

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09732

研究課題名(和文)胎盤を介した分子シグナルリレーによる血液脳関門形成制御機構の解明

研究課題名(英文) Maternal-fetal signal relay via placenta regulates the formation of blood-brain barrier in fetal brain cortex

研究代表者

島田 ひろき (SHIMADA, Hiroki)

金沢医科大学・看護学部・准教授

研究者番号：60278108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：胎盤を情報インターフェイスとした母胎間-白血病抑制因子(LIF)シグナルリレーは、胎児大脳皮質の発達を促進するが、このリレーが発生期の血液脳関門(BBB)形成にどのように関与しているかを検証した。

ウイルス感染モデルで、このリレーを抑制したところ、BBBに関与する細胞間接着が促進され、母体の炎症性サイトカインであるインターロイキン-6の胎児脳脊髄液への移行が抑制された。よって、LIFシグナルリレーはBBB形成に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that the materna-fetal signal relay pathway of maternal leukemia inhibitory factor (LIF)-adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-fetal LIF via the placenta (maternal-fetal LIF signal relay) led finally to neurogenesis in the cerebrum of the fetus. In this study, we investigated the role of the signal relay in the formation of blood-brain barrier (BBB) in fetal brain cortex.

Injection of polyriboinosinicpolyribocytidylic acid into dams, which induced maternal immune activation and suppressed maternal-fetal LIF signal relay, accelerated formation of tight junction in BBB and suppressed the transition of interleukin-6 from mother to fetal cerebrospinal fluid. These results indicated that maternal-fetal LIF signal relay regulates BBB formation in fetal brain cortex.

研究分野：発生学

キーワード：脳発生 血液脳関門 胎盤 白血病抑制因子(LIF) 副腎皮質刺激ホルモン(ACTH) 透明化

1. 研究開始当初の背景

これまで胎児期の BBB は「未成熟」であり、形態的にも機能的にも不完全で“leaky”であると理解されていたが、近年、ヒト胎児試料や動物モデルから、発生のごく初期に既に脳血管内皮に形態学的、機能的なバリア機構が存在していることが報告され(Saunders ら, 2012)、また、内皮細胞と周皮細胞を用いた BBB の in vitro 培養モデルが確立され、BBB 形成に関わる分子機構についても数多く報告されている(Saunders ら, 2012, Obermeier ら, 2013)。しかしながら、in vivo 研究では促進因子とされているものが in vitro 研究では抑制因子となるといった多くの齟齬が存在し、いまだ発生期の BBB 形成機構はよくわかっていない。

我々は胎盤を情報伝達インターフェイスとした母胎間-白血病抑制因子(LIF)/副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)シグナルリレー(母体 LIF 胎盤 ACTH 胎児有核赤血球 LIF)が胎児大脳皮質のニューロン形成を促進することを明らかにしてきた(Simamura ら, 2010)。今回、このリレーの発動時期が胎児の血液脳関門(BBB)形成初期と重なること、このリレーによって星状膠細胞分化も促進されること等より、LIF/ACTH リレーが BBB 形成を促進するという作業仮説をたてた。また、母体のウイルス感染モデルで、重度の免疫活性化で生じたインターロイキン-6(IL-6)が LIF シグナルリレーを破綻させることを明らかにした。IL-6 と LIF の下流シグナルは同じ JAK-STAT 系であり、IL-6 は炎症時に成獣の BBB 機能を低下させることが報告されているが、胎児モデルを使った研究はこれまでなされていない。以上の背景と仮説から、本研究を進めることが、発生期の BBB 形成機構を明らかにすると考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は上記の作業仮説を証明し、発生期の BBB 形成機構を明らかにすること、および母体感染によるこのリレーの破綻が BBB 形成に及ぼす影響を解明することである。

3. 研究の方法

動物: C57BL/6J 雌マウスを使用した。全ての動物実験は、金沢医科大学動物実験指針に従い、金沢医科大学動物実験委員会の審査、承認を得て行った。

母体免疫活性化: 母獣に polyribonucleosinic-polyribocytidylic(poly(I:C), 20mg/kg) を胎齢 12.5 日, 13.5 日, 14.5 日に 1 日 1 回腹腔内投与し、免疫活性化を生じさせた。対照群には生食を投与した。免疫活性化の確認は、母獣より末梢血を採取し、STAT3 のリン酸化を指標に Alphascreen 法で行った。

ビオチン化 IL-6 投与と試料採取: poly(I:C) 投与 2.5 時間後にビオチン化 IL-6(bIL-6)を腹腔投与し、30 分後に胎児脳脊髄液(CSF)、血清、羊水を試料として採取した。

ビオチン化 IL-6 の定量: 試料をアビジン化プレート(Nunc)に添加し、試料中の bIL-6 を吸着させた。bIL-6 を抗マウス IL-6 抗体で検出した。

胎児臓器の透明化: C57BL/6J マウス胎児より、脳を摘出し、固定化液(5% HCHO, 5% Triton-X 100, 1% KOH)に浸漬した後、透明化液(20% Ethylene glycol, 5% Triton-X 100, 1% KOH)に浸漬する。

免疫染色: 上記固定化液浸漬後、PBS に浸漬し、固定化液を除去した後、抗 Claudin5 抗体(Invitrogen)にて免疫染色した。共焦点レーザー顕微鏡(LSM710, Zeiss)で観察した。

4. 研究成果

BBB 形成を時系列で明らかにするには、組織を透明化して免疫染色等で解析していくことが大変有効である。また、脳と他の臓器との比較も重要である。そこで、我々がこれまでに独自に開発してきた透明化技術に改良を加え、着色臓器においてもマイルドで操作も簡便な透明化試薬を開発した。また、既製の共焦点レーザー観察装置に改良を加え、より広範囲な撮影ができるようにした。これらを用いることにより、マウス胎児の心臓を 500~1000 μm の深さまで観察できた。この方法により、胎児脳を丸ごと観察し、他の臓器と比較することが可能となった。上記方法をもちいて、胎児脳の BBB 形成を脳全体で時系列に比較するため、BBB 構成蛋白質の whole mount 免疫染色を行ったところ、血管内の赤血球のヘモグロビンの自家蛍光により詳細な観察が困難であった。ヘムをさらに除去するため長時間処理を行ったところ、組織の破壊がみられた。そこで、マイルドでありながら、より色素を除去できる透明化法を検討した。その結果、本研究に適した透明化法を開発した。また、それをさらに改良し、発生研究で有用な素材であるゼブラフィッシュのメラニン色素を組織破壊せず脱色・固定する方法を開発した。

LIF/ACTH リレー発動の前に LIF を投与することにより、リレー発動時期を人為的に移動させて BBB 形成過程を解析することを試みたが、個体によるばらつきがみられた。これまで発動の有無は胎児摘出時に胎盤のリン酸化 STAT3 (p-STAT3)の変化を Western blot 法で確認することによって行っていた。しかし、この方法では発動されたか否かが解析時までわからず、時間と試料が無駄となる場合がある。特に動物試料をなるべく有効に使用しなければならず、LIF 投与時に発動の有無をモニタリングすることが必要となった。そこでより簡便に LIF 投与時にモニタリングする方法を検討した。その結果、LIF 投与 1 時間後に採血を行い、AlphaScreen 法により p-STAT3 を測定することでモニタリングできることがわかった。

我々はこれまでに母体感染時の免疫亢進状態が LIF/ACTH リレーを抑制することを明

らかにしている。このリレーの発動する胎齢 12~14日にpoly:ICを投与したマウス感染モデルを用いてBBB形成におよぼす感染の影響を調べた。母マウスにピオチン化インターロイキン6(B-IL-6)を腹腔投与し、胎仔脳室より脳脊髄液(CSF)を回収して脳室への移行量を測定した。同時に胎仔脳でBBB構成蛋白質Claudin5の免疫染色を行なった。CSF中のB-IL-6濃度はPoly(I:C)投与群の方が対照群に比して低い傾向にあった。また、投与群の方が血管内皮細胞間にClaudin5の強い染色像がみられた。これらのことから免疫亢進が持続するとIL-6の移行に何らかの防御機構が働く可能性が示唆された。

<引用文献>

Saunders NR, Liddelow SA, Dziegielewska KM, Barrier mechanisms in the developing brain, *Frontiers in Pharmacology*, 2012, doi: 10.3389/fphar.2012.00046.

Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM, Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier, *Nature Medicine*, 2013, doi: 10.1038/nm.3407

Simamura E, Shimada H, Higashi N, Uchishiba M, Otani H, Hatta T, Maternal LIF signal promotes fetal neurogenesis via a LIF-ACTH-LIF signaling relay pathway. *Endocrinology*, 2010, doi: 10.1210/en.2009-0985.

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3件)

Sakata-Haga H, Uchishiba M, Shimada H, Tsukada T, Mitani M, Arikawa T, Shoji H, Hatta T, A rapid and nondestructive protocol for whole-mount bone staining of small fish and *Xenopus*. *Scientific Reports*, 査読有, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-25836-4.

Tsukada T, Simamura E, Shimada H, Arai T, Higashi N, Akai T, Iizuka H, Hatta T, The suppression of maternal-fetal leukemia inhibitory factor signal relay pathway by maternal immune activation impairs brain development in mice. *PLoS One*, 2015, 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0129011

Simamura E, Arikawa T, Ikeda T, Shimada H, Shoji H, Masuta H, Nakajima Y, Otani H, Yonekura H, Hatta T, Melanocortins contribute to sequential differentiation and enucleation of human erythroblasts via

melanocortin receptors 1, 2 and 5. *PLoS One*, 2015, 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0123232.

〔学会発表〕(計9件)

塚田剛史, 島田ひろき, 王賀, 坂田ひろみ, 東海林博樹, 八田稔久, 母体Poly(I:C)投与による胎盤TLR3シグナルの亢進部位の検索. 第123回日本解剖学会総会・学術集会, 2018

坂田ひろみ, 島田ひろき, 狩山信生, 有川智博, 東海林博樹, 八田稔久, ゼブラフィッシュ骨格観察のための簡易透明化法の開発と解析法の検討. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017

三浦公実, 阪上大昌, 島田ひろき, 王賀, 塚田剛史, 坂田ひろみ, 廖生俊, 有川智博, 東海林博樹, 八田稔久, 胎児脳発達を促進する母胎間白血病抑制因子(LIF)シグナルリレー発動の検出方法の検討. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017

Hatta T, Tsukada T, Shimada H, Arikawa T, Shoji H, W He, Sakata H, Immune-endocrine communication between mother and fetus contributes to fetal brain development, Third Myanmar-Japan inter-national Symposium, 2016

Tsukada T, Shimada H, W He, Sakata-Haga H, Iizuka H, Hatta T, Critical role of SOCS3 in the suppression of the maternal-fetal leukemia inhibitory factor signal relay pathway for fetal brain development, 5th Conference on Prenatal Programming and Toxicity, 2016

塚田剛史, 島田ひろき, 王賀, 東伸明, 飯塚秀明, 八田稔久, 大脳皮質発生に関わる母胎間LIF-ACTH-LIFシグナルリレーにおける胎盤CrhとPomcの挙動. 第56回日本先天異常学会学術集会, 2016

島田ひろき, 塚田剛史, 有川智博, 東海林博樹, 東伸明, 八田稔久, 母体免疫亢進時におけるインターロイキン6の母胎間移行動態. 第4回DOHaD研究会, 2015

塚田剛史, 島村英理子, 島田ひろき, 東伸明, 赤井卓也, 飯塚秀明, 八田稔久, 母胎免疫活性化による母胎間LIF-ACTH-LIFシグナルリレーの破綻と胎仔脳形成障害. 第55回日本先天異常学会学術集会・第38回日本小児遺伝学会学術集会(合同開催), 2015

吉村衣里子, 杉原諒, 三浦公実, 島田ひろき, 東伸明, 三谷真弓, 狩山信生, 有川智博, 東海林博樹, 八田稔久, GFPマウス胎仔

の透明化による心臓発生過程の立体画像化.
第 121 回日本解剖学会総会全国学術集会,
2015

〔産業財産権〕

○取得状況(計 1 件)

名称: Kit for producing cleared biological specimens and method for producing cleared biological specimens (透明化生物標本作製用キット及び透明化生物標本作製方法)

発明者: 八田稔久, 内芝舞実, 東伸明, 島田ひろき, 島村英理子

権利者: 同上

種類: 特許

平成 25 年 10 月 30 日出願(外国;
PCT/JP2013/079388),

平成 27 年 10 月 7 日公開(欧州; 2926658),
10 月 8 日公開(米国; US-2015-0285718-A1)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 ひろき (SHIMADA, Hiroki)

金沢医科大学・看護学部・准教授

研究者番号: 60278108

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

八田 稔久 (HATTA, Toshihisa)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号: 20238025