

201128091B

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 2011 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～平成23年度総合研究報告書

平成24年3月

March 2012

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 2011 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 23 年度総合研究報告書

平成 24 年 3 月  
March 2012

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

# 目 次

## 総合研究報告書

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 .....5  
独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター  
山崎 麻美
  
2. 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  
— 画像解析結果報告 — ..... 11  
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 壱
  
3. 神経軸索の再生技術開発に向けた基礎研究 ..... 15  
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
  
4. Angelman 症候群の表現型を示す SLC9A6 変異の頻度と病態 ..... 17  
名古屋市立大学大学院医学研究科新生児・小児医学分野  
齋藤 伸治

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総合研究報告書

# 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 副院長

研究分担者

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
西山健一	新潟大学脳研究所
斎藤伸治	名古屋市立大学
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
小崎健次郎	慶応義塾大学
伊東恭子	京都府立医科大学
宇都宮英綱	国際福祉大学
金村米博	国立病院機構大阪医療センター

**研究要旨** 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、2年間で約200例の症例登録があった。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くなり、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。神経放射線学的診断、分子遺伝子学的診断、病理学的診断方法を駆使し、確定診断がされた。患者生体試料は、15施設から合計255検体の試料の提供を受け、DNA試料115検体、培養細胞試料140検体を分離・樹立し、各々保管した。またこのような難治性疾患において、診断に至るプロセスそのものが、診断基準の基礎となる。

### 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、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は現在、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。

- (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) 脊髄髄膜瘤および脊髄形成異常

- (ケ) 頭蓋縫合早期癒合症
- (コ) 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 (図1)

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。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。

### (ウ) 患者由来生体試料のバンク化 (図3)

- 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。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。

