

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：13501
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K08511
研究課題名(和文) 脳室系の発達過程と脳脊髄液循環システムの解明

研究課題名(英文) Development of cerebral ventricular system

研究代表者

竹田 扇 (TAKEDA, Sen)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：20272429

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)：本研究は脳脊髄液(Cerebrospinal fluid, CSF)のホメオスタシスに関して産生、循環、吸収のプロセスを統一的に説明し、その異常と病態の基盤を解明することを企図している。研究の成果は大きく次の2つに分けられる。1. くも膜顆粒(Arachnoid granulation, AG)の微細形態とその細胞学的特徴の解析を通じてリンパ管様の構造を記載しCSF吸収機構に関する新知見を提案したこと、2. 脳室の繊毛機能に関する軸系構成分子CFAP70の細胞生物学的解析を行いCSF循環機構に関する知見を得たこと、である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりこれまでその機能に関して不明な点が多かったくも膜顆粒の構造が明らかとなった。この構造は脳脊髄液の吸収に関係していると考えられていたが、ここ20年くらいはその機能に対して否定的なものが多かった。今回の研究によりリンパ管様の構造がその内部に確認されたことから、何らかのかたちで吸収にも関係する余地が示された。これは正常圧水頭症などの病態が不明である疾患の発症機構解明に寄与する可能性がある。またCFAP70の機能解析から、繊毛動態を精緻に調節する機構の異常が、脳脊髄液循環に影響を与えうることが示された。ここから動繊毛一般と生体ホメオスタシス維持の関係解明に寄与することができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the morphological basis and molecular mechanisms for maintaining the homeostasis of cerebrospinal fluid (CSF) with special references to its circulation and absorption. By proposing a comprehensive picture of CSF homeostasis, I attempted to understand the pathogenesis of various diseases related to CSF metabolism. In this study, I have clarified the following two directions. 1. Ultrastructural analysis of the arachnoid granulation revealed a lymph-like canaliculi in the arachnoid granulation, which possibly act as conduit or safety valve from subarachnoid space to the venous circulation. 2. CFAP70, a novel structural component of axoneme, plays a pivotal role in circulation of CSF.

研究分野：細胞生物学

キーワード：繊毛 脳脊髄液 くも膜顆粒 軸系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経系の主役は脳や脊髄に代表される実質組織であり、その構成成分である神経細胞やグリア細胞、またその情報伝達モジュールであるシナプスの発生、形成、調節機構などが神経科学研究の中心課題となってきた。一方、これら中枢神経系は髄膜と呼ばれる膜構造で囲繞されており、これを満たす CSF を介して脳室と繋がり、その循環が中枢神経系の恒常性維持に与っていると考えられる。CSF は exosome (Tietje et al., 2015)、Gas1 (Ayala-Sarmiento et al., 2016)、IGF1 (Kunert et al., 2016) などさまざまな微量液性因子を含んでおり、その変動が発生、脳機能、種々の病態の基盤や原因になると予測されている。しかしながら、CSF の生理という観点からこれらを統一的に説明できるシステム論的な基礎研究はほとんどされていない。

申請者はこれまで脈絡叢上皮細胞の一次繊毛に注目し、これが CSF 産生を調節する分子機構に関して研究を進めてきたが (Narita et al., 2010, 2012, 2015; Nonami et al., 2013; Narita & Takeda, 2015)、その理解は主に産生機構にとどまっていた。一方、脳室内腔は上衣細胞で被われており、その表面には 9+2 の軸系構造を持った動繊毛が存在する。動繊毛の動きは脳室のコンパートメント毎に制御されており、全体としての循環を担保すると同時に、局所での微小環境の調節も行なっていると考えられている (Faubel et al., 2016)。さらには、発生期におけるこの流れが脳の発生で重要な機能を担うことも知られているが (Sawamoto et al., 2006)、その指向性をもった流れをつくる分子機構やそれによって輸送される担体 (成長因子など) の動態、その下流のシグナル経路に関する知見は極めて乏しい。

CSF の吸収はクモ膜顆粒 (Arachnoid granulation, AG) を通じて行なわれるという古典的な説 (Weed, 1923) がこれまで主流であったが、近年は脳の間質内の動静脈を介した系 (Glymphatic system, Iliff et al., 2015) なども提唱され、かたちを変えたリンパ類似構造の存在も提唱されるようになった。また髄膜におけるリンパ管の存在や Alzheimer 病との関連も指摘されている (Louveau et al., 2015)。従って CSF の吸収機構を解明することは、これからの脳神経科学や神経疾患の病理生理の理解において極めて重要な先進的課題であること、これまでとは異なる新しい視座を与えるものであるといえる。

申請者は上述の様にこれまで神経系の一次繊毛を中心に、CSF の産生機構の解析も行なってきたが、この中で循環、吸収プロセスを含めたシステムを理解することなく全体を説明することは不可能であることに気づいていた。また、脳室系の繊毛動態が発生と共に変化するという報告を行なう中で (Nonami et al., 2013)、発生・発達過程での CSF やそれを取り巻くシステムに関して統一的な理解が必須であることに考え至り、これらの研究をさらに発展させ、本研究につなげた。

2. 研究の目的

以上の背景に基づいて、本申請では CSF を循環させる系、吸収する系を一体化したシステムとして捉え、脳の恒常性を維持する仕組みの解明することを目的とする。またこれを基盤にして種々の疾患の病態生理を理解する。これに向けて、具体的には以下の 4 つの目標を定める。

- (1) 脳室壁を裏打ちする上衣細胞の繊毛の部位別成熟過程の解析：走査型電子顕微鏡を用いて上衣細胞の成熟過程を観察する。
- (2) CSF を吸収するシステムの発生・発達過程の解析：マウスなどのモデル動物を用いてクモ膜顆粒 (AG) の構造とその発生過程を電子顕微鏡で仔細に観察し、記述する。また発生に伴って発現する各種分化マーカーを同定し、AG 形成の分子機構を解明する。
- (3) CSF の循環システムと CFAP70 分子の関係：脳室の上衣細胞に発現する分子 CFAP70 の局在と上衣細胞の運動機能制御に関して *Cfap70* のノックダウン解析を行い、繊毛打頻度や繊毛長の解析を行う。またクライオ電子顕微鏡を用いて CFAP70 の軸系上での構造を解析する。
- (4) 繊毛関連蛋白質 4833427G06*Rik* のノックアウトマウスを用いて同様の解析を行う。以上より、CSF 循環システムの神経機能に対する影響が明らかとなる。

3. 研究の方法

- (1) 基礎的な形態解析に加え、既に当研究室で樹立されている新規繊毛関連因子 4833427G06*Rik* ノックアウトマウスや、当研究室で解析が進行 CFAP70 を利用しての解析を進める。

上衣細胞の分化形態の時系列解析を主に電子顕微鏡を用いて実施する。

4833427G06*Rik* ノックアウトマウスを用いた流路の解析を *ex vivo* 系で実施する。
Cfap70 ノックダウン系を用いた繊毛打頻度と繊毛長の解析。また蛍光ビーズを用いた流速の検討。

- (2) CSF を吸収するシステムの発生・発達過程の解析 CSF の吸収はクモ膜顆粒 (AG) 以外に、上衣細胞間を通して脳実質に入るといった報告もある (Mack et al., 1987)。ここでは、AG の発生を詳細に記述する

AG の硬膜静脈洞でのマッピングを行なう目的でマウスの上矢状洞周辺を SEM で観察する。

ヒトでの AG 発生頻度を考慮し、まずは P28 での観察を行なうが、発生時期を推定するために、上記 1 でのタイムポイントに加え必要に応じて P28 以降での観察も入れる。

クモ膜細胞に発現する上皮細胞分子マーカーである vimentin, desmoplakin, cytokeratin などの抗体を組み合わせて免疫染色を行い、上記の構造を分子レベルで確認する。

