

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05936

研究課題名(和文)胎盤性C3による胎子眼球成長機序および早成性に関する胎盤由来因子の解析

研究課題名(英文)Growth mechanism in animal eye development regulated by placental C3 and analysis of placenta derived factors for precocial neonates

研究代表者

日下部 健(Kusakabe, Takeshi)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：20319536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリでは眼球の発生に補体タンパクC3aと受容体C3aRが関与する。また、哺乳類では胎盤にC3フラグメントタンパクを豊富に含む。本研究では、形成初期のマウス網膜におけるC3a、C3aRを調べたが共に発現は低く、C3フラグメントタンパクは網膜内部に分布していなかった。マウス新生子の網膜における補体受容体CR3と、ミクログリアとの関連性について検討した。CR3とミクログリアマーカーであるIba1の生後の発現変化、網膜内局在は一致しなかった。ウマの胎盤における発現遺伝子を調べ、血液への移行について検討した。ANXA2とIT2MBが高頻度に検出されたが、妊娠期の血清と臍帯血で特異的では無かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

補体C3aと受容体C3aRはマウスの眼球形成に関与しないことが分かった。また、新生子の網膜におけるミクログリアの制御に、CR3は関与しないと考えられた。一方で、妊娠期の母体において、とくに乳腺で補体C3のフラグメントタンパクが作られていることが分かった。このことは泌乳によって新生子に補体タンパクが移行し、生理学的な役割を持つ可能性がある。ウマ胎盤で特異的に作られ、母体血や臍帯血に移行する因子を見つけることは出来なかった。しかし、ウマ胎盤で高発現している遺伝子リストを作成することが出来、このことはウマの妊娠生理や妊娠のモニタリングを行うための重要な研究材料になり得る。

研究成果の概要(英文)：In chickens, the complement protein C3a and its receptor C3aR are involved in eye development. In mammals, the placenta is an abundant organ for C3 fragment proteins. In the present study, both C3a and C3aR were examined in the early forming mouse retina, but both expressions were low, and C3 fragment proteins were not distributed inside the retina. The association of the complement receptor CR3 with microglia in the retina of mouse neonates was examined; postnatal changes in the expression of CR3 and the microglial marker Iba1, as well as its intraretinal localization, were not consistent. Expressed genes in the horse placentas and transition into blood were examined; ANXA2 and IT2MB were detected at high frequencies, but not specifically in gestational serum and cord blood.

研究分野：新生子の生物学

キーワード：網膜 補体 ミクログリア 胎盤 ウマ 遺伝子

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 鳥類・哺乳動物の新生子は成長速度の違いによって早成性、晩成性に分類することが出来る。視覚の成長速度は分類のための重要な指標の一つであり、ウシ・ウマ(早成性動物)は出生時から視覚に基づいた行動能力を有する。マウス(晩成性動物)は出生時には瞼が閉じており、視覚行動を獲得するまで出生後10日ほど必要とする。両動物間では、出生時の網膜の成熟レベルに大きな差がある。

ニワトリ(早成性動物)では補体成分 C3a とその受容体 C3aR が眼杯形成期の網膜に局在している。先天的に C3aR を欠損させると雛の眼球の形成が正常に進まず、小眼症や網膜欠損が発症する(Garajales-Esquivel, Dev Biol, 2017)。哺乳動物においても、胎生期の網膜・眼球の発身に C3a/C3aR システムが関与する可能性がある。

申請者らはマウスの胎盤に補体成分が含まれ、その侵襲性は制御因子によって抑制されていることを示した(Takeshita, J Reprod Dev, 2010)。補体因子は妊娠期において免疫機能以外にも作用を持ち、胎子の発生に関連しているかもしれない。

(2) 研究開始当初ではないが、研究を進めるにつれて、胎子・胎盤における補体成分の別の可能性を見出した。CR3 (CD11b) はミクログリアに発現し、補体成分 iC3b をリガンドとする。C3b の CR3 への結合は、ミクログリアを活性化することが出来る。網膜は、出生後の成長期において薄くなるが、薄化に伴う組織の再構築にミクログリアの貪食能が関与する可能性がある。

(3) 哺乳動物の胎盤には上皮絨毛膜型(ウマ、ブタなど)、内皮絨毛膜型(イヌ・ネコなど)、血絨毛膜型(ヒト、マウスなど)の三種類存在する。進化的に最も新しいタイプは上皮絨毛膜型で(Vogel, Placenta, 2005)、胎児成長機能での優位性も示された(Wildman, PNAS, 2006)。上皮絨毛膜型胎盤において、胎子の成長に関わる生理活性因子の特異性が存在する可能性がある。

### 2. 研究の目的

(1) 妊娠期における母体由来 C3aR および胎子の C3a の局在を調べ、胎子網膜における C3a/C3aR システムの関与について検証した。

(2) 研究(1)結果として、マウス胎生期網膜における C3a/C3aR システムの関連性を見出せなかったが、発生が進んだ胎子網膜において補体 iC3b を認めた(下記4(1)に記載)。上記背景(2)を根拠として、出生後の網膜における CR3 の分布、および網膜の成長過程におけるミクログリアの関与の可能性について検証した。

(3) 上皮絨毛膜型胎盤で産生される特異的因子を明らかにするため、RNA-Seq 実施し、選定された因子に関して母体血と臍帯血への移行の調査を行った。

### 3. 研究の方法

(1) C57BL/6J マウスにおいて、初期眼杯が形成される妊娠 10.0 日を起点に、妊娠 14.0 日までの胎子を採用した。同時に、母体から胎盤、乳腺、肝臓を採用した。サンプルを解析手法に対して適切に処置し、組織学的解析、ウエスタンブロット、リアルタイム PCR に適用した。

(2) マウスの新生子について、生後 0~56 日齢を安楽殺し、眼球を採用した。眼球から RNA を抽出し、リアルタイム PCR で解析した。また、未だ結果は出ていないが、新生子にミノマイシンを投与し、ミクログリアの機能抑制が眼球・網膜の形成に影響を与えるかを検討中である。

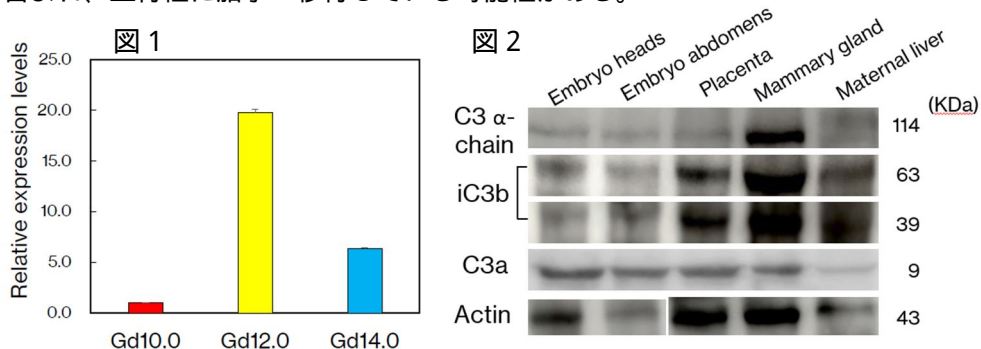
(3) ウマの後産胎盤から RNA を抽出し、2 種類の胎盤で共通して発現している遺伝子について RNA-Seq 解析を行った。ここに NCBI で公開されているウマ胎盤発現遺伝子(GSE147161)のデータを加えて、さらに共通発現している遺伝子を絞り込んだ。STRING 解析によって、抽出遺伝子についてクラス分けし、リボソームとミトコンドリアに関する遺伝子を排除した。選択された遺伝子について、RT-PCR と免疫染色にて胎盤での発現・タンパク局在を確認した。ウエスタンブロットリングにより、選択因子の血清、臍帯血における動態変化を調べた。

### 4. 研究成果

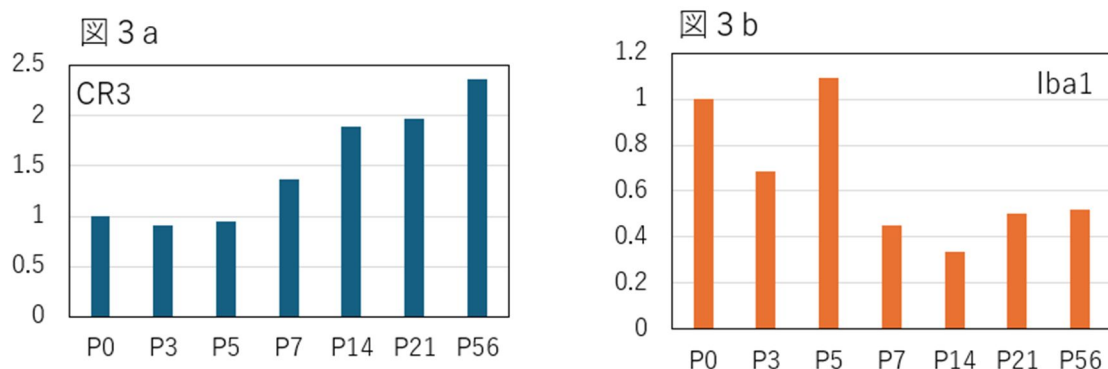
(1) 受容体 C3aR の mRNA 発現量は妊娠 10.0 日(Gd10.0)では低く、Gd12.0 をピークとして一過性の増加を見せた(図1)。C3a タンパクは Gd10.0、12.0 の胎子体内では確認できず、Gd14.0 で検出されるようになった(図2)。さらに、胎子網膜内には C3a を含む C3 タンパクの局在は認められず、陽性反応は網膜表層、硝子体血管の内部、水晶体上皮に確認された。

マウス眼杯の形態形成および網膜の分化には、C3a/C3aR システムの関与は低いことが示され

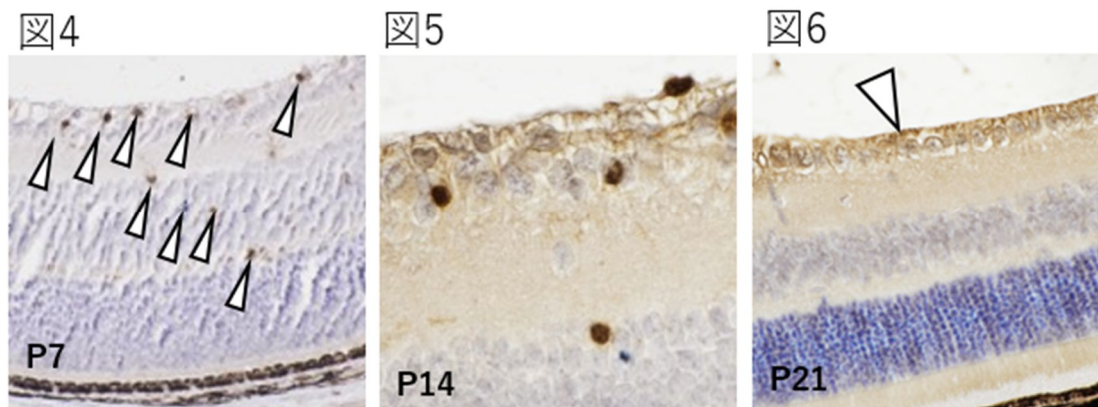
た。一方で、C3 フラグメントタンパク (C3a や iC3b) は眼球の血管周囲の部位に存在し、何らかの機能を有する可能性が示唆された。C3 フラグメントタンパクは母体の胎盤や乳腺に豊富に含まれ、血行性に胎子へ移行している可能性がある。



(2) 新生子の眼球において、CR3 遺伝子は生後 7 日齢 (P7) から増加し、P56 まで高いレベルで維持した (図 3a)。一方で、ミクログリアのマーカー遺伝子である Iba1 を同様に調べると、P0~5 の間で最も高く、P7 を過ぎると減少した (図 3b)。

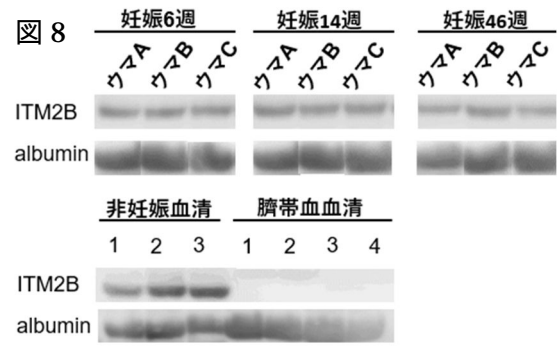
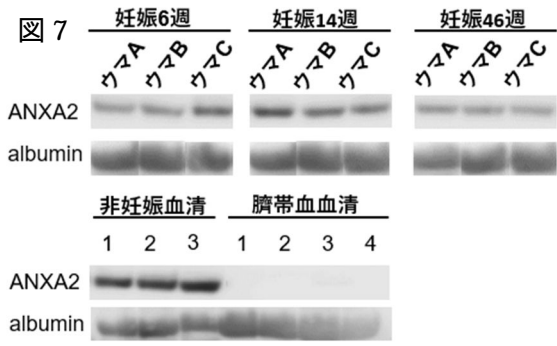


免疫染色では、Iba1 陽性反応は P0 から P56 までのすべての時期で検出され、神経節細胞層、内網状層、内顆粒層に多く局在していた (図 4)。拡大すると、球状の活性型である可能性が示された (図 5)。CR3 の陽性反応は P21 以降で明確に確認され、網膜表層においてびまん性、または血管壁に沿って認められた (図 6)。



CR3 と Iba1 のマウス新生子眼球における出現時期および局在部位は異なり、網膜内 CR3 はミクログリアを反映する分子ではないと考えられた。CR3 は血行性に網膜へ到達する iC3b を網膜表層で捉え、免疫反応の要因となる可能性が示唆された。

(3) ウマ胎盤の RNA-seq 解析から、ANXA2、HSPB1、ITM2B、S100A6、S100A11 の高発現を認めた。特に、分泌性の因子である ANXA2、ITM2B について血中動態を調べたが、妊娠期だけでなく非妊娠期においても血中での存在が確認された。臍帯血では ANXA2、ITM2B とともに検出されなかった (図 7、8)。本研究からウマ胎盤での高発現遺伝子を検出することが出来たが、妊娠期における特異的な血清動態を見出すまでには至らなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加川齊三郎、日下部健、村瀬晴崇、兵頭宗蔵、今井啓之
2. 発表標題 ウマ胎盤に含まれる生理活性因子の検索
3. 学会等名 第167回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中原千尋、日下部健、兵頭宗蔵、青柳亮慈、今井啓之.
2. 発表標題 胎生期マウスの眼球形成と補体因子との関連性
3. 学会等名 第4回獣医解剖アカデミア（日本獣医解剖学会 / 獣医解剖分科会春季学術集会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 青柳亮慈、兵頭宗蔵、中原千尋、今井啓之、日下部健
2. 発表標題 新生子期マウスの網膜の組織変化におけるミクログリアの関与
3. 学会等名 第4回獣医解剖アカデミア（日本獣医解剖学会 / 獣医解剖分科会春季学術集会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 兵頭 宗蔵、今井 啓之、加納 聖、日下部 健 .
2. 発表標題 ウシおよびマウスの出生後発達に伴う網膜の組織学的構造変化
3. 学会等名 日本解剖学会 第77回 中国・四国支部学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 兵頭宗蔵、今井啓之、加納聖、日下部健
2. 発表標題 ウシおよびマウス網膜の出生後発達に関する形態学的・分子生物学的解析
3. 学会等名 日本解剖学会 第77回 中国・四国支部学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 日下部 健
2. 発表標題 妊娠期における補体因子の胎盤内動態と流産との関連性について
3. 学会等名 第3 回日本生殖発生毒性フォーラム（大日本住友製薬株式会社）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 兵頭 宗蔵、今井 啓之、加納 聖、日下部 健
2. 発表標題 ウシおよびマウスの眼球と網膜の生後成長に関する研究
3. 学会等名 日本解剖学会第75回中国・四国支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 兵頭宗蔵、今井啓之、加納聖、日下部健
2. 発表標題 ウシおよびマウス網膜の出生後発達に伴う組織学的構造変化
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 兵頭 宗蔵、今井 啓之、加納 聖、日下部 健
2. 発表標題 ウシおよびマウスの出生後発達に伴う網膜の組織学的構造変化
3. 学会等名 日本解剖学会 第77回 中国・四国支部学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青柳亮慈、兵頭宗蔵、中原千尋、今井啓之、日下部健
2. 発表標題 新生子期マウスの網膜の組織変化におけるミクログリアの関与
3. 学会等名 日本獣医解剖学会 / 獣医解剖分科会春季学術集会 第4回獣医解剖アカデミア
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 日下部健、中原千尋、兵頭宗蔵、今井啓之
2. 発表標題 マウス眼球形成過程における補体C3の関連性
3. 学会等名 第128回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 兵頭宗蔵、今井啓之、日下部 健
2. 発表標題 ウシ眼球および網膜の生後成長に関する研究
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap <a href="https://researchmap.jp/read0055760">https://researchmap.jp/read0055760</a> YJK (山口獣医解剖) <a href="https://www.facebook.com/YjkshanKouShouYiJiePou">https://www.facebook.com/YjkshanKouShouYiJiePou</a> YJK (山口獣医解剖) <a href="https://www.facebook.com/YjkshanKouShouYiJiePou">https://www.facebook.com/YjkshanKouShouYiJiePou</a> 生体機能学講座 日下部 健 <a href="https://www.vet.yamaguchi-u.ac.jp/members/kusakabe-p.html">https://www.vet.yamaguchi-u.ac.jp/members/kusakabe-p.html</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	今井 啓之  (Imai Hiroyuki)	山口大学・共同獣医学部・助教  (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------