胎児水頭症の診断と治療にかかわる医師だけでなく、コメディカルや特に家族や患者さんにも広く受

け入れられてきた。

しかしその中で、研究班が終了してからも、胎児期水頭症のホームページを維持して、多くの病院からの相談を受けながら、グループでの討論を続けてきた。その中には、水頭症だけではなくその他の脳形成障害疾患が多く含まれていた。予後のよい単純な脳室拡大の診断を確実なものにするためには、これら難治性脳形成障害症の診断基準を策定することが必須であることが明らかになってきた。

また分子遺伝子学的手法の進歩により、難治性脳形成障害症に含まれる一部の疾患については原因遺伝子が明らかにされており、遺伝子診断を実施する事が可能である。また病態分類はおおきくかわり、予後評価も可能になっている。しかし、それらの成果は、遺伝カウンセリングや出生前診断の領域では、まだまだ活かされているとは言えない。胎児診断の進歩のなかで、正確な予後評価まで見据えた診断基準の作成は、臨床現場からは強く求められている。

これら重症先天性水頭症や細胞移動障害症などの

疾患の多くは、根本的治療法も予防法も不明である。加えて、これらの疾患はそれぞれが希少疾患である。病態データやこれら患者由来試料・細胞を集積することは、難治性脳形成障害症の病態解明と治療技術の開発を行うための基礎的研究の推進に貢献する。難治性脳形成障害症の診断、治療は小児神経学、小児脳神経外科学分野だけでなく、患者家族においても大きな問題であり、診断方法や治療技術の早期開発が切望されている。

## 2. 対象疾患

難治性脳形成障害症として、以下の疾患を対象とする(表1)。

### (ア) 重症水頭症

- ① X連鎖性遺伝性水頭症,
- ② その他の遺伝性水頭症
- ③ 水頭症症候群

### (イ) 全前脳胞症

### (ウ) 脳梁欠損症

### (エ) 神経細胞移動異常症

- ① 神経細胞移動異常症〈滑脳症, 丸石様滑脳症, 異所性灰白質〉,
- ② 大脳皮質構築障害〈多小脳回症, 裂脳症〉,
- ③ 異常増殖〈片側巨脳症〉

(オ) ダンディウォーカー症候群,

(カ) 水無脳症,

(キ) 二分頭蓋(脳瘤)

(ク) キアリII型奇形(脊髄髄膜瘤に合併する脳形成異常症のうち難治性のもの)

(ケ) その他の上記に分類されない脳形成異常症

## 3. 方法

### (ア) 症例登録

患者の臨床データおよび画像データを収集した。班会議独自のデータサーバーを立ち上げ、全ての登録は、webでおこなう(図1)。サーバー管理者は国立病院機構大阪医療センター臨床研究センターにおく。登録協力病院は、あらかじめサーバーへのユーザー登録をして、パスワードが割り当てられる。全国の症例登録協力病院から、臨床データおよび画像登録を行う。臨床データは、難治性脳形成異常症臨床登録票(表2)に従って記載し、画像データとともにデータ集積サーバーに、送る。管理者は送られてきた情報を、匿名化し、登録番号を割り付け、閲覧・症例検討サイトにアップする。

### (イ) 症例検討委員会(図2)

閲覧・症例検討サイトにアップされた症例について、臨床データや画像データを検討する。コメントに意見を書き込むという形で意見を交換する。また小児放射

表1 対象疾患

・重症水頭症
-X連鎖性遺伝性水頭症
-その他の遺伝性水頭症
-水頭症症候群
・全前脳胞症
・脳梁欠損症
・神経細胞移動異常症
-神経細胞移動異常症〈滑脳症, 丸石様滑脳症, 異所性灰白質〉
-大脳皮質構築障害〈多小脳回症, 裂脳症〉
-異常増殖〈片側巨脳症〉
・ダンディウォーカー症候群
・水無脳症
・二分頭蓋(脳瘤)
・キアリII型奇形(脊髄髄膜瘤に合併する脳形成異常症のうち難治性のもの)
その他の上記に分類されない脳形成異常症

