

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293241

研究課題名(和文)母胎児間シグナルチューニング機構の分子基盤解明

研究課題名(英文)The signal tuning system for the maternal-fetal signal relay

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) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、白血病抑制因子と副腎皮質刺激ホルモンによる、母胎児間(母胎間)シグナルリレーが胎児大脳皮質の形成と赤血球の分化を誘導することを明らかにした。本研究課題では、疑似ウイルスを用いた母体免疫亢進モデルマウスを用いて、母胎間シグナルリレーに対する母体炎症の影響を解析した。その結果、妊娠母体がウイルス感染により重篤な炎症状態に陥った時、過剰な炎症性シグナルを胎盤で減弱あるいは遮断することで、母体炎症から胎児を保護するシステムの存在が示された。しかし、これは同時に胎児の発生に必要な生理的母胎間シグナルリレーも遮断するため、母体の状態によって胎児大脳の発生が影響を受ける可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously described that the maternal-fetal leukemia inhibitory factor (LIF) signal relay contributes to the brain development of embryos in mice and rats. In the present study, we investigated the effects of maternal inflammation on the maternal-fetal LIF signal relay. To assess the effects of maternal inflammation, immunologically activated model mice were used. Pregnant mice were administered with polyinosinic:polycytidylic acid(Poly I:C). The administration of Poly I:C mimics influenza virus infections. The downstream signaling of LIFR/gp130 was inhibited by SOCS3, which was induced by excess inflammatory signals in the placenta. Thus, the signal tuning system of SOCS3 seems to protect fetuses from maternal inflammatory signals. However, the SOCS3 system also inhibited the physiological fetal-maternal signal relay; as a result, the development of the fetal cerebral cortex was damaged because of the starvation of LIF signals.

研究分野：発生学

キーワード：母体免疫 白血病抑制因子 インターロイキン6 DOHaD 自閉症スペクトラム

## 1. 研究開始当初の背景

胎盤は母と胎児のインタラクシオンの場における"maternal-fetal interface"としての役割が注目されてきたが、主に母体免疫系の制御と妊娠の成立・維持に関する研究が中心であった (Yagel, *Am J Obstet Gynecol* 2009; Paiva et al, *Cytokine Growth Factor Rev* 2009)。近年、妊娠環境に起因する胎児のエピゲノムの変化が多因子疾患の疾病素因を規定すると考える D0HaD 仮説 (Gluckman & Hanson, *Science* 2004) を支持する研究成果が世界中から続々と報告され、胎盤の母胎間情報伝達装置 (シグナルトランスミッター) としての機能に関する研究が重要になってきた。

我々は、母体由来の白血病抑制因子 (LIF) が胎盤由来の副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) を誘導し、この ACTH が胎児有核赤血球から再び LIF を分泌誘導する「母胎間 LIF シグナルリレー」を発見した (Simamura et al, *Endocrinology* 2010)。さらに、胎児で誘導された LIF が大脳皮質形成を促進することが明らかとなった。この論文は Faculty of 1000 Biology に選出 (2010) され、D0HaD 研究における新たな切り口の提示につながる研究成果として高く評価された。H19-21 および H22-24 基盤研究 B (いずれも研究代表者: 八田) を通して、母胎間シグナルリレーが胎児の発育調節に重要な生理的ネットワークであり、胎児の大脳皮質と赤血球の発生・分化を調和的に調節していることが示唆された。

本研究により得られる成果は、妊娠母体ならびに胎児の管理・治療法の開発のみならず、母体環境により胎児がエピゲノムレベルで影響を受けるメカニズムの解明に貢献することが期待される。

## 2. 研究の目的

母体炎症・免疫亢進状態では、妊娠母体における IL-1 や TNF の誘導を起点として、IL-6 を始めとする多様なサイトカインの爆発的産生が引き起こされる。これに続いて、下流で働く転写調節因子、栄養膜母体側のサイトカイン受容体の発現変動、炎症性シグナルの遮断機構の発動など、正負両方向の様々なレスポンスが誘導されることが予想される。

