

201419081A

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大野 欽司

平成27（2015）年5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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大野 欽司

平成27（2015）年5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. 下部神経管閉鎖障害の病態・制御研究	-----	7
	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. 感覚障害に伴う骨格系障害に関する研究	-----	10
	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. 二分脊椎の脊柱後弯症に関する研究	-----	12
	柳田晴久（福岡市立こども病院・整形・脊椎外科科長）		
	4. 下部神経管閉鎖障害患者の足部変形とその治療について	-----	13
	鬼頭浩史（名古屋大学医学部附属病院・整形外科准教授）		
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	15
IV.	研究成果の刊行物・別刷	-----	19

総括研究報告

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を起こす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 Eng 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), *VANGL2* (*New Engl J Med* 362: 2232, 2010), *FUZ* (*Hum Mol Genet* 2011), *CELSR1* (*PloS One* 2014) の遺伝子変異のみが報告されている。(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変異の病態分子機構の解明を行う。(iv) 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、(v) 脊髄運動神経細胞の軸索延長を増強する既認可薬の同定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・脊椎外科科長)
- 鬼頭浩史
(名古屋大学医学部附属病院・整形外科准教授)

A. 研究目的

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おこす。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が (*New Engl J Med* 350:101, 2004)、葉酸欠乏は本症の唯一の原因ではない。遺伝性症例も報告されているが、多くは孤発例である。我々はホメオボックス遺伝子 *Zeb1 Zeb2 (Sip1)* 欠損マウスが神経管閉鎖障害を起こすことを報告してきた (*Am J Hum Genet* 72: 465, 2003; *Dev Dyna* 235: 1941, 2006; *PLoS Genet* 7: e1002307, 2011; *Neuron* 73: 713, 2012; *Neuron* 77: 83, 2013; *Genesis* in press)。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), *VANGL2* (*New Engl J Med* 362: 2232, 2010), *FUZ* (*Hum Mol Genet* 2011), *CELSR1* (*PloS One* 2014) の遺伝子変異のみが報告されている。(i) 本研究では、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* 変異が関与する可能性を考え、患者会の協力を得て下部神経管閉鎖障害の網羅的なエキソームシーケンズ解析を行い、同定をした候補遺伝子のモデル細胞・モデル動物における分子作用機構の解明を行う。(ii) 我々が新規に同定をした脊髄運動神経細胞特異的に発現をする *RSPO2*、分子 X、分子 Y の運動神経細胞分化促進作用の分子機構を解明する。(iii) さらに、脊髄運動神経細胞の軸索延長を増強する薬剤を *drug repositioning* 法により同定をする。

B. 研究方法

(i) 血液 DNA から Agilent 社 SureSelect Human All Exon V4 を用いて exome capture resequencing (ECR) 解析を行う。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他疾患の ECR 解析で経験をしており (*Hum Genet* 2011; *J Neuro Sci* 315:15, 2012; *Hum Mutat* 34: 997, 2013; *Neurology* 82: 1058 2014; *Hum Mol Genet* 23: 1856, 2014; *PLoS One* 9: e96271, 2014; *Neuromuscular Disord* 25: 60-69, 2015)、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、

VNAGL1, *VANGL2*, *FUZ*, *CELSR1*, *ZEB1*, *ZEB2* に加えて、葉酸代謝に関与する31遺伝子、モデル動物において神経管閉鎖に関わる80遺伝子に絞り *de novo* 遺伝子変異解析を行った。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・NHLBI ESP 6500例・本邦 Human Genetic Variation Database (HGVD) を用いた。dbSNP137 から Mendelian disorders の原因遺伝子変異を除いても、dbSNP137 は多数の正常人の SNV データを含むために autosomal recessive disease を起こす disease-causing mutations が数多く含まれる可能性があるために、dbNSP137 によるフィルターリングは行わず、参考データベースとした。(ii) 脊髄運動神経細胞のレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法により同定をした *Rspo2*、分子 X、分子 Y のノックアウトマウス解析ならびに脊髄運動神経初代培養細胞を用いて、これら分子の運動神経細胞分化促進作用の分子機構の解明を行った。(iii) また1186種類の既認可薬パネルを分化誘導したマウス由来運動神経細胞 NSC34 細胞に付加し、neurite growth を Array Scan を用いて自動解析を行った。同定した薬剤の効果を mouse primary spinal motor neuron を用いて軸索延長を増強する効果の解析を行った。

(倫理面への配慮)

下部脊椎管閉鎖障害の臨床解析は、参加各施設の生命倫理委員会の承認を得た後に、「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)」に則り行った。

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、参加各施設長の承認を得て進めた。

C. 研究結果

(i) 9名の患者の exome capture resequencing 解析を行い、以下の遺伝子を候補として解析を行った: *VANGL1* 遺伝子(上述 *New Engl J Med* 2007); *VANGL2* 遺伝子(上述 *New Engl J Med* 2010); *FUZ* (上述 *Hum Mol Genet* 2011); *CELSR1* (上述 *PloS One* 2014); 申請者らが研究を行ってきたホメオボックス遺伝子 *Zeb1 Zeb2 (Sip1)* (上述5報); モデル動物において神経管閉鎖に関わる80遺伝子(上述

Nat Rev Genet 2003); 葉酸代謝に関与する 31 遺伝子(*PLoS One* 6: e28408, 2011); イノシトール代謝に関わる *ITPK1* 遺伝子(*ASHG Meeting* 2012, Abstract 2623T)。

