

|                  |   |
|------------------|---|
| Title            | 水頭症発症に関わる分子メカニズムの解明   |
| Sub Title        | Elucidation of the molecular mechanism about hydrocephalus  |
| Author           | 中村, 彰宏(Nakamura, Akihiro)   |
| Publisher        |   |
| Publication year | 2020  |
| Jtitle           | 科学研究費補助金研究成果報告書 (2019. )  |
| JaLC DOI         |   |
| Abstract         | <p>繊毛の運動を制御すると考えられているEFCAB1の機能を調べる目的で遺伝子欠損マウスを作製し、解析を行った。その結果、全ての遺伝子欠損個体で脳室空間が拡大していることがわかった。当初、EFCAB1を欠損したことにより脳室内の繊毛の運動に異常が生じ、脳液髄液の循環が原因かと考えられたが野生型マウスと比べて繊毛運動に明らかな違いは認められなかった。そこで脳を構成する神経細胞が分化し、脳構造を形成する胎仔期の脳を調べた。その結果、細胞分化に重要な特定の領域でEFCAB1が発現しないことにより神経細胞の分化に影響を及ぼしている可能性が示唆された。</p> <p>EFCAB1 is a Ca<sup>2+</sup> binding dynein-associated protein that regulates flagellar and ciliary movement. To study the physiological role of EFCAB1 in mice, we generated EFCAB1<sup>-/-</sup> mice that the mice exhibit situs inversus and hydrocephalus.</p> <p>These mice exhibiting diabetes insipidus and quantitative analysis demonstrated that the serum concentration of vasopressin was reduced. Immunohistochemical analysis revealed reduced that hormone produced cell in hypothalamus of adult EFCAB<sup>-/-</sup> mice. These results indicate that EFCAB1 has crucial role in neural differentiation and development of the cerebral cortex.</p> |
| Notes            | <p>研究種目：若手研究 (B)</p> <p>研究期間：2017～2019</p> <p>課題番号：17K16313</p> <p>研究分野：発生生物学</p>   |
| Genre            | Research Paper  |
| URL              | <a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K16313seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K16313seika</a>   |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16313

研究課題名（和文）水頭症発症に関わる分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism about hydrocephalus

研究代表者

中村 彰宏（NAKAMURA, Akihiro）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特別研究員（PD）

研究者番号：50750973

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：繊毛の運動を制御すると考えられているEFCAB1の機能を調べる目的で遺伝子欠損マウスを作製し、解析を行った。その結果、全ての遺伝子欠損個体で脳室空間が拡大していることがわかった。当初、EFCAB1を欠損したことにより脳室内の繊毛の運動に異常が生じ、脳液髄液の循環が原因かと考えられたが野生型マウスと比べて繊毛運動に明らかな違いは認められなかった。そこで脳を構成する神経細胞が分化し、脳構造を形成する胎仔期の脳を調べた。その結果、細胞分化に重要な特定の領域でEFCAB1が発現しないことにより神経細胞の分化に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義としてはこれまで繊毛に局在していると考えられていたEFCAB1タンパク質が繊毛以外の領域にも局在していることが示された。例えば、成獣では脳室に面し、繊毛を有する上皮細胞の頂端側の細胞質、また胎仔では胎齢12.5日の神経前駆細胞に発現しており、大脳領域の特異的領域に局在していることがわかった。これらのことから、これまで繊毛の運動に関する機能のみが知られていたが、他の機能を有することが示唆された。特に胎仔期の脳、神経分化においてはその発現領域がソニックヘッジホッグタンパク質の発現領域と重なることから、機能の重要性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：EFCAB1 is a  $\text{Ca}^{2+}$  binding dynein-associated protein that regulates flagellar and ciliary movement. To study the physiological role of EFCAB1 in mice, we generated EFCAB1<sup>-/-</sup> mice that the mice exhibit situs inversus and hydrocephalus.

These mice exhibiting diabetes insipidus and quantitative analysis demonstrated that the serum concentration of vasopressin was reduced. Immunohistochemical analysis revealed reduced that hormone produced cell in hypothalamus of adult EFCAB<sup>-/-</sup> mice. These results indicate that EFCAB1 has crucial role in neural differentiation and development of the cerebral cortex.