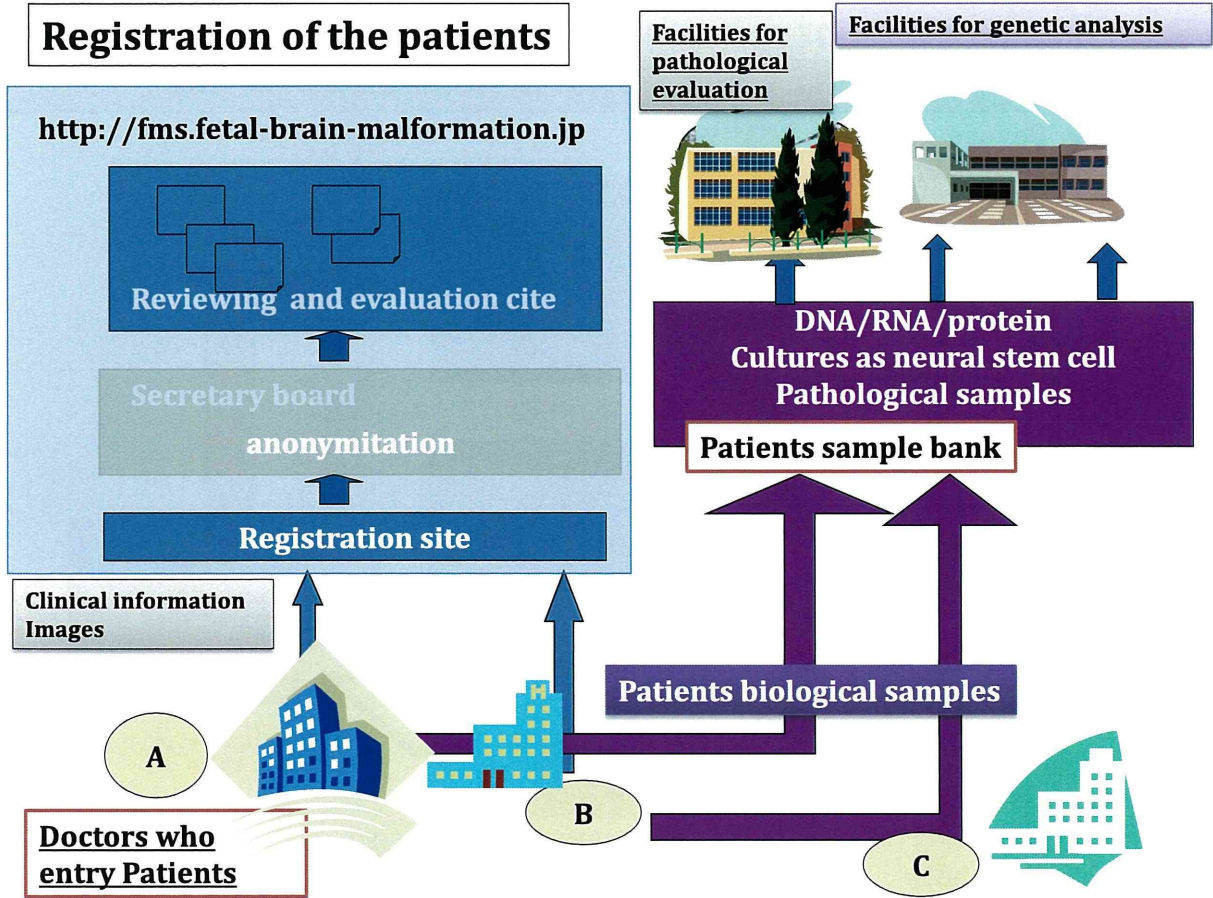


図 1

## Reviewing and evaluation cite

<http://fms.fetal-brain-malformation.jp>

Anonymous Patients information

**Fetal Brain Malformation**

**問病・症例検討ホルダー**

T-001 【問病診断種別】：【論究】【出生後】：Complete callosal agenesis with non-communicating IHC in the posterior interh...

--- (2011.07.30 種別変更あり) ---

コメントを見る/記入する(コメント)

関連するドキュメント

ID	トキコメントID	トキコメント名	説明	更新日時
ID:0000004151			DICOMfile	
ID:0000004982			DICOMfile (4981)	
ID:00000004983			DICOMリポネナル (4981)	
ID:00000001152			リポネナル (IST0000001)	
ID:00000005320			報告書	
ID:00000005321			報告書	

Gene analysis reports

Neuroradiological Reports by review board of 4 experts of pediatric neuroradiologists

