

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07828

研究課題名（和文）胎盤BDNF/TrkBシグナルを介した胎児脳発達のモニタリング機構

研究課題名（英文）Monitoring mechanism of fetal brain development via placental BDNF/TrkB signals

研究代表者

後藤 優美子 (Goto, Yumiko)

東海大学・医学部・客員講師

研究者番号：50624574

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：妊娠初期に、胎盤の絨毛・脱着膜で完全長型TrkBタンパクおよびmRNAの発現が多いことが確認された。また、胎児発育不全の症例においては、妊娠中期の重症SGA（small for gestational age, <-2.0SD）の胎盤にTrkBの全てのエクソンのmRNA発現が認められた。さらに、胎児発育にかかわらず、妊娠32週以降TrkBのmRNA発現が減少する傾向がみられたが、多くの症例においてIG-likeドメイン（BDNF（脳由来神経栄養因子）結合領域）は発現していた。TrkBのリガンドであるBDNFは、胎盤において重症SGA群では軽症SGA群に比較して有意に高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、妊娠初期の胎盤において、胎児側、母体側で完全長型TrkB発現が多く、妊娠週数が進むにつれてTrkB発現が低下する傾向がみられるが、胎児発育や妊娠週数に関わらずTrkBのBDNF結合領域の発現が多く認められることが明らかになった点である。胎盤でのBDNF/TrkBシグナルを介した母児間クロストークにより胎児脳の発育を維持する機構のさらなる解明は今後の課題である。また、胎児発育不全は出生後の児の発育にも関わる重大な健康、社会的問題であるが、本研究の成果はBDNF/TrkBシグナルに着目した胎児発育不全、なかでも胎児脳発達のモニタリングの可能性を示した点で社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：In early pregnancy, the expression of full-length TrkB protein and mRNA was confirmed to be high in the villi and decidual membranes of the placenta. In addition, in cases of fetal growth restriction, mRNA expression of all exons of TrkB was observed in the placenta of severe SGA (small for gestational age, <-2.0SD) in the second trimester of pregnancy. In addition, regardless of fetal development, there was a tendency for TrkB mRNA expression to decrease after 32 weeks of gestation, but the IG-like domain (BDNF (brain-derived neurotrophic factor) binding site) was expressed in many cases. BDNF, a ligand for TrkB, was significantly higher in the placenta in the severe SGA group than in the mild SGA group.

研究分野：産婦人科学

キーワード：チロシンキナーゼ受容体TrkB 胎盤 母児間クロストーク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胎児発育不全 (FGR: fetal growth restriction) は全妊娠の 5-10% に生じる妊娠合併症であり、周産期死亡や出生後の発育にも関わるため病態の解明と治療法の確立は重要な課題である。我々がこれまで研究対象としている神経栄養因子受容体 (TrkB: tropomyosin-related kinase B) は、チロシンキナーゼ受容体であり、神経組織において細胞の生存、分化、増殖に関与することが明らかにされている (Klein 1990)。TrkB にリガンドである脳由来神経栄養因子 (BDNF: brain derived neurotrophic factor) が結合すると、BDNF の自己分泌が増加すること、細胞表面の TrkB が増加することが明らかにされている (Chen 2011 等)。TrkB は Trk ファミリーの一つであり、TrkB をコードする *NTRK2* 遺伝子は 590bp で、24 エクソンを含み、TrkB は細胞内にチロシンキナーゼ (TK) 部位を持つ完全長型 TrkB-TK と、TK 部位を持たない TrkB-Shc、TrkB-T1 の主に 3 つのアイソフォームが知られている (Stoilov 2002) (図 1)。

一方、神経組織以外でも、婦人科領域では卵胞発育や受精卵発育に関与することや (Kawamura 2005)、子宮内膜、胎盤での TrkB 発現が報告されている (Fujita 2011 等)。

