

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17792

研究課題名（和文）線毛運動障害による髄液ダイナミクス異常とダイニンの分子生物学的解析

研究課題名（英文）Abnormal cerebrospinal fluid dynamics due to ciliary movement disorder and molecular biological analysis of 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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：線毛運動異常を示す水頭症モデルマウス（Dpcdノックアウトマウス）を用いて水頭症発現様式、機序について検討を行った。この水頭症は側脳室、第三脳室の脳室拡大を認めるものの、第四脳室の拡大は認めず脳室間で表現型に差異が存在することが示唆された。マウス内腕ダイニンを構成する8種の分子種のうち、Dnah1のmRNAの発現が減少し、対してDnah6は増加していることが明らかとなった。また透過型顕微鏡を用いた構造解析では内腕ダイニンの部分的な欠損が確認された。これによりDpcd遺伝子ノックアウトにより複数のダイニン分子種の遺伝子多寡と構造異常がもたらされていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線毛運動障害に伴う各臓器の機能異常については報告が増えているが、脳室上衣線毛の運動と水頭症形成の関連性については報告が少なく、特に脳室上衣線毛ダイニンの構成タンパクの解析については未だ報告がなく、本研究は極めて新規性の高いものであった。

線毛運動障害では非閉塞性水頭症を呈することが明らかとなった。非閉塞性水頭症は日常診療で遭遇する疾患であるが、その発症の原因、増悪の機序については未だ明らかにされていない。非閉塞性水頭症の一因として線毛運動障害の存在が示唆され、また増悪の機序として線毛運動ベクトルの経時的障害が存在することが示唆された。今後非閉塞性水頭症に対する治療への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：Using a hydrocephalic model mouse (Dpcd knockout mouse: Dpcd KO mouse) showing abnormal ciliary movement, the expression pattern and mechanism of hydrocephalus were investigated. This hydrocephalus showed lateral ventricle and third ventricle enlargement, but no fourth ventricle enlargement, suggesting that there is a phenotypic difference between the ventricles. Among the eight molecular species that compose the mouse inner arm dynein, it was revealed that the mRNA expression of Dnah1 was decreased and that of Dnah6 was increased. In addition, partial loss of the inner arm dynein was confirmed by structural analysis using a transmission electron microscope. It was clarified that the knockout of Dpcd gene resulted in gene polymorphism and structural abnormality of multiple dynein molecular species.

研究分野：脳神経外科

キーワード：水頭症 線毛 脳室上衣細胞 電子顕微鏡

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

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。微小管とモーターダイニンの滑り運動によって周期的な回転運動を起こし、これにより表面に存在する粘液、髄液などに動きが与えられ物質の移動が行われる。繊毛運動が障害されることによる、呼吸器系の易感性や内蔵逆位などの様々な障害が報告されている。このような背景の中で種々の種族での繊毛構造、繊毛運動障害についての研究がなされてきた。マウスの繊毛運動ならびに繊毛微細構造の解析については、特に気管繊毛表面の蛍光粒子の動態を観察することで繊毛の作り出す異物排泄のメカニズムが解析されているが、脳室上衣についての研究は、組織の脆弱性などもあり十分な研究がなされていなかった。

繊毛運動は脳室においても髄液還流形成に重要な役割を果たしていると考えられている。繊毛運動が障害されることによって水頭症を発現することが知られており、先天性水頭症の発症メカニズムを詳細に解明するためには、脳室上衣細胞の繊毛運動により引き起こされる髄液循環動態を解明することが不可欠と考えられた。脳室上衣細胞の繊毛運動異常が水頭症を引き起こすメカニズムを解明するためには、マウスモデルを用いた動的な髄液循環動態解析と分子メカニズム解析が必要と考えた。繊毛運動障害を有する水頭症自然発生マウスモデル (Dpcd KO マウス) を用いて先天性水頭症のうち特に非閉塞性水頭症の発現様式ならびにその増悪機序について検討を行うこととした。