図 2

## Generation of iPS cells from somatic cells of congenital CNS abnormalities patients

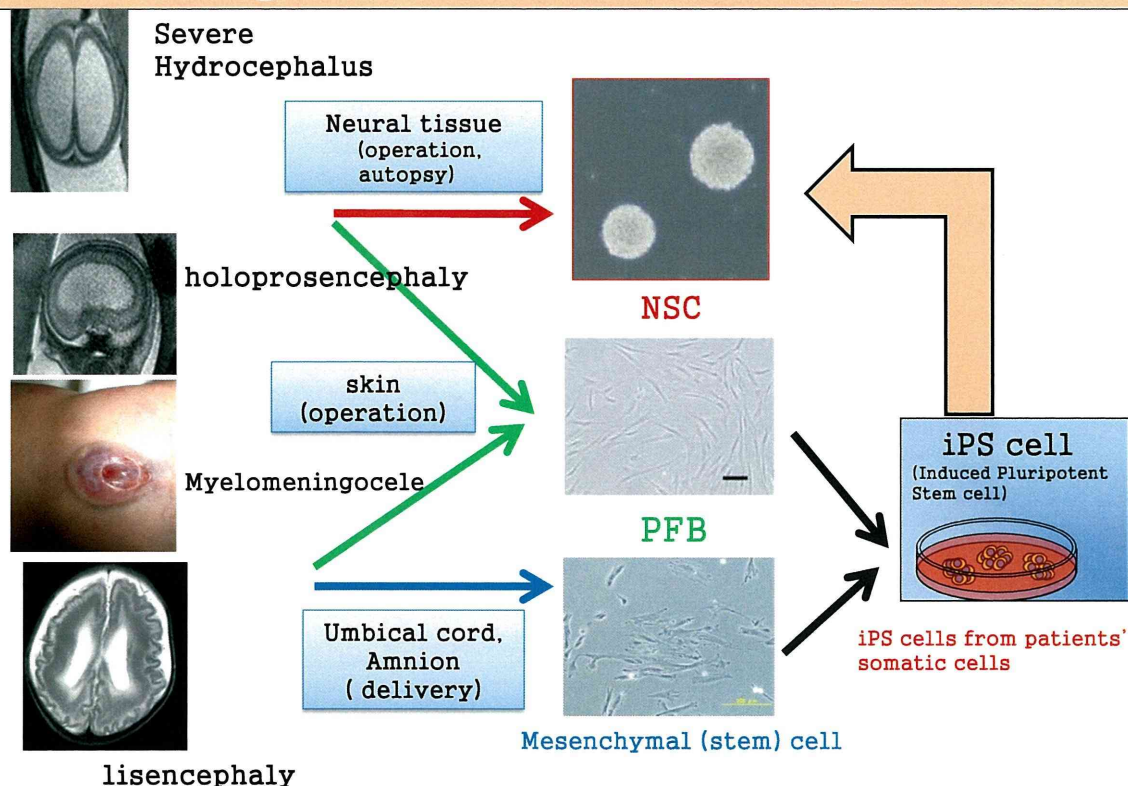


図 3

### (エ) 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。

### (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

(ア) 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18施設が登録している。(図1)

(イ) サーバーが立ちあがってから、2009年12月～2012年2月の間に、症例登録協力施設18施設から189件が登録された。

(ウ) 画像解析診断は、国際福祉大学 宇都宮英綱先生を中心に、神奈川県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、これまでに105例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。(図2)

(エ) 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14例の病理解剖を実施している。

(オ) また遺伝子解析は既知の遺伝子異常が疑われ

る症例について疾患遺伝子解析を行った。L1 遺伝子は 38 例に行い、27 例に遺伝子異常を同定した。そのうちには 2 例の出生前遺伝子検査を含む。L1 遺伝子の出生前診断については、これまでの結果もまとめて、7 例の出生前遺伝子診断の結果について報告した。DCX (*double cortin*) 遺伝子検査は 2 例に行い、1 例に異常を認めた。ARX 遺伝子検査は 4 例に行い、1 例に異常を見出した。CASK 遺伝子も 1 例に遺伝子解析を行ったが異常はなかった。FGFR1,2,3 遺伝子解析は 3 例に行い、アペール症候群に FGFR2 遺伝子異常、1 例は FGFR3 遺伝子異常を認め Thanatophoric dysplasia の診断がついた。また別の 1 例は TWIST 遺伝子の異常を認め、Seathre-chotzen 症候群と診断された。CREBBP 遺伝子異常を認め、Rubinstein-Taybi 症候群と診断できた 1 例もある。そのほか、小脳低形成を伴う滑脳症の 3 例に TUBA1A の遺伝子解析を行い、1 例に異常を認めている。そのほか Zic2 遺伝子、SHH 遺伝子などについて検索を行った。平成 22 年 8 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症脳低形成である。①の群は L1 遺伝子異常のものとそれ以外にまず分けられる。それらの群について、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、15 症例について CGH を用いた解析を行っている。

表 1

	試料名	収集数
DNA	患者由来	103
	家族由来	12
培養細胞	神経幹細胞	7
	臍帯細胞	34
	羊膜・絨毛膜細胞	26
	臍帯血細胞	30
	心臓血細胞	2
	皮膚由来線維芽細胞	12
	末梢血細胞	29
(合計)		255

(カ) 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。夫律子は胎生期に脳形成と血管構築の関係をプロスペクティブな評価として有用であるかどうかの検討を行っている。

(キ) 患者生体試料は、15 施設から合計 255 検体の試料の提供を受け、DNA 試料 115 検体、培養細胞試料 140 検体を分離・樹立し、各々保管した。(表 1、図 3)