くも膜顆粒にリンパ管構成内皮細胞が存在するか否かを Lyve-1 抗体を用いて検証する。

4. 研究成果

- (1) CFAP7 が脳室上衣細胞の動繊毛に局在することを示した。また生化学実験によりこれが軸系と強く結合していることを明らかにした。一方、クライオ電子顕微鏡で観察すると CFAP70 は外腕ダイニンの基部に結合していることが明らかとなり、ノックダウン解析の結果を合わせると CFAP70 がダイニンの制御因子と働き、繊毛打頻度を調節することが推測された。(文献 2)。
- (2) 繊毛関連蛋白質 CFAP290 の変異が有馬症候群患者で見られこれが繊毛短縮の原因であることを明らかにした。脳室での機能を明示的に示すことは出来なかったが、繊毛長の短縮は脳室でも起こっていることが推測され、先天性水頭症の原因解明の手がかりをつかんだ。(文献 1)
- (3) 卵管上皮の繊毛細胞増殖と分化とがエストロゲン、ノッチ、上皮増殖因子依存性であることを明らかにした。この分子機構は脳室上衣細胞にそのまま適用できるものではないが、ステロイドホルモン以外の因子に関しては共用していることが推測され、脳室内での上衣細胞の維持機構解明に手がかりを与えた。(文献 5)
- (4) 繊毛細胞の移動や生理機能に関してソニックヘッジホッグの作用メカニズムを解明した(文献 3,4)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shamoto N, Narita K. Kubo T, Oda T, Takeda S.	4. 巻 7
2. 論文標題 CFAP70 Is a Novel Axoneme-Binding Protein That Localizes at the Base of the Outer Dynein Arm and Regulates Ciliary Motility.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells7090124.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Johno H, Yoshimura K, Mori Y, Kimura T, Niimi M, Yamada M. Tanigawa T, Fan J, Takeda S.	4. 巻 14
2. 論文標題 Detection of potential new biomarkers of atherosclerosis by probe electrospray ionization mass spectrometry	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Metabolomics	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11306-018-1334-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 竹田 扇、小田 賢幸、鷓川 眞也、吉川雅英、松村 譲児、鈴木 崇根、小澤 一史、社本 憲俊、奥田 佳介、高 碩航、深谷 一勤、須澤 綾友、島田 春貴	4. 巻 93
2. 論文標題 これからの医学教育に求められるもの：2018年 解剖学会ワークショップから。	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 解剖学雑誌	6. 最初と最後の頁 54-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sen TAKEDA, Keishi NARITA	4. 巻 142
2. 論文標題 Transport across the choroid plexus: How to culture the cells and establish a functional assay system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Springer Protocols Neuromethods	6. 最初と最後の頁 163-173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 竹田 扇
2. 発表標題 人工知能は医療を監査しうるのか？：機械学習と質量分析法を用いたがん診断装置.
3. 学会等名 第118回北海道癌談話会特別講演（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹田 扇
2. 発表標題 がんセンターボードに於ける質量分析型診断支援装置の役割
3. 学会等名 埼玉北部地域消化器外科がんセンターボード（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Osamu Kutomi, Sen Takeda
2. 発表標題 Molecular mechanism of T cell differentiation mediated by centriole/ Cilia-related structure regulates the differentiation and maturation of thymic T cells/ Signaling through centriole modulates the thymic T-cell differentiation
3. 学会等名 Tokyo2018 Cell and Developmental Biology Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sen TAKEDA
2. 発表標題 Reductionism converged into artificial intelligence: mass spectrometry based-diagnosis of cancer.
3. 学会等名 11th International symposium on atomic level characterizations for new materials and devices（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹田 扇
2. 発表標題 生殖システムにおける繊毛、鞭毛の機能とその異常
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 竹田 扇	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 300
3. 書名 カラー図解 人体の細胞生物学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岩野 智彦 (IWANO Tomohiko) (10442930)	山梨大学・総合研究部・助教 (13501)	
研究分担者	成田 啓之 (NARITA Keishi) (50452131)	山梨大学・総合研究部・准教授 (13501)	