### 2. 研究の目的

繊毛運動が先天的に障害されるマウスでは水頭症の発現が認められる。我々の繊毛運動障害マウスでは胎生期には脳室拡大が認められておらず、徐々に脳室拡大が進行していることが先行研究で明らかとなっていた。このため、この水頭症がどのタイミングで発現し増悪していくのかについて、出生前より経時的に観察することで繊毛障害の水頭症発現への関与について検討することとした。また、繊毛運動がどのように髄液の流れを形成し、脳室内の髄液循環に関与しているのかについても明らかではなかった。このため、繊毛運動が引き起こす局所的な髄液流の強さ、ベクトルを解析することで水頭症の増悪因子の検討を行うこととした。これらの髄液循環動態の解明を行うことは、交通性水頭症発症に繊毛運動がどのように関与し、水頭症が増悪するメカニズムの解明につながると考えられた。また、繊毛運動にはモータータンパク質であるダイニンが関与することが明らかになっているが、本研究で用いられる Dpcd 遺伝子の働きについては明らかにされていなかった。本マウスモデルの上衣細胞の遺伝子発現解析を行うとともに、ダイニン分子異常に関わる遺伝子発現異常を同定することで、繊毛運動異常に関わる分子メカニズムを解明することも目的とした。

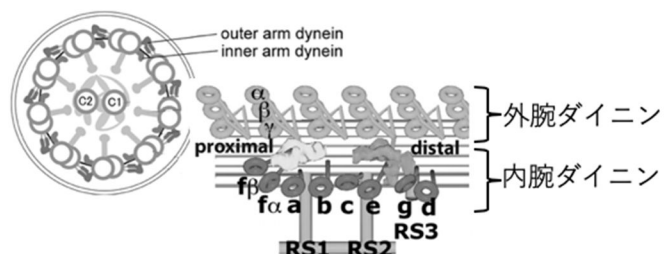
これらの検討を通じて、交通性水頭症発症の原因解明、増悪機序を解明するとともに、新たな治療法開発につながると考えた。

### 3. 研究の方法

繊毛運動異常を示すマウス (DpcdKO マウス) および正常マウスを用いて、構造を比較しつつ解析を行った。

(1) 繊毛運動障害マウスにおける水頭症発現、脳室拡大様式の経時的な観察並びに髄液還流の観察...これまでの検討で水頭症の程度は日齢によって大きく違いがあることが明らかとなっていた。しかしながら、どの時点で水頭症が発症し進行するのかについては明らかにされていなかった。そこで、出生前よりマウス水頭症が完成すると思われる生後 14 日目までの連日の MRI 撮影を行い拡大する脳室部位、順序を同定し、その責任部位を明らかとすることとした。脳室上衣繊毛運動による髄液流の検討は脳室ごとにマイクロビーズを用いて計測をすることが可能である。この違いを元に各脳室の繊毛のミクロ的運動について微分干渉顕微鏡をもちいて、そのベクトル、周波数等について脳室部位別の検討を行い、責任部位の同定、原因となる繊毛運動障害の種類について検討を行うこととした。

(2) 繊毛運動異常をもたらすダイニンの分子メカニズムの解析...繊毛運動は微小管とモーターダイニンタンパクの滑り運動によってもたらされる。繊毛内ダイニンには内腕ダイニンと外腕ダイニンが存在する。この内、Dpcd 遺伝子は主に内腕ダイニン構成タンパクに関与するとされている。内腕ダイニン重鎖には 8 種の分子種が存在し複合体を形成している。脳室内上衣繊毛のうちどの分子種に異常をきたしているのか、それぞれの分子種の発現を検討することで Dpcd 遺伝子ノックアウトがもたらすダイニン分子種異常の原因部位の特定が可能となると考えられた。また他の体組織での発現についても検討することで脳内における Dpcd 遺伝子の特異的な働きを知ることが可能となると考えた。

