

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07829

研究課題名(和文) 中枢神経系の発生においてストレス臨界期を制御する一次繊毛の意義と分子機構の解析

研究課題名(英文) Significance and molecular mechanisms of primary cilia controlling the stress critical period of cortical development.

研究代表者

石井 聖二 (ISHII, Seiji)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：50468493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス的大脑皮質神経細胞には、出生直後に、環境ストレスに対して脆弱となる「臨界期」が存在することが示唆されている。一方、一次繊毛は、マウス大脑皮質の神経細胞において、胎生期にはまだ殆ど存在せず、出生後、ストレス耐性の臨界期が終了する頃までに成熟することが知られている。そこで、臨界期中に環境ストレスを与えた一次繊毛欠損マウス的大脑皮質の第5層神経細胞を調べたところ、斑点状の活性型カスパーゼ3が、特に大脑皮質の第5層の神経細胞に多数検出されることを見出した。さらに、IGF-1受容体が大脳皮質の神経細胞の一次繊毛膜上に集積し、PI3K/Aktシグナル伝達経路が活性化されていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一次繊毛の形成、機能異常に起因すると考えられている遺伝性疾患は総称して繊毛病(シリオパチー)と呼ばれ、網膜色素変性症、嚢胞腎、多指症、水頭症、不妊、肥満など、多岐にわたる症状を呈することが知られている。本研究において「環境ストレスに対する一次繊毛を介した臨界期中枢神経系の防御機構」の分子基盤を明らかにする事で、一次繊毛を介した環境ストレス応答機構という新たな概念を提唱することができ、一次繊毛に対する理解が深まるものと期待される。本研究において得られた知見は、今後、多岐にわたる繊毛病の発症メカニズムの理解や新たな治療法への応用に貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that there is a "critical period" in mouse cortical neurons immediately after birth, when they become vulnerable to environmental stress. On the other hand, primary cilia are still largely absent in neurons of the mouse cerebral cortex during the embryonic period, and are known to mature by the end of the critical period for stress tolerance after birth. Layer 5 neurons in the cerebral cortex of mice lacking primary cilia that had been exposed to environmental stress on postnatal day 7 was examined and found that speckled active caspase-3 was detected in large numbers, especially in layer 5 neurons of the cerebral cortex. They also found that IGF-1 receptors accumulated on the primary ciliary membranes of neurons in the cerebral cortex and activated the PI3K/Akt signaling pathway.

研究分野：病態神経科学

キーワード：大脳皮質 一次繊毛 環境ストレス アルコール 麻酔薬

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胎生期のマウス大脳皮質の神経細胞は、様々な環境ストレスに対して高い耐性を有する。研究代表者らはこれまで、heat shock factor 1-heat shock protein (HSF1-HSP) シグナル経路がこのストレス耐性に不可欠である事を世界に先駆けて明らかにした (図1の破線、Hashimoto-Torii K. et al, *Neuron*, 2014; Torii M. et al, *PNAS*, 2017; Ishii S. et al., *Nature Commun.*, 2017)。一方で、出生直後の短期間は抗てんかん薬、コカイン、麻酔薬、アルコールなどの環境ストレスに対して一時的に耐性を失い、その後、生後約21日目までに再び耐性を獲得する事が知られている (Kaji A.A. et al, 2023)。このことは、大脳皮質神経細胞には環境ストレスに対して脆弱となる「臨界期」が存在することを示唆している (図1の実線)。さらに、成熟した成体神経細胞では環境ストレスに対する HSF1-HSP シグナル経路の活性化が惹起されないことから (Morimoto R.I. et al., 2008) (図1の破線)、臨界期を境として、胎児期型の HSF1-HSP を介したストレス耐性機構から、成体型の別の機構へと変遷している可能性が考えられる。さらに、後者ではストレスシグナルを感受する分子機構が不可欠であると推察される。

