

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08127

研究課題名(和文) 脳-脳脊髄液関門を構築する脳室上衣細胞の発生メカニズム

研究課題名(英文) Mechanisms underlying development of ependymal cells that constitute brain-CSF barrier

研究代表者

平岡 宏太良 (Hiraoka, Kotaro)

東北大学・サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター・助教

研究者番号：70586049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳の中に脳室という空間があり、脳脊髄液という液体が存在している。脳室は上衣細胞という細胞の層により覆われており、脳と脳脊髄液の間の境界となっていて色々な物質の移動の調節を行っている。また上衣細胞は鞭毛運動を行う多数の線毛という細胞構造物を脳室側に突出していて、線毛の運動が脳脊髄液の動きを制御している。脳の発達段階において、上衣細胞が幹細胞から成長して成熟細胞となるにはどのような因子の働きかけが必要か十分に分かっていない。本研究ではその因子を明らかにするために、骨形成たんぱく質という体内で情報を伝達することに使われているたんぱく質や脳脊髄液の関連を解析した。

研究成果の概要(英文)：In the brain, there are spaces called "the ventricles". The ventricles contain fluid called "the cerebrospinal fluid (CSF)". The ventricles are covered by layers of the ependymal cells. The cells regulate transfer of various molecules between the brain and CSF. The ependymal cells protrude hairlike structures called "the cilia" to the ventricles. Motility of the cilia affects dynamics of the CSF. In development of the brain, it is not fully clarified which factors induce development of the ependymal cells from stem cells to mature cells. In this study, we analyzed association between bone morphogenetic protein, a protein used in the body for signaling, and development of the ependymal cells. We also analyzed association between the CSF and development of the ependymal cells.

研究分野：神経科学、臨床神経学

キーワード：脳 脳脊髄液系 上衣細胞 発達・分化 BMPシグナリング 脳脊髄液

1. 研究開始当初の背景

脳室壁は多数の線毛を有する立方状の上衣細胞 (図 1) の層により覆われている。上

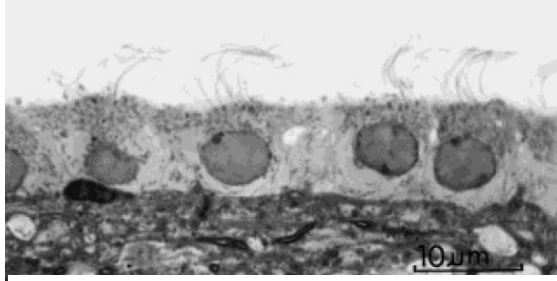


図 1. ラットの脳室壁に並ぶ線毛を有する立方状の上衣細胞 (参考文献 1 より抜粋)

衣細胞は水分子の輸送を行うアクアポリン 4 チャネル、グルコース輸送体の GLUT1、 $Na^+/K^+/2Cl^-$ 共輸送体などを発現しており、それらの物質の脳実質と脳脊髄液間の移動の調節を行っている²。また、上衣細胞の脳室側の表面より脳室腔に突出した線毛は、その運動により脳脊髄液の流動に寄与する。多数の上衣細胞の線毛による同調的な鞭毛運動により脳室壁面の脳脊髄液の流動が起こされているが、その機能が働かないと脳脊髄液の流動が障害され、マウスでは水頭症を発症する。また、成体脳において脳室下帯の幹細胞は新たな嗅神経を産生するため移動するが、その移動は脳脊髄液中の物質の濃度勾配により誘導されていて、その濃度勾配の形成に線毛の運動が重要であることが示されている³。

このように脳 - 脳脊髄液関門を構築し脳のホメオスタシスを維持したり、運動性の線毛により脳脊髄液の動態を制御する上衣細胞であるが、その発生についての知見は乏しい。上衣細胞はマウスでは胎生 14 日から 16 日の間に大部分が放射状グリアから産生され、出生後第 1 週の間線毛を有する成熟上衣細胞となることがわかっているが⁴、どのような形成過程を経て成熟した上衣細胞となるか、またどのような因子が上衣細胞の分化誘導に働いているかについてはわかっていない。