(ク) L1 遺伝子異常を有する X 連鎖性遺伝性水頭症や脊髄膜瘤 5 例の臍帯などから疾患 iPS 細胞の樹立に成功している。

(ケ) 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える。

## 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きた。小児神経放射線医、臨床遺伝子学、小児神経病理、神経小児科医、小児脳神経外科医、産科医など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ので、今回採用した、サーバを利用したオンラインで登録、議論は、実に有用であった。

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。症例の整理と、2 歳時の予後調査を行い、診断基準作成に貢献する。

## 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、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)などのデータバンクの構築は、難治性脳形成症研究の今後の基礎となるものである。



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総合研究報告書

# 難治性脳形成障害症データバンクにおける 遠隔画像診断に関する研究

## — 画像解析結果報告 —

研究分担者

宇都宮英綱

国際医療福祉大学大学院 放射線・情報科学分野

研究協力者

相田典子<sup>1</sup>、大場 洋<sup>2</sup>、森 壘<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 神奈川県立こども医療センター放射線科

<sup>2</sup> 帝京大学医学部 放射線科学講座

<sup>3</sup> 東京大学医学部附属病院 放射線科

**研究要旨** 胎児診断における難治性脳形成障害症の診断基準作成研究班のデータバンクに集積された画像データ解析を当研究班で構築された遠隔画像診断のシステムを用いて行ったので、その解析結果を総括し報告する。

### A. 研究目的

本研究班のデータバンクに集積された画像データを複数の読影者で遠隔画像診断し、診断結果を解析した。

### B. 研究方法

2010年1月～2012年1月までに症例検討サイト (<http://fms.fetal-brain-malformation.jp>) にデータ登録された症例のうち、神経放射線読影委員会で検討し得た108例を対象とした。読影委員は研究分担者(H.U.) 1名と研究協力者(N.A, H.O, H.M) 3名の計4名で構成された。データバンクに登録された画像データの中で読影に十分な情報がある症例（原則として画像データがDICOM形式でアップされているもの）を研究分担者(H.U) が拾い上げ、報告書(レポート)を作成し、これを各読影委員にメールで送信し、読影内容について検討を依頼した。読影委員からの返信を待って、意見を集約し最終報告書として症例検討サイ

トにアップした。

### C. 研究結果

#### (1) 画像データ

108例中、胎児MRIが施行されていたものは41例（胎児MRIのみは21例）であった。画像撮像時の正確な年齢が不明なものが24例（出生後:21例、胎児:3例）あった。性別は男性44例、女性32例、性別が記載されておらず不明であったものが32例であった。

#### (2) 読影結果(表1)

主たる診断名として、神経細胞移動障害:13例でその内訳は古典的滑脳症:2例(DCX遺伝子異常:1例)、丸石様皮質異形成:3例(Walker-Warburg症候群:2例)、小滑脳症:1例(TUBA1遺伝子異常)、多小脳回:6例(CMV感染:1例)、裂脳症(1例)であった。単純脳回型小脳症:7例で6例に脳梁低形成、3例に脳幹・小脳の低形成が認められた。また、1例には両側頭頂