哺乳動物細胞の一次繊毛はアンテナ様の構造をした細胞小器官であり、細胞外のシグナルを感知するセンサーとして発生に必要なシグナル伝達に参与する。Wnt やヘッジホッグなどの細胞外シグナル依存的にその受容体を一次繊毛膜上に蓄積することにより、細胞外シグナルを増強する (Goetz S.C. et al, 2010)。マウス大脳皮質の神経細胞では、一次繊毛は胎生期にはまだほとんど存在せず、生後に形成され、生後21日までに成熟することが知られている (Arellano J. I. et al, 2012) (図1の点線)。そこで、大脳皮質神経細胞は、生後21日以降は、一次繊毛を起点としたストレス応答性を獲得するという仮説を立て、研究を開始した。

### 2. 研究の目的

研究代表者は初めに、上記1.の仮説の検証を行うため、大脳皮質特異的な Emx1-Cre マウスと、flox Ift88 ホモマウスを交配し、大脳皮質特異的に一次繊毛を欠損したマウス (Emx1-Cre/Ift88fl/fl; cKO マウス) を作製した。生後7日目の cKO マウス群にアルコール投与すると、特に大脳皮質の第5層の神経細胞に多数検出されることを見出した (図2)。また、これまでの予備実験の結果、出生直後に形成される神経細胞の一次繊毛は臨界期後の環境ストレス耐性を獲得する上での起点であること、及び、アルコール投与下で一次繊毛が形成されない場合、細胞質内で斑点状に Caspase-3 が活性化され、大脳皮質における樹状突起の発達不全が観察されることが明らかとなった。これらのことから、臨界期後に一次繊毛に依存して誘導されるストレス応答シグナルの存在が示唆された。このシグナルの探索を行い、ストレス応答に対する臨界期の概念、及びその動的変化を制御する分子基盤を確立することを本研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

アルコール曝露に対する IGF-1 受容体の挙動を解析すると共に、その下流シグナル伝達機構を解析する。さらに、アルコールを投与した cKO マウスにおける、Caspase-3 依存的な大脳皮質における樹状突起の発達不全の分子機構を明らかにする。さらに、研究代表者が見出した分子機構が、一般的な環境ストレス応答でも認められるかを検証するために、環境ストレスとして麻酔薬への曝露モデルを用いて同様の解析を行う。

#### 研究項目 1 一次繊毛を起点とした IGF-1/Akt 経路活性化機構の解明

##### 1-A アルコール曝露による一次繊毛膜上での IGF-1 受容体の活性化機構の検証

活性化型 IGF-1 受容体に対する抗体 (Yeh C. et al, 2013) を用いて、アルコール曝露下の生後7日目の一次繊毛膜における発現を解析する。

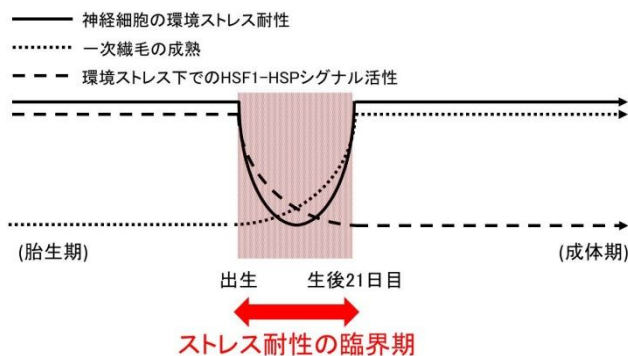


図1. HSF1-HSP シグナル活性と、一次繊毛の成熟度が、神経細胞の環境ストレス耐性の臨界期を制御している仮説。

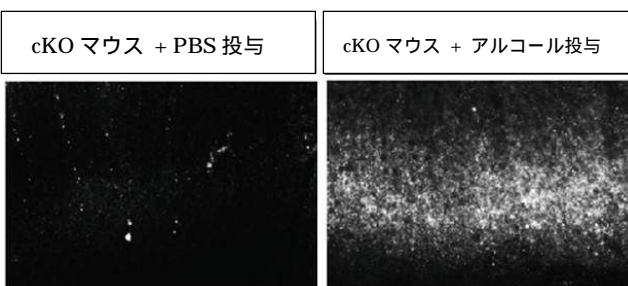


図2. cKO マウスの大脳皮質にアルコールを曝露すると、第5層の神経細胞において斑点状の活性化型 Caspase-3 の検出が顕著に増加する (左: PBS を投与した cKO マウス、右: アルコールを投与した cKO マウス)。

## 1 - B IGF-1 下流に存在する分子の活性化の可能性の検証

アルコール曝露下において、IGF-1 の下流シグナル分子である Akt や S6 のリン酸化の検出を免疫染色により検討する。

### 研究項目 2 一次繊毛を起点とした樹状突起の伸長および分岐を制御する機構の解明

ゴルジ体のトラフィッキングが阻害された樹状突起、あるいはゴルジ体が局在しない樹状突起は、長さ、分岐数がともに低下する (Horton A.C. et al, 2005)。また、ゴルジ体関連タンパク質である GRASP65 は活性型 Caspase-3 によって切断されることが知られている (Lane J.D. et al, 2002)。従って、アルコールを投与した cKO マウスにおける活性型 caspase-3 の蓄積が GRASP65 を切断し、その結果ゴルジ体のトラフィッキングが起こらなくなり、樹状突起の伸長および分岐が阻害される可能性が考えられるため、以下の検証を行う。

#### 2 - A 活性型 Caspase-3 により樹状突起内でゴルジ体が切断される機構の検証

まず、アルコールを投与した cKO マウスの樹状突起内に存在するゴルジ体において、活性型 Caspase-3 により GRASP65 が切断されているかどうかを免疫染色により解析する。さらに、Akt アゴニストの SC79 の投与により、GRASP65 の切断が抑えられるかを検証する。

#### 2 - B 光褪色後蛍光回復法を用いた樹状突起内でゴルジ体のトラフィッキングの検証

cKO マウスの胎生 14 日目大脳皮質由来の神経幹細胞に、ゴルジ体を可視化できる Galactose-1-phosphate uridyl transferase (GalT) に Venus を融合させたプラスミドを導入し、ニューロンに分化させる。次に、ニューロン中の GalT-Venus 陽性領域にレーザーを集光し、褪色させた後、その領域に流入する Venus の蛍光強度の回復を解析する方法(光褪色後蛍光回復法)を用い、アルコール存在下での cKO マウス由来ニューロンにおいて Venus 分子の回復する速度が遅くなるかどうかを検討する。

### 研究項目 3 麻酔薬による斑点状活性型 Caspase-3 の検出の可能性の検証

これまでの研究から、小児期に中枢神経系が抗てんかん薬や麻酔薬に暴露されると、正常発達に障害が生じる可能性が示唆されている (Fujimura K. et al, 2016; Huang L. et al, 2016)。そこで、本研究によって得られる知見が、

これらの一般的な環境ストレスにおいても認められるかを検証するため、生後 7 日目の cKO マウス群をケタミンやイソフルラン等の麻酔薬に曝露し、活性型 Caspase-3 の染色パターン、及び一連の細胞内シグナルの変化を解析する。さらに、SC79 によってこれらの表現型が抑制できるかを検討する。

## 4 . 研究成果

### (1) 研究の主な成果

生後 7 日目の cKO マウス群に麻酔薬としてケタミンを投与すると、斑点状の活性型 Caspase-3 シグナルが、アルコール投与時と同様に、大脳皮質の第 5 層の神経細胞に多数検出されることを見出した (図 3)。また、臨界期中に環境ストレスとしてアルコールを曝露すると、一次繊毛を欠損していないマウスの大脳皮質の第 5 層神経細胞の一次繊毛膜上において、活性型 IGF-1 受容体に集積していることを見出した(図 4)。このことから、PI3K/Akt シグナル伝達経路が活性化されていることが示唆された。一方で、臨界期中に環境ストレスを与えた一次繊毛欠損マウスの大脳皮質の第 2/3 層神経細胞においても、斑点状の活性型 Caspase-3 が多数検出されることを見出している。研究代表者は、IGF-1 受容体が大脳皮質の第 2 層の神経細胞の一次繊毛膜上に集積していないことも確認しているため、第 5 層において発現している IGF-1 受容体を第 2 層に運搬する何らかのシステムが想定される。近年、一次繊毛の先端が干切れて細胞の外に放出される現象が発見され、細胞の外に放出された毛の先端部分に含まれているタンパク質を高精度に検出する方法が確立されている(Phua S.C. et al, *Cell*, 2017)。そこで、研究代表者は、胎生 14 日目大脳皮質由来神経細胞を用いて培養上清を回収し、超遠心法により細胞外小胞(Extracellular Vesicles; EV)を抽出する実験系を構築することに成功した。一次

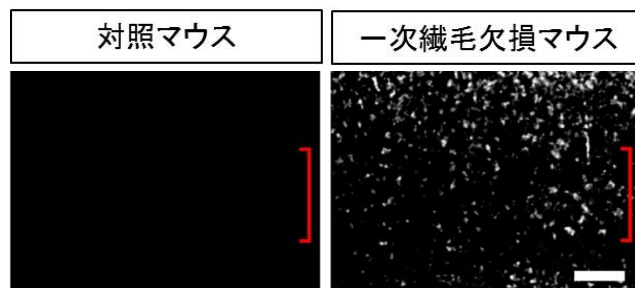


図 3. cKO マウスの大脳皮質にケタミンを曝露すると、第 5 層の神経細胞において斑点状の活性型 Caspase-3 の検出が顕著に増加する (左: ケタミンを投与した対照マウス、右: ケタミンを投与した cKO マウス)。スケールバーは 200  $\mu$ m。

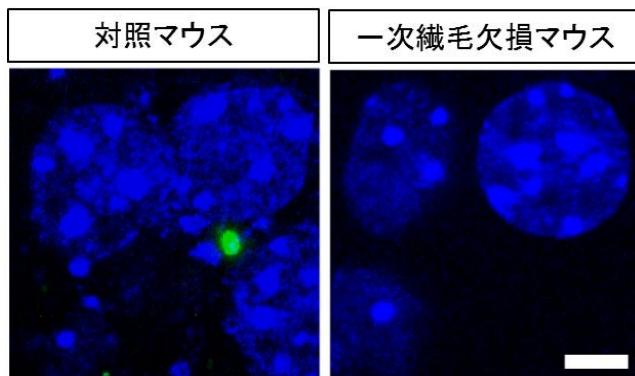


図 4. 一次繊毛を欠損していないマウスの大脳皮質にアルコールを曝露すると、リン酸化された IGF-1 受容体が検出される (左: アルコールを投与した対照マウス、右: アルコールを投与した cKO マウス)。スケールバーは 5  $\mu$ m。

切れて細胞の外に放出される現象が発見され、細胞の外に放出された毛の先端部分に含まれているタンパク質を高精度に検出する方法が確立されている(Phua S.C. et al, *Cell*, 2017)。そこで、研究代表者は、胎生 14 日目大脳皮質由来神経細胞を用いて培養上清を回収し、超遠心法により細胞外小胞(Extracellular Vesicles; EV)を抽出する実験系を構築することに成功した。一次



繊毛から放出される小胞のみを解析する手法として、繊毛を持つ細胞と持たない細胞、それぞれの培養上清から細胞外小胞(Extracellular Vesicles; EV)を超遠心法で回収することが考えられたが、生後 7 日目の大脳皮質の神経細胞を培養することは技術的に容易ではないため、生後の大脳皮質から EV を回収することに難渋すると考えられた。そこで、研究代表者は、胎生 14 日目大脳皮質由来神経細胞を用いて培養上清を回収し、超遠心法により胎生期大脳皮質由来の培養神経細胞から EV を抽出する実験系を構築することに成功した。

### (2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

一次繊毛は、細胞外のシグナルを感知するセンサーとして機能し、光、化学、機械刺激や、様々なシグナルを受容し細胞内へ伝達する。興味深いことに数多くの受容体が、リガンドの存在下で一次繊毛に集積し、その結果、細胞外シグナルを増強する。しかしながら、どのような分子機構で受容体が一次繊毛へ運ばれるのかは不明な点が多く、また、一次繊毛とストレス応答の関連については、これまでに報告されていなかった。本研究を通じて、一次繊毛を介した環境ストレス応答が、大脳皮質の樹状突起を変性から保護する役割を果たすことを発見した。研究代表者は、これまでに熱ショック応答という胎生期の脳皮質の保護機構を見出してきたが、臨界期、そして、それ以降においても、新たな大脳皮質の保護機構を提唱する根拠となる成果を得た。一次繊毛の形成異常や機能異常に起因すると考えられている遺伝性疾患は総称して繊毛病と呼ばれ、網膜色素変性症、嚢胞腎、多指症、水頭症、不妊、肥満など、多岐にわたる症状を呈するだけでなく、神経症状を伴うことも多いことが知られている。本研究において得られた知見は、今後、有効な治療法を確立していない繊毛病の神経症状に対して、画期的な治療法の開発の一助になると考えられる。本研究成果は、学術科学雑誌『Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America』に原著論文として掲載され、慶應義塾大学からプレスリリース発表も行った。この原著論文はこれまでに 17 回引用されており、国内外において本研究に対する関心の高さがうかがえる。

### (3) 今後の展望

研究代表者は、これまでに超遠心法により胎生期大脳皮質由来の培養神経細胞から EV を抽出することに成功した。哺乳類の細胞は、一次繊毛から放出される小胞以外にも、EV の一つであるエクソソームを放出しており、細胞を培養している培地から EV を集めてその含有物を調べても、それが繊毛から放出された小胞に入っているものなのか、エクソソームに含まれているものなのか区別できない。そこで、今後は繊毛を持つ細胞と持たない細胞、それぞれを培養した培地から EV を集め、プロテオミクスで小胞の含有物を比較することで、繊毛から放出された小胞の含有物として複数のタンパク質等が同定されることが期待される。

本研究において「環境ストレスに対する一次繊毛を介した臨界期中枢神経系の防御機構」の分子基盤を明らかにした事で、一次繊毛を介した環境ストレス応答機構という新たな概念を提唱することができ、一次繊毛に対する理解が深まるものと期待される。本研究において得られた知見は、今後、多岐にわたる繊毛病の発症メカニズムの理解や新たな治療法への応用に貢献できるものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Kaji Anna Arjun, Torii Masaaki, Ishii Seiji  | 4. 巻<br>45                    |
| 2. 論文標題<br>Caspase-3 inhibition toward perinatal protection of the developing brain from environmental stress  | 5. 発行年<br>2023年               |
| 3. 雑誌名<br>Developmental Neuroscience   | 6. 最初と最後の頁<br>66 ~ 75         |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1159/000529125  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                  |
| 1. 著者名<br>Shimada Hiroko, Sato Yuta, Sasaki Takashi, Shimozawa Aki, Imaizumi Kent, Shindo Tomoko, Miyao Sachiyo, Kiyama Kosuke, Kondo Takahiro, Shibata Shinsuke, Ishii Seiji, Kuromitsu Junro, Aoyagi Hirofumi, Ito Daisuke, Okano Hideyuki | 4. 巻<br>2                     |
| 2. 論文標題<br>A next-generation iPSC-derived forebrain organoid model of tauopathy with tau fibrils by AAV-mediated gene transfer   | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>Cell Reports Methods   | 6. 最初と最後の頁<br>100289 ~ 100289 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.crmeth.2022.100289   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |
| 1. 著者名<br>石井 聖二  | 4. 巻<br>94                    |
| 2. 論文標題<br>大脳皮質の一次繊毛が生み出す環境ストレス耐性機構の解明   | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>生化学  | 6. 最初と最後の頁<br>118 ~ 121       |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.14952/SEIKAGAKU.2022.940118   | 査読の有無<br>無                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Son Alexander I, Mohammad Shahid, Sasaki Toru, Ishii Seiji, Yamashita Satoshi, Hashimoto-Torii Kazue, Torii Masaaki  | 4. 巻<br>30                    |
| 2. 論文標題<br>Dual Role of Rbpj in the Maintenance of Neural Progenitor Cells and Neuronal Migration in Cortical Development  | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Cerebral Cortex  | 6. 最初と最後の頁<br>6444 ~ 6457     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/cercor/bhaa206   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                  |

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>Ishii Seiji, Sasaki Toru, Mohammad Shahid, Hwang Hye, Tomy Edwin, Soma Fahad, Ishibashi Nobuyuki, Okano Hideyuki, Rakic Pasko, Hashimoto-Torii Kazue, Torii Masaaki | 4. 巻<br>118        |
| 2. 論文標題<br>Primary cilia safeguard cortical neurons in neonatal mouse forebrain from environmental stress-induced dendritic degeneration                                      | 5. 発行年<br>2020年    |
| 3. 雑誌名<br>Proceedings of the National Academy of Sciences   | 6. 最初と最後の頁<br>1~10 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1073/pnas.2012482118   | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する       |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Mohammad Shahid, Page Stephen J., Wang Li, Ishii Seiji, Li Peijun, Sasaki Toru, Basha Aiesha, Salzberg Anna, Quezado Zenaide, Imamura Fumiaki, Nishi Hirotaka, Isaka Keiichi, Corbin Joshua G., Liu Judy S., Kawasawa Yuka Imamura, Torii Masaaki, Hashimoto-Torii Kazue | 4. 巻<br>23            |
| 2. 論文標題<br>Kcnn2 blockade reverses learning deficits in a mouse model of fetal alcohol spectrum disorders  | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Nature Neuroscience  | 6. 最初と最後の頁<br>533~543 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41593-020-0592-z  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する          |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>Ishii Seiji  | 4. 巻<br>2019        |
| 2. 論文標題<br>Environmental stress impacts the developing brain | 5. 発行年<br>2019年     |
| 3. 雑誌名<br>Impact   | 6. 最初と最後の頁<br>23~25 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.21820/23987073.2019.7.23      | 査読の有無<br>無          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>石井 聖二                        |
| 2. 発表標題<br>大脳皮質の一次繊毛が生み出す環境ストレス耐性機構     |
| 3. 学会等名<br>第127回 日本解剖学会総会・全国学術集会 (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2022年                         |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

|  |                                 |               |
|--|---------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称<br>Porous implantable devices | 発明者<br>Alexander I. SONら<br>他9人 | 権利者<br>同左     |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、US11534283B2         | 取得年<br>2022年                    | 国内・外国の別<br>外国 |

〔その他〕

|  |
|--|
| 慶應義塾大学プレスリリース（一次繊毛が生み出す環境ストレス耐性機構の解明）<br><a href="https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2021/1/6/28-77297/">https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2021/1/6/28-77297/</a>                             |
| 慶應義塾大学プレスリリース（次世代型認知症モデル脳オルガノイドの作製に成功 - 認知症患者の病理をミニチュア脳内で再現 - ）<br><a href="https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2022/9/9/28-131824/">https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2022/9/9/28-131824/</a> |

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|