

20112822/A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

有馬症候群の疫学調査および診断基準の作成と

病態解明に関する研究

(H23-難治-一般-065)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 雅之

平成24(2012)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

有馬症候群の疫学調査および診断基準の作成と

病態解明に関する研究

(H 2 3 -難治-一般-0 6 5)

平成 2 3 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 雅之

平成 2 4 (2 0 1 2) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

有馬症候群の疫学調査および診断基準の作成と病態解明に関する研究

4

伊藤 雅之

(資料1) 有馬症候群の全国疫学アンケート一次調査用紙

(資料2) 有馬症候群の全国疫学アンケート二次調査用紙

(資料3) 有馬症候群診断基準

II. 分担研究報告

1. 有馬症候群の病態解明に関する研究

12

伊藤 雅之、大野 耕策

2. 有馬症候群の疫学調査および診断基準の作成に関する研究

14

岩崎 裕治

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

17

IV. 研究成果の刊行物・別刷

19

I . 総括研究報告

有馬症候群の疫学調査および診断基準の作成と病態解明に関する研究

研究代表者 伊藤 雅之 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第二部 室長

研究要旨

有馬症候群は、乳児期早期より重度精神運動発達遅滞、先天性視覚障害、嚢胞腎（若年性ネフロン癆）、眼瞼下垂、小脳虫部欠損を呈する疾患である。1971年に本邦で初めて報告された疾患であるが、これまで実態調査はなかった。本研究では、有馬症候群の疫学的研究と遺伝子解析を行なった。疫学的研究では、患者数7例で疑似例201例が明らかになった。今後、遺伝子解析と更なる実態調査を進める。

研究分担者

岩崎 裕治 東京都立東部療育センター 副院長
大野 耕策 鳥取大学大学院医学系研究科脳神経小児科学 教授

研究協力者

有馬 正高 東京都立東部療育センター 院長
井手 秀平 東京都立東部療育センター 医長
伊藤 秀一 国立成育医療センター 医長
林 雅晴 東京都医学研究機構神経科学総合研究所 副参事研究員
井上 岳彦 ベリタス病院小児科 部長
松坂 哲應 長崎県立こども医療福祉センター 所長

A. 研究目的

有馬症候群は、乳児期早期より重度精神運動発達遅滞、先天性視覚障害、嚢胞腎（若年性ネフロン癆）、眼瞼下垂、小脳虫部欠損を呈し、腎障害のため小児期までに死亡する常染色体劣性遺伝性疾患である。本邦で10例程度と考えられ、希少性の高い難治性疾患であるが、これまで臨床調査はなく実態が分かっていなかった。

本研究の目的は、①有馬症候群の臨床疫学的研究と診断基準の策定（全国的な疫学調査により、有馬症候群の有病率と臨床症状・経過に関する臨床データの集計・解析と研究リソースの収集）を行い、②その原因遺伝子を同定し、病態を解明することであ

る。

B. 研究方法

①疫学的研究（有馬、岩崎、松坂、林、伊藤（秀）、伊藤（雅））：小児科学、腎臓学、障害者医学の立場から一次調査内容を決定し、全国の小児科指導医のいる病院483箇所（重症心身障害児病棟をもつ病院を除外）、国立病院機構重症心身障害児病棟74箇所、公法人立施設120箇所にアンケートを実施した（一次アンケート用紙（資料1））。

回答のあった施設へは、二次調査として主治医へ再度アンケートを依頼した（二次アンケート用紙（資料2））。さらに必要に応じて、主治医へ電話ないし面談によるインタビューを行なった。

②遺伝子研究（大野、井上、井手、伊藤（雅））：①の疫学的研究の結果を踏まえ、協力の得られた患者および家族から採血ないし皮膚を採取し、DNA抽出を行い、アジレント社ヒトCGHアレイ1Mのチップによる解析を行なった。

（倫理面への配慮）

本研究に関する疫学研究と遺伝子解析研究は、東京都立東部療育センター、国立精神・神経医療研究センターに設置されている倫理委員会の承認のもとに行なった。また、厚生労働省および文部科学省の疫学研究、ヒトゲノム・遺伝子解析研究、臨床研究の指針に沿った。研究対象者への人権擁護の配慮を十分に行なった。

C. 研究結果

①疫学的研究：一次調査の回答率は、全国小児科病院 72.7%、国立病院機構病院 63.5%、公法人立重症児施設 66.7%であった。その結果、有馬症候群 A-E のすべての症状をもつ例が 13 例（現在診療中 7 例、過去に診療 6 例）であり、A-E の 2 つ以上の症状を持つ疑い例（他の類縁疾患の可能性）が 32 例（現在診療中 20 例、過去に診療 12 例）であった。二次調査の結果とあわせて、最終的な確定例数を検討中である。また、有馬症候群の診断基準（資料 3）の見直しを行なっている。

②遺伝子研究：患者および家族の血液由来あるいは線維芽細胞由来 DNA を用いて、アジレント社ヒト CGH アレイ 1M のチップによる解析を行なった。現在、4 名の有馬症候群患者の解析中である。

