

平成22年 5月25日現在

研究種目：	基盤研究（B）
研究期間：	2007～2009
課題番号：	19390291
研究課題名（和文）	経胎盤的母胎間シグナル伝達による胎児脳の発育調節
研究課題名（英文）	Maternal leukemia inhibitory factor regulates fetal brain development via a maternal-fetal signaling pathway
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

研究成果の概要（和文）：胎盤のインターフェイス機能として、新たに白血病抑制因子(LIF)と副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)を基軸とする母-胎児間(母胎間)シグナルパスウェイを発見した。このパスウェイでは、母親由来のLIFが胎盤からACTHの分泌を誘導し、このACTHが胎児赤血球から再びLIFの分泌を誘導する。そして、LIFが胎児大脳皮質ニューロンの増殖を促進する。

研究成果の概要（英文）：Placental trophoblasts in rats are stimulated by maternal leukemia inhibitory factor (LIF) to secrete adrenocorticotrophic hormone (ACTH) into the fetal blood circulation. Then, fetal nucleated red blood cells are reactive to placental ACTH to secrete LIF, which induces an increase of LIF level in the fetal cerebrospinal fluid. Finally, the neuron production in the fetal forebrain increased.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：白血病抑制因子、副腎皮質刺激ホルモン、胎盤、脳、赤血球、発生

1. 研究開始当初の背景

申請者・八田らは、マウス胎児子宮外発生法を用いた in vivo 実験によって、白血病抑制因子(LIF)/gp130 シグナルが神経幹細胞を細胞分裂周期にとどめ、神経細胞の産生を促すことを明

らかにした(Hatta et al., J. Neurosci, 2002)。以後、神経幹細胞の self-renewal における LIF の重要性が認識されるようになった。研究開始当時、特に再生医学の領域では、LIF が神経細胞の再生におけるキー分子の候補として、注目さ

れていたが、LIF の胎生期における神経細胞産生機構については不明な点が多かった。本研究課題では、胎盤を介した母-胎児間 LIF シグナル伝達機構を想定し、それによる胎児脳の発育調節が行われるという仮説のもとに研究を開始した。

2. 研究の目的

- (1)ラット母体における LIF の濃度変化の解析
- (2)胎盤絨毛 ACTH の分泌誘導機構の検討
- (3)胎児血球 LIF の分泌誘導機構の検討
- (4)LIF による神経発生関連転写調節因子、成長因子の発現亢進作用の検討
- (5)母乳を介した、母-新生児間ネットワークによる生後脳の発達に及ぼす影響の検討

3. 研究の方法

- (1)ELISA による母獣および胎児の血清、脳脊髄液中の LIF および ACTH 濃度の計測。
- (2)RT-PCR による、LIF、LIFR、gp130、POMC、MC2 および 5R の発現解析。
- (3)real time PCR による、LIF、LIFR、gp130、POMC、MC2 および 5R の定量的発現解析。
- (4)胎盤絨毛および胎児血球における LIF、LIFR、gp130、POMC、MC2 および 5R の免疫染色。
- (5)ACTH 中和抗体の胎児へのマイクロインジェクションによる、LIF 分泌阻害実験。
- (6)MC2/5R 中和抗体による、初代培養胎児血球からの LIF 分泌阻害実験。
- (7)siRNA による培養絨毛幹細胞の gp130 および LIFR に対するノックダウン実験。
- (8)母獣への LIF 投与後の、胎児大脳における遺伝子発現プロファイル解析。
- (9)母獣への LIF 投与後の、胎児大脳における BrdU-labeling index 解析。
- (10)ラット母乳成分分析およびラット母乳の搾乳法の確立と人工哺育法の条件設定。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

①LIF シグナルパスウェイの証明

母体からの LIF 刺激により、胎盤絨毛細胞から ACTH が分泌誘導され、それが胎児有核赤血球に作用して、再び LIF の分泌を誘導することを、in vivo および in vitro の各種実験で確認した。これによって、母胎間にまたがる LIF-ACTH-LIF シグナルパスウェイの存在を同定した。また、そのシグナルパスウェイの標的として、胎児大脳皮質の発生が調節を受けることを示した。この研究成果は Endocrinology 誌に発表され、大変ユニークなモデルとして reviewer から高い評価を受けた (Simamura et al, Endocrinology 2010)。

