

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：33303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15405

研究課題名(和文)母胎間シグナルトランスミッターの構造解析

研究課題名(英文)Structural analysis of maternal-fetal signal transmitter

研究代表者

八田 稔久(HATTA, Toshihisa)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：20238025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：胎盤母体側と胎児側を架橋する情報伝達装置の存在を検証した。栄養膜間質にGFAP陽性線維を認めた。そこで、神経堤細胞マーカーであるHKX-1の免疫染色を行い、多数の陽性細胞が検出された。この結果は、血液胎盤関門がグリア性関門である可能性を示唆する。神経堤由来GFAP陽性線維の胎盤全体における局在を解析するために、我々が開発した組織透明化プロトコルであるRAP法を用いて胎盤組織の透明化を試みた。その結果RAP処理したサンプルではより強い陽性シグナルが得られることを確認した。このように、ホールマウント蛍光免疫染色とRAP法を組み合わせた胎盤のホールマウント・イメージング法の基礎がおおむね確立された。

研究成果の概要(英文)：Histological structures which bridge between the sinusoidal space on the maternal side and vessels of placental villi on the fetal side was investigated. The glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunostaining revealed that the GFAP-positive long fibers run across the mesenchyme in the trophoblasts. Then, immunostaining of HKX-1, the specific marker for the neural crest cells, exhibited that the numerous HKX-1-positive cells exists in the placenta. These findings suggest that glial-like cells of neural crest origin contribute to placental barriers similar to the blood-brain barrier. The RAP protocol for tissue clearing was applied to the immunostaining, showing that the RAP-treated specimens exhibited stronger signals. However, the lipophilic fluorescence tracer (Dil) for revealing the whole view of long process, could not be applied for RAP-treated specimens. Thus, in this project, whole mount imaging analysis of the placenta was almost established.

研究分野：発生学

キーワード：母胎児間インターフェイス 胎盤 胎盤関門 白血病抑制因子 胎盤絨毛 栄養膜

1. 研究開始当初の背景

母体環境に起因する胎児のエピゲノムの変化を多因子疾患の素因とする DOHaD (Developmental disorder of health and diseases)仮説 (Gluckman & Hanson, *Science* 2004) を支持する研究成果が多数報告されている。胎盤は胎児の栄養環境に直接影響を与えることから、DOHaD 研究の重要な研究対象と位置づけられる。我々が発見した母胎児間白血病抑制因子 (LIF) シグナルリレー (Simamura, et al, *Endocrinology* 2010) は、DOHaD 研究において、母胎間の情報伝達とその破たんという新たな視点を提案した。

我々がこれまで取り組んできた母胎児間 LIF シグナルリレーの研究 (H19-H21 基盤 B; H22-H24 基盤 B; H25-H27 基盤 B; H24-26 挑戦的萌芽、いずれも研究代表者・八田) において、母体からの LIF シグナルが極めて短時間に胎児に伝達されることが分かっていた。透過型電子顕微鏡を用いて微細構築の解析を行ったところ、絨毛血管内皮細胞の突起が絨毛間腔まで伸びていることが示唆された (H23-25 私学学術振興資金、研究代表者・八田)。しかしながら、技術的限界のため実像の確認には至らなかった。この点について、我々が研究を進めていた新しい組織透明化技術と、広視野・高精細画像取得システムの開発が進み、これらを応用することで、胎盤における母体側と胎児側の架橋構造の描出に取り組む準備ができた。

2. 研究の目的

母胎間シグナルリレーは、母体によるエピジェネティックな発生調節システムの一つと位置付けることが出来る。その特徴は、母体側の LIF シグナルが、胎盤栄養膜において分子の乗り換え (ACTH) をし、ACTH によって胎児側の細胞から LIF が再び分泌誘導される。すなわち、母体で産生された LIF 分子は、胎盤の輸送系を介して胎児側に運ばれるわけではなく、LIF 分子の実質的な移動は伴わず、LIF シグナルだけが母体から胎児に伝わる、回文構造を特徴とするユニークなサイトカインホルモンネットワークである。我々のこれまでの研究により、このシステムでは、母体側の刺激に対して、胎児側で非常に速いレスポ

