

201024186A

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 2010 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**

(H22 - 難治 - 一般 - 131)

平成 22 年度総括・分担研究報告書

平成 23 年 3 月
March 2011

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 2010 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 22 年度総括・分担研究報告書

平成 23 年 3 月
March 2011

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(平成22年度)

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	副院長 分子医療研究室長	
研究分担者	井関 祥子	国立大学法人東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科	教 授	
	伊東 恭子	京都府立医科大学大学院 医学研究科	准 教 授	
	宇都宮英綱	国際医療福祉大学大学院 放射線診断科	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	科 長	
	加藤 光広	山形大学医学部附属病院 小児科学講座	講 師	
	上口 裕之	独立行政法人 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	
	金村 米博	独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター	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	
	齊藤 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	副 院 長	
	西山 健一	新潟大学脳研究所 脳神経外科	助 教	
	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	
	大橋 博文	埼玉県立小児医療センター 遺伝科	科 長	
	大場 洋	帝京大学医学部 放射線科	准 教 授	
	押田 奈都	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	
	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	
	正礼 智子	独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター	室 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	
	寺元 千佳	独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター 看護部	助 産 師	
	遠山 潤	国立病院機構西新潟中央病院 統括診療部神経部小児科	医 長	
	長坂 昌登	あいち小児保健医療総合センター	副センター長 脳神経外科部長	
	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	
	原田 敦子	新潟医療センター 脳神経外科	医 長	
	馬場 庸平	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	専 修 医	
	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	教 授	
	藤井 裕士	広島大学病院 小児科	医 員	
	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 脳神経外科	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	
	室月 淳	宮城県立こども病院 産科	部 長	
	森 壘	東京大学医学部附属病院 放射線科	講 師	
	山田 崇弘	北海道大学病院 産科	助 教	
	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 e-mail mnonaka@onh.go.jp	医 員
	経理事務担当者	中本 達夫	同上 e-mail nakamot@onh.go.jp	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. FOXC1 遺伝子と水頭症発症に関する研究 19
東京医科歯科大学大学院分子発生学分野
井 関 祥 子
2. 胎児脳発達異常の出生前診断と病理に関する研究 25
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
3. 難治性脳形成障害症データベースにおける遠隔画像診断に関する研究 33
国際医療福祉大学大学院 放射線・情報科学分野
宇 都 宮 英 綱
神奈川県立こども医療センター放射線科
相 田 典 子
帝京大学医学部 放射線科学講座
大 場 洋
東京大学医学部附属病院 放射線科
森 壘
4. 橋小脳低形成を伴う小頭症, 精神遅滞における CASK 遺伝子の変異解析 39
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, 山 本 悠 斗
東京医科歯科大学難治疾患研究所 分子細胞遺伝
林 深, 稲 澤 讓 治
5. 大脳皮質形成障害の原因遺伝子解析に関する研究 43
山形大学医学部附属病院 小児科
加 藤 光 広

6. 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	47
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	
7. 神経軸索の再生技術開発に向けた基礎研究	51
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	
8. Hirschsprung 病を合併する先天性水頭症	53
慶應義塾大学医学部小児科学教室	
小崎健次郎, 下郷幸子, 中澤美絵, 鳥居千春	
9. X連鎖精神遅滞における SLC9A6 遺伝子変異の役割	57
北海道大学病院小児科	
齋藤伸治	
10. 難治性脳形成障害症の病態解析のための臨床情報の蓄積に関する研究： 頭蓋骨縫合早期癒合症を対象に	59
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	
11. 難治性脳形成異常症児の分娩に関する研究	65
宮城県立こども病院	
白根礼造	
12. 難治性脳形成障害症の外科治療における胎児 MRI の有用性に関する研究	67
新潟大学脳研究所 脳神経外科学分野	
西山健一	
新潟医療センター 脳神経外科	
原田敦子	
13. 胎児超音波検査による形態異常とマイクロアレイ CGH 微小染色体異常の検討	73
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	
14. Walker-Warburg syndrome 診断と症例コンサルテーションシステムの有用性	79
国立成育医療研究センター 脳神経外科	
師田信人, 荻原英樹, 上甲真宏	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	83

I. 総括研究報告

厚生科学研究費補助金（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

H22-難治-一般-131

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

斎藤伸治	北海道大学
白根礼造	宮城県立こども病院
師田信人	国立成育医療センター
加藤光広	山形大学
上口裕之	理化学研究所脳科学総合研究センター
井関祥子	東京医科歯科大学
小崎健次郎	慶応義塾大学
西山健一	新潟大学脳研究所
伊東恭子	京都府立医科大学
坂本博昭	大阪市立総合医療センター
岡本伸彦	大阪府立母子保健総合医療センター
夫律子	クリフムマタニティクリニック
金村米博	国立病院機構大阪医療センター
宇都宮英綱	国際福祉大学

A. 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ための臨床病態・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、先天性水頭症を始めとした難治性脳形成障害症の多くが、胎生期に同定されるようになった。本研究班が開始される前に、主任研究者らは、特定疾患対策研究事業『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。しかしながら胎児期脳室拡大と診断される中には、多くの**脳形成障害疾患が含まれており**、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た。

またこれらの疾患には、画像診断や病理診断がエキスパートによって充分検討されていないまま病名すらついていないものも多い。一方では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おいても、原因遺伝子が明らかになり、病態分類も変化しているものもある。そのため、それらのそれぞれの専門家が一堂に会して、検討することの意義は大きい。その成果を、出生前診断の領域に活かすための診断基準策定が第1の目的である。

