

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06172

研究課題名(和文) ストレス依存的な一次繊毛の構造機能変化

研究課題名(英文) Stress-dependent structural and functional changes of primary cilia

研究代表者

池上 浩司 (Ikegami, Koji)

広島大学・医系科学研究科(医)・教授

研究者番号：20399687

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)：細胞外ストレスに対する一次繊毛の変化について、複数のストレスを検討した結果、高浸透圧ストレスにより一次繊毛が短縮および消失することを見出した。また、この高浸透圧ストレスによる一次繊毛の短縮・消失は一次繊毛基部の中心体周辺タンパク質の消失を伴うこと、細胞質全体の微小管およびアクチン線維の過剰形成を伴うことを見出した。さらに、細胞内の微小管およびアクチン線維の重合を阻害することで高浸透圧ストレスによる一次繊毛の短縮・消失、および中心体周辺タンパク質の消失が抑制されることを見出した。以上より、高浸透圧ストレスが細胞骨格過剰形成依存的に一次繊毛の短縮・消失を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一次繊毛は人体の発生や形態形成に重要な役割を担っており、これまで多くの遺伝性先天性形態異常との関連が「線毛病」として研究されてきた。本研究により細胞外ストレスによる非遺伝性の一次繊毛の形態異常が提示されたことで、今後は環境因子による線毛病の発症を探究する新しい研究が展開されることが大いに期待される。また一次繊毛消失とがん化は密接に関わっていると考えられており、今回得られたストレスによる一次繊毛の短縮・消失は環境因子による細胞がん化のメカニズムの一端を説明する可能性もあり、将来的な疾患理解につながる事が期待される。更に、一次繊毛短縮・消失を抑制する処理はそれらがん化を阻止する方法に発展しうる。

研究成果の概要(英文)：We examined multiple stresses for changes in primary cilia in response to extracellular stress and found that hyperosmotic stress caused shortening and loss of primary cilia. We also found that the shortening and loss of primary cilia due to hyperosmotic stress was accompanied by the loss of peri-centrosomal proteins at the base of primary cilia and by the hyper-formation of microtubules and actin fibers in the entire cytoplasm. Furthermore, we found that inhibition of polymerization of intracellular microtubules and actin fibers suppressed hyperosmotic stress-induced shortening and loss of primary cilia and loss of peri-centrosomal proteins. Taken together, these results demonstrate that hyperosmotic stress induces shortening and loss of primary cilia in a manner dependent on hyper-formation of intracellular cytoskeleton.

研究分野：細胞生物学

キーワード：一次繊毛 中心体 ストレス 浸透圧変化 微小管 アクチン線維

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) 一次繊毛は細胞表面に一本だけ突き出た細長い構造体である。この構造体は哺乳類から魚類まで脊椎動物全般において、からだを構成する多くの細胞で見られる。一次繊毛には受容体やチャネルが集積し、細胞外のシグナルを局所で受容する“アンテナ”の働きを担っている。
- (2) 一次繊毛は細胞周期や受容体のリガンド刺激に応答して伸縮する構造的可塑性も持っている (Phua et al. Cell 2017)。一次繊毛の形成不全は胚発生の初期から中期において重篤な発生異常 (心臓や神経系の形成不全など) を引き起こし、胎生致死を招く。一次繊毛が不完全に形成されたり一次繊毛のアンテナ機能に失調があったりすると、網膜、腎臓、脳、指形成など、全身の様々な器官や組織に形態異常や機能破綻が生じる。近年、これらの先天性異常と一次繊毛関連遺伝子の変異との関係が次々と明らかとなり、繊毛病 ciliopathy と呼ばれる疾患群として、世界中で研究が盛んに進められている。
- (3) 細胞周期やリガンド刺激による一次繊毛の伸縮が示すように一次繊毛は“動的”であるにも関わらず、研究開始当初、繊毛病に見られる遺伝性の一次繊毛変化に関する研究のほとんどは“静的”なアンテナ機能に着目したものであった。特に、環境因子やストレス因子に依存した一次繊毛の変化や、その結果として生じうる『繊毛病“様”現象』については研究の実施例がほとんどなく、未開拓の分野に近い状態であった。