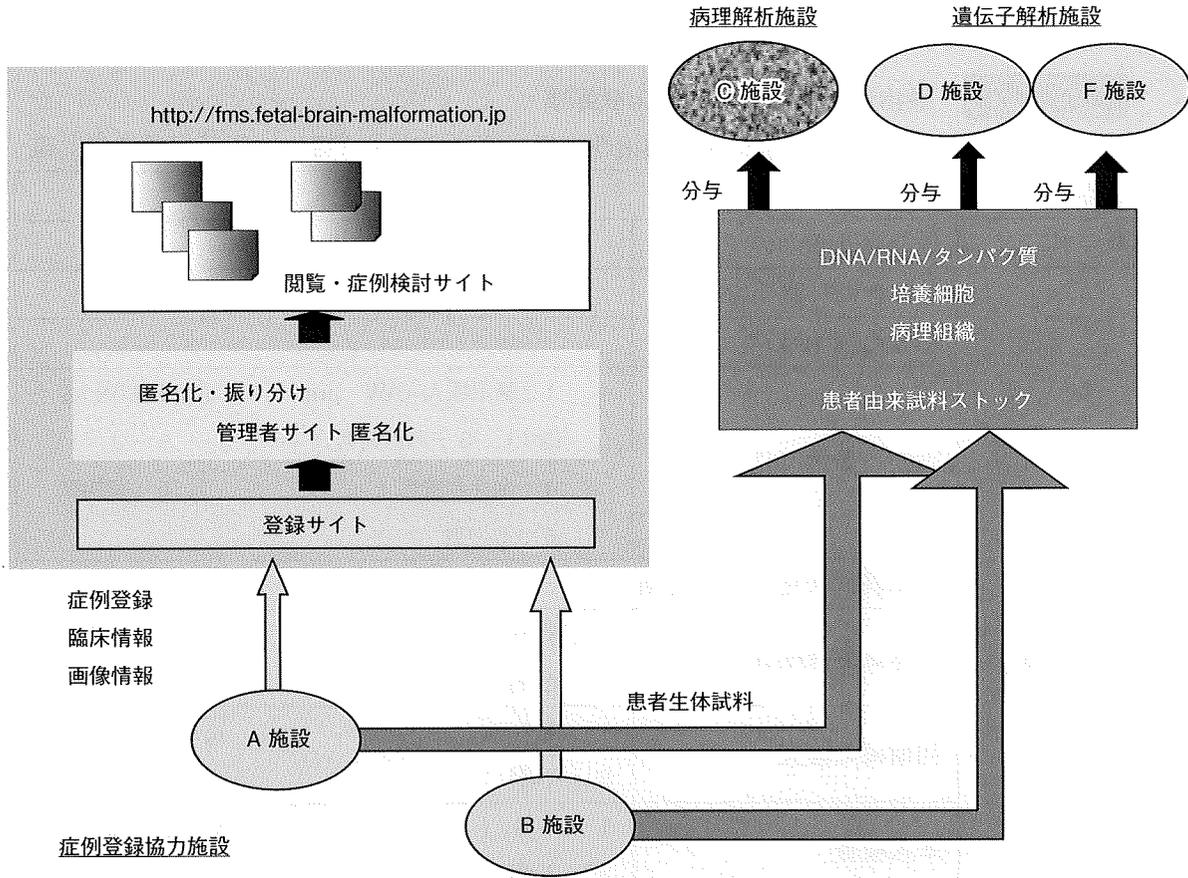


図1 症例登録・患者試料の登録

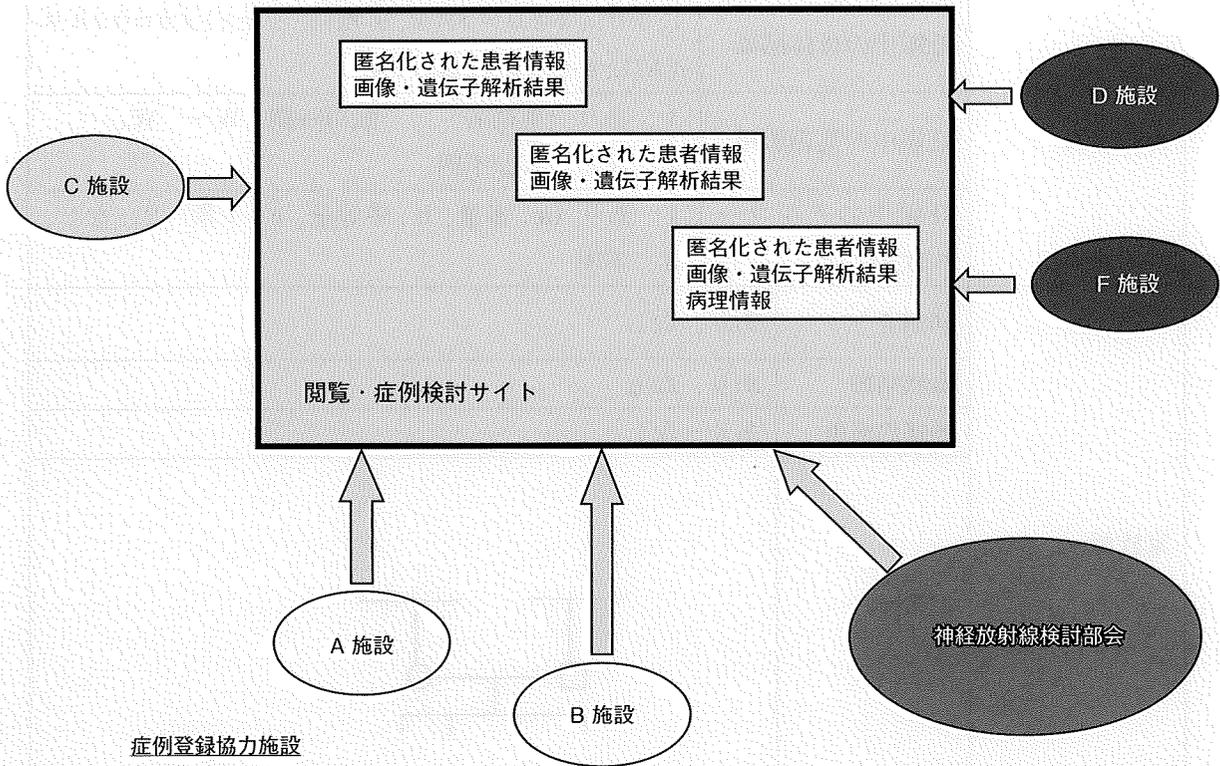


図2 症例検討会

表 2

## 添付資料 1

難治性脳形成異常症臨床登録票

厚生労働省難治性疾患克服研究事業『難治性脳形成異常症』班

登録番号			
診断	最終診断名		
	最終診断に到った方法		
出生前診断	超音波開始時期		
	当初の異常所見	1 ; 脳室拡大 (AW mm)、2 ; 頭囲異常(過大、過少)、3 ; 形態異常 ( )、 4 ; 全身合併症 ( )、5 ; 家族歴 6 ; その他	
	当初異常所見の診断時期		
	母体血血液検査	1 ; あり ( )、2 ; なし、 3 ; 不明	
	初期絨毛検査	1 ; あり ( )、2 ; なし、 3 ; 不明	
	羊水検査	1 ; あり ( )、2 ; なし、 3 ; 不明	
	胎児 MRI	1 ; あり ( )、2 ; なし、 3 ; 不明	
母体要因	妊娠中の母体感染	1、あり(a トキソプラズマ、b 風疹、c サイトメガロウイルス d;ATL、e その他)、2無、3不明	
	妊娠中の薬剤服用	1、あり (薬剤名 服用時期 W~ W、 2、なし、3、不明	
	妊娠中のアルコール飲用	1. あり (a ; 多量、b ; 中等量、c ; 少量) 2 ; なし、 3、不明	
家族歴	同病者	あり、なし	
	血族結婚	あり、なし	
	神経筋疾患	あり、なし	
	家系図		

表2 (つづき)

周産期	要因	1、あり (a;多胎、b;SFD,c;妊娠中毒症、d;低出生体重児、e;分娩外傷、f;重症黄疸、g;仮死、h;その他) 2 ; なし、3 ; 不明		
	分娩時期	在胎 週 日		
	分娩方法	1 ; 自然経膣、2 ; 誘発経膣、3 ; 帝王切開、4 ; 吸引分娩、5 ; 中絶、6 ; その他		
	出生時体重	g、	身長	cm
	Apgar score		1分 ( 点)	5分 ( 点)
発達歴	追視 m、あやし笑い m、 頸定 m、 独座 m、 独歩 m、 有意語 m、 二語文 m、 走る m			
現症	合併所見(中枢神経系)	1 ; あり ( )、2 ; なし、3 ; 不明		
	合併所見(中枢神経系以外)	1 ; あり ( )、2 ; なし、3 ; 不明		
	染色体異常	1 ; あり ( )、2 ; なし、3 ; 不明		
	遺伝子異常	1 ; あり ( )、2 ; なし、3 ; 不明		
	てんかん発作	初発 年 月から 現在の発作頻度 回 / 年・月・週・日		
	発作型			
治療	内科的治療	1 ; あり ( )、2 ; なし、3 ; 不明		
	外科的治療	1 ; あり ( )、2 ; なし、3 ; 不明		