第2の目的は、根本的治療法も予防法も不明なこれらの疾患の多くが希少疾患なので、病態データやこれら患者由来試料・細胞を集積することである。

B. 対象疾患

難治性脳形成障害症として、以下の疾患を対象にする(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

C. 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。症例登録、閲覧検討のための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。また小児放射線科のエキスパートによる読影委員会で検討をして、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。

(ウ) 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

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

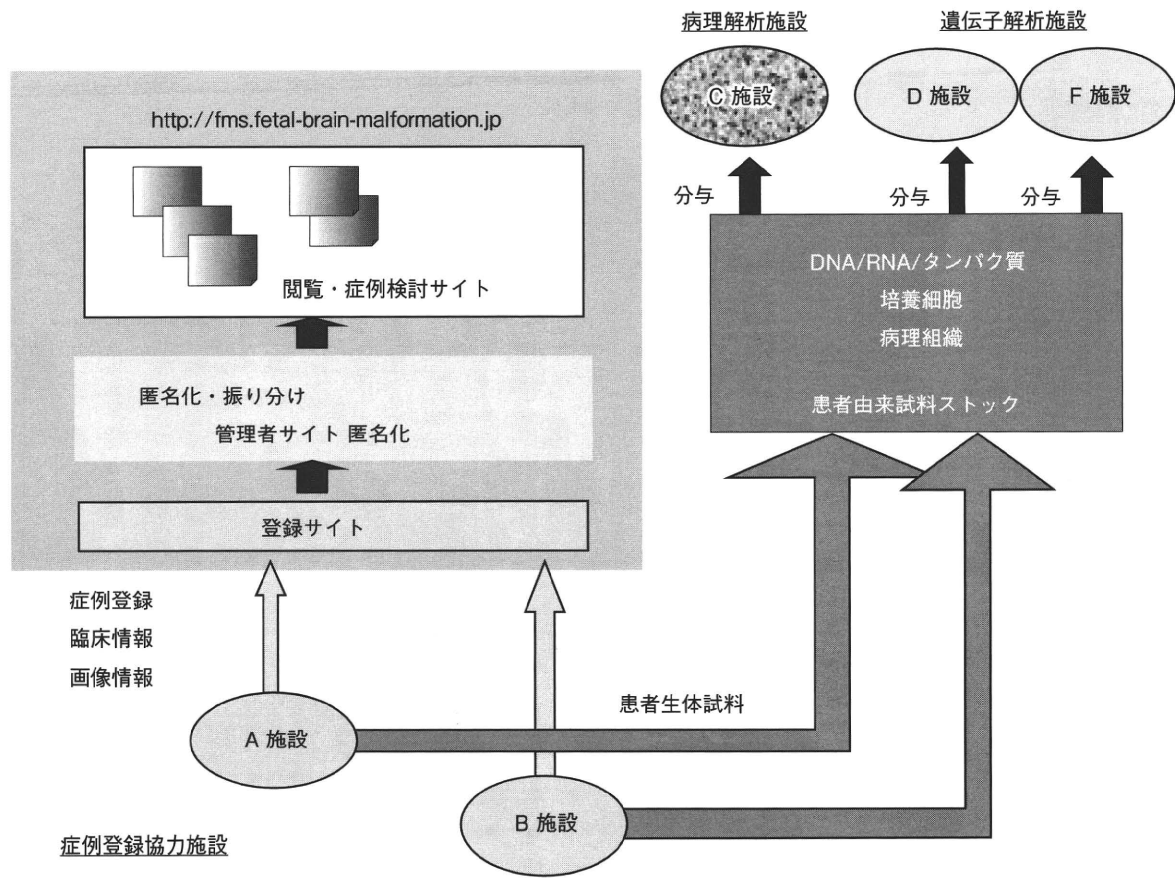


図1 症例登録・患者生体試料の登録

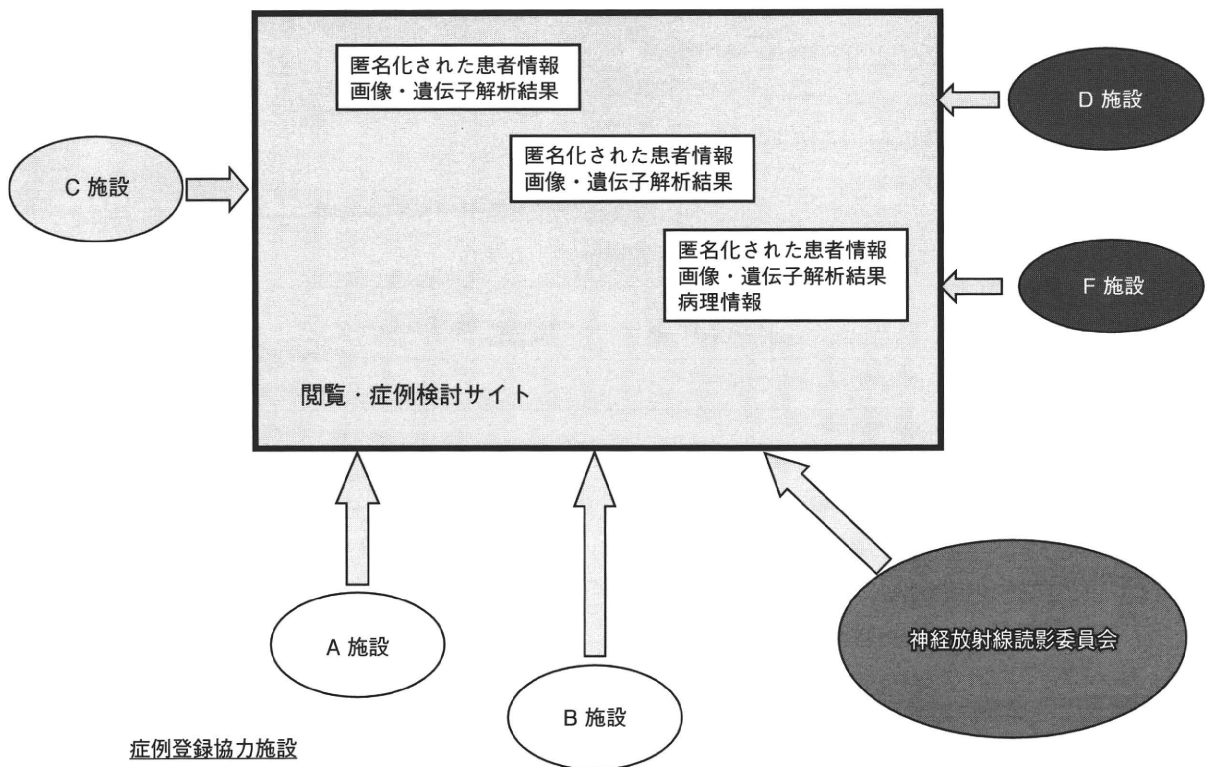


図2 症例検討委員会

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 サイトメガロウィルス 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	

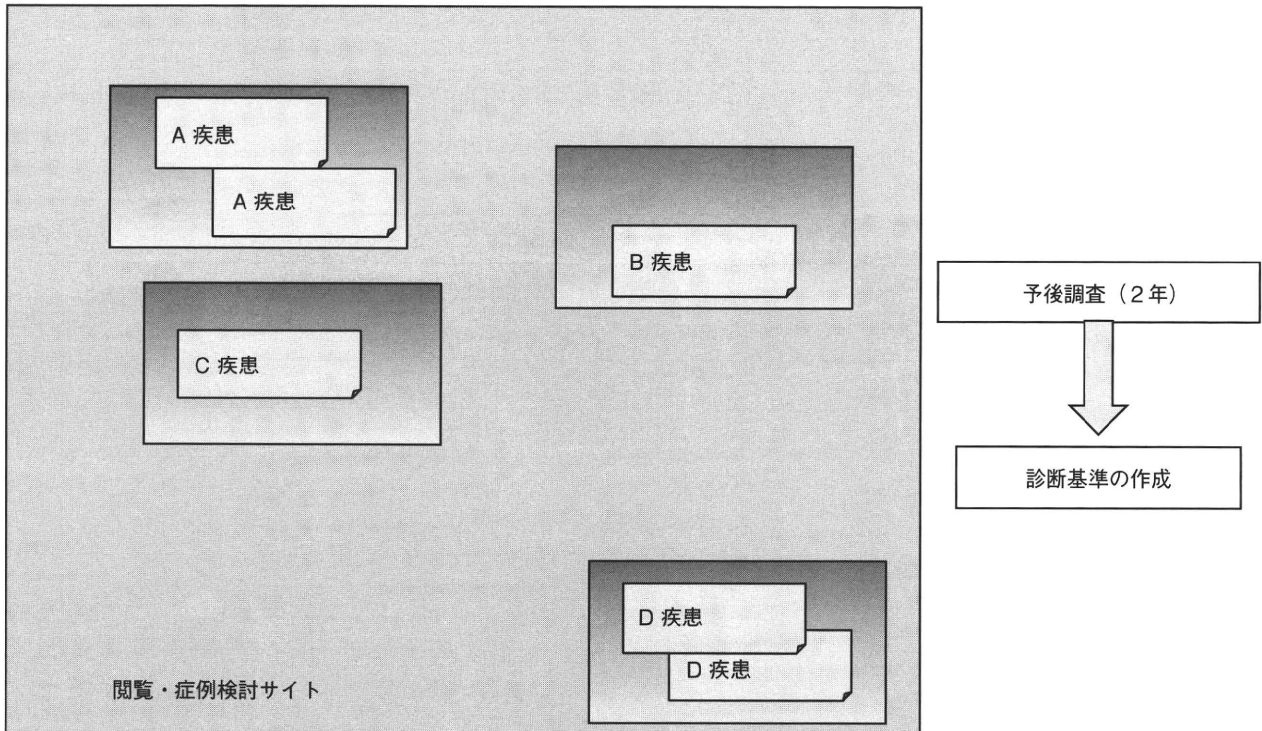


図3 症例分類・予後調査

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。また一部、患者細胞由来神経幹細胞、間葉系幹細胞 iPS 細胞の樹立をおこなう。

(エ) 診断基準作成に向けた取り組み

症例を蓄積し、しっかりとした診断をつけ、2歳時の予後の調査を行う。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）。

(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厳重な注意を払う。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。

D. 研究結果

(オ) 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、症例登録施設17施設が登録作業を済ませ、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、22年度は、実際にサーバーへの登録が開始した。

(カ) サーバーが立ちあがってから、2009年12月～2011年2月の間に、症例登録協力施設17施設から108件が登録された。

(キ) 画像解析診断は、国際福祉大学 宇都宮英綱先生を中心に、神奈川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 森毅先生の小児神経放射線科のエキスパートで構成した。サーバーを利用した遠隔診断システムを用い、ディスカッションしてレポートを完成させるというユニークな方法で、これまで43のレポートを作成している。これ