研究代表者はこれまで高齢者に認知障害や歩行障害を発症する特発性正常圧水頭症の MRI (核磁気共鳴画像法) などによる脳画像解析を用いた臨床研究を行ってきた。脳脊髄液の生理については不明な点も多く、そのことが水頭症などの脳脊髄液に関連した疾患の病態の解明をより困難なものとしている。脳脊髄液系の正常な機能や病的な状態を理解する上で、脳室上衣などの脳脊髄液と直接関連した組織の基礎的な知見を得ることは重要である。

2. 研究の目的

上衣細胞はマウスでは胎生 14 日から 16 日の間に大部分が放射状グリアから産生

され、出生後第 1 週の間線毛を有する成熟上衣細胞となることがわかっている⁴。神経幹細胞である放射状グリアから神経細胞への分化を促す因子としては、プロニューラル転写因子、Wnt シグナルなど、アストロサイト分化を促す因子としては、JAK-STAT シグナル、Notch シグナル、BMP (bone morphogenetic protein、骨形成タンパク質) シグナルなどが知られており、細胞の分化は細胞内因的な制御と細胞外環境の変化による制御により厳密に制御されている⁵。上衣細胞への分化過程においても複数の様々な因子が関与していることが予想されるが、本研究においては下記に掲げる根拠により、BMP シグナル系と脳脊髄液の上衣細胞分化への関与を明らかにすることを旨とした。

(1) BMP シグナル系と上衣細胞分化の関連の解明

BMP シグナル系を抑制する転写因子 Smad6、7 により *in vitro* で幹細胞が線毛を有した上衣細胞様の細胞に分化したとの報告があり⁶、*in vivo* でも BMP シグナル系の抑制が放射状グリアからアストロサイトへの分化を抑制し上衣細胞への分化を促進している可能性がある。本研究では BMP シグナル系の上衣細胞の分化への関与について明らかにすることを目的とした。

(2) 脳脊髄液の上衣細胞分化への関与の解明

これまで胎生期の脳脊髄液中の FGF2 (Fibroblast growth factor 2、線維芽細胞増殖因子 2) が神経幹細胞の増殖や神経細胞分化に関与していることや、胎生期の小脳の脳室帯における幹細胞の増殖に脳脊髄液中の Sonic hedgehog が重要であることなどが示されており、上衣細胞は脳室腔内の脳脊髄液と接していることから、脳脊髄液中の特定の因子が上衣細胞の分化を促す可能性が考えられる。本研究では上衣細胞の分化に対する脳脊髄液の関与について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) BMP シグナル系と上衣細胞分化の関連の解析

胎齢 16 日、出生後 0 日、8 日のマウスより側脳室の脳室帯を含んだ切片標本を作成した。上衣細胞において、BMP や、BMP による刺激を受けた BMP 受容体によりリン酸化されて下流の遺伝子の発現を制御する転写因子である Smad1、5、8、また Smad1、5、8 のリン酸化を阻害することにより BMP シグナル系を抑制する Smad7、BMP に結合することによりその働きを阻害する内在性因子である Noggin など BMP シグナル系に関連した因子 (図 2) の成熟過程にある上衣細胞における発現をこれらの因子に対する一次抗体と共焦点顕微鏡を用いた免疫組織学的手法によ

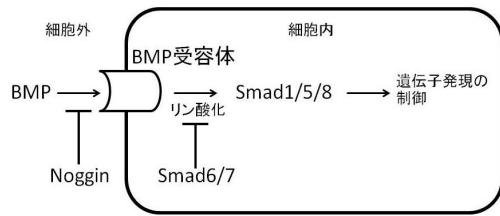


図2. BMP シグナル系に関連した因子

り解析した。また、生後0日のマウスより細胞を採取し、細胞培養を行った。細胞培養液に遺伝子組み換え BMP または BMP シグナル系を抑制する遺伝子組み換え Noggin を加えて、上衣細胞への分化に影響がみられるか解析する。