表 1

診断名(例数)	亜型(例数)	備考
■神経細胞移動障害(13例)	・古典的滑脳症(2例) ・丸石様皮質異形成(3例) ・小滑脳症(1例) ・多小脳回(6例):+異所性灰白質(1例)+脳梁低形成(1例) ・裂脳症(1例)	■DCX異常?(1例) ■W-W症候群(2例) ■TUBA1異常(1例) ■CMV先天感染(多小脳回の2例))
■単純脳回型小頭症(7例)		16番染色体異常(1例) 髄鞘形成不全合併(1例) 脳梁低形成合併(6例) 脳幹・小脳低形成合併(3例)
■脳梁形成不全(13例)	・完全欠損(10例):+脂肪腫(1例)、+非交通性半球間裂嚢胞(2例) ・部分欠損(1例):+中頭蓋窩クモ膜嚢胞 ・低形成(2例):+橋低形成、上衣嚢胞(1例)、+クモ膜ポーチ(1例)	
■全前脳胞症(5例)	・Alobar型(1例) Semilobar型(2例) Lobar型/syntelencephaly(2例)	
■Dandy-Walker奇形(7例)		PHACE症候群(3例)
■Joubert症候群関連奇形(3例)		Varadi症候群(1例):+DWC
■水頭症(17例)	・脳梁欠損+交通性半球間裂嚢胞(5例) ・X連鎖性遺伝性水頭症(4例) ・Chiari II奇形に伴う水頭症(2例) ・透明中隔欠損(2例) ・単純性水頭症(4例)	■単純性水頭症(4例)は全例胎児MRIのみでの診断 ■XLH(4例)中2例は胎児MRIで単純性水頭症と診断され、出生後MRIでXLHと診断
■その他の脳奇形(16例)	・巨脳症(3例):+白質異常(1例) ・線条体形成不全(1例):+Blake嚢 ・脳破壊性孔脳症(2例) ・小脳葉形成異常(1例) ・透明中隔欠損(1例) ・脳瘤(8例):閉鎖型(3例)、脳底部(1例)、+水頭症(4例)、+Blake嚢胞	
■頭蓋骨異常(7例)	・頭蓋縫合早期癒合症(6例) ・軟骨異形成疑い(1例): Chiari I型奇形	
■変性疾患(5例)	EAOH?(2例)、遺伝性痙性対麻痺(2例)	
■分類不能:7例	上衣下嚢胞(1例)、1側側脳室拡張(2例)、静脈洞血栓症(1例)、その他(出血2例,正常1例)	
■診断困難:8例		5例:胎児MRIのみ撮像

葉の脳破壊性孔脳症を伴っていた。脳梁形成不全:13例(完全欠損:10例,部分欠損:1例,低形成:2例),全前脳胞症:5例(alobar:1例,semilobar:2例,lobar/syntelencephaly:2例),Dandy-Walker奇形:7例,Jubert症候群関連奇形:3例,水頭症:17例(X連鎖性遺伝性水頭症:4例,交通性半球間裂嚢胞を伴う脳梁欠損の合併:5例)であった。その他の脳奇形(巨脳症,脳瘤など)が16例であった。脳奇形以外では脊髄小脳変性症:5例,頭蓋骨異常:7例(頭蓋縫合早期癒合6例,軟骨異形成症1例),変性疾患5例,その他,分類不能7例,診断困難例が8例あった。

脳回・脳溝形成異常を示した20例中で胎児MRIと出生後MRIで診断が異なるものが2例認められ,2例ともに胎児MRIでは単純脳回が疑われたが,出生後のMRIでは1例は丸石様皮質異形成(Walker-Warburg症候群)と診断された。他の1例は多小脳回が明瞭化した。単純脳回型小脳症で追跡MRIが施行された症例は2例あり,いずれも脳回・脳溝形成の

進行が確認された。

#### D. 考 察

今回の読影システムのユニークな点は小児神経放射線を専門とする4名の放射線診断医が読影に当たったことである。このような、遠隔読影のシステムはこれまでに行われたことがなく、画期的な方法といっても過言ではない。問題点としては、読影報告書の作成において最終報告書の作成までに時間を要することである。これは、メールによる議論で合意を得たためであるが、今後は各読影者で読影時間を統一することや、インターネットでのコミュニケーションツールなどを活用することで、より合理的な討論方法を確立していく必要があると思われる。一方、症例登録の時点で臨床情報の不十分なものがあり、特に胎児MRI施行時の胎齢が不明なものが多かった。今回のシステムでは臨床情報の取得が完全にはオンライン化されていないため、アップされたデータをチェックする方法を構築

しておく必要があると思われた。

遺伝子解析との対比では滑脳症や単純脳回に遺伝子異常や染色体異常が確認され、現在もいくつかの例で遺伝子解析が進行中である。遺伝子解析を含め脳形成不全性疾患の臨床解析は、より客観的に評価された画像診断に基づいてなされることが最も重要である。今後この遠隔画像診断システムを発展させることで、脳形成不全性疾患のさらに正確な診断法および臨床評価