D. 考察

有馬症候群は、1971 年に世界に先駆けて本邦から報告された疾患である。乳児期早期より重度精神運動発達遅滞、先天性視覚障害、嚢胞腎（若年性ネフロン癆）、眼瞼下垂、小脳虫部欠損を呈し、腎不全で死亡することが多かったが、近年の医療の進展により長期生存する症例があり、医学的管理が重要である。これまで、本疾患の疫学的調査がなく、本研究によって初めて患者数が明らかにされた。本疾患は多臓器に重度な障害をきたすことから、今回調査した施設ですべての患者を診療しているものと考えられる。また、稀ながら遺伝性が疑われる症例があり、今後の遺伝子解析の結果が待たれる。

また、Dekaban 症候群、Joubert 症候群（呼吸異常、精神運動発達遅滞、小脳虫部欠損）、Senior-Loken 症候群（先天性視覚障害、ネフロン癆、精神遅滞）、COACH 症候群（先天性眼球障害、肝繊維化、精神遅滞、小脳虫部低形成）などの類縁疾患との関係を分子生物学的に明らかにする必要がある。

E. 結論

有馬症候群の疫学的研究と遺伝子解析を行なった。疫学的研究では、1971 年の発見以来初めて患者数が明らかになった。今後、原因遺伝子の解析と更なる実態調査を行なう。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kuki I, Kawawaki H, Okazaki S, Kimura S, Nakano T, Fukushima H, Inoue T, Tomiwa K, Itoh M. Progressive Leukoencephalopathy with Intracranial Calcification, Congenital Deafness and Developmental Deterioration. *Am J Med Genet A* 2011; 155:2832-2837.

Saito T, Hanai S, Takashima S, Nakagawa E, Okazaki S, Inoue T, Miyata R, Hoshino K, Akashi T, Sasaki M, Goto Y, Hayashi M, Itoh M. Neocortical layer-formation of the human developing brains and lissencephalies: consideration of layer-specific markers expression. *Cereb Cortex* 2011;21: 588-596.

岩崎裕治, 平本東. NICU と重症心身障害児(者)施設(病棟)との連携. *日本重症心身障害学会* 2011;36: 63-64.

岩崎裕治. けいれん. 石井栄三郎編 症状別検査の選び方・進め方. *小児科臨床ピクシス*. 東京, 中山書店, 2011:130-133.

岩崎裕治. レスパイト入院(短期入所)の利用-主に重症心身障害児. 楠田聡編 *小児慢性疾患のサポート*. *小児科臨床ピクシス*. 東京, 中山書店, 2011:176-179.

Ueda M, Sugiura C, Ohno K, Kakita A, Hori A, Ohama E, Vinters HV, Miyata H. Immunohistochemical expression of fibroblast growth factor-2 in developing human cerebrum and epilepsy-associated malformations of cortical development. *Neuropathology* 2011;31:589-598.

Shimajima K, Isidor B, Le Caignec C, Kondo A, Sakata S, Ohno K, Yamamoto T. A new microdeletion syndrome of 5q31.3 characterized by severe developmental delays, distinctive facial features, and delayed myelination. *Am J Med Genet A*. 2011;155A:732-736.

2. 学会発表

なし。

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。

有馬症候群の全国疫学調査 一次調査用紙

1. 往信にある「有馬症候群にみられる臨床症状」の A を含めて 2 つ以上の臨床症状に該当する患者（含疑い例）の診療の有無をお教えてください。

診療したことがない	
診療したことがある	

*あてはまる欄に○
を入れてください。

2. 上記 1 で「診療したことがある」とご回答いただいた先生には、往信の「有馬症候群にみられる臨床症状」をご参考に、下記の表に数をお教えてください。

	A-E すべて あてはまる患者数	A-E のうち 3 項目 あてはまる患者数
現在診療中である		
過去に診療したことがある		

その他、ご相談やご連絡がありましたら、ご記入ください。

[_____]

記載医師御氏名： _____

貴施設名・ご所属： _____

記載年月日： _____

該当する患者様の有無に関わらず、下記アンケートにご協力を賜わり、ご返信いただけますようお願い申し上げます。

この一次調査をもとに、今後二次調査を予定しておりますので、ご協力をお願い申し上げます。返信はがきのご住所、貴施設名、貴診療科名などに誤りがありましたら、お手数ですがご訂正をお願いします。

有馬症候群 第二次調査個人票

有馬症候群調査・研究のためのコンソーシアム

この調査票は有馬症候群の病態調査のために使用し、ここに記された記録は秘守されます。該当する番号を丸でかきこむ。または「」内にご記入ください。質問に「無」とある項目は複数回答可です。過去に診療されたケースでは、不明な箇所は空欄で結構です。わかる範囲で記載をお願いします。

記載者氏名 記載年月日 平成 年 月 日
貴施設名 所在地 (省略可)
担当診療科 1 小児科 2 小児神経科 3 その他 ()

