

201224117A

厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）
下部神経管閉鎖障害の病態・制御研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大野 欽司

平成25（2013）年4月

厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）
下部神経管閉鎖障害の病態・制御研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大野 欽司

平成25（2013）年4月

目 次

I.	総括研究報告		
	下部神経管閉鎖障害の病態・制御研究	-----	1
	大野欽司（名古屋大学大学院医学系研究科・神経遺伝情報学教授）		
II.	分担研究報告		
	1. SIP1ノックアウトマウスを用いた神経管閉鎖機構およびその障害に関する研究	-----	8
	東雄二郎（愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・神経発生生物学、分子生物学部長）		
	2. 下肢の感覚障害が歩行に及ぼす影響に関する研究	-----	11
	下部神経管閉鎖障害としての仙骨形成不全の運動障害に関する研究	-----	13
	芳賀信彦（東京大学医学部附属病院・リハビリテーション医学教授）		
	3. 下部神経管閉鎖障害の病態・制御研究	-----	15
	柳田晴久（福岡市立こども病院・整形外科医長）		
	4. 下部神経管閉鎖障害症例に対するエキソームシークエンス解析研究	-----	16
	鬼頭浩史（名古屋大学医学部附属病院・整形外科講師）		
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	-----	21

總括研究報告

下部神経管閉鎖障害の病態・制御研究

研究代表者 大野 欽司 名古屋大学大学院医学系研究科・神経遺伝情報学教授

研究要旨

胎生初期における下部神経管閉鎖障害は二分脊椎とともに下肢運動感覚障害、膀胱・直腸機能障害を惹き起こす。本症における脊髄神経細胞障害の発症機構は十分に解明されておらず治療法も存在しない。妊娠初期における 400 µg 以上の葉酸摂取が本症の発症率を低下させることが知られている (*N Engl J Med* 350:101, 2004)。しかし、葉酸欠乏は本症の唯一の原因ではない。一部遺伝性症例がみられるが、多くは孤発例である。我々はホメオボックス遺伝子 *Zeb1 Zeb2* 欠損マウスが神経管閉鎖障害を起こすことを以前に報告した (*Am J Hum Genet* 72: 465, 2003; *Dev Dyna* 235: 1941, 2006)。モデル動物において神経管閉鎖に関わる遺伝子が他に 80 種類同定をされているが (*Nat Rev Genet* 4: 784, 2003)、ヒトにおいては *VANGL1* (*New Engl J Med* 356: 1432, 2007) と *VANGL2* (*New Engl J Med* 362: 2232, 2010) の遺伝子変異が報告をされているのみである。(i) 本研究では患者会の協力を得て下部神経管閉鎖障害の臨床・疫学調査を行なうとともに、(ii) 下部神経管閉鎖障害の一部には *ZEB1*, *ZEB2* 遺伝子を含む神経管形成遺伝子群の *de novo* 変異が存在する可能性を考え網羅的なエキソームシーケンス解析を行い、(iii) 同定をした候補遺伝子のノックダウンによる細胞レベルの検証、shRNA レンチウィルス脳室内導入、ノックアウトマウス作成による個体レベルの検証と分子機構の解明を行う。(iv) また、本症における運動感覚障害・自律神経障害は脊髄円錐部の tethering に伴う虚血再還流が原因であるという仮説を *Zeb1*, *Zeb2* 欠損モデル動物を用いて検証する。(v) さらに、脊髄運動神経細胞の維持・分化に関わる分子群の基盤的研究を行うとともに、(vi) 脊髄運動神経細胞の軸索延長を増強する既認可薬スクリーニングを行い本症に対する治療戦略を探る

研究分担者

- 東雄二郎（愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・神経発生生物学、分子生物学部長）
- 芳賀信彦（東京大学医学部附属病院・リハビリテーション医学教授）
- 柳田晴久（福岡市立こども病院・整形外科医長）
- 鬼頭浩史（名古屋大学医学部附属病院・整形外科講師）

A. 研究目的

下部神経管閉鎖障害は出生一万人あたり4人（平成11年度厚生科学研究「先天異常モニタリング等に関する研究」）に認められ、嚢胞性ならびに潜在性二分脊椎症、下肢運動感覚障害、膀胱・直腸障害を惹き起こす。妊娠初期における葉酸欠乏が本症の発症率を高めることが知られている(上述 *N Engl J Med*)。しかし、多くの症例において発症原因は不明であり、遺伝性も明らかではない。(i) 本研究では患者会「日本二分脊椎症協会」の協力を得て本邦における

下部神経管閉鎖障害の臨床・疫学調査を行う (H24-H26)。(ii) 次に、本症は神経管形成遺伝子群(上述 *Nat Rev Genet*)の *de novo* 変異によって起きる可能性を exome capture resequencing 解析により検証をすることを目的とした。網羅的な *de novo* 変異解析は次世代シーケンサにより初めて可能になる手法であり我々が知る限り類似の研究は行われていない。(iii) 同定をした候補遺伝子の細胞レベル・動物個体レベルでの機能解析は申請者らが専門としてきた研究領域である。(iv) また、軽症例では脊髄神経細胞障害が遅延性に起きるが、その発症機構は解明されていない。しかし、遅延性神経障害であることは出生後に発症を予防できる可能性を示唆しており、その発症機構の解明は危急の課題である。(v) さらに、我々が同定をした脊髄前角細胞特異的に発現をする RSPO2 と LGR5 に注目し、両分子の運動神経細胞分化促進作用の分子機構を解析する。(vi) 加えて本症の遅延性神経障害を出生後に抑制する目的で既認可薬のオフラベル薬効による治療戦略を探る。既認可薬はヒトに対する至適投与量・副作用が知られており、本症を含む希少疾患に対する治療戦略として既認可薬のオフラベル薬効の活用は有用であることが期待をされる。我々は先天性筋無力症候群 (*Hum Mol Genet* 18: 1229, 2009) と進行性骨化性線維異形成症 (FOP) (*J Bone Miner Metab*, in press) に対して有効な既認可薬を同定し、FOP に対しては治験を開始している。