(2) 脳脊髄液の上衣細胞分化への関与の解析

生後0日のマウスの脳室よりマイクロピペットを用いて脳脊髄液を抽出する。1個体あたり約4μlの脳脊髄液を抽出し、使用するまでは凍結保存する。生後0日のマウスより細胞を採取し、細胞培養を行う。細胞培養液に凍結保存した脳脊髄液を加えて、上衣細胞への分化に影響がみられるか解析する。

4. 研究成果

(1) BMP シグナル系と上衣細胞分化の関連の解析

免疫組織学的解析(図3)では、リン酸化 Smad1, 5, 8 は胎齢16日では強い発現、生後0日では軽度の発現がみられ、生後8日では発現がみられなかった。Noggin の発現はどの

	胎齢16日	生後0日	生後8日
リン酸化 SMAD1/5/8	++	+	-
Noggin	-	-	-
BMP2	-	+	+
BMP4	-	+	+
SMAD7	-	+	+

図3. BMP シグナル系に関連した因子の免疫組織学的解析の結果のまとめ

時期にもみられなかった。BMP2, 4, Smad7 は胎齢16日ではみられず、生後0日、8日に発現がみられた。以上の結果より、側脳室の脳室壁にて Smad1, 5, 8 のリン酸化を阻害することにより BMP シグナル系を抑制する SMAD7 が発現して BMP シグナル系を抑制している可能性が考えられた。BMP シグナル系と上衣細胞への分化の関連についてさらに明らかにするために、上衣細胞の培養の実験系を確立した。先行研究にならひ、生後0日のマウスの脳より放射状グリアを採取し、ウシ胎児血清を含んだ培養液で約1週間培養し、その後血清を含まない培養液で約2週間培養して、大半の細胞を上衣細胞に分化させることに

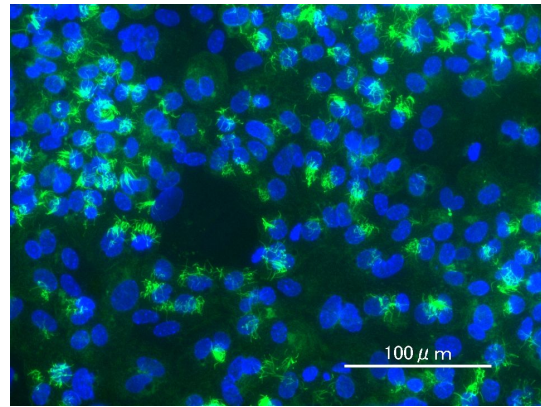


図4. 上衣細胞の細胞培養。緑色は線毛のマーカーであるβTubulin-IV、青は核染色のDAPI。

成功した(図4)。今後、培養液に BMP2 や BMP4 を添加した場合に BMP シグナリング系が促進されて上衣細胞への分化が抑制されるか検証する予定である。また以前の実験で、血清を含んだ培養液で培養し続けると、アストロサイトに大半が分化することを確認している。その場合に、培養液に BMP シグナル系のアンタゴニストである Noggin を加えて BMP シグナル系が抑制されて上衣細胞への分化が誘導されるかを検証する予定である。

(2) 脳脊髄液の上衣細胞分化への関与の解析

現在、生後0日の胎仔からの脳脊髄液の収集を行っている。(1)と同様の細胞培養の方法を用いて脳脊髄液の上衣細胞の分化への関与についても解析を行う予定である。

参考文献

1. Bruni JE. Microsc Res Tech. 1998;41:2-13.
2. Del Bigio MR. Acta Neuropathol. 2010;119:55-73.
3. Sawamoto K, et al. Science. 2006;311:629-32.
4. Spassky N, et al. J Neurosci. 2005;25:10-8.
5. 脳の発生学 - ニューロンの誕生・分化・回路形成. 第一版. 化学同人. 2013.
6. Nishimura Y, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2010;401:1-6.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 14件)

Harada R, Ishiki A, Kai H, Sato N, Furukawa K, Furumoto S, Tago T, Tomita N, Watanuki S, Hiraoka K, Ishikawa Y, Funaki Y, Nakamura T, Yoshikawa T, Iwata R, Tashiro M, Sasano H, Kitamoto T, Yanai K, Arai H, Kudo Y, Okamura N.