研究分野：発生生物学

キーワード：EFCAB1 神経発生 水頭症 繊毛

## 1. 研究開始当初の背景

水頭症とは、脳を満たす産生・循環・吸収などの異常により脳室が正常以上に大きくなった状態を指す。水頭症に関する臨床的研究の歴史は長く、20 世紀初頭にすでに脳脊髄液の循環を阻害することで水頭症が引き起こされることが実験的に明らかにされている。その後、脳脊髄液を外科的に排出することにより水頭症が治癒することが報告された。このように外科的原因については古くから知られている水頭症ではあるが、基礎的な原因については未だ議論されている。

1970 年代に先天性水頭症を示す実験動物で、脳室上衣細胞に存在する繊毛に異常が認められた。さらにヒトにおいても先天性の繊毛機能不全症候群の患者に水頭症が併発することが多く報告された (Santi et al., *Arch. Dis. Child*, 65: 5, 1990. Zariwala et al., *Annu. Rev. Physiol*, 69: 2007)。また 1990 年代以降、繊毛関連タンパク質を欠損させた遺伝子欠損マウスの解析により、繊毛の欠損あるいは運動不全の実験動物で水頭症の発症が報告されている (Karl-Ferdinand et al., *J. Cell. Biol.*, 180: 3, 2008. Sapiro et al., *Mol. Cell. Biol.*, 22: 17, 2002)。これらのことから脳室内上衣細胞にある繊毛の機能不全が脳脊髄液の循環を阻害し、その結果、水頭症が引き起こされるという仮説が現在の繊毛が関与する水頭症発症のメカニズムの主流となっている。

## 2. 研究の目的

水頭症の発症メカニズムとして、脳室内上衣細胞の繊毛の欠損あるいは機能不全が原因とされる仮説が臨床研究や遺伝子欠損マウスを用いた研究から有力とされている。しかしながら、申請者らが作製した繊毛運動制御タンパク質 (カラクシン) 欠損マウスでは上衣細胞の繊毛に異常は認められないものの、水頭症様の脳室拡大を呈する。このことはこれまでの仮説では説明することができない。そこで本研究では、繊毛の運動制御という観点から繊毛の種類とその種類ごとの運動制御を明らかにし、繊毛運動の環境応答性について実験的に示した上で、水頭症の発症メカニズムの解明と臨床における治療方法についてアプローチを試みる。

## 3. 研究の方法

水頭症の分子メカニズムを明らかにするために水頭症様の脳室拡大を呈する遺伝子欠損マウスがどのような状況により脳室が拡大しているかを明らかにする。具体的には異常が生じる時期とその際の細胞の状況を見極める。脳室の測定方法としては、組織切片を作成し 2 次元的に脳室空間面積を測定するとともに、ブルカージャパン株式会社の協力のもと、マイクロ CT によるコンピュータトモグラフィーにより 3 次元的に脳室空間の面積を測定し、比較検討する。次に当該マウスは脳室内の繊毛運動においてこれまでの水頭症モデルマウスとは異なることから、脳室内繊毛について解析を行う。脳室内繊毛の運動解析では脳室に面した脳組織を摘出し、正立顕微鏡下で観察し、その様子をハイスピードカメラで撮影し繊毛運動の様式を解析する。繊毛運動によって起こされる水流の速度、運動方向については摘出した組織とともに培養液中に蛍光マイクロビーズを添加し、蛍光観察しながらハイスピードカメラで撮影し、フレームあたりのビーズの移動速度、方向から流速と運動方向を解析する。特に当該マウスでは繊毛運動制御因子を欠損していることから、カルシウム濃度を中心とした環境変化に対する繊毛運動の変化に着目し解析を行い、これまでの水頭症モデルマウスとは異なった方向から分子メカニズムの解明を試みる。3 年間の本研究の研究計画においてまず、1 年目は脳室拡大時期の特定と細胞新生と細胞死のバランスの解明、2 年目に脳室内繊毛の運動時期の解明、そして最終年度である 3 年目に繊毛の運動制御の解明を実施する。