B. 研究方法

(i) 下肢運動・感覚神経障害、膀胱・直腸機能障害を主徴とする下部神経管閉鎖障害(嚢胞性ならびに潜在性二分脊椎症)を対象として、患者会「日本二分脊椎症協会」の協力を得て本邦における下部神経管閉鎖障害の臨

床症状・家族内発症・葉酸摂取を含む環境要因の調査を行なうとともにゲノム研究参加者を募った。

(ii) 血液 DNA を米国 Otogenetics 社に送付し Agilent 社 SureSelect Human All Exon V4 により whole exome capture を行い、x 50 coverage pair-end sequencing 解析を行った。Bowtie を用いてヒトゲノムへの mapping を行った。Single nucleotide variants (SNV) 解析は GATK ならびに Strand 社 Avadis NGS にて行った。解析ツールと解析パラメータにより検出される SNV が大幅に変動することを我々は経験をしており (*Hum Genet* 130:671, 2011)、高信頼度から低信頼度までパラメータを変動させながら、神経管形成遺伝子群(上述 *Nat Rev Genet*)を候補として *de novo* 遺伝子変異解析を行う。コントロールとして自験 44 サンプル・1000 ゲノムデータベース・dbSNP137 を用いることとした。

(iii) 脊髄前角細胞のレーザーキャプチャーマイクロダイセクションサンプルのマイクロアレイ解析と RNA-seq 解析にて脊髄前角細胞特異的に発現をする遺伝子の同定を行った。その解析結果の中から RSPO2 を候補として、E13.5 マウス脊髄運動神経細胞プライマリー培養ならびにマウス運動神経細胞株 NSC34 に対して神経突起延長促進効果を ArrayScan VTI-HCS により確認を行った。

(倫理面への配慮)

下部脊椎管閉鎖障害の臨床解析は、「臨床研究に関する倫理指針(平成20年7月31日全部改正)」ならびに「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成20年12月1日一部改正)」に則り、参加各施設の生命倫理委員会審議ならびに各施設長の承認を得た。

組み換え DNA 実験と動物実験は、名古屋大学・愛知県身体障害者コロニーの組み換え

DNA 実験指針・動物実験指針、ならびに、カルタヘナ法を遵守し、各施設長の承認を得て進めた。

C. 研究結果

(i) 下肢運動・感覚神経障害、膀胱・直腸機能障害を主徴とする下部神経管閉鎖障害（嚢胞性ならびに潜在性二分脊椎症）を対象として、孤発7症例ならび同胞発症2症例に加えてその両親より血液を採取し、トータル22名のDNA抽出を行った。

(ii) 一家系の血液 DNA を米国 Otogenetics 社に送付し Agilent 社 SureSelect Human All Exon V4 により whole exome capture を行い、x 50 coverage pair-end sequencing 解析を行った。Bowtie を用いてヒトゲノムへの mapping を行った。GATK ならびに Strand 社 Avadis NGS にて single nucleotide variants (SNV)解析を行った。高信頼度から低信頼度までパラメータを変動させながら、神経管形成遺伝子群を候補として *de novo* 遺伝子変異解析を行ったが、現在のところ候補となる SNVs の絞り込みができていない。年度末に重なったために残り 19 症例の次世代シーケンサ解析は平成 25 年度を予定した。

(iii) 脊髄前角細胞のレーザーキャプチャーマイクロダイセクションサンプルのマイクロアレイ解析と RNA-seq 解析にて脊髄前角細胞特異的に RSPO2 が発現をすることを同定した。その受容体が LGR5 である可能性を見出した。E13.5 マウス脊髄運動神経細胞プライマリー培養ならびにマウス運動神経細胞株 NSC34 に対して神経突起延長促進効果を見出し、ArrayScan VTI-HCS による自動解析によりその効果の検証を行った。

D. 考察

平成 24 年度の第 3 次募集により本研究事業の承認を受け、研究統括機関として名古屋大学医学系研究科の倫理委員会承認を得たのちに各研究施設の倫理委員会の承認を得たために、患者の血液の採取が 2012 年末開始となり、1 家系の exome capture resequencing 解析のみを終えることができた。平成 25 年度はさらに症例を重ねて解析を行う予定である。

基礎研究においては RSPO2 の神経突起延長作用を明らかにすることができた。本研究を継続するとともに RSPO2 の発現を増強する薬剤の screening を drug repositioning strategy により同定を行う。さらに、NSC34 の neurites 延長促進作用を有する off-label 薬の研究を開始する。

E. 結論

下部神経管閉鎖障害の遺伝学的基盤研究のセットアップを完了し、平成 25 年度も引き続き精力的に研究を進める。

F. 健康危険情報

研究代表者の施設においても、研究分担者の施設においても、特記事項はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

(Original Article)

1. Masuda A, Andersen HS, Doktor TK, Okamoto T, Ito M, Andresen BS, Ohno K. CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Sci Rep* 2012, 2: 209.
2. Yamashita Y*, Matsuura T*, Shinmi J, Amakusa Y, Masuda A, Ito M, Kinoshita M, Furuya H, Abe K, Ibi T, Sahashi K, Ohno K.