- Correlations of (18)F-THK5351 PET with Postmortem Burden of Tau and Astroglia in Alzheimer Disease. *J Nucl Med.* 2018;59:671-674. doi: 10.2967/jnumed.117.197426. 査読あり
- Kikuchi A, Nasir FBM, Inami A, Mohsen A, Watanuki S, Miyake M, Takeda K, Koike D, Ito T, Sasakawa J, Matsuda R, Hiraoka K, Maurer M, Yanai K, Watabe H, Tashiro M. Effects of levocetirizine and diphenhydramine on regional glucose metabolic changes and hemodynamic responses in the human prefrontal cortex during cognitive tasks. *Hum Psychopharmacol.* 2018 ;33:e2655. doi: 10.1002/hup.2655. 査読あり
- Kikkawa T, Casingal CR, Chun SH, Shinohara H, Hiraoka K, Osumi N. The role of Pax6 in brain development and its impact on pathogenesis of autism spectrum disorder. *Brain Res.* 2018. pii: S0006-8993(18)30111-2. doi:10.1016/j.brainres.2018.02.041. [Epub ahead of print] Review. PubMed PMID:29499177. 査読あり
- Inami A, Ogura T, Watanuki S, Masud MM, Shibuya K, Miyake M, Matsuda R, Hiraoka K, Itoh M, Fuhr AW, Yanai K, Tashiro M. Glucose Metabolic Changes in the Brain and Muscles of Patients with Nonspecific Neck Pain Treated by Spinal Manipulation Therapy: A [(18)F]FDG PET Study. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017;2017:4345703. doi:10.1155/2017/4345703. 査読あり
- Kikuchi A, Okamura N, Hasegawa T, Harada R, Watanuki S, Funaki Y, Hiraoka K, Baba T, Sugeno N, Oshima R, Yoshida S, Kobayashi J, Ezura M, Kobayashi M, Tano O, Mugikura S, Iwata R, Ishiki A, Furukawa K, Arai H, Furumoto S, Tashiro M, Yanai K, Kudo Y, Takeda A, Aoki M. In vivo visualization of tau deposits in corticobasal syndrome by 18F-THK5351 PET. *Neurology.* 2016;87:2309-2316. DOI: 10.1212/WNL.0000000000003375 査読あり
- Lockhart SN, Baker SL, Okamura N, Furukawa K, Ishiki A, Furumoto S, Tashiro M, Yanai K, Arai H, Kudo Y, Harada R, Tomita N, Hiraoka K, Watanuki S, Jagust WJ. Dynamic PET Measures of Tau Accumulation in Cognitively Normal Older Adults and Alzheimer's Disease Patients Measured Using [18F] THK-5351. *PLoS One.* 2016;11:e0158460. doi: 10.1371/journal.pone.0158460. 査読あり
- Hiraoka K, Sumiyoshi A, Nonaka H, Kikkawa T, Kawashima R, Osumi N. Regional Volume Decreases in the Brain of Pax6 Heterozygous Mutant Rats: MRI Deformation-Based Morphometry. *PLoS One.* 2016;11:e0158153. doi:10.1371/journal.pone.0158153. 査読あり
- Inami A, Matsuda R, Grobosch T, Komamura H, Takeda K, Yamada Y, Miyake M, Hiraoka K, Maurer M, Yanai K, Tashiro M. A simulated car-driving study on the effects of acute administration of levocetirizine, fexofenadine, and diphenhydramine in healthy Japanese volunteers. *Hum Psychopharmacol.* 2016;31:167-77. doi: 10.1002/hup.2524. 査読あり
- Harada R, Okamura N, Furumoto S, Furukawa K, Ishiki A, Tomita N, Tago T, Hiraoka K, Watanuki S, Shidahara M, Miyake M, Ishikawa Y, Matsuda R, Inami A, Yoshikawa T, Funaki Y, Iwata R, Tashiro M, Yanai K, Arai H, Kudo Y. 18F-THK5351: A Novel PET Radiotracer for Imaging Neurofibrillary Pathology in Alzheimer Disease. *J Nucl Med.* 2016;57:208-14. doi: 10.2967/jnumed.115.164848. 査読あり
- Kikuchi A, Takeda A, Sugeno N, Miura E, Kato K, Hasegawa T, Baba T, Konno M, Oshima R, Watanuki S, Hiraoka K, Tashiro M, Aoki M. Brain Metabolic Changes of Cervical Dystonia with Spinocerebellar Ataxia Type 1 after Botulinum Toxin Therapy. *Intern Med.* 2016;55:1919-22. doi: 10.2169/internalmedicine.55.5843. 査読あり
- Ishiki A, Okamura N, Furukawa K, Furumoto S, Harada R, Tomita N, Hiraoka K, Watanuki S, Ishikawa Y, Tago T, Funaki Y, Iwata R, Tashiro M, Yanai K, Kudo Y, Arai H. Longitudinal Assessment of Tau Pathology in Patients with Alzheimer's Disease Using [18F]THK-5117 Positron Emission Tomography. *PLoS One.* 2015;10:e0140311. doi: 10.1371/journal.pone.0140311. 査読あり
- Sato H, Ito C, Hiraoka K, Tashiro M, Shibuya K, Funaki Y, Yoshikawa T, Iwata R, Matsuoka H, Yanai K. Histamine H1 receptor occupancy by the new-generation antipsychotics

