

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06837

研究課題名（和文）神経炎症における傷害性アストロサイト一次繊毛の形成と機能の解明

研究課題名（英文）Formation and function of primary cilia in cytotoxic astrocyte in neuroinflammation

研究代表者

伊東 広（ITO, Hiroshi）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・客員教授

研究者番号：10183005

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）：後期高齢者社会を迎えアルツハイマー病やパーキンソン病の発症のメカニズムの解明が重要となっている。認知症の発症には慢性の神経炎症が関わっていることが明らかになっているが、アストロサイトの関与は不明な点が多く残されている。近年、アストロサイトの多様性および細胞障害性を示す活性型アストロサイトが見出された。本研究においては神経炎症時の障害性アストロサイトの生成に、細胞のアンテナとして働く一次繊毛がどのような役割を果たしているかを明らかにしようとした。その結果、一次繊毛が神経炎症時に伸長するとともに障害性アストロサイトの生成に寄与すること、認知機能の低下に関与することを示す結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経炎症は、アルツハイマー病やパーキンソン病などの進行性神経変性疾患で起こり病態の進行に寄与していると考えられている。本研究により神経炎症時にみられる神経細胞障害性アストロサイトの誘導および神経細胞死、さらに認知機能低下の一端にアストロサイトの一次繊毛が大事な働きをすることが明らかになった。神経炎症時にアストロサイトの一次繊毛の機能を抑制することにより、進行性の神経変性疾患を抑制できる可能性が判明した。本研究成果は現在画期的な治療薬が存在しないこれらの疾患の標的として、アストロサイトの一次繊毛に的を絞った治療薬探索に向けた第一歩となることが大いに期待される。

研究成果の概要（英文）：As society enters an era with a growing population of elderly individuals, it becomes increasingly important to elucidate the mechanisms underlying the onset of Alzheimer's disease and Parkinson's disease. It has been revealed that chronic neuroinflammation is involved in the onset of dementia; however, many aspects of the involvement of astrocytes remain unclear. Recently, diversity among astrocytes and the presence of reactive astrocytes exhibiting cytotoxicity have been discovered. In this study, we aimed to clarify the role of primary cilia, which function as cellular antennae, in the generation of cytotoxic astrocytes during neuroinflammation. The results indicated that primary cilia elongate during neuroinflammation and contribute to the generation of cytotoxic astrocytes, which are involved in cognitive impairment.

研究分野：分子薬理学

キーワード：アストロサイト 一次繊毛 神経炎症

## 1. 研究開始当初の背景

脳には神経ネットワークを形成し神経活動を担う神経細胞と、神経細胞に働きかけ神経ネットワークの構築に寄与するグリア細胞が存在する。グリア細胞の中でもアストロサイトは神経細胞よりも数的に多く存在して、これまでは神経細胞への栄養供給や有害物質の除去など、神経細胞および神経ネットワークの形成にポジティブな役割を果たすことがよく知られていた。実際、脳および脊髄の損傷時に活性化されたアストロサイトが修復に貢献するが、近年、神経炎症時において保護的に働く活性化アストロサイト (A2 アストロサイト) とは逆に神経細胞障害性を示す別の活性化アストロサイト (A1 アストロサイト) も存在することが見出された。高齢者の割合が増えるとともに認知症が大きな問題となってきたが、慢性的な神経炎症が起因とされるアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患において、この細胞障害性アストロサイトが誘起されることも報告された。しかしながら、アストロサイトがどのような仕組みで細胞障害性アストロサイトに形質を変化させるかについては分かっていなかった。

一方、一次繊毛はほとんど全ての細胞に存在し細胞表面から突起している構造体であり、細胞外のシグナルを受け取るアンテナとして機能している。一次繊毛の形成および機能不全により起こる疾患を繊毛病と呼び、いくつかの組織において細胞の増殖や分化に寄与することが知られているが、アストロサイトにおける一次繊毛の役割に関してはほとんど分かっていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

神経炎症時に誘導される細胞障害性 A1 アストロサイトの一次繊毛の変化を観察するとともに、一次繊毛が A1 アストロサイトの生成に関与するかどうか、さらに神経炎症によって引き起こされる認知機能の低下にアストロサイトの一次繊毛が寄与する可能性を検証することを目的とした。ほとんど解明されていないアストロサイトの一次繊毛に着目し、神経炎症における一次繊毛の生理機能を調べた研究はこれまで報告がなく、神経変性疾患や脳・脊髄損傷時における過剰な炎症反応による A1 アストロサイトの形成の抑制を視野に入れた新しい創薬標的の提示も目指している。