最終評価時の状態	評価時年齢	歳 ヲ月		
	日常生活動作の状態	1 ; 後遺症なく健康、2 ; 軽度の障害はあるが仕事(学業)可能、3 ; 自力で日常生活可能、4 ; 一部要介助、5 ; 全面介助、6 ; 植物状態、7 ; 死亡、8 ; 幼若のため判定保留、9 ; 中絶のため判定不能、10 ; 不明		
	発達障害の程度	別紙1より番号で記入 ( ) IQ/DQ( )		
	最近の受診状況	1;入院、入所、2 ; 通院、3 ; 不明		
	医療費の公費負担	1 ; あり ( )、2 ; なし、3 ; 不明		
	死亡の場合	死亡時年齢		
		剖検	1 ; あり ( )、2 ; なし、3 ; 不明	
	死因	1 ; 判明 ( )、2 ; 不明		

線科のエキスパートによる小児放射線検討会で検討をして、読影レポートをアップする。また必要な遺伝子解析を、コメントを参考に遺伝子解析施設に依頼し、あるいはそれぞれの手上げで行う。また病理解析レポートをアップする。分類不能な疾患群については、CGH アレイなどを利用して、未知の遺伝子解析を行う。遺伝子解析を予定する遺伝子については、下記のことを考えている。

(ウ) 解析対象遺伝子とその概略

**LICAM** (L1 cell adhesion molecule) [Hs.522818]

免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着因子。

(解析を行う理由)

- ・ 1992年に Rosenthal らによる X連鎖性劣性遺伝性水頭症 (X-linked hydrocephalus; 以下 XLH と略す) の1家系における *LICAM* 遺伝子異常の報告以降、世界各地から合計140以上のL1異常を有するXLH家系の報告があり、現在ではXLHの原因遺伝子として確定している。
- ・ 国内のXLH症例において、現在まで45家系に39タイプの*LICAM*遺伝子異常を同定してきた。その遺伝子異常の特徴・特に遺伝型の違いが臨床型の重症度に与える影響および重症*LICAM*遺伝子異常を有する症例の神経放射線学的特長について報告してきた (Kanemura Y et al., *J Neurosurg* 105 (5), 403-412, 2006)。
- ・ 水頭症の程度の軽い男児先天性単純性水頭症や水頭症を伴わない症例に、*LICAM*遺伝子異常の silent mutation が神経発生異常の原因となると推察される症例を見出し、現在までに10家系を同定した。

**MSI1** (Musashi homolog 1) [Hs.158311]

神経幹細胞に選択的に発現することが知られているRNA結合タンパク質。

(解析を行う理由)