ンスが認められることが明らかとなっている。高速なレスポンスが成立するためには、物質の輸送を、受動的拡散に依存する従来型の血液胎盤関門のモデルでは説明できない。そこで、シグナル伝達に特化した神経内分泌系(視床下部 下垂体後葉)に類似する組織構築の存在を着想した。当該研究課題では、以下の3項目について検討を行った。

- (1) 絨毛間腔と胎盤絨毛細血管内皮細胞を架橋する組織構築の解析
- (2) 上記架橋構造が母胎間シグナル伝達経路として機能解析
- (3) 架橋構造を示す細胞種の同定

3. 研究の方法

【実験動物】妊娠 13 日~15 日マウス (ICR または C57BL/6J) 母獣に、ドミトール、ドルミカムおよびベトルファール3種混合麻酔薬を腹腔内投与し、麻酔下に胎盤を摘出し、リン酸緩衝 4%パラフォルムアルデヒドにて浸漬固定を行った。その後、パラフィンまたは凍結切片を作成し組織学的解析に用いた。当該動物実験は、金沢医科大学動物実験倫理委員会の承認を受けた。

【構造解析】

(1) 非特異的蛍光染色

胎盤組織の全体像を把握する目的で、ホルマリン、エオジン、Tween20 などの非特異的蛍光染色を行った。蛍光ズーム顕微鏡 (AxioZoom, Zeiss) および共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710, Zeiss) で組織を観察した。

(2) 免疫染色

ACTH (栄養膜)、ラミニン (基板)、HNK-1 (神経堤細胞)、グリア酸性線維性タンパク (GFAP) (アストロサイト) を用いて免疫染色を行った。組織切片に対して、クエン酸バッファー中でマイクロウエーブ処理による抗原性賦活化処理を施した。一次抗体の非特異的反応のブロッキングを行った後、切片を各一次抗体と反応させた (4、オーバーナイト)。二次抗体は一次抗体動物種に合わせた Alexa488 および 596 標識抗 IgG 抗体を使用した。さらに、上記抗体を組み合わせた多重染色を行った。核染色には、DAPI または Hoechst33342 を用いた。

(3) 細胞膜トレーサー実験

絨毛間腔と毛細血管を架橋する突起の全体像を描出する目的で、細胞膜の広がりを描出することが可能な脂溶性カルボニアン色素 DiI をトレーサーとして用いた。胎盤の組織片に DiI を置き数日後に、胎盤を蛍光観察した。我々が開発した新規プロトコル RAP 法にて透明化し、蛍光観察を行った。

(4) 組織透明化プロトコル

我々が確立した組織透明化プロトコル RAP (Rapid protocol of tissue clearing) 法 (Sakata-Haga, 2018) を用いて、胎盤の透明化と免疫染色、DiI 染色との併用について検討した。また、より深部観察に適する高屈折率性メディウムについて検討を行った。

(5) 共焦点スキャナによる画像取得

培養細胞用高速イメージスキャナ CV7000 (横河電機、金沢医大に現有) を使用する。本来はウエルプレートベースでのスクリーニング装置であるが、スライドアダプタを用いて、高精細かつ高速に共焦点画像を自動取得することができる。これを用いて、組織全体の高倍率画像を取得した。また、厚切り切片 (500 μm 以上) に対して、RAP 法による透明化処理を施し、CV7000 にて解析が可能なチャンバースライドガラスの試作を行い、実用性について検討した。

(6) 画像解析

CV7000 にて得られる膨大な3次元連続画像をタイリングするためには PC の計算速度が律速となる。そこで、nDIVIA 製グラフィックボード上で画像処理計算を可能とする QUDA 機能に対応したタイリングプログラム MIST (画像解析ソフト Fiji のプラグイン) を用いて、全体像の再構築を行った。

4. 研究成果

(1) 非特異的染色による全体像の観察

ホルマリン自家蛍光を利用した蛍光観察では、シグナルが弱く低・中倍での観察には適さないことが分かった。エオジン染色標本の観察では、鮮明な画像が得られたが、常法の HE 染色に従うエオジン染色条件では、深部観察が十分にできなかった。染色による組織の透明度低下が原因と考えられた。蛍光強度と組織の透明度は相反するため、染色条件の最適化が必要である。20% Tween20 による自家蛍

光を利用した全体像の観察では、Tween20 処理自体で、組織の透明度が亢進するため、深部観察と蛍光標識を同時に行いうる可能性があることが分かった。しかし、高濃度 Tween20 環境下では、組織だけでなく溶液自体のバックグラウンドノイズも同時に検出されるため、当該研究には適さないことが分かった。

なお、当該研究の本来の目的とは異なるが、研究成果の副産物として、高感度骨格染色法が見出された。Tween20 のバックグラウンドノイズは、グリセロール置換により、組織から消失するが、骨には選択的に残ることが分かった。機序は不明であるが、骨のカルシウム塩を検出するアリザリンレッド S では検出できない胎生中期の胎児骨格でも高い S/N 比で鮮明に描出されることが分かった。これは、骨格奇形等の早期スクリーニングにおける高感度検出法としての今後の発展が期待される。

(2) 免疫染色

ACTH、ラミニン、HNK-1 および、GFAP の単染色および二重染色を用いて、発現解析を行った。ラミニン陽性の基底膜を指標に用いることで、これに囲まれる絨毛内の胎児血管 (胎児側) と、ラミニン陰性の絨毛間腔 (母体側) を明瞭に分別することが可能であった。Z 方向にスキャンすることで、胎児血管側からラミニン陽性基底膜を乗り越える細胞核をとらえることができた。その細胞質全体を描出することはできなかったが、胎児血管あるいはそれに随伴する構造物が絨毛管腔に向かって伸びていることを強く示唆する所見であると考えられた。

また、ACTH とラミニンの二重染色を施し、CV7000 にて胎盤全体の高倍率撮影を行った後に、MIST/Fiji を用いてタイリングを行った。その結果、ACTH は Giant trophoblast, Labyrinthine trophoblast とともに発現が認められるものの、それら全ての細胞に認められるわけではなかった。すなわち、通常の狭い領域での高倍率観察では見落とされていた、著しく不均一な局在が明らかとなった。これは、ACTH の合成および分泌が、栄養膜全体で一様に起きているわけではないことを示唆する。さらに、興味深いことに、多くの trophoblast が HNK-1 陽性を示した。この所見は、trophoblast が neural crest に由来する

ことを示唆している。HNK-1の発現局在は断続的であるため、これによって全体像を描出すことはできなかった。さらに、GFAP陽性を示す線維状構造物が検出された。HNK-1陽性細胞に比べると、数は少ないものの、非常に長い経路を示したが、他の抗体との二重染色による解析には至っていない。これらの研究成果より、neural crest起源の細胞集団が、胎盤内で情報伝達を担う構造的基盤を形成するという仮説が提示され、今後、適切なトレーサーと組み合わせることによって、全体像が明らかになると期待される。

(3) 細胞膜トレーサー実験

DiIを用いて、絨毛間腔と毛細血管を架橋する突起全体を標識し、RAP法にて透明化処理後、高視野にわたる深部観察を試みた。予備実験の段階で、RAP法の主成分であるTriton X-100処理によってDiIが溶出することが判明したため、常法では標識された構造物の観察をすることが出来なかった。胎盤はヘムに富む透明度が非常に低い組織であることから、深部観察と講師や観察を両立するためには、組織の透明化が必須である。RAP法の強力な脱色(脱ヘム)処理を、DiI標識前に行っておくなどのアプローチが考えられるが、当該研究期間内に、方法論を確立することはできなかった。

(4) 共焦点スキャナ

専用のスライドアダプタを用いることで、CV7000を用いた共焦点レーザー顕微鏡のクオリティでの、胎盤の広視野、高精細画像を取得することができた。QUDA動作環境下に、MISTを用いて数千枚からなる胎盤画像の再構築を短時間で処理できることを確認した。これにより、膨大な量の蛍光多重染色による胎盤切片全面全層の3次元スキャニング画像を画像解析しうるシステムが構築された。

RAP法による透明化処理を施した組織片に対応可能なチャンバースライドガラスについては、厚さ1-3mm程度までの数段階のシリコン枠を特注し、スライドガラス状に接着したもの、また、ガラス中央をくり抜き上下をカバーガラスで封じる方法などを試みた。CV7000は倒立型顕微鏡がベースとなっていることから、カバーガラスが下面に設置されたほうが焦点距離の面でメリットが多いことが

確認された。また、シリコン枠接着型のチャンバースライドガラスでは、下面にチャンバーが突出することになり、CV7000の作動範囲外となることが分かった。底面を作動範囲に合わせるためには、スライドアダプタの再設計が必要であり、今後の課題となった。また、スライドガラスをくり抜いてチャンバーを作る方法では、底面の位置がCV7000の動作範囲内に収まるため、撮像は可能であることが分かった。しかし、この方法では、チャンバーの高さがスライドガラスの厚さ(約1mm)となることから、実質的には500µm以下の標本までしか対応できない。この点について、上面に更にチャンバーを設けることによって更に厚い標本にも対応が可能と考えられ、引き続き検討を行う予定である。

なお、CV7000の動作に関するハード及び制御ソフトの改造により、深部方向で4mmまでの動作が確保された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9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 2018 10.1038/s41598-018-25836-4 査読有

Akai T, Hatta T, Shimada H, Mizuki K, Kudo N, Hatta T, Otani H: Extracranial outflow of particles solved in cerebrospinal fluid: Fluorescein injection study. Congenital Anomalies 2017 10.1111/cga.12257

Yoshitomi Y, Ikeda T, Saito H, Yoshitake Y, Ishigaki Y, Hatta T, Kato N, Yonekura H.: JunB regulates angiogenesis and neurovascular parallel alignment in mouse embryonic skin Journal of Cell Science 130: 916-926 2017 10.1242/jcs.196303 査読有

Arikawa T, Shengjun Liao, Shimada H, Inoue T, Sakata-Haga H, Nakamura T, Hatta T Shoji H.: Galectin-4 expression is down-regulated in response to autophagy during differentiation of rat trophoblast cells, Scientific Reports 6, Article number 32248 doi:10.1038/srep32248 2016, 査読有

八田稔久: 神経管の発生 小児の脳神経 41: 296 303, 2016, 査読有

八田稔久、三谷真弓： 生物試料の透明化：古典から最新技術まで。 医歯歯科技術雑誌 29：54-56,2016,査読有

Tsukada T, Simamura E, Shimada H, Arai T, Higashi N, Akai T, Iizuka H and 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 Jun 4;10(6):e0129011. DOI: 10.1371/journal.pone.0129011 査読有

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 Apr 10(4):1-17. DOI: 10.1371/journal.pone.0123232 査読有

Nakata H, Wakayama T, Sonomura T, Honma S, Hatta T, Iseki S.: Three-dimensional structure of seminiferous tubules in the adult mouse. J. Anat, DOI: 10.1111/joa.12375 2015査読有

〔学会発表〕(計 21 件)

王 賀, 有川智博, 廖 生俊, 塚田剛史, 坂田ひろみ, 島田ひろき, 東海林博樹, 八田稔久: 白血病抑制因子はマウス栄養膜幹細胞から副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンの分泌を促進する, 第 57 回日本先天異常学会(東京都新宿区, 早稲田大学理工学術院西早稲田キャンパス, '17.08.26~28)。

阪上大昌, 三浦公実, 羽立 謙, 坂田ひろみ, 塚田剛史, 島田ひろき, 王 賀, 辰野貴則, 石垣靖人, 八田稔久: マウス母体への LIF 投与は胎児大脳介在ニューロン産生に関わる遺伝子の発現を変化させる, 第 57 回日本先天異常学会(東京都新宿区, 早稲田大学理工学術院西早稲田キャンパス, '17.08.26~28)。

松本暁洋, Regassa Dereje Getachew, 古屋智英, 小川典子, 佐藤文夫, 橋本龍樹, 八田稔久, 大谷浩: 顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子のマウス胎仔脳組織形成における作用の解析第 57 回日本先天異常学会(東京都新宿区, 早稲田大学理工学術院西早稲田キャンパス, '17.08.26~28)。

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 シグナルの亢進は脱落膜中の母体由来細胞で生じる, 第 77 回日本解剖学会中部支部学術集会(愛知県名古屋市, 藤田保健衛生大学, '17.10.07~08)。

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(長崎県長崎市, 長崎大学坂本キャンパス, '17.03.28~30)。