まで各専門領域の中で独自の診断がなされていた現状を超えるものになった。このシステムを利用して初めて診断が明らかになった症例も多い。(宇都宮英綱先生分担研究報告書)

(ク) **病理解析診断**には、京都府立医科大学 伏木信次先生、伊東恭子先生があたり、これまで13例の病理解剖を実施している。(伊東恭子先生分担研究報告書)

(ケ) また**遺伝子解析**は既知の遺伝子異常が疑われる *L1* 遺伝子, *DCX* (double cortin) 遺伝子, *ARX* 遺伝子, *CASK* 遺伝子, *FGFR1, 2, 3* 遺伝子, *Zic2* 遺伝子などについて検索を行った。また、5月に班会議を開き、それまでに症例登録をされた症例を検討した。登録症例は、いくつかの群に分類された。①著明な脳室拡大、小脳低形成の群、②全前脳胞症の群、③胎児期初期には軽度脳室拡大を呈するもその後小頭症を呈する群、④細胞移動障害を呈する群、④頭蓋骨縫合早期癒合症を含めた骨系統疾患の群など、⑤小脳低形成の群である。①は *L1* 遺伝子異常のものとそれ以外にまず分けられる。それらについて、DNAチップ、アレイCGHを用いて網羅的な遺伝子解析の方法によってどこまで診断できるかを、それぞれ担当し開始している。①に関しては、金村米博先生、②は小崎健次郎先生、③は加藤光広先生、④坂本博昭先生、⑤は岡本伸彦先生がそれぞれ担っている。

(コ) いまやルーチン検査となっている**胎児超音波診断**は、全身合併症の検索に優れている。夫律子先生は胎生期に脳回形成をどこまで明らかにできるかについての研究を開始している。(夫律子先生分担研究報告書)

(サ) 患者生体試料は、15施設から合計123検体の試料の提供を受け、DNA試料54検体、培養細胞試料69検体を分離・樹立し、各々保管した。また研究班組織内で収集検体を相互利用する体制を確立した。これら難治性脳形成障害症患者由来の生体試料並びに培養細胞は、当該疾患の病態解明に大きく貢献できるものと考えられる。(詳細は金村米博先生分担研究報告書)

(シ) 本年度は、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た。(上口裕之先生分担研究報告書、井関祥子先生分担研究報告書)

(ス) 診断基準に向けた取り組みとして、今回胎児期水頭症診断と治療ガイドラインの改訂第2版を刊行した。

E. 考 察

昨年度創りあげた研究組織を活用した症例登録は順調にすすんでいる。本研究班が、症例が多く集まる病院の協力を得られた結果、1年間で100例を超える登録があった。神経小児科医、小児脳神経外科医、産科医など一線の多忙を極める臨床家が、登録しやすい体制を整えた。つまり、大型サーバーにオンラインで各症例のDICOMデータをアップし、遠隔診断および議論ができるようにした。小児神経放射線医、臨床遺伝子学、小児神経病理、のエキスパートがその診断の議論に加わり、意見や読影レポートを提出でき、またそれを全体が閲覧できるシステム自体は、このような希少疾患のコンサルテーションシステムとして高く評価できる。今回採用した、サーバーを利用したオンライン登録システムは有用であった。その中で、神経放射線学的診断、分子遺伝子学的診断、病理学的診断、胎児超音波診断方法を駆使し、確定診断がされていった。このような難治性疾患においては、診断に至るプロセスそのものが、診断基準の基礎となる。

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、希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。来年度の課題として、ガイドラインの英訳本を準備している。

F. 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を目的として開始した本研究班が採用したシステムは、画期的で、今後の希少疾患のコンサルテーションシステムの構築の参考になる。

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、病態解析を進めての結果を踏まえた症例の整理と、2歳児の予後調査を行う。それを診断基準の作成へと結び付けていく。

これらの集積された臨床病態、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は、今後、難治性脳形成障害症の病態解析、予防法の確立、新規治療法開発の研究に大きく貢献するものである。

G. 研究発表

(ア) 論文発表

- 1) Bamba Y, Nonaka M, Nakajima S, Yamasaki M. Three dimensional-reconstructed CT-MR fusion image – based preoperative planning for surgical procedures for spinal lipoma or tethered spinal cord after myelomeningocele (MMC) repair. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2011; 51 (5) in press
- 2) 山崎麻美：「胎児期水頭症 診断と治療ガイドライン 改訂2版」山崎麻美編集代表，金芳堂，京都，2010年
- 3) 山崎麻美：胎児診断された水頭症の治療方針は？「EBM 脳神経外科疾患の治療 2011-2012」宮本 享，新井 一，鈴木倫保，渋谷 一郎，中瀬裕之編，338-343，中外医学社，東京，2010年
- 4) 山崎麻美：水頭症「リハビリテーションポケットマニュアル」診断と治療社，東京 印刷中
- 5) 山崎麻美，埜中正博：脳室腹腔シャント（V-P シャント術）「脳神経外科臨床マニュアルⅡ 改訂第4版」端 和夫編，680-692，シュプリンガー・ジャパン，東京，2010年
- 6) 山崎麻美，埜中正博，馬場庸平，寺元千佳，伴 千秋，夫 律子：胎児期水頭症の診断と治療および長期予後「脳神経外科ジャーナル」印刷中
- 7) 山崎麻美：先天性水頭症の長期予後「周産期医学」40 (8)：1197-1201，2010
- 8) 山崎麻美：小児脳神経外科領域における遺伝子診断「NEUROLOGICAL SURGERY 脳神経外科」39 (1)：65-77，2011
- 9) 山崎麻美：先天性水頭症と二分脊椎 「小児神経学の進歩」印刷中