②LIF 刺激により変動する胎児大脳皮質の遺伝子発現プロファイル

LIF 投与4時間後の胎児大脳皮質の遺伝子発現プロファイルを Affimetrix Gene chip を用いて解析したところ、250 遺伝子に変動が認められ、137 遺伝子が発現亢進していた。この中の 28 遺伝子が神経発生関連遺伝子であった。

③ミルク成分の解析

ラットのミルクを、容易に、かつ効率よく搾乳できる方法論が確立できたため、この方法を用いて、生後日数に伴う母乳含有成分の変化を LS/MS/MS および二次元電気泳動による検索を開始した。その結果、初乳と 3 日目の成乳を比較すると、構成成分に大きな違いが認められた。現在、変動した分子の同定を行っている。また、従来では困難であった、出生直後の新生児に対して、安全に強制哺乳するための経口ゾンデの原型が完成した。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

母胎児間シグナルパスウェイを初めて記載し、それが胎児脳の発育に関与することを報告した (Simamura et al, Endocrinology 2010)。これは母と胎児をむすぶ情報伝達システムの発見にほ

かならず、当該領域の研究において全く新しい視点を与える、非常に独創的かつエポックメイキングな研究成果であると位置付けられる。この論文は、Faculty of 1000 Biology に選出(2010, 4月)され、高い評価を得ている。

(3)今後の展望

母胎間シグナルパスウェイによる、胎児大脳と血球の発生を調節する分子機構が明らかになり、その生理的意義が確立される。さらに、LIF シグナルパスウェイの標的分子の中で神経発生関連転写調節因子に対する発現調節機構が解明されることにより、いまだ明確な分子機構が示されていない、生活習慣病や神経疾患の胎児起源仮説(DOHad 仮説)の研究における突破口になると期待される。

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21件)

- 1) Maternal leukemia inhibitory factor (LIF) promotes fetal neurogenesis via a LIF-ACTH-LIF signaling relay pathway.: Simamura E, Shimada H, Higashi N, Uchishiba M, Otani H, Hatta T *Endocrinology* <査読有> 151: 1853-1862 2010
- 2) Ror2 is required for midgut elongation during mouse development.: Yamada M, Udagawa J, Matsumoto A, Hashimoto R, Hatta T, Nishida M, Minami Y and Otani H *Dev Dynam* <査読有> 239: 941-953 2010
- 3) Paraquat toxicity induced by voltage-dependent anion channel 1 acts as an NADH-dependent oxidoreductase.: Shimada H, Hirai K-I, Simamura E, Hatta T, Iwakiri H, Mizuki K, Hatta T, Sawasaki T, Matsunaga S, Endo Y and Shimizu S *J Biol Chem* <査読有> 284: 28642-28649 2009
- 4) Quantitative Analysis of Delayed Neuronal Death in the Hippocampal Subfields of SHRP and SHR: Daisu M, Hatta T, Sakurai-Yamashita Y, Nabika T, Moritake K *Cell Mol Neurobiol* <査読有> 29: 557-562 2009
- 5) Morphometric study on the characteristic external features of normal and abnormal human embryos.: Otani H, Udagawa J, T. Lundh, Hatta T, Hashimoto R, Matsumoto A, Satow F *Congenit Anom(Kyoto)* <査読有> 48: 18-28 2008
- 6) Bioreductive activation of quinine antitumor drugs by mitochondrial voltage-dependent anion channel 1.: Simamura E, Shimada H, Ishigaki Y, Hatta T, Higashi N, Hirai K-I *Anat. Sci. Int* <査読有> 83: 261-266 2008
- 7) Mitochondrial voltage-dependent anion channels (VDACs) as novel pharmacological targets for anti-cancer agents.: Simamura E, Shimada H, Hatta T, Hirai K-I *J. Bioenerg. Biomembr* <査読有> 40: 213-217 2008
- 8) Congenital deformities and developmental abnormalities of the mandibular condyle in the temporomandibular joint.: Kaneyama K, Segami N, Hatta T *Congenit Anom(Kyoto)* <査読有> 48: 118-125 2008

