

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462218

研究課題名(和文)先天性正常圧水頭症の原因遺伝子の探索と水頭症の発現機序の解明

研究課題名(英文)Genetic studies of congenital normal pressure hydrocephalus

研究代表者

宮嶋 雅一 (MIYAJIMA, MASAKAZU)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：60200177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果の概要：正常圧水頭症の臨床的特徴を示し、全脳室拡大、Magendie孔開大と大槽拡大の形態的特徴を有する水頭症を新たな病態PaVMとして提唱した。この病態の病因となる遺伝子変異を同定し、水頭症の発症機序を分子レベルで解明した。家族性PaVMと正常例を対象として、コピー数多型解析を行った。PaVMにのみ認められるコピー数欠失を1家系に1カ所同定した。この部位は1q42,12の位置で、軸系ダイニン重鎖タンパク(DNAH14)をコードしている。DNAH14がコードする蛋白は線毛に存在するダイニン内腕を構成する蛋白であり、線毛の機能障害がこの水頭症の原因として推定される。

研究成果の概要(英文)：The authors' s goal in this study is to provide the first clinical, radiological and genetic studies of panventriculomegaly with a wide foramen of Magendie and large cisterna magna (PaVM) defined by a wide foramen of Magendie and large cisterna magna. Adult patients showed gait disturbance, urinary dysfunction, and cognitive dysfunction. Five infant patients exhibited macrocranium. Genetic analysis revealed a deletion in DNAH14 that encodes a dynein heavy chain protein associated with motile cilia function. Immunohistochemistry localized DNAH14 specifically to choroid plexus epithelial cells and ependymal cells. Panventriculomegaly with a wide foramen of Magendie and a large cisterna magna may belong to a subtype of congenital hydrocephalus with familial accumulation, younger age at onset, and symptoms of normal pressure hydrocephalus. In addition, a family with PaVM has a gene mutation associated with dysfunction of motile cilia.

研究分野：医学

キーワード：正常圧水頭症 家族性 線毛

## 1. 研究開始当初の背景

正常圧水頭症は、認知障害、起立歩行障害、尿失禁を来し、高齢者の QOL を阻害し、寝たきり状態を招き、ひいては家族負担と医療費を増大させる為に、高齢化社会を迎えたわが国においては大きな問題となる。従って本研究を進める事により、本症の早期診断、早期治療法を確立する事が、疾病の予防という観点から喫緊の課題といえる。本邦のガイドラインによると正常圧水頭症は、原因の不明な特発性正常圧水頭症 (iNPH) とくも膜下出血や髄膜炎などの先行する疾患が明らかな二次性水頭症に分類される。先天性正常圧水頭症は、先行する疾患が明らかではないが、生下時には水頭症が存在し、症状が遅発的に出現するため、二次性正常圧水頭症に分類されている。先天性正常圧水頭症は、水頭症の進行は緩徐である為、新生児・乳児期には頭囲の拡大、学童期・青年期には頭痛のみを呈することが多い。しかし加齢とともに歩行障害、認知症、排尿障害などの正常圧水頭症の症状を認める様になる。正確な発生頻度は不明であるが、正常圧水頭症の中で、約 5% 程度であると予想される。先天性正常圧水頭症には、long-standing over ventriculomegaly (LOVA)、中脳水道狭窄症や Blake's pouch cyst などが報告されているが、原因となる遺伝子が同定されている先天性正常圧水頭症の報告はない。遺伝子異常が明らかにされている X 連鎖性遺伝性水頭症は、L1CAM 遺伝子の異常で、中脳水道狭窄を生じるが、小児期より重篤な精神運動発達障害を認め、正常圧水頭症の臨床症状を示すことはない。我々はここに全脳室拡大、大槽拡大と Magendie 孔開大を特徴とする、新規の正常圧水頭症 (panventriculomegaly with a wide foramen of Magendie and large cisterna magna (PaVM)) を提唱する。当施設において、過去 5 年間に家族性と孤発例を併せて、28 例の正常圧水頭症 (PaVM) を治療・経過観察している。

## 2. 研究の目的

先天性正常圧水頭症 (PaVM) の臨床的特徴を明らかにし、PaVM の病因遺伝子を同定し、水頭症の発症機序を分子レベルで解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 正常圧水頭症 (PaVM) の定義と対象

正常圧水頭症 (PaVM) の定義は、頭部 MRI にて、全脳室拡大、中脳水道開存、大槽拡大と Magendie 孔開大である。(図) 2009 年 1 月から 2013 年 10 月順天堂医院にて治療された 28 例 (男性 16 例、女性 12 例) の正常圧水頭症 (PaVM) を対象とした。発症年齢は平均  $56.0 \pm 16.7$  歳で、28 例中 5 家系 10 例が家族性であった。