我々は、「神経組織の生存、分化、増殖に関わる TrkB はなぜ胎盤に存在し、胎盤では BDNF/TrkB シグナルはどのような働きをしているのか」という点に着目した。FGR の胎盤では TrkB 発現が増加すること (Mayeur 2010) や、FGR の妊娠中期の羊水中で BDNF が増加することが報告されている (Antonakopoulos 2018)。一方、FGR でもその約 70% は胎児脳の発育は保たれ、いわゆる非対称性 FGR と称される。そこで、「FGR において胎児脳の発育を維持する機構に胎盤の BDNF/TrkB シグナルが重要な働きを担っている可能性」および「胎盤で母児間の血液・栄養素・酸素の交換が行われる絨毛間腔において BDNF/TrkB シグナルを介した母児間のクロストークが行われている可能性」を考えた。胎盤における母児間のクロストークに関しては様々な分子について研究がされているが (Tenorio 2019 等)、胎盤 BDNF/TrkB シグナルを介した母児間のクロストーク機構はまだ明らかではない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「胎盤における BDNF/TrkB シグナルを介した母児間のクロストーク、すなわち胎盤の BDNF/TrkB シグナルを介した胎児脳の発達レベルのモニタリング機構について明らかにすること」である。その目的を達するため、具体的には胎盤の胎児側、母体側で発現する TrkB アイソフォームを同定し、胎盤の絨毛管腔での BDNF/TrkB シグナル伝達の実態を解明するほか、アイソフォーム特異的な TrkB モノクローナル抗体作製を行なう。

3. 研究の方法

(1) 胎盤における TrkB の局在に関する研究

インフォームドコンセントを得た胎盤 (東海大学医学部附属病院、四国こどもとおとなの医療センター) は、妊娠初期、中期、満期に手術または経膈分娩時に採取した。胎盤は RNA レーターおよびホルマリンにて保存した。検討した 15 症例の内訳は、8 週 1 例、9 週 1 例、28 週 2 例、32 週 2 例、36 週 1 例、37 週 3 例、38 週 2 例、39 週 2 例であった。妊娠初期 2 例を除いた 13 例のうち、FGR は 4 例 (28 週 2 例、32 週 1 例、36 週 1 例) に認めた。

免疫組織化学染色した検体について、細胞内の TK 部位を認識する抗体 (ab18987, abcam) とすべてのアイソフォームに共通する細胞外の部位を認識する抗体 (sc377218, SantaCruz) を用いた。

胎盤組織から胎児側と母体側についてそれぞれ RNA、タンパク質を抽出し、リアルタイム PCR、ウェスタンブロッティングにより TrkB の発現量と TrkB アイソフォームの種類を解析した。

(2) 胎盤に発現する TrkB アイソフォームの構造および BDNF 発現に関する研究

FGR 症例の胎盤において、発現する TrkB mRNA の分子構造を明らかにするため、先行研究で既に設計した TrkB の主要なエクソンを認識するプライマーを用いて RT-PCR を行なった。検討した 33 例の内訳は、妊娠中期 2 例 (24 週、27 週)、後期 12 例 (29 週から 36 週)、満期 (37 週

