

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460271

研究課題名(和文) 一次繊毛を介した神経細胞分化ならびに形態形成機構の解明

研究課題名(英文) Molecular Mechanism of Neuronal Differentiation Regulated by Primary Cilium

研究代表者

竹田 扇 (TAKEDA, Sen)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：20272429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞は脳の基本単位であり、グリア細胞と血管に囲まれた骨格の中に局在する。またその間隙は組織液で満たされており微小周囲環境からの情報も受容する。本研究では、その様な外部環境変化の受容機構、また受容後の細胞内情報伝達機構、そしてアウトプットとしての細胞移動に焦点をあて、神経発生において一次繊毛が重要な役割を担っていることを明らかにした。具体的にはMHCというホルモンによって繊毛長の調節が行なわれ、それはcAMPを介して繊毛それ自身の短縮を引き起こし、これが細胞移動や分化と関係することを示唆するデータを得た。この結果は今後様々な神経疾患の病態解明の基礎データとして寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Neurons are the fundamental components of brain and are woven into the glial and vascular cytoarchitecture, whose internal space is filled with interstitial fluid forming microenvironment. Therefore, neurons may receive various signals from surrounding milieu to modulate their function. In this study, I focused on the molecular receptive mechanism, intracellular signaling relay and the behavior of neurons during development in terms of primary cilia installed on the neurons. This study revealed that melanin concentrating hormone (MCH) regulates the length of cilia via G-protein coupled receptors (GPCRs), whose downstream is mediated by cAMP. Moreover, it implies the importance of cilia in regulating the migration of neuronal stem cell towards pail surface via ciliary guidance. Collectively, this study provides several lines of evidence that primary cilia contribute to the neurogenesis. This will pave the way for elucidating the pathogenesis of neuronal ciliopathy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：繊毛 神経幹細胞 細胞移動 神経分化

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は主にシナプス入力を受けてこれを細胞体で統合し、軸索から再度シナプスを介して次の神経細胞に伝達するという情報伝達システムを有している。この様なシナプス伝達の構造的基盤や生理学的性質についての詳細な検討がなされてきたが、この神経情報伝達系のセントラルドグマだけでは説明できない現象も多々存在している。例えば、一般の神経細胞には一次繊毛が存在する事は比較的古くから報告されてきているが (Dahl, 1963; Karlsson, 1966)、一次繊毛が上述の様々な現象を説明しうる構造である可能性がある。

一次繊毛が再発見された重要なマイルストーンの一つとして、1990年代に研究代表者らが発見した哺乳類の体の左右非対称性を決めるノードの一次繊毛が挙げられる (Nonaka et al., 1998; Takeda et al., 1999)。モーター蛋白質 *Kif3* の完全欠失体を作成したところ、発生中期に形成されるノードの繊毛が消失していた。ここには通常 9+2 の軸糸構造を持つ繊毛ではなく、中心の微小管対を欠く (9+0) 一次繊毛が存在していた。その後、他のグループに依って一次繊毛には G 蛋白質共役受容体を中心とする多様な受容体が存在することが明らかとなり、繊毛が細胞外環境の受容を行い、細胞機能を調節するバイオセンサーである事がコンセンサスとなっている (Gerdes et al., 2009)。他方で、一次繊毛下流のシグナル伝達系やそのエフェクター分子に関しては未だ不明な点が多い。

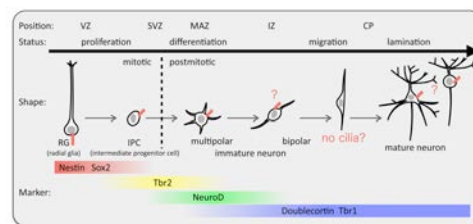
バイオセンサーとしての一次繊毛の理解は今日かなり進んでいるが、その下流のシグナル伝達系や生理機能そのものに関しては余り研究が進んでいない。*Kif3* の発現量を野生型の数%程度にまで低下させた hypomorph マウスでは (Takeda et al., 2004)、繊毛病でよく見られる表現形の他に、脳の高次機能の異常に起因すると思われる運動異常、行動異常等の症状が出現し、研究代表者はこれが中枢神経系の一次繊毛異常に依る調節障害及び先天的な神経細胞の形態形成異常であると考えに至った。その原因の一つとして一次繊毛上に存在するソマトスタチン受容体 3 型 (*Sstr3*) がシナプス可塑性に影響を与えることが示されている (Einstein et al., 2010)。しかしながら、(1) この様な異常を説明する背景として他にどの様な細胞内情報伝達系が関係しているのか、(2) 一次繊毛に依るシ

グナル受容は神経細胞の分化にどの様に関わっているのか、(3) 一次繊毛を介した神経細胞の形態形成と繊毛病はどの様に関係しているのか、といった重要な問題が一部は解析が始まったところではあるが (Higginbotham et al., 2013)、大部分は依然として解決されずに残されている。

2. 研究の目的

本研究では細胞の外部センサーである一次繊毛が細胞外部環境からの情報を受容したあと、どの様な細胞内情報伝達機構で細胞分化や細胞機能の調節を行っているかを解明することを目的とする。具体的には神経系細胞を中心に、(1) 一次繊毛上に存在する G 蛋白質共役受容体 (GPCR) を刺激した際にどの様な細胞内情報伝達系が活性化されるのか、(2) 活性化された際に細胞のどの様なエフェクター分子に情報が伝達されて形態変化や細胞分化が齎されるのか、(3) 大脳皮質形成時に一次繊毛はどのような動態を示すか (図 1)、という観点からシステム論的な理解を目標とする。これらの知見に基づいて、神経細胞分化機構、神経・グリア関連に於ける一次繊毛の生理的機能を解明するのみならず、整然とした神経構築の分子機構の解明を企図する。

図 1 神経発生と繊毛 脳室帯 (VZ) から皮質板 (CP) に移動する神経細胞の一次繊毛動態は不明である。細胞移動、形態形成と一次繊毛の関係を解明するのが本研究の目的の一つである。



3. 研究の方法

- (1) 細胞が一次繊毛で受容したシグナルを細胞内エフェクター分子に伝達する機構解析
 - ① 現在初代培養アストロサイトと海馬神経細胞でリガンド (MHC, SAG, Shh など) を投与した際の細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 応答のデータの蓄積を行う。
 - ② $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が ER からのものなのか、それとも細胞外からのものであるのかを確認するた

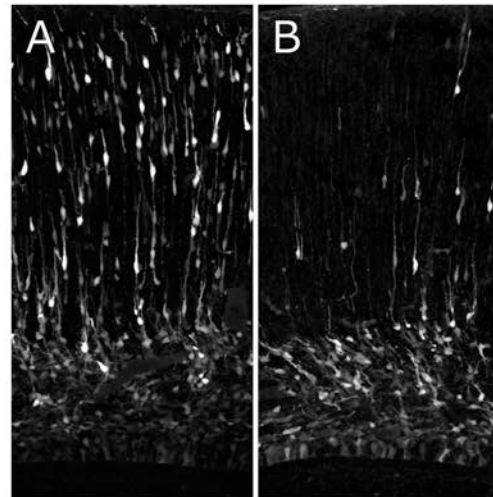
- めに、 $[Ca^{2+}]_i$ を除去した培養液でのリガンド投与効果を観察する。更に、dantrolene や 2-ABP 等の阻害剤を用いて Ca^{2+} チャンネルの特定を行う。
- (2) 神経幹細胞が一次繊毛で受容したシグナルに依って分化する分子機構の解析
- ① 受容体下流のシグナル伝達分子と考えられる ACIII や $G\alpha_{11}$ の各種変異体 (恒常的活性型、ドミナントネガティブ型) 発現ベクターを導入してリガンド刺激を行い、細胞骨格動態の変化を解析する。また同時にアクチン動態を制御する活性型 Rac の定量を行なう。
 - ② 一次繊毛の形成阻害に依ってリガンド刺激時の一連の現象がどのように変化するかを *Ift88* (Pazour et al., 2000) に対する shRNA を、レンチウイルスを用いて感染させ検証する。
- (3) 神経発生時における大脳皮質層構造と一次繊毛の関係
- ① EGFP と Arl13-mCherry と Flag-dnKIF3a を電氣的穿孔法により胎生 14 日でマウス脳に発現させる。胎生 17 日で脳を取り出し、神経分化マーカー染色を組み合わせて評価する。
 - ② 蛍光分子標識神経細胞の移動度と繊毛形成ならびに層構造形成との関係を組織切片を用いて免疫蛍光染色を併用し解析する。
 - ③ Joubert 症候群患者線維芽細胞を用いて細胞移動を解析し、繊毛関連分子の異常による細胞移動の変化を観察記録する。

4. 研究成果

- (1) 受容体下流の情報伝達系に関して:メラニン濃縮ホルモン(MHC)で細胞を刺激すると、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇、ERK や Akt のリン酸化、 $[cAMP]_i$ の濃度低下が起こり、菌結果として $G_{i/o}$ 依存性に繊毛の短縮が起こることを明らかにした (文献 1)。
- (2) 繊毛関連分子変異細胞における細胞骨格動態に関して: Joubert 症候群患者の線維芽細胞では繊毛長の短縮、繊毛形成障害が見られること判った。現在、繊毛関連分子の異常が繊毛長の調節を行なう分子機構に関して、患者由来 iPS 細胞を用いた実験を企図している。

- (3) 繊毛関連蛋白質変異による神経細胞、線維芽細胞の細胞運動に関して:脳室下帯に位置する神経幹細胞は繊毛を有するが、上方に移動する途中では繊毛が一時的に消失し、局所に落ち着くと再び繊毛を形成することがわかった。また dominant negative *Kif3a* 繊毛形成を抑制すると、細胞運動が遅延した (図 2)。現在、細胞移動と繊毛形成の関係を培養系で検討することを計画している。

図 2 繊毛形成阻害を行なった際の細胞移動コントロール (A) では細胞の上方移動が見られるが、ドミナント・ネガティブ *Kif3a* 発現群では著しい遅延 (B) が見られ、多くの神経幹細胞は脳室周囲に留まっている。



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 5 件) 全て査読あり

1. Hamamoto, A., Yamato, S., Katoh, Y., Nakayama, K., Yoshimura, K., Takeda, S., Kobayashi, Y. and Saito, Y. Modulation of primary cilia length melanin-concentrating hormone receptor 1. *Cell Signal.* 28, 572-84. 2016. doi:10.1016/j.cellsig.2016.02.018.
2. Odate, T. Takeda, S. Narita, K. and Kawahara, T. 9+0 and 9+2 cilia are randomly dispersed in the mouse node. *Microscopy.* 65,119-26. 2016. doi: 10.1093/jmicro/dfv352.
3. Narita, K. and Takeda, S. Cilia in the choroid plexus: their roles in hydrocephalus and beyond. *Frontiers in Cellular Neuroscience.*

- 2015.doi:10.3389/fncel.2015.0003.
4. Inoue, T., Narita, K., Nonami, Y., Nakamura, H. and **Takeda, S.**
Observation of ciliary movement of choroid plexus epithelial cells ex vivo. *J. Vis. Exp.* 101.e52991. 2015. doi: 10.3791/52991.
 5. Narita, K., Sasamoto, S., Koizumi, S. Okazaki, S., Nakamura, H., Inoue, T. and **Takeda, S.** TRPV4 regulates the integrity of the blood-cerebrospinal fluid barrier and modulates transepithelial protein transport *FASEB.J.* 29, 2247-59. 2015. doi: 10.1096/fj.14-261396.

〔学会発表〕（計 2 件）

1. **Sen Takeda**: A novel approach in personalized medicine: mass spectrometry and machine learning. 22th International Conference on Laboratory Medicine. Plenary Lecture (Invited). Padova (Italy). 2015 年 10 月 22 日
2. 竹田 扇: 「神は細部に宿る: 繊毛機能の解明とジュベール症候群の治療に向けて」2015 年 12 月 13 日 東京大学医学部附属病院 (東京都文京区) AMED 難病対策 班会議一般向け講演

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

1. アウトリーチ活動
がん診断装置をつくる サイエンスカフェ 2015 年 7 月 17 日
富山房 (東京都千代田区)
2. ホームページ
<http://www.cellbiology.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 扇 (TAKEDA, Sen)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号: 20272429