

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590245

研究課題名(和文)母胎間シグナル伝達による胎児大脳新皮質の好氣的誘導

研究課題名(英文)Maternal-fetal leukemia inhibitory factor signal relay induces aerobic growth and proliferation of fetal cerebral cortex

研究代表者

島田 ひろき (SHIMADA, Hiroki)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：60278108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：母親白血病抑制因子(LIF) - 胎盤副腎皮質刺激ホルモン(ACTH) - 胎児LIFシグナルパスウェイが胎児大脳皮質形成を促進する機構について、以下のことを明らかにした。

1. シグナルパスウェイによって誘導されたLIFが大脳皮質内のインスリン様増殖因子(IGF1およびIGF2)を誘導し、これらが線維芽細胞増殖因子2と協調して神経幹細胞の増殖を相乗的に亢進させる。2. シグナルパスウェイ発動期にACTHによる胎児赤血球の脱核誘導が促進され、胎児脳室内の酸素濃度を上昇させる。以上の結果より、LIFシグナルパスウェイは胎児脳発達において神経幹細胞増殖と酸素供給増加を協調させる機構であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that maternal leukemia inhibitory factor (LIF) induces adrenocorticotrophic hormone (ACTH) secretion from the placenta, ACTH stimulates the secretion of fetal LIF from nucleated erythrocytes, and the fetal LIF induces the proliferation of neural stem/progenitor cells (NSC) in the cerebral cortex. In this study, we revealed the downstream network of this maternal-fetal LIF signaling pathway in the fetal cerebrum. The main results are summarized as follows.

1. The secreted fetal LIF induces the secretion of insulin-like growth factors (IGF1 and IGF2), and these IGFs synergistically enhance the action of fibroblast growth factor 2 (FGF2) in NSC proliferation. 2. The placental ACTH promotes the differentiation and enucleation of fetal erythroblasts, and the increased mature erythrocytes elevate the oxygen level in the fetal cerebrum. These results indicate that the LIF pathway enhances fetal brain growth by coordinating NSC proliferation and oxygen supply.

研究分野：発生学

キーワード：発生・分化 脳・神経 胎盤 神経科学 細胞・組織 シグナル伝達 増殖因子

1. 研究開始当初の背景

我々は、母親由来の白血球抑制因子 (LIF) が、胎盤から副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) を分泌誘導し、この ACTH が胎児の有核赤血球から再び LIF を分泌誘導するシステムを見出した。ここでは母体側の LIF 分子の移動を伴わずにシグナルだけが胎児に伝達されることから、胎盤を介した母胎間を結ぶシグナルリレーと位置づけた。また胎児 LIF が大脳の神経幹細胞の増殖を促進することを明らかにした。これまでの *in vitro* での研究では、LIF は発生段階早期では増殖因子として働くが、大脳皮質が形成される中期以降は分化因子として働き、神経幹細胞の増殖には線維芽細胞増殖因子 2 (FGF-2) が関与していると報告されてきた。しかし、*in vivo* の研究では中期以降も増殖作用をもつことが報告されており、*in vitro* 研究との乖離が見られる。一方で我々は、LIF サージに引き続いて脳内でインシュリン様増殖因子 (IGF-1 および IGF-2) の発現と分泌が増加すること、ACTH が有核赤血球の脱核を促進することを予備研究の中で見出した。IGF は増殖だけでなく糖代謝や酸化還元関連因子の発現調節にも関わること、赤血球の成熟による酸素供給の増加が予想されることから、LIF シグナルリレーが酸素要求性の高い胎児大脳新皮質の発達に関与していることが想起された。

2. 研究の目的

当該研究課題では、LIF-ACTH-LIF シグナルリレー下流で IGF が FGF2 と協調して大脳神経幹あるいは前駆細胞の増殖を相乗的に亢進させること、およびシグナルリレーが大脳新皮質発達時に好気的環境を提供するという作業仮説を証明する。

3. 研究の方法

Wistar Hannover ラット (Slc) を用い、以下の実験を行った。

(1) 胎仔脳発達に関与する LIF シグナルリレー下流の分子機構の解析 (*in vivo* 解析): 母体 (胎齢 15.5 日) に LIF を投与後、胎仔大脳背側皮質より全 RNA を調製し、マイクロアレイによって変動する遺伝子群を網羅的に解析した。変動が確認された遺伝子のうち、神経発生に関与すると考えられる候補遺伝子を選別し、発現をリアルタイム PCR で確認した。また、胎児脳脊髄液中における遺伝子産物の濃度について ELISA を用いて計測した。In utero 法により LIF を胎仔脳室へのマイクロインジェクションし、候補遺伝子の変動を確認した。母体にウイルス免疫応答を引起す polyriboinosinicpolyribocytidylic acid (p(I:C)) を投与して LIF シグナルリレー経路を変動させて胎仔脳発達に影響が出るかを検討した。

(2) LIF の胎仔神経幹/前駆細胞に対する作用 (*in vitro* 解析): LIF の下流遺伝子の発現変動について胎仔大脳皮質神経幹/神経前駆細胞より調製した neurosphere を用いて確認した。

(3) LIF シグナルによる胎仔脳内酸素濃度変動の解析 (*in vivo* 解析): 母体への LIF 刺激後の胎仔脳室内酸素濃度をニードル式マイクロ酸素濃度計をもちいて測定した。

4. 研究成果

母体 LIF 刺激後の胎仔大脳背側皮質における遺伝子発現の網羅的解析により 25 種類の候補遺伝子が得られた。FGF-2 には変化がみられなかった。候補遺伝子のうち特に IGF-1 および IGF-2 (IGF-1/2) に注目して検討をおこなった。正常ラット胎仔脳脊髄液中の IGF-1/2 のピークはともに LIF のピークの 1 日後の胎齢 16.5 日に出現した。胎仔脳室内へ LIF を注入すると、胎仔脳室内の IGF-1 および IGF-2 蛋白濃度がともに上昇した。また、背側皮質において *Igf1* および *Igf2* mRNA の発現が亢進した。この時期の胎仔大脳背側皮質での IGF-1/2 受容体 (IGF1R) の局在を免疫染色により確認し、LIF 刺激による subventricular zone での細胞増殖亢進を Edu 法を用いて組織学的に確認した。

母体に p(I:C) を投与 (20 mg/kg) すると、免疫応答により母体血清中および胎盤で、LIF と同じファミリー分子である IL-6 が上昇した。このとき胎盤での ACTH 誘導に抑制がかかり、胎仔での LIF 産生が減少した。また、最終的に大脳皮質の形成が増殖濃度および細胞数とも抑制された。

神経幹/前駆細胞より成る neurosphere に LIF を投与すると IGF-1/2 が誘導された。また、FGF-2 の神経幹/前駆細胞の細胞分裂誘導作用は、LIF 存在下のほうが非存在下よりも有意に高く、IGF1R 阻害剤存在下では LIF の増強作用が消失した。

これらの結果から、母胎間 LIF シグナルは IGF-1/2 を介して胎児大脳皮質形成を相乗的に促進しており、この経路が感染等で抑制されると胎児脳の発達に影響を与えることが明らかとなった。

13.5~16.5 日の胎仔脳室内酸素濃度を測定したところ、14.5 日以降に酸素濃度の上昇がみられた。これは LIF シグナルリレーにおける ACTH のピークと一致する。我々のグループの関連した研究により、ACTH はメラノコルチン受容体を介して分化を促進して脱核を誘導することが明らかとなっていることから、LIF シグナルリレーは酸素要求性の高い大脳新皮質の形成と酸素供給を協調させるシステムであることが推測された。LIF シグナルパスウェイが IGF-1/2 を介して胎児大脳新皮質のエネルギー代謝機構を低酸素

に対応したもから酸素依存的なものに変化させていることを明らかにするため、これら因子の免疫組織学的解析を試みた。先ず、大脳皮質全域にわたるこれら因子の局在を明らかにするため、胎仔の透明化法を検討した。その結果、抗原性を保ちながら、これまで報告されてきた方法に優る透明化方法を開発した。現在、低酸素プローブおよび酸化ストレス対応因子の免疫組織学的解析をおこなっている。

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4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. DOI: 10.1371/journal.pone.0129011 (in press) 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. 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
4. Arikawa T, Simamura E, Shimada H, Nishi N, Tatsuno T, Ishigaki Y, Tomosugi N, Yamashiro C, Hatta T, Takegami T, Mogami H, Yamaguchi K, Nakamura T, Otani H, Hatta T, Shoji H.: Expression pattern of Galectin 4 in rat placentation. Placenta 33: 885-887 2012 DOI: 10.1016/j.placenta. 査読有

[学会発表](計24件)

1. 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ーは亢進する. 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).

2. 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).
3. 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).
4. 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 シグナルリレーによる 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).
5. 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).
6. 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).
7. 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).
8. 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）。
9. 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（千葉県千葉市，千葉大学，'13.07.26~27）。
 10. 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）。
 11. 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）。
 12. 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）。
 13. 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）。
 14. Tsukada T, Simamura E, Shimada H, Akai T, Iizuka H, Hattai 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）。
 15. 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）。
 16. 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）。
 17. 内芝舞実，桶谷祐介，池原裕介，島村英理子，島田ひろき，東 伸明，渡辺弥寿夫，八田稔久：ラット胎児パーチャルスライドライブラリーを用いた臓器発生の形態計測学的解析と立体再構築。日本解剖学会総会（香川県高松市，サンポートホール高松 かがわ国際会議場，'13.03.28~30）。
 18. 島村英理子，島田ひろき，有川智博，東海林博樹，大谷 浩，八田稔久：メラノコルチンレセプター1, 2, 5 伝達シグナルによる赤芽球の分化制御。第 74 回日本血液学会学術集会（京都府京都市，国立京都国際会館，'12.10.19~21）。
 19. Arikawa T, Simamura E, Shimada H, Hattai T, Shoji H: Analysis of the galectin 4 expression during trophoblast differentiation in rat placentation. 第 18 回国際胎盤学会（広島県広島市，広島国際会議場，'12.09.18~21）。
 20. 島村英理子，島田ひろき，有川智博，東海林博樹，八田稔久：ヒト赤芽球のエリスロポエチンシグナルはメラノコルチンシステムにより調節される。第 38 回総会・第 48 回学術集会（石川県河北郡内灘町，金沢医科大学，'12.7.21）。
 21. 八田稔久，島村英理子，島田ひろき，東海林博樹，有川智博，東 伸明，大谷浩，渡辺弥寿夫：母-胎児間 LIF-ACTH ネットワークによる脳と血球のシナジスティックな発生調節機構。第 38 回総会・第 48 回学術集会（石川県河北郡内灘町，金沢医科大学，'12.07.21）。
 22. 島村英理子，島田ひろき，有川智博，東海林博樹，八田稔久：母胎 LIF シグナルの胎児大脳皮質 radial glia への影響。第 52 回日本先天異常学会（東京都新宿区，東京女子医科大学弥生記念講堂，'12.07.6~8）。
 23. 有川智博，島村英理子，島田ひろき，八田稔久，東海林博樹：ガレクチンによる制御を介した胎盤形成・維持機構の解析。第 52 回日本先天異常学会（東京都新宿区，東京女子医科大学弥生記念講

堂，'12.07.6～8）。

24. Uchishiba M, Simamura E, Higashi N, Shimada H, Mitani M, Hatta T : Morphometric analysis of organ development in staged rat embryos with virtual serial slide library. 第52回日本先天異常学会（東京都新宿区，東京女子医科大学弥生記念講堂，'12.07.6～8）。

〔産業財産権〕

出願状況（計4件）

1. 名称：赤芽球の脱核方法及び脱核赤血球
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
2. 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
3. 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
4. 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，島村英理子，島田ひろき
権利者：学校法人 金沢医科大学
種類：特許権
番号：特願 2012-239465号
出願年月日：2012年10月30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

島田 ひろき (SHIMADA, Hiroki)
金沢医科大学・医学部・講師
研究者番号：60278108

(2) 連携研究者

八田 稔久 (HATTA, Toshihisa)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：20238025