

平成30年6月26日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07700

研究課題名(和文) ウシ胎盤剥離メカニズムの解明と応用技術の開発

研究課題名(英文) Study of placenta releasing mechanism in cows and its practical application.

研究代表者

鎌田 八郎 (KAMADA, HACHIRO)

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・主席研究員

研究者番号：70360443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：牛受精卵由来栄養膜細胞を用いて、有望な胎盤剥離誘導シグナル候補であるオキソアラキドン酸(KETE)の反応を調べた。栄養膜細胞コロニーにKETE(40 μ M)を添加すると細胞のシート状剥離が誘導され、その際MMP活性化とアポトーシス誘導が観察された。ビボの胎盤剥離においても同様の現象が見られており、KETEが胎盤剥離誘導シグナルとして働くことが強く支持された。一方、低濃度(5-10 μ M)のKETE添加では粒状変形と剥離浮遊が起き、この反応はプロテアーゼ阻害剤で抑制された。このことは低濃度のKETEが栄養膜細胞のプロテアーゼを活性化する事を示しており、分娩時の胎盤剥離において新しい機構を提供する。

研究成果の概要(英文)：The response of trophoblast cells derived from bovine blastocyst against 12-KETE (a candidate of signal for placenta release at delivery) was investigated. Addition of 12-KETE (40 μ M) to the cell colony of trophoblast induced a rapid exfoliation into a cell sheet. In this process, matrix metalloproteinase (MMP) activation and apoptosis induction were observed. These results are consistent with in vivo observations, and strongly support the idea that 12-KETE is a placenta releasing signal. On the other hand, a low concentration (5-10 μ M) of 12-KETE addition induced a spherionization and subsequent floating of trophoblast. This reaction was suppressed by protease inhibitor. Activation of protease by low 12-KETE may propose the new idea on the placenta releasing mechanism at delivery.

研究分野：牛の分娩管理

キーワード：ウシ 胎盤 オキソアラキドン酸 栄養膜細胞

1. 研究開始当初の背景

畜産の生産現場では繁殖成績の低下に苦しんでおり、繁殖障害の克服、受胎率の向上が今最も求められている技術である。繁殖障害は分娩前後に頻発するが、そのひとつに分娩後不要になった胎子胎盤が排出されない病態である胎盤停滞がある。胎盤停滞が発生すると、胎子胎盤は子宮内に留まりゆっくり軟化分解するため子宮内膜炎を誘発し、泌乳量の低下、子宮回復の遅延による受胎率の低下等により畜産農家に大きな経済的損失を与える(一般農家において7~15%の確率で発生)。試算では1例あたり3万円強の損失が出るとされる。その原因は種々想定されているが、分娩後に胎子胎盤と母胎盤の分離が正常に行われないことが主因であり、何らかの原因で分離メカニズムが働いていない事が予想される。また農家を深夜早朝の分娩介護から解放し、適切な分娩介護の実施により子牛の損耗率を低減する目的で分娩誘起により昼分娩を達成する技術があるが、その際頻発する胎盤停滞の防止技術が求められている。

一方、胎盤剥離メカニズムに関するこれまでの知見は乏しい。胎盤は母体にとって免疫的に異物である胎子を一時的に母体の異物排除機構から保護し育てる器官であり、胎子が体外で生存できる状態になると役目を終えて排出される。胎盤剥離にはマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)系の関与が推定されているが詳細は不明であり、MMP活性化誘導シグナルも未知であった。申請者はこれまでの検討からすでに有望なシグナル伝達物質(オキソアラキドン酸:12-oxoETE)を世界に先駆けて発見しており、一定の条件下ではあるがウシを使った動物実験で胎盤の剥離排出誘導に成功している。

2. 研究の目的

本課題では、ウシの分娩時胎子娩出後の胎盤剥離排出機構を明らかにし、その知見を用いた新しい胎盤剥離技術を開発する事を目的とする。分娩時の胎子の娩出に関するメカニズムはよく理解されているが、不要になった胎盤の剥離排出に関する知見は乏しい。胎子は娩出されるが胎盤が排出しない胎盤停滞という病態が存在することやプロスタグランジン(PG)等を用いた人為的な分娩誘起でも胎盤停滞が頻発することから、胎子の娩出とは別に胎盤剥離を誘導する未知のシグナルの働きが予想される。胎盤剥離機構の解明と剥離誘導技術の開発は、ウシの繁殖成績の向上及び農家の労働負担軽減に寄与することが期待される。

3. 研究の方法

(1) 栄養膜細胞の調製

妊娠末期の胎盤から調製した胎盤実質細胞の培養が極めて困難と報告されていること、胎盤の入手機会も限られていることから、

当研究所で入手しやすい受精卵由来の栄養膜細胞を試験に用いた。培養液は10%胎児血清を含むDME Mを用い、5%炭酸ガス95%空気、38.5度で培養した。

(2) 12-KETE に対する反応

栄養膜小胞を播種し、フィーダー細胞(胎盤由来線維芽細胞)のある場合(重層)ない場合(単層)についてそれぞれ栄養膜細胞コロニーを形成させた。12-KETEを含む胎児血清を含まない培養液に交換して形態変化を観察した(胎児血清に含まれるTIMPはMMPを阻害する)。MMPの活性を調べる場合は蛍光標識したコラーゲンを混合した培養液で2時間処理した後、いったん洗浄後12-KETE 処置し、経時的に蛍光顕微鏡観察を行った(内部消光している蛍光がコラーゲンの分解により観察できる)。初期アポトーシスの検出はYoPro-1とPropidium iodide(PI)の2重染色で行った(12-KETE 処置4時間後に蛍光顕微鏡観察)。アポトーシス細胞はYoPro-1で染色されるがPIでは染色されない。後期アポトーシスの検出は12-KETE 処理翌日にTUNEL染色法で行った。遺伝子発現は12-KETE 処理4時間後にRNAを抽出し、逆転写反応でcDNAを作成後qPCRで測定した。プライマーセットは以下を用いた。

GAPDH : F, 5' -CAGCAATGCATCCTGCAC-3'
 R, 5' -GAGTTGCTGTTGAAGTCACAGG-3'
 Bax : F, 5' -GCCCTGTCTGCTCCTTTGTCC-3'
 R, 5' -TGGCGAGGAGCTGGTCTGG-3'
 Casp-3 : F, 5' -GAGCCTGTGAGCGTCTTTT-3'
 R, 5' -TGTTGCTGAGGATGACATGG-3'
 Bcl-2 : F, 5' -CGACTTTGCAGAGATGTCCA-3'
 R, 5' -TAGTTCACAAAGGCATCCC-3'
 PAG : F, 5' -ACGGCATCAACTACCCAGTG-3'
 R, 5' -GGAGTGCCCAAAGTGTGAGT-3'
 Cdx-2 : F, 5' -GCCACCATGTACGTGAGCTAC-3'
 R, 5' -ACATGGTATCCCGTAGTC-3'

阻害剤等は培養液中に12-KETEと混合して使用した。

(3) ハプトグロブリン

ホルスタイン乳牛を用い分娩後2週間程度毎日採血を実施し、血漿中のハプトグロブリン量を牛用EIAキットで測定し、自然分娩牛(n=5)、分娩誘起胎盤停滞牛(n=6)、自然発生胎盤停滞牛(n=3)、胎盤剥離誘導牛(n=5)について比較した。

(4) 経産牛の胎盤剥離誘導

対照区で確実に胎盤停滞が発生するように、分娩予定7日前にプロスタグランジンを臀部筋肉内注射して分娩を誘起した(3年間で計25頭)。分娩の時刻を知るために、膣内温度センサを用いた市販の分娩警報装置および分娩監視カメラを用いた。基本的な試験条件として胎子の娩出後4時間に12-KETEを含む薬液を頸静脈から注入し、その後胎盤の排出の有無を観察した。注入後カテーテルを用いて連続採血し、血漿中12-KETEを高速度体クロマトグラフィー(HPLC)で分析した。血漿をイオン交換水で希釈しpHを約3に合

わせた後、Sep-Pak C18 カートリッジカラムに吸着させ、水洗浄後に酢酸エチル:メタノール(9:1)で抽出し、窒素気流で乾固後メタノールに溶解してSymmetry C18 columnに供した。移動相は85%メタノールを用い、検出波長は280nmで行った。

4. 研究成果

(1) 栄養膜細胞の調製

ウシ受精卵をフィーダー細胞なしで培養液DMEEMで培養すると接着せず数日で黒化退行した。フィーダー細胞として子宮上皮細胞を用いると、受精卵は上皮細胞の剥離浮遊を誘導し培養を継続できなかつた。フィーダー細胞として胎盤由来の線維芽細胞を用いると、受精卵は接着しコロニー形成したが、コロニーは次第に退行した。それに対し、子宮上皮細胞と胎盤線維芽細胞の混合培養系で受精卵を培養した場合は、接着・コロニー形成し長期に維持できた。コロニーからは小胞が形成され、浮遊再接着し再びコロニー形成した。小胞を子宮上皮細胞(フィーダー細胞)培養へ移すと、数日後孫小胞を形成し子宮上皮細胞に接着、コロニー形成したが、重層構造はできなかつた。このコロニーも小胞を形成し、胎盤線維芽細胞(フィーダー細胞)培養に移すと、接着、コロニー形成した。形成した栄養膜細胞コロニーは胎盤線維芽細胞上に重層していた。培養が進むと盛んに小胞を形成するようになり、これを用いてフィーダー細胞なしで3年以上の継代が可能であった。また緩慢凍結容器を用いて凍結保存も可能だった。得られた栄養膜細胞はギムザ染色、ヘキスト染色により2核細胞を含むことが観察された。またqPCR解析により胎盤特異的遺伝子であるPAG、Cdx-2が発現していた(対照として分析した子宮上皮細胞および胎盤由来線維芽細胞ではほとんど発現していなかつた)。

(2) 12-KETEに対する反応

フィーダー細胞なしあるいは胎盤線維芽細胞上に形成された栄養膜細胞コロニーに対し、12-KETEを添加すると、高濃度(40 μ M)では数時間後にシート状の細胞剥離が誘導された。その際、蛍光標識コラーゲンの分解が観察され、生体内コラーゲナーゼであるMMPが活性化されたことが示された。また初期アポトーシスの指標である細胞膜の非対称性の破壊が蛍光色素の取り込みで確認された。さらに後期アポトーシスの指標であるDNAの断片化もTUNEL染色法で確認できた。一方、qPCRを用いて遺伝子発現を調べたところ、12-KETEの添加でアポトーシス促進因子であるBaxのGAPDHに対する比の上昇が示された。しかしCaspase-3の発現には差がなく、転写後調節を受けるとする説を支持した。一方、アポトーシス抑制因子であるbcl-2の発現は12-KETE添加の有無にかかわらずBaxの1/500程度と低かつた。これらの結果から高濃度12-KETEの添加は栄養膜細胞

のMMP活性化とアポトーシス誘導を引き起こすことが示された。これらは分娩後排出された胎盤で報告されている現象と一致した。

一方、低濃度(5-10 μ M)の12-KETEを添加した場合、栄養膜細胞はフィーダー細胞なしの場合でも胎盤線維芽細胞に重層した場合でも粒状に剥離浮遊した。この際蛍光標識コラーゲンの分解は弱く、アポトーシス細胞も少なかつた。しかしプロテアーゼ阻害剤であるPefablocがこの反応を抑制した。従来、胎子娩出後の胎盤剥離過程ではMMPやアポトーシスが機能していると考えられてきたが、低濃度の12-KETEが栄養膜細胞のプロテアーゼを活性化したことは、胎盤剥離メカニズムにおいて新しい可能性を示した。

12-KETEによる栄養膜細胞の剥離誘導は、エストラジオール17あるいはエストリオールの添加で抑制された。これは分娩末期血中エストロジェンが高い期間に胎盤剥離が起きないように寄与しているのかもしれない。

(3) ハプトグロブリン

これまでに胎盤剥離誘導に成功した初産牛の血中ハプトグロビン(炎症蛋白)を、自然分娩牛、分娩誘起胎盤停滞牛、自然発生胎盤停滞牛と比較したところ、胎盤が停滞した場合、胎盤が子宮内に残っている期間は血中ハプトグロビン濃度が高く維持されている事が示された。12-KETE投与で胎盤が迅速に排出されるとハプトグロビンの低下も早かつた。

(4) 経産牛の胎盤剥離誘導

経産牛の場合初産牛と同じ条件では胎盤の剥離排出は起こらなかつた。注入時間を胎子娩出後2~8時間に広げても効果はなく、またシグナルの持続時間を長くする目的で12-KETE1また2mgを1分おきに30回投与したが効果がなかつた。自然分娩ではシグナルは数時間持続するが、薬液の注入で再現することは困難だった(薬剤単価が高いため)。単回注入の12-KETEは数分で血中から代謝消失するが、連続注入した場合血中濃度は単回注入の2倍程度に上昇した。また同量の注入でも経産牛の血中最高濃度は初産牛より低かつた。

<参考文献>

Kamada H, Matsui Y, Sakurai Y, Tanigawa T, Itoh M, Kawamoto S, Kai K, Sasaki T, Takahashi K, Hayashi M, Takayama Y, Nakamura M, Kadokawa H, Ueda Y, Sutoh M, Murai M. Twelve oxoeicosatetraenoic acid induces fetal membrane release after delivery in cows. *Placenta* 2012; 33:106-113.

Hirayama H, Ushizawa K, Takahashi T, Sawai K, Moriyasu S, Kageyama S, Miura R, Matsui M, Fukuda S, Naito A, Fujii T, Minamihashi A. Differences in apoptotic

status in the bovine placentome between spontaneous and induced parturition. J. Reprod. Dev. 2012; 58:585-591.

Maj JG. and Kankofer M. Activity of 72-kDa and 92-kDa matrix metalloproteinases in placenta tissues of cows with or without retained fetal membranes. Placenta 1997; 18:682-687.

Eiler H. and Hopkins FM. Successful treatment of retained placenta with umbilical cord injections of collagenase in cows. JAVMA 1993; 203:436-443.

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計4件)

69th EAAP(2018) 「In vitro effects of 12-oxoETE on trophoblast cells derived from bovine blastocyst.」 Kamada H., No.24, (査読あり)

第123回日本畜産学会(2017) 「12オキソアラキドン酸は栄養膜細胞のMMP活性化とアポトーシスを誘導する。」 鎌田八郎。講演要旨p84。

67th EAAP(2016) 「Trial of construction of the in vitro model to analyze placental separation at delivery.」 Kamada H., Matoba S, Takahashi H. No.22, p635. (査読あり)

66th EAAP(2015) 「Effects of fetal membrane release induced by 12-oxoETE injection after delivery on the postpartum dairy cow performance.」 H.Kamada, Y.Matsui. No.21, p282. (査読あり)

6. 研究組織

(1)研究代表者

鎌田 八郎 (KAMADA, Hachiro)

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・家畜育種繁殖研究領域・主席研究員

研究者番号：70360443