### 2. 研究の目的

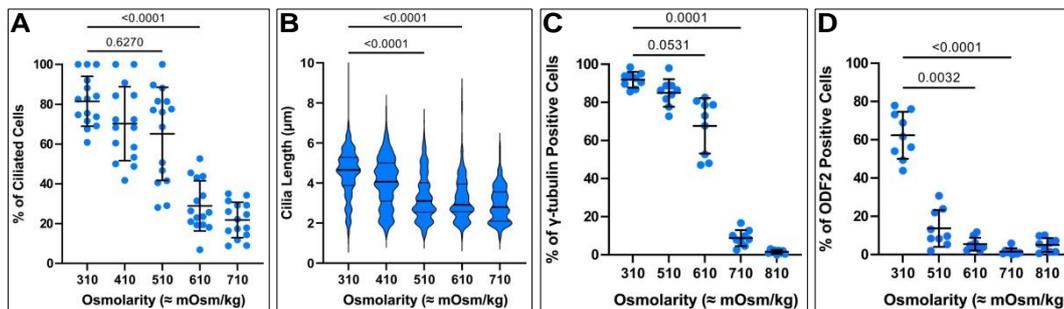
- (1) 本研究の目的は、第一に『ストレス依存的な一次繊毛の変化』を実証することである。また発見したストレス依存的な一次繊毛の変化の分子基盤を明らかにすることを第二の目標とする。これらをさらに広げ、それらストレス依存的な一次繊毛変化を原因とする繊毛病様現象を実証し、一次繊毛変化を抑制する手段の構築を通し、ストレス依存的な一次繊毛変化と繊毛病様現象を阻止することを目指す。究極的には、遺伝性繊毛病の中に潜んでいると予想される遺伝性因子と環境因子の相乗効果によって生じる繊毛病重篤化に光を当てる新視点を提供する。

### 3. 研究の方法

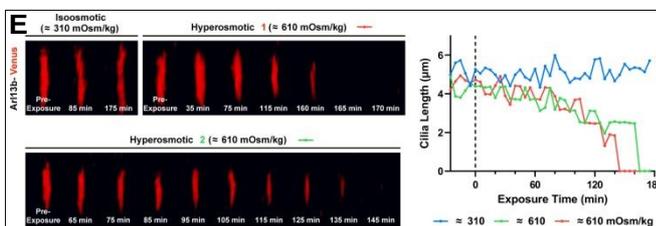
- (1) がんなどの病的状態ではなく生理学的条件に近い状態で検証するために、細胞の形態が正常に近く、正常組織形態を示しやすく、さらに一次繊毛の形成が良好な細胞としてマウス腎臓髓質集合管上皮から樹立された mIMCD-3 細胞を実験材料とした。mIMCD-3 細胞を過密培養することで上皮に分化させ、さらに細胞分裂を止めるために血清飢餓状態にすることで大部分の細胞に一次繊毛を形成させた。
- (2) 上皮に分化し一次繊毛を形成した mIMCD-3 細胞を正常状態の 2 倍程度の高浸透圧培地に曝露し、化学固定した後、一次繊毛のマーカーである ARL13B に対する抗体を用いて一次繊毛を免疫染色し、共焦点顕微鏡を用いて三次元的に一次繊毛の長さを測定した。
- (3) くわえて、一次繊毛の基部に局在する ODF2、チューブリンに対する抗体を用いた免疫染色を行い、それらのタンパク質の細胞内局在を共焦点顕微鏡を用いて観察および解析した。
- (4) 高浸透圧ストレスによって起こる一次繊毛の変化の経時変化を検証するために、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術を介したノックイン細胞を樹立した。ノックインでは一次繊毛に局在する ARL13B のカルボキシ末端に蛍光タンパク質 Venus を挿入した。樹立したノックイン細胞を用いてタイムラプス共焦点顕微鏡法により一次繊毛の形態変化を三次元的に撮影した。
- (5) 細胞内の超微細形態をさらに検証するために、高浸透圧ストレスに曝露した細胞を強力に化学固定し、超薄切片を作製し透過電子顕微鏡により一次繊毛の形態、一次繊毛基部の形態、細胞内細胞骨格の形態を観察した。
- (6) 高浸透圧ストレスによって起こる一次繊毛の変化に寄与する分子を同定するために、細胞骨格に着目し阻害剤を用いて検証した。アクチン線維の形成を阻害する Laturunculin A、微小管の重合を阻害する Nocodazole の効果を検討した。

#### 4. 研究成果

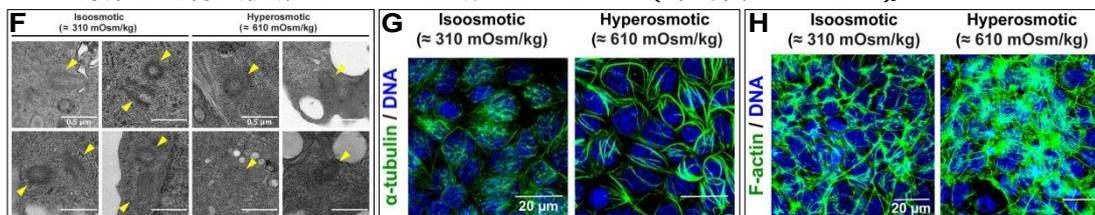
- (1) 高浸透圧ストレスに曝露した mIMCD-3 細胞の免疫染色サンプルを共焦点顕微鏡を用いて三次元的に観察した結果、浸透圧強度依存的に一次繊毛を有する細胞が減少することが明らかとなった(下グラフ A)。また、残っている一次繊毛の長さも浸透圧強度依存的に減少することが明らかとなった(下グラフ B)。
- (2) 一次繊毛に加えて、高浸透圧ストレスに曝露した mIMCD-3 細胞の中心体周辺タンパク質の免疫染色サンプルを共焦点顕微鏡で観察した結果、チューブリンや ODF2 が浸透圧強度依存的に消失することが明らかとなった(下グラフ C および D)。興味深いことに、高浸透圧ストレスによる中心体周辺タンパク質の消失はタンパク質ごとに応答が異なることが明らかとなった(下グラフ C と D の比較)。また、高浸透圧ストレスに対する応答は中心体周辺タンパク質の方が一次繊毛よりも敏感であることが明らかとなった(下グラフ A, C, D の比較)。



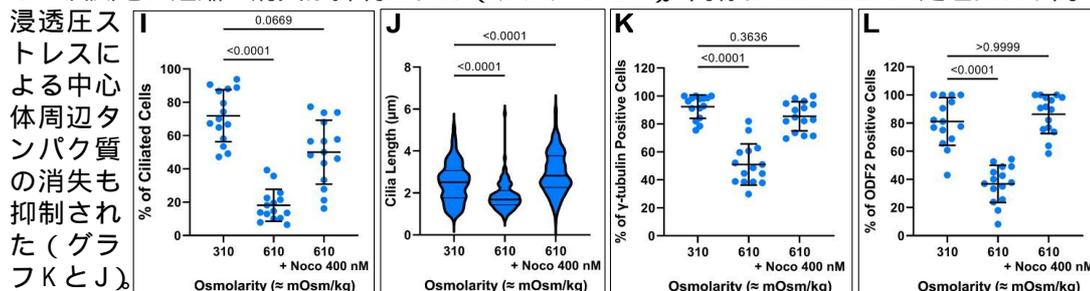
- (3) ゲノム編集で樹立した蛍光タンパク質標識 ARL13B の生理学的レベル安定発現ノックイン細胞株を用いて、共焦点顕微鏡による三次元タイムラプスイメージングを行った結果、高浸透圧ストレスへの曝露から 2 時間経過する頃から急激に一次繊毛が短縮することが明らかになった(上図 E)。



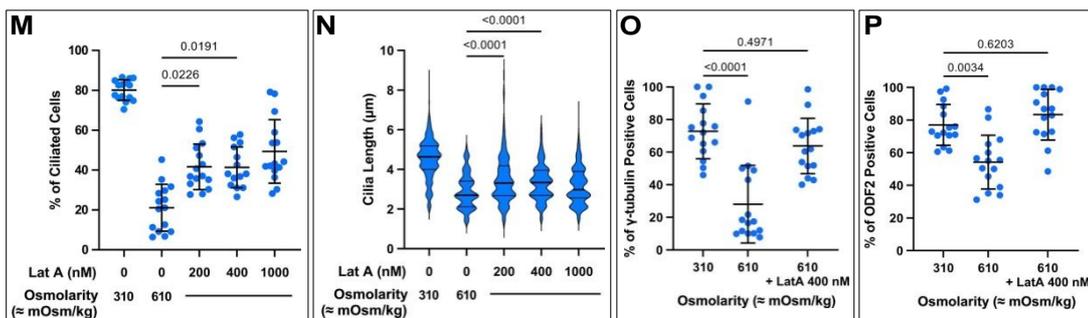
- (4) 高浸透圧ストレスに曝露した mIMCD-3 細胞を透過電子顕微鏡で観察した結果、興味深いことに、高浸透圧ストレスによる一次繊毛基部中心体周辺タンパク質の消失にも関わらず中心体のコア構造自体は保たれていることが明らかとなった(左下写真 F)。
- (5) 高浸透圧ストレスに曝露した mIMCD-3 細胞内の細胞骨格の状態を、抗チューブリン抗体あるいは蛍光標識されたアクチン線維結合分子ファロイジンを用いて可視化したのちに共焦点顕微鏡で観察した結果、高浸透圧ストレスによって細胞質全体において微小管やアクチン線維が過剰に形成されることが明らかとなった(下写真 G および H)。



- (6) 高浸透圧ストレスによる細胞骨格の変化が一次繊毛の短縮や消失、中心体周辺タンパク質の消失などに関わっているという仮説を立て、細胞骨格形成阻害剤を用いた検証実験を行った。微小管重合を阻害する Nocodazole で細胞を処理した結果、高浸透圧ストレスによる一次繊毛の短縮・消失が抑制された(グラフ I と J)。同様に Nocodazole 処理により高浸透圧



(7) アクチン重合阻害剤 Laturunculin A で細胞を処理した結果、高浸透圧ストレスによる一次繊毛の短縮・消失が抑制された(グラフ M と N)。同様に Latrunculin A 処理により高浸透圧ストレスによる中心体周辺タンパク質の消失も抑制された(グラフ O と P)。興味深いことに、アクチン線維形成阻害による高浸透圧ストレス依存的な一次繊毛短縮と消失の抑制は、微小管重合阻害による抑制よりも軽微であった(グラフ I, J と M, N の比較)。しかし、それに関わらずアクチン線維形成阻害は高浸透圧ストレスによる中心体周辺タンパク質の消失をほぼ完全に抑制した(グラフ M, N とグラフ O, P の比較)。



(8) 以上の一連の結果から、高浸透圧ストレスにより一次繊毛が短縮および消失することが示された。さらに、この高浸透圧ストレス依存的な一次繊毛の短縮および消失は一次繊毛基部に集積する中心体周辺タンパク質の消失を伴うことも示された。細胞骨格重合阻害の結果より、これら高浸透圧ストレスによる一次繊毛短縮・消失と中心体周辺タンパク質の消失は、細胞骨格過剰重合を介して起こる一方で、異なる経路を介していることが示唆された。これらの研究結果は各種学会で発表するとともに、英文論文にまとめた上でプレプリントとして公開したのち学術雑誌に投稿した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Otani Hiroshi, Nakazato Ryota, Ijaz Faryal, Koike Kanae, Ikegami Koji	4. 巻 -
2. 論文標題 Excessive F-Actin and Microtubule Formation Mediates Primary Cilia Shortening and Loss in Response to Increased Extracellular Osmotic Pressure	5. 発行年 2024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） 10.1101/2024.01.25.577175	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 Nakazato Ryota, Matsuda Yuki, Ijaz Faryal, Ikegami Koji	4. 巻 24
2. 論文標題 Circadian oscillation in primary cilium length by clock genes regulates fibroblast cell migration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e56870
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.202356870	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 Nakazato Ryota, Otani Hiroshi, Ijaz Faryal, Ikegami Koji	4. 巻 175
2. 論文標題 Time-lapse imaging of primary cilium behavior with physiological expression of fluorescent ciliary proteins	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 45～68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.mcb.2022.10.003	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 Ijaz Faryal, Nakazato Ryota, Setou Mitsutoshi, Ikegami Koji	4. 巻 12
2. 論文標題 A pair of primers facing at the double-strand break site enables to detect NHEJ-mediated indel mutations at a 1-bp resolution	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-15776-5	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 -

1. 著者名 中里亮太、池上浩司	4. 巻 39
2. 論文標題 細胞外小胞と一次繊毛の最新知見 繊毛による受信, 繊毛からの放出, そして繊毛を介した発射?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 3208-3214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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18件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Hiroshi Otani, Ryota Nakazato, Koji Ikegami
2. 発表標題 F-Actin-dependent deformation of primary cilia and pericentriolar matrix and release of selective primary cilia proteins into media by hyperosmotic shock
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中里亮太、松田悠生、木曾遼太郎、池上浩司
2. 発表標題 概日リズムと一次繊毛の関係性
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池上浩司
2. 発表標題 Four-dimensional imaging of a primary cilium, a submicron cellular structure
3. 学会等名 第64回日本神経病理学会総会学術研究会 / 第66回日本神経化学大会 合同大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中里亮太、松田悠生、木曾遼太郎、池上浩司
2. 発表標題 時計遺伝子による一次繊毛の構造制御
3. 学会等名 日本睡眠学会第45回定期学術集会 / 第30回日本時間生物学会学術大会 合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中里亮太、松田悠生、Faryal Ijaz、池上浩司
2. 発表標題 概日振動する一次繊毛長の生理学的意義
3. 学会等名 第77回日本解剖学会中国四国支部学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中里亮太、松田悠生、Faryal Ijaz、池上浩司
2. 発表標題 時計遺伝子により制御される一次繊毛の生理学的意義
3. 学会等名 第13回繊毛研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中里亮太、松田悠生、Faryal Ijaz、池上浩司
2. 発表標題 時計遺伝子による一次繊毛長制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hiroshi Otani, Ryota Nakazato, Faryal Ijaz, Kanae Koike, Koji Ikegami
2. 発表標題 Increase in extracellular osmotic pressure causes primary cilia shortening and loss dependently on F-actin and microtubule excessive formation
3. 学会等名 Cell Bio 2023-An ASCB EMBO Meeting
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroshi Otani, Ryota Nakazato, Koji Ikegami
2. 発表標題 Shrinking and loss of primary cilia associated with translocation of centrosomes upon hypertonic shock
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Faryal Ijaz, Ryota Nakazato, Mitsutoshi Setou, Koji Ikegami
2. 発表標題 Double-strand break Site-Targeted PCR coupled with high concentration TBE-PAGE enables to detect NHEJ-mediated indel mutations at a 1-bp resolution
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中里亮太、木曾遼太郎、松田悠生、池上浩司
2. 発表標題 概日リズムにおける脳内一次線毛の形態解析
3. 学会等名 第76回日本解剖学会中国四国支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大谷拓史、中里亮太、池上浩司
2. 発表標題 Shrinking and loss of primary cilia associated with delocalization of pericentriolar proteins upon hypertonic shock
3. 学会等名 第76回日本解剖学会中国四国支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大谷拓史、中里亮太、Faryal Ijaz、小池香苗、池上浩司
2. 発表標題 Reversible shrinking and loss of primary cilia and delocalization of pericentriolar proteins upon hypertonic shock
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中里亮太、松田悠生、池上浩司
2. 発表標題 概日リズムを示す一次繊毛の生理学的意義
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池上浩司
2. 発表標題 5'UTRへのノックインによるタグ標識タンパク質の生理的非過剰発現
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Faryal Ijaz、池上浩司
2. 発表標題 Knock-in of Labeled Proteins into 5' UTR Enables Highly Efficient Generation of Stable Cell Lines
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大谷拓史、中里亮太、池上浩司
2. 発表標題 高浸透圧ショックによる一次繊毛の形態変化
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池上浩司
2. 発表標題 Primary cilium functions as an extracellular vesicles-launching device
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>広島大学大学院医系科学研究科 解剖学及び発生生物学研究室  <a href="https://anatomy.hiroshima-u.ac.jp/index.html">https://anatomy.hiroshima-u.ac.jp/index.html</a>          広島大学大学院医系科学研究科 解剖学及び発生生物学研究室  <a href="https://www.hiroshima-u.ac.jp/med/research/lab/basis/Anatomy_and_Developmental_Biology">https://www.hiroshima-u.ac.jp/med/research/lab/basis/Anatomy_and_Developmental_Biology</a></p>
---

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
研究分担者	中里 亮太  (Nakazato Ryota)  (30761803)	広島大学・医系科学研究科(医)・助教    (15401)	

	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	大谷 拓史  (Otani Hiroshi)		
研究協力者	イジャーズ ファリアール  (Ijaz Faryal)		
研究協力者	小池 香苗  (Koike Kanae)		

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			
米国	ジョンズホプキンス大学			