## 3. 研究の方法

### (1)初代培養系におけるアストロサイトの一次繊毛の同定と動態の観察

マウス新生児の脳からグリア細胞を調製した。アストロサイトは長期培養したグリア細胞から細胞接着性の違いをもとにミクログリアやオリゴデンドロサイトを排除して実験に供した。一次繊毛の同定には一次繊毛のマーカータンパク質である ARL13B に対する抗体を用いた免疫染色を行った。アストロサイトの同定にはマーカータンパク質であるグリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) に対する抗体、そして細胞障害性 A1 アストロサイトのマーカーである C3 タンパク質に対する抗体をそれぞれ用いて免疫染色し蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

### (2)神経炎症を起こしたマウス脳から脳切片の調製と免疫染色

マウス腹腔内へリポポリサッカライド (LPS) を定期的に投与したのちマウス大脳を取り出し固定化し保存した。固定化した脳の切片を調製した後、それぞれのマーカータンパク質に対する抗体を用いた免疫染色を行った。生理食塩水を同様に投与したマウスをコントロールとした。

### (3)マウスの認知機能の解析

生理食塩水あるいは LPS を腹腔内投与したマウスを用いて新規物質認識能を評価した。マウスをフィールド上に 2 つの形状の異なる物体を置いた環境に順応させた後、一つの物体を変えてそれぞれの物体へ近づく時間と回数を計測した。

### (4)一次繊毛不全を誘導するノックダウンとノックアウトの作成法

アストロサイトの一次繊毛不全を行うために一次繊毛形成に必須である IFT88 の siRNA をリポフェクトアミン RNAiMAX を用いてアストロサイトへ導入した。薬剤誘導的にアストロサイト特異的に一次繊毛をノックアウトするマウスを作成するためにジャクソンラボラトリーから IFT88 のエクソン 4-6 を Cre 存在下で欠失する B6.129P2-Ift88tm1Bky/J マウス (#022409)の凍結胎児を、理化学研究所からアストロサイト特異的に Cre を薬剤誘導できる C57BL/6-Slc1a3(GLAST)<tm1(crePR)Ksak> マウス(RBRC02350)の精子を購入した。どちらのマウスも飼育した後、両者のマウスを掛け合わせ目的とするマウスを得るために薬剤 RU486 を腹腔内投与し IFT88 コンディショナルノックアウト(cKO)マウスを作成した。

## 4 . 研究成果

マウス新生児の皮質より調製したグリア細胞はアストロサイトの他にミクログリアや 前駆細胞の混ざりである。最初にグリア細胞の培養液に LPS を添加して培養したところ、LPS 添加により細胞障害性アストロサイトマーカー C3 の発現上昇が認められた。一方、純化したアストロサイトは LPS 処理による C3 発現上昇は見られなかった。しかしながら既報通り IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , C1q の 3 種の生理活性物質の添加により顕著な C3 発現上昇が認められた。

次に一次繊毛の形態を抗 ARL13B 抗体を用いて調べたところ C3 発現細胞においては有意に一次繊毛が伸長していることが判明した。また IFT88 siRNA を導入したアストロサイトを調べたところコントロール siRNA を導入したアストロサイトに比べ一次繊毛の伸長が抑えられ、C3 の発現も抑制された。さらに C3 の発現と一次繊毛の伸長を詳しく調べたところ 3 種生理活性物質の添加後 1 時間で一次繊毛の伸長が起こり C3 の発現は添加後 6 時間経ってから認められた。これらのことから一次繊毛の形成が細胞障害性アストロサイトの誘導を促進することが示唆された。

次にマウスを用いた *in vivo* の実験を行った。*In vitro* 培養系で見られたようにマウス腹腔に LPS を投与した際に、脳内において GFAP+で C3+の細胞障害性アストロサイトの増加、および神経細胞死が増加していることが確認できた。また、LPS 投与したマウスの行動実験を行ったところ、Open field test や Y-maze test ではコントロールマウスと比べて違いが認められなかったが、Novel object recognition test (新規物体認識テスト)において LPS 投与は新規物体に興味を示す行動が低下していることが判明した。さらに薬剤誘導でアストロサイト特異的に一次繊毛をノックアウトするマウスを作成し、同様の新規物体認識テストを行ったところコントロールで見られた LPS 投与による C3 発現細胞の増加と細胞死の増加が抑制されるとともに新規物体認識能の低下も抑える結果が得られた。

以上の研究成果は、神経炎症時に細胞障害性アストロサイトが誘導される時に一次繊毛が強く寄与していることを示すものである。神経炎症はアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患に共通して起こる現象であり、神経炎症の悪化に細胞障害性アストロサイトによる神経細胞死が深く関与している。本成果は神経炎症時のアストロサイトの一次繊毛の機能抑制が神経変性疾患の治療戦略となりうることを初めて示したものであると言える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Tetsuo Kobayashi, Tatsuya Ikeda, Reo Ota, Takafumi Yasukawa, Hiroshi Itoh.	4. 巻 135
2. 論文標題 The atypical small GTPase RABL3 interacts with RAB11 to regulate early ciliogenesis in human cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Cell Sci	6. 最初と最後の頁 jcs260021
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.26002	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 Yu Mashima, Hayato Nohira, Brian David Dynlacht, Tetsuo Kobayashi, Hiroshi Itoh.	4. 巻 5
2. 論文標題 KIF24 depletion induces clustering of supernumerary centrosomes in PDAC cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Sci Alliance	6. 最初と最後の頁 e202201470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202201470	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 該当する
1. 著者名 Yusuke Nojima, Manami Toriyama, Kenji Tago, Norikazu Mizuno, Kazuhiro Morishita, Hiroshi Itoh.	4. 巻 28
2. 論文標題 GPR56 C-terminal fragment mediates signal received by N-terminal fragment of another adhesion GPCR Latrophilin1 in neurons.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 83-96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12994	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 Y. Mashima, H. Nohira, H. Sugihara, B.D. Dynlacht, T. Kobayashi T, H. Itoh	4. 巻 -
2. 論文標題 KIF24 controls the clustering of supernumerary centrosomes in pancreatic ductal adenocarcinoma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1111/gtc.12994	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 該当する

1. 著者名 T. Kobayashi, T. Ikeda, R. Ota, T. Yasukawa, H. Itoh	4. 巻 -
2. 論文標題 Atypical small GTPase RABL3 interacts with RAB11 to regulate early ciliogenesis in human cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	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) 10.1101/2022.03.16.484562	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 S. Sarmoko, D. Novitasari, M. Toriyama, M.S. Fareza, N.A. Choironi, H. Itoh, E. Meiyanto.	4. 巻 22
2. 論文標題 Different modes of mechanism of gamma-mangostin and alpha-mangostin to inhibit cell migration of Triple Negative Breast Cancer (TNBC) cells concerning on CXCR4 downregulation and ROS generation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Iran J Pharm Res	6. 最初と最後の頁 e138856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5812/ijpr-138856	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 該当する

1. 著者名 M. Toriyama, D. Rizaldy, M. Nakamura, Y. Atsumi, M. Toriyama, F. Fujita, F. Okada, A. Morita, H. Itoh, K.J. Ishii	4. 巻 10
2. 論文標題 Dendritic cell proliferation by primary cilium in atopic dermatitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Front Mol Biosci	6. 最初と最後の頁 1149828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2023.1149828	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 該当する

1. 著者名 Nor Atiqah Muhamad, Shota Furukawa, Shunsuke Yuri, Michinori Toriyama, Kohei Masutani, Chuya Matsumoto, Seiya Itoh, Yuichiro Shinagawa, Ayako Isotani, ManamiToriyama, Hiroshi Itoh	4. 巻 44
2. 論文標題 Astrocyte-specific inhibition of primary cilium suppresses C3 expression in reactive astrocyte	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Mol Neurobiol	6. 最初と最後の頁 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10571-024-01482-5	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 該当する

1. 著者名 T. Fushimi, T. Kobayashi, H. Itoh	4. 巻 666
2. 論文標題 CEP164-GLI2 association ensures the hedgehog signaling in pancreatic cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 179-185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.05.031	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8件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 鳥山真奈美、伊東 広
2. 発表標題 免疫応答における一次繊毛の機能解析
3. 学会等名 第19回生命科学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伏見勇彦、小林 哲夫、伊東 広
2. 発表標題 膵臓がん細胞における中心小体タンパク質CEP164を介したヘッジホッグシグナル制御
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 多胡憲治、杉山直幸、太田 聡、大村千尋、松儀実広、柳澤 健、富永 薫、伊東 広、多胡めぐみ
2. 発表標題 B-Ras結合タンパク質TRB3は新規のがん抑制シグナル分子として機能する
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nor Atiqah Binti Muhamad, Manami Toriyama, Hiroshi Itoh
2. 発表標題 Primary cilia functions in neurotoxic (A1) reactive astrocytes
3. 学会等名 第67回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sarmoko, Noriko Kaji, Manamai Toriyama, Hiroshi Itoh
2. 発表標題 Functional Analysis of Adhesion GPCR Latrophilin 2 (ADGRL2) in MDA-MB-231 Human Breast Cancer cells
3. 学会等名 16th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林哲夫、田中勇彦、伊東 広
2. 発表標題 膵管がんにおける新しいヘッジホッグシグナル伝達機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平岩絵梨花、中山夏海、Endah Puji Septisetyani、鈴木智之、梶紀子、鳥山真奈美、伊東 広
2. 発表標題 ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 を制御する抗GPR56機能性抗体の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田朱美、Nur Ayunie Binti Zuelkepli、多胡憲治、小林哲夫、伊東 広
2. 発表標題 哺乳動物細胞を用いたSUMO化修飾の調節機構の解析
3. 学会等名 第67回日本生化学会近畿支部例会
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