- Four parameters increase the sensitivity and specificity of the exon array analysis and disclose twenty-five novel aberrantly spliced exons in myotonic dystrophy. *J Hum Genet* 2012, 57: 368-374. *Equal contribution.
3. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K. Protein-anchoring strategy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. *Mol Ther* 2012, 20: 1384-1392.
 4. Matsuura T, Minami N, Arahata H, Ohno K, Abe K, Hayashi YK, Nishino I. Myotonic dystrophy type 2 (DM2) is rare in the Japanese population. *J Hum Genet* 2012, 57:219-220.
 5. Ishigaki S, Masuda A, Fujioka Y, Iguchi Y, Katsuno M, Shibata A, Urano F, Sobue G, Ohno K. Position-dependent fus-rna interactions regulate alternative splicing events and transcriptions. *Sci Rep* 2012, 2: 529.
 6. Kurosaki T, Ueda S, Ishida T, Abe K, Ohno K, Matsuura T. The unstable CCTG repeat responsible for myotonic dystrophy type 2 originates from an *AluSx* element insertion into an early primate genome. *PLoS ONE* 2012, 7: e38379.
 7. Ito M, Hirayama M, Yamai K, Goto S, Ichihara M, Ohno K. Drinking hydrogen water and intermittent hydrogen gas exposure, but not lactulose or continuous hydrogen gas exposure, prevent 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease in rats. *Med Gas Res* 2012, 2:15.
 8. Yoshinaga H, Sakoda S, Good J M, Takahashi M P, Kubota T, Arikawa-Hirasawa E, Nakata T, Ohno K, Kitamura T, Kobayashi K, Ohtsuka Y. A novel mutation in SCN4A causes severe myotonia and school-age-onset paralytic episodes. *J Neurol Sci* 2012, 315:15-19.
 9. Sayeed S, Asano E, Ito S, Ohno K, Hamaguchi M, Senga T. S100a10 is required for the organization of actin stress fibers and promotion of cell spreading. *Mol Cell Biochem* 2013, 374: 105-111.
 10. Yamamoto R, Matsushita M, Kitoh H, Masuda A, Ito M, Katagiri T, Kawai T, Ishiguro N, Ohno K. Clinically applicable antianginal agents suppress osteoblastic transformation of myogenic cells and heterotopic ossifications in mice. *J Bone Miner Metab* 2013, 31: 26-33.
 11. Iio A, Ito M, Itoh T, Terazawa R, Fujita Y, Nozawa Y, Ohsawa I, Ohno K, Ito M. Molecular hydrogen attenuates fatty acid uptake and lipid accumulation through downregulating cd36 expression in hepg2 cells. *Med Gas Res* 2013, 3: 6.
 12. Tanisawa K, Mikami E, Fuku N, Honda Y, Honda S, Ohsawa I, Ito M, Endo S, Ihara K, Ohno K, Kishimoto Y, Ishigami A, Maruyama N, Sawabe M, Iseki H, Okazaki Y, Hasegawa-Ishii S, Takei S, Shimada A, Hosokawa M,

- Mori M, Higuchi K, Takeda T, Higuchi M, Tanaka M. Exome sequencing of senescence-accelerated mice (sam) reveals deleterious mutations in degenerative disease-causing genes. *BMC Genomics* 2013, 14: 248.
13. Nakata T, Ito M, Azuma Y, Otsuka K, Noguchi Y, Komaki H, Okumura A, Shiraishi K, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Ohno K. Mutations in the c-terminal domain of colq in endplate acetylcholinesterase deficiency compromise colq-musk interaction. *Hum Mutat* 2013, in press.
4. Ohno K, Ito M, Kawakami Y, Krejci E, Engel AG. Specific binding of collagen q to the neuromuscular junction is exploited to cure congenital myasthenia and to explore bases of myasthenia gravis. *Chem Biol Interact*. Elsevier, Amsterdam, 2012, 203: pp 335-340. (査読有)
5. Ohe K, Masuda A, Ohno K. Intronic and exonic nucleotide variations that affect rna splicing in humans. *Introduction to Sequence and Genome Analysis*. iConcept Press, Hong Kong, 2012, in press.
6. 大野欽司「RNA 異常と神経疾患」Annual Review 神経 2012 :97-103, 2012.
7. 大野欽司「先天性筋無力症候群」Clinical Neuroscience 30 (6): 685-687, 2012.

(Book Chapters)

1. Engel AG, Shen X-M, Ohno K, and Sine SM. Congenital myasthenic syndromes. *Myasthenia gravis and myasthenic disorders 2nd ed*. Ed. by Engel AG. Oxford University Press, New York, 2012, pp173-230. (Review article with peer review)
2. Ohno K, Ito M, and Engel AG. Congenital Myasthenic Syndromes – Molecular Bases of Congenital Defects of Proteins at the Neuromuscular Junction – *Myopathy*. InTech, Rijeka, 2012, pp175-200. (Review article with peer review)
3. Ohno K, Ito M, Ichihara M, and Ito M. Molecular Hydrogen as an Emerging Therapeutic Medical Gas for Neurodegenerative and Other Diseases. *Oxid Med Cell Longev* vol.2012. Hindawi Publishing Corporation, Cairo, 2012, Article ID 353152, 11 pages (Review article with peer review)

2. 学会発表

(Poster Presentation)

1. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K
Protein-anchoring therapy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction
The 11th International Meeting on Cholinesterases (Poster), Kazan, Russia
Jun 4-9, 2012
2. Kinoshita M, Kokunai Y, Kubota T, Takahashi M, Sasaki R, Ohno K, Hirose K
EMG findings at non-myotonia and myotonia states in patients with Na channelopathies
The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center (Poster), Kyoto, Japan