その結果、一例において *VANGL1* 遺伝子に新規ヘテロ変異を同定した(未発表)。この変異は魚類まで遡り脊椎動物で保存をされたアミノ酸の置換であり、SIFT, LRT, Mutation Taster はこの変異の病原性を示唆している。遺伝子変異を有する *VANGL1* に導入し MDCK 細胞に発現をさせたところ遺伝子変異は *VANGL1* の細胞膜局在に影響を与えなかった。他の症例においては *CELSR1* 遺伝子(Robinson et al. *Hum Mut* 33: 440, 2012; Allache et al. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 94: 176, 2014), *DVL3* 遺伝子(De Marco et al. *J Mol Neurosci* 49:582, 2013), *DACT1*, *SNMT1*, *PRICKLE1* の候補遺伝子群に SNVs を同定した。*CELSR1* の機能解析を開始したが本研究期間には発表できる成果を得ることができなかった。

(ii) マウス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にて脊髄前角細胞特異的に発現をする *Rspo2*、分子 X、分子 Y を同定した。*Rspo2* は神経筋接合部形成を促進する agrin に次ぐ重要なタンパクであることを同定するとともに、*Rspo2*、分子 X、分子 Y はいずれも運動神経細胞の神経突起延長作用を有することを明らかにした。*Rspo2* は脊髄前角細胞の生存に影響を与えなかった。さらに *Rspo2* は Wnt modulator として神経筋接合部に作用し、神経筋接合部におけるアセチルコリン受容体のクラスター形成を促進することを明らかにした。*Rspo2* は筋終板に高発現する *Lgr5* を受容体とし、*Lgr5* は MuSK/LRP4 の複合体を形成し、*Rspo2* ligand の *Lgr5* receptor への結合により MuSK リン酸化を誘導し、アセチルコリン受容体のクラスターリングを促進することを明らかにした。

(iii) マウス NSC34 細胞ならびにマウス脊髄前角細胞プライリーカルチャーに対して抗てんかん薬・抗パーキンソン病薬 Zonisamide が濃度依存的に神経突起延長促進作用を有することを同定した。マウス脊髄前角細胞プライリーカルチャーを培養し neurite network を培養皿上に形成したのち、一定の幅で neurite network を削る scratch assay を行った。Zonisamide は濃度依存性に neurite elongation を促進した。また、細胞培養顕微鏡

(IncuCyte Zoom)を用いた連続観察でも Zonisamide はマウス脊髄前角細胞プライリーカルチャーの neurite elongation を促進した。さらに、Zonisamide は過酸化水素によるマウス脊髄前角細胞プライリーカルチャー毒性を軽減した。Zonisamide はマウス脊髄前角細胞プライリーカルチャーに対して、neurotrophins とその受容体群の発現を誘導した。マウス sciatic nerve 切断モデルによる検討では、Zonisamide 経口投与は神経切断部位下流の軸索変性を抑制し、軸索再生を促進することを明らかにした。

D. 考察

下部神経管閉鎖障害の exome capture resequencing 解析を行った 9 例中 6 例において 9 種類の候補遺伝子変異を同定した。8 種類は *VANGL1* 遺伝子を含む PCP パスウェイの遺伝子群であり、1 種類は葉酸代謝に関わる遺伝子であった。いずれも新規変異であり、変異分子の病原性をさらに解明する必要がある。

基盤的研究においては *Rspo2*、分子 X、分子 Y 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*、分子 X、分子 Y の発現を増強する薬剤の screening を drug repositioning strategy により同定を今後行う。さらに、Zonisamide のマウス脊髄前角細胞プライリーカルチャーならびに NSC34 細胞の neurite 延長促進作用を明らかにするとともに、末梢神経切断モデルにおける効果を明らかにした。

E. 結論

下部神経管閉鎖障害患児 9 例の exome capture resequencing 解析により *VANGL1* の新規ミスセンス変異を含む候補遺伝子変異群を同定した。さらに、*Rspo2*、分子 X、分子 Y が運動神経突起延長促進作用を有する脊髄運動神経に特異的に発現し、神経筋接合部のアセチルコリン受容体のクラスターリングを促進する新規分子であることを明らかにした。既認可薬として広く使われてきている抗てんかん薬・抗パーキンソン病薬 Zonisamide が、マウス NSC34 細胞ならびにマウス脊髄前角細胞プライリーカルチャーに対して濃度依存的に神経突起延長促進作用を有することを同定するとともにモデルマウスにおける効果を確認した。