(イ) 口頭発表

国際学会 15件
国内学会 54件

そのうち主なもの

- 1) Yamasaki M. The research into molecular biology and stem cell research in hydrocephalus. The Korean Society for Pediatric Neurosurgery 2010, Seoul, Korea, May 2010
- 2) Yamasaki M. For the establishing of criteria in prenatal diagnosis of intractable fetal brain malformation. 6th International Academy of Perinatal medicine, Scientific Program International Symposium on Fetal Neurology, Osaka, Japan, Oct 2010
- 3) Yamasaki M, Nonaka M, Shofuda T, Kanemura Y. Prenatal molecular diagnosis and stem cell research in severe type of L1CAM syndrome (X-linked hydrocephalus). 5th International Hydrocephalus Workshop, Crete, Greece, May 2010
- 4) Yamasaki M, Nonaka M, Shofuda T, Kanemura Y. Prenatal molecular diagnosis and stem cell research in severe type of L1CAM syndrome (X-linked hydrocephalus). 15th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy. Amsterdam, Netherlands, July 2010
- 5) Yamasaki M, Nonaka M, Bamba Y, Teramoto C, Pooh R. Evaluation of prenatal diagnosis of isolated ventriculomegaly. Society for Research into Hydrocephalus and Spina Bifida 54th Annual Scientific Meeting. Vancouver bc, Canada, July 2010

H. 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

FOXC1 遺伝子と水頭症発症に関する研究

研究分担者

井 関 祥 子

東京医科歯科大学大学院分子発生学分野

A. 研究目的

FOXC1 は forkhead-box ドメインを持つ FOX 転写因子ファミリーのメンバーであり、FOXC1 遺伝子はヒトでは 6p25 に位置する。FOXC1 遺伝子の機能欠失型変異が、水頭症や緑内障を主徴とする Axenfeld 症候群や Rieger 症候群を引き起こすことが報告されている。症候群性ではない緑内障を引き起こす原因遺伝子でもあり、その変異の報告は比較的多いが、症候群性でない水頭症との関係はほとんど知られていない。

マウス *Foxc1* 遺伝子は 13 番染色体に位置し、*Foxc1* 遺伝子欠失マウスは水頭症、眼の発生異常、骨格形成異常を示し、新生仔致死となる。*Foxc1* 遺伝子の DNA 結合領域である winged helix モチーフ中に、ストップコドンへと変化させる点突然変異を持つ自然発症マウスの系統 congenital hydrocephalus (*ch*, *Foxc1^{chlch}*) は、*Foxc1* 欠失マウスと同様の表現型を呈し、水頭症を発症している脳に出血を頻繁に認める。

本研究では、ヒトの先天性水頭症における FOXC1

遺伝子の変異を検討するとともに、*Foxc1^{chlch}* マウスを用いて *Foxc1* 遺伝子の脳領域形成における役割について検討し、ヒト水頭症の発現メカニズムの理解の一助となる可能性を検討することを目的とする。

B. 研究方法

(1) ヒト FOXC1 遺伝子の配列解析

ヒト FOXC1 遺伝子はその全長 3,450 bp が 6p25 に forward 向きに位置している。全長が exon1 に転写され、mRNA も 3,450 bp 長である。コーディング領域とその（すぐ）上流のプロモーター領域を配列解析の対象とし、以下の計画を立てた。

1. (遺伝子) 供与者より得た遺伝子から PCR (法) により増幅した FOXC1 遺伝子配列を読み取る。
2. 遺伝子配列比較ソフトウェアにより配列比較を行う。
3. 既知・未知の遺伝子変異の有無、病態との相関を検討する。

ヒト FOXC1 遺伝子は図 1 のように GC 含量が高い

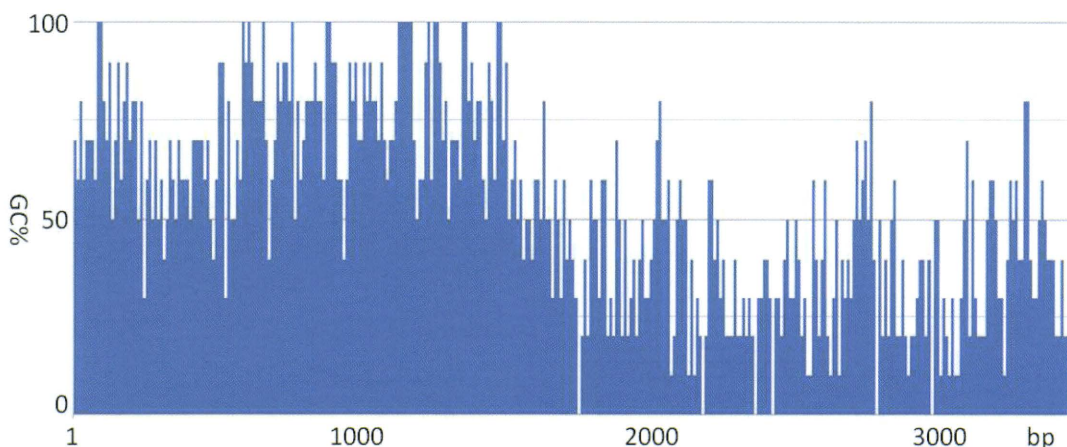


図 1 ヒト FOXC1 配列中の GC 率 (%)

