

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450458

研究課題名(和文)牛における胎盤成熟メカニズムの解明と分娩誘起法の改良

研究課題名(英文)Studies of bovine placental maturation mechanism and parturition induction methods

研究代表者

平山 博樹(Hirayama, Hiroki)

東京農業大学・生物産業学部・准教授

研究者番号：60390861

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)：本研究ではグルココルチコイドが牛の分娩時の胎盤成熟におよぼす影響を明らかにするために、自然分娩と誘起分娩時の胎盤節における二核細胞数およびTGF- $\beta$  関連遺伝子発現を比較した。プロスタグランジンF<sub>2</sub>あるいはデキサメサゾンによる誘起分娩では、二核細胞の減少がみられず、TGF- $\beta$  関連遺伝子発現量も自然分娩と異なっていた。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では二核細胞数の減少やTGF- $\beta$  関連遺伝子発現が自然分娩に近い傾向を示した。これらの結果より、グルココルチコイドのタイプ、用量および投与スケジュールなどの検討により、牛の分娩時の胎盤成熟を促進できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Mechanisms of detachment of fetal membrane after parturition in cattle are poorly understood. We compared the disappearance of trophoblast binucleate cells (BNCs) and expression of transforming growth factor-beta (TGFB) in term placentomes between spontaneous and induced parturition to investigate the influences of glucocorticoids on the placental maturity. The number of binucleated cells was lower in the spontaneous parturition (SP) group than in groups induced parturition with prostaglandin F<sub>2a</sub> (PG) or dexamethasone (DEX). mRNA levels of TGFB1, TGFBR1 and TGFBR2 in the SP group differed from PG and DEX groups. In all analyses, there was no difference between the SP group and the BET group that was induced parturition with triamcinolone acetonide and betamethasone. Results in the BET group suggest that investigation into types, dose, and dosage schedule of glucocorticoids may facilitate placental maturation.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：牛 分娩 胎盤 分娩誘起

1. 研究開始当初の背景

牛の分娩誘起では Adams (1969) によるデキサメサゾンによる成功が最も古く、この報告による 20mg/cow という投与量は現在に至るまで臨床現場で用いられている。その後、1970~1980 年代にかけグルココルチコイドの種類や、エストロジェンやプロスタグランジン (PG) F2 $\alpha$  との併用法が検討され、90% 以上の効率で分娩を誘起することが可能になっている。しかし、これらの方法は分娩時刻の制御が難しく、夜間の分娩鑑視などが必要となる。また、分娩後に胎子胎盤が排出されない胎盤停滞が発生する頻度が高く、繁殖性に悪影響を及ぼすことが知られている。このため、分娩誘起は分娩遅延による長期在胎に対する処置として用いられる場合を除き、一般の分娩管理では普及していない。

一方、生産現場では急速に飼養頭数規模の拡大が進み、家畜管理の省力化は重要な技術開発テーマとなっている。また、胎子の過大化による難産を防止するためにも分娩誘起法は重要であり、分娩時刻の制御が可能で胎盤停滞の発生しない分娩誘起法の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究では誘起分娩と自然分娩の比較により分娩時の胎盤成熟機構を解明するとともに、グルココルチコイド投与法を検討し胎盤成熟を促進し、胎盤停滞の発生を低減した改良分娩誘起法の開発を目的として研究を実施する。

胎盤成熟の指標として、妊娠の維持や分娩時の性ホルモン合成などに関与し、自然分娩時に減少することが知られる二核細胞の数を評価した。さらに、細胞増殖、アポトーシス誘導および細胞外マトリックス生産などに関与することが知られる TGF- $\beta$  とその受容体の分娩時胎盤における発現を解析し、それらに対するグルココルチコイド投与法の影響を解析した。

3. 研究の方法

(1) 分娩

胎盤節は以下に挙げる 4 種類の方法による分娩直後に採取し、mRNA 発現量定量用と免疫組織化学解析用に分けてそれぞれ保存した。

- ①自然分娩 (SP)
- ②PGF2 $\alpha$  単独による分娩誘起 (PG)
- ③デキサメサゾン (20mg/cow) 投与の 24 時間後に PGF2 $\alpha$  を投与する分娩誘起 (DEX)
- ④トリアムシノロンアセトニド (0.017mg/kg i.m.) 投与 5 日後に PGF2 $\alpha$  とベタメタゾン (0.5mg/kg i.m.) を投与する分娩誘起 (BET)

胎子はすべて黒毛和種であり、妊娠牛は肉

用牛 (黒毛和種、アンガス種、交雑種) であった。

(2) タンパク質局在解析

胎盤節における TGFB1、TGFB2、TGFB3 およびその受容体 (TGFB1 および TGFB2)、ならびにフィブロネクチン (FN) の局在を免疫組織化学により解析した。

(3) 遺伝子発現解析

胎盤節を胎子胎盤 (COT) と母胎盤 (CAR) に分け、TGFB1、TGFB2、TGFB3 およびその受容体 (TGFB1 および TGFB2)、ならびに FN の mRNA 発現量をリアルタイム PCR により解析した。

4. 研究成果

(1) 分娩結果

すべての妊娠牛が分娩誘起処理の終了から 3 日以内に子牛を分娩した (表 1)。

PG、DEX および BET は SP に比較して在胎日数が有意に短かった。分娩終了から分娩までの時間は PG に比較して DEX および BET は有意に短かった。胎盤停滞の発生率に有意差はみられなかったが、PG が 71% と最も高く、次いで DEX と BET の発生率が 50% および 40% と高く、SP では胎盤停滞の発生がなかった。

以上の結果から、PG、DEX および BET の 3 群はいずれも自発的な分娩開始前の段階で人為的な誘起処理によって分娩し、分娩誘起処理時の胎盤も未成熟な状態であったと考えられた。本研究では、これらの未成熟な胎盤に対するグルココルチコイド投与の影響を評価した。

表 1 在胎日数と胎盤停滞発生率

分娩方法	頭数	分娩誘起開始時の妊娠日数	在胎日数	分娩誘起終了から分娩までの時間 (hr)	胎盤停滞発生数
SP	5	-	292 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	-	0 (0%)
PG	7	283 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	285 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	44 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	5 (71%)
DEX	6	278 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	281 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	26 $\pm$ 9 <sup>b</sup>	3 (50%)
BET	5	274 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	280 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	32 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	2 (40%)

異文字間に有意差あり (p<0.05)

(2) TGF- $\beta$  および TGF- $\beta$  受容体の局在

TGFB1 は胎盤節における母胎盤間膜と胎子絨毛膜板の血管に局在したのに対し、TGFB2 および TGFB3 は母胎盤および絨毛膜の上皮細胞に局在した (図 1)。

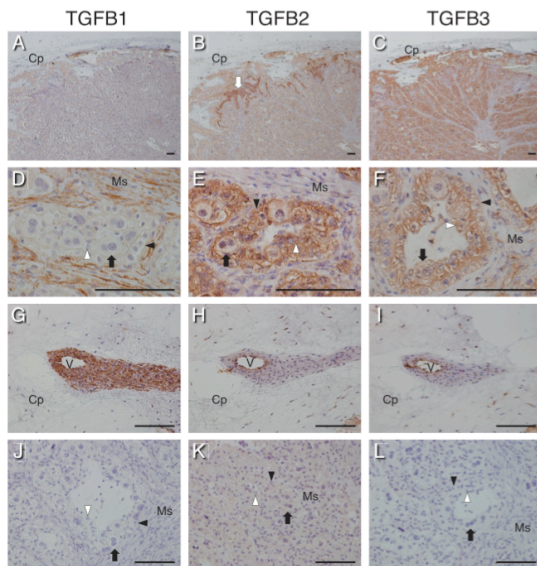


図1 ウシの分娩時胎盤節における TGF- $\beta$  の局在  
A-C (低倍率) および D-F (高倍率): 絨毛膜と母胎盤の結合領域、G-I: 絨毛膜板における血管、J-L: ネガティブコントロール  
矢印: 二核細胞、黒矢頭: 母胎盤上皮細胞、白矢頭: 絨毛膜上皮細胞、Ms: 母胎盤間膜、Cp: 絨毛膜板、スケールバー: 100 $\mu$ m

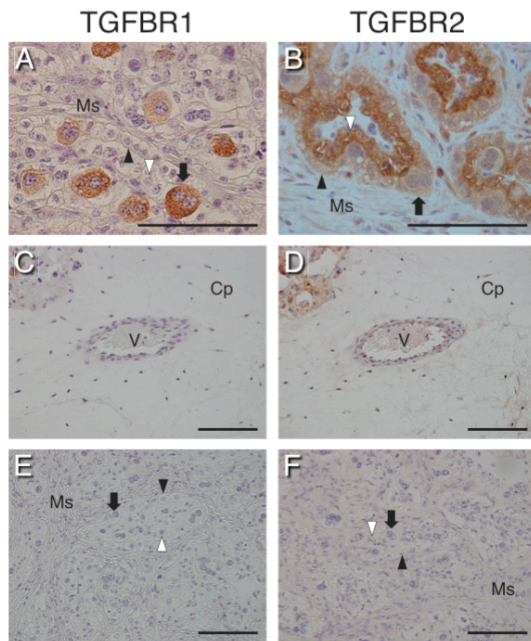


図2 ウシの分娩時胎盤節における TGF- $\beta$  受容体の局在

A および B: 絨毛膜と母胎盤の結合領域、C および D: 絨毛膜板における血管、E および F: ネガティブコントロール

矢印: 二核細胞、黒矢頭: 母胎盤上皮細胞、白矢頭: 絨毛膜上皮細胞、Ms: 母胎盤間膜、Cp: 絨毛膜板、スケールバー: 100 $\mu$ m

TGFBR1 は二核細胞に特異的に局在し、TGFBR2 は二核細胞を含む絨毛膜上皮細胞と母胎盤上皮細胞に局在した (図2)。

FN は絨毛膜板および母胎盤に広範囲に局在した。FN は絨毛膜の固有層や母胎盤の間膜にも局在した。

以上の結果から、分娩時の胎盤節の機能制

御において TGF $\beta$ 1 は TGF $\beta$ 2 および TGF $\beta$ 3 とは異なる作用を有することが示唆された。TGF- $\beta$  は TGFBR2 に結合し、さらに TGFBR1 と結合することによって SMAD 分子をリン酸化して核へのシグナル伝達を行う。分娩時の胎盤節では二核細胞においてのみ TGFBR1 と TGFBR2 が共存したことから、二核細胞の機能制御に TGF- $\beta$  が関与することが示唆された。

### (3)二核細胞数

SP の胎盤節における二核細胞数は、PG および DEX に比較して有意に少なく、BET はそれらの中間の値を示した (図3)。

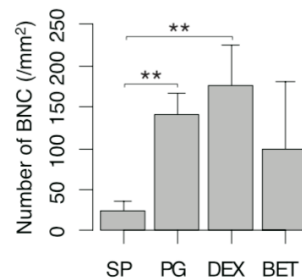


図3 分娩時胎盤節における二核細胞数

\*\* p<0.01

### (4)TGF- $\beta$ mRNA 発現量

SP は PG および DEX に比較して、COT における TGF $\beta$ 1 発現量が有意に低かった (図4)。TGF $\beta$ 1 発現量は、CAR においても SP の値が DEX よりも有意に低かった。

TGFBR1 の CAR における発現量は、SP の値が PG および DEX よりも有意に低かった (図4)。TGFBR2 の COT における発現量は、SP の値が PG および DEX よりも有意に高かった。

BET における TGF- $\beta$  およびその受容体の mRNA 発現量は、いずれも SP と PG あるいは DEX の中間の値を示した。

これらの結果から、トリアムシロンアセトニドとベタメタゾンの複合投与による分娩誘起は、TGF- $\beta$  およびその受容体の発現量を変化させ、自然分娩に近づける可能性が示唆された。

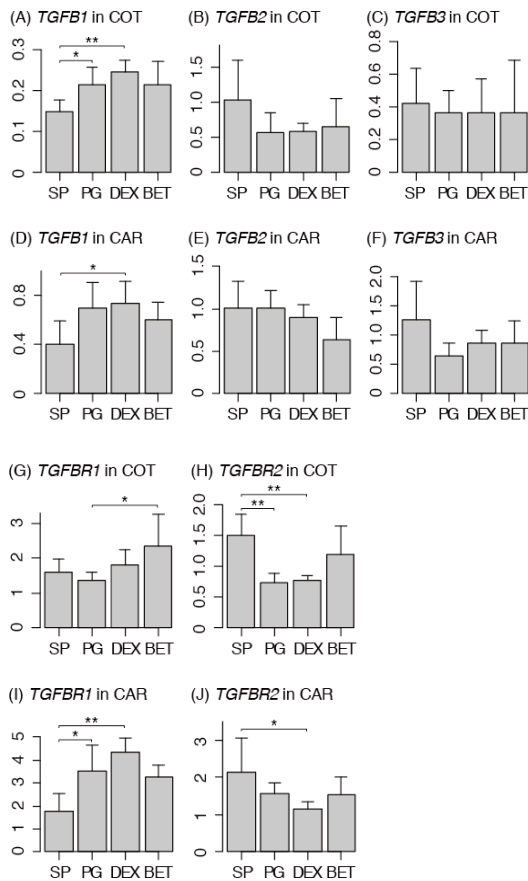


図 4 分娩時胎盤節における TGF- $\beta$  および TGF- $\beta$  受容体 mRNA 発現量に対する分娩誘起方法の影響

(5) フィブロネクチン mRNA 発現量

分娩時の胎盤節の CAR において、SP の FN 発現量は PG、DEX および BET のいずれに対しても有意に高い値を示した (図 5)。

母胎盤の間膜には TGFB1 が局在し、SP では TGFB1 発現量が低下したことから、TGFB1 が分娩時胎盤節における FN 発現の制御に関与する可能性が示唆された。

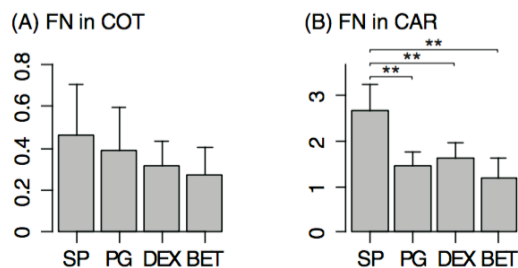


図 5 分娩時胎盤節におけるフィブロネクチン mRNA 発現量に対する分娩誘起方法の影響

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 1 件)

Hirayama H, Koyama K, Sawai K, Fujii T, Naito A, Fukuda S, Kageyama S.

Localization of TGF- $\beta$  and TGF- $\beta$  receptor in bovine term placenta and expression differences between spontaneous and induced parturition. *Placenta* 2015;36:1239–1245. 査読有  
DOI: 10.1016/j.placenta.2015.09.003

[学会発表] (計 1 件)  
平山博樹・澤井健・内藤学・福田茂夫・藤井貴志・陰山聡一、ウシの分娩時胎盤節における TGF- $\beta$  および受容体の発現解析、第 107 回日本繁殖生物学会大会、2014 年 8 月 23 日 (帯広畜産大学、北海道、帯広市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平山 博樹 (HIRAYAMA Hiroki)  
東京農業大学・生物産業学部・准教授  
研究者番号：60390861

(2) 連携研究者

福田 茂夫 (FUKUDA Shigeo)  
北海道立総合研究機構・畜産試験場  
・主査  
研究者番号：00390865

(3) 研究協力者

白砂 孔明 (SHIRASUNA Komei)  
東京農業大学・農学部・助教