

## 神経系に於ける新しい情報伝達システムの解明

Elucidation of a novel information processing system in the nervous system

代表研究者 山梨大学 竹田 扇 University of Yamanashi Sen TAKEDA

共同研究者 山梨大学 成田 啓之 University of Yamanashi Keishi NARITA

共同研究者 山梨大学 吉村 健太郎 University of Yamanashi Kentaro YOSHIMURA

Primary cilium is known to be a sensory organelle that modulates cellular functions under incessantly changing external environment. Although several lines of genetic evidence witnessed a participation of cilia in higher cognitive brain functions, exact molecular mechanisms remain to be elucidated. In order to dissect the functions of primary cilia in the nervous system, we first took advantages of choroid plexus epithelial cells (CPECs) expressing dozens of primary cilia. Interestingly, several motile components were identified by proteomics, and a subset of CPEC cilia was motile during specific perinatal period, suggesting a hybrid nature of ciliary function in CPECs. Second, we identified a primary cilium in astrocytes, which expressed molecules responsible for Hedgehog (Hh) signaling. Activation of Hh signaling in astrocytes resulted in an improved survival of cells under a starved condition, the results implying a possible role of primary cilia in brain function via modulating a perineuronal micro-environment as well as neuro-glial interactions. Third, we identified Hh signaling machinery in the primary cilium of Schwann cells (SCs). Of note, the primary cilia of SCs were uniquely responsive to Desert hedgehog (Dhh) ligand and facilitated myelination. These data collectively pave the way into elucidation of roles of primary cilia in the nervous system.

## はじめに

細胞は不断に変化する外部環境に対してその内部環境の恒常性を維持する装置を内在させている。繊毛 (cilium) もその一つであるといえよう。細胞表面に存在する繊維状構造物である繊毛は長さが十数 $\mu\text{m}$ 、直径が  $0.5\mu\text{m}$  程度の微細な構造である。これを大きく分けると、外部環境に働きかけて自らの内部環境の恒常性を保つ運動繊毛 (従来型繊毛) と、外部環境の変化に応答して自らの内部環境を調節する感覚繊毛 (一次繊毛) とがある。何れも微小管細胞骨格 (軸糸) を有する構造であるが、その配列は一般に前者が主に  $9+2$  であるのに対して後者は  $9+0$  であるとされる。運動繊毛に関しては、気管支上皮、卵管、精子などに存在し、そのトポロジーから機能が比較的類推しやすい事もあり、古くから注目され解析が行われて来た。また、近年の網羅的解析 (オミックス解析) でも幾つかの代表的な細胞でその構成蛋白質の解析が行われている。一方、一次繊毛は多くの細胞に存在するにも関わらず解析がほとんど進んでいない。また一次繊毛の異常が脳の高次機能を含む様々な神経系の疾患を齎す事が報告されつつあるが、その分子機構に関しても十分な解析が行われていない。本研究では神経系細胞の中から、脳室を構成する脈絡叢上皮細胞、神経細胞の約 10 倍の数があるとされるグリア細胞、更に末梢神経系の神経伝導速度を規定する髄鞘形成に与る Schwann 細胞 (SC) の一次繊毛に焦点を当て、neuron-glia interaction という観点からその機能を解析、考察した。これに依り、神経系に於ける一次繊毛機能の理解が進み、今後一次繊毛を介した新たな神経情報伝達システムを解明していく上での基盤が形成された。

## 研究目的

本研究では神経系の一次繊毛に焦点を当て、古典的シナプス伝達 (シナプスパラダイム) 以外の新しい情報伝達系を解明することを目的とする。これに依りこれまでに解析が困難であった脳の高次機能を、新たなパラダイム (繊毛パラダイムに基づく neuron-glia interaction) に依って解明することを企図する。この目的に向けて次の 3 つの具体的目標を掲げて解析を行う。A. 一次繊毛の機能を解明するにはその構成分子を知る必要がある。ここでは大量の一次繊毛を得やすい脈絡叢上皮細胞を用いてプロテオーム解析を行う。B. 神経細胞の機能を支援するグリア細胞 (アストロサイト) の一次繊毛機能を特にヘッジホッグシグナルに着目して解析する。これにより成熟した神経系での一次繊毛の機能がどの様に神経系全体の機能に影響を及ぼしているかを解析する。C. 末梢神経での髄鞘形成は神経伝導速度を規定する主要な因子であるが、その形

成機構に関しては不明な点が多い。筆者らは以前一次繊毛機能不全マウスで髄鞘形成異常を見いだしている。ここでは SC の一次繊毛がどの様に髄鞘形成に関係しているかをヘッジホッグシグナルに着目して解析し、神経情報の出力修飾の観点からその機能を考察する。