- Jun 7-8, 2012
3. Kinoshita M, Morita S, Ohno K, Hirose K
In myotonic dystrophy type 1 Peroxiredoxin-2 of RBC membrane protein was reduced, compared with a normal subject
The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center (Poster), Kyoto, Japan
Jun 7-8, 2012
 4. Masuda A, Andersen HS, Doktor TK, Okamoto T, Ito I, Andresen BS, Ohno K
Global analysis of RNA-binding sites of CUGBP1 and MBNL1 reveal their preferential binding to 3' UTRs to regulate mRNA stability
The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center (Poster), Kyoto, Japan
Jun 7-8, 2012
 5. Ohkawara B, Fuse Y, Nakashima H, Ohno K
Functional characterization of GFPT1 during myogenesis and NMJ formation
The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center (Poster), Kyoto, Japan
Jun 7-8, 2012
 6. Rahman MA, Ohe K, Masuda A, Ito M, Hutchinson DO, Engel AG, Ohno K
Mutation in congenital myasthenic syndrome reveals opposite splicing regulatory effects of hnRNPs L and LL
35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Poster), Nagoya, Japan
Sep 18-21, 2012
 7. Masuda A, Ishigaki S, Fujioka Y, Iguchi Y, Katsuno M, Shibata A, Urano F, Sobue G, Ohno K
Global mapping of FUS-binding sites and global profiling of FUS-mediated RNA metabolisms in the mouse brain
62nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Poster), San Francisco, USA
Nov 6, 2012
 8. Shibata A, Masuda A, Ohno K
A comprehensive and efficient algorithm to predict splicing consequences of intronic nucleotide substitutions in the human genome
62nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Poster), San Francisco, USA
Nov 6, 2012
 9. Sobue S, Yamai K, Ito M, Ohno K, Ito M, Ohkuwa T, Ichihara M
Molecular hydrogen alters signaling pathways and gene expression profiles in multiple mouse organs
52nd Annual Meeting of the American Society for Cell Biology (Poster), San Francisco, USA
Dec 15, 2012
 10. Nasrin F, Rahman MA, Ohe K, Masuda A, Ohno K
Alternative RNA splicing regulating the molecular architecture of NMJ
5th NAGOYA Global Retreat (Poster), Nagoya, Japan
Feb 2, 2013
 11. Selcen D, Shen X-M, Milone M, Brengman J, Ohno K, McQuillen M, Deymeer F, Finkel

R, Rowin J, Engel AG
Investigation of 11 Patients with
GFPT1-Myasthenia Reveals Clinical,
Structural, and Electrophysiologic
Heterogeneity
65th American Academy of Neurology, San
Diego, USA
Mar 21, 2013

12. Ito M, Itoh T, Ohno K, Nozawa Y
Molecular mechanism of the inhibitory
effect of hydrogen on inflammation
90th Annual Meeting of the Physiological
Society of Japan (Platform), Tokyo, Japan
Mar 28, 2013

(Invited Presentation)

1. Ohno K
Specific binding of collagen Q to the
neuromuscular junction is exploited to cure
congenital myasthenia and to explore bases
of myasthenia gravis
11th International Meeting on
Cholinesterases, Kazan, Russia
Jun 4-9, 2012
2. Ohno K
Congenital defects of neuromuscular signal
transduction

3rd Berlin Summer School for Myology,
Berlin, Germany
Jun 18-22, 2012

3. Ohno K
Molecular bases and therapeutic intervention
of neuromuscular transmission defects
Ninth French-Japanese Workshop on
Muscular Dystrophies, Tokyo, Japan
Sep 7, 2012
6. Ohno K
Global mapping and global expression
profiling of RNA-binding proteins that are
associated with neurological and
neuromuscular diseases
35th Annual Meeting of the Japan
Neuroscience Society, Nagoya, Japan
Sep 18-21, 2012

H. 知的所有権の取得状況

1. 出願年月日：2013年3月10日
発明等の名称：骨系統疾患治療薬及びその用途
特願 2013-047426 号
発明者：大野欽司、石黒直樹、鬼頭浩史、松
下雅樹
出願人：国立大学法人名古屋大学
特許事務所番号：NU11005

分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
分担研究報告書

SIP1 ノックアウトマウスを用いた神経管閉鎖機構およびその障害に関する研究

研究分担者 東雄二郎（愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・神経発生生物学、分子生物学部長）

研究要旨

神経管閉鎖は、マウスにおいては、胎生 8.5 日から 9 日にかけて起こり、その後の中枢神経組織構築の基礎となる重要なプロセスである。SIP1（Smad interacting protein 1）遺伝子のノックアウトマウス（以下、KO マウスと略す）においては、この神経管閉鎖が起こらない。すなわち、SIP1 KO マウスはヒトにおける二分脊椎症のモデルとなり得る。この障害の分子レベルでの理解のために、まず SIP1 が神経管閉鎖過程において、どのような発現パターンを示すかを検討した。また SIP1 KO 胚の神経板では、神経板細胞の細胞極性不全が観察され、さらに野生型胚と比較して Sox2 の発現が低下していることが免疫組織染色で確認された。また、胎生 8.5 日目の KO 胚の一部では、神経管の形成されるべき背側に、異所的な小泡が形成され、Sox2 の発現と E-cadherin の発現が見られた。これらの結果から、SIP1 の欠失により細胞極性が消失した神経板の細胞は、細胞運動の障害によって神経管閉鎖に至らず、さらに、Sox2 の発現低下により神経分化にも異常をきたしていることが明らかになった。

共同研究者

- 西崎有利子
（愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所）
- 松井ふみ子
（愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所）

A. 研究目的

転写因子 SIP1 のノックアウトマウス（以下、KO マウスと略す）は、神経管が閉鎖しない表現型を示し、胎生致死である。現在、SIP1 が神経管閉鎖障害にどのように関わっているのかは明らかになっていない。また、正常な神経管閉鎖のメカニズムに関しても、その詳細な理解は不十分である。本研究では、ヒトの二分脊椎症のモデル動物となる SIP1 KO マウスを使用し、その障害メカニズムを解明することにより、二分脊椎の障害ならびに正常な神経管形成のメカニズムを理解し、将来的に、この疾患の予防や治療に貢献できる基礎研究を行う。本年度はまず、神経管閉鎖過程における SIP1 タンパクの発現パターンを観察する。一方、KO マウスの神経板において、その apico-basal の極性が正常に形成されているかどうかを、極性に関連する幾つかマーカータンパクの局在等を観察することにより検討を行う。

