

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590189

研究課題名（和文） 神経細胞に於ける新規情報伝達システムの分子細胞生物学的解析

研究課題名（英文）Molecular Cell Biology of a Novel Signaling System in Neurons

研究代表者

竹田 扇（TAKEDA SEN）

山梨大学・医学工学総合研究部・教授

研究者番号：20272429

研究成果の概要（和文）：本研究では主に神経細胞の一次繊毛の情報伝達機構を解析するものであったが、同時にグリア細胞での一次繊毛の機能も解明する事が出来た。アストロサイト、脈絡上皮細胞、シュワン細胞の夫々での一次繊毛の機能の一端が解明され、今後のニューロン・グリア連関という枠での発展が期待できる成果であった。また、神経細胞に関しては一次繊毛の存在する G 蛋白質共役受容体（GPCR）に関する基礎的知見を得たので、今後の解析の方向性が決定された。

研究成果の概要（英文）：I analyzed various functions of primary cilia in glial cells, in addition to the elucidation of neuronal primary cilia. These novel findings on the molecular mechanisms underlying the signaling processes through primary cilia may pave the way into analysis in terms of neuron-glia interaction. Furthermore, stimulation of neuronal primary cilia with agonist to Hedgehog receptors provoked intracellular oscillation that may lead to dedifferentiation of the cells. I will further focus on this intriguing phenomenon in future project.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：神経細胞、一次繊毛、グリア細胞、シグナル伝達系、ヘッジホッグ

1. 研究開始当初の背景

神経細胞（neuron）でのシグナル伝達は古くからシナプス伝達知られているが、それ以外の様式に関しては殆ど知られていなかった。一方、一次繊毛（primary cilia）は血球系など浮遊細胞を除く体の殆ど全ての細胞に存在することから、神経細胞やグリア細胞（glia）でどの様な役割を担っている

かが注目されていた。特に繊毛関連分子の突然変異によって齎される繊毛症（ciliopathy）が精神遅滞、中枢性肥満などを惹起することが知られており、繊毛を介した神経のシグナル伝達機構に問題のある可能性が指摘され始めていた。本研究が開始した頃には神経細胞の一次繊毛が記憶の形成に関与していることが丁度報告されたこと

ろであったが (Einstein et al., 2010)、それ以外の機能や分子機構に関しては殆ど知られていない状況にあった。

2. 研究の目的

本研究の目的は大きく次の4つに分けられる。

- (1) 神経細胞のシグナル伝達に於ける一次繊毛の役割を分子レベル、特に GPCR の機能を中心に解析する。
- (2) グリア細胞の代表である星状膠細胞 (astrocyte) の一次繊毛の機能を解析し、神経細胞に与える影響を考察する。
- (3) 神経系でのシグナル伝達速度を規定するシュワン細胞に於ける一次繊毛の機能を解析することで、末梢神経グリア細胞が一次繊毛を介してどの様に神経機能を調節しているかを解明する。
- (4) 繊毛のプロテオーム解析を行って、どの様なシグナル伝達素子が繊毛の機能を規定しているかを解析し、今後の研究の方向性を決定する。

3. 研究の方法

- (1) 神経細胞の一次繊毛に於ける GPCR の機能と細胞分化
生後1日目 (P1) のマウス胚から、海馬神経細胞の初代培養を行い、1週間かけて神経突起の成長とグリア細胞の増殖を促した。この時点で神経系細胞の一次繊毛に特異的に局在することが知られている adenylyl cyclase III (ACIII) に対する抗体、一次繊毛に局在することが知られている GPCR であるソマトスタチン受容体3型 (sstr3) や soomethened (smo) に対する抗体で染色を行い、一次繊毛の存在並びに応答可能性を検討した。最後に Fura2 をロードし状態でこれらの受容体を刺激する作動薬 (agonist) を投与して細胞内 Ca^{2+} の変動を解析した。同時にこの反応系の生理的意義を抗ネスチン (nestin) 抗体で検証した。
- (2) 星状膠細胞に於ける一次繊毛の機能解析
マウスよりグリア細胞 (astrocyte) 初代培養を立ち上げ、一次繊毛の存在を確認した。培養を安定させた後に培地から血清を除去し細胞にストレスを与えた。この時、ソニックヘッジホッグ (sonic hedgehog, shh) を投与した時とそうでない時の細胞生存率の比較を行った。
- (3) シュワン細胞に於ける一次繊毛と髄鞘形成機構の解明
マウス坐骨神経よりシュワン細胞 (Schwann) と後根神経節の ex vivo 初代培養系を立ち上げ、シュワン細胞での一次繊毛の存在を確認した。約10日の培養を行って安定させた後、培地に各種ヘッジホッグ (shh, ihh, dhh) や smo 作動薬