調査対象 性別 1 男 2 女 生年月日 明治 2 大正 3 昭和 4 平成 5 西暦 () 年 () 月
患者番号 居住地 都・道・府・県・不明 出生地 不明

記載日現在の年齢 () 歳 () カ月
推定発症年齢 () 歳 () カ月
貴施設初診時年齢 () 歳 () カ月

診察した医療機関 1 貴院 2 他院 (医名・診療機関名)
診断 1 有馬症候群 2 有馬症候群の疑い 3 Joubert症候群 4 その他
【備】有馬症候群にみられる症状の有無 A 小脳虫部欠損 B 重症の精神運動発達遅滞 C 低浸透圧尿+小児期に発症し進行する腎機能障害 (濃縮力がみられることがよくある) D 先天性の視覚障害 E 眼瞼下垂を伴う顔貌異常
死表の有無 1、発表なし 2、発表あり () 3、不明

I 家族歴

1 血族結婚 0 無 1 有 (内容) 9 不明
2 【備】疾患 (罹患者の患者との続柄) 0 無 1 有 (内容) 2 Joubert症候群 () 3 他の精神障害 () 4 その他 (具体的に) ()
*血族結婚、家族歴は、問診で知り得た範囲内で結構です。可能であれば、三等親までは調べてください。

II 母親の本児経歴について

1 異常 0 無 1 有 (内容) 9 不明

重 出生歴

1 異常 0 無 1 有 (内容) 9 不明
2 出生時の体格 体重 () g 身長 () cm 頭圍 () cm

IV 既往歴

1 疾患名 (罹患年齢) 0 無 1 有 (内容) () 歳 () 月 9 不明
2 手術 (内容と年齢) 0 無 1 有 (内容) () 歳 () 月 9 不明
3 その他 (内容と年齢) 0 無 1 有 (内容) () 歳 () 月 9 不明

V 現在の特異的症候の有無・発達遅滞について + () 歳 () 月からのところはその症状の発現年齢を記してください

a 有馬症候群関連疾患に特異的な症状・所見の有無
1 【備】運動発達遅滞 0 無 1 軽度 2 重度 3 最重度 9 不明
2 精神遅滞 0 無 1 軽度 2 重度 3 最重度 9 不明
3 小脳虫部欠損 0 無 1 有 () 歳 () 月 9 不明
4 失調症状 (ふらつき) 0 無 1 有 () 歳 () 月 9 不明
5 脳トーマス低下 0 無 1 有 () 歳 () 月 9 不明
6 低浸透圧尿 0 無 1 有 () 歳 () 月 9 不明
7 腎機能障害 0 無 1 有 () 歳 () 月 9 不明
8 嚔胎腎 0 無 1 有 () 歳 () 月 9 不明
9 眼瞼下垂 0 無 1 有 () 歳 () 月 9 不明
10 視覚障害 0 無 1 有 () 歳 () 月 9 不明
11 ERG異常 0 無 1 有 () 歳 () 月 9 不明
12 【備】けいれん 0 無 1 有 (内容) () 歳 () 月 9 不明
13 肝機能障害 0 無 1 有 9 不明
14 その他特記すべきこと 0 無 1 有 () 9 不明

b 現在の身体所見

1 身長 1 () cm 9 不明
2 体重 1 () kg 9 不明
3 顔面 1 () cm 9 不明
4 その他 (内容と年齢) 0 無 1 有 (内容) ; 歳 () 月

c 現在の運動発達

1 歩行 0 無 1 有 () 歳 () 月 9 不明
2 登り下り 0 無 1 有 () 歳 () 月 9 不明
3 座位 0 無 1 有 () 歳 () 月 9 不明
4 四つ這い移動 0 無 1 有 () 歳 () 月 9 不明
5 独歩 0 未 1 有 () 歳 () 月 9 不明
6 【備】上記1の場合異常パターン 1 失調歩行 2 つま先歩行 3 その他 () 9 不明
8 他の不随意運動 0 無 1 有 (内容) ; 歳 () 月 9 不明
9 既往異常 劇咳 0 無 1 有 () 歳 () 月 9 不明
10 その他 0 無 1 有 () 歳 () 月 9 不明

d 現在の精神発達

1 精神遅滞 0 無 1 有 (推定DQ/IQ: ; 測定方法:) (施行時年齢: 歳 () 月) 9 不明
2 習字 0 無 1 単語 () 2 二語文 3 その他 9 不明
3 精神機能の過行 0 無 1 有 () 歳 () 月 9 不明
4 その他 0 無 1 有 ()

e 参考となる検査所見

1 血液・尿検査
年月日
尿比重
尿浸透圧
Hb
BUN
Creatinine
AST
ALT
2 眼底所見 (年月日) 0 無 1 有 (内容) 9 不明
3 腎生検 (年月日) 0 無 1 有 (内容) 9 不明
4 頭部MRI/CT異常 (年月日) 0 無 1 有 (所見) 9 不明
5 腎MRI/CT/echo (年月日) 0 無 1 有 (所見) 9 不明
6 染色体検査 (年月日) 0 未検査 1 G-band 2 高精度分帯法 3 FISH 4 その他 ()
検査した場合 染色体所見 0 異常なし 1 所見あり (具体的に)
7 遺伝子検査 (年月日) 0 未検査 1 有 (検査実施施設名)
検査した場合 遺伝子異常 0 無 1 有 (結果) 9 不明
8 その他 (年月日) 0 無 1 有 (内容) 9 不明