法が確立されていくことが期待される。

## E. 結 論

他施設共同研究の一環として行われた遠隔読影システムについて紹介するとともに、その結果について報告した。この方法は、難治性脳形成脳形成障害症の診断基準の作成に大きく寄与するものと考えられた。

# 神経軸索の再生技術開発に向けた基礎研究

研究分担者

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

**研究要旨** 中枢神経組織が損傷して神経回路が断裂すると、損傷部位に発現する各種再生阻害因子が軸索の伸長を妨げて神経回路の修復を阻害する。代表的な再生阻害因子であるセマフォリン 3A, ミエリン関連糖タンパク質, コンドロイチン硫酸プロテオグリカンが軸索の伸長を阻害するメカニズムを解明し、その知見に基づき軸索の再生を促進する方法を発見した。

## A. 研究目的

中枢神経組織の損傷部位には、グリア細胞や線維芽細胞などに由来するさまざまな軸索再生阻害因子が高発現する。神経回路を構成する軸索突起が断裂すると、その切断端は新たな成長円錐となり伸長を再開しようとする。しかし再生阻害因子が軸索の伸長を抑制するため、再生軸索は損傷部位を乗り越えて伸長することができない。このような軸索再生阻害が、脳神経系の疾病や外傷の機能予後を不良とする主要因である。本研究では、再生阻害因子が軸索を反発するメカニズムおよび軸索の伸長を停止させるメカニズムを解明し、その知見に基づき軸索再生を促進する方法を開発することを目的とした。

## B. 研究方法

代表的な軸索再生阻害因子である、セマフォリン 3A (Semaphorin 3A; Sema3A), ミエリン関連糖タンパク質 (Myelin-associated glycoprotein; MAG), コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (Chondroitin sulfate proteoglycan; CSPG) の作用機序を研究した。これら再生阻害因子の濃度勾配存在下で、初代分散培養した脊髄感覚神経細胞の軸索の運動性と機能を解析した。Sema3A と MAG の濃度勾配は培養液中に作製し、CSPG の濃度勾配はカバーガラス上に作製した。

これら再生阻害因子の濃度勾配が、軸索の反発や伸長停止を引き起こすことを確認した後、成長円錐での細胞内シグナル伝達や細胞膜・接着斑の動態を可視化解析した。さらに再生阻害因子下流のシグナル伝達や駆動機構を阻害する薬剤投与や遺伝子導入により、軸索再生を促進できるか否かを検証した。また、成体ラットの網膜神経細胞に各種遺伝子を導入し、視神経切断後の軸索再生能を定量した。

## C. 研究結果および考察

Sema3A と MAG はいずれも軸索を反発した。すなわち、これら再生阻害因子の濃度勾配に遭遇した成長円錐は、低濃度の方向に旋回した。成長円錐が反発される過程で、高濃度の Sema3A と MAG に面した側でのみ成長円錐細胞質のカルシウムイオン濃度が上昇し、形質膜の取り込み（クラスリン依存性エンドサイトーシス）が亢進した。カルシウムイオンは、タンパク質脱リン酸化酵素カルシニューリンを介してクラスリン依存性エンドサイトーシスを促進した。薬剤投与によりクラスリン依存性エンドサイトーシスを抑制した成長円錐は、再生阻害因子に反発されず、逆に再生阻害因子に向かって伸長した。以上、成長円錐での非対称的エンドサイトーシスは軸索再生阻害の必要条件であることが明らかになった。

CSPG 濃度勾配に遭遇した神経細胞では、接着斑構成タンパク質であるパキシリンのリン酸化を抑制する細胞内シグナル系が活性化し、軸索の伸長を停止した。パキシリンのリン酸化を誘導すると CSPG 濃度勾配上での軸索再生は有意に促進した。次に、パキシリンのリン酸化が動物個体レベルで軸索再生を促進するかどうかを検証するために、成体ラットの網膜神経細胞にパキシリンリン酸化模倣体を遺伝子導入し、視神経を切断した後の軸索再生を定量した（マイアミ大学 Vance Lemmon 教授との共同研究）。対照遺伝子を発現する神経細胞と比較して、パキシリンリン酸化模倣