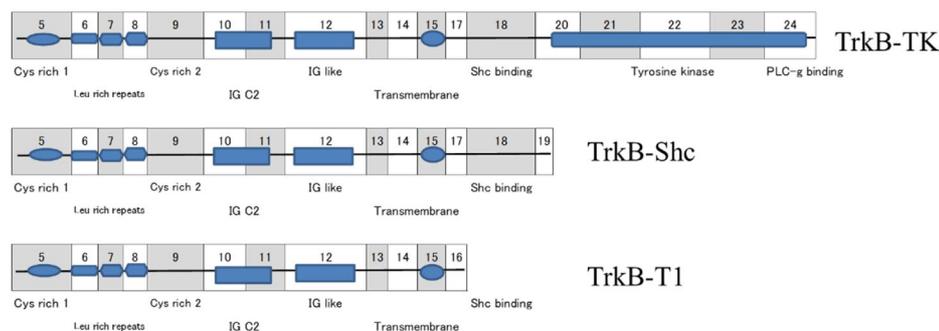


図1 TrkBアイソフォーム

以降)であった。FGRは15例に認め、重症SGA (small for gestational age) 群9例と軽症SGA群は6例に分類した。

FGR症例の胎盤におけるBDNF発現を確認するため、同様に既に設計したBDNFを認識するプライマーを用いてRT-PCRを行なった。

正常およびFGR妊娠例でBDNFとTrkB発現の相違を解析した。

(3) アイソフォーム特異的なTrkBモノクローナル抗体に関する研究

TrkBアイソフォームの構造の違いを識別するために、現在市販品のないアイソフォーム特異的モノクローナル抗体を作製する。特に細胞外ドメインでもBDNF結合領域に当たるエピトープを認識するクローンが必要とされる。BALB/c系統のマウスリンパ腫の細胞株A20およびヒト胎児腎細胞由来の細胞株HEK293にTrkBのプラスミドDNA (0Hu24187D, GenScript)を導入し、BALB/cマウスに免疫した。同じプラスミドを導入したHEK293を用いて抗体価の上昇を確認し、免疫マウス脾臓細胞とミエローマ細胞P3Xの融合によりハイブリドーマを形成した。これらを抗TrkB細胞外ドメイン抗体で染色し、一次スクリーニングを行ったのち、BDNFエピトープに相当するペプチドで二次スクリーニングを行なった。

4. 研究成果

(1) 胎盤におけるTrkBの局在に関する研究

妊娠初期に、胎盤の絨毛(胎児側)・脱落膜(母体側)で完全長型TrkBタンパクの発現が多いことが免疫組織化学(図2)により確認された。検討した15症例のうち、妊娠初期の胎盤は2例(8週、9週)であった。

ウェスタンブロッティングにおいても、妊娠初期について同様の結果が得られた。リアルタイムPCRでは、妊娠初期(8週、9週)で胎児側、母体側ともにTrkB mRNA発現量が多く、妊娠32週から37週にかけてTrkB mRNA発現量が減少する傾向が見られた。TrkBドメイン別の発現については、細胞内チロシンキナーゼドメインであるExon22-23(図1)は、胎児側、母体側ともに妊娠初期に多く検出され、その後の妊娠週数では発現量は低下し、再度妊娠38週から39週に発現量が増加した。妊娠後期の発現量は妊娠初期より少なく、母体側では胎児側より少ない発現量であった。

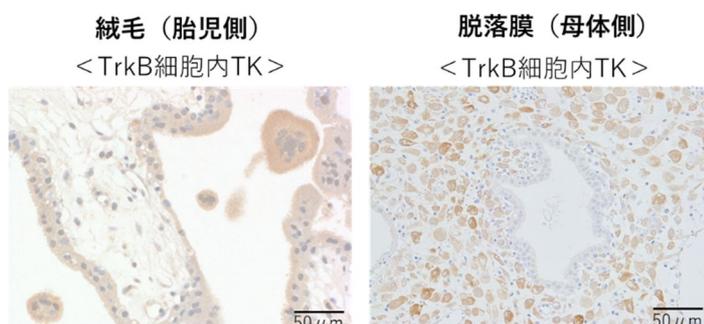


図2 免疫組織化学染色

(2) 胎盤に発現するTrkBアイソフォームの構造およびBDNF発現に関する研究

妊娠週数が早い24週のSGA (<-2.0SD)の胎盤において、TrkBのすべてのmRNA発現が認められた。TrkBの発現は週数が進むにつれて発現が低下する傾向がみられた。また、胎児発育に関わらず多くの症例(29例/33例)においてIG-likeドメイン(BDNF結合領域、図1)は発現していた。また、既知の主要なTrkBアイソフォーム(完全長型、Shc、T1)の他に、さらに異なるアイソフォームが存在する可能性が示唆された。

TrkBのリガンドであるBDNFについては重症SGA群においては軽症SGA群と比較して有意に発現上昇を認めた。

TrkBのアイソフォームや発現量については正常発育およびFGRで大きな相違は認めなかった。BDNFについてはFGRで正常発育例と比較して発現量が低い傾向があるものの有意差はなかった。

(3) アイソフォーム特異的なTrkBモノクローナル抗体に関する研究

3つの有力なクローンを得た(図3)。現在限界希釈法を用いて引き続きBDNF結合領域を認識するモノクローナル抗体の作製を目指している。

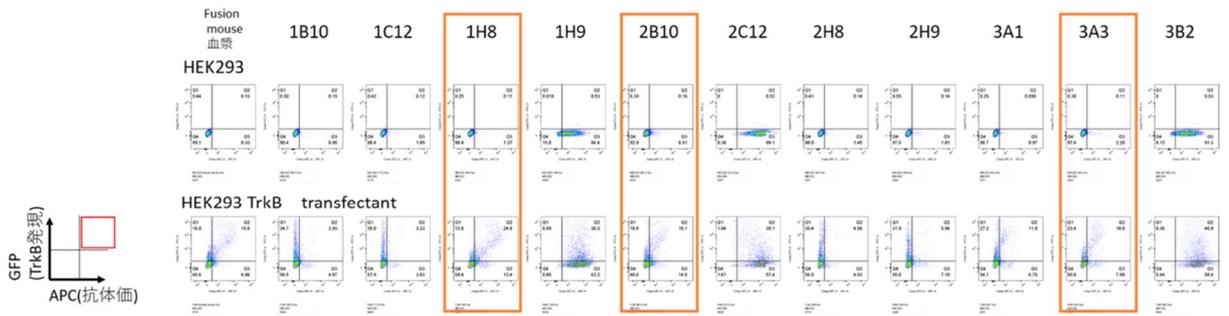


図3 TrkB特異的ハイブリドーマの作製

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Toshiro Seki, Rikio Suzuki, Shino Ohshima, Yoshiyuki Manabe, Shion Onoue, Yuki Hoshino, Atsushi Yasuda, Ryoji Ito, Hiroshi Kawada, Hitoshi Ishimoto, Takashi Shiina, Yoshie Kametani	4. 巻 -
2. 論文標題 Liposome-encapsulated progesterone efficiently suppresses B-lineage cell proliferation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2024.101710	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Toshiro Seki, Shino Ohshima, Satoko Komatsu, Soga Yamada, Hirofumi Kashiwagi, Yumiko Goto, Banri Tsuda, Akiko Kanno, Atsushi Yasuda, Hitoshi Kuno, Noriko M Tsuji, Takashi Shiina, Yoshie Kametani	4. 巻 -
2. 論文標題 Coccomyxa subellipsoidea KJ components enhance the expression of metallothioneins and Th17 cytokines during human T cell activation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microorganisms in press	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms12040741	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshie Kametani, Ryoji Ito, Shino Ohshima, Yoshiyuki Manabe, Yusuke Ohno, Tomoka Shimizu, Soga Yamada, Banri Tsuda, Hirofumi Kashiwagi, Yumiko Goto, Mikio Mikami, Kiyoshi Ando, Hitoshi Ishimoto, Takashi Shiina et al	4. 巻 14
2. 論文標題 Construction of the Systemic anticancer Immune Environment in Tumor-Bearing Humanized Mouse by Using Liposome-Encapsulated Anti-Programmed Death Ligand 1 Antibody-Conjugated Progesterone	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1173728
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2023.1173728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 亀谷美恵	4. 巻 30
2. 論文標題 妊娠維持機能とプロゲステロン	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hormone Frontier	6. 最初と最後の頁 59-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34449/J0015.30.03_0059-0063	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hirofumi Kashiwagi, Toshiro Seki, Shino Oshima, Yusuke Ohno, Tomoka Shimizu, Soga Yamada, Nagi Katano, Yumiko Goto, Atsushi Yasuda, Banri Tsuda, Ryoji Ito, Shun-Ichiro Izumi, Hitoshi Ishimoto, Takashi Shiina, Yoshie Kametani	4. 巻 13
2. 論文標題 High-progesterone environment preserves T cell competency by evading glucocorticoid effects on immune regulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.1000728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 近藤朱音、亀谷美恵、灰田祐子、木南理仁、林亜紀、立花綾香、森根幹生、檜尾健二、前田和寿	4. 巻 9
2. 論文標題 Small For Gestational age (SGA) の胎盤におけるTrkBアイソフォームの発現の検討 Analysis of TrkB isoform expression in placenta of Small For Gestational age (SGA)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 国立病院機構四国こどもととなの医療センター医学雑誌	6. 最初と最後の頁 9-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yumiko Goto, Yoshie Kametani, Aurelie Auguste, Thuraya Almamari, Audrey LeFormal, Shun-ichiro Izumi, Catherine Genestie, Hitoshi Ishimoto, Mikio Mikami, Alexandra Leary	4. 巻 42
2. 論文標題 Tropomyosin-related kinase B (TrkB) full-length isoform is related to advanced-stage clear cell ovarian cancer (CCOC)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Gynaecological Oncology	6. 最初と最後の頁 899-908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31083/j.ejgo4205137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yoshie Kametani, Ryoji Ito, Shino Ohshima, Yoshiyuki Manabe, Yusuke Ohno, Keita Ito, Banri Tsuda, Hirofuji Kashiwagi, Yumiko Goto, Atsushi Yasuda, Toshiro Seki, Koichi Fukase, Mikio Mikami, Kiyoshi Ando, Hitoshi Ishimoto, Takashi Shiina
2. 発表標題 Construction of Anticancer Immune Environment by Liposome-encapsulated Progesterone conjugated with anti-PD-L1 antibody
3. 学会等名 The 82nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名	Yoshie Kametani, Ryoji Ito, Shino Ohshima, Yoshiyuki Manabe, Yusuke Ohno, Soga Yamada, Keita Ito, Takuya Matsumoto, Koichi Fukase, Banri Tsuda, Hirofumi Kashiwagi, Yumiko Goto, Atsushi Yasuda, Masatoshi Maeki, Manabu Tokeshi, Toshiro Seki, Mikio Mikami, Kiyoshi Ando, Hitoshi Ishimoto, Takashi Shiina
2. 発表標題	Construction of Anticancer Immune Environment by Liposome-encapsulated Progesterone conjugated with anti-PD-L1 antibody
3. 学会等名	The 27th Annual Meeting of Japanese Association of Cancer Immunology (国際学会)
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	Yoshie Kametani
2. 発表標題	High-progesterone environment preserves naive T cell competency by evading glucocorticoid effects on immune regulation
3. 学会等名	The 6th International Workshop on Humanized Mice (IWHM6) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	大島志乃、山田壮我、清水智香、大野裕介、柏木寛史、後藤優美子、關敏郎、亀谷美恵
2. 発表標題	プロゲステロンとコルチゾルがヒト化マウス抗体産生機能に与える効果の解析
3. 学会等名	第36回下垂体研究会学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	山田壮我、清水智香、大島志乃、大野裕介、柏木寛史、安田敦、關敏郎、和泉俊一郎、伊藤亮治、亀谷美恵
2. 発表標題	妊娠ホルモンによるヒト化マウス免疫系の調節機能解析
3. 学会等名	第36回下垂体研究会学術集会
4. 発表年	2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 担がん - 免疫不全非ヒト動物、これを用いた供試物質に関するがん免疫応答評価方法	発明者 亀谷美恵、他	権利者 学校法人東海大学、公益財団法人実験動物中央
産業財産権の種類、番号 特許、2022-123595	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 T細胞の分化調節剤及び組成物	発明者 亀谷美恵、他	権利者 学校法人東海大学、株式会社デンソー
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/041870	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 T細胞及び / 又はB細胞の活性調節剤を含む併用剤	発明者 亀谷美恵、他	権利者 学校法人東海大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/029854	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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
研究分担者	石本 人士 (Ishimoto Hitoshi) (10212937)	東海大学・医学部・教授 (32644)	
研究分担者	亀谷 美恵 (Kametani Yoshie) (50338787)	東海大学・医学部・客員准教授 (32644)	

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
---------	---------