

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：33303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659512

研究課題名(和文)母胎間シグナル伝達から迫る精神・神経疾患スペクトラムの胎児起源仮説

研究課題名(英文)Prenatal origin of the risk of mental disorders caused by the defects of 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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：母体免疫亢進が母胎児間LIFシグナルリレーに与える影響を解析した。妊娠マウスにPolyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C: 4, 20 mg/kg BW) を腹腔内投与した結果、母体 IL-6はPoly I:Cと正の相関を示したが、胎児脳脊髄液LIF、胎児血清ACTHはPoly I:C 20mg/kg投与により減少した。Poly I:C 20mg/kg投与では、胎児大脳の神経幹細胞/前駆細胞の分裂頻度および大脳皮質ニューロンの総数が減少した。一方、母体LIF刺激後の胎児大脳では、発現亢進した上位20遺伝子のうち14個が自閉症と関連するものであった。

研究成果の概要(英文)：Effects of maternal immune activation (MIA) induced by Polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C) administration (4 mg or 20 mg/kg BW) into pregnant mice were investigated. The MIA-dams demonstrated that alteration of maternal serum IL-6 level was correlated with Poly I:C in a dose dependent manner. However, leukemia inhibitory factor (LIF) level of cerebrospinal fluid and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in serum in embryos were decreased by injection of Poly I:C at 20 mg/kg BW into dams. In addition, the proliferating neural stem/progenitor cells and the post mitotic neurons in the dorsal cerebrum were decreased in number by injection of Poly I:C at 20 mg/kg BW into dams. The dorsal cerebrum of embryos with administration of LIF (5µg/g/kg BW) into dams exhibited that 14 of the top 20 up-regulated genes are the autism-related genes, suggesting that the interference of maternal-fetal LIF signaling relay by MIA results in the prenatal risk of autism.

研究分野：発生学

キーワード：大脳皮質 白血病抑制因子 妊娠 胎盤 炎症

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 (leukemia inhibitory factor, LIF) が、胎盤から副腎皮質刺激ホルモン (adrenocortico tropic hormone, 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 (Simamura et al. 2010)。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明らかにし、その生理学的メカニズムについて解析を進めてきた。

近年、母体炎症に伴う胎児脳における interleukin-6 (IL-6) の上昇が胎児脳傷害を惹起し、それが統合失調・自閉症の素因形成につながることを示唆された (Smith et al., 2007)。胎児の脳で検出される IL-6 のソースについては、Meyer ら (2006) の報告では胎児脳において産生が誘導されることが示されている。また、ラットでは IL-6 の胎盤透過性が認められ (Dahlgren et al., 2006)、母体にて産生された過剰な IL-6 が胎盤を通過して胎児脳に直接的な障害を与えると可能性が示されたが (Patterson., 2011)、確証は得られていない。さらに、胎児脳で亢進した IL-6 による胎児脳傷害の分子メカニズムは依然として不明である。本研究では、我々が同定した母胎間 LIF-ACTH-LIF シグナルリレーにより胎児脳の発生を調節する生理的システム (Simamura et al. 2010) が、IL-6 を基軸とする母体炎症により影響を受ける可能性を想起した。

2. 研究の目的

本研究課題では、母胎間 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明らかにする。さらに、母体の免疫亢進によって誘導された過剰な IL-6 によって、生理的 LIF シグナルリレーが破たんし、それが出生後の自閉症スペクトラムのリスクファクターとなる可能性を検証する。

3. 研究の方法

妊娠 12.5 日 (12.5 dpc, 膣栓確認日 = 0 dpc) の C57BL/6J (SLC) マウスに疑似ウイルスである Polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C) を 4 および 20 mg/kg BW 腹腔内投与することにより惹起される母体免疫亢進モデルを用いて、以下の項目について解析を行った。

(1) Poly I:C 投与量と母体 IL-6, LIF および

ACTH レベルの相関性について ELISA および定量的 RT-PCR を用いて解析を行った。

(2) Poly I:C 投与量と胎児背側大脳神経幹/前駆細胞の細胞分裂頻度との相関を明らかにするために、Edu 標識された神経幹/前駆細胞の総数および標識率をステレオロジー (Stereo Investigator, MBF) により解析した。

(3) Poly I:C 投与量と胎児背側大脳皮質ニューロン総数との相関性についても、ステレオロジー解析を行った。

(4) 母体 LIF 刺激に反応する胎児脳の遺伝子発現変化について網羅的検索を行った。すなわち、LIF (5 μ g/kg BW) を妊娠 13.5dpc の母鼠に腹腔内投与し、3 時間後における胎児背側大脳の mRNA の発現変動について、DNA マイクロアレイ (Affymetrix. ExonExprChip. MoGene-1_0-st-v1) 解析を行った。

4. 研究成果

(1) 母体血清 IL-6 濃度は Poly I:C と正の相関を示したが、胎児脳脊髄液 LIF 濃度、胎児血清 ACTH 濃度は Poly I:C 20mg/kg BW 投与により減少した (図 1)。

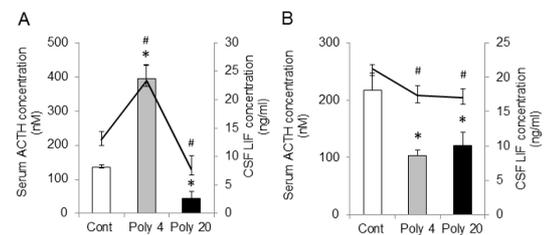


図 1. 胎児血清 ACTH 濃度および脳脊髄液中の LIF 濃度変化

(2) Poly I:C 20mg/kg BW 投与群では、胎児背側大脳皮質の体積および大脳皮質ニューロンの総数 (図 2 A, B) が減少していた。また脳室帯・下帯における神経幹細胞/前駆細胞の EdU 標識率は陰性対照群よりも低値を示した。

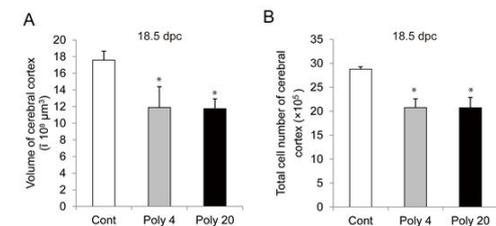


図 2 胎児大脳皮質の体積と大脳皮質神経細胞数の変化

(3) LIF 刺激後の胎児大脳の遺伝子発現変動に関する DNA マイクロアレイ解析の結果、

母体の LIF 刺激により胎児大脳で発現が亢進した上位 20 遺伝子のうちの 14 個 (70%) が、自閉症との関連が報告されている遺伝子であった。この結果は、母胎間 LIF シグナルの破たんが、胎生期におけるインターニューロンの産生・分化障害を引き起こし、それが自閉症スペクトラムのリスク素因形成に關与することを強く示唆する。母体間 LIF シグナル関連分子の胎盤選択的ノックダウン法については、諸条件の検討を行ったが、適切な実験系の確立には至らなかった、胎児への過剰な炎症シグナルの強制伝達実験については今後の課題となった。

以上の結果より、母体の免疫亢進によって誘導された過剰な IL-6 によって、生理的母胎間 LIF シグナルリレーが破たんし、胎児大脳皮質の形成に影響を与えることが明らかとなった。これらの研究成果は国際誌にて公表予定である (Tsukada et al, PLOS ONE 2015, in press)。

< 引用文献 >

Simamura E, Shimada H, Higashi N, Uchishiba M, Otani H, and Hatta T. Maternal leukemia inhibitory factor (LIF) promotes fetal neurogenesis via a LIF-ACTH-LIF signaling relay pathway. *Endocrinology*, 2010, 151(4):1853-62.

Smith SEP, Li J, Garbett K, Mirmics K, and Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci*, 2007, 27(40):10695-10702.

Meyer U, Nyffeler M, Engler A, Urwyler A, Schedlowski M, Knuesel I, Yee BK, and Feldon J. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *J Neurosci*, 2006, 26(18):4752-4762.

Dahlgren J, Samuelsson AM, Jansson T, and Holmång A. Interleukin-6 in the maternal circulation reaches the rat Fetus in mid-gestation. *Pediatric Res*, 2006, 60(2):147-151.

Patterson PH. Maternal infection and immune involvement in autism. *Trends in Molecular Medicine*, 2011, 17(7), 389-394.

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*.

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. 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
4. 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
5. 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 29 件)

1. 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. 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) .

3. 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) .
4. 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) .
5. 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) .
6. 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) .
7. 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) .
8. 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) .
9. 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) .
10. 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) .
11. 八田稔久: 中枢神経系の正常発生: 脳はひとりで大きくなれるか?. 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) .
12. 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) .
13. 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) .
14. 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 γ 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) .
15. 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) .
16. 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) .
17. 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) .
18. 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)。
19. 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)。
 20. 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)。
 21. 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)。
 22. 桶谷祐介, 池原裕介, 渡辺弥寿夫, 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(兵庫県神戸市, 理化学研究所発生・再生科学総合研究センター, '12.11.1 ~ 2)。
 23. 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)。
 24. Arikawa T, Simamura E, Shimada H, Hatta 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)。
 25. 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。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)。
 26. 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 - A C T H 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)。
 27. 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)。
 28. 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)。
 29. 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

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