

平成 21 年 09 月 15 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19870008

研究課題名（和文） 一次線毛による脳脊髄液産生機構の分子生物学的研究

研究課題名（英文） Functional characterization of primary cilia in regulation of cerebrospinal fluid production in choroid plexus epithelial cells.

研究代表者

成田 啓之（NARITA KEISHI）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号：50452131

研究成果の概要：

担当者は本研究課題を通して以下の成果を得た。1) CPEC の一次線毛には NPF2FR2 が局在し、低濃度の NPFF に対する細胞の応答性を高めていることを見いだした。2) CPEC が NPFF の autocrine signaling によって CSF 産生量を定常的に抑制していることを見いだした。3) CPEC の一次線毛を単離・精製することに成功した。4) 一次線毛を持つ CPEC と従来型線毛を持つ上皮細胞の両方から cDNA ライブラリーを作成した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,370,000	0	1,370,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：一次線毛・脳脊髄液・水頭症・シグナル伝達・NPFF・cAMP

## 1. 研究開始当初の背景

線毛は細胞表面から突出する径 0.5  $\mu\text{m}$ 、長さ 2-20  $\mu\text{m}$  の線維状構造物で、微小管骨格の構造的差異に基づいて従来型線毛と一次線毛に分けられる。従来型線毛は 9+2 の微小管骨格を持ち、いわゆる線毛運動を行い気管における粘液輸送や精子の運動に関わる等、深く研究されている。一方、一次線毛は 9+0 の微小管骨格を持ち不動の線毛とされ、感覚器細胞等をはじめ、あらゆる細胞に幅広く存在することが知られていたが、従来型線毛に

比べて研究は立ち遅れていた。しかしながら近年、マウス胚の発生初期における体の左右決定に重要な役割を果たすノード流が一次線毛の回転運動によって作られていることを見いだされ、また一次線毛が細胞外からの刺激を感知するバイオセンサーとしての機能を担っており、その形成不全が水頭症や、長い間原因不明であった Joubert 症候群、Bardet-Biedl 症候群など、様々な病態の基盤になっていることが明らかになるなど、その構造と機能の分子生物学的解析が注目されつ

つある。

水頭症は、中枢神経系において髄膜に包囲された閉鎖空間（髄腔）を満たす脳脊髄液（CSF）の産生・循環・吸収の動的平衡が擾乱されることで発症し、その原因は多岐にわたる。従来型線毛の機能不全が引き起こすCSF循環阻害に伴う水頭症に関しては研究の歴史が長く、1970年代には先天性水頭症を示す実験動物において、髄腔内表面を覆う上皮細胞の従来型線毛の形成異常が見いだされている。当初この線毛形成異常は水頭症の結果生じるという説もあったが、線毛形成異常が水頭症の原因の一つであると認識されるようになったのは、ヒトにおける *immotile cilia syndrome* と呼ばれる水頭症を伴う先天性異常の報告が相次ぎ、また線毛の欠失に伴い内臓逆位や水頭症などをあらわすノックアウトマウスの報告が初めてされた1990年代のことである。その後2000年代に入り今日に至るまで、上皮細胞の従来型線毛の運動機能低下とCSF循環阻害の関連を分子生物学的手法で示した報告が相次いでいる。しかし線毛形成に関わる遺伝子をノックアウトしたにもかかわらず上皮細胞の従来型線毛には異常が見られず、なおかつ水頭症を呈する変異マウスも報告されており、従来型線毛の運動機能低下だけでは説明できないケースもあることが示されている。

本課題において申請者が注目したのは、一次線毛の機能不全が及ぼすCSF産生調節機構への影響である。CSFは主に脳室内の脈絡叢で産生されるが、その量はさまざまな生理活性物質によって調節されている。その脈絡叢において毛細血管-髄腔間の水分子などの物質移動を介在し、CSF産生を実質的に担っている脈絡叢上皮細胞は、CSF中に存在する *serotonin* など複数の生理活性物質に応答してその産生量を調節していることが示唆されている。この脈絡叢上皮細胞はまた、頂端側に無数の線毛を持ち、その線毛は主に一次線毛であるという記述が存在するが、その詳細な分布、動態および生理活性物質を介したシグナル伝達との関連は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本申請課題では、線毛形成或いは機能の異常がどのような分子メカニズムに従って水頭症を引き起こすのかを解明し、病態理解の足掛りを形成することを目的とする。具体的には脈絡叢上皮細胞および上皮細胞の線毛を通じた細胞内情報伝達系を解明することで脳脊髄液産生調節機構を明らかにし、水頭症治療の分子基盤を築くことを企図している。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞培養：ブタ脈絡叢上皮細胞 (PCPECs) の初代培養は、Baehrらによって報告されている方法に従い、マトリゲルコートした培養皿およびグラスカバーグラスを用いておこなった。コンフルエントになった細胞を無血清培地中で24h以上培養することで、一次線毛の形成を誘導した。脱線毛は抱水クロラールを培地中に終濃度4mMになるように加え、24h培養することでおこなった。

(2) cAMP アッセイ：アプライドバイオシステム社の cAMP-Screen System を用いておこなった。

(3) 脳脊髄液産生アッセイ：Baehrらによって報告されている方法を一部改変しておこなった。まず Corning 社の polycarbonate Transwell permeable supports 上にコンフルエントな PCPECs の単層を形成させた。次に基底側の培地に Invitrogen 社の Oregon Green 488-labeled dextran, average molecular weight of 70 kDa を終濃度 1.0 μM になるように加え、37°C で培養を続けた。その後1時間ごとに頂端側の培地を少量サンプリングし、培地に含まれる Oregon Green dextran の量を蛍光プレートリーダーで定量した。

(4) 一次線毛の単離・精製：まず新鮮なブタの脳から得た脈絡叢組織を、ジブカイン塩酸塩を含む溶液中で1分間震盪した。これにより遊離した一次線毛を分画遠心法とショ糖密度勾配超遠心分離法を組み合わせることで精製した。こうして得られた分画を、抗アセチル化αチューブリン抗体を用いたウェスタンブロット解析と電子顕微鏡観察によってスクリーニングし、一次線毛が濃縮されている分画を同定した。

(5) サプレッション・サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション (SSH)：マウス新生児より単離培養した脈絡叢上皮細胞および上皮細胞からそれぞれ total RNA を抽出し、クロンテック社の SMART PCR cDNA Synthesis Kit を用いて完全長 cDNA ライブラリーを調製した。SSHはクロンテック社の PCR-Select cDNA Subtraction Kit を用いておこなった。

#### 4. 研究成果

(1) 我々はまず PCPECs が頂端側に多数の一次線毛を持つことを確認した。初代培養 PCPECs は典型的な上皮細胞の形態を示した (図 1A, 左)。また CPEC のマーカータンパクである transthyretin に対する抗体を用いた免疫染色により、培養には他の細胞がほとんど含まれていないことが確認された (図 1A, 右)。電子顕微鏡でこの細胞の微細構造を観察すると、頂端側に長さ約 5  $\mu\text{m}$  の多数の線毛が観察され (図 1B)、それらは 9+0 型の微小管構造を持つ一次線毛であることが確認された (図 1C)。通常一次線毛は 1 つの細胞に 1 本しか形成されず、この細胞の一次線毛発現様式は特殊であることが示された。これは 1980 年代に既に他の論文に記載されている事実であるが、ほとんど注目されていなかった。今回の我々の知見は、線毛の構造と機能の分子生物学的解析が注目されつつある今日においてインパクトは大きいと思われる。

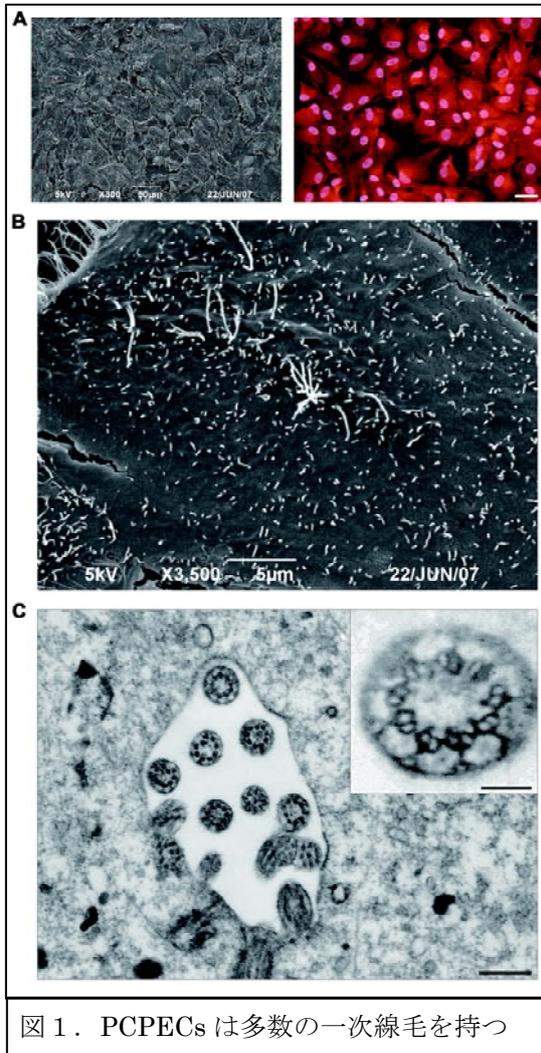


図 1. PCPECs は多数の一次線毛を持つ

(2) 次に我々は PCPECs が持つ一次線毛の機能を解析するために、抱水クロラルによる脱線毛処理 (4 mM, 24 h) をおこなった。脱線毛処理されていない細胞では、一次線毛が電子顕微鏡および抗アセチル化  $\alpha$  チューブリン抗体を用いた免疫染色で観察することができるが、脱線毛処理した細胞では一次線毛がほぼ完全に消失していた (図 2A and B)。一方、抱水クロラルが脱線毛以外に細胞に与える副作用を検討したが、上皮細胞のバリアー機能の指標となる ZO-1 の分布 (図 2C) や経上皮電気抵抗値などには顕著な影響は見られなかった。

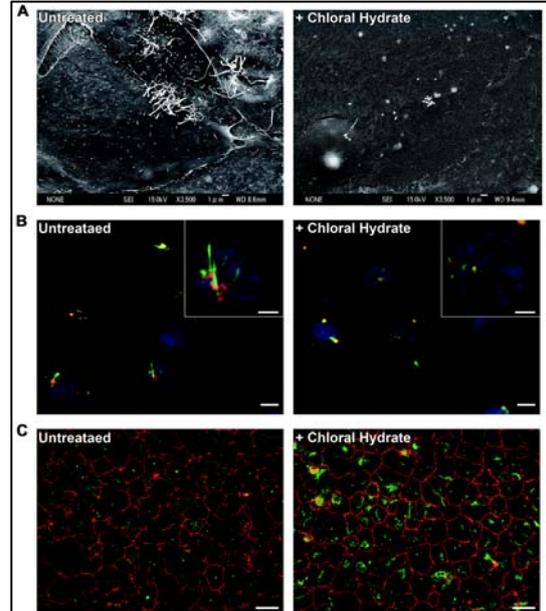


図 2. 抱水クロラルは PCPEC の脱線毛を引き起こす

上記の方法を用いて一次線毛を失った PCPECs を種々の方法を用いて解析したところ、脱線毛に伴って細胞内 cAMP 濃度の上昇が確認された (図 3)。また脳脊髄液産生活性も脱線毛処理に伴い増加することが明らかになった (図 4)。

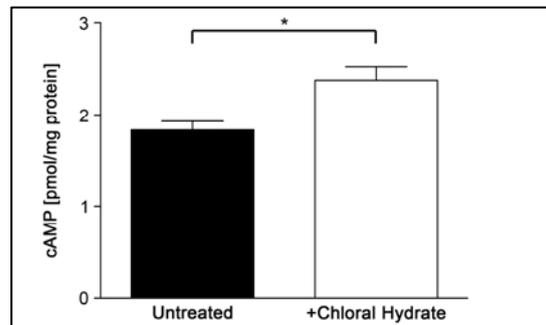
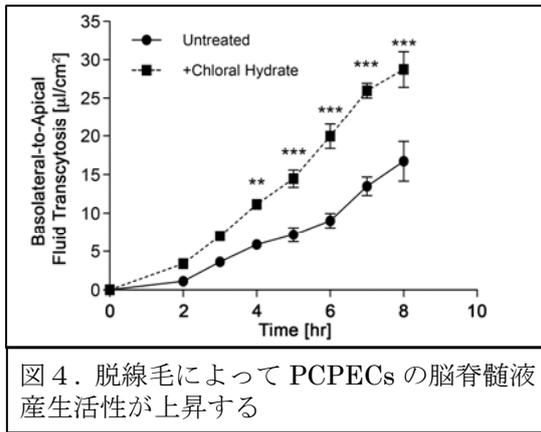


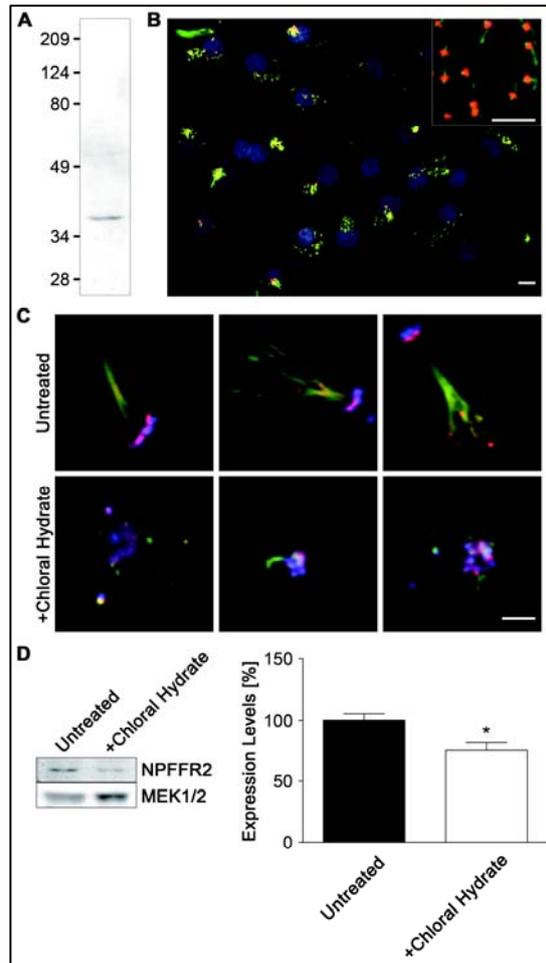
図 3. 脱線毛によって PCPECs 内の cAMP 濃度が上昇する



培養 PCPECs を用いて得られたこれらの結果は脈絡叢上皮細胞の一次線毛が細胞内シグナル伝達と脳脊髄液産生調節に関わっていることを強く示唆している。線毛と脳脊髄液産生の関係はBanizsらがPolarisの変異マウスを用いて得た知見を元に推測していたが、直接証明する実験データはこれまで報告がなく、今回の我々がおこなった解析は、脈絡叢上皮細胞の詳細な機能解析を可能にする実験系を提示したという点でインパクトは大きいと思われる。