olanzapine and quetiapine: a positron emission tomography study in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015;232:3497-505.

doi:10.1007/s00213-015-4002-2. 査読あり

Hiraoka K, Narita W, Kikuchi H, Baba T, Kanno S, Iizuka O, Tashiro M, Furumoto S, Okamura N, Furukawa K, Arai H, Iwata R, Mori E, Yanai K. Amyloid deposits and response to shunt surgery in idiopathic normal-pressure hydrocephalus. *J Neurol Sci*. 2015;356:124-8.

doi:10.1016/j.jns.2015.06.029. 査読あり

Harada R, Okamura N, Furumoto S, Furukawa K, Ishiki A, Tomita N, Hiraoka K, Watanuki S, Shidahara M, Miyake M, Ishikawa Y, Matsuda R, Inami A, Yoshikawa T, Tago T, Funaki Y, Iwata R, Tashiro M, Yanai K, Arai H, Kudo Y. [(18)F]THK-5117 PET for assessing neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015;42:1052-61.

doi: 10.1007/s00259-015-3035-4. 査読あり

〔学会発表〕(計 4件)

平岡宏太良, Regional volume decreases in the brain of Pax6 heterozygous mutant rats: MRI deformation-based morphometry、第39回日本神経科学大会、2016

平岡宏太良, シンポジウム1 (iNPHの疫学)「iNPHは希少疾患か? Common diseaseか? - 本邦の疫学研究から。」講演1. Community-based studies 1)宮城県の研究、第17回日本正常圧水頭症学会、2016

平岡宏太良, Pax6変異ヘテロ接合ラットにおける脳体積の減少 小動物用MRIを用いた脳形態解析、第11回成体脳のニューロン新生懇談会、2015

平岡宏太良, Decreased volume in the brain of Pax6 heterozygous mutant rats: A morphometric MRI study、Symposium on Development and Disease、2015

〔図書〕(計 1件)

Kazuhiko Yanai, Kotaro Hiraoka, Anikó Kárpáti, Fumito Naganuma, Nobuyuki Okamura, Manabu Tashiro, Tadahito Nakamura, and Takeo Yoshikawa. Human Press. *Histamine Receptors Preclinical and Clinical Aspects*. 2016. P311-326

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平岡 宏太良 (HIRAOKA, Kotaro)
東北大学・サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター・助教
研究者番号: 70586049

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

大隅典子 (OSUMI, Noriko)
東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号: 00220343

(4) 研究協力者

()