- ・ この遺伝子を欠損した実験動物が水頭症を発症する事が報告されている (Sakakibara S et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12, 99: 15194-9, 2002)

**POLL** (Polymerase (DNA directed), lambda) [Hs.523230]

DNA鎖を合成に関与する酵素の1種  
(解析を行う理由)

この遺伝子を欠損した実験動物が水頭症を発症する事が報告されている (Kobayashi Y et al., *Mol Cell Biol*. 22 (8): 2769-76, 2002)。

**ZIC1** (Zic family member 1 [odd-paired homolog]) [Hs.647962]

zinc-finger たんぱくの1種。  
(解析を行う理由)

この遺伝子を欠損した実験動物が小脳の異常を伴う水頭症を発症する事が報告されている (Aruga J. *Mol Cell Neurosci*. 26 (2): 205-21, 2004)。

**ZIC2** (Zic family member 2 [odd-paired homolog]) [Hs.591205]

zinc-finger たんぱくの1種。  
(解析を行う理由)

全前脳胞症の症例にこの遺伝子の異常を伴う事が報告されている (Brown SA, et al., *Nat Genet* 20 (2): 180-3, 1998)

**SHH** (Sonic hedgehog homolog) [Hs.164537]

ヘッジホッグ (HH) ファミリーに属する分泌たんぱくの1種。

(解析を行う理由)

全前脳胞症の症例にこの遺伝子の異常を伴う事が報告されている (Roessler E, et al., *Nat Genet* 14 (3): 357-60, 1996)

**EN2** (Engrailed homeobox 2) [Hs.134989]

ホメオドメイン転写因子の1種。  
(解析を行う理由)

この遺伝子を欠損した実験動物が小脳の形成異常を発症する事が報告されている (Kuemerle B, et al., *J Neurosci*. 17 (20): 7881-9, 1997)。

**WNT1** (Wingless-type MMTV integration site family, member 1) [Hs.248164]

分泌性糖タンパク質の1種.

(解析を行う理由)

この遺伝子を欠損した実験動物が小脳の形成異常を発症する事が報告されている (Mastick GS, et al., J Comp Neurol 374 (2): 246-58, 1996)

### **CASK**

CASK signal pathway に関与する

(解析を行う理由)

小頭症, 小脳低形成などの症状を呈する CASK 異常症の遺伝子異常として明らかになった.

Najm et al Nature Genet 2008

**ANK3** (Ankyrin 3, node of Ranvier [ankyrin G]) [Hs.499725]

内在性膜タンパク質の1種.

(解析を行う理由)

L1CAMの局在を制御すると考えられている分子でありその遺伝子異常が水頭症の発症に関与している可能性を検討する必要があると考えられるため.

**SPTBN4** (Spectrin, beta, non-erythrocytic 4) [Hs.32706]

内在性膜タンパク質の1種.

(解析を行う理由)

L1CAMの局在を制御すると考えられている分子でありその遺伝子異常が水頭症の発症に関与している可能性を検討する必要があると考えられるため.

**TP73** (Tumor protein p73) [Hs.192132]

がん抑制遺伝子の1種

(解析を行う理由)

TP73 ノックアウトマウスにおいて, 脳瘤形成が見られることが報告されている (Yang A, et al., Nature 404 (6773): 99-103, 2000).

**VANGL2** (Vang-like 2 [van gogh], LOOP-TAIL PROTEIN 1; LPP1) [Hs.99477]

frizzled-dishevelled 組織極性化経路の構成要素.

(解析を行う理由)

脊髄髄膜瘤を発症するマウス (Loop-tail) にこの遺伝子の異常が同定された (Murdoch, J et al., Hum. Molec. Genet. 10: 2593-2601, 2001).

**CELSR1** (Cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 [flamingo homolog, Drosophilal]) [Hs.252387]

7回膜貫通型のGPCRの1種

(解析を行う理由)

脊髄髄膜瘤を発症するマウスにこの遺伝子の異常が同定された (Curtin JA, et al., Curr Biol 13 (13): 1129-33, 2003).

**SCRIB** (Scribbled homolog) [Hs.436329]

Apical-basalの細胞極性に関与する遺伝子

(解析を行う理由)

脊髄髄膜瘤を発症するマウス (circletail) にこの遺伝子の異常が同定された (Murdoch JN, et al., Hum Mol Genet 12 (2): 87-98, 2003).

**MTHFR** (5,10-methylenetetrahydrofolate reductase [NADPH]) [Hs.214142]

葉酸代謝酵素の1種

(解析を行う理由)

脊髄髄膜瘤の遺伝的危険因子として葉酸代謝酵素である MTHFR の 677TT および 1298CC を示す SNP との関連性が報告されている (Boyles AL, et al., Environ Health Perspect 114 (10): 1547-52, 2006).

**BHMT** (Betaine-homocysteine methyltransferase) [Hs.80756]

葉酸代謝酵素の1種

(解析を行う理由)

脊髄髄膜瘤の遺伝的危険因子として BHMT の SNP との関連性が報告されている (Boyles AL, et al., Environ Health Perspect 114 (10): 1547-52, 2006).

**FGFR2** (Fibroblast growth factor receptor 2) [Hs.533683]

FGFのレセプターの1種

(解析を行う理由)

頭蓋骨早期癒合症に FGFR2 の異常が報告されている (Carinci F, et al., J Craniofac Surg 16 (3): 361-8, 2005).