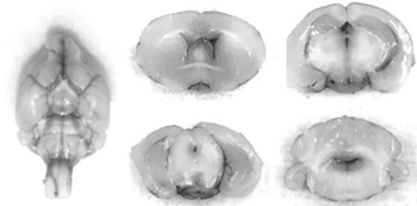
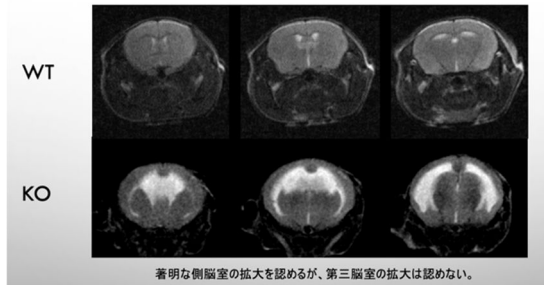


#### 4. 研究成果

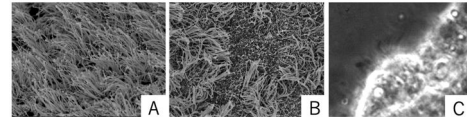
(1) 水頭症発現マウスに対して脳室穿刺による色素注入を施行したところ、本繊毛運動障害に伴う水頭症は非交通性水頭症であることが確認された。MRIをP1より連日撮影を行うことで、水頭症は生下時にほとんど認められないが、P2より増悪し、個体差はあるが、概ねP14程度で脳室拡大が停止することが確認された。その後約1~2週程度で死亡するが、その間の拡大はなく、水頭症は直接的な死因とはならない可能性が示唆された。また脳室拡大は側脳室、第三脳室で強く、中脳水道以遠ではほとんど認められないという特徴を伴っていた。このような脳室間での拡大の程度の違いは通常中脳水道における閉塞が予想される。このため、脳室内に色素を注入し、外観の観察を行った。その結果、全脳室~脳槽まで色素が全体的に行き渡っており、閉塞起点が無いことが確認された。閉塞起点が無いにも関わらず、脳室拡大の差異が見られたため、髄液流障害の程度に着目し検討を進めた。マイクロビーズを用いた髄液流の検討では第三脳室、第四脳室では正常マウスと比較して流速に有意な違いは認められないものの、側脳室では有意に低下していることが明らかとなった。微分干渉顕微鏡を用いた検討では側脳室内では運動繊毛の減少、ベクトルの乱れが強く認められた。繊毛運動周波数については同部位においても維持されており、Dpcd遺伝子は繊毛運動の周期性に参与しないことが明らかとなった。第三脳室、第四脳室では運動繊毛数、周波数についてはある程度維持されるが、この一方で第三脳室以遠では徐々にベクトルの乱れが強くなる傾向が認められた。脳室上衣繊毛について電子顕微鏡を用いて観察を行ったところ、側脳室から第四脳室に向かうにつれて繊毛数の減少が認められることが明らかとなった。このことから、側脳室では主に運動繊毛数の減少から髄液流が形成されず、第三脳室では繊毛運動ベクトルの乱れから正常な髄液流が形成されないことが明らかとなった。Dpcd遺伝子ノックアウトに伴う水頭症は交通性水頭症であり、脳室ごとにその表現系に差異が認められた。脳室拡大の原因は脳室ごとに異なる可能性が示唆された。

(2) DpcdKOマウス脳組織を用いた検討では、マウス内腕ダイニン分子種の一つであるDnah1のmRNAの発現が減少し、Dnah6は増加していることが明らかとなった。この変化は脳では認められたものの他の体組織では認められず、脳室上衣繊毛に特有の変化であることが示唆された。脳室繊毛内部構造を確認するため透過型電子顕微鏡を用いた構造解析を行ったところ、内腕ダイニンの部分的な欠損が確認されたが、その分子種の配列、多寡については明らかにできなかった。Dpcd遺伝子ノックアウトにより複数のダイニン分子種の遺伝子多寡と構造異常がもたらされることが示唆された。今後の課題として、これらの異常がもたらすダイニン分子種の微細な配列についてクライオ電子顕微鏡を用いて検討を行っていく予定である。また、髄液流がもたらす繊毛運動ベクトル異常について後天的に増悪するかどうかについても検討を行う必要があると考えられた。これらの検討を通じて先天性水頭症形成、増悪のメカニズムの解明が進むことが期待される。