体を発現する神経細胞は視神経切断端を超えて軸索を伸長した。以上、パキシリンリン酸化による接着斑の機能制御が軸索再生に重要な役割を担うことが示された。

#### D. 結 論

代表的な軸索再生阻害因子（Sema3A, MAG, CSPG）の下流で誘起される細胞内メカニズムの一端が明らかとなり、この知見に基づき、成長円錐での細胞膜・接着斑の動的機能を人為的に修飾することで軸索再生を促進できることが示唆された。

# Angelman 症候群の表現型を示す SLC9A6 変異の頻度と病態

研究分担者

齋藤 伸治

名古屋市立大学大学院医学研究科新生児・小児医学分野

**研究要旨** 脳形成障害は脳形成過程における発生の異常である。マクロに明らかな重度の形成異常からシナプス形成障害まで連続した障害としてとらえることができる。私たちはシナプス可塑性の障害が原因であることが明らかになった Angelman 症候群 (AS) と共通する臨床症状を示す、SLC9A6 遺伝子変異について、日本における頻度とその分子病態について解析を行った。SLC9A6 変異は日本人 X 連鎖精神遅滞 104 例のなかには変異が同定されなかったが、AS が疑われた男性患者 22 例中 1 例において SLC9A6 変異が同定された。この SLC9A6 変異が疾患を引き起こす病態について解析を行い、機能喪失型変異が疾患発症のメカニズムであることを明らかにした。SLC9A6 はシナプス形成に重要な役割を果たしていることが考えられ、脳形成障害の理解を深める上で重要な遺伝子と考えられる。

## A. 研究目的

脳形成において重要な役割を果たしているシナプス形成の分子機構の理解が進んでいる。しかし具体的な遺伝子変異による疾患発症の検討は端緒にすぎたばかりである。私たちは、シナプス形成やシナプス可塑性の障害に着目して、研究を行っている。Angelman 症候群 (AS) は精神遅滞、てんかん、失調様運動を主要な症状とする神経疾患であり、原因遺伝子は UBE3A である。UBE3A はシナプス可塑性に必須の役割を果たしていることが明らかにされた。特に、経験依存性シナプス可塑性に必須であり、出生後の脳機能発達障害のモデルとして重要である。臨床的に AS が疑われたが、UBE3A の関与が否定された患者のなかには、SLC9A6 変異が存在することが報告された。そこで、私たちは、日本人 X 連鎖精神遅滞もしくは AS が疑われた男性患者を対象として、SLC9A6 変異解析を実施した。さらに、変異が同定されたときは、その機能障害について一連の実験を行った。

SLC9A6 の中枢神経における役割を明らかにするこ

とは、シナプス可塑性の脳形成や脳機能発達のメカニズムを明らかにすることに貢献することが期待される。

## B. 研究方法

X 連鎖精神遅滞患者 104 例、および臨床的に AS を疑われたが遺伝学的に否定された男性患者 22 例を対象とした。末梢白血球由来ゲノム DNA を用いて、SLC9A6 遺伝子変異解析は翻訳領域全域を PCR 法にて増幅し、直接シーケンス法にて解析した。

患者において同定された SLC9A6 c.441delG 変異の病的意義を明らかにするために、患者および両親由来の末梢白血球から EB ウイルスを用いて不死化リンパ芽球を樹立し、ゲノム DNA, RNA, 蛋白を抽出して、一連の実験を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は北海道大学大学院医学研究科医の倫理委員会の承認を受け、解析にあたっては、ご家族から書面

による同意を得た。

### C. 研究結果

X連鎖精神遅滞が疑われた患者 104 例においては、病因と判定された SLC9A6 遺伝子変異は同定されなかった。

AS が疑われた 22 例のなかに 1 例において、エクソン 2 に一塩基欠失によるフレームシフト変異 (c.441delG) を同定した。母親はこの変異をヘテロ接合性に有しており、保因者であった。この変異は既存のデータベースには存在せず、また、正常コントロール女性 50 名において検出されなかった。