### DCX (double cortin)

Xq22.3-q23 に座位し, DCX protein をコードする。  
(解析を行う理由)

DCX 遺伝子の異常が, 男性に起これば ISL を発症し, 女性に起これば皮質下帯状異所性灰白質 (subcortical band heterotopia : SBH) あるいは double cortex とよばれる, より軽症の表現型をとる (Des Portes V Cell 92: 51-61, 1998).

### ARX

Xp22.13 に存在する。

(解析を行う理由)

生殖器に異常を伴う X-linked lissencephaly with ambiguous genitalia (XLAG) の原因遺伝子として同定されている (Dobyns et al Am J Med Genet 86: 331-7, 1999).

### TUBA1A

tubulin  $\alpha$  1A

(解析を行う理由)

滑脳症の遺伝子として同定されている (Kato M Hum Mol Genet 12: 89-96, 2003).

### HESX1, SOX2, AKT3, RARS2

(解析を行う理由)

脳形成異常症に関与すると考えられている遺伝子

### その他の水頭症関連遺伝子, 脳形成障害症関連遺伝子, てんかん関連遺伝子

(エ) 患者由来生体試料のバンク化

① 患者由来試料の種類

神経組織, 胎盤組織 (臍帯を含む), 羊水, 絨毛, 臍帯血, 皮膚組織, 末梢血

② 患者生体試料の送付, 運搬について

その詳細については, 分担研究報告 (難治性脳形成障害症患者由来生体試料の収集そのバンク化に関する研究; 金村米博) を参照されたい。

③ 研究解析用試料の分離・保存

提供を受けた各患者由来試料から, 一般的な手法を用いて核酸 (DNA および RNA) およびタンパク質を分離する。また一部の試料は固定を行い, 組織標本を作成する。これらを研究解析用試料として保管・管理する。

④ 特性解析

これら患者由来の研究解析用試料の生物学的特性を, 分子生物学的, 病理学的観点から詳細に検討する。解析方法としては, 免疫組織学的, 細胞免疫化学的評価解析, RT-PCR, マイクロアレイ, タイリングアレイ等を用いた発現遺伝子解析, CGH アレイ等を用いたゲノム安定性評価, ウェスタンブロット法, 抗体アレイ法, SELDI-TOF-MS を用いた低分子タンパク質の発現プロファイル評価, 等を用いた発現タンパク質解析などが含まれる。

⑤ 患者細胞由来神経幹細胞, 間葉系幹細胞 iPS 細胞の樹立

提供を受けた各患者由来試料から, 一般的な手法を用いて浮遊系細胞あるいは接着性細胞 (線維芽細胞, 間葉系幹細胞, 上皮細胞, 血管内皮細胞, 等) を分離し, 一定スケールまで培養後, 凍結保存する。また, 神経組織からは neurosphere 法を主体に Kanemura らの変法 (Kanemura et al. J Neurosci Res, 69, 869-879, 2002) を用いて神経幹細胞を分離し, 同様に培養・凍結保存する。また, 分離した各種患者由来細胞に, ウイルスベクターを用いて山中 4 因子 (Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4) を遺伝子導入し, 患者細胞由来 iPS 細胞樹立する。

⑥ 患者由来細胞の *in vitro* での細胞特性解析

前項までに樹立・分離した各種患者由来細胞, 幹細胞 (神経幹細胞, 間葉系幹細胞, iPS 細胞) とその分化細胞, に関して, 細胞形態, 増殖能, 細胞表面マーカー分子発現様式など *in vitro* 特性解析を実施する。また正常ヒト神経幹細胞 (を比較コントロールに使用して, 神経形態の特徴解析, 細胞構造特異的マーカー蛋白質の免疫組織学的解析, 突起進展, 樹状突起発達解析, シナプス形成の特徴解析, 機能蛋白質の発現解析, 神経回路網形成能の評価などを行う。

