

令和元年8月30日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05364

研究課題名(和文)母胎間シグナル伝達による胎児大脳皮質インターニューロンの産生誘導機構

研究課題名(英文) Mechanism of induction of inter neuron production in fetal cerebral cortex by 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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：母体由来の白血病抑制因子(LIF)が、胎盤を介して胎児大脳のインターニューロン産生に関与するという仮説をたて、その検証を行った。母体へのLIF投与および胎児大脳由来のneurosphereを用いた解析から、LIFに反応して発現亢進する上位20遺伝子の約半数が、インターニューロンの産生・分化誘導に関わる遺伝子であることが判明した。これらの結果から、母胎間LIFシグナルリレーは、胎児大脳におけるインターニューロンの産生および分化誘導に深く関与することが示唆された。また、自閉症様脳の網羅的組織解析に最適化した切片作製法ならびにハイスループット画像取得システムのプロトタイプを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、インターニューロンを誘導する上流の遺伝子群の発現が、母胎間LIFシグナルリレーにより調節されている可能性が示唆された。この成果は、生後個体でのインターニューロン新生誘導技術およびiPS等の培養幹細胞からのインターニューロン産生誘導技術の開発に直結する基礎的成果であり、今後の臨床応用を視野に入れた技術的発展が期待される。また、本研究により、ヒト脳も対象とし得る、脳全域にわたる網羅的組織データ取得のための統合的解析システムの基礎を確立することが出来た。このシステムは、ヒト全脳組織情報を収集するためのツールとして発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that maternally derived leukemia inhibitory factor (LIF) is involved in production of interneurons in the fetal cerebrum via the placenta and tested this hypothesis. Analysis using maternal administration of LIF and neurosphere derived from the fetal cerebrum revealed that about half of the top 20 genes with increased expression in response to LIF were those involved in induction of interneuron production and differentiation. These results suggest that maternal-fetal LIF signal relay is involved in the production and differentiation of interneurons in the fetal cerebrum. In addition, we have established a prototype of a specific slice preparation method and a high-throughput image acquisition system optimized for comprehensive tissue analysis of autistic brains.

研究分野：発生学

キーワード：母胎間シグナル 白血病抑制因子 インターロイキン6 gp130 インターニューロン 大脳皮質

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

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 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。近年、罹患患者数の増加が社会的問題となっている自閉症の発症要因として、遺伝的要因と環境要因がともに約 50%と同程度であることが報告され、改めて母体環境要因の重要性が再認識された (Sandin et al., JAMA 2014)。自閉症と関係が深い環境要因として、母体のインフルエンザウイルス感染があげられる (Brown et al., Developmental Neurobiology 2012)。また、自閉症者の脳の組織学的特徴として、大脳皮質インターニューロンの減少が知られている (Fatemi et al., Psychiatry 2002)。母体のインフルエンザ感染と、児の自閉症様行動および大脳皮質インターニューロンの発生障害の関係は、動物実験でも確認されており (Smith et al., J Neurosci 2007)。母体免疫亢進に伴う母体由来 IL-6 および IL-17a (Grolia et al., Science 2016) による胎児脳傷害が有力なモデルとして提唱された。しかし IL-6/17a モデルのみでは説明しきれない問題が数多く残されており、これらを解決する糸口として、生理的な大脳皮質インターニューロンの産生誘導機構を解明することが急務である。

2. 研究の目的

胎盤は、母と胎児のインタラクションの場における "maternal-fetal interface" として、免疫学的視点からも、妊娠の成立・維持に重要な役割を担っていることが知られている (Yagel, Am J Obstet Gynecol 2009; Paiva et al, Cytokine Growth Factor Rev 2009)。我々は、母体由来の白血球抑制因子 (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)。母胎間 LIF シグナルリレーでは、母体由来の LIF により胎盤栄養膜から ACTH の分泌が誘導される。この ACTH が胎児赤血球を刺激することで、再び LIF が分泌され、胎児の大脳における神経細胞の産生が亢進する。さらに、母体炎症にともなう LIF レベルの上昇に対して、抑制系 SOCS3 によって JAK2/STAT3 のリン酸化が調節され、胎盤栄養膜からの ACTH 分泌の適正化と胎児 LIF レベルの恒常性が保たれる。しかし、高度の母体免疫亢進状態では、母体で大量に誘導される IL-6 のシグナルに対して、SOCS3 による過剰な抑制系が発動される。その結果、生理的な LIF/JAK2/STAT3 経路が遮断され、胎児の脳は LIF シグナル枯渇状態となり、大脳皮質の産生が障害を受けるというモデルを提唱した。本研究課題では、これまでの研究成果をもとに、母胎間 LIF シグナルリレーを基盤とする胎児大脳におけるインターニューロン産生機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 妊娠 13.5 日のマウス母体へ LIF を投与した後、胎児大脳における遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより解析した。変動が認められた遺伝子については、定量的 RT-PCR を用いて詳細な発現解析を行った。また、妊娠 13 日の C57/BL6 マウス胎児大脳由来の神経幹細胞から作成した neurosphere を用いて LIF の作用を解析した。

(2) 胎児および新生児大脳におけるインターニューロンの総数を推定するため、3D ダイレクトカウンティング法に最適な組織プレパレーション法について検討を行った。神経細胞数の正確な計測を行うためには 50 μm 以上の厚い切片が好ましい。しかし、常法では浮遊切片としてしか扱うことが出来ないため、大量の組織切片を処理することは困難であった。さらに、組織の変形・破壊が不可避であり、脳全体の連続切片を安定して得るためには高度の技術が要求される。これらの問題点をクリアするために、新しい組織切片用包埋材の開発を行った。具体的には、アクリルアミド樹脂、アルギン酸ナトリウム、および低分子ゼラチンをベースとする包埋材を検討した。

(3) 網羅的組織定量解析システムによる胎児大脳におけるインターニューロン総数の計測を目的として、Cell Voyager7000 (横河電機) をベースとするハイスループット組織解析システムの構築を行った。

(4) 母胎間 LIF シグナルリレーの恒常的な断絶モデルを確立するために、中間分子である副腎皮質刺激ホルモンの受容体であるメラノコルチン 5 および 2 受容体ノックアウトマウスの系統確立と胎児脳の産生に及ぼす影響について検討を行った。

4. 研究成果

(1) DNA マイクロアレイ解析の結果、母体への LIF 投与に反応してマウス胎児大脳にて発現亢進した神経関連遺伝子のうち、上位 20 遺伝子の約半数が、インターニューロンの産生・分化誘導関連の遺伝子であった。インターニューロンの分化誘導に関連する遺伝子については、*in vitro* および *in vivo* 実験系にて、定量的 PCR で再確認した。その結果、腹側大脳由来 neurosphere において、培養液への LIF の添加により抑制性ニューロン産生誘導に重要な転写因子 *Sox2*、*Shh* および *Nkx2.1* の発現亢進が確認された。培養系で認められたこれらの遺伝子群の反応を生体でも確認する目的で、妊娠 13.5 日齢 C57BL/6J マウス母鼠に LIF (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BW) を投与し、胎児腹側大脳における遺伝子発現を、定量的 RT-PCR にて解析した。その結果、母体への LIF 投与により、胎児背側大脳において *Sox2* および *Nkx2.1* の有意な発現亢進が確認された。*Nkx2.1* はガイドランス因子受容体である *Neuropilin-2* の発現量を調節することで、インターニューロンの

移動に關与することが知られる。さらに、抑制性シナプス形成に關与する *Slitrk3* の発現亢進も認められた。これらの結果から、母胎間 LIF シグナルリレーは、胎児大脳における抑制性ニューロンの産生および分化誘導に深く關与することが示唆された。Sox2、Shh および Nkx2.1 は、インターニューロン関連遺伝子の発現を誘導することが報告されているが、それ自体の発現を調節するメカニズムに關しては不明であった。本年度の研究によって、インターニューロンを誘導する上流の遺伝子群の発現が、母胎間 LIF シグナルリレーにより調節されている可能性が示唆された。上記成果は、個体でのインターニューロン新生誘導および iPS 等の幹細胞からのインターニューロン産生誘導技術の開発に直結する基礎的成果であり、今後の応用・発展が期待される。

(2) アクリルアミド樹脂およびアルギニン酸ナトリウムを主材料とした包埋法では、凍結マイクロトームおよびマイクロスライサーによる組織切片的作成が可能であった。しかし、各種コーティング剤処理を施しても、スライドガラスへの貼付が困難であり、ハイスルーブット解析で要求される大量の切片を扱うには不適當であった。また、免疫染色では、抗体の浸透が表層数 μm 程度までにとどまるため、免疫染色のための最適化が必要であることがわかった。一方、低分子ゼラチンを主材料とする包埋材では、凍結マイクロトームを用いることで $100\ \mu\text{m}$ までの切片を容易かつ安定して作成することが出来た。また、 $50\ \mu\text{m}$ 程度の切片であれば、 $100\ \mu\text{m}$ での抗原賦活化処理を施してもスライドガラスから外れることなく、以降の免疫染色が可能であった。この新規包埋材と凍結マイクロトームを組み合わせることで、容易に全脳の連続厚切り切片を作成し、スライドガラスベースで一括・大量処理することが可能となった。また、市販の各種水溶性封入剤では切片の透明度が十分に得られないため、独自に高屈折率の水溶性封入剤を開発した。その結果、非常に微細な組織構築までが見事に保たれ、深部観察が可能な連続組織切片的の作成法を確立することができた。核染色は常法どおり適用できることも確認された。

(3) 全脳におけるインターニューロンの網羅的画像解析については、CV7000 をベースとするハイスルーブット画像取得システムの構築とそれに最適化した脳透明化プロトコル (RAP-IH および CLAP) がおおむね完成した。RAP-IH 処理により、インターニューロンのマーカーであるバルブアルブミン等の免疫染色において、深部における染色性が向上することを確認した。本研究により、ヒト脳も視野に入れた、脳全域にわたる網羅的組織データ取得のためのシステムの基礎を確立することが出来た。全脳解析のハイスルーブット化のために用いる新たな組織透明化プロトコル CLAP については、特許申請準備中である。

(4) MC5R ノックアウトマウスのコロニーを確立することができた。しかしながら、純形態学的な解析では、MC5R ホモ欠損個体に脳組織に明らかな異常を見出すことはできなかった。他の MC 受容体が機能しているため、これらによる redundancy などが原因と予想される。MC2R ノックアウトマウスについては、ホモ個体では胎生致死であるため、胎児脳の解析を行うことができなかった。今後は、胎児が死亡する前の時期に大脳を摘出し、neurosphere を用いて *in vitro* での解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9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/10.1111/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

Yoshihara T, Satake H, Nishie T, Okino N, Hatta T, Otani H, Naruse C, Suzuki H, Sugihara K, Kamimura E, Tokuda N, Furukawa K, Furukawa K, Ito M, Asano M.: Lactosylceramide synthases encoded by *B4gal t5* and *6* genes are pivotal for neuronal generation and myelin formation in mice *PLoS Genetics* <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007545> Published: August 16, 2018 査読有

Bold J, Sakata-Haga H, Fukui Y.: Spinal nerve defects in mouse embryos prenatally exposed to valproic acid. *anatomical science international*. 93: 35-41 10.1007/s12565-016-0363-9. 2018 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* 10.1111/cga.12257 2017 査読有

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 10.1242/jcs.196303 2017 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. 医学生顕微鏡技術雑誌 29: 54-56, 2016, 査読有

[学会発表](計26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 H: 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

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 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

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 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 Myanmar-Japan international Symposim 2016

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 2016

②1坂田ひろみ、Bold luramt、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 2016

②2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

②3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，2016

②4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 2016

②5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 2016

②6八田稔久：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」，2016

〔その他〕

ホームページ等

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

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：東海林 博樹

ローマ字氏名：(SHOJI, hiroki)

所属研究機関名：金沢医科大学

部局名：一般教育機構

職名：教授

研究者番号 (8 桁) : 10263873

研究分担者氏名：坂田 ひろみ

ローマ字氏名：(SAKATA-HAGA, hiromi)

所属研究機関名：金沢医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁) : 50294666

研究分担者氏名：島田 ひろき
ローマ字氏名：(SHIMADA, hiroki)
所属研究機関名：金沢医科大学
部局名：看護学部
職名：准教授
研究者番号(8桁)：60278108

研究分担者氏名：有川 智博
ローマ字氏名：(ARIKAWA, tomohiro)
所属研究機関名：金沢医科大学
部局名：一般教育機構
職名：准教授
研究者番号(8桁)：70452670

研究分担者氏名：塚田 剛史
ローマ字氏名：(TSUKADA, tsuyoshi)
所属研究機関名：金沢医科大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号(8桁)：90647108

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。