

令和元年6月17日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19674

研究課題名(和文)胎児大脳皮質発生調節機構における胎盤TLR3の役割の解明

研究課題名(英文)Role of placental TLR3 in the fetal brain development

研究代表者

塚田 剛史(TSUKADA, Tsuyoshi)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：90647108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス妊娠中期におけるToll-like receptor 3 (TLR3) の発現は、母親由来組織である脱着膜および胎児由来組織である栄養膜細胞に広く認められた。TLR3のリガンドとして知られる合成二重鎖RNAであるpoly (I:C) を用いた母体ウイルス感染モデルでは、TLR3を介したシグナルは、脱着膜においてのみ認められた。EGFPトランスジェニックマウスを用いた母体ウイルス感染モデルでの検討から、脱着膜中の母親由来の間葉細胞でpoly (I:C)による初期免疫応答が生じていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

母体ウイルス感染は、児の神経発達障害発症の危険因子と知られている。この病態に関与する分子メカニズムとしては、胎盤における炎症性サイトカインIL-6、IL-17Aを介した経路が示唆されているが、ウイルス感染モデルにおいて、これらサイトカイン産生に至る自然免疫の初期応答部位が胎盤で生じているのかは明らかではなかった。本研究によって、脱着膜中の母親由来の間葉細胞が自然免疫の初期応答を示していることが明らかになった。このことは、ウイルス感染が関与する神経発達障害モデルの新たな治療標的を提供するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：At mid-gestational days, immunoreactivity to anti-TLR3 antibody was observed in the decidua and trophoblast cells. At embryonic day 12.5, dams were administered an intraperitoneal poly (I:C) injection (20 mg/kg body weight) and we quantitatively analyzed the phosphorylation of interferon (IFN) regulatory factor 3 (pIRF3). As a result, poly (I:C) injection induced TLR3 signaling in the decidua. By cross-breeding male enhanced green fluorescent protein (EGFP) transgenic mice with wild-type females, the placental tissues of maternal origin can be distinguished from those of paternal origin using EGFP expression. Using this method, we demonstrated that maternally derived decidual cells were the initial target of maternal poly (I:C) through the toll-like receptor 3/TIR-domain-containing the adapter-inducing interferon- signaling pathway.

研究分野：神経発生学

キーワード：胎盤 自然免疫 ウイルス感染 胎児大脳形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

正常大脳皮質形成における母胎間シグナルリレー経路は、炎症惹起性サイトカインである白血球抑制因子 (LIF) と 副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) を使用する。この母胎間シグナルリレー経路は、妊娠中期の母体中に LIF のピークが形成されることで始動する。先行研究から、Toll like receptor 3 (TLR3) を介した軽度母体ウイルス感染モデルで、母体中の LIF が上昇する結果を得ていたことから、生理的な状況下においても TLR3 を介した自然免疫応答により、妊娠中期の母体中に LIF のピークが形成されシグナルを始動するという仮説を立てた。

#### 2. 研究の目的

胎盤 TLR3 を介した自然免疫応答の部位、また応答を示す細胞を明らかにし、胎盤 TLR3 を介した自然免疫応答の母胎間シグナルリレー経路における役割を明らかにすること。

#### 3. 研究の方法

(1)妊娠中期 (10 - 14 日) 野生型マウスの胎盤を採取し、組織標本の作製およびタンパクの抽出を行い、ウエスタンブロッティング法と免疫組織学的に胎盤における TLR3 の発現を評価した。  
(2)妊娠 12.5 日の野生型マウスを使用して、組織標本の作製およびタンパクの抽出を行い、胎盤における TLR3 シグナルをウエスタンブロッティング法と免疫組織学的に評価した。TLR3 シグナルの亢進群として poly (I:C) 20 mg/kg BW を用いた母体ウイルス感染モデルを採用した。生理食塩水投与を対照群とし、無処置の胎盤でも解析を行った。  
(3)EGFP トランスジェニック雄マウスと雌の野生型マウスを交配させることで、胎児由来の細胞に EGFP が観察される胎盤を得た。この胎盤を用いて、TLR3 シグナルを認める細胞群を免疫組織学的に検討した。  
TLR3 の inhibitor (0.5 mg/ml) を母体に投与し TLR3 を介したシグナル抑制モデルを作成した。ELISA 法とウエスタンブロッティング法を用いて対照群と inhibitor 群で、母胎間シグナル伝達に与える影響について比較検討した。

#### 4. 研究成果

(1)妊娠中期 (10 - 14 日) の胎盤において、TLR3 の発現は各群で有意な差は観察されなかった。妊娠 12.5 日の胎盤では、TLR3 は、母親由来組織である脱落膜および胎児由来組織である栄養膜細胞に広く認められた。  
(2)TLR3 シグナルは、アダプタ - 分子である TRIF と転写因子である IRF3 のリン酸化を評価した。Poly (I:C) 投与群で、対照群と比較して有意に IRF3 のリン酸化レベルが上昇していた。免疫組織学的には、IRF3 のリン酸化は、脱落膜においてのみ認められた。無処置の脱落膜においても、ごく少量であるが IRF3 のリン酸化を検出した。  
(3)胎児由来の細胞に EGFP が観察される胎盤を用いた免疫組織学的な解析により、IRF3 のリン酸化は、脱落膜中の母親由来の間葉細胞 (EGFP 陰性、CK7 陰性、Vimentin 陽性) に認められた。対照群に比して、TLR3 の inhibitor 投与群では、母体血清中の LIF レベルの低下を認めた。胎児血清中 ACTH 濃度の増加を認めた。胎児脳脊髄液中の LIF 濃度に関しては増加する傾向を認めた。SOCS3 の発現および pSTAT3 レベルについては、両群間で差はみられなかった。