定量 RT-PCR の結果、患者において発現量が 20% 程に低下していた。

発現の低下は NMD による可能性を考え、NMD を阻害する CHX にて処理を行った後に、RNA を抽出し定量 RT-PCR を行ったところ、発現量はほぼ正常値に回復していた。

次に、蛋白レベルでの発現をウエスタンブロッティングにて評価を行ったところ、患者白血球では、蛋白発現はみられなかった。

### D. 考 察

日本人 X連鎖精神遅滞が疑われた患者 104 例を対象として SLC9A6 遺伝子の変異解析を行った。その結果では、病因となりうる変異は同定されなかった。したがって、本遺伝子は X連鎖精神遅滞の主要な原因遺伝子とは考え難い。しかし、X連鎖精神遅滞の原因遺伝子は全体の 1% 程度しか占めないものが多く知られており、より対象の数を増やした研究が必要と考えられる。

一方、AS が疑われた 22 例の男性患者のなかに、1 例本遺伝子変異が同定された。このことは、SLC9A6 遺伝子変異の表現型はこれまでの報告のように AS に似ていることを確認した結果と考えられる。最近 AS の原因遺伝子 UBE3A は経験依存的シナプス可塑性に関連することが示された。SLC9A6 もシナプス形成との関連が報告されており、双方の遺伝子変異において

良く似た表現型が示されることを考えると、UBE3A と SLC9A6 とが発達脳に置けるシナプス形成において共通した経路で働いている可能性が示唆される。

SLC9A6 遺伝子は X 染色体長腕 26.3 上に存在し、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送体 NHE6 をコードしている。NHE6 は細胞内の pH や Na 濃度を調整する機能を有している。脳細胞においても高度に発現しており、樹状突起でのシナプス形成に関与していることが報告されている。しかし、SLC9A6 変異が脳障害を引き起こす病態についてはほとんど分かっていない。そこで、私たちは、c.441delG を有する患者からリンパ芽球株を樹立し、変異が RNA、蛋白へ与える影響について解析を行った。RNA レベルでは発現が 20% 程に低下していた。この低下は CHX 処理により回復したことから、RNA の発現低下は NMD により引き起こされていることが明らかになった。

蛋白レベルでの解析では、機能的蛋白は同定されなかった。c.441delG 変異はフレームシフトを生じて、アミノ酸 7 残基後に停止コドンとなる。したがって、20% に減少した RNA は蛋白を生成するが、その蛋白は異なる構造をとることになる。そのため、RNA レベルでは存在しても、機能的な蛋白は全く存在しないことが実験的に確認された。患者においては、機能的 NHE6 蛋白が存在せず、NHE6 蛋白の欠損が脳障害の基本的な病態であることが示された。

### E. 結 論

SLC9A6 は日本人 X連鎖精神遅滞の主要な原因遺伝子ではない。SLC9A6 遺伝子変異は日本人においても AS と良く似た表現型を示す。従って、UBE3A と SLC9A6 とが発達脳のシナプス形成において関連している可能性が示唆される。SLC9A6 変異を有する患者においては mRNA 発現が NMD により低下しており、また、機能的蛋白は欠損していた。したがって、SLC9A6 の機能喪失性変異が患者での病態であることが明らかになった。SLC9A6 (NHE6) 蛋白はシナプス形成に必須の役割を果たしていることが示唆された。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 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

平成 23 年度総合研究報告書

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

Research Committee for Intractable Fetal Brain Malformation in Research  
of Intractable Disease Health and Labour Sciences Research Grants  
in 2011 by Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan

印刷 平成 24 年 3 月 31 日

発行 平成 24 年 3 月 31 日

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）  
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

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

製作 有限会社 編集室なるにあ

〒 113-0033 東京都文京区本郷 3-3-11