ので、PCR 効率を考慮して増幅断片を以下の5つの block に設定した。

block1: *FOXC1* 遺伝子の upstream 973 bp から *FOXC1* 遺伝子内 82 bp まで

block2: *FOXC1* 遺伝子内 9 bp から *FOXC1* 遺伝子内 941 bp まで

block3: *FOXC1* 遺伝子内 759 bp から *FOXC1* 遺伝子内 1804 bp まで

block4: *FOXC1* 遺伝子内 1664 bp から *FOXC1* 遺伝子内 2732 bp まで

block5: *FOXC1* 遺伝子内 2584 bp から *FOXC1* 遺伝子 downstream 212 bp まで

本研究は東京医科歯科大学倫理委員会の承認を得ている。

(2) *Foxc1^{chlh}* マウスの組織学的解析

マウスは C57BL/6 マウスをバックグラウンドとして交配し、通常の明暗サイクルにおいて飼育し、膣栓確認日の朝9時を胎齢0日とした。胎仔は目的とする胎齢において母獣より摘出後、適当な組織塊にトリミングし、4%パラフォルムアルデヒド/PBS 溶液で一晩固定した。PBS で洗浄した後に 12.5%スクロース/PBS、25%スクロース/PBS で置換し、OCT コンパウンドに包埋して凍結切片を作製し、免疫組織化学染色、*in situ* hybridization を施した。

C. 研究結果および考察

(1) ヒト *FOXC1* 遺伝子の配列解析

PCR は以下の条件で行うことで目的の配列のみが増幅されることが確認できた。

primers と PCR 産物長および GC 含量率 (%)

block	primer 名	primer 配列
block1	hFOXC1-0973F	gctggcgaaggaatgaga
	hFOXC1_0082R	CGCGGTAGTAGCTCTGCTC
		1055bp, GC=75%
block2	hFOXC1_0009F	GCGCTACTCCGTGTCCAG
	hFOXC1_0941R	ATGATGTTGTCCACGCTGAA
		933bp, GC=71%
block3	hFOXC1_0759F	GGTGCCCAAGATCGAGAG
	hFOXC1_1804R	GATATTCTGTTCGCTGGTGTG
		1046bp, GC=69%
block4	hFOXC1_1664F	ACACCCTCAAAGCCGAAC TA
	hFOXC1_2732R	ACAGGCATCACCGTGGTAAG
		1069bp, GC=36%
block5	hFOXC1_2584F	TCAGCTTGCTTTGAGGCTAGT

hFOXC1+0212R ccccgaaagaggctgtaac
1079bp, GC=43%

PCR 反応液と PCR 反応条件

block 1, 2, 3 について

GoTaq Hot Start Green Master Mix	10.0 μ l
Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ l
Genome (0.5 μ g/ μ l)	0.1 μ l
DMSO	1.0 μ l
H ₂ O	8.1 μ l

PCR 反応

Step 1	95.5°C	240 sec
Step 2	95.5°C	60 sec
Step 3	66.9°C	40 sec
Step 4	72.0°C	90 sec
Step 5	72.0°C	720 sec
Step 6	4.0°C	forever

(Step 2-4 を 40 回繰り返す)

block 4, 5 について

GoTaq Hot Start Green Master Mix	10.0 μ l
Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ l
Genome (0.5 μ g/ μ l)	0.1 μ l
H ₂ O	9.1 μ l

PCR 反応

Step 1	95.5°C	240 sec
Step 2	95.5°C	60 sec
Step 3	58.0°C	40 sec
Step 4	72.0°C	90 sec
Step 5	72.0°C	720 sec
Step 6	4.0°C	forever

(Step 2-4 を 40 回繰り返す)

PCR 反応液を 1% Agarose ゲル中にて 20 分電気泳動し、EtBr をインターカレートさせたのち蛍光下でバンドを可視化して PCR 産物入りのゲルを切り出した。

PCR 産物抽出キットを用いて PCR 産物を抽出精製し、50 μ l の水溶液として得た。

PCR 産物 11.0 μ l と、対応する forward または reverse primer 1.0 μ l の混合液を遺伝子配列解析サービスに提出し、結果を得た。

健常者の遺伝子について上記操作を行い、目的のPCR反応産物が得られていることが確認できた。

今後、複数の遺伝子供与者から同じ操作を行い、遺伝子配列解析サービスから得られる読み取り結果と、データベース上のヒト *FOXC1* 配列を、遺伝子配列比較ソフトウェアにて比較することで、遺伝子配列変異を検出できる。

これまでヒト *FOXC1* 配列内には、56 個の遺伝子変異が見つかった (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)。病態と関連付けられたものはそのうち 11 個である (www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/601090)。

FOXC1 タンパクは以下の 553 アミノ酸よりなる。
 MQARYSVSSPNSLGVVYPYLGGEQSYRAAAAAAGGG
 YTAMPAPMSVYSHPAHAEQYPGGMARAYGPYTPQP
 QPKDMVKPPYSYIALITMAIQNAPDKKITLNGIYQFI
 MDRFPFYRDNKQGWQNSIRHNLNLNECFVKVPRD
 DKKPKGKGSYWTLDPDSYNMFENGSLRRRRRFKFKK
 DAVKDKEEKDRLHLKEPPPPGRQPPAPPEQADGN
 APGPQPPVRIQDIKTENGTCPSPPQPLSPAAALGSG
 SAAAVPKIESPDSSSSSLSSGSSPPGSLPSARPLSLDGA
 DSAPPPPAPSAPPPHHSQGFSVDNIMTSLRGSPPQSAA
 AELSSGLLASAAAASSRAGIAPPLALGAYSPGQSSLYSSP
 CSQTSSAGSSGGGGGAGAAGGAGGAGTYHCNLQA
 MSLYAAGERGGHLQGAPGGAGGSAVDDPLPDYSLP
 PVTSSSSSSLSHGSGGGGGGGGQEAGHHPAAHQGR
 LTSWYLNQAGGDLGHLASAAAAAAGYPGQQQNF
 HSVREMFESQRIGLNNSPVNGNSSCQMAFPSSQSLY

