

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：63905

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21509

研究課題名(和文)脳内環境を守るクモ膜バリアの分子基盤と生理的意義の解明に向けた萌芽的研究

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular basis and physiological significance of arachnoid barrier protecting the brain environment

研究代表者

古瀬 幹夫(Furuse, Mikio)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・教授

研究者番号：90281089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：クモ膜は脳の周囲をとりまくバリアとして、脳内の液性環境の恒常性維持に寄与していると考えられながら、その構造や分子基盤の全貌はまだ明らかにされておらず、生理的意義を実験的に示した例もほとんどない。本研究では、このクモ膜バリア細胞に発現する、細胞間結合タイトジャンクションに関連するタンパク質群を明らかにするとともに、それら分子を人為的に欠失させたマウスを作出した。今後、これらマウスを詳細に解析することにより、クモ膜バリアの生理的意義が明らかにできると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クモ膜は脳内の液性環境の維持に重要なバリア構造であると古くから認識されながら、その生理的意義や病態との関わりについての研究は大きく遅れている。本研究で作成した遺伝子改変マウスは、クモ膜バリアの生理的意義を解明するための今後の研究に役立つとともに、未だ知見や治療法が定まっていない脳脊髄液減少症のようなクモ膜の機能低下に関連すると思われる疾患の理解にもつながることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The arachnoid membrane has been believed as a barrier to contribute to the homeostasis of the liquid environment in the brain. However, the whole picture of the structure and molecular organization of the arachnoid barrier is poorly understood. The physiological role of the arachnoid barrier has not been experimentally demonstrated. In this study, we have identified tight junction-associated proteins that are expressed in arachnoid barrier cells and generated mice lacking part of these proteins. Further detailed analysis of these mice is expected to clarify the molecular basis and physiological significance of the arachnoid barrier.

研究分野：細胞生物学

キーワード：クモ膜 タイトジャンクション

1. 研究開始当初の背景

脳が安定的に機能するためには神経細胞をとりまく液性環境の恒常性が欠かせない。脳実質を満たす細胞外液の電解質組成は厳密に保たれており、栄養の供給も厳しくコントロールされている。安定した脳実質の細胞外液の環境を規定する2大要素は、脳脊髄液の産生・フローおよび脳実質への浸透と、脳実質を外部環境から仕切るバリア構造である。これらのはたらきが滞ると脳機能に様々な異常が引き起こされると考えられる。

脳実質の細胞外液の恒常性維持に必要なバリアとして血液-脳関門がよく知られている。血液-脳関門の主体は、脳内に入り込んで張り巡らされた血管の内皮細胞であり、細胞膜上の薬物排出ポンプと、内皮細胞間隙から脳実質への有毒物質の流入を防ぐための細胞間結合である「密着結合」を含む。特に細胞間隙を介する脳実質への物質の漏れは重大な影響をもたらす。血管内皮細胞の密着結合の構造タンパク質クロロディン5を欠失させたマウスは血液-脳関門の著しい破綻により生後致死である (Nitta et al., J Cell Biol 161:653, 2003)。

一方、血液-脳関門とは別に、脳を守るためのバリアが存在する。それは脳の表層を覆うクモ膜バリアである(図1)。クモ膜は数層の扁平な細胞からなり、電子顕微鏡形態学によると細胞間隙をシールする密着結合をもつ(Nabeshima et al., J Comp Neurol 164:127, 1974)。クモ膜の外側の硬膜には透過性の高い血管が豊富に存在するが、そこから漏出した血液成分や水溶性トレーサーはクモ膜でせき止められ、内側のクモ膜下腔・脳実質に侵入することができない (Nabeshima & Reese, J Neuropath Exp Neurol 31:176, 1972)。すなわち、クモ膜は脳脊髄液を外部環境から守るバリアであり、脳内液性環境の恒常性維持にきわめて重要な役割を果たしていると推測される。しかし、1970年代の形態学的観察以降、クモ膜バリアにおける細胞間隙の透過バリアの全体像、分子実体、個体における生理的意義は解明されておらず、脳外科等の臨床分野でもバリアとしてのクモ膜の役割はほとんど注目されてこなかった。適当な実験モデルがないために、クモ膜バリアの機能低下がどのような病態を引き起こすかについても謎のままである。

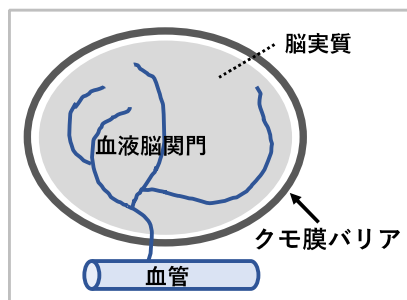


図1. クモ膜バリアと血液脳関門

2. 研究の目的

本研究では、細胞間隙の透過性を規定する細胞間結合である密着結合に着目してクモ膜バリアの実体を解明することを目指し、以下の3つの目的を設定した。

(1) 上皮組織において分子構成が明らかにされてきた密着結合の知見をクモ膜に当てはめ、密着結合の構造と機能発現に中心的な役割を果たすクロロディンファミリーの各サブタイプ及びその他の密着結合関連分子のクモ膜における発現と空間的分布を免疫染色により光学顕微鏡レベルで明らかにする。

(2) 密着結合がクモ膜に存在することが電子顕微鏡ですでに示されているとはいえ、空間的に密着結合が連続していなければクモ膜全体としてバリア機能を果たすことができない。しかし、密着結合のマクロな空間分布は全く明らかにされていない。また、電子顕微鏡で非常に薄い数層のクモ膜細胞が重なったように観察されるクモ膜細胞が、空間的にどのように配置しているかについてもほとんど情報が無い。そこで、クモ膜におけるクモ膜細胞の形態と立体的な配列を電子顕微鏡レベルで明らかにして、密着結合の空間分布を理解するための基礎情報を得る。

(3) 目的(1)、(2)において明らかにした密着結合関連分子を欠失させることによりクモ膜バリア破綻マウスを樹立することを目指し、クモ膜に発現する密着結合関連分子を単体で欠失するマウスを入手し、あるいは多重欠失するマウスを作出して、クモ膜における密着結合の形態変化を観察するとともに、クモ膜のバリア機能を評価する。

3. 研究の方法

(1) クモ膜に発現する密着結合関連分子の探索

クモ膜に発現する密着結合関連分子を同定するために、入手できる抗体を用いて蛍光免疫染色を実施した。安楽死させたマウスより採取した脳を無固定で凍結包埋した後、カバーガラス上に凍結切片を作製した。風乾後、氷温で95%エタノールにより30分固定し、次に室温のアセトンで1分処理して、リン酸緩衝液(PBS)で洗浄した。1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含むPBSでブロッキングを行った後、密着結合関連分子に対する抗体で標識し、PBSで洗浄後、蛍光二次抗体を結合させ、さらに洗浄して包埋し、蛍光顕微鏡で観察を行った。また、最新の文献情報にもとづき、Eカドヘリンを蛍光免疫染色のクモ膜のマーカーとした (Desisto et al. Dev Cell 54:43-59, 2018)

(2) 三次元再構築を目指したクモ膜の電子顕微鏡観察

マウスを深麻酔科でグルタルアルデヒド、パラホルムアルデヒドを含むカコジル酸緩衝液で灌流固定し、脳を採取後、細切してさらに固定を行った。洗浄後、後固定し、電子染色した後、レジンに包埋して固化させた。レジンから切り出した脳組織を連続断面走査電子顕微鏡にセットして、厚さ 50 nm 程度で数百枚から千枚程度の切片を切り、残った組織ブロックの表面を走査電子顕微鏡で撮像してデータを取得した。

(3) クモ膜バリア破綻マウスの作出のためのマウス系統の入手あるいは樹立とクモ膜バリアの評価

クローディン 11 遺伝子欠失マウス (Kitajiri et al. J Cell Sci 117:5087-96, 2004)を凍結受精卵から作製した。Bern 大学の Britta Engelhardt 博士より JAM-C 遺伝子欠失マウス (PLoS One. 7:e45619, 2012)の分与を受けた。その他、3 細胞結合関連タンパク質の遺伝子欠失マウスの樹立して交配を行った。

クモ膜バリアを評価するアッセイとして、安楽死直後のマウスの頭蓋を除き、露出させた大脳の表面から、HANKS 液に 1-2mg/ml で溶解させたビオチン化試薬(NHS-Sulfo-Biotin)を滴下し、5 分後に 10%FCS を含む HANKS で洗浄した。直後に脳を摘出して無固定あるいは 4%PFA で固定した後に凍結包埋し、凍結切片を作製した。これに蛍光標識ストレプトアビジンを添加してビオチン化試薬の脳内への浸透を可視化した。

4. 研究成果

(1) クモ膜に発現する密着結合関連分子の探索

蛍光免疫染色により、クモ膜にクローディン 11、オクルディン、ZO-1、JAM-C 各タンパク質が発現していることを明らかにした。これらの分子は細胞間結合を形成していることを示唆する線状の分布を示し、概ね互いに共局在していた。また、E カドヘリンが免疫染色レベルでクモ膜細胞のよいマーカーとなることを確認した。クローディンファミリーについては、クローディン 11 以外の発現を認めなかった (図 2)。

(2) 三次元再構築を目指したクモ膜の電子顕微鏡観察

連続ブロック断面走査顕微鏡による観察とその後のセグメンテーションによるクモ膜細胞の形態および細胞同士の結合の三次元再構築を実施するために 50 nm ずつ切削しながら試料表面のイメージを取得した。報告書作成時点でセグメンテーションは途中であるが、継続することによりクモ膜細胞の立体構造を記述できると期待されるレベルのデータを得ることができた。

(3) クローディン 11 欠失マウスのクモ膜バリアの評価

クモ膜のバリア機能の評価法を確立するために試行錯誤を重ねた結果、安楽死直後のマウスの頭蓋の一部を慎重に取り除けば、露出した脳の表面にほぼクモ膜が残存することわかった。この状態で脳表面から分子量約 400 のビオチン化試薬をトレーサーとして投与した。その後、脳の凍結切片に対して蛍光標識ストレプトアビジンを反応させてビオチンの結合部位を可視化することにより、バリア機能を検討した。予想に反し、クローディン 11 欠失マウスにおいてこの方法ではクモ膜のバリア機能の低下は検出できなかった (図 3)。この結果は、クモ膜のバリア機能がクローディン 11 以外に発現する密着結合関連分子も寄与して形成されていることを示唆する。したがって、クモ膜バリア破綻マウスモデルを樹立するには、今後それらとクローディン 11 の多重欠失マウスを作製する必要があると考えられる。特に 3 細胞結合関連タンパク質の欠失に期待がもてる。

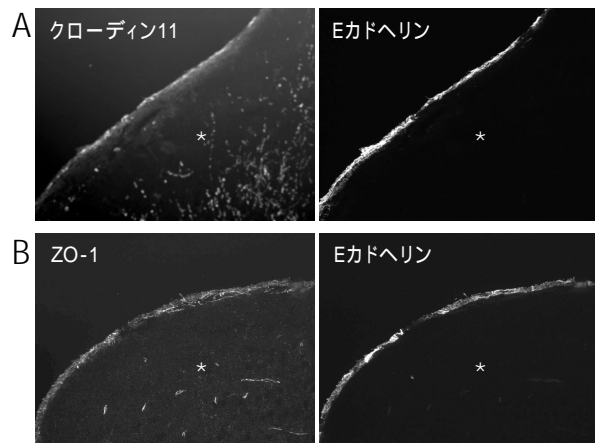


図2. マウス脳のクモ膜における密着結合関連分子の発現 (蛍光免疫染色). A. クローディン11抗体とEカドヘリン抗体による二重染色. B. ZO-1抗体とEカドヘリンによる二重染色. *は脳実質.

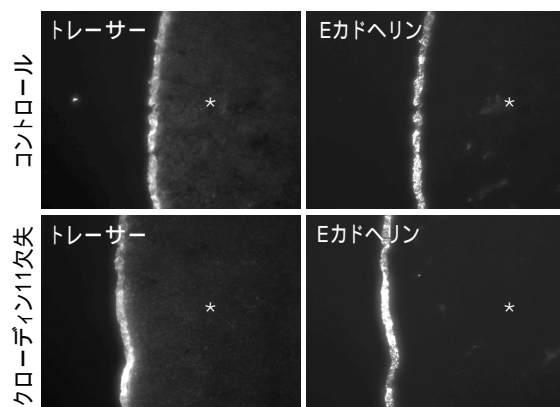


図3. クモ膜バリアの評価. コントロールマウス、クローディン11欠失マウスともに、脳表面から投与したトレーサーはEカドヘリンで二重染色されるクモ膜に強く検出されるが、脳実質 (*)への顕著な浸透は観察されなかった.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 0件）

1. 著者名 Sugawara Taichi, Furuse Kyoko, Otani Tetsuhisa, Wakayama Tomohiko, Furuse Mikio	4. 巻 220
2. 論文標題 Angulin-1 seals tricellular contacts independently of tricellulin and claudins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202005062
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202005062	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0件

〔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
---------	---------