B. 研究方法

① SIP1 発現パターンの解析

発現パターン解析のために、我々のグループにより作成された、SIP1-EGFP レポーターマウスを用いた。このマウスは SIP1 遺伝子 locus に遺伝子相同組み替え法により、EGFP を in-frame で SIP1 タンパクのカルボキシル基末端側にノックイン挿入した EGFP レポーターマウスである。この SIP1-EGFP の雄マウスと野生型 ICR 雌マウスを交配し、神経管閉鎖が起こる、胎生 8.5 日に胎仔を摘出し、EGFP による自家蛍光や、抗 EGFP 抗体を用いて内在の SIP1-EGFP 発現を調べた。GFP 抗体で免疫組織染色を行うことで SIP1 の発現を検出した。

② SIP1 KO 胚神経板の極性の解析

SIP1 KO マウスを用いて、そのヘテロ変異同士の交配により、ホモ変異胚の胎仔を得る。胎生 8.5 日で、体節数が 1, 2 個から 5, 6 個生じたもの（まさにこれから神経管閉鎖を起こそうとする段階である）で、遺伝子型がホモ変異のものと、その対照群としてヘテロ変異および野生型の胚を用いた。それぞれについて、apico-basal の極性のマーカータンパク等の免疫組織染色を行った。

C. 研究結果

① SIP1 発現パターンの解析

SIP1-EGFP タンパクは、神経管閉鎖過程を通して神経管全体及び体節に発現していた。神経管の大部分の細胞では、SIP1 は核内に存在していたが、神経管の背側の一部の細胞においては、核ではなく細胞質に局在しているものも観察されたが、この点に関しては、さらに詳細な観察が必要である (図1)。

② SIP1 KO 胚神経板の極性について

胎生 8 日目の神経管閉鎖期直前にある SIP1 KO 胚

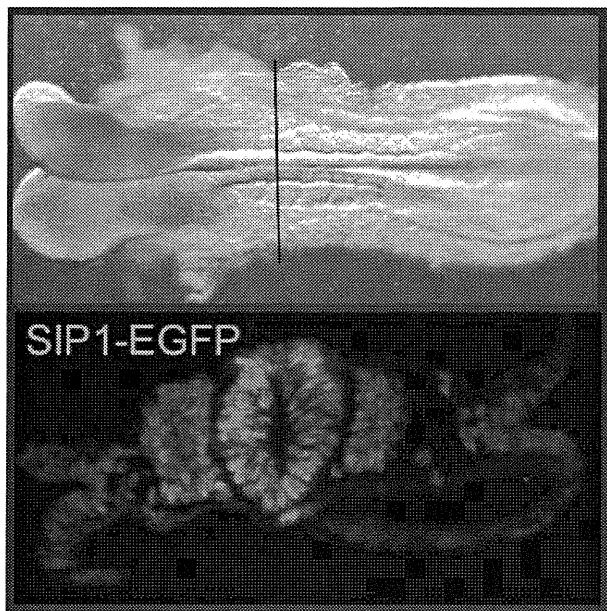


図1 胎生 8.5 日における SIP1 の発現パターン
SIP1-EGFP ヘテロマウス (胎生 8.5 日) の神経管閉鎖を起こしてル胚を横断切片し、抗 EGFP 抗体により免疫染色した

の神経板では、神経板細胞の細胞極性不全が観察され、野生型胚と比較して Sox2 の発現が低下していることが免疫組織染色で確認された(図2)。また、胎生 8.5 日目のノックアウト胚では、神経管の形成されるべき背部に、異所的な小疱が形成されていた (図3)。小疱は上皮様の一層からなる細胞で構成されており、Sox2 の発現と E-cadherin の発現が見られた (図3)。

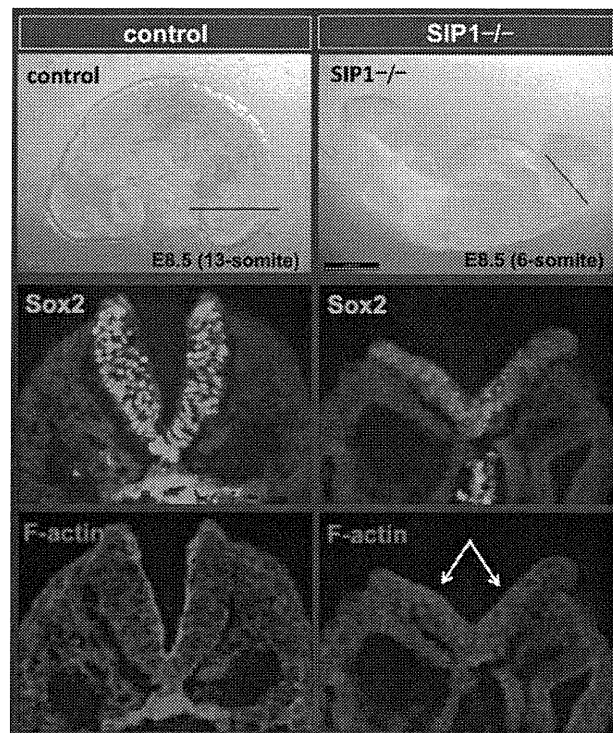


図2 SIP1 KO 胚における、Sox2 発現の減衰と F-actin 局在の消失
SIP1 KO 胚では神経板における Sox2 の発現が弱まり、細胞極性の指標である F-actin の局在が消失している。