(オ) 診断基準作成に向けたとりくみ

症例を蓄積し, しっかりとした診断をつけ, 2 歳時の子後の調査を行う。診断に至る方法の有効性を検証し, 診断基準を策定する (図 3)。

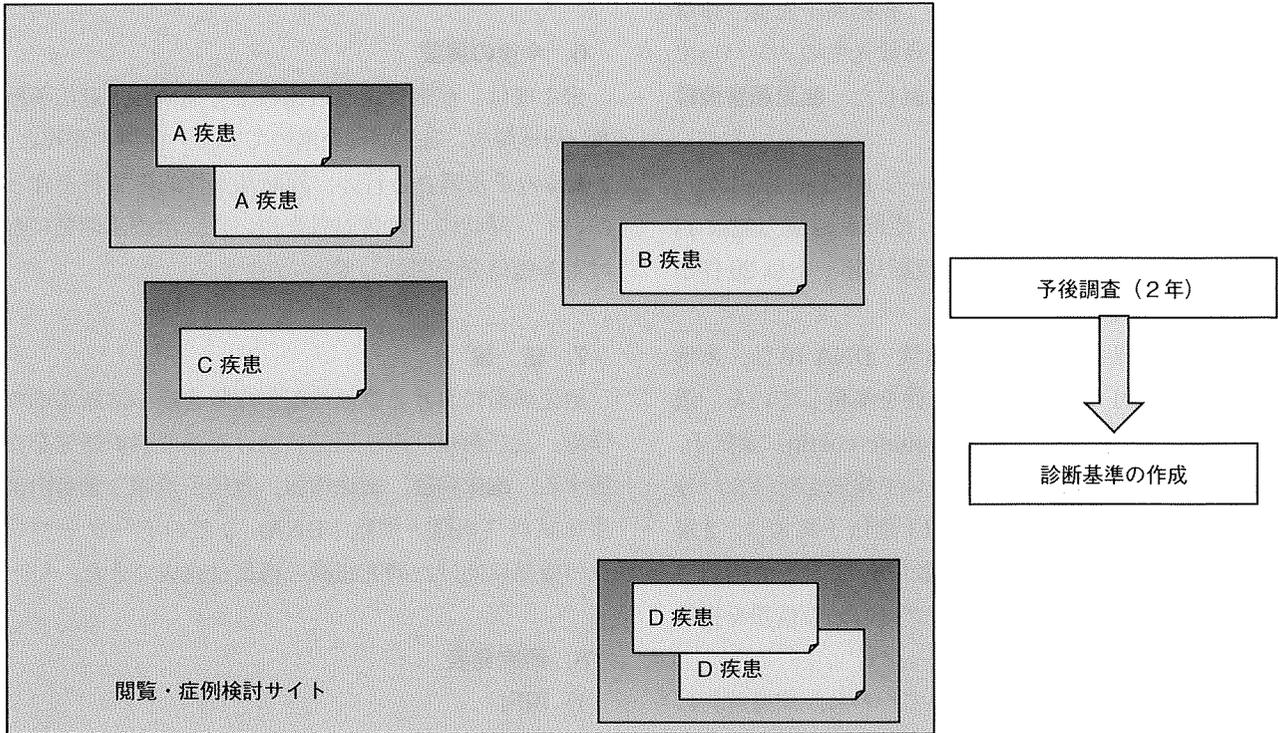


図3 症例分類・予後調査

#### (倫理面への配慮)

情報管理においては、個人情報管理とその漏洩防止に細心で嚴重な注意を払う。遺伝子解析がかかわる部分に関しては文部科学省・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】および遺伝医学関連10学会より提案された【遺伝学的検査に関するガイドライン】を遵守する。本研究の全体の計画に関しては、平成21年9月に国立病院機構大阪医療センター倫理委員会で『難治性脳形成障害症の病態解析と治療法開発』研究の実施について承認を受けた。また、各分担研究者施設での倫理委員会での申請を行い、その承認を受けている。

#### 4. 研究結果

(ア) まず難治性脳形成障害症の範疇で扱う対象疾患の整理を行った。その結果、2の対象疾患でまとめられた。

(イ) 症例登録、閲覧検討の班会議独自のサーバー、難治性脳形成障害症 (fetal brain malformation) サーバー (<http://fms.fetal-brain-malformation.jp>) を立ち上げた。症例登録施設として、北海道大学齋藤伸治先生、宮城県立こども病院白根礼造先生、埼玉県立小児

医療センター大橋博文先生、神奈川県立こども医療センター黒澤健司先生、国立成育医療研究センター師田信人先生、愛知県心身障害者コロニー中央病院長坂昌登先生、山形大学加藤光広先生、大阪大学香川尚己先生、大阪市立総合医療センター坂本博昭先生、国立大阪医療センター埜中正博先生、大阪府立母子保健総合医療センター岡本伸彦先生、竹本理先生、クリフム夫律子マタニティクリニック夫律子先生、森之宮病院荒木洋先生、慶應義塾大学小崎健次郎先生、大分県立病院吉岡進先生、聖マリア病院下川尚子先生、国立香川小児センター夫敬憲先生など17施設が協力を承諾してくれた。登録作業を済ませ、各施設での診療科のすり合わせや倫理委員会への申請などを順次済ませている。

(ウ) また遺伝子解析施設としては、北海道大学齋藤伸治先生、山形大学 加藤光弘先生、慶應義塾大学 小崎健次郎先生、東京医科歯科大学 井関祥子先生、大阪府立母子センター 岡本伸彦先生、国立大阪医療センター 金村米博先生の承諾を得た。

(エ) 病理解析施設として、京都府立医科大学 伏木信次先生、伊東恭子先生が登録された。

(オ) 画像解析は、国際福祉大学 宇都宮英綱先生、

神奈川県立子ども医療センター 相田典子先生，帝京大学 大場洋先生，東京大学 森毅先生のメンバーで構成された画像検討委員会を組織した。胎児超音波診断は，夫律子先生に依頼した。

(カ) サーバーが立ちあがった2009年12月から2010年2月までの3カ月間で，症例登録協力施設14施設から42件が登録された。読影レポートは20件が寄せられ，診断が確定した。

(キ) 患者生体試料は，検体数 DNA 10件，末梢血4件，臍帯1件，胎盤組織1件を集積している。遺伝子解析 L1 遺伝子，DCX (double cortin) 遺伝子，ARX 遺伝子，CASK 遺伝子について検索を行った(分担研究報告 加藤光広参照)。L1 遺伝子異常は，2家系で陽性であった。母が保因者であることが確認され，次子の遺伝子カウンセリングに有効な情報を提供した。

(ク) 病理検索は2例について行われ，病態解析に貢献している。(分担研究報告『胎児脳発達異常の出生前診断と病理に関する研究(伊東恭子)』参照)

(ケ) またDNAチップ，アレイCGHを用いて，難治性脳形成障害症を有する患者の微量検体由来のゲノムDNAを用いて，微細な染色体の構造異常を検出可能であることを示した。(分担研究報告 小崎健次郎，岡本伸彦，夫律子)』参照)

## 5. 評価

### 1) 達成度

今年度の目標である，研究組織を創りあげることが，達成した。各分野でのエキスパートや，症例が多く集まる病院を網羅しており，本研究課題の研究組織としては，高く評価できる。全国組織で一線の多忙を極める臨床家ばかりであるにもかかわらず，各施設での倫理委員会での承認の手続きなどを済ませ，すでに登録は，次々と進んでおり，このペースで展開すれば，目標症例数には，1年で達成される勢いである。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

西欧諸国では，重篤な脳形成障害があれば妊娠後期でも選択的妊娠中絶が施行されるという現状が先行し，われわれが参考にできるガイドラインもデータベースも存在しない。臨床と基礎・臨床遺伝の研究者が，稀少疾患に対する克服対策について一堂に会して，班会議を形成するのは，貴重なことであり，この分野では国際的にも注目される成果が期待できる。

## 6. 今後の展望

来年度は，症例登録を目標数まで達成し，遺伝子解析，病理解析，病態解析を進めていく。症例の整理と，2歳時の予後調査を行い，診断基準作成の資料を作っていく。同時に，生体試料を用いた，治療法開発にむけた基礎研究を開始していく。

## 7. 結論

胎児診断における難治性脳形成障害症の診断基準の作成，及び新規治療法開発に向けた病態解析研究を支援する，臨床病態，画像情報，遺伝子情報，患者由来生体試料(組織・細胞・DNA)などのデータベースの構築に向けた研究組織の構築は達成できた。

## 8. 研究発表

### 1) 国内

レビュー等の発表 12件

### 2) 海外

口頭発表 1件

そのうち主なもの

### 論文発表

1. 山崎麻美・坂本博昭，247-263，金芳堂，京都，2009年
2. 山崎麻美：大脳の先天性疾患「小児脳神経外科学」山崎麻美・坂本博昭，342-360，金芳堂，京都，2009年
3. 水頭症「小児脳神経外科」山崎麻美・坂本博昭，469-536，金芳堂，京都，2009年
4. 山崎麻美：先天性奇形の遺伝子検索の意義「脳神経外科 周術期管理のすべて」松谷雅生・田村晃，P410-417，メジカルビュー社，東京，2009年
5. 山崎麻美，埜中正博，北野元裕：水頭症/二分脊椎「小児科診療」72(8): P.1449-1454，診断と治療社，2009年
6. 山崎麻美，埜中正博，寺元千佳，伴千秋，夫律子：二分脊椎の胎児診断「小児外科」41(7): P.658-664，東京医学社，2009年
7. 山崎麻美，埜中正博：先天性水頭症の診断と治療「Neurological Surgery 脳神経外科」37(8): P.729-740，医学書院，2009年

### 学会発表

1. Yamasaki M, Nonaka M, Kanemura Y, Pooh R. Evaluation of prenatal diagnosis of isolated ventriculomegaly. Hydrocephalus 2009, Baltimore,

Maryland, USA, 2009年9月

**9. 知的財産権の出願・登録状況**

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

## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

## 胎児脳発達異常の出生前診断と病理に関する研究

研究分担者

伊東 恭子, 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

**研究要旨** 胎児水頭症と画像診断され、在胎 20 週前後で病理解剖となった胎児の脳発達異常について、病理学的検索を行った。一例は、滑脳症 (type II) で遺伝子異常は検索中、一例は *L1cam* 異常に伴う X 連鎖性水頭症であった。今後、症例を重ね、脳形成異常の出生前診断精度の向上、発生病理の研究、遺伝相談へのフィードバックに寄与することをめざしたい。

### A. 研究目的

本研究は難治性脳形成障害症の病態解析を行い、臨床的には胎児診断における難治性脳形成障害症の診断基準の作成をめざすものである。その過程において、臨床病態、画像情報、遺伝子・染色体検索から難治性脳形成障害症と診断された胎児の病理学的解析を詳細に行い、脳発達異常の本態を明らかにすることは重要である。我々は『胎児水頭症』と画像により出生前診断され、在胎 20 週前後で病理解剖となった胎児の脳発達異常について神経病理学的解析を行ったので報告する。

### B. 研究方法

1. 患者の臨床データは、難治性脳形成異常症臨床登録票に従って記載し、画像データとともにデータ集積サーバに、登録番号に従って整理した。サーバは独立行政法人国立病院機構大阪医療センターに設置されている。

#### 2. 病理学的解析

ご遺族に病理解剖の主旨及び意義を十分に説明し、病理解剖の承諾書をいただいた後、死体解剖保存法の規定に基づき病理医によって死体および死胎の病理解剖を行った。その組織は、京都府立医科大学病理学教室分子病態病理学部門において、詳細な病理

組織学的検索を行った。

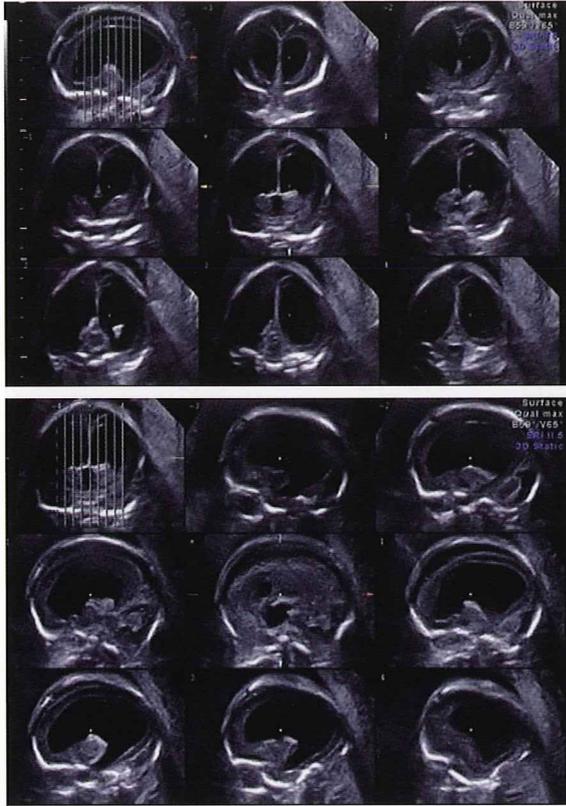
(倫理面への配慮)

インフォームド・コンセントのための手続及び方法として、「研究にご協力いただける皆様への説明文書」を用いて共同研究機関の説明者が口頭で、本研究の意義・目的・方法に関する内容、試料および採取法に関する事項、予想される研究成果および危険、個人情報の保護の方法、予測される不利益およびそれを防止する措置、研究成果の取り扱い、等の内容について十分説明し、研究協力の依頼を行った。本研究は、京都府立医科大学医学倫理審査委員会において承認を受けた (番号 C-638)。

### C. 研究結果

症例 1: 在胎 20 週男児。第 4 子で、第 1 子、第 2 子は男児で共に水頭症と診断され中絶、第 3 子は女児で正常発達をしている (*L1cam* は正常)。在胎 18 週で、胎児エコー、MRI で、水頭症、小脳低形成と画像診断された (図 1)。病理学的には、肉眼的に脳梁低形成をみるが、大脳壁の非薄化、水頭症は明らかではなく、小脳はやや低形成であるが虫部欠損は認められず、脳幹は正常であった (図 2)。組織学的に、大脳皮質には *glia limitans* をこえた未熟神経細胞のへ

Fetal US at 18W



Fetal MRI at 18W



図1 胎児エコーとMRI（症例1）. 水頭症, 小脳低形成を認める.

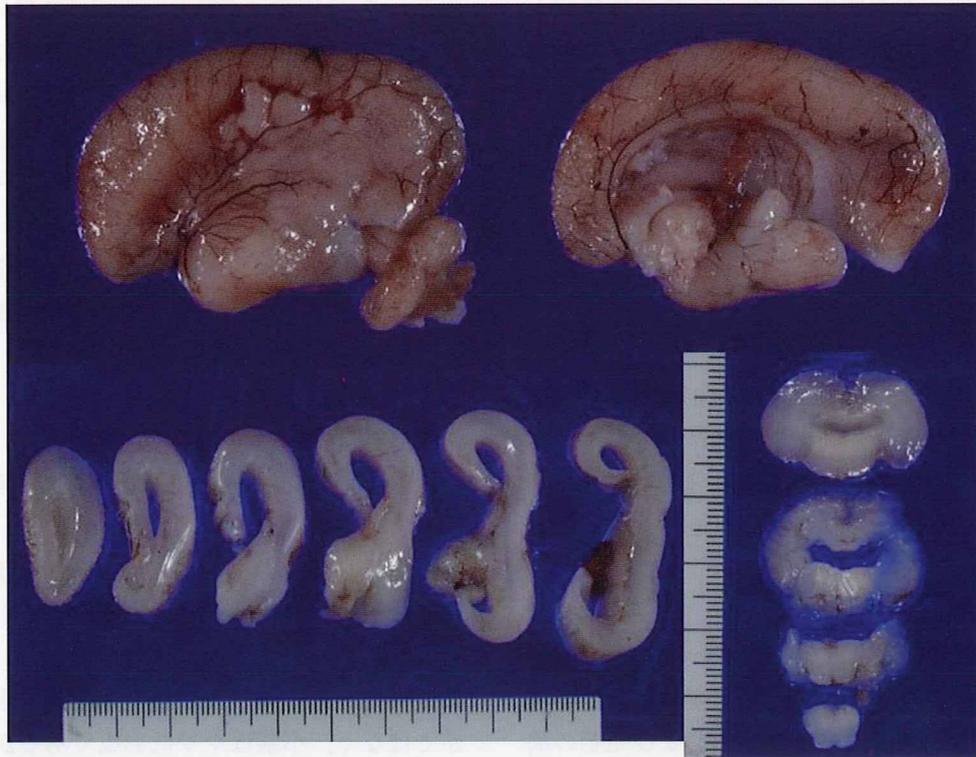


図2 脳の肉眼的所見（症例1）. 脳梁低形成をみるが, 大脳壁の菲薄化, 水頭症は明らかではない. 小脳はやや低形成であるが, 虫部欠損はみられない.