RTSGAFVYDCSKF

このうち、

- 1) 78-155 が forkhead ドメイン (赤文字)
 - 2) 114, 115, 124, 127, 128, 148 番残基が DNA と結合して標的遺伝子の転写開始に働く部位 (太字)
 - 3) 228, 232, 235, 241, 320 番残基がリン酸化される残基 (青文字)
- である。

- 4) 下線は既知の SNP に該当する残基である。

今後は大阪医療センターよりの試料提供を受けて変異を検討していく予定である。

(2) *Foxc1^{chlch}* マウスの組織学的解析

Foxc1 遺伝子の発現パターンを、GC 含量が低い 3' 領域に結合するプローブを作成して *in situ* hybridization を行った。図 2 に示すように、野生型では少なくとも胎齢 10 日 (E10) には神経管の周囲の頭部間葉に血管内皮も含めて *Foxc1* の発現が認められた。胎齢 11 日には大脳に血管が侵入していた。胎齢 12 日になると大脳周囲の間葉において脳に近接する領域、すなわち将来髄膜となる間葉細胞に発現が限局してきた。さらに鼻領域の軟骨の形成領域での強い発現が認められた。

一方、外観より胎齢 11 日には大脳の拡張が認められた (図 3)。マウス胎齢 11 日では中枢神経系は神経管とほぼ同様であることから、中脳水道の狭窄や閉塞などが影響しているとは考えにくい。また、野生型での大脳への血管侵入の時期と一致したために、大脳に