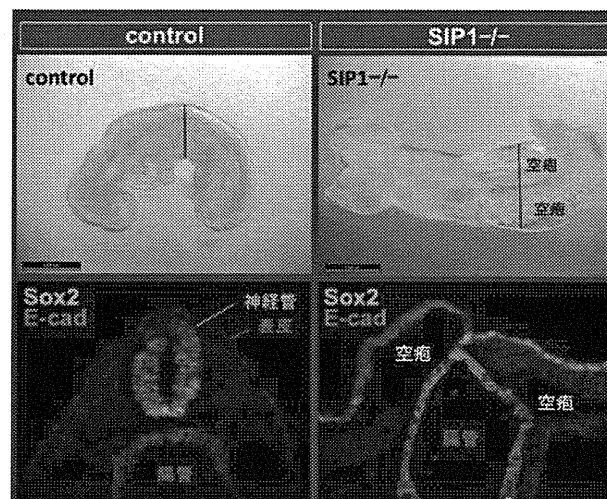


図3 SIP1 KO 胚における、異所的小疱における Sox2 の発現
SIP1 KO 胚における異所的な小疱では、Sox2 の発現があり、神経板が表皮様の形態に変化したものと考えられる。

神経管閉鎖過程にある胎生 8 日目の SIP1^{-/-}胚では、Par3 などの apical 側に局在するべき分子の局在が明確でなく、apical 側の細胞収縮を担う pMLC の形成にも異常が見られた (図 4)。また、神経管の背側に見られるべき Smad5 の強いリン酸化が SIP1 KO 胚では見られなかった。SIP1 の欠失により、BMP

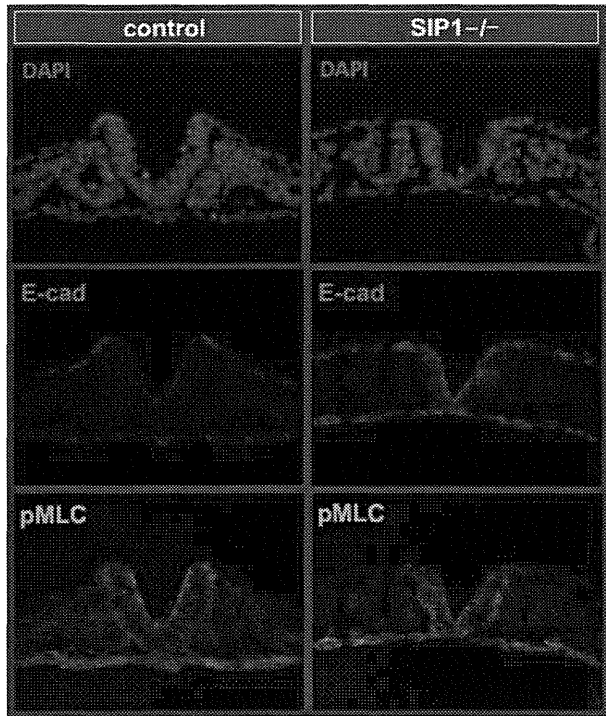


図 4 SIP1 KO 胚における、pMLC 発現の異常
SIP1 KO 胚における pMLC の発現が正常胚とは異なり、apical 側での均一な発現が見られない。

シグナリングの阻害、apical 極性の異常と収縮低下が引き起こされていることが明らかになり、そこに関わる分子の解析をさらに行っている。

D. 考察

これらの結果から、SIP1 の欠失により細胞極性が消失した神経板の細胞は、細胞運動の障害によって神経管閉鎖に至らず、さらに、Sox2 の発現低下により神経分化にも異常をきたし、上皮組織でしか発現が見られないはずの E-cadherin の発現が起こり、上皮様小疱を形成したと考えられる。これらの結果は、SIP1 遺伝子が、神経管形成過程において、細胞極性の制御と神経分化という 2 つの役割を担っていることを示唆している。

E. 結論

SIP1 は神経板が神経上皮組織を維持するための必須の因子であることがわかった。また神経管閉鎖における SIP1 の機能はその神経板の apico-basal の極性や、BMP シグナルの活性化と何らかの関連性があると推察された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Weng, Q., Chen, Y., Wang, H., Xu, X., Yang, B., He, Q., Shou, W., Chen, Y., Higashi, Y., van den Berghe, V., Seuntjens, E., Kernie, S.G., Bukshpun, P., Sherr, E.H., Huylebroeck, D. and Lu, Q.L.

Dual-Mode Modulation of Smad Signaling by Smad-Interacting Protein Sip1 Is Required for Myelination in the Central Nervous System
Neuron, 73, 713-728, (2012)

Suzuki K, Yokoyama C, Higashi Y, Daikoku T, Mizoguchi S, Saika S and Yamada G.

Wakayama symposium: epithelial-mesenchymal interaction regulates tissue formation and characteristics: insights for corneal development.
*Ocul Surf.*10, 217-220. (2012)

McKinsey GL, Lindtner S, Trzcinski B, Visel A, Pennacchio LA, Huylebroeck D, Higashi Y, and Rubenstein JL.

Dlx1&2-dependent expression of Zfhx1b (Sip1, Zeb2) regulates the fate switch between cortical and striatal interneurons
Neuron. 77, 83-98. (2013)

2. 学会発表

高木豪、東雄二郎 de novo 型 Sip1 ヘテロ変異マウスを用いた Mowat-Wilson syndrome のモデル動物としての有用性の検討 第 35 回日本分子生物学会 (福岡) 2012 年 12 月 11 日

東雄二郎、高木豪、西崎有利子、松井ふみ子、中西圭子、時田義人 δ EF1/zeb1 は下垂体形成に必須である 第 35 回日本分子生物学会 (福岡) 2012 年 12 月 11 日