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. Inaguma Y, Hamada N, Tabata H, Iwamoto I, Mizuno M, Nishimura YV, Ito H, Morishita R, Suzuki M, Ohno K, Kumagai T, Nagata KI. SIL1, a causative cochaperone gene of Marinesco-Sjogren syndrome, plays an essential role in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. *EMBO Mol Med* 2014, 6: 155 - 295.
2. Ohkawara B, Cabrera-Serrano M, Nakata T, Milone M, Asai N, Ito K, Ito M, Masuda A, Ito Y, Engel AG, Ohno K. LRP4 third beta-propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner. *Hum Mol Genet* 2014, 23: 1856-1868.
3. Nakayama T, Nakamura H, Oya Y, Kimura T, Imahuku I, Ohno K, Nishino I, Abe K, Matsuura T. Clinical and genetic analysis of the first known Asian family with myotonic dystrophy type 2. *J Hum Genet* 2014, 59: 129-133.
4. Kokunai Y*, Nakata T*, Furuta M*, Sakata S, Kimura H, Aiba T, Yoshinaga M, Osaki Y, Nakamori M, Itoh H, Sato T, Kubota T, Kadota K, Shindo K, Mochizuki H, Shimizu W, Horie M, Okamura Y, Ohno K, Takahashi M. A Kir3.4 mutation causes Andersen-Tawil syndrome by an inhibitory effect on Kir2.1. *Neurology* 2014, 82: 1058-1064. *Equal contribution.
5. Mano Y, Kotani T, Ito M, Nagai T, Ichinohashi Y, Yamada K, Ohno K, Kikkawa F, Toyokuni S. Maternal molecular hydrogen administration ameliorates rat fetal hippocampal damage caused by in utero ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2014, 69: 324-330.
6. Takamatsu A, Ohkawara B, Ito M, Masuda A, Sakai T, Ishiguro N, Ohno K. Verapamil protects against cartilage degradation in osteoarthritis by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling. *PLOS ONE* 2014, 9: e92699.
7. Kobayashi M, Ohno T, Ihara K, Murai A, Kumazawa M, Hoshino H, Iwanaga K, Iwai H, Hamana Y, Ito M, Ohno K, Horio F. Searching for genomic region of high-fat diet-induced type 2 diabetes in mouse chromosome 2 by analysis of congenic strains. *PLoS ONE* 2014, 9: e96271.
8. Yamashita Y*, Matsuura T*, Kurosaki T, Amakusa Y, Kinoshita M, Ibi T, Sahashi K, Ohno K. LDB3 splicing abnormalities are specific to skeletal muscles of patients with myotonic dystrophy type 1 and alter its PKC binding affinity. *Neurobiol Disord* 2014, 69: 200-205. *Equal contribution.
9. Asai N, Ohkawara B, Ito M, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. LRP4 induces extracellular matrix productions and facilitates chondrocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2014, 451: 302-307.
10. Nasrin F, Rahman MA, Masuda A, Ohe K, Takeda J, Ohno K. HnRNP C, YB-1 and hnRNP L coordinately enhance skipping of human MUSK exon 10 to generate a Wnt-insensitive MuSK isoform. *Sci Rep* 2014, 4: 6841.
11. Azuma Y, Nakata T, Tanaka M, Shen XM, Ito M, Iwata S, Okuno T, Nomura Y, Ando N, Ishigaki K, Ohkawara B, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Sokabe M, Ohno K. Congenital myasthenic syndrome in Japan: Ethnically unique mutations in muscle nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Neuromuscular Disorders* 2015, 25: 60-69.
12. Matsushita M, Hasegawa S, Kitoh H, Mori K, Ohkawara B, Yasoda A, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Meclozine promotes longitudinal

- skeletal growth in transgenic mice with achondroplasia carrying a gain-of-function mutation in the FGFR3 gene. *Endocrinology* 2015, 156: 548-554.
13. Funayama M, Ohe K, Amo T, Furuya N, Yamaguchi J, Saiki S, Li Y, Ogaki K, Ando M, Yoshino H, Tomiyama H, Nishioka K, Hasegawa K, Saiki H, Satake W, Mogushi K, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Toda T, Mizuno Y, Uchiyama Y, Ohno K, Hattori N. CHCHD2 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. *Lancet Neurol* 2015, 14: 274-282.
 14. Tsunoda M, Hirayama M, Tsuda T, Ohno K. Noninvasive monitoring of plasma l-dopa concentrations using sweat samples in Parkinson's disease. *Clin Chim Acta* 2015, 442: 52-55.
 15. Sobue S, Yamai K, Ito M, Ohno K, Iwamoto T, Qiao S, Ohkuwa T, Ichihara M. Simultaneous oral and inhalational intake of molecular hydrogen additively suppresses signaling pathways in rodents. *Mol Cell Biochem* 2015, 403: 231-241.
 16. Masuda A, Takeda J, Okuno T, Okamoto T, Ohkawara B, Ito M, Ishigaki S, Sobue G, Ohno K. Position-specific binding of FUS to nascent RNA regulates mRNA length. *Genes Dev* 2015, 29: 1045-1057.
 17. Selcen D, Ohkawara B, Shen X-M, McEvoy K, Ohno K, Engel AG. LRP4 myasthenia. Impaired Synaptic Development, Maintenance, and Neuromuscular Transmission in LRP4 Myasthenia. *JAMA Neurology*, in press
 18. Udagawa T, Fujioka Y, Tanaka M, Honda D, Yokoi S, Riku Y, Ibi D, Nagai T, Yamada K, Watanabe H, Katsuno M, Inada T, Ohno K, Sokabe M, Okado H, Ishigaki S, Sobue G. FUS regulates AMPA receptor function and FTL/ALS-associated behavior via GluA1 mRNA stabilization. *Nat Commun*, in press
 19. Fujii H, Matsubara K, Sakai K, Ito M, Ohno K, Ueda M, Yamamoto A. Dopaminergic differentiation of stem cells from Human deciduous teeth and their therapeutic benefits for parkinsonian rats. *Brain Res*, in press
 20. Iwata S, Ito M, Nakata T, Noguchi Y, Okuno T, Ohkawara B, Masuda A, Goto T, Adachi M, Osaka H, Nonaka R, Arikawa-Hirasawa E, Ohno K. A missense mutation in domain III in *HSPG2* in Schwartz-Jampel syndrome compromises secretion of perlecan into the extracellular space. *Neuromuscular Disorders*, in press
 21. Kishimoto Y, Kato T, Ito M, Azuma Y, Fukasawa Y, Ohno K, Kojima S. Molecular hydrogen ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats by modulating the STAT3/NFAT axis with anti-inflammatory and anti-oxidative effects. *J Thorac Cardiovasc Surg*, in press

(Review and Book Chapters)

1. Ohno K, Ohkawara B, Ito M, Engel AG. Molecular Genetics of Congenital Myasthenic Syndromes. *eLS*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, 2014, <http://www.els.net> [doi: 10.1002/9780470015902.a0024314]. (査読有)
2. Ohno K, Ito M, Kawakami Y, Ohtsuka K. Collagen Q is a key player for developing rational therapy for congenital myasthenia and for dissecting the mechanisms of anti-MuSK myasthenia gravis. *J Mol Neurosci* 2014, 53: 359-361. (査読有)
3. Noda M, Fujita K, Ohsawa I, Ito M, Ohno K. Multiple effects of molecular hydrogen and its distinct mechanism. *J Neurol Disord* 2014, 2: 6 (査読有)
4. Noda M, Ito M, Ohsawa I, Ohno K. Beneficial effects of hydrogen in the CNS and a new brain-stomach interaction. *Eur J Neurodegener Dis* 2014, 3: 25-34 (査読有)
5. Rahman MA, Nasrin F, Masuda A, Ohno K. Decoding abnormal splicing code in human diseases. *J Invest Genomics* 2015, 2(1): 00016 (査読有)