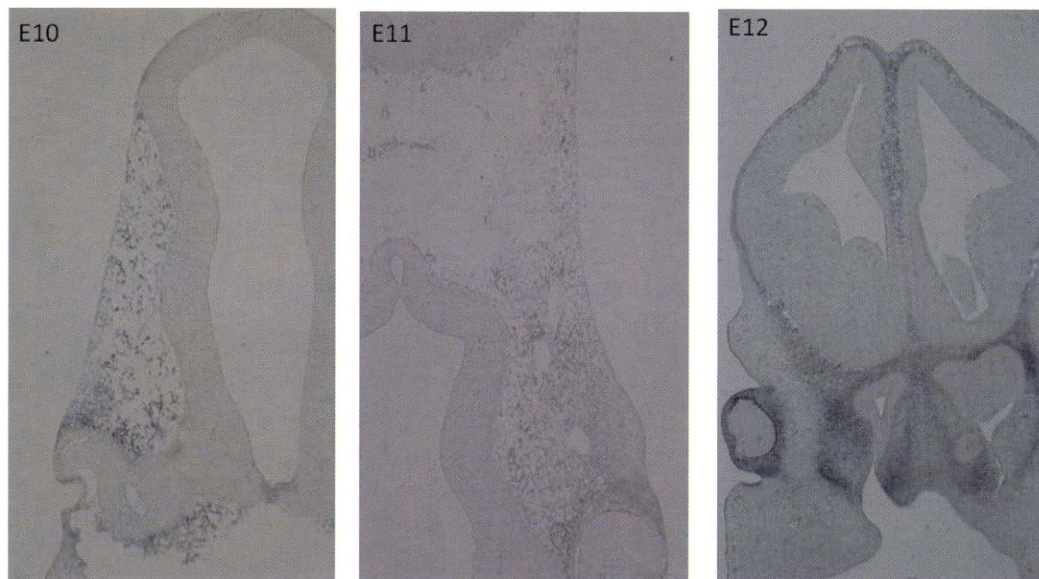


図 2 *Foxc1* の発現を *in situ* hybridization で検討したもの

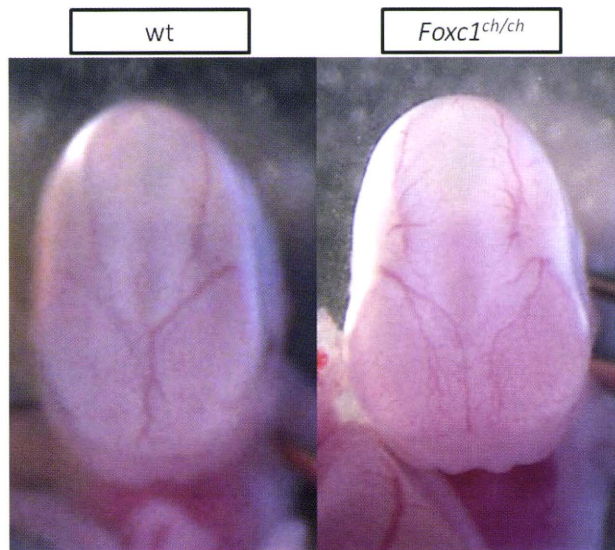


図3 胎齢11日頭部の上方からの観察。Foxc1^{chl}にはすでに大脳の拡張が認められる。

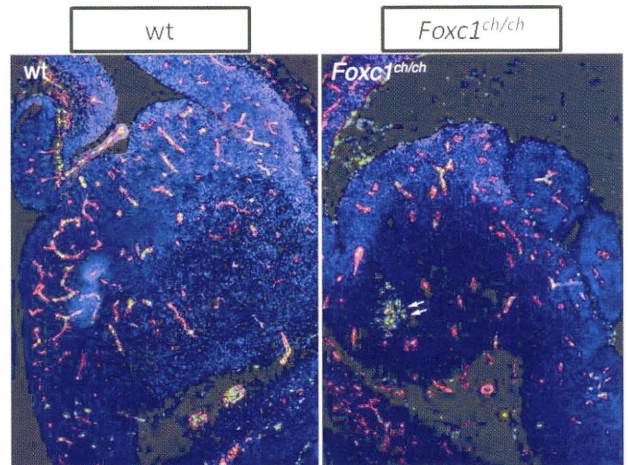


図5 胎齢13日大脳の基底部分における血球（緑）と血管（赤）の局在。矢印の部分で出血していると考えられる。

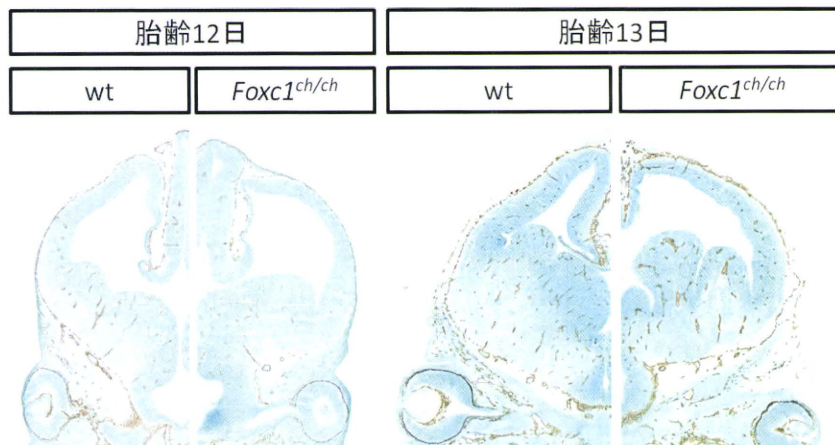


図4 胎齢12,13日の前頭断切片における血管内皮マーカー CD31の免疫染色像

における血管網構築について検討した。血管内皮の侵入は胎齢12日ではFoxc1^{chl}マウスでは遅れており、また、放射状に侵入していく様子も認められなかった。胎齢（図4）13日になると、放射状を描く血管網形成パターンはFoxc1^{chl}マウスには認められず、さらには血管が野生型と比較して径が大きくなっていることが観察された。また、胎齢13日の大脳の基底部分において赤血球と血管の局在を免疫染色で検討すると、一部で出血傾向が認められた（図5）。

D. 結論

Foxc1^{chl}マウス表現型解析より、ヒト水頭症でのFOXC1変異について、および変異と表現型の関連についてマウスを用いて検討を続ける意義が大きいと考えられた。Foxc1^{chl}マウスにおける表現型の発現メ

カニズムを明らかにすることは、ヒト脳形成障害症の診断の基準に基盤情報を与えると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kimura A, Inose H, Yano F, Fujita K, Ikeda T, Sato S, Iwasaki M, Jinno T, Ae K, Fukumoto S, Takeuchi Y, Itoh H, Imamura T, Kawaguchi H, Chung UI, Martin JF, Iseki S, Shinomiya K, Takeda S. (2010) Runx1 and Runx2 cooperate during sternal morphogenesis. Development 137 (7): 1159-1167.
- 2) Ebe N, Hara-Yokoyama M, Iwasaki K, Iseki S, Okuhara S, Podyma-Inoue KA, Terasawa K, Watanabe A, Akizuki T, Watanabe H, Yanagishita M, Izumi Y. (2010) Pocket epithelium in the pathological setting for HMGB1 release. J. Dent. Res. 90 (2): 235-240.

2. 学会発表

- 1) 長岡亮介, 奥原 滋, 天笠光雄, 井関祥子: 胎児期低酸素状態が顔面形成に与える影響. 第50回 日本先天異常学会 学術集会 平成22年7月8-10日 淡路市
- 2) 鈴木尋之, 須田直人, 志賀百年, 谷本幸穂, 中村正孝, 井関祥子, 森山啓司: Apert 症候群型の変異 FGFR2 とその可溶性変異体を過剰発現するトランスジェニックマウスの解析. 第69回 日本矯正歯科学会 平成22年9月27-29日 パシフィコ横浜
- 3) 永山友子, 中原 貴, 太田正人, 春日井昇平, 井関祥子: FGF シグナルの胎児マウス頭蓋冠骨芽細胞分化に与える影響. 第30回 日本炎症・再生医学会 平成22年8月5-6日 東京
- 4) Nagaoka R, Okuhara S, Amagasa T, Iseki S. Effects of embryonic hypoxia on maxillofacial development. The 16th International Society of Differentiation Conference, 15-18 November 2010 Nara
- 5) Okuhara S, Sagai T, Nagaoka R, Amano T, Shiroishi T, Iseki S. Cleft palate in compound heterozygote of sonic hedgehog and MFCS4. The 16th International Society of Differentiation Conference, 15-18 November 2010 Nara
- 6) Suzuki H, Suda N, Shiga M, Tanimoto Y, Nakamura M, Iseki S, Moriyama K. Osteoblastic differentiation of transgenic mice overexpressing Apert syndrome-type mutant FGFR2 and its soluble form. The 10th Tooth Morphogenesis and Differentiation, 1-4 September 2010 Berlin

F. 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