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(長崎県長崎市, 長崎大学坂本キャンパス, '17.03.28~30)。

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 international Symposim(Myanmar, Patein University '16.12.3~5)。

Shengjun Liao, Arikawa T, Shimada H, Sakata-Haga H, Hatta T, Shoji H.: Autophagy contributes to the differentiation of rat trophoblast cells, partially through down regulating Galectin-4 expression. 第 39 回日本分子生物学会年会(神奈川県横浜市, パシフィコ横浜, 16.11.30~12.02)。

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(福岡県小倉市, 北九州国際会議場 '16.11.13~16)。

坂田ひろみ, Bold Iuramt, 福井義浩, 島田ひろき, 八田稔久: パルプロ酸が脊髄神経の形成に及ぼす影響, 第 76 回日本解剖学会中部支部学術集会(長野県松本市, 信州大学医学部 '16.10.8~9)。

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,(兵庫県姫路市, 姫路商工会議所 '16.07.29~31)。

松本暁洋, 古屋智英, 小川典子, 佐藤文夫, 橋本龍樹, 八田稔久, 大谷 浩: マウス胎仔脳組織形成における顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子の作用の解析, 第 56 回日本先天異常学会学術集会,(兵庫県姫路市, 姫路商工会議所 '16.07.29~31)。

廖生俊、有川智博、島田ひろき、坂田ひろみ、八田稔久、石垣靖人、東海林博樹：Significance of autophagy and down-regulation of Galectin-4 expression during differentiation of rat trophoblast cells, 第 52 回金沢医科大学医学会学術集会 (石川県河北郡内灘町, 金沢医科大学, '16.07.16) .

赤井卓也、八田稔久、島田ひろき、水城圭司、工藤奈江、八田泰三、大谷 浩：脳室内脳脊髄液とくも膜下腔脳脊髄液の動きの相違とその意義, 第 56 回日本先天異常学会学術集会 (兵庫県姫路市, 姫路商工会議所 '16.07.29 ~ 31) .

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 (福島, ビッグパレットふくしま '16.03.28 ~ 30) .

八田稔久: 組織透明化技術, "未来へのバイオ技術" 勉強会「ハイコンテンツアナリシス(HCA)技術の進化」, (東京都中央区, バイオインダストリー協会, '16.02.25) .

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 (福島県郡山市, ビッグパレットふくしま '16.03.28 ~ 30)

八田稔久: 組織透明化技術, "未来へのバイオ技術" 勉強会「ハイコンテンツアナリシス(HCA)技術の進化」, (東京都中央区, バイオインダストリー協会, '16.02.25) .

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, (東京都品川区, 昭和大学, '15.08.01 ~ 02)

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: 母体免疫活性化による母胎間 LIF - ACTH- LIF シグナルリレ - 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, (神奈川県横浜市, パシフィコ横浜会議センター '15.07.25 ~ 27) .

②八田稔久: 生物試料の透明化: 古典から最新技術まで, 医学生物学電子顕微鏡技術学会 (招待講演), (愛知県名古屋市, 名古屋市立大学医学部, '15.06.19 ~ 21) .

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

1. 名称: 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: 学校法人 金沢医科大学

状態: 特許権取得

番号: 特願 2014-544550

登録日: 2018.1.19

登録番号: 特許第 6274443

国内外の別: 特許権国内

2. 名称: METHOD FOR ENUCLEATING NUCLEATED ERYTHROCYTE, AND ENUCLEATION INDUCER

発明者: 八田稔久, 島田ひろき, 島村英理子

権利者: 学校法人 金沢医科大学

種類: 特許権

状態: 権利化済

番号: 9,290,737B2

出願年月日: 2016年3月22日

国内外の別: 外国

3. 名称: Kit for producing cleared biological specimens and method for producing cleared biological specimens

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: 学校法人 金沢医科大学

種類: 特許権

番号: 13850135.8

出願年月日: 2015年5月28日

国内外の別: 外国

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kanazawa-med.ac.jp/~anatomy1>

6. 研究組織

(1)研究代表者

八田 稔久 (HATTA, Toshihisa)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号: 20238025

(2)連携研究者

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

(3)連携研究者

島村 英理子 (SIMAMURA, Eriko)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号: 00267741