2. 学会発表

(Presentation, English)

1. Shibata A, Okuno T, Masuda A, Ohno K
P16.49-S - IntSplice: A tool to predict the effect on pre-mRNA splicing of intronic nucleotide substitutions
The European Society of Human Genetics 2014 (Poster), Milan, Lombardy, Italy
May 31-June 3, 2014
2. Ohno K
Maintenance of the neuromuscular junction and its aberrations in hereditary and autoimmune disorders
Guarda-Symposium 2014 on the Molecular and Cell Biology of the Neuromuscular System (Invited), Guarda, Switzerland
Sep 1, 2014
3. Ohno K, Shibata A, Okuno T, Rahman MA, Azuma Y, Masuda A
IntSplice: A tool to predict aberrant splicing of an SNV at intronic positions -50 to -3
64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Poster), San Diego, California, USA
Oct 18-22, 2014
4. Bruun GH, Doktor TK, Brøner S, Masuda A, Palhais B, Krainer AR, Ohno K, Andresen BS
Global identification of binding sites for the splicing regulatory factors SRSF5 and hnRNPA1
64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Poster), San Diego, California, USA
Oct 18-22, 2014
5. Rahman MA, Nasrin F, Masuda A, Ohe K, Takeda J, Ohno K
Alternative splicing of human MUSK exon 10 is physiologically regulated by multiple splicing regulatory cis-elements and cognate trans-factors
RNA Biology meeting, Cold Spring Harbor Asia Conference (Poster), Suzhou, China
Nov 10-14, 2014

H. 知的所有権の取得状況

なし

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

下部神経管閉鎖障害の病態・制御研究

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

マウスにおける神経管閉鎖は、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。SIP1 KOマウスを二分脊椎症のモデルマウスとして、その障害の分子機構の解明のための分子レベルでの解析を行った。平成26年度は、（1）ヒトにおいて二分脊椎症の原因遺伝子であることが明らかになっている *van gogh like 2 (Vangl2)* 遺伝子と SIP1 遺伝子との相互作用の検討。（2）SIP1 KO胚の神経板（あるいは管形成）における機能、特にその制御遺伝子に関して検討するために、野生型胚と KO胚を用いて、マイクロアレイ解析を行った。1）*Vangl2* 遺伝子との相互作用については、その自然突然変異体である *Loop tail* マウスと SIP1 KOマウスの二重ヘテロ変異マウスを作製し、それら遺伝子の遺伝的相互作用を検討した。その結果、両遺伝子に相互作用を観察することは出来なかった。2）SIP1 KO胚においては、膜タンパクが増減している傾向が見られた。特に *Gap-junction* に関連する細胞接着タンパク等が注目される。

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）

路（Planar Cell Polarity の経路）と何らかの相互作用をしているのかを検討する。（2）転写制御因子 SIP1 の神経管形成における機能を検討するために SIP1 が制御、標的としている細胞内因子を網羅的に探索し、検討する。

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、このような神経管閉鎖過程における SIP1 の機能を解明するための手がかりとして、（1）ヒトにおいて二分脊椎症の原因遺伝子の一つであることが明らかになっている *van gogh like 1, 2 (Vangl1,2)* 遺伝子と SIP1 遺伝子との相互作用、即ち転写制御因子である SIP1 が *Vangl2* タンパクの関与するシグナル経

B. 研究方法

（1）については、SIP1 KO ヘテロマウス（オス）と *Loop-tail (Vangl2 遺伝子)* ヘテロ変異マウス（メス）を交配し、その胎児（10日胚、14日胚）や産仔（3週齢）の遺伝子型を決定する。その中で、両遺伝子のヘテロ変異を同時に有する胎児および産仔について、神経管や脊髄の形成に関し、何らかの障害が観察されるか検討する。（2）については、SIP1 KOヘテロ変異同士の交配により、ホモ変異胚の胎仔を採取する。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、その対照群としてヘテロ変異胚は含まない野生型の胚を用いた。またこの際、SIP1 遺伝子と相同遺伝子であり、DNA 結合配列も同じである転写制御因子 δ EF1 についても、当グループではその KOマウスを作製しており、 δ EF1 KO胚も用いることとした。SIP1 の標的遺伝子は δ EF1 の標的遺伝子で

もある可能性は高いことから、SIP1 遺伝子の標的遺伝子やその機能を考える際に、重要な情報となると考えた。各々 SIP1 KO 胚は 20 匹、 δ EF1 KO 胚は 20 匹、野生型胚は 25 匹の胚を用い、total RNA (それぞれ、11 μ g、40 μ g、16 μ g の収量であった) を調整した。その RNA を用いて、Affymetrix 社 GeneChip を用いて、DNA マイクロアレイの解析を行い、これらの胚において全ゲノム遺伝子について、その発現量を網羅的に解析した。

(倫理面への配慮)

本研究においては患者サンプルならびに患者情報を扱わなかった。組み換え DNA 実験と動物実験は愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所の承認を得たのちに、カルタヘナ法、ならびに、愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所の動物実験指針を遵守して動物実験を行った。