本研究課題では、母体炎症モデルを基本として、母胎間 LIF シグナルリレー関連分子の

発現変動、胎児大脳皮質の組織学的解析、胎盤における gp130 下流の JAK2/STAT3 のシグナル伝達解析、ならびにそれに対するネガティブループに關与する分子の発現変動を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) LIF 刺激による胎児の遺伝子発現変

#### 胎盤の遺伝子発現変化

妊娠 13.5 日のマウス母獣に LIF (5  $\mu$ g/kg BW) 投与し、30 分後における胎盤の遺伝子発現を、DNA マイクロアレイを用いて解析した。

#### 胎児大脳皮質の遺伝子発現変化

妊娠 13.5 日のマウス母獣に LIF (5  $\mu$ g/kg BW) 投与し、3 時間後における背側大脳皮質の遺伝子発現を、DNA マイクロアレイを用いて解析した。

### (2) 母体免疫亢進モデルの解析

妊娠 12.5 日 (12.5 dpc) の C57BL/6J マウスに Polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C) (1, 4, 20 mg/kg BW) を腹腔内投与し、母体免疫亢進モデルマウスを作成し、以下の項目について検討を行った。

母体 IL-6 および LIF、胎児 ACTH および LIF レベルの変動

ELISA および定量的 PCR を用いて解析した。

母体免疫亢進レベルと胎児大脳皮質発生に及ぼす影響

各処置群の胎児大脳皮質ニューロン総数と S 期の細胞総数を、ステレオロジー解析により算出した。これらの細胞数と、上記で得られた ELISA および定量的 PCR の結果の相関性について解析を行った。

胎盤栄養膜における JAK2/STAT3 に対する作用

LIFR/gp130 下流のシグナル量を抑制的に調節することが知られる SOCS3 の作用を調べた。すなわち、poly:I:C 投与後に、栄養膜における STAT3 のリン酸化量をウエスタンブロットティングにて計測し、SOCS3 の発現量をウエスタンブロットティングおよび定量的 PCR で計測した。

軽度母体免疫亢進状態における胎児臓器発生に及ぼす影響

Poly I:C 低用量域での投与実験を行った。すなわち、0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 40 mg/kg BW 投与群における胎児体重および臓器 (脳, 肺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 消化管, 脾臓) 重量を、

18.5 dpc および生後 3 週に計測した。

#### 4 . 研究成果

##### (1) LIF 刺激後の胎児の遺伝子発現変化

###### 胎盤の遺伝子発現解析

JAK2/STAT3、MAP2 経路に関する遺伝子群および SOCS3 の発現については明らかな変動は認められなかった。また、POMC からメラノコルチン分子種の切り出しを行うために必要な Proprotein convertase 1 および 2 についても、LIF 投与 30 分後では、発現の変動は確認されなかった。しかし、Canonical pathway では Allograft Rejection Signaling , Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells , Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target Cells などが影響を受けることが明らかとなった。

###### 胎児大脳の遺伝子発現変化

母体の LIF 刺激によって、胎児大脳インターニューロンの産生・分化誘導に関連する遺伝子群の発現亢進が認められた。それらは、大脳で発現亢進が認められた全遺伝子のうちの上位を占めていた。

##### (2) 母体免疫亢進モデルの解析

母体 IL-6 および LIF、胎児 ACTH および LIF レベルの変動

Poly 1:C 投与 3 時間後における母体血清インターロイキン 6 (IL-6) 濃度をエライザ法にて計測したところ、Poly 1:C 投与量に対して、母体血清 IL-6 濃度は、Poly 1:C 用量依存性に上昇していた。母体血清 LIF 濃度は、Poly 1:C 4 mg/kg BW 投与群 (poly 4) ではコントロール群に比べ有意な上昇を示したが、20 mg/kg BW 投与群 (poly 20) では上昇を示さず、コントロールと同レベルであった。同様に、12.5 dpc および 13.5 dpc における ACTH、LIF、および胎児脳脊髄液 (CSF) の LIF 濃度を計測したところ、12.5 dpc では、ACTH は poly 4 で上昇するが、poly 20 では逆にコントロールよりも減少していた。一方、13.5 dpc では、poly 4 および poly 20 いずれの群でも血清 ACTH 濃度はコントロールよりも減少していた。胎児 CSF 中の LIF 濃度も、胎児血清 ACTH と同様の濃度変化を示した。

母体免疫亢進レベルと胎児大脳皮質発生の関係

胎児大脳皮質の総ニューロン数および分裂細胞数は poly 1:C および母体 IL-6 用量依

存的に減少することが明らかとなった。

胎盤栄養膜における LIF シグナル伝達分子の挙動

胎盤における STAT3 のリン酸化の状況、LIF シグナル下流の JAK2/STAT3 経路を抑制する *Socs3* mRNA の発現量を調べた。その結果、STAT3 のリン酸化は、12.5 dpc では poly 4 および poly 20 いずれの群でも亢進するが、13.5dpc では逆にコントロールよりも低値を示すことが明らかとなった。*Socs 3* は、Poly 1:C 投与量依存性に増加することが明らかとなった。これらの所見より、母体免疫亢進の程度に対応して、母胎間 LIF シグナルリレーが抑制を受けることが明らかとなった。

軽度母体免疫亢進状態における胎児臓器発生に及ぼす影響

母体免疫亢進後の胎児臓器重量の検索では、Poly 1:C 低用量域 (0.1, 0.5 mg/kg BW) において胸腺重量が減少することが明らかとなった。

##### (3) 研究成果の総括

母体免疫亢進と母体 IL-6 レベルは正の相関を示すが、胎盤における POMC の発現、胎児血清 ACTH および LIF レベルは Poly 1:C 低濃度域 (1 mg/kg BW および 4 mg/kg BW) では正の相関を示すが、高濃度域 (20 mg/kg BW) では逆に減少することが明らかとなった。すなわち、過剰な炎症性シグナルが胎盤に入ると、LIF およびその下流のパスウェイに対して抑制がかかることが明らかとなった。これは、poly 1:C 用量依存的に発現が亢進する SOCS3 によって、LIF/gp130 下流の STAT3 リン酸化が抑制を受けることが一因であると考えられた。

また、軽度の母体免疫亢進では、母体由来の炎症性シグナルが胎盤のシグナル調節機構をすり抜け得ることが示された。

本研究で得られた成果のうち、母体免疫亢進による母胎間 LIF シグナル破たんモデルの解析および ACTH による胎児有核赤血球の成熟分化調節機構に関する研究成果は、2 報の論文として国際誌に公表された (Tsukada et al., Plos One 2015, Simamura et al., Plos One, 2015)。

#### 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5件)

1. 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
2. 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
3. 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
4. Inoue T, Hashimoto R, Matsumoto A, Jahan E, Rafiq AM, Udagawa J, Hatta T, Otani H.: In vivo analysis of Arg-Gly-Asp sequence/integrin  $\alpha 5\beta 1$ -mediated signal involvement in embryonic enchondral ossification by exo utero development system. J Bone Miner Res. 2014, 29(7):1554- 63. DOI: 10.1002/jbmr.2166. 査読有
5. Arikawa T, Simamura E, Shimada H, Nakamura T, Hatta T, Shoji H.: Significance of sugar chain recognition by galectins and its involvement in disease-associated glycosylation. (Review) Congenital Anomalies, 2014, 54(2):77-81, DOI:10.1111/cga.12055. 査読有

〔学会発表〕(計25件)

1. 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)
2. 八田稔久: 組織透明化技術, "未来へのバイオ技術"勉強会「ハイコンテントアナリシス(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) .
3. 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)

4. 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) .
5. 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) .
6. 倉本純子, 平野 了, 元矢知志, 八田稔久, 大谷 浩: 軽度から中等度の母胎免疫活性化によって胎児大脳皮質の形成に関わる母胎間シグナルリレ - は亢進する. 第54回日本先天異常学会学術集会(神奈川県相模原市, 麻布大学, '14.07.26~27) .
7. 塚田剛史, 島村英理子, 島田ひろき, 赤井卓也, 飯塚秀明, 八田稔久: 軽度から中等度の母胎免疫活性化によって胎児大脳皮質の形成に関わる母胎間シグナルリレ - は亢進する. 第54回日本先天異常学会学術集会(神奈川県相模原市, 麻布大学, '14.07.26~27) .
8. 有川智博, 島田ひろき, 島村英理子, 大谷 浩, 八田稔久, 東海林博樹: オートファジーによるガレクチン4発現制御を軸とした胎盤形成機構の解明. 第54回日本先天異常学会学術集会(神奈川県相模原市, 麻布大学, '14.07.26~27) .
9. 内芝舞実, 島村英理子, 坂田ひろみ, 島田ひろき, 東伸明, 有川智博, 東海林博樹, 福井義浩, 八田稔久: ラット新生児の定量的人工哺育システムの開発. 第54回日本先天異常学会学術集会(神奈川県相模原市, 麻布大学, '14.07.26~27) .
10. 島田ひろき, 島村英理子, 塚田剛史, 東海林博樹, 東伸明, 八田稔久: 母胎間 LIF - ACTH-LIF シグナルリレ - による insulin-like growth factor を介した神経幹/前駆細胞の増殖作用. 第3

- 回 DOHaD 研究会（東京都世田谷区，国立成育医療研究センター，' 14.07.25 ~ 26）。
11. 塚田剛史，島田ひろき，島村英理子，東 伸明，赤井卓也，飯塚秀明，八田稔久：母胎免疫活性化は大脳皮質形成に働く母胎間 LIF/ACTH/LIF シグナルリレーを抑制する。第 3 回 DOHaD 研究会（東京都世田谷区，国立成育医療研究センター，' 14.07.25 ~ 26）。
  12. 島田ひろき，黒田尚宏，東 伸明，島村英理子，八田稔久：肉眼解剖学・発生学を統合した組織学総合試験パッケージシステムの開発とバーチャルスライド組織学実習におけるその学習効果。日本解剖学会総会（栃木県下野市，自治医科大学，' 14.03.27 ~ 29）。
  13. Tsukada T, Simamura E, Shimada H, Akai T, Iizuka H, Hatta T: Maternal immune activation impairs the maternal-fetal leukemia inhibitory factor signal relay and reduces neural stem/progenitor cell proliferation. Neuroscience 2013 ( San Diego, California USA, ' 13.11.9 ~ 13) .
  14. 塚田剛史，島村英理子，島田ひろき，赤井卓也，飯塚秀明，八田稔久：大脳皮質形成に働く母胎間白血病抑制因子シグナル伝達経路は，母体免疫活性化により変動する。日本脳神経外科学会第 72 回学術集会（神奈川県横浜市，パシフィコ横浜，' 13.10.16 ~ 18）。
  15. 黒田尚宏，島田ひろき，島村英理子，東 伸明，八田稔久：組織画像スライド試験システムの教育効果。第 45 回日本医学教育学会大会（千葉県千葉市，千葉大学，' 13.07.26 ~ 27）。
  16. 八田稔久：中枢神経系の正常発生：脳はひとりで大きくなるか？。第 53 回日本先天異常学会学術集会（大阪府豊中市，千里ライフサイエンスセンター，' 13.07.21 ~ 23）。
  17. 島田ひろき，島村英理子，塚田剛史，八田稔久：35 ゲージ針を用いたラット胎児脳室注入法。第 53 回日本先天異常学会学術集会（大阪府豊中市，千里ライフサイエンスセンター，' 13.07.21 ~ 23）。
  18. 仲島百合子，島村英理子，島田ひろき，有川智博，東海林博樹，増田浩子，大谷 浩，八田稔久：メラノコルチンによるヒト赤芽球の分化調節機構。第 53 回日本先天異常学会学術集会（大阪府豊中市，千里ライフサイエンスセンター，' 13.07.21 ~ 23）。
  19. 金山景錫，八田稔久，島村英理子，島田ひろき，瀬上夏樹：マウス顎関節発生におけるエストロゲン関連受容体の発現について。第 53 回日本先天異常学会学術集会（大阪府豊中市，千里ライフサイエンスセンター，' 13.07.21 ~ 23）。
  20. 黒田尚宏，島田ひろき，八田稔久，東 伸明，島村英理子，堀 有行：組織画像スライド試験システムを利用した復習促進効果。金沢医科大学第 39 回総会・第 49 回学術集会（石川県河北郡内灘町，金沢医科大学，' 13.07.06）。
  21. 吉富泰央，池田崇之，吉竹佳の，八田稔久，加藤伸郎，米倉秀人：神経 - 血管相互作用を介した血管ネットワーク形成における JunB の機能。金沢医科大学医学会 第 39 回総会・第 49 回学術集会（石川県河北郡内灘町，金沢医科大学，' 13.07.06）。
  22. Tsukada T, Simamura E, Shimada H, Akai T, Iizuka H, Hatta T: Concentration of leukemia inhibitory factor in fetal cerebrospinal fluid is altered following maternal immune activation. 第 36 回日本神経科大会（京都市左京区，国立京都国際会館，' 13.06.20 ~ 23）。
  23. 島田ひろき，島村英理子，東海林博樹，有川智博，東 伸明，八田稔久：Leukemia inhibitory factor は insulin-like growth factor を介して Fibroblast growth factor 2 の神経幹/前駆細胞の増殖作用を増強する。第 36 回神経科学大会（京都市左京区，国立京都国際会館，' 13.06.20 ~ 23）。
  24. 金山景錫，八田稔久，山本奈央，瀬上夏樹：顎関節症に女性ホルモンは関与するか - エストロゲンレセプターの免疫組織学的検討。第 67 回日本口腔科学会学術集会（栃木県下都賀郡，栃木県総合文化センター，' 13.05.22 ~ 24）。
  25. 石垣靖人，中村有香，辰野貴則，島田ひろき，八田稔久，桑畑 進，中川秀昭，竹上 勉，友杉直久：細胞内 mRNA-

タンパク質構造の可視化．日本顕微鏡学会 第69回学術講演会(大阪府吹田市，ホテル阪急エキスポパーク，'13.05.20～22)．

〔産業財産権〕

○出願状況(計6件)

1. 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

2. 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

3. 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

種類：特許権

番号：特願 2014-544550

出願年月日：2015年4月20日

国内外の別：外国

4. 名称：赤芽球の脱核方法及び脱核赤血球の維持方法

発明者：八田稔久，島村英理子，島田ひろき，仲島百合子

権利者：学校法人 金沢医科大学

種類：特許権

番号：PCT/JP2014/62205号

出願年月日：2014年5月6日

国内外の別：外国

5. 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

種類：特許権

番号：PCT/JP2013/079388号

出願年月日：2013年10月30日

国内外の別：外国

6. 名称：赤芽球の脱核方法及び脱核赤血球の維持方法

発明者：八田稔久，島村英理子，島田ひろき，仲島百合子

権利者：学校法人 金沢医科大学

種類：特許権

番号：特願 2013-097312号

出願年月日：2013年5月7日

国内外の別：国内

〔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)研究分担者

島田 ひろき (SHIMADA, Hiroki)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：60278108

東海林 博樹 (SHOJI, Hiroki)

金沢医科大学・一般教育機構・准教授

研究者番号：10263873