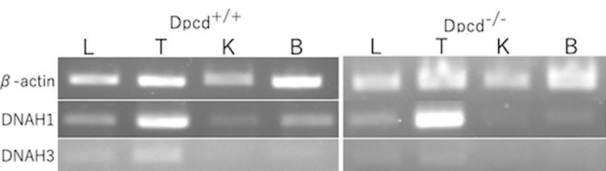
MRI (冠状断)



脳室内色素注入

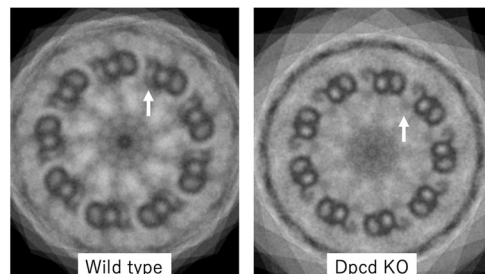


A: 正常マウスの脳室上衣の走査型顕微鏡による観察。繊毛が一様に配列されている。  
B: Dpcd KOマウスの脳室上衣では一部で繊毛が脱落している。繊毛の並びにも乱れが認められる。  
C: Dpcd KOマウスの脳室内繊毛を位相差顕微鏡で観察した。繊毛運動のベクトルに乱れが生じ髄液流が形成されていない。