## 4. 研究成果

まず、1 年目に脳室拡大時期の特定と細胞新生と細胞死のバランスの解明を目指し、脳室拡大の時期の特定、細胞新生と細胞死のバランスについて解析をおこなった。脳室拡大の時期についてはマウスにおいて一般的に離乳時期とされる生後 3 週齢において既に遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べ有意に脳室が拡大していることが組織切片による解析から明らかになった。さらに胎仔期まで遡り比較、検討を行った結果、胎齢 16 日において野生型では閉鎖する領域が遺伝子欠損型のいくつかの個体では閉鎖していない状況が認められた。細胞新生と細胞死のバランスについて 3 週齢個体を用いて解析を行った。BrdU を用いた細胞新生の解析では、野生型と遺伝子欠損マウス間に大きな差は認められなかった。また、TUNEL 染色による細胞死の解析ではやや遺伝子欠損マウスの上衣細胞にシグナルが認められたものの、細胞数の比較では野生型と遺伝子欠損マウス間に有意な差は認められなかった。神経細胞の増殖、分化が活発な胎齢 12-14 日ごろに同様の解析を行う必要がある。2 年目は脳室内繊毛の運動時期の解明を計画していた。これについては成獣の脳組織を用いて組織切片と電子顕微鏡観察により繊毛の有無と形態、長さには異常は認められなかった。またハイスピードカメラによる撮影から脳室周囲の上衣細胞の多毛繊毛の運動様式にも異常は認められなかった。免疫組織化学染色を行う中で、神経細胞マーカータンパク質である NeuN や MAP2、グリア細胞 (アストロサイト) のマーカータンパク質である GFAP の発現量が遺伝子欠損個体で減少していることが示された。このことに関し、これらのタンパク質の減少が特に脳組織吻側 (前交連上部) の大脳皮質でのみ認められた。さらに計画にはなかったが、in vitro での繊毛解析系を構築する目的で遺伝子欠損マウスから iPS 細胞を樹立した。3 年目は繊毛の運動制御の解析を予定していたが、繊毛の運動に異常が認められ

ないこと、また、脳室纖毛のない胎仔期に既に脳室の拡大が完了していることなどを踏まえ、胎仔期における本研究のターゲット分子 EFCAB1 の発現の解析を行った。その結果、これまで纖毛に局在すると考えられていた当該分子は神経細胞および脳組織形成初期の胎齡 12 日で既に発現していることが確認された。さらに、発現領域は細胞分化に重要とされる Shh 遺伝子発現領域と重なっており、その重要性が示唆された。また、発現領域が将来的な下垂体ホルモン分泌細胞に分化すると考えられる領域であることから成獣のホルモン量を測定した結果、遺伝子欠損個体ではバソプレシン の量が減少しており、それらの個体では多尿症に似た表現型が認められた。成獣における尿崩症様の症状はホルモン分泌細胞の減少によるものと考えられ、さらにその原因が本研究のターゲット因子である EFCAB1 遺伝子欠損によるものと推測される。現段階では推測に止まるものの、本研究から EFCAB1 タンパク質は纖毛の運動制御にとどまらず、細胞の分化に関わる可能性が示唆された。纖毛やそれを構成するタンパク質が種を超えて保存されていることは周知の事実である。この保存されたタンパク質の機能性、使い道を拡大・転用することで中枢神経系を高度に発展させ、生物学的な高度化を可能にしたとも考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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<br>Sasaki Keita, Shiba Kogiku, Nakamura Akihiro, Kawano Natsuko, Satouh Yuhkoh, Yamaguchi Hiroshi, Morikawa Motohiro, Shibata Daisuke, Yanase Ryuji, Jokura Kei, Nomura Mami, Miyado Mami, Takada Shuji, Ueno Hironori, Nonaka Shigenori, Baba Tadashi, Ikawa Masahito, Kikkawa Masahide, Miyado Kenji, Inaba Kazuo | 4 . 巻<br>2          |
| 2 . 論文標題<br>Calaxin is required for cilia-driven determination of vertebrate laterality   | 5 . 発行年<br>2019年    |
| 3 . 雑誌名<br>Communications Biology   | 6 . 最初と最後の頁<br>1-11 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s42003-019-0462-y  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1 . 発表者名<br>中村彰宏、宮戸健二、山田満稔、田中守               |
| 2 . 発表標題<br>大脳層構造形成におけるカルシウムセンサーEFCAB1の必須な役割 |
| 3 . 学会等名<br>第42回日本分子生物学会年会                   |
| 4 . 発表年<br>2019年                             |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

|  |                           |                       |    |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|  | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|