VI その他

1 発症状況 (最近1年間) 1 主に通院 2 主に入院 3 通院と入院 4 転院 (転院先:) 9 不明
2 現在の状況 4 死亡 (死亡時期: 平成 年 月 日; 死因:); 劇咳: 1 頻行 2 未発行)
3 最終受診日 平成 年 月 日

以下、当研究への要望や懸念等でお困りの点など、ご自由にご記入ください。

1971年に本邦から報告された有馬症候群は、これまで稀少性と孤発性のため遺伝子解析を含めた研究が進んでいませんでしたが、本コンソーシアムではこの疫学調査をもとに取組んでいきます。つきましては、研究を推進するために、遺伝子検査を含めた検体や患者さんの情報のご提供などにご協力をいただけませんでしょうか。ご協力内容は後日ご連絡差し上げますが、ご協力の可否についてお答えいただけますと幸いです。

- 1 協力する 2 協力は難しい 3

有馬症候群にみられる臨床症状

- A 小脳虫部欠損
- B 重度の精神運動発達遅滞
- C 低浸透圧尿+小児期に発症し進行する腎機能障害（嚢胞腎がみられることがよくある）
- D 早期からみられる視覚障害
- E 眼瞼下垂を伴う顔貌異常（E はあってもなくても良い）

II. 分担研究報告

有馬症候群の病態解明に関する研究

研究代表者 伊藤 雅之 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第二部 室長
研究分担者 大野 耕策 鳥取大学大学院医学系研究科脳神経小児科学 教授
研究協力者 井上 岳彦 ベリタス病院小児科 部長
研究協力者 井手 秀平 東京都立東部療育センター 医長

研究要旨

有馬症候群は、乳児期早期より重度精神運動発達遅滞、先天性視覚障害、嚢胞腎（若年性ネフロン癆）、眼瞼下垂、小脳虫部欠損を呈する疾患である。1971年に本邦で初めて報告された疾患であるが、これまで原因遺伝子の解明、病態研究はなかった。本研究では、有馬症候群の遺伝子解析を行なった。今後、さらに遺伝子解析を進める。

A. 研究目的

有馬症候群は、乳児期早期より重度精神運動発達遅滞、先天性視覚障害、嚢胞腎（若年性ネフロン癆）、眼瞼下垂、小脳虫部欠損を呈し、腎障害のため小児期までに死亡する常染色体劣性遺伝性疾患である。希少性の高い難治性疾患であり、病態が解明されていない。

本研究の目的は、有馬症候群の原因遺伝子を同定し、病態を解明することである。

B. 研究方法

本研究について十分な説明のもと、協力の得られた患者および家族から採血ないし皮膚を採取し、DNA抽出を行い、アジレント社ヒトCGHアレイ1Mのチップによる解析を行なった。

（倫理面への配慮）

本研究に関する遺伝子解析研究は、東京都立東部療育センター、国立精神・神経医療研究センターに設置されている倫理委員会の承認のもとに行なった。また、厚生労働省および文部科学省のヒトゲノム・遺伝子解析研究、臨床研究の指針に沿った。研究対象者への人権擁護の配慮を十分に行なった。

C. 研究結果

患者および家族の血液由来あるいは線維芽細胞由来DNAを用いて、アジレント社ヒトCGHアレイ1Mのチップによる解析を行なった。現在、4名の有馬症候群患者の解析中である。

D. 考察

有馬症候群の原因遺伝子研究はいままでになかった。本疾患は多臓器に重度な障害をきたすことから、その病態解明が重要である。

また、Dekaban症候群、Joubert症候群（呼吸異常、精神運動発達遅滞、小脳虫部欠損）、Senior-Loken症候群（先天性視覚障害、ネフロン癆、精神遅滞）、COACH症候群（先天性眼球障害、肝繊維化、精神遅滞、小脳虫部低形成）などの類縁疾患との関係を分子生物学的に明らかにする必要がある。

E. 結論

有馬症候群の遺伝子解析を行なった。今後、更なる原因遺伝子の解析を行なう。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kuki I, Kawawaki H, Okazaki S, Kimura S, Nakano T, Fukushima H, Inoue T, Tomiwa K, Itoh M. Progressive Leukoencephalopathy with Intracranial Calcification, Congenital Deafness and Developmental Deterioration. Am J Med Genet A 2011; 155:2832-2837.

Saito T, Hanai S, Takashima S, Nakagawa E, Okazaki S, Inoue T, Miyata R, Hoshino K, Akashi T, Sasaki M, Goto Y, Hayashi M, Itoh M. Neocortical

layer-formation of the human developing brains and lissencephalies: consideration of layer-specific markers expression. Cereb Cortex 2011;21: 588-596.