Dpcd KOでは脳Dnah1 mRNA発現が低下しているが、他の体細胞では影響が認められない。

L: Lung, T: Testis  
K: Kidney, B: Brain



Wild type Dpcd KO  
Dpcd KOマウスではInner dyneinは確認されるものの一部で欠損が生じている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 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, Okuno Yusuke, Aoki Kosuke, Motomura Kazuya, Takeuchi Kazuhito, Kusakari Hironao, Yanagisawa Nobuyuki, Sato Shinya, Yamaguchi Junya, Tanahashi Kuniaki, Hirano Masaki, Kato Akira, Shimizu Hiroyuki, Kitano Yotaro, Yamazaki Shintaro, Kondo Yutaka, Wakabayashi Toshihiko, Natsume Atsushi	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 -
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, Ishikawa Takayuki, Kawabata Teppei, Shimoyama Yoshie, Inoshita Naoko, Wakabayashi Toshihiko	4. 巻 5
2. 論文標題 Peel-off resection of the pituitary gland for functional pituitary adenomas: pathological significance and impact on pituitary function.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pituitary	6. 最初と最後の頁 507-513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11102-019-00980-w	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, Sato Yusuke, Tambara Masao, Teranishi Masaaki, Wakabayashi Toshihiko	4. 巻 132
2. 論文標題 Preservation of Olfactory Function Following Endoscopic Single-Nostril Transseptal Transsphenoidal Surgery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 e665 ~ e669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2019.08.051	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, Ishikawa Takayuki, Kawabata Teppei, Shimoyama Yoshie, Wakabayashi Toshihiko	4. 巻 126
2. 論文標題 Removal of the Medial Wall of the Cavernous Sinus for Functional Pituitary Adenomas: A Technical Report and Pathologic Significance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 53 ~ 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2019.02.134	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 Ishikawa Takayuki, Takeuchi Kazuhito, Nagatani Tetsuya, Aimi Yuri, Tanemura Eriko, Tambara Masao, Nagata Yuichi, Choo Jungsu, Wakabayashi Toshihiko	4. 巻 122
2. 論文標題 Quality of Life Changes Before and After Transsphenoidal Surgery for Sellar and Parasellar Lesions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 e1202 ~ e1210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2018.11.017	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 Ishikawa Takayuki, Takeuchi Kazuhito, Nagata Yuichi, Choo Jungsu, Kawabata Teppei, Ishizaki Tomotaka, Wakabayashi Toshihiko	4. 巻 131
2. 論文標題 Three types of dural suturing for closure of CSF leak after endoscopic transsphenoidal surgery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1625 ~ 1631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2018.4.JNS18366	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 Takeuchi Kazuhito, Handa Takashi, Chu Jonsu, Wada Kentaro, Wakabayashi Toshihiko	4. 巻 131
2. 論文標題 Endoscopic clipping of intraventricular aneurysms using the "wet-field" technique	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 104 ~ 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2018.1.JNS172393	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14件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 山本太樹、竹内和人、石川隆之、永田雄一、上野裕則、若林俊彦、夏目敦至
2. 発表標題 Dpcdノックアウトマウスにおける脳室内繊毛運動についての解析
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第78回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本太樹、竹内和人、石川隆之、永田雄一、上野裕則、若林俊彦、夏目敦至
2. 発表標題 脳室内出血後水頭症マウスにおける繊毛運動と形態の観察
3. 学会等名 第26回日本神経内視鏡学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本太樹、竹内和人、石川隆之、永田雄一、上野裕則、若林俊彦、夏目敦至
2. 発表標題 Dpcdノックアウトマウスにおける脳室内繊毛運動についての解析
3. 学会等名 第20回分子脳神経外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本太樹、竹内和人、石川隆之、永田雄一、上野裕則、若林俊彦、夏目敦至
2. 発表標題 Dpcdノックアウトマウスにおける脳室内繊毛運動についての解析
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第78回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内和人、永谷哲也、渡邊督、岸田勇吾、永田雄一、川端哲平、石川隆之、山本太樹、若林俊彦
2. 発表標題 脳幹部海綿状血管腫に対する内視鏡手術有用性と今後の課題
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第78回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内和人
2. 発表標題 新たな神経内視鏡手術への挑戦ーより安全、確実な手術を目指してー
3. 学会等名 第26回日本神経内視鏡学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhiito Takeuchi
2. 発表標題 Endoscopic Cylinder Brainstem Surgery
3. 学会等名 9th IFNE world congress of neuroendoscopy（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhiito Takeuchi
2. 発表標題 Endoscopic Cylinder Brainstem Surgery
3. 学会等名 IFNE neuroendoscopy workshop（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内和人
2. 発表標題 新たな内視鏡手術への挑戦ーそれ内視鏡のほうがいいんじゃないですか？ー
3. 学会等名 第23回関西ニューロエンドスコープ研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhi to Takeuchi
2. 発表標題 Endoscopic surgery for intraparenchymal tumours
3. 学会等名 ACNS Endoscopic Shanghai Neurosurgical Forum（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内和人
2. 発表標題 内視鏡下キーホールサージェリーの工夫
3. 学会等名 第28回脳神経外科手術と機器学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 太樹、竹内 和人、石川 隆之、永田 雄一、上野 裕則、若林 俊彦、夏目 敦至
2. 発表標題 先天性水頭症における二次繊毛の解析
3. 学会等名 水頭症脳脊髄液外科学会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 山本 太樹、竹内 和人、石川 隆之、永田 雄一、上野 裕則、若林 俊彦、夏目 敦至
2. 発表標題 Dpcd ノックアウトマウスにおける脳室内繊毛運動の解析
3. 学会等名 第11回繊毛研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川隆之、竹内和人、上野裕則、若林俊彦
2. 発表標題 脳室上衣細胞による各脳室の髄液灌流の研究
3. 学会等名 第24回日本神経内視鏡学会
4. 発表年 2017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
研究協力者	永田 雄一  (Nagata Yuichi)		
研究協力者	山本 太樹  (Yamamoto Taiki)		
研究協力者	石川 隆之  (Ishikawa Takayuki)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	上野 裕則  (Ueno Hironori)		