#### 考察

マウス胎盤における TLR3 の発現については、培養栄養膜細胞での発現は知られていたが、組織上での発現については明らかではなかった。今回の検討により、TLR3 が妊娠中期の胎盤において、広く認めることが明らかになった。poly (I:C) を用いた母体ウイルス感染モデルは、感染が関与する神経発達障害モデルとしてよく使用されるが、同モデルでは、胎児由来である栄養膜細胞や免疫担当細胞が TLR3 を介し免疫応答部位であることが推察されてきていた。しかしながら、本研究によって、TLR3 シグナルの初期応答細胞は、脱落膜中の母親由来の間葉細胞であることが強く示唆される結果を得た。このことは、感染が関与する神経発達障害モデルの新たな治療標的を提供するものと考えられる。また、無処置群の脱落膜でも IRF3 のリン酸化が検出できたこと、母体に TLR3 の inhibitor を投与した際の母体血清中の LIF レベルが低下したことは、生理的な状況下においても TLR3 を介した自然免疫応答が胎盤で生じ、母体血清中の LIF のピークを形成するシグナルを始動している仮説を支持するものと考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Tsukada T, Shimada H, Sakata-Haga H, Iizuka H, Hatta T.: Molecular mechanisms underlying the models of neurodevelopmental disorders in maternal immune activation relevant to the placenta. *Congenital Anomalies*, 2019, 59(3):81-87, doi:org/101111/cga.12323. 査読有

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

〔学会発表〕(計20件)

塚田剛史、王 賀、増田なつみ、島田ひろき、坂田ひろみ、東海林博樹、八田稔久：母体ウイルス感染モデルにおける胎盤での免疫応答部位の探索、第54回北陸生殖医学会学術講演会2018

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・全国学術集会2018

坂田ひろみ、内芝舞実、島田ひろき、塚田剛史、三谷真弓、有川智博、東海林博樹、八田稔久：小型魚類とアフリカツメガエルのための新規迅速骨染色法とその応用 日本毒性学会学術年会 2018

坂田ひろみ、内芝舞実、島田ひろき、塚田剛史、狩山信生、有川智博、東海林博樹、八田稔久：迅速骨染色法(Rap-B)のマウス・ラットへの適用 第58回日本先天異常学会学術集会2018

阪上大昌、塚田剛史、坂田ひろみ、島田ひろき、王 賀、八田稔久：母体のLIF 投与は胎児大脳におけるNkx2.1 の発現を上昇させる 第58回日本先天異常学会学術集会 2018

Tsukada T, Sakagami H, Shimada H, Takata S, Sakata-Haga H, Iizuka H, Shoji H, Hatta T: Leukemia inhibitory factor signaling and STAT3 phosphorylation at Ser727 in fetal mouse brain development Neuroscience 2018

Sakagami H, Tsukada T, Sakata-Haga H, Shimada H, Miura K, Wang H, Arikawa T, Takata S, Shoji H, Hatta T: Administration of maternal leukemia inhibitory factor induces Nkx.2.1 in the ventral cerebrum of fetal mice Neuroscience 2018

狩山信生、坂田ひろみ、塚田剛史、島田ひろき、八田稔久：骨格観察における除毛処理の有効性に関する研究 第78回日本解剖学会中部支部学術集会 2018

He Wang, Tsukada T, Sakata-Haga H, Shimada H, Arikawa T, Shoji H, Hatta T: Leukemia inhibitory factor induces corticotropin releasing hormone in the mouse placenta 第78回日本解剖学会中部支部学術集会 2018

坂田ひろみ、内芝舞実、島田ひろき、塚田剛史、狩山信生、増田なつみ、有川智博、東海林博樹、八田稔久：迅速骨染色法(RAP-B法)の開発とその応用 第78回日本解剖学会中部支部学術集会 2018

八田稔久、松原孝宜、塚田剛史、増田なつみ、島田ひろき、坂田ひろみ：脳組織のハイコンテントアナリシス 第59回日本組織細胞化学学会総会・学術集会 2018

塚田剛史、王 賀、増田なつみ、島田ひろき、坂田ひろみ、東海林博樹、八田稔久：EGFP 発現マウスを利用した母体ウイルス感染モデルにおける胎盤 TLR3 シグナル亢進部位の検討 第59回日本組織細胞化学学会総会・学術集会 2018

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 2017

阪上大昌、三浦公実、羽立 譲、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 2017

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 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

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, 5<sup>th</sup> 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児間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 2016

## 6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。