(図) PaVM の MRI 画像

### (2) 正常圧水頭症 (PaVM) の臨床的特徴

カルテの記載と神経放射線画像を後方視的に調査した。調査項目は、発症年齢、性別、正常圧水頭症の 3 症候 (歩行障害、認知障害、排尿障害) と手術方法 (脳室腹腔シャント術、腰部くも膜下腔腹腔シャント術、内視鏡的第三脳室底開窓術) である。頭部 MRI 画像は脳室・脳槽内の観察に適した MR 脳槽撮影 (3D-FASE) と造影剤を用いることなく髄液の動きを可視化した time-spatial labeling inversion pulse (time slip) を撮影した。

### (3) DNA アレイによるコピー数多型解析

5 家系の家族性正常圧水頭症 (PaVM) 及び孤発性正常圧水頭症 (PaVM) およびその家族の

血液または唾液より DNA を抽出した。DNA アレイによりコピー数多型解析を行い、得られたデータをコンピューター解析ソフトにて分析した。各家系に共通のコピー数欠失の中で、普通に見られる変異としてデータベースに登録されていないコピー数欠失を同定した。

(4) 定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) によるコピー数多型解析

DNA アレイにて同定された遺伝子のコピー数を qPCR 法にて定量した。

(5) Deletion Breakpoint PCR によるコピー数欠失の検証

コピー数多型解析にて同定された遺伝子の欠失部位を挟むような PCR プライマーを作成し、PCR により得られた産物の遺伝子配列を決定した。

(6) 脳組織での発現

得られた遺伝子がコードするタンパクの特異抗体を用いて、ヒト剖検脳の免疫蛍光二重組織染色を行なった。

#### 4. 研究成果

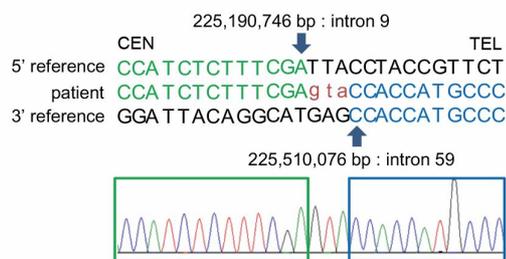
(1) 正常圧水頭症 (PaVM) の臨床的特徴

正常圧水頭症 (PaVM) の最も頻度の高い症状は歩行障害 (57%) で、尿失禁 (39%) と認知機能障害 (30%) も高頻度に認められた。脳室の大きさの指標となる Evans' index は平均  $0.38 \pm 0.06$  (0.3 以上が脳室拡大) で、全ての症例に脳室拡大を認めたが、特発性正常圧水頭症 (iNPH) に特徴的に認められる高位円蓋部脳溝の狭小化は認めなかった。Time slip 法により中脳水道及び Magendie 孔での髄液の動きが観察された。第 3 脳室底の形状より正常圧水頭症 (PaVM) を 2 つのグループに分類した。即ち、第 3 脳室底の下方変位を認める群と認めない群である。17 例で第 3 脳室底の下方変位を認め、この群の全症例に橋前槽に膜様組織を認め、Time slip 法で橋前槽での髄液の動きが消失していた。一方、第 3 脳室底

の下方変位を認めない群では、Time slip 法で橋前槽の髄液の良好な動きを認めた。第 3 脳室底の下方変位を認める群では、内視鏡の大 3 脳室底開窓術を、認めない群では、髄液シャント術を行ない、両者ともに臨床症状の改善を認めた。正常圧水頭症 (PaVM) は特異な臨床的特徴を示している。この病態は正常圧水頭症の臨床症状 (歩行障害、認知障害、排尿障害) を示すが、特発性正常圧水頭症 (iNPH: disproportionately enlarged subarachnoid space hydrocephalus (DESH)) とは発症年齢と家族性の割合が高いことが異なっている。この病態の発症年齢は平均 56 歳であるが、特発性正常圧水頭症 (iNPH) の平均年齢は 75 歳と報告されている。この病態は、MRI 画像所見では Blake' s pouch cyst と似ているが、第 4 脳室の拡大が軽度なことと第 4 脳室と脳槽に交通があることが異なる。

(2) 正常圧水頭症 (PaVM) の遺伝子解析

DNA アレイによる探索で、1 家系において、水頭症罹患患者 2 名のみ認められるコピー数多型異常を同定した (コピー数=1, 第 1 染色体短腕 1q42.12, 322kbp のヘテロ欠損)。この異常は DNAH14 遺伝子上に認められ、qPCR で再評価したが、水頭症罹患患者 3 名のみコピー数 = 1 と評価された。家系内非罹患患者、孤発群、健常者についてはコピー数=2 となった。PCR 産物の遺伝子配列は 319,330bp (染色体 1 : 225,190,746-225,510,076bp) の欠失を認めた。この欠失はデータベースへ登録されてはならず、DNAH14 遺伝子のエクソンにあたる。