Ueda M, Sugiura C, Ohno K, Kakita A, Hori A, Ohama E, Vinters HV, Miyata H. Immunohistochemical expression of fibroblast growth factor-2 in developing human cerebrum and epilepsy-associated malformations of cortical development. Neuropathology 2011;31:589-598.

Shimajima K, Isidor B, Le Caignec C, Kondo A, Sakata S, Ohno K, Yamamoto T. A new microdeletion syndrome of 5q31.3 characterized by severe developmental delays, distinctive facial features, and delayed myelination. Am J Med Genet A. 2011;155A:732-736.

2. 学会発表
なし。

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。

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

有馬症候群の疫学調査および診断基準の作成に関する研究

分担研究者 岩崎 裕治 東京都立東部療育センター 副院長
研究協力者 有馬 正高 東京都立東部療育センター 院長
研究協力者 伊藤 秀一 国立成育医療センター 医長
研究協力者 林 雅晴 東京都医学研究機構神経科学総合研究所 副参事研究員
研究協力者 松坂 哲應 長崎県立こども医療福祉センター所長

研究要旨

有馬症候群は、乳児期早期より重度精神運動発達遅滞、先天性視覚障害、嚢胞腎（若年性ネフロン癆）、眼瞼下垂、小脳虫部欠損を呈する疾患である。1971年に本邦で初めて報告された疾患であるが、これまで実態調査はなかった。本研究では、有馬症候群の疫学的研究と遺伝子解析を行なった。疫学的研究では、患者数7例で疑似例201例が明らかになった。今後、遺伝子解析と更なる実態調査を進める。

A. 研究目的

有馬症候群は、乳児期早期より重度精神運動発達遅滞、先天性視覚障害、嚢胞腎（若年性ネフロン癆）、眼瞼下垂、小脳虫部欠損を呈し、腎障害のため小児期までに死亡する常染色体劣性遺伝性疾患である。本邦では、これまで臨床調査はなく、臨床実態が分かっていない。

本研究の目的は、有馬症候群の臨床疫学的研究と診断基準の策定（全国的な疫学調査により、有馬症候群の有病率と臨床症状・経過に関する臨床データの集計・解析と研究リソースの収集）を行い、臨床実態を明らかにすることである。

B. 研究方法

疫学的研究として、小児科学、腎臓学、障害者医学の立場から一次調査内容を決定し、全国の小児科指導医のいる病院483箇所（重症心身障害児病棟をもつ病院を除外）、国立病院機構重症心身障害児病棟74箇所、公法人立施設120箇所にアンケートを実施した。

回答のあった施設へは、二次調査として主治医へ再度アンケートを依頼した。さらに必要に応じて、主治医へ電話ないし面談によるインタビューを行なった。

（倫理面への配慮）

本研究に関する疫学研究は、東京都立東部療育センター、国立精神・神経医療研究センターに設置され

ている倫理委員会の承認のもとに行なった。また、厚生労働省および文部科学省の疫学研究、臨床研究の指針に沿った。研究対象者への人権擁護の配慮を十分に行なった。

C. 研究結果

一次調査の回答率は、全国小児科病院72.7%、国立病院機構病院63.5%、公法人立重症児施設66.7%であった。その結果、有馬症候群A-Eのすべての症状をもつ例が13例（現在診療中7例、過去に診療6例）であり、A-Eの2つ以上の症状を持つ疑い例（他の類縁疾患の可能性）が32例（現在診療中20例、過去に診療12例）であった。二次調査の結果とあわせて、最終的な確定例数を検討中である。また、有馬症候群の診断基準の見直しを行なっている。

D. 考察

有馬症候群は、1971年にはじめて報告された疾患である。乳児期早期より重度精神運動発達遅滞、先天性視覚障害、嚢胞腎（若年性ネフロン癆）、眼瞼下垂、小脳虫部欠損を呈し、腎不全で死亡することが多かったが、近年の医療の進展により長期生存する症例があり、医学的管理が重要である。これまで、本疾患の疫学的調査がなかったが、本研究によって初めて患者数が明らかにされた。本疾患は多臓器に重度な障害をきたすことから、今回調査した施設がすべ

ての有馬症候群患者を診療しているものと推定できる。また、稀ながら遺伝性が疑われる症例があった。

有馬症候群の類縁疾患である Dekaban 症候群、Joubert 症候群、Senior-Loken 症候群、COACH 症候群などの疾患との関係を明らかにする必要がある。

E. 結論

有馬症候群の疫学的研究を行なった。疫学的研究では、1971 年の発見以来初めて患者数が明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

岩崎裕治, 平本東. NICU と重症心身障害児(者)施設(病棟)との連携. 日本重症心身障害学会 2011;36: 63-64.

岩崎裕治. けいれん. 石井栄三郎編 症状別検査の選び方・進め方. 小児科臨床ピクシス. 東京, 中山

書店, 2011:130-133.

岩崎裕治. レスパイト入院(短期入所)の利用-主に重症心身障害児. 楠田聡編 小児慢性疾患のサポート. 小児科臨床ピクシス. 東京, 中山書店, 2011:176-179.

2. 学会発表

なし。

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。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
岩崎裕治	けいれん	石井栄三郎	症状別検査の選び方・進め方. 小児科臨床ピクシス	中山書店	東京	2011	130-133
岩崎裕治	レスパイト入院(短期入所)の利用-主に重症心身障害児	楠田聡	小児慢性疾患のサポート. 小児科臨床ピクシス	中山書店	東京	2011	176-179

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kuki I, Kawawaki H, Okazaki S, Kimura S, Nakano T, Fukushima H, Inoue T, Tomiwa K, <u>Itoh M.</u>	Progressive Leukoencephalopathy with Intracranial Calcification, Congenital Deafness and Developmental Deterioration	Am J Med Genet A	155	2832-2837	2011
Saito T, Hanai S, Takashima S, Nakagawa E, Okazaki S, Inoue T, Miyata R, Hoshino K, Akashi T, Sasaki M, Goto Y, Hayashi M, <u>Itoh M</u>	Neocortical layer-formation of the human developing brains and lissencephalies: consideration of layer-specific markers expression	Cereb Cortex	21	588-596	2011
岩崎裕治, 平本東	NICUと重症心身障害児(者)施設(病棟)との連携	日本重症心身障害学会	36	63-64	2011
Shimajima K, Isidor B, Le Caigne C, Kondo A, Sakata S, <u>Ohno K, Yamamoto T</u>	A new microdeletion syndrome of 5q31.3 characterized by severe developmental delays, distinctive facial features, and delayed myelination.	Am J Med Genet A	155A(4)	732-736	2011
Ueda M, Sugiura C, <u>Ohno K</u> , Kakita A, Horii A, Ohama E, Vinters HV, Miyata H	Immunohistochemical expression of fibroblast growth factor-2 in developing human cerebrum and epilepsy-associated malformations of cortical development	Neuropathology	31(6)	589-598	2011

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Neocortical Layer Formation of Human Developing Brains and Lissencephalies: Consideration of Layer-Specific Marker Expression

Takashi Saito^{1,2}, Sae Hanai^{1,2}, Sachio Takashima³, Eiji Nakagawa², Shin Okazaki⁴, Takeshi Inoue⁵, Rie Miyata⁶, Kyoko Hoshino⁷, Takumi Akashi⁸, Masayuki Sasaki², Yu-ichi Goto¹, Masaharu Hayashi⁶ and Masayuki Itoh¹

¹Department of Mental Retardation and Birth Defect Research, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, 187-8502, Japan, ²Department of Child Neurology, The Hospital of National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, 187-8551, Japan, ³Yanagawa Institute of Handicapped Children, International University of Health and Welfare, Fukuoka, 832-0058, Japan, ⁴Department of Pediatrics, Osaka City General Hospital, Osaka, 534-0021, Japan, ⁵Department of Pathology and Laboratory Medicine, Osaka City General Hospital, Osaka, 534-0021, Japan, ⁶Department of Clinical Neuropathology, Tokyo Metropolitan Institute of Neuroscience, Fuchu, 183-8526, Japan, ⁷Department of Pediatrics, Saitama Medical Center, Kawagoe, 350-8550, Japan and ⁸Department of Pathology and Laboratory Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, 113-8510, Japan

Takashi Saito and Masayuki Itoh have contributed equally to this work.

Address correspondence to M Itoh, Department of Mental Retardation and Birth Defect Research, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan. Email: itoh@ncnp.go.jp.

To investigate layer-specific molecule expression in human developing neocortices, we performed immunohistochemistry of the layer-specific markers (TBR1, FOXP1, SATB2, OTX1, CUTL1, and CTIP2), using frontal neocortices of the dorsolateral precentral gyri of 16 normal controls, aged 19 gestational weeks to 1 year old, lissencephalies of 3 Miller–Dieker syndrome (MDS) cases, 2 X-linked lissencephaly with abnormal genitalia (XLAG) cases, and 4 Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD) cases. In the fetal period, we observed SATB2+ cells in layers II–IV, CUTL1+ cells in layers II–V, FOXP1+ cells in layer V, OTX1+ cells in layers II or V, and CTIP2+ and TBR1+ cells in layers V and VI. SATB2+ and CUTL1+ cells appeared until 3 months of age, but the other markers disappeared after birth. Neocortices of MDS and XLAG infants revealed SATB2+, CUTL1+, FOXP1+, and TBR1+ cells diffusely located in the upper layers. In fetal FCMD neocortex, neurons labeled with the layer-specific markers located over the glia limitans. The present study provided new knowledge indicating that the expression pattern of these markers in the developing human neocortex was similar to those in mice. Various lissencephalies revealed abnormal layer formation by random migration.

Keywords: developing human neocortex, layer-specific marker, lissencephaly

Introduction

The experimental neurosciences have recently provided many new insights into the molecular mechanisms of mammalian cerebral formation. Past knowledge revealed that some molecules are regulated with a well-designed genetic algorithm during the developmental stages, with interrelated phenomena that include cell proliferation, fate determination and migration to the proper laminar, and final position in the cerebral cortex. Neocortical laminar formation is highly programmed by genetic control in the early embryonic period. At the decided time, projection neurons migrate into the cortical plate (CP) along the radial glial process from the subventricular germinal zone with an inside out pattern. At this neural migration stage, integration of reelin (RELN), Lis-1, doublecortin (DCX), and other molecules is required to form a complete neocortex (Guillemot et al. 2006; Mochida and Walsh 2004). Finally, mammalian brains commonly show a 6-layer neocortex, and

each layer has a specific function with a synaptic connection. In each step, specific genes have important roles, and the molecular mechanism is well known in rodent brains (Arlotta et al. 2005; Alcamo et al. 2008). *Satb2*, a special AT-rich binding protein 2, generates callosal projection neurons in layers II–IV (Alcamo et al. 2008; Britanova et al. 2008). *Ctip2*, encoding a C2H2-type zinc finger protein, locates in layers V and VI and promotes corticospinal motor neuron projection (Arlotta et al. 2005; Britanova et al. 2008). *Satb2* is a repressor of *Ctip2* and makes not only the callosal projection but also the subcortical connections (Alcamo et al. 2008). Mouse *Otx1*, orthodenticle homeobox 1, is expressed in a number of cells in layers V and VI (Weimann et al. 1999). *Tbr1*, a member of the T-box homeobox gene family, expresses in preplate and layer VI in mouse fetal brain (Hevner et al. 2001) and layers I–III and layer VI in mouse adult brain (Bulfone et al. 1995). *Tbr1* contributes to make corticocortical projection neurons (Hevner et al. 2001). *Tbr1* expresses in the deep layer of the human fetus cortex (Sheen et al. 2006). A transcription factor *Cutl1*, drosophila homeobox CUT like 1, is expressed in pyramidal neurons of the upper layer (Nieto et al. 2004). *Foxp1*, a transcription factor of the winged-helix/forkhead family, expresses in layers III–V of mouse neocortex (Ferland et al. 2003) and layer V in human neocortex (Sheen et al. 2006). *Foxp1* expresses in the deep layer of Miller–Dieker syndrome (MDS) neocortex (Sheen et al. 2006). However, many rodent studies show that the other layer-specific molecules also play very important roles in forming cortical lamination (Molyneaux et al. 2007) and that such gene disruption leads to profound cortical malformation (Mochida and Walsh 2004).

Lissencephaly, formed at the neuronal migration period, is classically recognized to be mainly of 2 types; smooth pachygyria-agyria as type I lissencephaly and cobblestone lissencephaly as type II lissencephaly (Olson and Walsh 2002). Type I (classical) lissencephaly shows a thick 4-layer cortex and is typically known as MDS and double cortex syndrome. The causative genes of type I lissencephaly are known as RELN, Lis-1, DCX, and filamine. Interestingly, the gene products are associated with the microtubules and can alter the cytoskeleton size for cell movement (de Rouvoit and Goffinet 2001; Reiner and Sapir 2009) or its related molecules (Olson and Walsh 2002; Assadi et al. 2003). Typical type II (cobblestone) lissencephalies

of Muscle-eye-brain disease, Walker-Warburg syndrome (WWS), and Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD), are caused by mutated genes encoding enzymes of alpha-dystroglycan glycosylation, such as POMGnT1, protein-O-mannosyltransferase (POMT) 1 and 2, and Fukutin, respectively (Mochida and Walsh 2004). The posttranslational glycosylated alpha-dystroglycan binds to extracellular matrix (Michele et al. 2002). Reduction of glycosylation leads to disruption of the glia limitans over which neurons migrate (Yamamoto et al. 2004).

Recently, it has been reported that X-linked lissencephaly with abnormal genitalia (XLAG), whose causative gene is *Aristaless*-related homeobox gene (*ARX*), is a new type of lissencephaly that shows a 3-layer neocortex (Dobyns et al. 1999; Kitamura et al. 2002; Bonneau et al. 2002; Okazaki et al. 2008). *ARX* has a homeodomain and decides the migration of interneurons in the ganglionic eminence. However, it is unknown why *ARX* dysfunction leads to abnormal radial neuronal migration in human XLAG, whereas *ARX*-null mice show reduced cortical proliferation but normal migration (Kitamura et al. 2002; Okazaki et al. 2008).

It is very important to reveal the molecular and morphological relationship between these malformed brains to understand human neocortical formation and pathophysiology, although little is known about the expression pattern of layer-specific markers in human developing brain (Hevner 2007). In the present study, we focus on layer formation and investigate the expression of layer-specific molecules in neocortices of human developing brains and lissencephalies.

Materials and Methods

Human Brain Tissues

All cerebral tissues used in the present study were approved for research usage by parents and Ethical Committees of the involved hospitals and institutes. For the developmental study, we used frontal cortices of the dorsolateral precentral gyri of 16 controls, showing no neuropathological findings (age 19 gestational weeks [GWs] to 1 year after birth) (Supplementary Material). In addition, we examined the same frontal cerebral hemispheres of lissencephaly, which were clinicopathologically diagnosed as MDS, XLAG, and FCMD (Supplementary Material). The postmortem interval (time from death to fixation) of all subjects was within 12 h (Supplementary Material). After removal, all brains were fixed in 10% buffered formalin or 4% paraformaldehyde for 2 weeks. Then, brains were dehydrated with 70–100% alcohol and embedded in paraffin. The serial sections were cut 6 μ m thick for histological and immunohistological examination.