- 9) Right vertebral artery as the fourth branch of the aortic arch. : Higashi N, Shimada H, Simamura E, Hatta T *Anat. Sci. Int* <査読有> 83: 314-318 2008
- 10) Mouse exo utero development system; Protocol and troubleshooting. : Yamada M, Hatta T, Otani H *Congenit Anom(Kyoto)* <査読有> 48: 183-187 2008
- 11) Partial functional overlap of the three *ras* genes in mouse embryonic development. : Nakamura K, Ichise H, Nakao K, Hatta T, Otani H, Sakagami H, Kondo H and Katsuki N *Oncogene* <査読有> 27: 2961-2968 2008
- 12) Adrenocorticotrophic hormone affects nonapoptotic cell death of undifferentiated germ cells in fetal mouse testis. : *In vivo* study by *exo utero* transplantation of corticotrophic tumor cells into embryos. : Nimura M, Udagawa J and Otani H *Congenital Anomalies* <査読有> 48(2):81-86, 2008
- 13) Morphometric study on the characteristic external features of normal and abnormal human embryos. : Otani H, Udagawa J, T. Lundh, Hatta T, Hashimoto R, Matsumoto A, Satow F: *Congenit Anom(Kyoto)* <査読有> 48:18-28, 2008
- 14) Fetal jaw movement affects development of articular disk in the temporomandibular joint. : Habib H, Hatta T, O. I. F. Rahman, Yoshimura Y and Otani H *Congenit Anom(Kyoto)* <査読有> 47: 53-57 2007
- 15) Development of the pons in human fetuses. : Hatta T, Satow F, Hatta J, Hashimoto R, Udagawa J, Matsumoto A and Otani H *Congenit Anom(Kyoto)* <査読有> 47: 63-67 2007
- 16) Roles of leptin in prenatal and perinatal brain development. : Udagawa J, Hatta T, Hashimoto R and Otani H *Congenit Anom(Kyoto)* <査読有> 47: 77-83 2007
- 17) 八田稔久、山田真紀子、島村英理子、島田ひろき、二村正行、松本暁洋、宇田川潤、橋本龍樹、東伸明、大谷浩 : マウス胎児子宮外発生法 *金医大誌* <査読有> 32: 16-22 2007
- 18) 脾臓を含む調和的な組織形成と子宮内環境. : 大谷 浩 *糖尿病と妊娠* <査読有> 7:17-22, 2007
- 19) 母体環境と I 型糖尿病発症について -NODマウスを用いた解析-. : 籠橋有紀子、大谷 浩 *糖尿病と妊娠* <査読有> 7:23-29, 2007
- 20) Reg I-knockout mice reveal its role in regulation of cell growth that is required in generation and maintenance of the villous structure of small intestine. Ose T, Kadowaki Y, Fukuhara H, Kazumori H, Ishihara S, Udagawa J, Otani H, Takasawa S, Okamoto H and Kinoshita Y *Oncogene* <査読有> 26:349-359, 2007
- 21) Sulfated glycosaminoglycans are necessary for Nodal signal transmission from the node to the left lateral plate in the mouse embryo. : Oki S, Hashimoto R, Okui Y, Michael M. Shen, Mekada E, Otani H, Saijoh Y and Hamada H *Development* <査読有> 134:3893-3904, 2007

〔学会発表〕(計18件)

