

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660230

研究課題名(和文)新たに同定された水頭症原因遺伝子の幹細胞維持機構における役割解明

研究課題名(英文)Studies on roles of a newly identified hydrocephalus gene for maintenance in stem cells

研究代表者

桑村 充 (KUWAMURA, MITSURU)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

研究者番号：20244668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの全身諸臓器のCcnc85c発現を確認したところ、肝細胞、胆管などの上皮系細胞で発現が認められた。発達期の細胞分裂が活発な時期および部位において、強い発現が確認され、細胞分裂や形態形成に重要であることが示された。イヌとネコの正常乳腺と腫瘍性腺上皮細胞においても、ラットと同様に細胞間の頂端側で強いシグナルがみられた。イヌとネコでは筋上皮細胞の一部においても、Ccnc85cの発現が認められた。腫瘍において、管腔を形成する腫瘍細胞では、頂端側にCcnc85c発現がみられたが、びまん性・シート状に増殖する上皮性細胞では発現は弱かった。イヌの悪性乳腺腫瘍では、発現が減弱する傾向が認められた。

研究成果の概要(英文)：Ccnc85c is a causative gene for spontaneous mutant mouse with non-obstructive hydrocephalus. Ccnc85c was expressed in various simple epithelia but not stratified epithelia. Ccnc85c was localized at cell-cell junctions and its expression was strong at apical junctions. Intense expression was seen at developing period and gradually decreased with advancing development. Distribution of Ccnc85c coincides with that of proliferating epithelial cells. These results suggest that Ccnc85c plays an important role in the proliferative property of simple epithelia. In the canine mammary gland tumors, Ccnc85c was expressed at the apical junctions of the luminal epithelial cells and distributed throughout the entire cytoplasm of the myoepithelial cells. Ccnc85c expression was not observed at the epithelial cells forming sheet growth pattern. In the carcinomas, Ccnc85c expression in mammary tumor tissue tended to be weaker than that in surrounding normal mammary gland tissue.

研究分野：獣医病理学

キーワード：神経幹細胞 水頭症 細胞極性 上皮細胞 細胞増殖 細胞分化

### 1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループは、水頭症を発症する自然発生ミュータントマウスを発見し、hhy(hemorrhagic hydrocephalus)マウスと名付けた(Kuwamura M *et al. Dev Brain Res* 152: 69-72, 2004)。また、hhyマウスの原因遺伝子がCcdc85c (coiled-coil domain containing 85c)であることが明らかとなった。Ccdc85C 蛋白は、大脳の発達において神経幹細胞の頂端部に発現しており、Ccdc85C 発現が欠損するホモ型マウスでは、ネスチン陽性の神経幹細胞の早期枯渇を引き起こすこと、さらに同部位で大脳皮質発達障害を来し異所性灰白質組織が形成されることを発表した(Mori N, Kuwamura M *et al. Am J Pathol*, 180: 314-327, 2012)。Ccdc85c の役割については我々のグループが世界で初めて明らかにしたが、現在、国内外において Ccdc85c について研究しているグループはなく、その機能の多くは不明である。

### 2. 研究の目的

遺伝性水頭症モデル hhy マウスの原因遺伝子が新規の Ccdc85c (coiled-coil domain containing 85c)であることを突き止め、Ccdc85C が大脳の発達において神経幹細胞の頂端部に発現し、その欠損は神経幹細胞の早期枯渇を引き起こすことを明らかにした (*Am J Pathol*, 180: 314-327, 2012)。Ccdc85c の生物学的な役割については不明点が多い。本研究は、神経幹細胞および全身の幹細胞の機能維持における Ccdc85C の役割を明らかにし、幹細胞を用いた再生医療に向けた臨床応用のための基礎研究の一助とすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

**動物:** 本学理学部にて維持している hhy マウスのヘテロマウスを交配し、得られた発症マウス(ホモ型)および対照マウス(野生型, ヘテロ型)を用いる。マウスの遺伝

子型は、Ccdc85C 特異プライマーを用いた PCR と電気泳動を行ってタイピングを行い決定する。また、TALEN を用いたゲノム編集技術によって Ccdc85c ノックアウトラットを作製し、本研究に用いた。

### 全身諸臓器における Ccdc85C 発現分布と細胞周期解析

胎齢 15 日から生後 2 週までの胎仔および新生仔の全身諸臓器から total RNA を抽出し、Ccdc85C 特異プライマーを用いた RT-PCR 法によって、全身の発現動態を解析する。また、発現が見られた臓器においては、凍結切片を作製して抗 Ccdc85C 抗体を用いた免疫組織化学を行って発現細胞を同定する。各種細胞増殖マーカー-MCM 7 (G1 期初期~S 期), Ki -67 (全ての細胞周期), Topo a(S 期後期~G2/M 期), BrdU (S 期) に対する免疫組織化学と Ccdc85C 抗体を用いた多重免疫組織化学を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、Ccdc85C 発現細胞の細胞周期と特徴を明らかにする。

### Ccdc85C の細胞内局在と細胞分化に伴う動態解析

Ccdc85C の発現が見られた組織については、4%パラフォルムアルデヒドを経左心灌流固定した後、凍結切片を作製する。作製した凍結切片と抗 Ccdc85C 抗体を用いた免疫電子顕微鏡法(プレエンベディング・ナノゴールド法)を行い、Ccdc85C の細胞内局在を同定する。また、様々な日齢の組織における Ccdc85C の分布の変化を詳細に検討し、その消長を観察する。さらに各種細胞マーカーに対する免疫電顕を DAB ブラック法にて行い、Ccdc85C との二重免疫電顕によって細胞を同定し、特定の細胞内での Ccdc85C の分布変動を明らかにする。

## 自然発生腫瘍における Ccdc85C の発現解析

マウスおよびラットに自然発生した神経芽細胞腫，髄芽腫，肝細胞癌，胃癌，小腸・大腸癌，精上皮腫を収集し，免疫組織化学的に Ccdc85C の発現を検討する．幾つかの腫瘍については，既に我々の研究室にサンプルがあり，利用した．発現が認められた腫瘍については，様々な悪性度の腫瘍細胞を収集し，悪性度の変化に伴う Ccdc85C の発現変動を免疫組織化学あるいは Western blot 解析によって検討する．使用する Ccdc85C 抗体は，ラット Ccdc85C と交差反応することをすでに検証しており，様々な動物種で交差反応が期待できる．そこで，腫瘍マーカーとしての発展性を検討する目的で，イヌ，ネコなどの自然発生腫瘍についても同様に発現検討を行う．

## Ccdc85c 欠損に伴う遺伝子発現のプロファイリング比較

hhy マウスでは，脳室の背部に限局して，神経幹細胞の早期離脱，それに続く異所性灰白質形成が認められるが，なぜ Ccdc85C 欠損時に背部のみ幹細胞に異常が見られるかは不明のままである．胎齢 15 日の胎仔～生後 1 週齢の新生仔の発達途中の脳の凍結切片を作製し，レーザーマイクロダイセクション装置を用いて背部，側部の神経上皮細胞を分離・回収する．それらのサンプルから mRNA を抽出し cDNA を逆転写してマイクロアレイ解析を行い，遺伝子の発現パターンをスクリーニングする．スクリーニングによって変動が予想される遺伝子を選択し，リアルタイム PCR 法にて背部と側部で比較し，発達に伴う経時的変動を検討する．さらに興味ある変動が見られた遺伝子については，遺伝子特異的な RNA プローブを作製し，in situ hybridisation

法を行って発現細胞の分布を比較・検討するとともに，リアルタイム PCR 解析を行い詳細に調べる．

## 4. 研究成果

TALEN を用いたゲノム編集によって，F344 ラット Ccdc85c をノックアウトした Ccdc85c のエクソン 1 をターゲットとし，Platinum TALEN を使用したところ，Ccdc85c に変異を有する F0 ラットを 9 匹得られた．野生型 F344 ラットと交配して F1 ラットを作出し，さらに F1 ラット同士の交配によって F2 ラットを得た．そのうちの 1 系統の F2 ラットに頭部の腫大したラットが確認された．ゲノム DNA を用いた PCR の結果，このラットでは Ccdc85c の一部に約 300bp の欠失がみられ，Ccdc85c ノックアウトラットの作製に成功した．

Ccdc85C ノックアウトラットでは，生後 14 日頃から頭部の腫大が認められ，多くの発症ラットは約 1 ヶ月齢頃で死亡した．発症ラットでは，頭蓋内出血がみられ，側脳室の拡張し水頭症を発症していた．

ノックアウトラットを組織学的に解析したところ，組織学的にも出血を伴う水頭症が確認された．さらに，側脳室の背側を中心に異所性灰白質の形成が認められた．これら肉眼的，組織学的な病変は，hhy マウスの所見と極めて類似していたが，ノックアウトラットの異所性灰白質の大きさは，hhy マウスに比べて大きかった．

次にラットの Ccdc85C への詳細な解析を行うため，ラットの Ccdc85c 配列に対する特異的な抗体作製を行った．GST 融合タンパク発現系を構築し，目的のタンパクを精製後ウサギに免疫して抗体を得た．胎齢期から成体ラットの全身諸臓器の凍結切片を用いて，Ccdc85C の発現動態を免疫組織化学的に検討した．

ラットの様々な全身諸臓器における Ccdc85c 遺伝子の発現を免疫組織化学および

RT-PCR 法にて確認したところ、肝細胞、胆管、尿細管上皮細胞、鼻粘膜上皮細胞、気管支上皮、腸管上皮細胞などの様々な上皮系細胞で Ccdc85C の発現が認められた。

さらに臓器・組織の発達に伴う発現変動を免疫組織化学と RT-PCR 法で確認したところ、発達期の細胞分裂が活発な時期および部位において、Ccdc85C の強い発現が確認された。Ccdc85C の発現は、組織の発達とともに徐々に減少した。以上の所見より、Ccdc85C が細胞分裂や形態形成に何らかの役割を演じていることが示された。

イヌ、ネコおよびラットの乳腺腫瘍を収集し、Ccdc85C 抗体を用いて免疫組織化学を行ったところ、ラットの乳腺において、Ccdc85C は腺上皮細胞に発現しており、正常組織の上皮細胞と同様に細胞間の頂端側にシグナルが認められた。イヌとネコの正常乳腺と腫瘍性腺上皮細胞においても、ラットと同様に細胞間の頂端側で強いシグナルがみられた。イヌとネコでは、正常乳腺および腫瘍の筋上皮細胞の一部においても、Ccdc85C の発現が認められた。腫瘍において、管腔を形成する腫瘍細胞では、頂端側に Ccdc85C 発現がみられたのに対して、腺構造を形成せずにびまん性・シート状に増殖する上皮性細胞においては、Ccdc85C の発現は弱かった。腫瘍の悪性度と Ccdc85C 発現との関連性を調べる目的で、正常乳腺組織と腫瘍細胞間の発現強度と悪性度を検討したところ、イヌの悪性乳腺腫瘍では、Ccdc85C 発現が减弱する傾向が認められた。

#### 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1件)

Tanaka N, Izawa T, Takenaka S, Yamate J, Kuwamura M  
Ccdc85C, a causative protein for hydrocephalus and subcortical heterotopia, is expressed in the systemic epithelia with proliferative activity in rats

Histology and Histopathology 30: 823-832, 2015. 査読有  
doi: 10.14670/HH-11-589

〔学会発表〕(計1件)

Tanaka N, Izawa T, Yamate J, Kuwamura M  
Ccdc85C expression in mammary gland tumors in animals.  
ACVP, ASVCP, and STP combined Annual Meeting  
2015年10月17日~21日  
ミネアポリスコンベンションセンター, ミネアポリス, 米国

〔図書〕(計1件)

Mori N, Kuwamura M, Tanaka N  
Hydrocephalus (Edt: Amaya Velazquez)  
Hemorrhagic hydrocephalus (hhy): a novel hydrocephalus mouse mutation with near-perfect penetrance  
Nova Science Publishers, Inc, (107-115), 2013

〔その他〕

ホームページ等  
大阪府立大学 獣医病理学教室ホームページ  
<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/path/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

桑村 充 (Kuwamura Mitsuru)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授  
研究者番号: 20244668

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

森 展子 (Mori Nobuko)  
大阪府立大学・理学研究科・教授  
研究者番号: 90100221