## 結果

### A. 一次繊毛のプロテオーム解析

#### 1) 脈絡叢上皮細胞 (CPEC) からの一次繊毛の単離とプロテオーム解析

生後4ヶ月のブタ脈絡叢をジブカイン処理により脱繊毛し、分画遠心分離法、密度勾配遠心法を併用して一次繊毛濃縮分画を得た。これを SDS 電気泳動で分離し、全てのバンドを切り出し、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) で解析を行った。分析装置は LTQ Orbitrap Velos である。1115 の蛋白質分子が同定されたがそのうちミトコンドリアやリボソーム由来であると考えられるコンタミネーションを除いた 868 分子を脈絡叢上皮細胞の一次繊毛として同定した (以下「プロテオーム」と表記)。

プロテオームを視細胞の一次繊毛プロテオームと比較すると、396 分子が共有されており、これらが一次繊毛共通分子として同定された。従って残りの分子が CPEC の一次繊毛特異的分子であると考えられる。また約 20% (152 分子) はいわゆる運動繊毛と共有された蛋白質分子であった。そのうち運動繊毛と感覚繊毛の双方に見られる分子は 146 であり、繊毛間で多くの分子が共有されており細胞システムとしての完成度の高さが伺われた。特筆すべきは一般に運動能がないとされている一次繊毛に radial spoke head homolog 4, 9 (Rsph4, 9) などの運動繊毛のコンポーネントが見付かったことである。Rsph9 の局在を免疫染色で確認すると、一つの CPEC 上でもこの分子を発現している繊毛とそうではないものがモザイクとして存在することがわかった。

#### 2) 出生前後に於ける繊毛機能の遷移

実際に CPEC の繊毛に運動能があるか否かを初代培養 CPEC と *ex vivo* 組織で観察した。培養細胞では繊毛の動きは殆ど見られなかったが、*ex vivo* の観察では出生直後には運動している繊毛が観察された。しかしながら、生後 2 週間を経た CPEC からは繊毛運動は完全に消失していた。また CPEC の繊毛運動を上衣細胞の繊毛運動と比較すると、繊毛運動の周波数は上衣細胞よりも明らかに低くその運動方向性もランダムであった。

## B. アストロサイトにおける一次繊毛は細胞の生存を左右する

### 1) アストロサイトの一次繊毛はヘッジホッグシグナル分子を発現する

初代培養アストロサイトでヘッジホッグシグナル伝達系の分子が発現しているか否かを、免疫染色と電子顕微鏡を用いて検討した。アストロサイトには 9+0 の軸糸構造を持つ一次繊毛が存在し、そこには Patched (Ptc) と Smoothened (Smo) などが局在していた。また、ソニックヘッジホッグ (Shh) や Smo のアゴニストである SAG を投与すると、下流のシグナル伝達分子として知られている Gli の転写レベルが有意に上昇する事を確認した。従って、アストロサイトの一次繊毛は Hh を受容しその情報を細胞内に伝達する事が明らかになった。

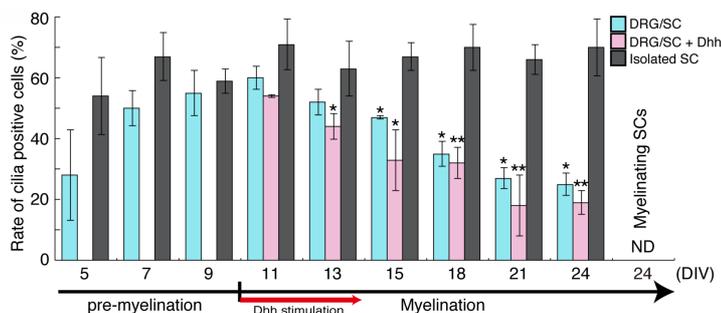
### 2) ヘッジホッグシグナルの活性化はストレス環境下での細胞生存率を高める

アストロサイトを血清非存在下で培養すると生存する細胞が対照群に比して 70%程度まで低下する。この様な状態で SAG を投与するとアストロサイトの生存率が有意に上昇した。またこの様な現象は cyclopamine や tomatidine など Hh シグナル特異的阻害剤を使用することで消失した。更に Ift20 に対する siRNA 処理で繊毛を退縮させて同様の実験を行うと、SAG を投与しても細胞生存率に回復が見られなかった。従って、一次繊毛に局在する Hh シグナル伝達系を介して細胞への情報が伝わり細胞死が抑制されていたことが明らかとなった。

## C. Schwann 細胞の一次繊毛は髄鞘形成を促進する

### 1) Schwann 細胞 (SC) にも一次繊毛が存在するがその発現は時期特異的である (Fig. 1)

SC にも一次繊毛が存在し、そこには Hh シグナル伝達分子の局在が見られた。後根神経節 (Dorsal root ganglion, DRG) を摘出して *ex vivo* で培養し、培養後 10 日を経たところで Dhh 投与を行うと、軸索上に髄鞘形成が誘導された。大変興味深い事に髄鞘形成が進むと共に一次繊毛を持った細胞の割合が減少した。一方、Dhh 刺激をしない群、或いは DRG としてではなく SC のみを単離して培養した場合には一次繊毛を有する細胞の率は変化しなかった。



(Yoshimura and Takeda, 2012)

Fig.1 Quantification of the ratio of primary cilia positive cells in isolated SCs, control and 100 ng/ml Dhh treated DRG/Schwann cell (SC) explant cultures. Primary cilia were not detected in myelinating Schwann cells. On the contrary, isolated SCs still express primary cilia.

