

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13902

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K12029

研究課題名（和文）水頭症マウスの脳室の流体構造と繊毛運動解析

研究課題名（英文）Analysis of the fluid structure and ciliary motion in the brain ventricle of hydrocephalus mice

研究代表者

上野 裕則（Ueno, Hironori）

愛知教育大学・教育学部・准教授

研究者番号：70518240

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題は脳室内の流体構造と繊毛運動の関係を理解する事によって水頭症の原因の一端を解明することである。本研究により、水頭症を発症するマウスでは、脳室内の内腕ダイニンの遺伝子の発現量が低下していることが明らかとなった。脳室繊毛の運動についてもその波形が野生型と比べ変化しており、脳脊髄液の流れに影響を及ぼしている可能性が示唆された。さらに、側脳室と第3脳室を結ぶモンロー孔付近の流れが脳脊髄液の効率的な側脳室からの排出に関与している可能性が示唆された。本課題によって水頭症の進行や発症原因の一端を理解することが出来、今後の新たな課題も見出すことが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水頭症は日本でもたくさんの患者がいるが、その発症機構は未だに不明な部分が多い。一方で、脳室上皮細胞にはたくさんの繊毛が存在し、髄液に流れを生み出すと考えられているが、脳室内における流体構造や繊毛細胞の詳細な局在は不明であった。本研究により、脳室の繊毛運動に関与するダイニン遺伝子が繊毛の波形に関与し、髄液の効率的な流れに関与している可能性が示唆され、水頭症の原因解明に向けた新たな結果を提示することが出来た。今後さらに側脳室のモンロー孔付近の組織や繊毛運動についての解析を行う事によって水頭症の発症にのメカニズムを突き止める計画である。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research is to understand the relationship between the fluid structure in the ventricle and ciliary movement, and to elucidate a part of the cause of hydrocephalus. We detected the reduction of expression in the inner arm dynein genes in the ventricles of knockout mice that develop hydrocephalus. In addition, the ciliary waveform in the ventricle was different from it of the wild type. These results suggested that the change of ciliary waveform may affect the flow of cerebrospinal fluid. Furthermore, the flow near the foramen of Monroe connecting the lateral ventricle and the third ventricle may be involved in the efficient flow of cerebrospinal fluid from the lateral ventricle. We were able to understand some of the causes of hydrocephalus.

研究分野：医工学

キーワード：水頭症 脳室 繊毛 ダイニン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

水頭症は主に先天性のものと後天性のものに分けられ、脳室内の髄液の流れが止まってしまうものや髄液の吸収が止まってしまうものなどがある。日本でもたくさんの患者がいるが、その発症機構は未だに不明な部分が多い。一方で、脳室上皮細胞にはたくさんの繊毛が存在し、髄液に流れを生み出すと考えられているが、脳室内における流体構造や繊毛細胞の詳細な局在は不明であった。研究開始当初では、第3脳室の流体マップが発表されたが(Faubel et al., Science, Vol.353, p176, 2016)、その他の脳の部位における流れは不明な部分は多かった。本研究では生後徐々に水頭症を発症していくDpcdノックアウトマウスを用い、水頭症によって脳室の状態や繊毛の様子、繊毛のモータータンパク質ダイニンの発現解析を行った。

### 2. 研究の目的

本研究課題は、脳室内の流体構造と繊毛運動の関係を理解するとともに水頭症の原因の一端を解明することである。脳内にはいくつかの脳室があり、脳脊髄液で満たされている。髄液は脳室やそれをつなぐ孔内の流れによって循環しているが、この流れが止まると脳室内に髄液が蓄積し水頭症となる。一方、脳室内の組織表面には繊毛細胞が存在し、脳から脊髄へ流れを生み出している。しかし、水頭症の脳内における詳細な流体構造や繊毛細胞の分布、繊毛運動の詳細は良く分かっていない。本研究では水頭症を発症するDpcdノックアウトマウスを用い、野生型と比較することによって、脳室の形状や流体構造、繊毛運動や繊毛内部構造の違いを明らかにすることを目的とした。先行研究によって既にDpcdノックアウトマウスが生後徐々に水頭症を発症していくことを確認しており、本課題はこのDpcdノックアウトマウスと野生型マウスについて、主に繊毛に着目して研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 水頭症の脳室の変化 (MRI解析)

脳室の各部位の変化をMRIを用い、Dpcdノックアウトマウスが生後どのように水頭症が発症し野生型マウスとどのように違うかを構造的に比較した。

#### (2) 脳室の流体解析 (顕微鏡解析)

野生型マウスとDpcdノックアウトマウスの脳室を開き、それぞれの組織上にトレーサー粒子を加え、繊毛運動による脳室組織の表面の流れを解析した。

#### (3) 脳室における内腕ダイニンの遺伝子発現

野生型マウスとDpcdノックアウトマウスの脳室からmRNAを抽出し、定量PCR法によって内腕ダイニンの遺伝子発現の程度を調査した。野生型とDpcdノックアウトマウスについて比較検討を行い、内腕ダイニンの遺伝子発現の増減を確認した。

#### (4) 繊毛運動解析

野生型マウス、Dpcdノックアウトマウスから脳を取り出し、ピプラトームで薄切片を切り出して顕微鏡で観察した。撮影にはハイスピードカメラを用い、詳細な運動解析を行い、野生型の繊毛運動と比較した。

#### (5) コンピューターシミュレーション

共同研究によって脳室内の髄液の流れをコンピューターシミュレーションで解析した。MRIで得られた脳室の形状にメッシュを張り、格子ボルツマン法を用いて脳脊髄液の流体シミュレー

ションを行った。

#### (6) 脳繊毛の3次元構造解析(クライオ電子顕微鏡解析)

脳の繊毛の内部3次元構造は未だに良く分かっていない。本研究ではクライオ電子線トモグラフィ法を用いて3次元構造を明らかにし、野生型とノックアウトマウスで3次元構造の違いについて比較することを試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) 脳室の形状

遺伝子変異の確認後にマウスを麻酔し、脳内のMRIを撮影し、脳室の形態を確認して水頭症の症状や進行状況を野生型マウスと比較した。脳室には複数あり、側脳室の形態の他、第3脳室、第4脳室、側脳室から第3脳室へつながるモンロー孔、第3脳室から第4脳室へつながる中脳水道など、水頭症に関与すると考えられるいくつかの部位の形態も野生型と比較し確認することによって、脳室が大きくなる原因について推察した。その結果、Dpcdノックアウトマウスの脳室は野生型と比べ劇的に大きくなっていることが明らかとなった。これは主に側脳室で変化が顕著であり、次いで第4脳室で形状の変化がみられた。第3脳室ではあまり変化がみられなかった。

#### (2) 脳室の流体解析

Dpcdノックアウトマウスと野生型マウスの脳を取り出し、側脳室、第3脳室、第4脳室の組織表面を開いて、トレーサー粒子(ポリスチレンビーズ)を付加し、粒子の軌跡を解析することによって髄液の流れを確認した。その結果、Dpcdノックアウトマウスの脳室内の流体の速度は、主に側脳室で野生型とは大きく異なり遅くなっていることが分かった。

#### (3) 内腕ダイニン遺伝子の発現解析

内腕ダイニンの遺伝子は10種類存在することがわかっているが、本研究ではDynein axonemal heavy chain (DNAH)1、DNAH3、DNAH6、DNAH10、DNAH12、DNAH14の遺伝子について野生型マウスと水頭症を発症するDpcdノックアウトマウスを比較した。脳における内腕ダイニンの遺伝子の発現の増減を定量PCR法により解析した。その結果、いくつかの内腕ダイニン遺伝子について発現量が減少していることが分かり、これらの遺伝子が繊毛の波形を制御し、脳脊髄液の脳室内の循環に関わっている可能性が示唆された。

#### (4) 脳室の繊毛運動解析

繊毛運動をハイスピードカメラを用いて解析した結果、周波数はそれほど変化がないものの、Dpcdノックアウトマウスでは繊毛運動の波形に変化が観察された。

#### (5) コンピューターシミュレーション

共同研究によって脳室内の流体の様子を、コンピューターシミュレーションを用いて解析した。脳室切片から、断層情報を取得し、それらをつなぎ合わせてマウス脳室の3次元の形態情報を取得することに成功した。今後はこの脳室内の脈絡叢から、ある一定のスピードで液体が分泌され、流れて行く様子を数値解析で明らかにしたい。また、ヒトの脳の情報を基にした数値シミュレーションの結果、モンロー孔付近の流れが側脳室の形状変化に関与している可能性が考えられた。今後はモンロー孔の繊毛運動などを中心に調査していく。

#### (6) クライオ電子顕微鏡法

クライオ電子顕微鏡法によって脳の繊毛の3次元構造を明らかにするため、試料の作成法の検討を行った。また、3次元構造解析のための画像解析システムも確立し、クライオ電子顕微

鏡で脳室繊毛の傾斜情報を得られれば、3次元構造解析も行えるようにした。しかし、一般的な方法では脳の組織から繊毛を単離することが出来ず、ホモジェナイズなどの物理的に力を加えて単離する方法と、薬品を用いて化学的に単離する方法などを試みた。その結果、物理的な刺激によって単離する方法によってある程度脳の繊毛を得ることが出来たが、一方で脳室組織も破壊され、組織の一部が含まれ、クライオ電子顕微鏡による解析を行う事が困難であることが分かった。今後は繊毛の回収方法をさらに改善する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ishikawa Takuji, Ueno Hironori, Omori Toshihiro, Kikuchi Kenji	4. 巻 110
2. 論文標題 Cilia and centrosomes: Ultrastructural and mechanical perspectives	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Seminars in Cell & Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 61 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.semcd.2020.03.007	査読の有無 無
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 Yoke Hiroshi, Ueno Hironori, Narita Akihiro, Sakai Takafumi, Horiuchi Kahoru, Shingyoji Chikako, Hamada Hiroshi, Shinohara Kyosuke	4. 巻 16
2. 論文標題 Rsp4a is essential for the triplet radial spoke head assembly of the mouse motile cilia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1008664
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1008664	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本 太樹、竹内 和人、石川 隆之、永田 雄一、上野 裕則、若林 俊彦、夏目 敦至
2. 発表標題 Dpcdノックアウトマウスにおける脳室内繊毛運動についての解析
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第78回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 汾陽早紀、上野裕則
2. 発表標題 マウス内腕ダイニンDNAH1, DNAH3のストーク部位発現と組織依存的な遺伝子発現解析
3. 学会等名 公益財団法人日本動物学会 第89回札幌大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 汾陽早紀、上野裕則
2. 発表標題 マウス内腕ダイニンDNAH1, DNAH3のストーク部位発現と組織依存的な遺伝子発現解析
3. 学会等名 公益財団法人日本動物学会 中部支部学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上野裕則、山本太樹、竹内和人、永田雄一、大岡史治、夏目敦至、齋藤竜太
2. 発表標題 Dpcdノックアウトマウスの側脳室における内腕ダイニンの遺伝子発現と繊毛運動解析
3. 学会等名 公益財団法人日本動物学会 第92回オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
連携研究者	成田 哲博  (Narita Akihiro)  (30360613)	名古屋大学・理学系研究科・准教授   (13901)	
連携研究者	竹内 和人  (Takeuchi Kazuhito)  (90710088)	名古屋大学・医学部・講師   (13901)	
連携研究者	大岡 史治  (Ohka Fumiharu)  (10725724)	名古屋大学・医学部・講師   (13901)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------