- 1) Hatta T, Simamura E, Otani H: Maternal LIF contributes to fetal development via a LIF-ACTH-LIF signaling relay pathway, Analyses of Developmental Phenomena: Toward the elucidation of the developmental origins of diseases (International Symposium), (出雲, 島根大学医学部' 09.10.30) .
- 2) Hatta T, Simamura E, Shimada H, Uchishiba M, Higashi N: Maternal leukemia inhibitory factor enhances proliferation of neuronal progenitors of forebrain in rat fetuses, Society for NEUROSCIENCE 2009, (Chicago, McCormick Place convention center' 09.10.17~21) .
- 3) Simamura E, Shimada H, Higashi N, Otani H, Hatta T: Leukemia inhibitory factor level in cerebrospinal fluid is elevated via placental adrenocortico- tropic hormone in rat fetuses, Society for NEUROSCIENCE 2009, (Chicago, McCormick Place convention center' 09.10.17~21) .
- 4) 東 伸明, 島田ひろき, 島村英理子, 八田稔久: 標準型腹腔動脈について, 第69回中部支部学術集会, (浜松, 浜松医科大学' 09.10.10-11), 解剖誌, 84: 57.
- 5) 八田稔久, 島村英理子, 島田ひろき, 東伸明: 母胎間LIFネットワークによる胎児脳の発育調節, 第45回金沢医大医学会, (内灘, 金沢医科大学' 09.07.25) .
- 6) Simamura E, Shimada H, Higashi N, Otani H, Hatta T: Analysis of maternal-fetal LIF-ACTH-LIF signaling pathrogy, 第49回日本先天異常学会学術集会, (鹿児島, 鹿児島市民文化ホール' 09.06.25-27) .
- 7) Hatta J, Hatta T, Miyagawa S, Kitahara Y, T.Hirota, Anzawa K, Mochizuki T: Quantitative image analysis of effects of antimycotic agents on the hyphal growth in *Trichophyton rubrum*, The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, (東京, 京王プラザホテル東京' 09.05.25-29) .
- 8) 島村英理子, 島田ひろき, 東 伸明, 大谷 浩, 八田稔久: 胎盤を介した母胎間シグナル伝達経路の証明, 第114回日本解剖学会総会, (岡山, 岡山理科大学' 09.03.28-30).
- 9) 東 伸明, 島田ひろき, 島村英理子, 八田稔久: ヒト大動脈の加齢変化, 第114回日本解剖学会総会, (岡山理科大学' 09.03.28-30) .
- 10) 八田泰三, 水城圭司, 岩切弘輝, 金崎壮平, 島田ひろき, 八田稔久: ビオチン化パラコート合成とVDAC1検出系への応用, 日本化学会西日本大会, (長崎, 長崎大学' 08.11.15-16) .
- 11) 東 伸明, 島田ひろき, 島村英理子, 八田稔久: 腹大動脈、腹腔動脈、左胃動脈から起こる肝動脈の分類, 第68回中部地方会学術集会, (名古屋, 名古屋市立大学' 08.10.11-12), Act Anat Nipp, 83:26.
- 12) 島村英理子, 島田ひろき, 東 伸明, 八田稔久: ラット胎児におけるLIFのソースに関する研究, 第44回金沢医科大学医学会学術集会, (内灘, ' 08.7.19) .
- 13) 島村英理子, 島田ひろき, 東 伸明, 八田稔久: 胎盤におけるleukemia inhibitory factor receptorの発現解析, 第48回日本先天異常学会, (東京, 聖路加看護大学' 08.06.28-30) .
- 14) 松本暁洋, 八田稔久, 小野篤輝, 河本舞, 張 慶華, 大谷 浩: マウス胎児の中枢神経系における顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子およびレセプター

の発現解析, 第 48 回日本先天異常学会,
(東京, 聖路加看護大学' 08. 06. 28-30) .

15) 松本暁洋, 八田稔久, 小野篤輝, 河本舞, 井上隆之, 橋本龍樹, 大谷 浩: マウス胎児の脳と体液における顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子発現分布の解析, 第 113 回日本解剖学会総会, (大分, 大分大学' 08. 03. 27-29) .

16) 東 伸明, 島田ひろき, 島村英理子, 八田稔久: 臍静脈から下大静脈の胎児循環路, 第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会, (大分, 大分大学' 08. 03. 27-29) .

17) 東 伸明: 上位腹部動脈系の変異, 第 29 回肉眼解剖学懇話会, (大分, 大分大学' 08. 03. 27) .

18) 東 伸明, 島田ひろき, 島村英理子, 八田稔久: 腹大動脈、腹腔動脈、左胃動脈から起こる肝動脈の分類, 第 67 回中部支部学術集会, (名古屋, 愛知医科大学' 07. 10. 13-14) .

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 有核赤血球の脱核方法及び脱核誘導剤

発明者: 八田稔久、島村英理子、島田ひろき

権利者: 学校法人 金沢医科大学

種類: PCT/JP2010

番号: 001217

出願年月日: 2010 年 2 月 23 日

国内外の別: 外国

[その他]

<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) 研究分担者

大谷 浩 (OTANI HIROKI)

島根大学・医学部・教授

研究者番号: 20160533

(H19: 分担者→H20: 連携研究者)

橋本 龍樹 (HASHIMOTO RYUJU)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 90252907

(H19 のみ分担者として参画)

宇田川 潤 (UDAGAWA JUN)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 10284027

(H19 のみ分担者として参画)

松本 暁洋 (MATSUMOTO AKIHIRO)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 70346378

(H19 のみ分担者として参画)

島村 英理子 (SIMAMURA ERIKO)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号: 00267741

(H20~21 分担者として参画)

島田 ひろき (SHIMADA HIROKI)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号: 60278108

(H20~21 分担者として参画)

東 伸明 (HIGASHI NOBUAKI)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号: 00139784

(H20~21 分担者として参画)