

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462206

研究課題名(和文) 上衣細胞の細胞周期再開と運命決定制御による脊髄損傷修復促進技術の開発

研究課題名(英文) Regeneration of CNS axons by ependymal cell fate regulation

研究代表者

藤谷 昌司 (Fujitani, Masashi)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40376372

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)：上衣細胞の細胞周期再開と脱分化にp73,p53が関与することを証明することができなかった。しかし、上衣細胞特異的p73ノックアウトマウスを活用し、p73によるシリア形成制御機構に関する研究を行った。p73ノックインマウスを用いて、p73の発現と、シリア形成の表現型を解析した。p73のノックインマウスは、translational polarityの異常を来しているが、これは胎児期のprimary cilium(一次繊毛)の形成の異常が成体にまで影響を及ぼしていると考えられたこと、また、条件特異的ノックアウトマウスの解析結果から、一次繊毛異常が水頭症発症にもっとも寄与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The p53 family member p73 plays a critical role in brain development. p73 knockout mice exhibit a number of deficits in the nervous system, such as hydrocephalus. In this study, we generated a p73 knock-in (KI) mutant mouse and a conditional p73 knockout mouse. The homozygous KI mutants showed aqueductal stenosis. p73 was expressed in the ependymal cell layer and several brain areas. Unexpectedly, when p73 was disrupted during the postnatal period, animals showed aqueductal stenosis at a later stage but not hydrocephalus. An assessment of the integrity of cilia and basal body (BB) patch formation suggests that p73 is required to establish translational polarity but not to establish rotational polarity or the planar polarization of BB patches. Deletion of p73 in adult ependymal cells did not affect the maintenance of translational polarity. These results suggest that the loss of p73 during the embryonic period is critical for hydrocephalus development.

研究分野：神経科学

キーワード：繊毛 p73 水頭症

1. 研究開始当初の背景

p73はp53のファミリー分子の1つであり、分化した神経細胞の恒常性を維持するのに必須の分子である (Wetzel M, Fujitani M et.al., Neuron 2008)。研究代表者はその全長型 TAp73 のアイソフォーム特異的ノックアウトマウスを解析し、歯状回の発生に異常が起こることを報告した。(Tomasini R, Fujitani M et.al. Genes and Development 2008) 更に、研究代表者は、TAp73 がマウス成体脳神経幹細胞プールの維持に必須の分子であることを証明した。(Fujitani M et.al., Current Biology 2010)

次に、研究代表者は *in vivo* における p73 の発現解析及びその機能解析を行うために、p73 特異的ノックイン+ノックアウトマウス (KI マウス) を新たに作製した(後述)。マウスの成体の脳、脊髄切片を解析したところ、脳脊髄における上衣細胞層に p73 が特異的に発現することを発見した。

生理的、病的条件下での p73 の機能を同定するために、脊髄損傷モデル動物を用いてその発現を解析した。脊髄損傷により、上衣細胞における p73 蛋白の発現が低下することが分かった。

上衣細胞は、脳内では、分裂を停止しているが、脊髄内ではゆっくりと分裂している。また、通常では、中心管上衣細胞からは上衣細胞しか産まれない。細胞周期及び、運命決定機構が厳密に維持されている。

最近になって、脊髄の上衣細胞は、脊髄損傷を受けると、細胞分裂が活性化され、また、グリア前駆細胞に脱分化することが多くのグループにより報告されている。また、そのグリア前駆細胞由来の細胞は損傷部位に移動し、損傷修復に関与することが報告されている。その現象の分子メカニズムは全く解明されていなかった。

そこで、脊髄損傷モデル動物における中心管上衣細胞の細胞周期再開と、グリア前駆細胞への脱分化に p73 が関与することを証明する研究を提案していたが、中心管上衣細胞が脱分化して、幹細胞に戻るといふごくごく早期の時点で、結果が再現できなかった。

実際、そのような脊髄損傷後に、上衣細胞の脱分化が起こるといふ現象は極めて限定的ではないかという論文も最近になり報告され (Ren Y et al 2017) 研究の方向性自体を変える必要性があった。

そこで、p73 のノックアウトマウスの表現型に、水頭症が有り、また、共同研究により、p73 を上衣細胞特異的にノックアウトできる方法を確立していたことから、水頭症の原因となる、繊毛形成異常を探求する研究にシフトした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「p73 を介した上衣細胞分化および、繊毛形成機構を解明し、そのノックアウトマウスが表出する水頭症の発症機

構を解明すること」である。

上衣細胞は、脳室の壁を構成する上皮細胞の一種であり、上衣細胞は多数の運動性繊毛を有している。脳室系の内腔表面を覆って脳室と脳実質組織の間の境界を形成し、脳脊髄液の循環などに関与していると考えられている。

すなわち、p73 のノックアウトマウスは水頭症を来すことから、運動性繊毛の発生や機能と p73 は関与すると考えられた。

3. 研究の方法

(図 1)に示すとおり、新たに作出した p73 ノックアウト+ノックイン (KI) マウスを用いる。

生後期、成体における遺伝子発現を解析する。

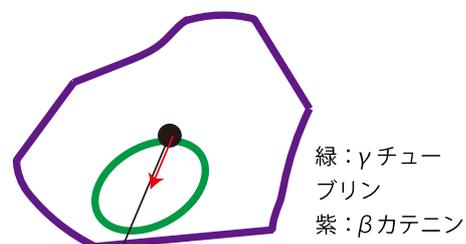
(図 1)に示す、ノックアウト+ノックインマウスから上衣細胞特異的ノックアウトマウスを作製する。そして、発現時期(生直後及び、成体)特異的にタモキシフェンを投与して、遺伝子ノックアウトを行う。

また、ノックアウトされた上衣細胞は、tdTomato の発現を確認することでノックアウトされた細胞を追跡する。

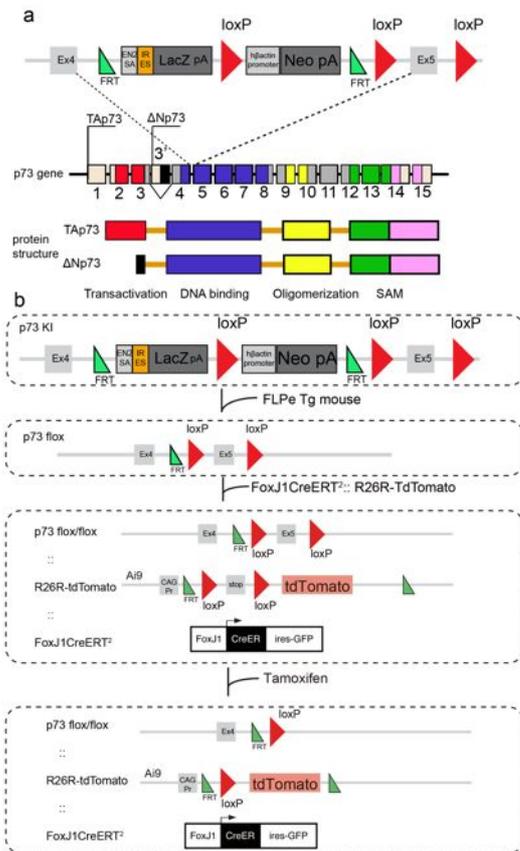
免疫染色の手法としては、通常の Nissl 染色法に加えて、X-gal 染色法による発現解析や、側脳室の *en-face* ホールマウント法による、側脳室壁の観察を共焦点レーザー顕微鏡により行った (Mirzadeh, Z. et al 2010)。

カテニンにより、上衣細胞の細胞壁を、チューブリンによって、運動性繊毛の基部にある基底小体を染色して、評価を行った。

カテニンによって、細胞壁をトレースすることができる。そして、基底小体の集合をチューブリンによってトレースすることができる。距離と角度を計算することで、上衣細胞に形成される基底小体及びその上部に形成される運動性繊毛の異常について詳細に検討した。(Ohata S. et al 2014, 2015)



緑: BB (中心小体) patch
 黒丸: 細胞の中心
 赤矢印: 細胞の中心から BB patch の中心までを結んだ矢印
 黒線: 赤矢印を延長し、細胞の中心から細胞壁までの距離



(図 1)

上衣細胞においては、2つの極性があると考えられている。1つは、translational porality である。そして、もう一つは rotational porality である。

Translational porality は基底小体が細胞の前方へ偏る様子を表しており、Rotational porality は繊毛の向きが一方向へと揃う様子を表している。

上記の因子のうち、赤矢印の角度についての検討が、translational porality のうちの、角度因子。そして、displacement factor は、基底小体の集合度合いの異常を表し、両方共が translational porality の異常を示唆する。Rotational porality については、アセチル化チューブリンによる繊毛を可視化し、その方向性を観察した。

4. 研究成果

まず、新たにノックアウト+ノックイン(KI)マウスを作製したために、p73の発現や、ノックアウトマウスでこれまで示されてきた生後期の死亡頻度の上昇について我々のマウスにおいても生存曲線を検討した。ノックアウト+ノックインホモマウス(KI/KI)でのp73の発現が完全に消失しており、そのヘテロマウス(KI/+)では約7割に低下していることが分かった。また、生存曲線も生後期

に急激に死亡するなど、ほぼこれまでの結果と同様であった。

これらのことから、p73のKIマウスが正しく作出できており、p73遺伝子もノックアウトされていることが確認された。

一方、p73の発現をX-gal染色により確認し、成体では、p73が主として上衣細胞と視床下部に発現していることを確認した。生後期においては、海馬周辺や、脈絡叢細胞にも発現していることを確認した。

はじめに、p73のノックアウト+ノックインホモマウス(KI/KI)をNissl染色法によって組織学的に検討した。これまで報告がなかった、中脳水道の閉塞が確認された。これは一次的に中脳水道狭窄から閉塞が起こった可能性もあったが、運動性繊毛の異常による水頭症に伴って脳脊髄液の移動が大変遅くなり、2次的に起こった可能性もあった。それらを区別するために、様々な発達段階におけるp73の条件特異的ノックアウトを行った。特に、FoxJ1-CreERT2マウス(Sabelstrom, H. et al 2013)を用いて、上衣細胞特異的にノックアウトするために、スウェーデンのカロリンスカ研究所のFrisen研究室との共同研究により、マウスを作製した。

まず、生後直後に、母体にタモキシフェンを投与し、母乳を介してタモキシフェンを生直後のマウスに投与する方法を確立した。tdTomatoの発現や、Real time PCR法によって、上衣細胞特異的にノックアウトできていることを確認した。そして、中脳水道についてと、水頭症について組織学的に検討したところ、中脳水道の狭窄は認められたが、水頭症を来すことはなかった。このことから、生後期や、成体期にp73がなくとも、水頭症は来さないことが分かった。

一方、p73のKIマウスは、ホールマウント法による染色及び、上衣細胞の極性の検討によって、BB patchの向きに異常が認められ、translational poralityに異常を来すことが分かった。その他、上衣細胞の形の異常を来していることから、上衣細胞の分化異常が認められた。この点はこれまでの報告と同様であった(Gonzalez-Cano, L. et al. 2015)。rotational poralityについては、異常を来していないことが確認された。

また、成体においてもp73の発現が弱く上衣細胞に確認された。このことから、p73が成体において上衣細胞の維持に機能する可能性を考えて、成体においてノックアウトした。しかし、水頭症も来さず、繊毛や、基底小体の異常を来さなかった。

結論として、これまで気管支等においても、p73は運動性線毛形成に関与し(Marshall, C.B. et al 2016)、p73は運動性繊毛の形成に異常を来すために、脳脊髄液の流れに異常を来して、水頭症を発症すると考えられてきた(Gonzalez-Cano, L. et al. 2015)。

従って、まずこれまでの報告から、この運動性繊毛形成は、マウスの場合、生後4日から20日にかけて行われることが分かっている(Mirzadeh, Z. *et al* 2010)。従って、まず、p73を生直後から5日にかけて母乳を介してノックアウトする手法を確立し、条件特異的にノックアウトした。しかし、この運動性線毛形成時期のp73ノックアウトでは、水頭症を来さなかったことから、p73のノックアウトマウスでは、運動性繊毛異常や繊毛の機能異常によって、水頭症を発症するのではないと結論づけた。中脳水道の狭窄が認められた程度の弱い表現型しか示さないことが分かった。

また、成体になる途中でp73をノックアウトしても運動性繊毛の異常もないし、水頭症も来さない。これらのことから、p73はより早期の発生時期においての役割が大きいと考えられた。

一方でマウスの translational polarity は胎生16日までに放射状グリアから上皮細胞が分化するときすでに形成されている(Mirzadeh, Z. *et al* 2010)。ただ、放射状グリアから上皮細胞が形成されるときに、再度 translational polarity の成熟も起こることから、p73ノックアウトマウスにおける放射状グリアの translational polarity 形成や、分化直後の translational polarity の異常について検討する必要がある。

今後は、胎児期において適切な条件特異的ノックアウトそして、放射状グリアの translational polarity の検討が必要と考えられる。FoxJ1の発現は、e16より早期の放射状グリアにおける発現は明瞭ではないため、新たに Nestin-CrERT2 マウスを用いるなどして早期のp73の役割を検討する必要がある。

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6件)

1. Fujitani M*, Sato R, Yamashita T*. Loss of p73 in ependymal cells during the perinatal period leads to aqueductal stenosis. *Scientific Reports*. 2017 Sep 20;7(1):12007. (査読有)
DOI: 10.1038/s41598-017-12105-z
2. Kanemitsu Y, Fujitani M*, Fujita Y, Zhang S, Su YQ, Kawahara Y, Yamashita T*. The RNA binding protein MARF1 promotes cortical neurogenesis

through its RNase activity domain.

Scientific Reports. 2017 Apr

25;7(1):1155. (査読有)

DOI:10.1038/s41598-017-01317-y

3. Fujitani M*, Zhang S, Fujiki R, Fujihara Y, Yamashita T*. A chromosome 16p13.11 microduplication causes hyperactivity through dysregulation of miR-484/protocadherin-19 signaling. *Molecular Psychiatry*. 2017 Mar;22(3):364-374 (査読有)
DOI:10.1038/mp.2016.106
 4. Hamasaki H, Fujitani M*, Yamashita T*. NME2 associates with PTP to transduce signals from chondroitin sulfate proteoglycans. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016 Mar 18;471(4):522-7. (査読有)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.02.042
 5. 藤谷昌司 16p13.11 微小重複症の候補遺伝子の探索 兵庫医科大学医学会雑誌 41(1):37-46.2016 (査読無)
 6. Zhang S, Kanemitsu Y, Fujitani M*, Yamashita T* The newly identified migration inhibitory protein regulates the radial migration in the developing neocortex. *Scientific Reports* Aug 7;4:5984 2014 (査読有)
DOI:10.1038/srep05984
- [学会発表](計5件)
1. 藤谷昌司、山下俊英、野口光一
Loss of p73 in ependymal cells during the perinatal period leads to aqueductal stenosis
第60回日本神経化学大会 ポスター 2017
 2. 宮嶋久雄、田辺章悟、藤谷昌司、山下俊英 (2017) IL-17A による脊髄損傷後の組織

修復阻害機構、第 40 回日本神経科学大会
ポスター、2017

3. Fujitani M, Noguchi K, Yamashita T
Abnormal neurogenesis by 16p13.11
microduplication causes hyperactivity.
第 15 回国際幹細胞学会 (International
society for stem cell research) Neural
Stem Cells セッション内口演 2017
4. Kanemitsu Y, Fujitani M, Fujita Y,
Yamashita T RNA-binding protein MARF1
regulates embryonic neurogenesis. 第
46 回北米神経科学学会 (Society for
Neuroscience) 2016
5. Fujitani M, Yamashita T microRNA-484
located in chromosome 16p13.11 locus,
control cortical development. 神経糖鎖
生物学 第 1 回国際シンポジウム
(International symposium on
glyco-neuroscience) 2014

〔その他〕

ホームページ等

[http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/
2016/20160705_1](http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2016/20160705_1)

[http://www.med.osaka-u.ac.jp/jpn/acti
vities/results/2016/005.html](http://www.med.osaka-u.ac.jp/jpn/activities/results/2016/005.html)

7 月 17 日の NHK ニュース (関西版)、7 月 6
日の日経新聞など多数の誌面で研究内容が
紹介された。

[http://www3.nhk.or.jp/kansai-news/2016
0717/4002701.html](http://www3.nhk.or.jp/kansai-news/20160717/4002701.html)

LITALICO 発達ナビで研究成果が紹介

[https://h-navi.jp/column/article/350255
80](https://h-navi.jp/column/article/35025580)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤谷 昌司 (MASASHI, FUJITANI)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40376372