を投与し、髄鞘形成の程度を対照群と比較を行った。

- (4) 繊毛のプロテオーム解析
ブタ脈絡叢を塩酸ジブカインで脱繊毛し、そこから密度遠心勾配法、分画遠心法を用いて繊毛分画を濃縮した。この分画をトリプシン限定分解し、得られたペプチド断片を LTQ Orbitrap Velos で質量分析した。その後、Mascot を用いて蛋白質の同定を行って、繊毛のプロテオームを決定した。
- ## 4. 研究成果
- (1) 神経細胞の一次繊毛に於ける GPCR の機能と細胞分化
 - ① 一次繊毛上のsstr3やptchを刺激すると、一部の細胞で Ca^{2+} 振動の上昇が見られた。
 - ② Ca^{2+} 振動が持続的になった細胞ではnestinの発現レベルが上昇したのがあり、脱分化が惹起された可能性がある。
 - ③ 現在、 Ca^{2+} 振動を齎す Ca^{2+} がどのチャンネルや貯蔵場所に由来するものであるかを検討している。
 - (2) 星状膠細胞に於ける一次繊毛の機能解析
 - ① 培養系で星状膠細胞に一次繊毛が存在することを確認した。
 - ② 低栄養ストレスを与えると、星状膠細胞の細胞死亡率の上昇が見られたが、ヘッジホッグ系のアゴニストで刺激を行うと細胞死の減少が見られた。
 - ③ 一次繊毛を消失させると、SAGを投与しても細胞死の減少は見られず、一次繊毛を介したヘッジホッグシグナル伝達が星状膠細胞の生存を規定していることが明らかになった。
 - (3) シュワン細胞に於ける一次繊毛と髄鞘形成機構の解明
 - ① シュワン細胞の一次繊毛を同定した。
 - ② シュワン細胞の一次繊毛は髄鞘形成が開始すると退縮することを示した。
 - ③ シュワン細胞による髄鞘形成は一次繊毛が存在する状態でデザートヘッジホッグ (desert hedgehog, dhh) 処理を行うと促進することが判った。
 - ④ Hhシグナル伝達をcyclopamineを用いて阻害すると、髄鞘形成も阻害されることが判った。
 - (4) 繊毛のプロテオーム解析
 - ① ブタ脈絡叢から比較的高純度の繊

- 毛分画を得ることに成功した。
- ② 1115 の分子が同定され、この中からコンタミネーションと思われるものを除いた 868 分子を繊毛プロテオームとして同定した。
 - ③ 一次繊毛のプロテオームであるが、繊毛運動に関係するものが 152 分子存在した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

1. Nagata, S., Hamamoto, A., Horikawa, M., Yoshimura, K., Takeda, S. and Saito, Y. Characterization of ciliary targeting sequence of rat melanin-concentrating hormone receptor 1. *General and Comparative Endocrinology*. 2013. (in press) (査読有)
2. Mandal, M.K., Subhrakanti, S., Yoshimura, K., Shida, Y., Takeda, S. Nonami, H. and Hiraoka. Biomolecule analysis and cancer diagnostics by negative mode probe electrospray ionization. *Analyst*. DOI: 10.1039/C3AN36554A. 2013. (査読有)
3. Yoshimura, K. and Takeda, S. Hedgehog signaling regulates the myelination of peripheral nerve axons through the primary cilia. *Differentiation*. 83, S178-185. 2012. (査読有)
4. Takeda, S. and Narita, K. Categories of cilia: Structure and function of vertebrate cilia, towards new taxonomy. *Differentiation*. 83, S4-11. 2012. (査読有)
5. Takeda, S. and Narita, K. Categories of cilia: Structure and function of vertebrate cilia, towards new taxonomy. *Differentiation*. 83, S4-11. 2012. (査読有)
6. Takeda, S., Yoshimura, K. and Hiraoka, K.: Innovations in analytical oncology - *Status quo* of mass spectrometry-based diagnostics for malignant tumor- *Journal of Analytical Oncology*. 1, 74-80. 2012. (査読有)
7. Narita, K., Kozuka-Hata, H., Nonami, Y., Ao-Kondo, H., Suzuki, T., Nakamura, H., Yamakawa, K., Oyama, M., Inoue, T. and Takeda, S. Proteomic analysis of multiple primary cilia reveals a novel mode of ciliary development in mammals. *Biology Open*. 1, 815-25. doi: 10.1242/bio.20121081. 2012. (査読有)
8. Yoshimura, K., Chen, L.C., Nakazawa, T., Mandal, M.K., Yu, Z., Uchiyama, T., Hori, H., Tanabe, K., Kubota, T., Fujii, H., Katoh, R., Hiraoka, K. and Takeda, S. Analysis of renal cell carcinoma as a first step for mass spectrometry-based diagnostics. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 23, 1741-49. 2012. doi: 10.1007/s13361-012-0447-2. (査読有)
9. Mandal, M.K., Yoshimura, K., Chen, L.C., Yu, Z., Nakazawa, T., Katoh, R., Fujii, H., Takeda, S.*. and Hiraoka*. K. Application of probe electrospray ionization mass spectrometry (PESI-MS) to clinical diagnosis. Solvent effects on lipid analysis. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 23, 2043-7. 2012. doi: 10.1007/s13361-012-0462-3. [co-corresponding author]. (査読有)
10. Odate, T., Kawai, M., Iio, K., Funayama, S., Futamata, H. and Takeda, S. Anatomy

- of the levator claviculae muscle, with an overview and its history. *Anatomical Science International*. 87, 203-211. 2012. DOI 10.1007/s12565-012-0148-8 (査読有)
11. Mandal, M. K., Yoshimura, K., Saha, S., Ninomiya, S., Rahman, Md. O., Yu, Z., Chen, L. C., Shida, Y., Takeda, S., Nonami, H. and Hiraoka. Solid probe assisted nonelectrospray ionization mass spectrometry for biological tissue diagnostics. *Analyst*. 137, 4658-61. 2012. (査読有)
 12. Yoshimura, K., Kawate, T. and Takeda, S. Signaling via primary cilium affects glial cell survival under the stressed environment. *Glia*. 59, 333-344. 2011. (査読有)
 13. Narita, K., Hisamoto N., Okuda, T. and Takeda, S. Differential neuroprotective activity of two different grape seed extracts. *PLoS One*. 6, e14575. doi:10.1371/journal.pone.0014575. 2011. (査読有)
 14. Yoshimura, K., Chen, LL., Yu, Z., Hiraoka, K. and Takeda, S. Real time analysis of living animals by electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 417, 195-201. 2011. (査読有)
 15. Narita, K., Kawate, T., Kakinuma, N. and Takeda, S. Multiple primary cilia modulate the fluid transcytosis in choroid plexus epithelium. *Traffic*, 11, 287-301. 2010. (査読有)
 16. Asakawa, D., Yoshimura, T, Takeda, S., and Hiraoka, K.: Direct analysis of lipids in mouse brain using electrospray droplet impact/SIMS. *Journal of Mass Spectrometry*. 45, 437-443. 2010. (査読有)
- [学会発表] (計 16 件)
1. 竹田 扇: 一次繊毛を介した末梢神経髄鞘形成の分子メカニズム. 第 118 回日本解剖学会全国学術集会. シンポジウム (指名) 香川 2013. 3-30
 2. 竹田 扇: 新しいイオン化法と機械学習を応用したがん診断支援装置の開発. がんプロフェッショナル養成基盤推進プラン 大学間連携トランスレーショナル研究キックオフシンポジウム (指名) 東京 2013. 3-9
 3. Sen TAKEDA: New approaches to the cancer diagnosis - Combination of probe electrospray ionization and machine learning - University of Yamanashi International Symposium. UYIS2012. (Special Lecture) Kofu. 2012.12-3
 4. 吉村健太郎、三澤透、濱本明恵、斎藤祐見子、竹田 扇: 一次繊毛を介した 3 型ソマトスタチン受容体によるカルシウム動態の調節 第 35 回日本神経科学大会名古屋 2012. 9-19
 5. Sen TAKEDA: What's New in Cancer Diagnostics? - An Upcoming Innovative Approach Based on Mass Spectrometry and Logistics Regression - 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry. Symposium. (invited). Kyoto, 2012. 8-28.
 6. 竹田 扇: 関東 4 大学コンソーシアムの取組について. 第 117 回日本解剖学会全国学術集会. ワークショップ (指名)

- 甲府, 2012. 3-26.
7. Sen Takeda and Kentaro Yoshimura. Hedgehog signaling regulates the myelination of peripheral nerve axons through the primary cilia. 51st Annual Meeting of ASCB, Denver, USA 2011. 12-5.
 8. 吉村健太郎、竹田 扇 : シュワン細胞の一次繊毛によるヘッジホッグシグナルの受容はミエリン形成を促進する 第 34 回日本神経科学大会 横浜 2011.9-16
 9. 竹田 扇 : 質量分析法の術中迅速診断への応用 第 38 回 BMS カンファレンス. (招待) 箱根, 2011.7-12
 10. 竹田 扇 : 神経系細胞の感覚受容モジュールとしての繊毛の役割 第 116 回日本解剖学会全国学術集会. シンポジウム (指名) 横浜, 2011. 3-27 (誌上開催)
 11. 竹田 扇 : 肉眼解剖学実習を通じた医師・看護師双方向性教育の意義 - その効果と今後の指針 - 第 116 回日本解剖学会全国学術集会. シンポジウム (指名) 横浜, 2011. 3-27 (誌上開催)
 12. Multiple primary cilia modulate the fluid transcytosis in choroid plexus epithelium. S. Takeda and K. Narita. 50th Annual Meeting of ASCB, Pennsylvania Convention Center. (Pennsylvania, USA) 2010. 12-14.
 13. 竹田 扇 : Integrated science としてのバイオエシックス - 本邦のバイオエシックス草創期における今堀和友の役割 - 日本生命倫理学会第 22 回年次大会 シンポジウム (指名) 藤田保健衛生大学 (愛知県). 2010.11-20
 14. 竹田 扇 : 神経系繊毛の多様な機能と病態 第一回繊毛研究会 シンポジウム (企画) 自然科学研究機構生理学研究所 (愛知県). 2010.11-13
 15. 竹田 扇 : 生きた動物個体への質量分析法の応用と今後の課題. 第 58 回質量分析総合討論会. ワークショップ (招待), エオポカルつくば (茨城県), 2010.6-18
 16. Sen TAKEDA : Primary cilia as a novel functional module of the nervous system. The 87th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. Symposium (invited), Malios Morioka (Iwate), 2010.5-20
- [図書] (計 3 件)
1. 竹田 扇 : 2. 神経細胞の細胞骨格 精神科臨床リュミエール 第 16 巻『精神科医のための脳科学: これだけは知っておきたい基礎知識』神庭重信、加藤忠文(編) (分担執筆) 169-70 頁 2010 中山書店 東京
 2. Takeda, S. and Woodland, H.: Special Issue on Cilia. *Differentiation*. 2012. Elsevier. 114p. p.
 3. 竹田 扇 : 『カラーアトラス機能組織学』(河田光博、小路武彦監訳) 原著第 2 版 第 2 章、第 3 章、pp.61-93. 2013 エルゼビア・ジャパン/医歯薬出版 東京
- [産業財産権]
○出願状況 (計 1 件)
- 名称: 質量分析装置、及び該装置を用いた癌診断装置
発明者: 出水 秀明、谷畑 博司、糸井 弘人、田邊 國士、竹田扇、吉村健太郎、平岡賢三、Lee Chuin Chen、堀裕和
権利者: 株式会社島津製作所、田邊 國士、竹田扇、国立大学法人山梨大学
種類: 特許権
番号: 特願 2012-186490
出願年月日: 2012 年 8 月 27 日
国内外の別: 国内
- [その他]

ホームページ等

<http://www.cellbiology.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 扇 (TAKEDA SEN)

山梨大学・医学工学総合研究部・教授

研究者番号：20272429

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし