

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16106

研究課題名（和文）ブタ・ウサギにおける脳脊髄液の吸収機構の解剖学的・機能的研究

研究課題名（英文）Anatomical and functional analysis in the drainage system of cerebrospinal fluid in pig and rabbit.

研究代表者

久富 理（Kutomi, Osamu）

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：60773728

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）：脳脊髄液（Cerebrospinal fluid: CSF）は、中枢神経系の恒常性維持に必須の成分である。くも膜顆粒はCSF吸収路として機能すると古くから考えられているが、その形態的特徴は未だ不明な点が多い。本研究は、臨床検体より採取したヒトくも膜顆粒の超微細形態解析を行った。解析の結果、ヒトくも膜顆粒においてリンパ管内皮細胞の構成分子が存在していること、くも膜顆粒周辺の脳硬膜において、くも膜下腔と上矢状静脈洞を連絡するギャップ領域が観察され、ヒトくも膜顆粒の新たな形態的特徴を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近の研究により、髄膜リンパ管や脳皮質の血管周囲腔（glymphatic system）など、中枢神経系のリンパ系がCSF経路を担うという説が主流になりつつある。このような背景のなか、上記の研究成果は、くも膜顆粒もリンパ系としてCSF吸収に機能する可能性を示唆するものである。また、本研究で観察されたヒトくも膜顆粒の形態的特徴は、以前に我々がブタ脳髄膜で見出した形態的特徴と類似していることから、この形態は進化的に保存されている可能性が示された。さらに本研究で得られた知見は、水頭症や脳脊髄液漏出症など、CSF循環機構の破綻と関連する疾患の発症機序の理解や診断/治療の応用にもつながると期待される。

研究成果の概要（英文）：Cerebrospinal fluid (CSF) is essential for maintenance of homeostasis in central nervous system. Although cranial arachnoid granulations (CAGs) have long been thought to function as a CSF drainage pathway from subarachnoid space (SAS) into venous sinus, their detailed morphological characteristics are still unclear. In this study, we performed ultrastructural analysis of human CAGs collected from clinical specimens. We revealed that components of lymphatic endothelial cells express in human CAGs and a gap region in the cerebral dura mater around the CAGs connecting the SAS and venous sinus.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脳脊髄液 くも膜顆粒 リンパ管内皮細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

脳脊髄液（cerebrospinal fluid, CSF）は脳室の脈絡叢から産生され、くも膜下腔を通過して静脈洞に排出される。このCSFの循環機構は中枢神経系の恒常性維持に必須であり、この循環機構の破綻は、脳室でのCSFの貯留を引き起こし、脳室拡大による水頭症などの重篤な中枢神経系の異常を引き起こすことが知られている。この吸収機構については、くも膜顆粒を介した静脈洞への吸収路という古典的な仮説や、最近報告された脳髄膜内のリンパ管や、脳実質の血管周囲腔（glymphatic system）などがあるが、これらが生理的に機能しているか否かという点については研究が遅れており、未だ不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、ヒトおよび、解剖学的・生理学的・発生学的にヒトと共通点が多いブタ・ウサギを用いて、脳髄膜の超微細形態解析と、トレーサー導入による中枢神経系における流路の追跡解析を行い、これらがCSF吸収路として生理的に機能するものか否かを明らかにすることで、CSFと密接に関係する中枢神経系の疾患の発症機序の解明や、その治療法の開発に向けた基礎研究の完成を目指した。

### 3. 研究の方法

当初の研究計画では以下の3点を設定した。

- (1) ブタ・ウサギ・ヒトにおける脳髄膜の超微細形態解析
- (2) ウサギの脳室におけるトレーサー導入によるCSF流路の同定
- (3) 新たなCSF吸収路の探索として、CSF産生に関わる脈絡叢の機能解析

これらのうち、研究期間中における各研究の進捗状況、および技術的な問題などを考慮して、本研究では計画(1)のヒトくも膜顆粒の形態解析を重点的に行った。

ヒトくも膜顆粒の形態解析には、髄膜腫患者の手術中に採取した臨床検体を使用した。本研究の遂行にあたり、山梨大学医学部倫理委員会より承認を受け、当該患者より同意を得たうえで行われた。検体採取は、荻原雅和博士・木内博之博士（山梨大学脳神経外科学講座）の執刀のもと、適切に行われた。

採取したくも膜顆粒を速やかに組織固定し、光学・電子顕微鏡用試料を作製した。電子顕微鏡解析においては、くも膜顆粒単体、ならびにくも膜顆粒周辺の硬膜の形態解析を行った。同時にくも膜顆粒の凍結切片を作製し、リンパ管内皮細胞のマーカーであるLyve-1およびpodoplanin（PDPN）に対する免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により局在を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒトくも膜顆粒の形態

ヒトくも膜顆粒の表層部では、低密度の方向が揃っていないコラーゲン線維束が主に観察され、コラーゲン線維以外には、線維芽細胞の類似した細胞が観察された。深層部におけるくも膜顆粒の形態を解析したところ、いくつか突起を伸ばしたfibroblast-like cellsが観察された（**図 1A-C**）。先行研究では、この領域は「core」に相当し、上記の細胞はarachnoid cellsに相当する。透過型電子顕微鏡解析により、arachnoid cellsを解析したところ、細胞体を中心に数本の突起を伸ばし、互いの細胞がデスモソームによって接着している様子が観察された（**図 1D**）。さらに、arachnoid cellsの間隙には、低密度のコラーゲン線維が存在していた。これらの観察結果は、これまでに報告されているヒトくも膜顆粒の形態的特徴と対応していることを確認した。

次に、くも膜顆粒にリンパ管の構成分子が存在しているか否かを検証するため、くも膜顆粒の凍結切片より、リンパ管内皮細胞の構成分子、Lyve-1 および PDPN に対する免疫染色を行った。その結果、Lyve-1, PDPN の両方において、細網状の染色パターンが認められた (図 2)。このパターンは、くも膜顆粒の超微細形態解析で見られた arachnoid cells の細胞形態に一致していた。これらより、arachnoid cells においてリンパ管内皮細胞の構成分子が発現している可能性が示された。

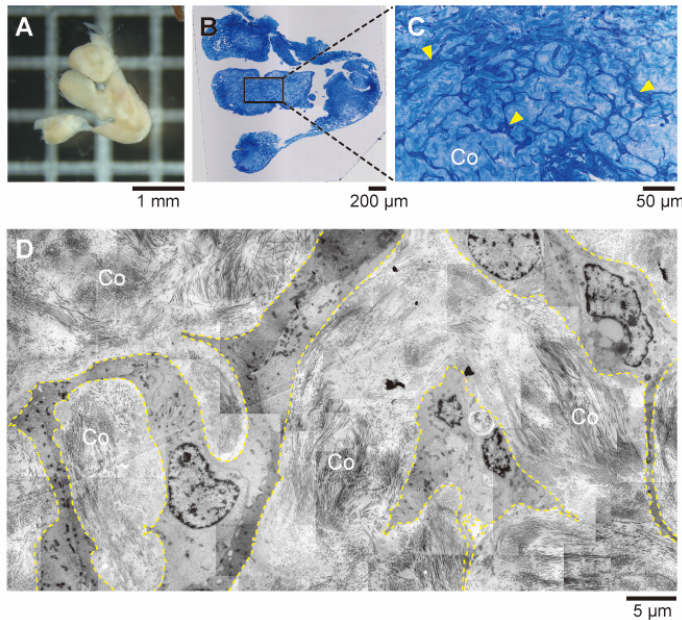


図 1. ヒトくも膜顆粒の形態。

A: くも膜顆粒の外観。B: 光学顕微鏡解析によるくも膜顆粒の形態。C: 図 1B 中の黒枠が示す領域の拡大図。黄色矢尻: arachnoid cell; Co: コラーゲン線維。D: 透過型電子顕微鏡解析によるヒトくも膜顆粒の超微細形態。黄色破線枠: arachnoid cell; Co: コラーゲン線維。arachnoid cell 同士には細胞間接着構造が見られる。

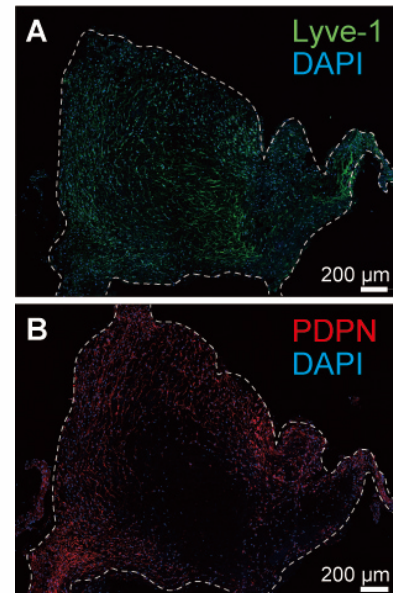


図 2. ヒトくも膜顆粒におけるリンパ管内皮細胞分子の局在。作製した凍結切片に対してリンパ管内皮細胞マーカーLyve-1 (A) と podoplanin (PDPN, B) の局在を免疫染色でそれぞれ解析した。破線枠: くも膜顆粒。

## (2) くも膜顆粒周辺の脳硬膜の形態

最近の研究によって、上矢状静脈洞付近の硬膜には、硬膜リンパ管など CSF 吸収路に関わるチャンネルが存在することが示唆されているが、詳細な形態解析を示した研究は十分ではない。そこで、くも膜顆粒周辺の脳硬膜の形態解析を行った。くも膜顆粒に隣接する硬膜は基本的に連続した構造をとっており、密なコラーゲン線維で構成されていた。その中で一部不連続の領域が観察された (図 3A)。透過型電子顕微鏡解析により、内皮細胞に類似する細胞が配置されていたことから、試料調製の際に生じたアーティファクトではない、固有の構造物と言える。この硬膜の不連続の領域の直下には、細網構造と細胞の集団が観察された (図 3B)。さらに別の硬膜の不連続の領域では、くも膜下腔から SSS へと続くような比較的大きいギャップが観察された (図 3C, D)。

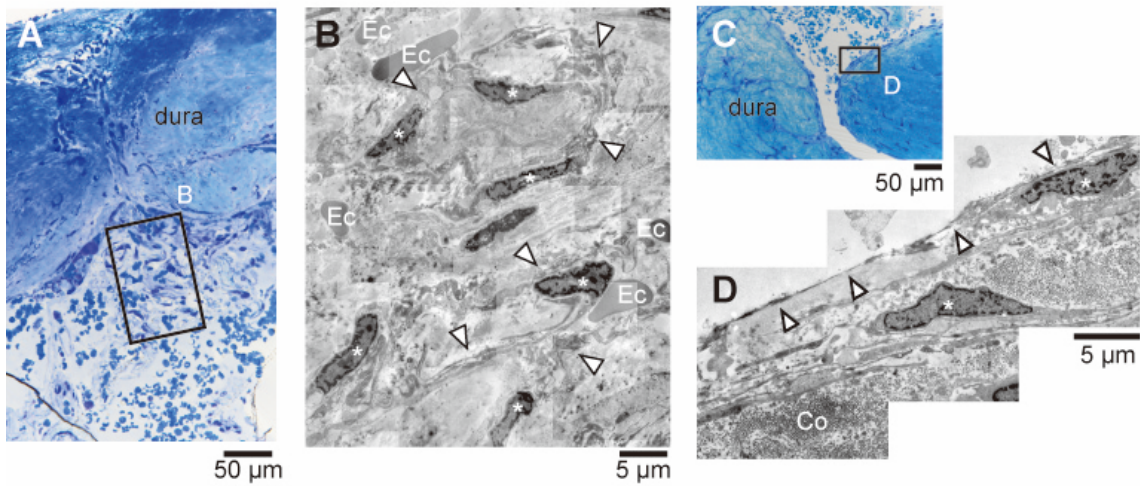


図3. ヒトくも膜顆粒周辺における脳硬膜の形態解析。

A: 光学顕微鏡解析による脳硬膜の形態。画像上部・下部はそれぞれ上矢状静脈洞側・くも膜下腔側を示す。B: 不連続な脳硬膜直下の領域（図3A中の黒枠）における透過型電子顕微鏡像。C: 比較的連続領域が大きい部位における脳硬膜の形態。画像上部・下部はそれぞれ上矢状静脈洞側・くも膜下腔側を示す。D: 図3C中の黒枠が示す領域における透過型電子顕微鏡像。不連続領域には細胞が配置されている。白矢尻: 細胞体; \*: 細胞核; Co: コラーゲン線維。Ec: 赤血球。

以上の観察結果は、ヒトくも膜顆粒にリンパ系の特徴を持ち、中枢神経系リンパ系として脳脊髄液の排出機構に機能する可能性を示唆するものである。同時に、特徴的な構造物を含む脳硬膜の形態が、進化的に高度に保存されている可能性を示唆すると言える。本研究の成果発表のため、論文準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kutomi Osamu, Nonaka Shigenori, Hozumi Katsuto, Takeda Sen	4. 巻 97
2. 論文標題 Depletion of Ifit88 in thymic epithelial cells affects thymic synapse and T-cell differentiation in aged mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 409, 422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12565-022-00663-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 Osamu Kutomi, Sen Takeda	4. 巻 69
2. 論文標題 Identification of lymphatic endothelium in cranial arachnoid granulation-like dural gap.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 391, 400
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jmicro/dfaa038	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7件（うち招待講演 4件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久富理、竹田扇
2. 発表標題 脳髄膜の形態解析による脳脊髄液の循環機構の研究
3. 学会等名 第78回日本顕微鏡学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sen Takeda, Osamu Kutomi
2. 発表標題 Towards Understanding the Role of Cilia in the Immune System
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福島瞭、久富理、岩野智彦、近藤哲夫、竹田扇
2. 発表標題 胸腺上皮細胞の一次繊毛欠損が及ぼす末梢免疫反応への影響
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久富理
2. 発表標題 原生生物の行動変化に関わる繊毛運動の制御機構の研究
3. 学会等名 第54回日本原生生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久富理、野中茂紀、竹田扇
2. 発表標題 Regulatory role of thymic epithelial primary cilia on the T cell development.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会/第98回日本生理学会合同大会（オンライン）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久富理、竹田扇
2. 発表標題 くも膜顆粒はリンパ管の特徴を持つ
3. 学会等名 日本解剖学会 第80回中部支部学術集会（誌上開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久富 理
2. 発表標題 脳脊髄液の循環における中枢神経系のリンパ系
3. 学会等名 第38回山梨神経科学研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap（久富 理） <a href="https://researchmap.jp/okutomi">https://researchmap.jp/okutomi</a>
--

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