

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17959

研究課題名（和文）脳室上衣繊毛ダイニン異常による非閉塞性水頭症の発症、増悪機序の分子学的解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of onset and exacerbation of non-obstructive hydrocephalus caused by abnormal ventricular ependymal ciliary dynein

研究代表者

竹内 和人 (Takeuchi, Kazuhito)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：90710088

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Dpcd KOマウスを用いて異常な繊毛運動の解析を行った。その結果内腕ダイニンの異常時に見られる振幅に異常が認められた。次に内腕ダイニンサブユニットについて免疫染色およびRNA発現を解析し、おもにDnah6の発現が低下していることがわかった。さらに、電子顕微鏡による内部構造の解析では内腕ダイニンの一部が確認されており完全欠損ではないことが確認された。次に脳室繊毛の単離を試みた。すり応力による脱繊毛がもっとも効率良く繊毛の回収が可能であり、濃度勾配を利用した繊毛水溶液の精製に成功した。この繊毛水溶液の濃度はクライオ電子顕微鏡による3D解析を可能とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでDpcdKOによる繊毛運動異常は内腕ダイニンの欠損によるものと報告されていた。我々の研究の結果、内腕ダイニンは完全欠損しておらず一部の発現が低下していることが示唆された。さらに内部構造の把握を進めるため、脳室繊毛の単離に取り組んだ。これまでに脳室繊毛の単離に成功した報告はなく極めて新規性が高いものである。我々は内部構造把握にはクライオ電子顕微鏡による3D画像の取得が重要と考え、これに耐える濃度の繊毛水溶液作成に取り組んだ。その結果、十分な濃度の繊毛水溶液を作成し、クライオ電子顕微鏡観察に成功している。今後繊毛運動に由来する脳疾患の研究に役立つものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Dpcd KO mice were used to analyze abnormal ciliary movements. We found that the amplitude of cilia movement was abnormal, which is observed in abnormal inner arm dynein. Next, immunostaining and RNA expression analysis of the inner arm dynein subunits revealed that the expression of Dnah6 was mainly downregulated. Furthermore, electron microscopic analysis of the internal structure showed that a portion of the inner arm dynein was present, confirming that it was not completely absent. Next, we attempted to isolate ventricular cilia. We succeeded in purifying an aqueous solution of cilia by using a concentration gradient, because shear stress is the most efficient way to recover cilia. The concentration of this aqueous cilia solution enabled 3D analysis by cryo-EM.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳室繊毛 ダイニン クライオ電子顕微鏡

### 1. 研究開始当初の背景

非閉塞性水頭症の原因として髄液吸収障害に加えて、脳室上衣の繊毛運動の機能不全による髄液還流障害も考えられている。*Dpccd* 遺伝子はダイニンを含むモータータンパク質複合体の発現調整に関与する。これまで我々は繊毛運動障害を示す水頭症モデルマウス (*Dpccd* ノックアウトマウス: *Dpccd* KO マウス) を用い、繊毛運動障害と髄液ダイナミクスの関係性について研究を行ってきた。この結果、*Dpccd* 遺伝子のノックアウトによる分子群の発現異常によりダイニンの分子構成と構造変化が起こることが示唆された。本研究開始時点では *Dpccd* KO マウスにおける繊毛分子構造異常は内腕ダイニンの欠損に伴うものであると報告がなされていた。しかしながら我々の先行研究では電子顕微鏡で一部の内腕ダイニン構造が維持されていることが示唆されていた。そこで、本研究で脳室繊毛の内部構造の解明を行うべきと判断した。

### 2. 研究の目的

繊毛は気管、卵管、脳室などの様々な体組織の細胞表面に多数存在する。これまでに脳室以外の繊毛については研究が進んでおり、その内部構造の把握も報告が散見されるようになってきている。このような背景の中で、脳室繊毛については単離技術が確立しておらず、内部構造の解析は事実上不可能な状態であった。このため、本研究の目的として、まず 脳室繊毛の単離・精製を行うことで、 繊毛単体での免疫染色および クライオ電子顕微鏡を用いた繊毛内部構造の把握に取り組むこととした。

### 3. 研究の方法

前述の目的を達成すべく、①～③の順に研究を進めた。

脳室繊毛の単離。他部位における繊毛の単離方法であるジブカイン、Ca ショックなどの薬物による単離、機械刺激など種々の単離方法を組み合わせる、あるいは改良することで単離する。得られた繊毛溶液について精製を行い②～③の研究につなげる。

繊毛単体での免疫染色。繊毛は微細な構造であり、脳室上衣組織に付着した状態での染色では十分な結果が得られなかった。このため 得られた繊毛単体を利用することで発現した内腕ダイニン構造の把握を行う。

クライオ電子顕微鏡による内部構造の把握。内腕ダイニンの立体構造を把握するためにはクライオ電子顕微鏡による撮像が有用と考えた。 得られた繊毛水溶液濃度を調整し脱膜処理を行ったうえでクライオ電子顕微鏡による解析を行う。

### 4. 研究成果

先行研究に続いて、脳室繊毛の動きの解析、内部構造について透過電子顕微鏡を用いて解析を行った。その結果 *Dpccd* KO マウスでは、繊毛運動の周波数には異常を認めず、振幅が大きく低下していることがわかった。これは内腕ダイニンの異常を示唆する所見であった。そこで、どの程度の内腕ダイニンの発現異常が見られるのか推察するため透過型電子顕微鏡を用いて検討を進めた。その結果、内腕ダイニンが一部維持されていることが確認された (Fig.1) が、これは先行報告の *Dpccd* KO マウスでは内腕ダイニンの完全欠損が見られるという報告と一致しないものであった。

この結果を受けて、内腕ダイニンのどのサブユニットが発現しているのかという疑問が生まれた。内腕ダイニンの構造を把握すべく、内腕ダイニンの種々の免疫染色に取り組んだが、上衣細胞に付着している状態での染色では十分な構造把握が難しいと判断し、繊毛の単離に取り組んだ。これまでに報告されている単離方法であるジブカインあるいは Ca ショックでは上衣細胞の剥離は見られないものの非常に少量の繊毛のみ脱毛される状態であり、解析には利用が難しいものであった。そこで気管繊毛で利用される機械刺激を試みた。単離される繊毛は少量存在するものの、上衣細胞とともに剥離されたものが多数を占め解析には至らなかった。そこで、濃度調整を行った Triton X を利用した流体のずり応力を用いたところ上衣細胞の少ない繊毛水溶液の採取に成功した。脱繊毛処理後上衣組織の観察を行ったところ、処理前に比較して処理後では繊毛基部に存在する tubulin が欠損しており、細胞骨格である catenin は破壊されているもののある程度維持されていることが確認され、十分な脱毛が行われたことがわかった。

しかしながら、本水溶液中には上衣細胞や脈絡叢組織など多数の不純物が混入し、繊毛同士が絡み合うような状態であった。この状態ではさらなる研究遂行は不可能と判断した。繊毛の絡みをとるため、ボルテックス、ピペッティングなど種々の方法を検討し、最終的にピペッティングが最も絡みを解消し、繊毛構造が保たれることがわかった。更に繊毛濃度を高めるため、Optiprep を用いて濃度勾配を作成し超遠心を行うことで繊毛水溶液の精製を行い、十分な濃度を有した繊毛水溶液の精製に成功した。

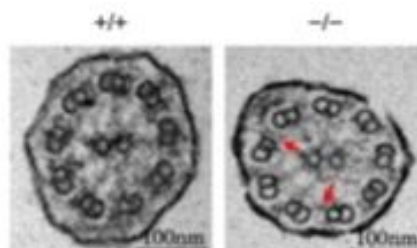


Fig.1 繊毛の透過型電子顕微鏡像

この繊毛水溶液を用いて、内腕ダイニン重鎖の免疫染色を施行したところ、一部の重鎖で低下が認められることがわかり、また損傷ダイニン重鎖も発現消失ではなく低発現していることが示唆された。また繊毛水溶液はクライオ電子顕微鏡にも対応可能であった。脱膜処理を行ったうえで観察を行ったところ、周辺微小管のうちA小管にMIPsと呼ばれる微小管内部構造が確認され、この内部構造は他部位の繊毛では見られない未知のものであることが確認された。目的とした内腕ダイニンの構造解析については前述の処理および脱膜処理の影響を受け、外腕ダイニンの多くが脱落しており平均化処理が難しく、現在のところ解明には至っていない。今後処理方法の改良を行うことで内腕ダイニン構造が明らかになることが期待される。またこれまで研究が難しかった脳室繊毛による水頭症発現のメカニズムが解明される可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kawabata Teppei, Suga Hidetaka, Takeuchi Kazuhito, Nagata Yuichi, Sakakibara Mayu, Ushida Kaori, Ozone Chikafumi, Enomoto Atsushi, Kawamoto Ikuo, Itagaki Iori, Tsuchiya Hideaki, Arima Hiroshi, Wakabayashi Toshihiko	4. 巻 11
2. 論文標題 A new primate model of hypophyseal dysfunction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10729
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-90209-3	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 Yamamoto Taiki, Takeuchi Kazuhito, Nagata Yuichi, Mizuno Akihiro, Harada Hideyuki, Saito Ryuta	4. 巻 -
2. 論文標題 A novel endoscopic ventriculocisternostomy and stenting technique with a transparent acrylic puncture needle for a trapped temporal horn: a technical report and literature review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurosurgical Review	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10143-021-01634-x	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 NOHIRA Shota, SHIMATO Shinji, YAMANOUCI Takashi, TAKEUCHI Kazuhito, YAMAMOTO Taiki, ITO Makoto, KATO Kyoza, NISHIZAWA Toshihisa	4. 巻 8
2. 論文標題 A Case of Primary Leptomeningeal Lymphoma Presenting with Hydrocephalus Characterized by Disproportionately Large Fourth Ventricle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NMC Case Report Journal	6. 最初と最後の頁 399 ~ 404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2176/nmccrj.cr.2020-0215	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 Shirasaka Nobuo, Yasuda Muneyoshi, Takeuchi Kazuhito, Ito Keisuke, Funai Mikiko, Maruga Yohei, Totsuka Takeaki, Hasegawa Yoshihito, Miyasaki Akihiro, Negoro Makoto	4. 巻 3
2. 論文標題 Impending Blindness by Obstructive Hydrocephalus Intractable to Endoscopic Third Ventriculostomy: Case Report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 SN Comprehensive Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 759 ~ 764
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s42399-020-00688-0	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 Tanaka Riki, Takeuchi Kazuhito, Ansari Ahmed, Sasaki Kento, Miyatani Kyosuke, Yamada Yasuhiro, Kawase Tsukasa, Kato Yoko, Horiguchi Akihiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Endoscopic-assisted paramedian infratentorial supracerebellar approach for pineal cyst ? How I do it Video clip	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgical Neurology International	6. 最初と最後の頁 336 ~ 336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.25259/SNI_354_2020	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 ISHIKAWA Takayuki, TAKEUCHI Kazuhito, YAMAMOTO Taiki, NAGATA Yuichi, NATSUME Atsushi	4. 巻 61
2. 論文標題 Importance of Hydrostatic Pressure and Irrigation for Hemostasis in Neuroendoscopic Surgery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 117 ~ 123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmc.oa.2020-0278	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 Yamamoto Taiki, Takeuchi Kazuhito, Nagata Yuichi, Mizuno Akihiro, Wakabayashi Toshihiko	4. 巻 145
2. 論文標題 Novel Endoscopic Technique for Inserting a Sheath into a Slit Ventricle: The Water-Slide Technique	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1 ~ 4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2020.08.206	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 Nagata Yuichi, Takeuchi Kazuhito, Yamamoto Taiki, Mizuno Akihiro, Wakabayashi Toshihiko	4. 巻 142
2. 論文標題 Fully Endoscopic Transcylinder Trans-Magendie Foraminal Approach for Fourth Ventricular Cavernoma: A Technical Case Report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 104 ~ 107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2020.06.171	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 KAWABATA Teppei, TAKEUCHI Kazuhito, NAGATA Yuichi, ISHIKAWA Takayuki, CHOO Jungsu, WAKABAYASHI Toshihiko	4. 巻 60
2. 論文標題 Endoscopic Treatment Strategy for a Disproportionately Large Communicating Fourth Ventricle: Case Series and Literature Review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 351 ~ 359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmc.oa.2019-0299	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 Tsuboi Takashi, Harada Yumiko, Suzuki Masashi, Ando Takashi, Atsuta Naoki, Ohka Fumiharu, Takeuchi Kazuhito, Taoka Toshiaki, Ohba Shigeo, Nakaguro Masato, Abe Masato, Nakashima Ichiro, Yoshida Mari, Katsuno Masahisa	4. 巻 193
2. 論文標題 Steroid-responsive recurrent tumefactive demyelination with multiple petechial hemorrhages along non-displaced medullary veins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neurology and Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 105764 ~ 105764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clineuro.2020.105764	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 Maeda Sachi, Ohka Fumiharu, Takeuchi Kazuhito, Wakabayashi Toshihiko, Natsume Atsushi et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 H3F3A mutant allele specific imbalance in an aggressive subtype of diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	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) 10.1186/s40478-020-0882-4	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 原田 英幸、竹内 和人、永田 雄一、山本 太樹、佐々木 博雄、水野 晃宏、大岡 史治、上野 裕則、齋藤 竜太
2. 発表標題 原発性繊維毛機能不全マウスにおける運動繊維毛の解析
3. 学会等名 第22回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田 英幸、竹内 和人、永田 雄一、山本 太樹、佐々木 博雄、水野 晃宏、大岡 史治、上野 裕則、齋藤 竜太
2. 発表標題 原発性繊毛機能不全マウスにおける運動繊毛の解析
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第81回学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水野 晃宏、竹内 和人、永田 雄一、原田 英幸、山本 太樹、佐々木 博勇、上野 裕則、夏目 敦至、齋藤 竜太
2. 発表標題 原発性繊毛機能不全マウスにおける脳室上衣繊毛の解析
3. 学会等名 第21回日本分子脳神経外科学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------