C. 研究結果

① SIP1 と Vangl2 の遺伝的相互作用について

我々はすでに神経管閉鎖過程にある胎生 8 日目の SIP1 KO 胚では、Par3 などの apical 側に局在すべき分子の局在が明確でなく、また、神経板の apical 側に沿って形成されるべき索状の pMLC が、形成不全で寸断化していることが明らかにしている (昨年度、本研究課題報告書)。一方、Vangl2 遺伝子も細胞極性に関与することが知られていること、SIP1 と Vangl2 両遺伝子はホモ変異で神経管閉鎖が起こらないこと等を考慮し、両遺伝子が何らかの形で相互作用している可能性は高いと推察された。そこで遺伝的相互作用を、両遺伝子の二重ヘテロ変異マウスを作製しその表現型を見ることで検討した。例えば、両遺伝子ともヘテロ変異では神経管閉鎖障害が起こらないが、二重ヘテロ変異にすると閉鎖不全が見られた場合、両遺伝子はこの神経管閉鎖過程で何らかの形で遺伝的相互作用をしていることになる。

検討の結果、9.5 日、14.5 日、16.5 日胚、および生後 3 週齢の産仔について、二重ヘテロ変異マウスにおいてそれらの表現型がさらに厳しくなる、あるいは、あらたな表現型が生じることはなかった。生後 3 週齢を越えて以降も、二重ヘテロ変異マウスは各ヘテロ変異マウスと同じように成長し、生存した。この結果より両遺伝子の間での遺伝的相互作用は、少なくとも生存率や体表からの形態のレベルでは観察されなかった。

② SIP1 KO 胚、 δ EF1 KO 胚を用いたマイクロアレイ解析について

遺伝子名	変化量 (対野生型)		備考
	SIP1	δ EF1	
	-	-	
Amnionless	2.5	1.7	SIP1-/-で増加。Vicerol endoderm で発現。ホモ変異体では羊膜が形成されず、胚性致死
Cathepsin H	2.0	-	リソソームに存在する蛋白分解酵素
Cbx3	-	0.6	SIP1-/-、 δ EF1-/-で共に増加。染色体ヘテロクロマチン化に関与
<u>Claudin-6</u>	2.1	-	密着結合構成因子
<u>Connexin 43</u>	0.6	-	ギャップ結合構成因子。6 量体でコネクソン形成
Crabp1	0.5	-	Cellular retinoic acid binding protein 1
Cubilin	1.9	1.4	SIP1-/-で増加。Cobalamin リセプター
Cyclin D2	0.5	0.7	SIP1-/-で減少。細胞周期 G1 チェックポイントに関与。TGF- β シグナルにより発現低下
<u>Desmoglein 2</u>	1.7	-	接着結合デスモソーム構成因子カドヘリン
Disabled 2	-	1.4	Disabled homolog (Drosophila)
Folbp1	0.9	-	Folate リセプター。神経管形成に影響
<u>N-Cadherin</u>	0.6	-	接着結合構成因子。神経管、体節等で発現
Necdin	0.5	-	Post mitotic 神経増殖因子
Sox2	0.6	-	初期の神経系で重要な機能を持つと考えられる
Tssc3	2.5	-	Tumor-suppressing subchromosomal transferable fragment 32

表 1 SIP1 -/-、 δ EF1 -/-において増減を示した遺伝子マイクロアレイの解析の結果、ホモ変異胚と野生型胚で発現量が異なる遺伝子が多数見つかった。ホモ変異胚の表現形の程度を反映してか、 δ EF1 よりも SIP1 の方が大きく変化した遺伝子が多いように思われる。結果の一部を (表 1) に示す。SIP1-/-、 δ EF1-/-胚で逆の増減変化を示す遺伝子もあった。

いくつかの Prolactin ファミリー遺伝子 (Proliferin、Placental lactogen I、Prolactin like protein A、E) が SIP1-/-胚では増加し、そのうち Proliferin は δ EF1-/-胚で減少していた。これらの結果は現在 Real-time PCR 等を用いて確認中であるため、表 1 には掲載していない。また SIP1-/-胚と δ EF1-/-で共に増加あるいは共に減少している遺伝子も見られた。Cyclin D2、decidual/trophoblast prolactin related protein は両変異胚で減少し、Amnionless、Cubilin は増加していた。

D. 考察

①の結果から、SIP1 遺伝子と、ヒトで二分脊椎症の原因遺伝子として明らかになっている Vangl2 遺伝子との明らかな遺伝的相互作用は示されなかった。このことは神経管閉鎖過程における SIP1 の働きが Vangl2 の機能とは別の経路で働いている可能性を示唆している。即ち SIP1 の機能を明らかにすることは、神経管閉鎖過程の分子機構に新たな視点を与えるものと期待される。

②のマイクロアレイの解析の結果において興味深いのは、表中の下線を引いた分子は gap junction 等の細胞接着に関わるタンパクであり、その他にも Amnionless や Cubilin の膜タンパクがある。これらのことは、これまで我々が観察してきた神経板細胞の極性の問題や、神経管が閉鎖する際の両側の神経褶細胞の接着性に影響を与えることが想像される。今後はこれらの遺伝子について、まず SIP1 KO 胚と野生型胚において in situ hybridization を行い、マイクロアレイの解析の結果が実際に閉鎖過程で再現されるのかを明らかにする。またこれらの遺伝子を直接制御しているのかどうかという点に関しても、それらの制御領域に SIP1 の結合配列が存在するかどうかの検討を行う。

E. 結論

①SIP1 は Vangl2 遺伝子同様に、そのホモ変異体で神経管閉鎖障害を呈するが、その分子機構は Vangl2 が介する Planar cell polarity のシグナル経路とは異なる分子機構によるものであることが示唆された。

②SIP1 が神経管形成時期に制御する候補タンパクは細胞接着に関与するものがある。これらが実際

に SIP1 の標的遺伝子として機能しているのかどうか明らかにする必要がある。

本年度の研究により、これまで解明されていなかった神経管閉鎖の分子機構と SIP1 との関係が明らかになってきた。これまで知られていない二分脊椎症の発症原因の特定につながる成果が得られたと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamaguchi, S., Machida, J., Kamamoto, M., Kimura, M., Shibata, A., Tatematsu, T., Miyachi, H., Higashi, Y., Jezewski, P., Nakayama, A., Shimozato, K. and Tokita, Y. Characterization of novel MSX1 mutations identified in Japanese patients with nonsyndromic tooth agenesis.