G. 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

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
分担研究報告書

下肢の感覚障害が歩行に及ぼす影響に関する研究

研究分担者 芳賀信彦（東京大学医学部附属病院・リハビリテーション医学教授）

研究要旨 二分脊椎における感覚障害が歩行に及ぼす影響を知ることを目的に、遺伝性感覚自律神経ニューロパチーの患者を対象とし歩行の特徴を検討した結果、9歳以下では、大きい歩幅を伴う歩行速度の増加、踵接地と足底接地の間の角速度の増加、という特徴があった。これを二分脊椎患者の褥瘡形成、骨折、Charcot関節といった足部合併症の予防に役立たせることができる可能性がある。

A. 研究目的

二分脊椎では、下肢の運動麻痺、感覚障害、膀胱直腸障害を示す。感覚障害は褥瘡形成や Charcot 関節につながりうるが、そのメカニズムを運動麻痺のある状態で検討することは困難である。そこで感覚障害単独が歩行に及ぼす影響を知ることを目的に、運動麻痺がなく感覚の障害を示す遺伝性感覚自律神経ニューロパチー（hereditary sensory and autonomic neuropathy: HSAN）の患者を対象として、歩行の特徴を検討した。

B. 研究方法

下肢に明らかな運動障害のない HSAN-IV 型 10 名、V 型 1 名（年齢 2-23 歳、男性 6 名・女性 5 名）を対象とし（患者群）、家庭用ビデオカメラ（Sony HDV-HC3）を用いて歩行を撮影、ビデオ解析用ソフト（Dartfish 5.5 ProSuite Version）を用いて解析した。解析したパラメータは、歩行速度、歩調、歩幅、立脚相時間（歩行周期に対する割合）、踵接地から足底接地までの時間およびその間の角速度である。対照として健常者 15 名（2-23 歳、男性 7 名・女性 8 名）に同じ計測を行った（健常群）。従来から報告されている、成長に伴う歩行パラメ

ータの変化を考え、2-9 歳の年少者、10-23 歳の年長者に分けて検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は、東京大学医学系研究科倫理委員会の承認を得た上で、研究参加者の書面での同意を得て行った。

C. 研究結果

身長で正規化した歩行速度は患者群が健常群より速く、年少者では有意な差であった。歩調には両群間で差がなかった。身長で正規化した歩幅は年少者、年長者共に健常群より患者群が長かった。立脚相時間には両群間で差がなかった。

踵接地から足底接地までの時間（歩行周期に対する割合）には両群間で差がなかった。この間の角速度は患者群が健常群より速く、年少者では有意な差であった。

D. 考察

HSAN では末梢神経の A δ および C 線維の障害により主に温痛覚が障害されるが、触圧覚や深部知覚も低下していることをわれわれは報告している（Iijima M, Haga N: Childs Nerv Syst 2010）。従って HSAN は二分脊椎の下肢障害の中で感覚障害を抽出したモデルとなりうる。二分脊椎では下肢

感覚障害に伴い褥瘡形成、骨折、Charcot 関節を合併することがあり、これらは移動機能の低下につながりうる重大な合併症である。

本研究の結果、年少の HSAN 患者では、大きい歩幅を伴う歩行速度の増加、踵接地と足底接地の間の角速度の増加、があることが明らかになった。後者は感覚障害に伴い、踵接地時の速度と衝撃が大きいことを示唆し、踵部の褥瘡形成、後足部の骨折や Charcot 関節につながる可能性がある。二分脊椎においても、特に若年者では、歩行に関する指導、靴や装具による衝撃の吸収が、足部合併症を減らす可能性があると考えた。

E. 結論

年少の HSAN 患者の歩行には、大きい歩幅を伴う歩行速度の増加、踵接地と足底接地の間の角速度の増加、という特徴があった。これを二分脊椎患者の足部合併症予防に役立てる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 芳賀信彦、田中信幸、田中弘志：先天性無痛無汗症の治療戦略. 日整会誌 87: 57-60, 2013
- 2) Zhang Y, Ogata N, Yozu A, Haga N: Two-dimensional video gait analyses in patients with congenital insensitivity to pain. Dev Neurorehabil, in press

2. 学会発表

- 1) 芳賀信彦：先天性無痛無汗症の治療戦略. 第 85 回日本整形外科学会, 2012. 5. 17-20, 京都

- 2) 芳賀信彦、田中信幸、田中弘志、緒方直史、中原康雄、宮本英明：先天性無痛無汗症に合併した膝 Charcot 関節の特徴と経過. 第 49 回日本リハビリテーション医学会学術集会, 2012. 5. 31-6. 2, 福岡

- 3) 張雅素、緒方直史、芳賀信彦：ビデオを用いた先天性無痛症の歩行分析. 第 28 回日本義肢装具学会学術大会, 2012. 11. 10-11, 名古屋

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
分担研究報告書

下部神経管閉鎖障害としての仙骨形成不全の運動障害に関する研究
研究分担者 芳賀信彦（東京大学医学部附属病院・リハビリテーション医学教授）

研究要旨 東京大学医学部附属病院で過去 10 年間に経験した仙骨形成不全 6 名について、カルテと画像検査から、仙骨の状態と下肢運動障害を調査した。仙骨完全欠損でも片側下肢に異常を認めない症例があるなど、仙骨形成不全の程度と運動障害の程度が必ずしも比例しなかった。また下肢の筋力低下の分布が、脊髄・馬尾神経の筋支配分布に必ずしも一致しなかった。

A. 研究目的

仙骨形成不全は、腰髄レベル以下の神経障害を合併することから下部神経管閉鎖障害の一種である潜在性二分脊椎として捉えることができる。しかし稀な疾患であることから、その神経障害に関するまとまった報告は少ない。本研究の目的は、仙骨形成不全をもつ小児の運動障害を知ることである。

B. 研究方法

東京大学医学部附属病院リハビリテーション科の小児リハビリ専門外来、および同整形外科の小児整形外科専門外来を過去 10 年間に受診した仙骨形成不全患者のカルテ記載及び画像検査を後方視的に検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は、東京大学医学系研究科倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

