

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05040

研究課題名(和文) 牛の分娩時胎盤節における炎症誘導機構の解明と胎盤成熟誘導型分娩誘起技術開発

研究課題名(英文) Induction of placental maturation at induced parturition in cows

研究代表者

平山 博樹 (HIRAYAMA, Hiroki)

東京農業大学・生物産業学部・教授

研究者番号：60390861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、牛の分娩誘起のためのグルココルチコイド(GC)投与が、胎盤節において胎子胎盤の排出に關するプロスタグランジン合成を促進する可能性を示した。また、自然分娩時の胎盤節では、白血球の遊走因子のひとつであるC-Cケモカインの遺伝子発現が上昇することを明らかにした。しかし、誘起分娩時のGC投与ではC-Cケモカインの発現が誘導されなかった。これらの結果より、分娩後に発生する胎盤停滞の低減のためにはGCの投与方法の検討が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

繁殖牛の適正な分娩管理は、分娩時の事故による母体や子牛の損耗を防ぐとともに、分娩した個体の生殖機能回復を早めることで繁殖効率の向上につながる。本研究の成果は、分娩牛に発生する重要な疾患の一つである胎盤停滞の発生メカニズムの解明や分娩誘起技術の改良を通じて、牛の繁殖効率向上による乳肉など畜産物の安定的生産に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, the administration of glucocorticoids induced the expression of genes involved in prostaglandin synthesis in placentomes at parturition. The expression of C-C chemokines was increased in placentomes at spontaneous parturition. C-C chemokines are responsible for the recruitment of the leukocytes to the site of inflammation. However, the administration of glucocorticoids did not influence the expression of C-C chemokines. These results suggest that further studies on administration methods of glucocorticoids are needed in order to reduce the incidence of retained fetal membrane after parturition.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：牛 分娩 胎盤停滞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

牛胚の着床様式は多胎盤であり、母体の母胎盤(丘阜)と胎子胎盤(絨毛膜)が結合した多数の胎盤節を形成する。分娩後に母胎盤から胎子胎盤が剥離するためには、コラゲナーゼなどによる細胞外マトリックス(ECM)の分解が重要となる(Beagley et al., 2010)。また、アポトーシスなどによる組織構造変化も胎子胎盤の剥離と関連する(Kamemori et al., 2011、Hirayama et al., 2012)。自然分娩時の胎盤停滞の予防や胎盤停滞を伴わない分娩誘起技術の開発のためには、胎盤成熟と呼ばれるこれらの機能や組織構造の変化を制御するメカニズムの解明が必要である。

自然分娩時の胎盤では、反芻獣の胎盤に特有な巨細胞である栄養膜二核細胞の消失などの胎盤成熟が起こることで胎子胎盤の剥離が進行すると考えられている。しかし、臨床用量のデキサメサゾンによる牛の分娩誘起ではこれらの胎盤成熟が誘導されない。一方、トリアムシノロンアセトニドによる持続的なグルココルチコイド(GC)感作によって、分娩誘起後の胎盤停滞の発生が減少する可能性が示されている(Nasser et al., 1994)。さらに、羊では母体への高用量のベタメタゾン投与により二核細胞が減少することが報告されている(Braun et al., 2007)。

我々は、分娩発生のトリガーであるGCが胎盤成熟因子のひとつであると考えており、これまでの研究でトリアムシノロンアセトニドの前処理後に高用量のベタメタゾンを投与するGC複合投与法で分娩誘起を行うと二核細胞が減少する事例を見いだした(Hirayama et al., 2015)。分娩誘起のGC投与の有無やGCの種類と投与方法を変化させ、胎盤節の機能や構造を自然分娩時と比較する方法は、胎盤成熟モデルとして胎盤成熟メカニズムの解明やGCの投与効果の評価に利用できる。

ヒト産科領域では胎盤における炎症反応による分娩誘導の研究が盛んに行われ、早産防止への応用が期待されている(Stephen et al., 2014)。牛では分娩時の胎盤節において炎症性のサイトカインやケモカイン発現が増加することが報告されている(Strey et al., 2012)。これらは、末梢血の好中球活性が胎盤停滞と関連するとの報告(Kimura et al., 2002 など)と胎盤節におけるマクロファージの増加(Miyoshi & Sawamukai, 2004)などローカルな免疫系の変化を結びつける興味深い知見といえる。炎症反応は、胎子胎盤の免疫的排除やECMリモデリングに深く関与していると考えられる。しかし、牛では胎盤節における炎症性遺伝子発現の詳細な研究はなく、炎症反応の誘導メカニズムも明らかとなっていない。

妊娠末期の胎子コルチゾール産生増加は分娩開始の重要なトリガーとされているが、それらGCによる強い免疫抑制作用は分娩時の胎盤節における炎症反応の亢進と矛盾する。これまでに、GCが胎盤節に及ぼす影響は十分に解明されておらず、特に炎症反応との関係は全く研究されていない。一方で、コルチゾールは炎症誘導因子であるProstaglandin (PG) E2の胎盤における産生を促進する(Strey et al., 2012)。これらの知見から、我々は、GCによる感作が胎盤節におけるPGE2産生を介して炎症反応を促進し、胎盤成熟を引き起こすという仮説を検証すべく本研究に取り組むこととした。

2. 研究の目的

(1) 分娩時胎盤節における炎症関連遺伝子の発現動態

胎盤成熟モデルを利用して分娩時の胎盤節の成熟程度を変化させ、発現変動遺伝子を抽出する。本研究では特に炎症性サイトカインおよびケモカインに注目し、胎盤の成熟に伴う炎症反応とその制御メカニズムの変化を明らかにする。

(2) 改良型分娩誘起技術開発

種々の方法で分娩誘起を行い、胎盤停滞の発生頻度、分娩に要する時間や子牛の健全性を調査して胎盤停滞を伴わない分娩誘起技術の開発につなげる。さらに、トリアムシノロンアセトニドの前処理後に高用量のベタメタゾン投与する GC 複合投与方法が、胎盤の成熟に及ぼす効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 分娩時胎盤節における炎症関連遺伝子の発現動態

胎盤節は、肉用牛の自然分娩直後(SP 群)およびデキサメサゾンによる誘起分娩直後(DEX 群)に採取した。胎盤節は胎子胎盤と母胎盤に分離し、母胎盤部分の炎症関連遺伝子発現を PCR array (RT² Profiler PCR Array, Qiagen, Hilden, Germany) を用いて解析した。また、PCR array によって発現変動の検出された C-C ケモカインおよびその受容体の組織内局在は、免疫組織化学によって解析した。

トランスクリプトーム解析は、肉用牛の自然分娩 (SP 群)、PGF2 α による誘起分娩 (PG 群)、デキサメサゾンによる誘起分娩 (DEX 群) およびトリアムシノロンアセトニドとベタメタゾンの複合投与による誘起分娩 (TABET 群) の直後に採取した胎盤節を用いて実施した。胎盤節は、胎子胎盤と母胎盤に分け RNA-seq 解析を実施し、自然分娩時に対する誘起分娩時の発現変動遺伝子を探索した。

(2) 改良型分娩誘起技術開発

乳用牛における分娩経過は、自然分娩 (SP 群)、PGF2 α による誘起分娩 (PG 群) およびトリアムシノロンアセトニドとベタメタゾンの複合投与による誘起分娩 (TABET 群) 時に調査した。胎盤停滞は分娩後 12 時間までの発生率を調査し、子牛の状態は外貌と活力の観察を行った。

肉用牛および乳用牛の分娩直後に採取した胎盤節における遺伝子発現量は、リアルタイム PCR により解析した。

4. 研究成果

(1) 分娩時胎盤節における炎症関連遺伝子の発現動態

分娩時の母胎盤で解析した炎症関連 84 遺伝子のうち、自然分娩では誘起分娩に比較して 34 遺伝子の発現が有意に上昇した (図 1)。同様に 3 遺伝子の発現量が自然分娩時に有意に低下した。このうち、C-C ケモカインである CCL8 および CCL2 の Fold change は 20.22 および 16.64 と最も大きな変動を示した。このことから、自然分娩時の胎盤節では白血球遊走因子のひとつである C-C ケモカインの発現が上昇し、炎症反応を促進することが示唆された。

C-C ケモカインおよびその受容体の局在を解析したところ、母胎上皮細胞において CCL8、CCR1、CCR2 および CCR5 が検出された (図 2)。このことから、分娩時の胎盤節におけるケモカイン発現の上昇は、白血球の遊走だけでなく上皮細胞の機能制御に関与することが示唆された。

胎盤節におけるトランスクリプトーム解析の結果、自然分娩 (SP 群) と比較して PG 群、

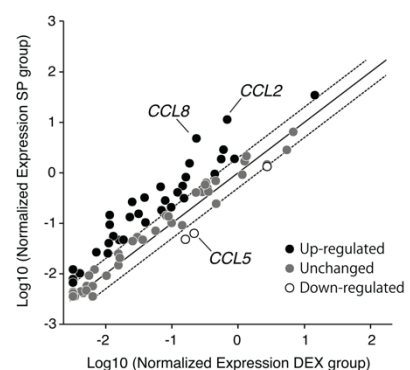


図 1 PCR array による炎症関連遺伝子の発現量解析

DEX 群および TABET 群いずれの誘起分娩においても多数の発現変動遺伝子が検出された (図 3)。発現変動遺伝子は分娩誘起の方法によって異なり、胎子胎盤では PG 群が 1165 遺伝子、DEX 群が 678 遺伝子、TABET 群が 126 遺伝子と GC 投与量の増加に伴い発現変動遺伝子数が減少した。現在、トランスクリプトーム解析で特徴的な変化の検出されたシグナル伝達経路について詳細な検討を進めている。

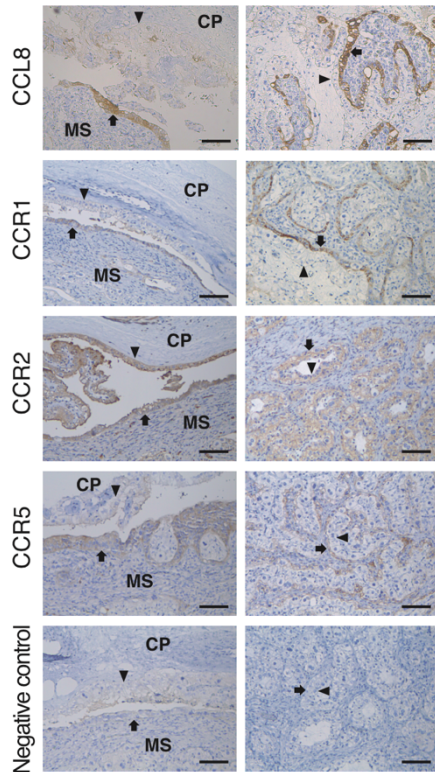


図 2 分娩時の胎盤節における C-C ケモカインおよび受容体の局在
矢印：母胎盤上皮細胞、矢頭：胎子胎盤上皮細胞、MS：母胎盤、CP：胎子絨毛膜

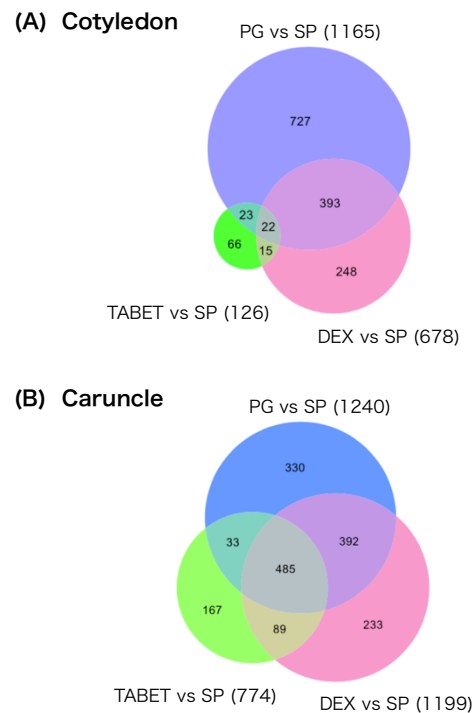


図 3 分娩時の胎盤節における RNA-seq 解析により検出された発現変動遺伝子数

(2) 改良型分娩誘起技術開発

乳牛で実施した分娩誘起の経過、胎盤停滞発生および娩出された子牛の状態について解析した。ホルモン処理終了から分娩までの間隔は、PG 群の平均 44.2 時間 (最大-最小間隔; 23.6 時間) に対し、TABET 群では平均 35.2 時間 (最大-最小間隔; 15.3 時間) と分娩タイミングの変動が小さかった。胎盤停滞発生率は、SP 群が 20% であり、PG 群および TABET 群の発生率はそれぞれ 100 および 78% であった。TABET 群の胎盤停滞発生率は PG 群と比較して低下したが、有意差は認められなかった。TABET 群における子牛の生時体重および娩出後の臨床的所見に異常は見られなかった。

自然分娩時の胎盤節では、胎子胎盤において *PTGS2* 発現の有意な上昇が認められた (図 4)。また、PG 群と比較して *PGES* 発現が上昇する傾向が認められた。このことから、分娩時の胎子胎盤では *PGE2* の合成が促進されることが示唆された。*PGE2* は強い催炎活性を持つ物質であり、分娩時の胎盤節における炎症の誘導に関与することが考えられた。また、*PTGS2* 発現は、高用量の GC を投与した TABET 群で上昇する傾向が認められ、GC の投与方法を検討することで PG 合成の促進が可能であることが示唆された。

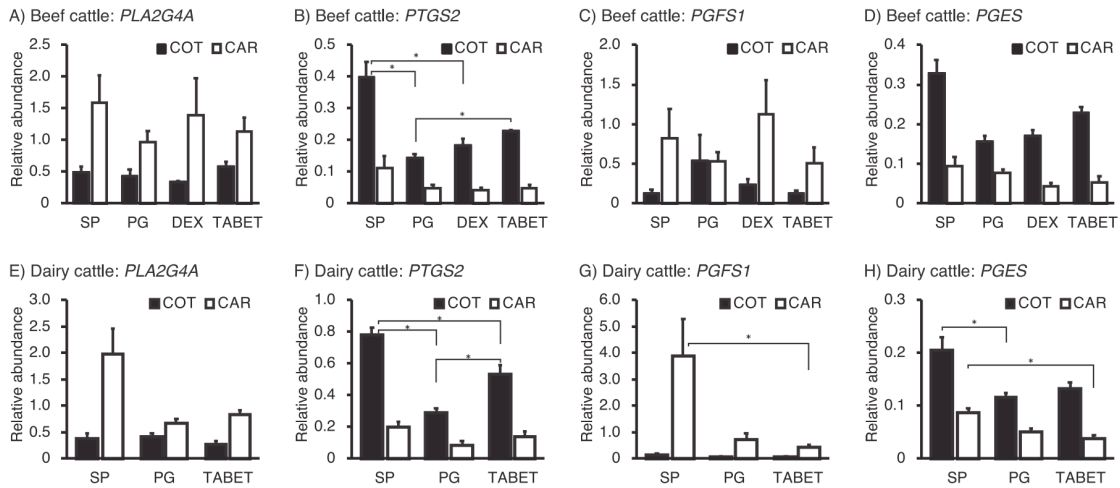


図4 分娩時の胎盤節におけるプロスタグランジン合成関連遺伝子の発現量解析
COT：胎子胎盤、CAR：母胎盤

自然分娩時の胎盤節では、母胎盤において *CCL2* および *CCL8* 発現の有意な上昇が認められた (図5)。*CCL2* の受容体である *CCR2* 発現量は、mRNA 発現レベルが低くリアルタイムPCRによる定量ができなかった。*CCL8* の受容体である *CCR1* および *CCR5* 発現量は、いずれも自然分娩で有意に上昇した。誘起分娩ではこれらケモカインの発現上昇が認められなかった。誘起分娩で発生する胎盤停滞の要因として、炎症反応の誘導が不十分であることが示唆されているが、C-C ケモカインの発現以上が胎盤停滞の要因のひとつであると考えられた。TABET 群では *CCR1* 発現の上昇が認められたものの、その他の遺伝子の発現は PG 群と同様であった。このことから、持続型および高用量の GC 投与は、不完全ではあるが分娩時胎盤節における PG 合成を促進できるものの、炎症誘導に直接関与する C-C ケモカインの活性は制御できないことが示された。

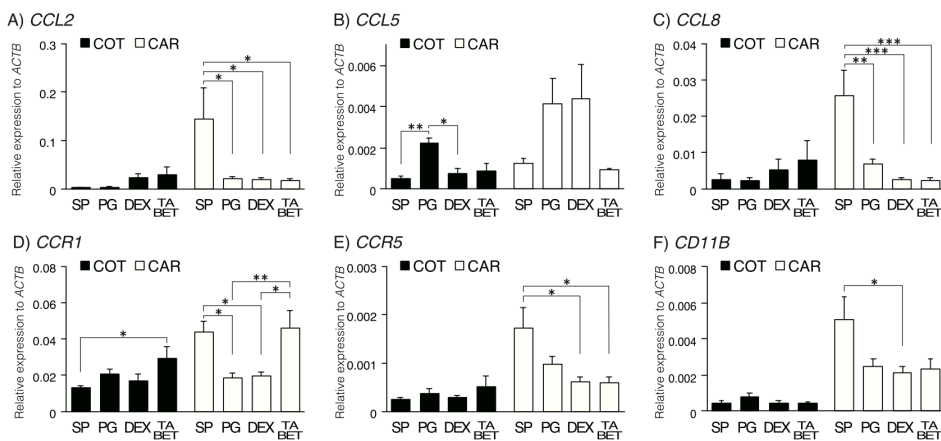


図5 分娩時の胎盤節における炎症関連遺伝子の発現量解析
COT：胎子胎盤、CAR：母胎盤

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 HIRAYAMA Hiroki, SAKUMOTO Ryosuke, KOYAMA Keisuke, YASUHARA Taichi, HASEGAWA Taito, INABA Ryo, FUJII Takashi, NAITO Akira, MORIYASU Satoru, KAGEYAMA Soichi	4. 巻 66
2. 論文標題 Expression of C-C motif chemokines and their receptors in bovine placentomes at spontaneous and induced parturition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 49～55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2019-113	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 Yasuhara Taichi, Koyama Keisuke, Sakumoto Ryosuke, Fujii Takashi, Naito Akira, Moriyasu Satoru, Kageyama Soichi, Hirayama Hiroki	4. 巻 139
2. 論文標題 Enhanced glucocorticoid exposure facilitates the expression of genes involved in prostaglandin and estrogen syntheses in bovine placentomes at induced parturition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Theriogenology	6. 最初と最後の頁 1～7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.theriogenology.2019.07.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 泰原大治・古山敬祐・作本亮介・小林祐子・平山博樹
2. 発表標題 ウシ分娩時胎盤節における主要組織適合遺伝子複合体クラス1（BoLA-1）発現
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroki Hirayama, Ryosuke Sakumoto, Keisuke Koyama, Taichi Yasuhara, Taito Hasegawa, Takashi Fujii, Satoru Moriyasu
2. 発表標題 Expression of CC chemokines and their receptors in bovine placentome at spontaneous and induced parturition
3. 学会等名 Fourth World Congress of Reproductive Biotechnology（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 泰原大治・古山敬祐・作本亮介・平山博樹
2. 発表標題 乳牛のグルココルチコイドによる誘起分娩時胎盤節のプロスタグランジン合成酵素発現
3. 学会等名 日本畜産学会第124回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平山博樹・泰原大治・古山敬祐・作本亮介・藤井貴志・森安悟
2. 発表標題 グルココルチコイドによる誘起分娩がウシ胎盤節におけるプロスタグランジン合成酵素発現に及ぼす影響
3. 学会等名 日本畜産学会第122回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	古山 敬祐 (KOYAMA Keisuke) (50611026)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・講師 (24403)	
連携 研究者	作本 亮介 (SAKUMOTO Ryosuke) (20343999)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・上級研究員 (82112)	
連携 研究者	森安 悟 (MORIYASU Satoru) (50390860)	地方独立行政法人北海道立総合研究機構・農業研究本部畜産試験場・研究主幹 (80122)	