PLoS One. 2014 Aug 7;9(8):e102944.

2. 学会発表

Hila Milo Rasouly, Stefanie Chan, Anna Pisarek-Horowitz, Yuriko Nishizaki, Yujiro Higashi, Weining Lu : Loss of *Zeb2* Causes Glomerulocystic Kidney Disease in Mice. Annual meeting of the American Society of Nephrology: Kidney Week 2014. 2014.11.13-16, (Philadelphia, PA)

Akio Shibata, Junichiro Machida, Seishi Yamaguchi, Masashi Kimura, Tadashi Tatematsu, Hitoshi Miyachi, Yujiro Higashi, Atsuo Nakayama, Kazuo Shimozato, Yoshihito Tokita. Novel mutation in RUNX2/CBF α 1 with alanine tract expansion from Japanese cleidocranial dysplasia patient. Society of Human Genetics Meeting. 2014.10.22-26. (San Diego, USA)

Yamaguchi, S, Machida, J, Kamamoto, M, Kimura, M, Shibata, A, Tatematsu, T, Miyachi, H, Higashi, Y, Jezewski, PA, Nakayama, A, Shimozato, K, Tokita, Y. (Aichi Gakuin Univ, Univ of Alabama) Novel MSX1 Mutations in Japanese Tooth Agenesis Patients. American Society of Human Genetics Meeting. 2013.10.22-26. (Boston, USA)

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

分担研究報告書

感覚障害に伴う骨格系障害に関する研究

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

二分脊椎における感覚障害から生じる骨格系障害の予防法確立を目的に、同様に感覚障害を示す先天性無痛無汗症の骨格系障害について、自験例と日本語での報告例をまとめた。障害のほとんどは下肢に生じ、骨折は1～7歳が多かったが、脱臼、骨髄炎、Charcot 関節の発症は年齢と関係がなかった。明らかな外傷性が無かったり、転落など軽微な外傷性により骨折や脱臼を生じていた。

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。感覚障害は骨折や 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。そこでわれわれは感覚障害単独が歩行に及ぼす影響を知ることがを目的に、運動麻痺がなく感覚の障害を示す先天性無痛無汗症（遺伝性感覚自律神経ニューロパチーIV型）の患者を対象として、骨格系障害の特徴を知ることがを目的に、本研究を行った。

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を受診した14名を対象とした（自験群）。また、医学中央雑誌の検索で入手した76の症例報告に含まれる77名のデータを分析した（文献群）。調査項目は、性別、年齢、知的障害の有無、骨格系合併症（骨折、脱臼、感染、Charcot 関節）の詳細（発症時年齢、部位、主徴、原因、治療）である。

（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行った。

C. 研究結果

自験群と文献群に、性別、知的障害の有無について差がなかった。文献群の年齢（中央値11歳）は自験群（同14歳）より小さかった。

骨折は全部で116回あり、うち105回（91%）は下肢に生じており、特に下腿以下が多かった。骨折は1～7歳が多かった。骨折の明らかな原因を記載しているものは少なく、記載してあっても軽

微な外傷性が多かった。手術が行われたのは13回（11%）と少なかった。

脱臼は全部で33関節に生じていた。このうち30（91%）は股関節脱臼であった。発症年齢に特徴はなく、脱臼の明らかな原因を記載しているものは少なかった。手術が行われたのは3関節（9%）であった。

感染は全部で39回あり、うち24回が骨髄炎、15回が関節炎であった。24回（62%）は下肢に生じていた。発症年齢に特徴はなく、手術が行われたのは17回（44%）であった。

Charcot 関節は52関節に生じ、うち45関節（87%）は下肢であった。手術が行われたのは4関節（8%）であった。

D. 考察

先天性無痛無汗症では、無痛による防御反応の低下のみならず、知的障害の合併もあり下肢の外傷が多いとされている。一方二分脊椎でも、特に高位麻痺において運動麻痺による骨萎縮から骨折を生じたり、低位麻痺であっても感覚障害のために防御反応が低下し疲労骨折を含む外傷を生じることがある。このように、多少機序は異なる可能性はあるが、「感覚障害に伴う防御反応の低下」という観点で、先天性無痛無汗症の骨格系障害について調査した。

本研究の結果、先天性無痛無汗症に伴う骨格系障害は下肢に多く、通常で外傷を生じる様な明らかな機序が無く外傷を生じることが多いこと、骨折は乳幼児期に多いことが分かった。われわれの過去の研究結果では、先天性無痛症の特に幼児は、

歩行時に踵接地時の速度が速く、また踵接地後の heel rocker も速いことが示唆されている。特に乳幼児で歩行時の衝撃が大きいことにより、下肢に外傷を生じ、これが Charcot 関節につながっている可能性がある。二分脊椎でも下肢に麻痺のある患者の約 20%に病的骨折を合併するとの報告もあり、先天性無痛無汗症における研究が、二分脊椎の下肢障害に対する予防と治療に役立つ可能性がある。

E. 結論

先天性無痛無汗症では、骨格系障害のほとんどは下肢に生じ、明らかな外傷性が無かったり、転落など軽微な外傷性により骨折や脱臼を生じていた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Zhang Y, Haga N: Skeletal complications in congenital insensitivity to pain with anhidrosis: a case series of 14 patients and review of articles published in Japanese. J Orthop Sci 19: 827-831, 2014

2) 芳賀信彦: 二分脊椎患児の理学療法. 脊髄外科 28: 128-133, 2014

3) 芳賀信彦: 後天性脊髄損傷. Monthly Book Medical Rehabilitation 175: 11-14, 2014

4) 四津有人、芳賀信彦、太田順: 小児科 - 発達の見方とリハビリテーション. J Clin Rehabil 23: 902-906, 2014

2. 学会発表

1) 戸島美智生、中原康雄、井口はるひ、石川雄己、雲野康紀、緒方直史、芳賀信彦: 三次元動作解析法を用いた両脚用ロボットスーツ着用時の起立動作解析. 第 51 回日本リハビリテーション医学会学術集会, 2014.6.5-7, 名古屋

2) 四津有人、芳賀信彦、中原康雄、緒方直史: 腰下肢痛に対し脊髄刺激を行った症例の歩行分析. 第 51 回日本リハビリテーション医学会学術集会, 2014.6.5-7, 名古屋

3) Okada K, Tanaka S, Takikawa K, Haga N: Our experience with cloacal exstrophy: a novel method for post-operative fixation. 25th Annual Meeting of the Japanese Paediatric Orthopedic Association, 2014.11.27-28, 千葉

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

二分脊椎の脊柱後弯症に関する研究

研究分担者 柳田 晴久（福岡市立こども病院・整形・脊椎外科科長）

研究要旨

二分脊椎のうち脊髄髄膜瘤などの顕在性二分脊椎では脊柱後弯症を合併することが稀でない。後弯症は座位の不安定、腹部臓器圧迫による摂食障害、呼吸機能障害、難治性褥瘡形成などの問題につながる。後弯症に対する手術は座位の安定、消化管機能、呼吸機能などの面で二分脊椎患者がうける QOL 上の改善は大きかった。

A. 研究目的

二分脊椎の脊柱後弯症に対して手術を行った症例の経過を調査し、本手術の意義を考察する。

B. 研究方法

当院で手術を行った 18 例の症例について単純レ線における後弯の改善度、呼吸機能評価、摂食障害や嘔吐などの消化管症状の経過、褥瘡、その他 ADL 上の改善について聞き取り調査を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は福岡市立こども病院倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

症例は 18 例で、手術時年齢は平均 3.8 才であった。術後経過観察期間は平均 10 年であった。後弯角は術前平均 127° が術後平均 36° と改善し、最終経過観察時に 47° となっていた。合併症として皮膚壊死が 6 例、深部感染が 3 例、implant failure が 3 例にみられ、後弯の再発のため再手術を要した例が 4 例であった。全例で最終経過観察時には座位バランスの改善が得られ、座位で両手を使いやすくなった症例が多かった。呼吸機能は幼児期手術のため客観的データに乏しいが、座位で息が荒くなっていたのが消失するなど、臨床的満足度は高かった。このほかにも褥瘡の根治や仰臥位で寝れるようになった QOL の改善に大きく寄与していることが確認できた。

D. 考察

二分脊椎のうち脊柱後弯を生じる患者群では両下肢麻痺を生じており座位での生活が中心となるため座位の安定は非常に重要となる。幼児期に行う手術では切除椎体数や固定範囲を最小限に留められ後弯の矯正が可能であった。座位の安定だけでなく、消化管機能、呼吸機能などの面で二分脊椎患者がうける QOL 上の改善は大きかった。

E. 結論

本手術により座位の安定、消化管機能、呼吸機能などの面で二分脊椎患者がうける QOL 上の改善は大きかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

症候性側弯症

柳田晴久

小児科診療 診断と治療社 Vol.78 No.4, 529-535, 2015

2. 学会発表

二分脊椎

第 12 回日本側弯症学会研修セミナー
平成 26 年 6 月 14 日、福岡

神経筋原性側弯症に対する手術治療の実際
第 2 回神経・筋疾患による脊柱変形に関する研究会

平成 26 年 8 月 30 日、大阪

小児脊柱変形の診断と治療

佐賀県臨床整形外科医会学術講演会
平成 26 年 9 月 26 日、佐賀

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

下部神経管閉鎖障害患者の足部変形とその治療について

研究分担者 鬼頭 浩史（名古屋大学医学部附属病院・整形外科准教授）

研究要旨

名古屋大学附属病院において手術加療した下部神経管閉鎖障害患者の足部変形を調査し、術後成績を検討した。5例8足が内反尖足変形を呈し、腱延長、腱移行、骨性手術、関節解離などさまざまな手術が施行され、変形は矯正され、足部機能は改善した。

A. 研究目的

下部神経管閉鎖障害は下肢の運動・知覚障害、膀胱直腸障害などを引き起こし、患者の移動能力や日常生活動作を著しく低下させる。また、下肢筋力のアンバランスによりしばしば内反尖足などの足部変形を引き起こし、患者の歩行能力を著しく低下させる。足底接地ができないような足部変形に対しては、各種の保存的、手術的治療が考慮される。本研究では、手術を要した下部神経管閉鎖障害患者の足部変形の詳細につき調査し、術後機能について検討する。

B. 研究方法

名古屋大学附属病院で医学的管理を受けている下部神経管閉鎖障害患者のうち、2010年以降に足部変形に対して手術的治療を受けた5例（8足）を対象とした。男2例、女3例、手術時年齢は4ヶ月～17歳であった。足部変形の種類、手術内容、術後の歩行機能および胼胝形成の有無につき調査した。

（倫理面への配慮）

患者情報は厳格に管理され、プライバシーが守られるように十分に配慮する。

C. 研究結果

5例8足すべて手術側は麻痺性内反尖足変形を呈していた。片側例の健側は1例で外反扁平足を、1例で内反尖足を示した。手術はアキレス腱および後脛骨筋延長などを含む後内側解離術を5足に、後脛骨筋移行やエバンス手術を1足に、アキレス腱切腱術を2足に施行した。術前は全例、plantigrade不能で、足部外側に胼胝を形成していた。術前の歩行能力は独歩が2例、杖歩行が2例、歩行不能が1例であった。術後は全例、plantigrade可能となり、胼胝の消失を4例で認めた。歩行能力に関しては、術前後で変わりはなかった。片側例の1例では、健側の内反尖足変形が増悪し、手術が予定されている。

D. 考察

今回の調査ではすべて内反尖足変形を認めた。麻痺レベルにより、足関節背屈筋の筋力低下、底屈筋の相対的過緊張により内反方向に変形するものと思われる。変形矯正手術方法としては、緊張した底屈筋の延長、底屈筋を背屈筋として作用するように腱移行、関節解離などがあるが、いずれの手術法でも変形矯正は可能で、術後の機能向上が認められた。しかし、長期予後に関しては今後のフォローを待たなければならない。

E. 結論

下部神経管閉鎖障害では内反尖足変形を呈することが多い。腱延長、腱移行、関節解離などの手術的加療により変形矯正は可能であり、歩容の改善や胼胝の消失を認めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hoover-Fong J, Sobreira N, Jurgens J, Modaff P, Blout C, Moser A, Kim OH, Cho TJ, Cho SY, Kim SJ, Jin DK, Kitoh H, Park WY, Ling H, Hetrick KN, Doheny KF, Valle D, Pauli RM. Mutations in PCYT1A, encoding a key regulator of phosphatidylcholine metabolism, cause spondylometaphyseal dysplasia with cone-rod dystrophy. *Am J Hum Genet* 94:105-112, 2014
2. Matsushita M, Kitoh H, Kaneko H, Mishima K, Itoh Y, Tokita Y, Ishiguro N. A novel in-frame deletion of the *RUNX2* gene causes a classic form of cleidocranial dysplasia. *J Bone Miner Metab* 32:96-99, 2014

3. Matsushita M, Kitoh H, Michigami T, Tachikawa K, Kaneko H, Mishima K, Ishiguro N. Benign prenatal hypophosphatasia: a treatable disease not to be missed. *Ped Radiol* 44:340-343, 2014
 4. Okabe YT, Kondo T, Mishima K, Hayase Y, Kato K, Mizuno M, Ishiguro N, Kitoh H. Biodistribution of locally or systemically transplanted osteoblast-like cells. *Bone Joint Res* 3:76-81, 2014
 5. Mishima K, Kitoh H, Haga N, Nakashima Y, Kamizono J, Katagiri T, Susami T, Matsushita M, Ishiguro N. Radiographic characteristics of the hand and cervical spine in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Intractable Rare Dis Res* 3:46-51, 2014
 6. Matsushita M, Kitoh H, Mishima K, Nishida Y, Ishiguro N. A case of severe proximal focal femoral deficiency with overlapping phenotypes of Al-Awadi-Raas-Rothschild syndrome and Fuhrmann syndrome. *Ped Radiol* 44:1617-1619, 2014
 7. Kitoh H, Kaneko H, Mishima K, Matsushita M, Kadono I, Nishida Y, Ishiguro N. Early and late fracture following extensive limb lengthening in achondroplasia and hypochondroplasia. *Bone Joint J* 96-B:1269-1273, 2014
 8. Kaneko H, Kitoh H, Mishima K, Matsushita M, Izumi K, Naoki Ishiguro, Hattori T. Factors associated with an unfavourable outcome after Salter innominate osteotomy in patients with unilateral developmental dysplasia of the hip: Does occult dysplasia of the contralateral hip affect the outcome? *Bone Joint J* 96-B:1419-1423, 2014
 9. Matsushita M, Kitoh H, Subasioglu A, Colak FK, Dundar M, Mishima K, Nishida Y, Ishiguro N. A glutamine repeat variant of the RUNX2 gene causes cleidocranial dysplasia. *Mol Syndromol* 6:50-53, 2015
 10. Olney RC, Prickett TCR, Espiner EA, Mackenzie WG, Duker A, Ditro C, Zabel B, Hasegawa T, Kitoh H, Aylsworth AS, Bober MB. C-type natriuretic peptide (CNP) plasma levels are elevated in subjects with achondroplasia, hypochondroplasia, and thanatophoric dysplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 100:E355-359, 2015
 11. Matsushita M, Hasegawa S, Kitoh H, Mori K, Ohkawara B, Yasoda A, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Meclozine promotes longitudinal skeletal growth in transgenic mice with achondroplasia carrying a gain-of-function mutation in the FGFR3 gene. *Endocrinology* 156:548-554, 2015
- ## 2. 学会発表
1. 鬼頭浩史、三島健一、松下雅樹、杉浦洋、石黒直樹. 軟骨無(低)形成症に対する培養骨髄細胞移植を併用した骨延長術. 第27回日本創外固定骨延長学会 2014. 3. 7-8 (大阪)
 2. Hiroshi Kitoh, Hiroshi Kaneko, Kenichi Mishima, Masaki Matsushita, Naoki Ishiguro. Early and late fracture following lower limb lengthening. Annual meeting of Pediatric Orthopedic Society of North America 2014.4.30-5.3 (Los Angeles)
 3. 鬼頭浩史、三島健一、松下雅樹、杉浦洋、石黒直樹. 骨髄幹細胞を用いた骨延長術. 第87回日本整形外科学会 2014. 5. 22-25 (神戸)
 4. 鬼頭浩史、三島健一、松下雅樹、杉浦洋、石黒直樹. 培養骨髄細胞と PRP の移植を併用した骨延長術. 第87回日本整形外科学会 2014. 5. 22-25 (神戸)
 5. 鬼頭浩史、金子浩史、三島健一、松下雅樹、西田佳弘、石黒直樹. 下肢骨延長後の骨折に関連する因子. 第87回日本整形外科学会 2014. 5. 22-25 (神戸)
 6. 鬼頭浩史、三島健一、松下雅樹、杉浦洋、長谷川幸、北村暁子、石黒直樹. 先天性股関節脱臼に対する選択的リーメンビューゲル法による短期治療成績 第25回日本小児整形外科学会 2014. 11. 27-28 (千葉)
- ## G. 知的財産権の出願・登録状況
- なし

研究成果の刊行に関する一覧表