Histology and Immunohistochemistry

For investigation of brain architecture, the sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and Klüber-Barrera (KB) method. To investigate cortical layer formation, we performed immunohistochemistry using cortical layer-specific markers; polyclonal antibodies against TBR1 (dilution of 1:100; Abcam), FOXP1 (1:100; Abcam), and OTX1 (1:100; Abcam), as well as monoclonal antibodies against SATB2 (1:100; Bio Matrix Research Inc.), CUTL1 (1:100; Abnova), and CTIP2 (1:20; Abcam).

Our immunohistochemistry technique was previously described (Okazaki et al. 2008). Briefly, the serial sections were deparaffinized and rehydrated. For antigen retrieval, we performed an autoclave treatment (120 °C for 10 min in 10 mM citrate buffer, pH 6.0). Sections were incubated in primary antibodies at 4 °C for overnight, and then reacted with the secondary antibodies (Nichirei). We used amino ethyl carbazole (Nichirei) as a chromogen. For counterstaining, 0.2% methyl green was used. For double labeling, we used Alexafluor-488- and 568-conjugated secondary antibodies (Invitrogen Corporation) with

4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI). We observed the stained tissues with FLUOVIEW 500 fluorescent microscope (Olympus).

Results

Cortical Lamination of Normal Developing Brains

Generally, we confirmed cortical formation of all subjects with HE- and KB-staining. We observed the CP and intermediate zone around 20 GW (Fig. 1A). At this embryonic period, SATB2+ cells located in the upper region of CP (Fig. 1B). CUTL1+ cells were diffusely distributed in CP (Fig. 1C). FOXP1+ cells were restricted to the middle region of CP (Fig. 1D). OTX1+ cells and CTIP2+ cells are seen in the lower region of CP (Fig. 1E,F). The distribution of TBR1+ cells exhibited a 2-layer pattern of CP and SP (Fig. 1G).

At approximately 30 GW, the neocortex was divided into 6 layers (Fig. 2A). The distribution of SATB2+ cells was observed in layers II–V, predominantly in layers II and IV (Fig. 2B). CUTL1+ cells were diffusely seen in layers II–VI (Fig. 2C). FOXP1+ cells were in layer IV and the upper region of layer V (Fig. 2D). OTX1+ cells were concentrated in layers IV and V (Fig. 2E). CTIP2+ and TBR1+ cells were located in layers V and VI (Fig. 2F,G). The developmental expression pattern is shown in Supplementary Figure 1.

In the perinatal period, the expression pattern of the cortical layer-specific markers is very similar to that of around 30 GW (Fig. 3). In the late gestational period, SATB2 expressed in the superficial region of the neocortex and CUTL1, FOXP1, and CTIP2 gradually demonstrated in the deep region, while TBR1 was in the bottom. Interestingly, OTX1+ cells were only in layer V (Fig. 3E). After birth, SATB2+ and CUTL1+ cells appeared until 3 months of age, although the other markers had already disappeared (data not shown).

In order to investigate the relationships among these layer-specific markers, we performed double fluorescent staining of SATB2 and FOXP1, SATB2 and TBR1, CTIP2 and SATB2, SATB2 and OTX1, CTIP2 and FOXP1, and CTIP2 and TBR1 (Fig. 4, Supplementary Figure 1). FOXP1+ and SATB2+ merged (FOXP1+/SATB2+) cells were observed in the superficial CP of 23 GW but in the deep layer after 29 GW (Fig. 4A). Throughout the fetal period, FOXP1+/CTIP2+ cells might be in the deep layer (Fig. 4E), and many SATB2+/OTX1+ cells were in layers II and IV or V (Fig. 4D). However, SATB2+ cells did not express CTIP2+ (Fig. 4C). TBR1+ cells had no SATB2, but there were a few CTIP2 signals in layer VI (Fig. 4B,F). The double staining of layer-specific marker expression was shown in Supplementary Figure 1.

Layer-Specific Marker Expression of Various Lissencephalies

MDS brains were typical agyria and pachygyria with thick cortex and thin white matter. MDS showed a 4-layer neocortex as previously reported (Crome 1956): a molecular layer, an external cellular layer (layer I), a sparsely cellular layer (layer II), and an internal cellular layer (layer III) (Fig. 5A). In layers II, III, and IV, small neurons, which had immunoreactivities of SATB2, CUTL1, FOXP1, and TBR1, were observed diffusely but were few in number (Fig. 5B–E). Large pyramidal neurons in the upper layer II had TBR1 (Fig. 5E). The neocortex in XLAG exhibited a 3-layer pattern (Bonneau et al. 2002): a molecular layer (layer I), an intermediate layer with densely packed