DNAH14 と  $\alpha$ -tubulin の蛍光 2 重染色では、

脳実質と髄液の間に位置する脳室上衣細胞及び脈絡叢上皮細胞に特異的に免疫反応を認めた。DNAH14 は運動線毛の動力源となる軸系ダイニンの重鎖タンパクであり、運動線毛機能異常により、原発性線毛機能不全を合併する可能性がある。

原発性線毛機能不全は運動線毛の異常により、副鼻腔炎、気管支炎、肺炎、中耳炎、不妊や内蔵逆位などを呈する常染色体劣性の遺伝性疾患である。稀に水頭症を合併し、これは脳室上衣細胞の運動線毛の異常が、脳脊髄液の対流を障害し、水頭症を生じると説明されている。しかし、原発性線毛機能不全モデルマウスの多くは水頭症を呈するが、ヒトでは水頭症を合併する例は稀である。(Lee L. J Neuroscience Res. 2013) 一方、ヒトの遺伝性水頭症では接着因子 L1 CAM の異常による重篤な発達遅滞を呈する X 連鎖性遺伝性水頭症は有名であるが、症候の発現が緩徐な正常圧水頭症の原因遺伝子の報告はない。(Rosenthal A, et al. Nat Genet 1992) 最近、運動線毛の機能異常を認めるマウスモデルの解析により、水頭症の発症に脳脊髄液の対流の障害以外の機序、すなわち、脳室上衣細胞と脈絡叢上皮の機能変化により水頭症が生じると報告されている。(Banizs B, et al. Development 2006) 更に、Bardet-Biedl syndrome のモデルマウスでは、脳室上衣下の神経前駆細胞の増殖抑制・細胞死と水頭症の関連が明らかになり、リチウム投与により水頭症の発現を回避できることが報告された。(Carter CS, et al. Nat Med 2012)

全脳室拡大、Magendie 孔開大と大槽拡大を形態的特徴とする正常圧水頭症(PaVM)の、臨床的特徴を明らかにした。この病態のコピー数多型解析を行い、1 家系に DNAH14 遺伝子上の欠失を同定した。DNAH14 は運動線毛のダイニン内腕形成にかかわる遺伝子であり、この家系の水頭症の発生にかかわっている可能性が示唆された。

## 引用文献

- Lee L: Riding the wave of ependymal cilia: genetic susceptibility to hydrocephalus in primary ciliary dyskinesia. J Neurosci Res 9:1117-1132, 2013
- Rosenthal A, Jouet M, Kenrick S: Aberrant splicing of neural cell adhesion molecule L1 mRNA in a family with X-linked hydrocephalus. Nat Genet 2(2): 107-112, 1992
- Banizs B, Pike MM, Millican CL, et al.: Dysfunctional cilia lead to altered ependymal and chroid plexuss function, and result in the formation of hydrocephalus. Development 132:5329-5339, 2005
- Carter CS, Vogel TW, Zhang Q, et al.: Abnormal development of NG2+PDGFR+ neural progeny cells leads to neonatal hydrocephalus in a ciliopathy mouse model. Nat Med 18:1797-1804, 2012

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- Kageyama H, Miyajima M, Ogino I, Nakajima M, Shimoji K, Fukai R, Miyake N, Nishiyama K, Mastumoto N, Arai H: Panventriculomegaly with a wide foramen of Magendi and a large cisterna magna. J Neurosurg 124(6): 1858-1866, 2016 (査読あり)
- Miyajima M, Nakajima M, Ogino I, Kunichika M, Arai H: An autopsy case of long-standing overt ventriculomegaly in adults (LOVA) -neuropathhological investigation-. J Hydrocephalus 7: 6-10, 2015 (査読なし)
- Miyajima M, Arai H: Evaluation of the production and absorption of cerebrospinal fluid. Neurol Med Chir (Tokyo) 55(8): 647-656, 2015 (査読あり)

[学会発表](計5件)

H Kageyama, I Ogino, R Fukai, O Iizuka, N Miyake, K Nishiyama, N Matsumoto, H Arai, M Miyajima: Congenital chronic communicating hydrocephalus with wide foramen of Magende and dilation of cisterna magunum: clinical features and congenitall etiologies. Hydrocephalus 2014,University Bristol Bristol,UK 2014.9.6-8

H Kageyama, I Ogino, K Shimoji, M Nakajima, R Fukai, N Miyake, K Nishiyama, N Matsumoto, H Arai, M Miyajima: Panventriculomegary with a wide foramen of Magendie and large cisterna magna: clinical, radiological, and genetic analysis. Hydrocephalus 2015,Fairmont Banff Springs Hotel, Banff,Alberta,Canada, 2015.10.19-21

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

宮嶋 雅一 (MIYAJIMA Masakazu)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号 : 60200177

### (2)研究分担者

松本 直通 (MATSUMOTO Naomichi)

横浜市立大学・医学部・教授

研究者番号 : 80325638