## 2) Hh シグナルに依る髄鞘形成は Dhh 特異的な現象である

Hh シグナルの主要なリガンドとしては Shh, Dhh, Indian hedgehog (Ihh) が知られており、その情報伝達系の分子である Ptc や Smo は共有されている。先行研究で Dhh のノックアウトでは末梢神経の髄鞘形成に異常が見られる事が知られていたため、本実験では Dhh 投与に依る髄鞘形成を検証した。一方、他の Hh リガンドに対する反応性を検討したところ、Shh や Ihh では髄鞘形成の有意な促進は観察されなかった。従って、SC の一次繊毛を介した髄鞘形成には Dhh が特異的に関係している事が明らかとなった。

## 考察

- A. 繊毛のコンポーネントは運動繊毛、感覚繊毛で共有されているものがあること、同じ細胞でも発生時期に依って運動繊毛から不動繊毛への機能的遷移が見られる事を勘案すると、これまでに分類されてきた繊毛の概念は再編成される必要があるかも知れない。特に成長に従って運動能が失われる CPEC の繊毛は、繊毛の系統発生のショーケースになっている可能性もあり、今後の繊毛研究に新しい方向性を提示している。また、CPEC の繊毛は脳室を介したいわゆる volume transmission に関係している可能性もあり、その意味で神経系での新たな情報伝達システムの一つとなり得る。
- B. アストロサイトの一次繊毛を介した Hh シグナルがストレス環境下（今回は血清除去による飢餓ストレス）で細胞死を抑制する事が明らかになった。アストロサイトは血管から神経細胞への栄養分の中継を行ったり、神経細胞を保護したりする作用を持つ事が知られている。従って、アストロサイトの細胞死を抑制する情報伝達系はグリア細胞を介した神経制御機構の存在を示唆するものである。この様な一次繊毛を介した神経細胞-グリアネットワーク (neuron-glia network) が高次脳機能の解明にあたって重要な視座を与えているといえよう。
- C. 髄鞘は神経伝導速度を規定する重要な因子であり、その形成不全は中枢神経、末梢神経の双方で機能的に重要な意味を有する。本研究から末梢神経系での髄鞘形成が SC の一次繊毛を介した Dhh 特異的な現象であることが解明された。そこで、以下の2点が今後の重要な課題になると考えられる。(1) 細胞内情報伝達に関わる主要な分子 Ptc や Smo が3つのリガンドで共有されているにも関わらず、Dhh だけが髄鞘形成を促進する分子機構の解明。(2) 中枢神経系で髄鞘形成を行うオリゴデンドロサイトの一次繊毛が SC と同じ様な分子機構で髄鞘形成を促進するか否かを検

討すること。本研究は一次繊毛を介したニューロン・グリア連関の解明に極めて重要な意味を有する。

## まとめ

以上の結果から、一次繊毛を介した情報伝達系が広義のグリア細胞（脈絡叢上皮細胞、アストロサイト、Schwann 細胞）に於いて様々な機能を遂行している事が明らかとなった。今後は神経細胞の一次繊毛での機能解析を行うことも勿論重要であるが、その周囲を取り囲み数も多いグリア細胞との相互作用という観点から新たな情報伝達系を模索することが、高次脳機能の解明に繋がると期待される。また、脈絡叢上皮細胞の一次繊毛のプロテオーム解析から得られた情報は、今後の繊毛情報伝達系の解明の基盤として重要になるばかりではなく、繊毛の分子進化を考察する上でも有用であると考えられる。

## 研究発表

### [口頭]

1. **Takeda, S.** and Narita, K. Multiple primary cilia modulate the fluid transcytosis in choroid plexus epithelium. 50th Annual Meeting of ASCB, Philadelphia. 2010. 12.
2. 吉村健太郎、竹田 扇 シュワン細胞の一次繊毛によるヘッジホッグシグナルの受容はミエリン形成を促進する 第34回日本神経科学大会 横浜 2011.9.
3. **Takeda, S.** and Yoshimura, K. Hedgehog signaling regulates the myelination of peripheral nerve axons through the primary cilia. 51st Annual Meeting of ASCB, Denver. 2011. 12.

### [誌上]

1. Yoshimura K., Kawate, T. and **Takeda, S.** Signaling via primary cilium affects glial cell survival under the stressed environment. *Glia*. 59, 333-344. 2011.
2. Yoshimura, K. and **Takeda, S.** Hedgehog signaling regulates the myelination of peripheral nerve axons through the primary cilia. *Differentiation*. 83, 178-185. 2012.
3. **Takeda, S.** and Narita, K. Categories of cilia: Structure and function of vertebrate cilia, towards new taxonomy. *Differentiation*. 83, 104-111. 2012.