(3) 我々は次に、脈絡叢上皮細胞の一次線毛を介した脳脊髄液産生調節機構の詳細を解析するために、一次線毛に局在するシグナル伝達関連分子を検索した。その結果、PCPECsの一次線毛にはNPFFR2という受容体が局在していることを見いだした。NPFFR2はG蛋白質共役型受容体(GPCRs)の一つで、リガンドであるNPFFは脳脊髄液内に存在し、さらにリガンドの結合によって細胞内cAMP濃度を低下させる活性を持つことが知られている分子である。ウェスタンブロット解析の結果、我々が用いた抗ヒトNPFFR2抗体はPCPECsに存在する約38kDaのタンパクに特異的に結合することが示された(図5A)。免疫染色をおこなうと、この抗体が結合するタンパクはPCPECsの一次線毛の基底小体近傍に局在することが明らかになった(図5B)共焦点顕微鏡を用いて詳細な観察の結果、このNPFFR2分子は一次線毛の基底部分のみならず、一部は線毛内に点状に存在することも明らかになった(図5C)。抱水クロラールで脱線毛処理された細胞においては、NPFFR2の一次線毛および基底小体への局在は顕著に阻害され(図5C)、またタンパクレベルも約25%減少した(図5D)。

一次線毛にはPDGF受容体などのシグナル伝達に関わる蛋白が局在していることが報告されており、一般に細胞外からの刺激を感知するアンテナとしての役割を持っていることが示唆されている。しかしながら一次



線毛は様々な機能を担っている細胞に広く存在していることから、その細胞膜上に発現されている受容体の種類も細胞によって多様である事が推測されており、多くの研究者が注目している。本研究ではNPFFR2が一次線毛へ局在することを示す初めての報告であり、インパクトも大きいと思われる。

(4) NPFFR2はこれまで脊髄レベルでの痛覚の調節に関わっていることが報告されている分子であり、脈絡叢上皮細胞における機能は未知である。我々は培養PCPECsの培地にNPFFを添加すると、濃度依存的に細胞内cAMP濃度を低下させることを見いだした(図6A)。これは以前他の細胞を用いて示されたNPFFR2の活性と一致している。興味深いことに、抱水クロラールを用いて脱線毛したPCPECsを同様にリガンドで刺激した場合、低濃度のNPFFに対する細胞の応答性が低下することを示した(図6B)。これは一次線毛に受容体が局在することによってシグナル受容の感度が高められるという新しい動作機構を呈示している。

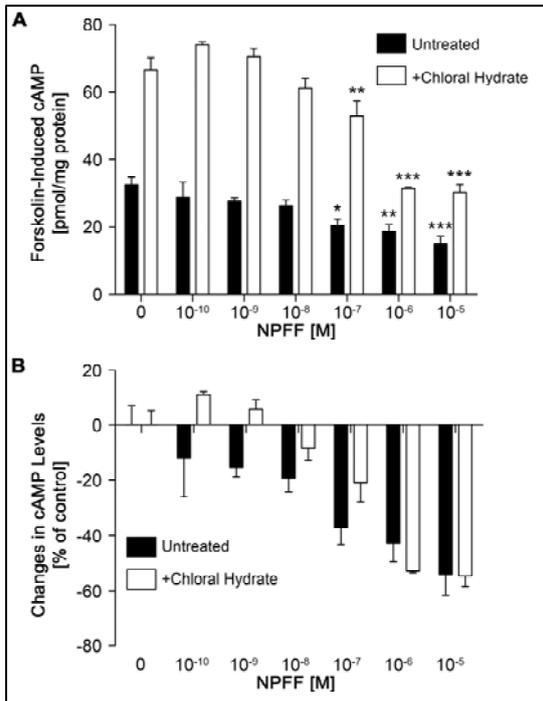


図6. 脱線毛によって低濃度のNPFFに対するPCPECsの応答性が低下する

(5) 上記の一連の実験結果に基づいて我々が立てた仮説は、PCPECsにおいて通常一次線毛に局在するNPFFR2は脳脊髄液産生を負に制御しており、抱水クロラルを用いた脱線毛によってNPFFR2を介したシグナル伝達効率が低下すると、脳脊髄液産生レベルが増加するというものである。この仮説に基づき、我々は培養PCPECsにNPFFを加えることで脳脊髄液産生を抑制できるのではないかと考えた。しかし実際に実験をおこなってみるとそのような傾向は見られなかった(図7)。しかしその後、我々はNPFFRのアンタゴニストであるBIBP3226をPCPECsに投与すると脳脊髄液産生レベルが増加することを見いだした(図7)。この結果は、PCPECsが自らNPFFR2のリガンドであるNPFFを産生し、定常的に脳脊髄液産生の負の調節をおこなっていることを強

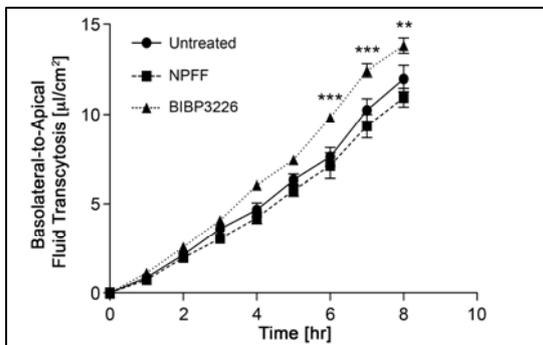


図7. NPFFRのアンタゴニストであるBIBP3226はPCPECsの脳脊髄液産生活性を向上させる

く示唆していた。実際に培養PCPECsから抽出したRNAを用いてRT-PCRをおこなうと、我々の予想通り、単一の転写産物が検出された(図8A)。シークエンス解析により、このPCR産物がヒト、マウス、ラット、牛などと高い相同性を持つブタのNPFF前駆体であることを確認した(図8C)。さらに、脱線毛処理したPCPECsではNPFF前駆体の発現レベルが増加する傾向を見いだした(図8B)。これはNPFFRを介したシグナル伝達の効率低下に対する細胞の応答と考えられた。

この実験結果は、これまで脊髄において痛覚の調節に関わっているとされてきたNPFFR2が、脈絡叢では脳脊髄液産生調節に関わっているという、全く新しい機能を持っていることを示す初めての報告である。またBIBP3226やRT-PCRの解析によりCPECがNPFFのautocrine signalingによってCSF産生量を定常的に抑制しているという、新たな分子機構も明らかにした。

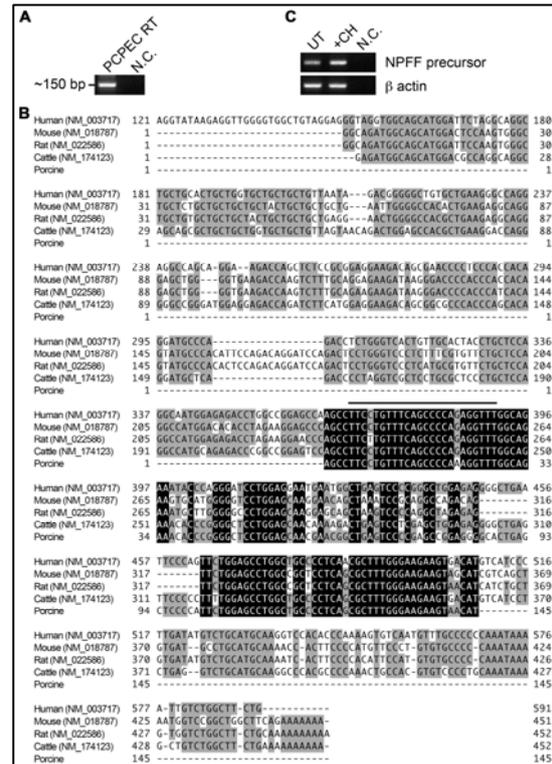


図8. PCPECsは自らNPFFを発現している

以上(1)~(5)の研究成果により、脈絡叢上皮細胞における一次線毛を介したCSF産生調節シグナル伝達分子機構解明の端緒が開かれた。この研究成果は現在国際学術誌に投稿中である。

(6) 上記の一連の研究成果に加え、我々はPCPECsの一次線毛に局在するシグナル伝達関連タンパク群を網羅的に解析するために、一次線毛の単離・精製することにも成功した(図9)。細胞から遊離された一次線毛をショ糖密度勾配上で精製して得られたサンプルは、現在質量分析装置を用いてタンパク分子の同定をおこなっているところである。

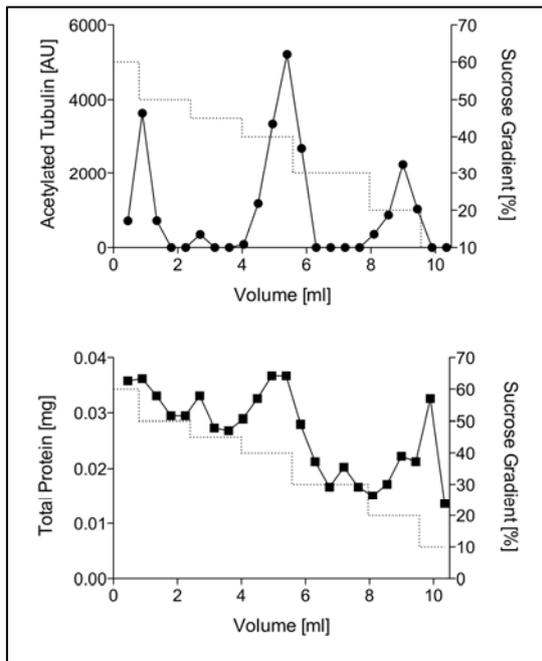


図9. 一次線毛の単離・精製

(7) 最後に、我々は脈絡叢上皮細胞の一次線毛に局在する分子を網羅的に解析するもう一つのアプローチとして、一次線毛を持つCPECと従来型線毛を持つ上皮細胞の両方をマウス組織から単離・培養し(図10)、それぞれからcDNAライブラリーを作成して両者の間に発現レベルが異なる遺伝子群の同定を試みている。この目的でおこなったサプレッション・サブトラクティブ・ハイブリダイゼーションは現在完了し、これからクローンを順次シークエンス解析していく予定である。

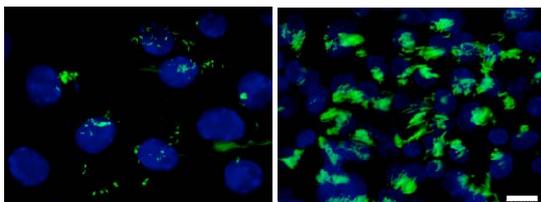


図10. マウスから単離培養した脈絡叢上皮細胞(左)と上皮細胞(右)を抗アセチル化 $\alpha$ チューブリン抗体を用いて免疫染色した画像

(6)～(7)の研究成果は、脈絡叢上皮細胞の一次線毛に特異的に存在する受容体群を網羅的に解析し、一次線毛を介したCSF産生調節シグナル伝達の全容を解明するための重要な基盤であり、これにより今後独創性の高い研究を遂行していくための基盤を整えることができた。

## 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)

[学会発表](計4件)

- ①. 成田啓之、川手豊子、竹田扇 バイオセンサーとしての一次線毛を介した脳脊髄液産生調節機構の分子機構 第114回日本解剖学会・全国学術集会 2009年3月30日 岡山理科大学
- ②. 成田啓之、川手豊子、竹田扇 Primary cilia act as biosensors to regulate production of cerebrospinal fluid. 第48回米国細胞生物学会年会 2008年12月17日 Moscone Center, San Francisco, CA
- ③. 成田啓之、川手豊子、竹田扇 Functional analysis of primary cilium in regulation of cerebrospinal fluid production. 第31回日本神経科学大会 2008年7月9日 東京国際フォーラム
- ④. 成田啓之、川手豊子、竹田扇 脈絡叢上皮細胞の一次線毛を介した脳脊髄液産生調節機構の解析 第113回日本解剖学会・全国学術集会 2008年3月29日 大分大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

成田 啓之 (NARITA KEISHI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号: 50452131

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし