

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

研究種目： 基盤研究（B）  
 研究期間： 2010～2012  
 課題番号： 22390216  
 研究課題名（和文）  
 母胎間シグナルリレーの脳皮質発生における生理学的意義  
 研究課題名（英文）  
**Physiological role of maternal-fetal LIF signal relay in the development of cerebral cortex**  
 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

## 研究成果の概要（和文）：

母胎間白血病抑制因子(LIF)シグナルリレーでは、母体側LIFが胎盤栄養膜細胞から副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)の分泌を誘導し、これが胎児赤芽球から再びLIFの分泌を誘導する。胎児側で分泌されたLIFは脳において、インスリン様成長因子1または2を介して脳皮質形成を促進していることが明らかとなった。さらに、母体からのLIFシグナルにより胎盤から誘導される副腎皮質刺激ホルモンが、胎児側のLIFのソースである胎児赤芽球の分化調節に関与していることが明らかとなった。これらの結果より、母胎間LIFシグナルリレーが胎児脳と赤血球の発生を同期的に調節している可能性が示された。

## 研究成果の概要（英文）：

Leukemia inhibitory factor (LIF) induces adrenocorticotrophic hormone (ACTH) from the placenta, which in turn induces fetal nucleated red blood cells to secrete LIF. In the present study, it was revealed that fetal LIF induces insulin-like growth factor 1 or 2 that increases neurogenesis in the developing rat cerebrum. In addition, it was revealed that placental ACTH contributes to the differentiation of fetal erythroblasts. These findings suggest that the development of brain and red blood cells is regulated synchronously by maternal-fetal LIF signal relay.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード: 母-胎児間シグナル、白血病抑制因子、インスリン様成長因子、副腎皮質刺激ホルモン、神経幹細胞、大脳皮質、胎児、胎盤

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、母親由来の白血病抑制因子 (LIF) が、胎盤から副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) を誘導し、この ACTH が胎児の有核赤血球から再び LIF を誘導することで母体側の 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システムを見出した。また LIF が胎児大脳において神経幹細胞の増殖を促進することを明らかにした。これらの研究成果をもとに、母胎間 LIF-ACTH-LIF シグナルリレーが胎児大脳の発生に関与することを想起した。

### 2. 研究の目的

当該研究課題では、この LIF-ACTH-LIF シグナルリレーが、母体と胎児をつなぐ生理的なネットワークの一部として機能し、大脳の発生に関与することを証明する。また、その分子機構を明らかにする。

### 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) LIF の胎児脳に対する作用 (in vivo 解析): DNA マイクロアレイを用いて LIF 投与により胎児大脳で変動する遺伝子群を網羅的に解析した。母体 LIF 刺激後に胎児大脳で変動が確認された胎児遺伝子のうち、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 を胎児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。LIF 受容体 (LIFR) の中和抗体を胎児脳室に注入し、候補遺伝子の発現変化を確認した。

(2) LIF の胎児脳に対する作用 (in vivo 解析): LIF の下流遺伝子の発現変動について neurosphere を用いて確認した。

(3) 胎盤 ACTH の機能解析: ACTH 中和抗体を胎児へ注入し、胎児末梢血中の LIF 濃度を計測した。レンチウイルスベクターを用いた胎盤選択的なノックダウンモデルの作成を試みた。臍帯血由来造血前駆細胞から誘導した赤芽球を用い、メラノコルチン受容体に対する中和抗体あるいは阻害剤で ACTH シグナルを遮断し、そのレスポンスを調べた。

### 4. 研究成果

母体 LIF 刺激に対する胎児大脳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。そのうち特に大脳皮質形成に対する IGF-1 および 2 (IGF1/2) の役割に

注目して検討を行い以下の成果を得た。正常ラット胎児脳脊髄液中の LIF 濃度のピークが胎齢 15 日に認められ、IGF1/2 のピークはともに胎齢 16 日に出現した。胎児脳室内へ LIF を注入すると、胎児背側大脳において *Igf1* および *2 mRNA* の発現が亢進した。母体 LIF 刺激後の胎児大脳における DNA マイクロアレイ解析により、*Igf1* および *Igf2 mRNA* の発現が亢進した。一方、胎児脳室内に抗 LIFR 中和抗体を注入することで、LIF 刺激をしても胎児大脳における *Igf1, 2mRNA* の発現亢進は認められなかった。Neurosphere を用いた解析では、LIF 投与により神経幹細胞から IGF1/2 が誘導された。また、FGF2 の神経幹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、IGF-1 あるいは 2 中和抗体存在下では 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 IGF1/2 を介して大脳皮質形成を促進していることが明らかとなった。

さらに、胎児赤芽球に発現しているメラノコルチン受容体 1 - 5 がそれぞれ分化ステージ選択的にリンクして機能していることが明らかとなった。このことは、母体からの LIF シグナルにより胎盤から誘導される ACTH が、胎児赤芽球の分化調節に関与していることを示唆する。ACTH 中和抗体の胎児への注入による機能阻害実験では、胎児 LIF 濃度の低下が誘導されたが、in vivo での胎児有核赤血球の脱核に対する影響については、結論を出すに至っていない。しかし、臍帯血由来造血前駆細胞から誘導した赤芽球培養系を用いた in vitro 実験系において、メラノコルチン受容体に対する中和抗体あるいは阻害剤で ACTH シグナルを遮断することにより脱核率の低下を確認することができた。レンチウイルスベクターを用いた胎盤選択的なノックダウンモデルの作成とそれを用いた栄養膜での母胎間 LIF シグナルの遮断実験については、モデルの確立に至らず、今後の課題となった。

以上の結果より、母胎間 LIF シグナルリレーは、胎児大脳と赤血球の発生を同期的に調節している可能性が示された。これらの研究成果は現在論文投稿中である。

### 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 7 件)

1. Yamada M, Udagawa J, Hashimoto R, Matsumoto A, Hatta T, Otani H: Interkinetic nuclear migration during early development

- of midgut and ureteric epithelia. *Anat Sci Int.* 88: 31-37 2012 査読有  
DOI: 10.1007/s12565-012-0156-8
2. Arikawa T, Simamura E, Shimada H, Nishi N, Tatsuno T, Ishigaki Y, Tomosugi N, Yamashiro C, Hata 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 査読有  
DOI: 10.1016/j.placenta.2012.07.013
  3. Simamura E, Shimada H, Shoji H, Otani H, Hatta T: Effects of melanocortins on fetal development. *Congenit Anom(Kyoto)* 51: 47-54 2011 査読有
  4. Hashimoto R, Udagawa J, Kagohashi Y, Matsumoto A, Hatta T, Otani H: Direct and indirect effects of neuropeptide Y and neurotrophin 3 on myelination in the neonatal brains. *Brain Res.* 1373: 55-66 2011 査読有  
DOI: 10.1016/j.brainres.2010.12.027
  5. Otani H, Udagawa J, Hatta T, Kagohashi Y, Hashimoto R, Matsumoto A, Satow F, Nimura M.: Individual variation in organ histogenesis as a causative factor in the developmental origins of health and disease: unnoticed congenital anomalies? *Congenit Anom(Kyoto)* 50: 205-211 2011 査読有
  6. Simamura E, Shimada H, Higashi N, Uchishiba M, Otani H, Hatta T: Maternal leukemia inhibitory factor (LIF) promotes fetal neurogenesis via a LIF-ACTH-LIF signaling relay pathway. *Endocrinology* 151: 1853-1862 2010 査読有  
DOI: 10.1210/en.2009-0985
  7. Yamada M, Udagawa J, Matsumoto A, Hashimoto R, Hatta T, Nishida M, Minami Y, Otani H: Ror2 is required for midgut elongation during mouse development. *Dev Dynam* 239: 941-953 2010 査読有  
DOI: 10.1002/dvdy.22212
- [学会発表] (計 24 件)
1. 桶谷祐介, 池原裕介, 渡辺弥壽夫, 八田稔久: ラット胎児に関する組織細胞連続切片画像の高速自動整合と3次元再構築, バイオイメージ・インフォマティクス ワークショップ 2012, (神戸, '12.11.2).
  2. 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, '12.10.19-21).
  3. 島村英理子, 島田ひろき, 有川智博, 東海林博樹, 八田稔久: ヒト赤芽球のエリトポイ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, 金沢医科大学医学会, (内灘, '12.7.21).
  4. 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, 渡辺弥壽夫: 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, 金沢医科大学医学会, (内灘, '12.07.21).
  5. 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, '12.07.6-8).
  6. 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, '12.07.6-8).
  7. 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, '12.07.6-8).
  8. Hatta T, Shimada H, Simamura E, Shoji H, Higashi N.: Leukemia inhibitory factor induces expression of insulin-like growth factor 1 and 2 in the forebrain of rat fetuses via maternal-fetal leukemia inhibitory factor signal pathway, Society for Neuroscience 2011, (Washington, '11.11.16).
  9. Simamura E, Shimada H, Shoji H, Otani H, Hatta T: Maternal-placental-fetal leukemia inhibitory factor signal pathway contributes stage-specific differentiation from fetal neural stem/progenitor cells to astrocytes, Society for Neuroscience 2011, (Washington, '11.11.15).
  10. 島村英理子, 島田ひろき, 東海林博樹, 増

- 田浩子, 八田稔久: ACTH による脱核誘導作用とメラノコルチンレセプターによる赤芽球の分化制御, 第 73 回日本血液学会学術集会, (名古屋, '11.10.15).
11. Shimada H, Simamura E, Shoji H, Higashi N, Hatta T: LIF induced elevation of insulin-like growth factor 1 in fetal forebrain via maternal-fetal LIF-ACTH-LIF signaling relay pathway, The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, (Yokohama, '11.09.15).
  12. 島村英理子, 島田ひろき, 東海林博樹, 大谷 浩, 八田稔久: ラット母獣 LIF 投与は母胎間 LIF-ACTH-LIF シグナルリレーを介して胎児脳におけるアストロサイト様細胞の分化を促進する, 第 34 回日本神経科学大会, (横浜, '11.09.15).
  13. 島村英理子, 増田浩子, 内芝舞実, 島田ひろき, 東海林博樹, 八田稔久: 母胎間シグナル伝達 LIF-ACTH による胎児造血調節, 第 51 回日本先天異常学会学術集会, (東京, '11.07.23).
  14. 島村英理子, 島田ひろき, 東海林博樹, 八田稔久: メラノコルチンレセプターによる赤芽球分化調節機構の解析, 金沢医科大学医学会第 47 回学術集会, (内灘, '11.07.9).
  15. 東海林博樹, 島村英理子, 島田ひろき, 八田稔久, 石垣靖人: 胎盤栄養膜由来細胞株 Rcho-1 におけるガレクチンファミリーの発現, 金沢医科大学医学会第 47 回学術集会, (内灘, '11.07.9).
  16. Uchishiba M, Simamura E, Shimada H, Higashi N, Masuta H., Hatta T: Construction of the virtual serial slide library of developing rat embryos, The 116th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists, (Yokohama, '11.03.28).
  17. Hatta T, Shimada H, Simamura E, Ishigaki Y, Higashi N, Tatsuno T, Takano F.: Alteratio of gene expression profiles in the fetal cerebrum after injection of leukemia inhibitory factor into dams, Society for NEUROSCIENCE 2010, (San Diego, '10.11.15).
  18. 東 伸明, 島田ひろき, 島村英理子, 八田稔久: 大動脈腹側枝と背側枝の派出位置について, 第70回日本解剖学会中部支部学術集会, (岐阜, '10.10.16.).
  19. 島村英理子, 島田ひろき, 東 伸明, 内芝舞実, 大谷 浩, 八田稔久: The regulation of fetal neurogenesis via maternal-fetal LIF-ACTH-LIF signaling relay pathway, 第 33 回日本神経科学大会, (兵庫, '10.09.2).
  20. 東海林博樹, 島村英理子, 石垣靖人, 西望, 中村隆範, 島田ひろき, 八田稔久: ラット胎盤由来細胞株 Rcho-1 におけるガレクチンファミリーの発現, 第 51 回日本先天異常学会学術集会, (東京, '11.07.23).
  21. 島村英理子, 増田浩子, 島田ひろき, 東海林博樹, 村上学, 東伸明, 八田稔久: 赤血球脱核誘導因子による成熟赤血球の培養法, 第 46 回金沢医科大学医学会学術集会, (内灘, '10.07.17).
  22. 島村英理子: 胎盤を介した母胎間シグナルリレー LIF-ACTH-LIF による胎児発生調節機構, 第 50 回日本先天異常学会学術集会, (淡路島, '10.07.8). (授賞講演)
  23. 金山景錫, 八田稔久, 島村英理子, 島田ひろき, 瀬上夏樹: ビスフェノール A のマウス下顎頭に及ぼす影響, 第 50 回日本先天異常学会学術集会, (淡路, '10.07.8).
  24. 島田ひろき, 島村英理子, 内芝舞実, 東伸明, 増田浩子, 高田尊信, 土田秀行, 石垣靖人, 友杉直久, 八田稔久: ラット初乳中の蛋白, ペプチド成分のプロファイリング, 第 50 回日本先天異常学会学術集会, (淡路島, '10.07.8).
- [産業財産権]  
 ○出願状況 (計 4 件)  
 名称: 透明化生物標本作製方法及び透明化生物標本作製用キット  
 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  
 出願年月日: 2012 年 10 月 30 日  
 国内外の別: 国内
- 名称: Method for enucleating nucleated erythrocyte, and enucleation inducing agent  
 発明者: 八田稔久, 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：10 745 966.1  
出願年月日：2011年9月19日  
国内外の別：外国（EP移行）

名称：Method for enucleation of erythrocyte, and enucleation induction  
発明者：八田稔久、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：13/202.852

US-2012-0070897-A1  
出願年月日：2011年8月23日  
国内外の別：外国（米国移行）

名称：有核赤血球の脱核方法及び脱核誘導剤  
発明者：八田稔久、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：2011-501498  
出願年月日：2011年8月15日  
国内外の別：国内（日本国移行）

〔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

島村 英理子 (SIMAMURA ERIKO)  
金沢医科大学・医学部・講師  
研究者番号:00267741

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

米倉 秀人 (YONEKURA HIDETO)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号:80240373

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

### (3)連携研究者

大谷 浩 (OTANI HIROKI)  
島根大学・医学部・教授  
研究者番号:20160533