対象となる患者は 6 名（男児 3 名、女児 3 名）であった。以下の個々の患者の運動障害に関する概略を記載する。

【症例 1】女児、仙骨完全欠損。初診時 0 歳、最終診察時 3 歳（経過観察中）。右下肢

は、股関節屈曲内転位にあり脱臼、膝関節には屈曲拘縮、軽度の内反尖足を認める。下腿以下は低形成で、膝関節以下に自動運動を認めない。左下肢は、股関節は屈曲外転位にあり、膝関節は著しく過伸展している。足関節以下には強い内反凹尖足があり、膝関節以下の自動運動ははっきりしないが、足趾は自動屈曲・伸展可能である。

【症例 2】女児、仙骨完全欠損。初診時 0 歳、最終診察時 6 歳。右下肢に著しい膝窩翼状片を認め、膝関節屈曲拘縮、著しい内反尖足があるが、股関節から足趾までの自動運動は可能である。左下肢に明らかな異常はない。

【症例 3】女児、仙骨後方を中心とした形成不全。初診時 0 歳、最終診察時 10 歳（経過観察中）。Body stalk anomaly と診断した児で、右下肢は強い股関節・膝関節拘縮と足部変形があり、股関節以下の筋力もほとんど効いていない。右股関節は脱臼位にある。左下肢は明らかな変形・拘縮はないが、前脛骨筋以下に軽度の筋力低下がある。

【症例 4】男児、仙骨片側欠損。初診時 8 歳、最終診察時 12 歳（経過観察中）。左股関節は亜脱臼位にあるが、股関節・膝関節に明らかな拘縮なし。足部変形はないが、足関節の背屈・底屈とも可動域制限あり。

筋力は股関節以下で低下しているが、筋力低下の分布は特定の神経学的レベルに一致しない。右下肢に明らかな異常はない。

【症例5】男児、仙骨片側欠損。初診時6歳、最終診察時6歳。左股関節脱臼の治療歴がある。左足関節の背屈制限の他に、大きな可動域の制限はない。左下肢の筋力は軽度低下しているが、その分布は特定の神経学的レベルに一致しない。

【症例6】男児、仙骨片側の形成不全。初診時0歳、最終診察時0歳（経過観察中）。左下肢には先天性内反足があり、下腿以下の形成不全を伴う。足関節以下の自動運動は低下している。右下肢に明らかな異常はない。

D. 考察

仙骨形成不全は、尾側退行症候群 (caudal regression syndrome) の部分症状として捉えることができ、下部消化管、泌尿器系の異常に加えて下肢の神経学的異常を合併することが多い。一方、二分脊椎では仙骨の完全または部分欠損を伴うことが知られており、仙骨形成不全に伴う神経障害を二分脊椎の症状として捉えるのは自然である。しかし開放性脊髄髄膜瘤などと異なり、仙骨形成不全に伴う下肢運動障害に関する報告は少ない。

本研究では、様々な程度の仙骨形成不全の運動障害を調査したが、1) 仙骨形成不全の程度と運動障害の程度が必ずしも比例しない、2) 下肢の筋力低下の分布が、脊髄・馬尾神経の筋支配分布に必ずしも一致しない、という結果であった。これは、仙骨形成不全に伴う神経障害が、開放性脊髄髄膜瘤などの典型的な下部神経管閉鎖障害

に伴う神経障害と異なる病態を持つ可能性を示唆する。今後症例を蓄積し、仙骨形成不全の状態と下肢運動障害の関係を検討することが、本疾患の下肢機能の再建、移動に関するリハビリテーション手法の選択にとって重要である。

E. 結論

東京大学医学部附属病院で過去10年間に経験した仙骨形成不全6名について、下肢運動障害を調査した結果、仙骨形成不全の程度と運動障害の程度が必ずしも比例せず、また下肢の筋力低下の分布が、脊髄・馬尾神経の筋支配分布に必ずしも一致しなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
分担研究報告書

下部神経管閉鎖障害の病態・制御研究

研究分担者 柳田晴久（福岡市立こども病院・整形外科医長）

研究要旨 下部神経管閉鎖障害の患者ならびに無症状の両親・非罹患同胞の exome capture resequencing 解析を行い、遺伝子変異を同定することにより、本症の遺伝学的な要因の解明を行う。

A. 研究目的

下部神経管閉鎖障害の分子遺伝学的な要因を解明すること。

B. 研究方法

下部神経管閉鎖障害患者および家族から採血し、それを研究代表者の教室に送付する。遺伝子解析により疾患関連遺伝子の候補SNVsを同定する

（倫理面への配慮）

本研究の目的・方法について説明し理解（インフォームドコンセント）が得られた場合のみ採血を行い、検体には名前は記入せず番号のみとし、プライバシーは厳重に守られる。なお当院の倫理委員会からの承認も得ている。

C. 研究結果

D. 考察

現時点では検体収集中であり、結果・考察を明記できる状況にはない。

E. 結論

現在まで4家族9名から同意を得て採血し検体を名古屋大学へ送付している。今後遺伝子解析による変異の同定を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

A Replication Study for Association of Five Single Nucleotide Polymorphisms with Curve Progression of Adolescent Idiopathic Scoliosis in Japanese. : Ogura Y, Takahashi Y, Kou I, Nakajima M, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, Minami S, Yanagida H, Taneichi H, Yonezawa I, Tsuji T, Suzuki T, Sudo H, Kotani T, Watanabe K, Chiba K, Toyama Y, Matsumoto M, Ikegawa S. Spine Oct 2. 2012.

2. 学会発表

脚長差と構築性側弯症を合併する病態に対する治療方針 第 23 回日本小児整形外科学会
平成 24 年 11 月 30 日、福岡

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし