

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08059

研究課題名(和文)ウシの胎盤形成におけるアドレノメデュリンの機能解明と後期胚死滅の予察への展開

研究課題名(英文) Investigation of the functional role of adrenomedullin in bovine placental development and its application for the prediction of late embryonic death

研究代表者

林 憲悟 (HAYASHI, Ken-Go)

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・主任研究員

研究者番号：70563625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アドレノメデュリン(AM)は多岐にわたる生理活性作用を有する血管作動性ペプチドである。本研究は、AMのウシ胎盤形成における機能調節因子としての役割を検証するとともに、母体血中AM動態と後期胚死滅との関連性を明らかにすることで、AMの後期胚死滅の指標としての有用性を検証することを目的とした。その結果、胎盤形成期および胚死滅の経過に伴う母体末梢血中AM動態の詳細が明らかとなり、AMが後期胚死滅を予察する指標となり得る可能性が示された。また、ウシ栄養膜細胞において、AMは遊走や浸潤を促進することにより、胎盤形成に伴う組織リモデリングに關与する機能調節因子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

雌牛における後期胚死滅の発生は畜産経営に多大な損失を及ぼすにも関わらず、現在まで有効な評価手法の開発には着目されていない。本研究により、母体の末梢血中AM濃度による後期胚死滅発生の予察の可能性が示されたことは、空胎日数を短縮することによる雌牛の生産効率改善に資する技術の開発のための基盤的知見となる。また、AMにより制御される、栄養膜細胞を中心としたウシの胎盤形成メカニズムの局所調節機構の詳細が明らかとなり、雌牛の繁殖生理において、胎盤形成の主要調節因子としてのAMという新しい概念が裏付けられた。

研究成果の概要(英文)：Adrenomedullin (AM) is a multifunctional vasodilator peptide and expressed in bovine placenta. This study aimed 1) to determine the functional role of AM in bovine placental development and 2) to validate AM as a possible marker for the prediction of late embryonic death by investigating the relationship between maternal circulating AM dynamics and late embryonic death. Maternal circulating AM showed characteristic changes during placental development and the process of embryonic death. This finding suggests that the patterns of maternal AM concentrations may be a possible marker for the prediction of late embryonic death in cattle. In addition, the results of present study also demonstrate that AM plays a crucial role in the regulation of tissue remodeling associated with placental development by promoting migration and invasion of the trophoblast cells in cattle.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：ウシ 胎盤 アdreノメデュリン 妊娠 胚死滅

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウシの着床とその後の胎盤形成は、受精後に伸長して子宮内を浮遊している胚が、妊娠 3 週間目頃に子宮内膜表面に接着することで開始する。一方で、着床開始後、妊娠 17~42 日目に胚が死滅して不受胎になることを「後期胚死滅」と呼び、その発生率はウシの全不受胎のおよそ 15%とされている。後期胚死滅は正常な発情間隔(通常約 21 日)を超えて発情が回帰するため、発情周期の延長が見られない着床前の胚死滅(早期胚死滅)の場合よりも、再度の人工授精と受胎までの日数(空胎日数)が大幅に延長する。後期胚死滅の発生は、着床期から機能的な胎盤形成の開始時期と一致していることから、胎盤形成不全がその一因であることが示唆されているが、その発生機序の詳細は未だ不明のため、有効な予察法や予防法の確立には至っていない。

ウシを含む反芻類の着床と胎盤形成では、子宮内膜の子宮小丘と呼ばれる隆起部に胚の栄養膜が侵入・融合したごぶし様の胎盤が多数形成され、その形成段階において大幅な組織リモデリングを伴うとともに、二核細胞の出現が最大の特徴である(ウシでは妊娠 25 日目頃)。この細胞は遊走して子宮内膜上皮細胞と融合するとともに、胎盤特異的ホルモン並びに各種ステロイドホルモンを産生し胎盤機能の中心を担う。しかし、その出現機序や遊走機序などの細胞機能の詳細は明らかにされていない。さらに、胎盤は短期間で高度な血管網を構築することから、近年、ウシの胎盤における血管系の重要性が注目されている。研究代表者は、強力な血管拡張作用に加え、血管新生、アポトーシス調節、細胞の増殖や分化、遊走など非常に多岐にわたる生理活性作用を有する血管作動性ペプチドの一つである「アドレノメデュリン(AM)」についてその多機能性に着目し、ウシ胎盤における AM の関与についてこれまでに以下の知見を明らかにしている(引用文献)。

- (1) 胎盤局所で産生された AM は妊娠期間を通して母体の末梢血中に反映する。
- (2) 胚および胎盤局所の AM は、着床後から胎盤形成にかけて活発に作用している。
- (3) ウシ胎盤における AM は二核細胞に特異的で、パラクリン/オートクリン作用により栄養膜細胞や子宮内膜細胞の機能調節に関与している。

2. 研究の目的

上記の学術的背景とこれまでの研究成果から、AM のウシ胎盤におけるさらなる生理的役割として以下のことが推察された。

- (1) 胎盤形成において、AM は栄養膜細胞及び子宮細胞の増殖だけではなく、これらの細胞の浸潤等による組織リモデリングの調節にも関与する。
- (2) 胎盤形成不全による後期胚死滅が生じた場合は、母体末梢血中に AM 動態の異常として反映される。

そこで本研究では、AM がウシ胎盤形成における主要な機能調節因子として生理的役割を担うことを実証するとともに、胎盤形成期の母体末梢血中 AM 動態と後期胚死滅の発生との関連性を明らかにすることで、末梢血中 AM 濃度の後期胚死滅発生を予察する指標としての有用性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 母体末梢血中 AM 濃度の後期胚死滅の発生を予察する指標としての有用性の検証

妊娠初期における末梢血中 AM 動態の把握と後期胚死滅牛における変化の解析

ホルスタイン種未経産牛および黒毛和種経産牛に人工授精を施し、人工授精から 21 日目までは 7 日毎、その後は 60 日目まで 3 日毎に採血を行った。カラードップラー超音波画像診断装置を用いた妊娠鑑定を人工授精後 35 日目および 60 日目に行い、60 日目まで妊娠の継続が確認された牛を妊娠牛、35 日目から 60 日目の間に胚の死滅が確認された牛を後期胚死滅牛とした。血中の AM、胎盤で産生される血管作動性物質の一つであるエンドセリン 1 (ET1)、胎盤特異的タンパク質である妊娠関連糖タンパク質 1 (PAG1) 濃度を市販の ELISA キットにより、黄体ホルモンであるプロゲステロン (P4) 濃度を時間分解蛍光法により測定した。

胚死滅の経過に伴う血管作動性物質を含む母体の末梢血中内分泌動態の解析

妊娠 40 日目の黒毛和種雌牛 4 頭の子宮内に高張食塩水 100ml を投与することで胚死滅を誘起した。胚死滅誘起前(0 時間) 誘起後 2 時間、6 時間、1、2、3、4、7、10 および 14 日目に、カラードップラー超音波画像診断装置を用いて卵巣(黄体退化) 子宮(妊娠腔および胎膜) および胎仔(心拍動および血流)の状態を観察するとともに採血を行い、上記と同様の手法で AM、ET1、PAG1 および P4 の血中動態を解析した。

- (2) ウシの胎盤形成における、主要な機能調節因子としての AM の生理的役割の解明

AM がウシ栄養膜細胞の遊走能および浸潤能に及ぼす効果の検証

24 ウェルセルカルチャーインサート(ポアサイズ 8.0 μ m)を使用した細胞遊走アッセイ、およびマトリゲル基底膜マトリックス(コーニング社)をコートしたセルカルチャーインサートを使用した細胞浸潤アッセイにより検証した。インサート内に 1 \times 10⁵ 個のウシ栄養膜細胞株(BT-1 細胞)を播種し、AM(0、10、100nM)および AM(100nM)+AM アンタゴニスト(AM(22-52): 1000nM)を添加して 72 時間培養した(n=6)。各インサートは非遊走細胞または非浸潤細胞

胞を除去後にヘマトキシリンで染色し、高倍率視野の顕微鏡下でランダムに抽出した 6 視野の遊走細胞数または浸潤細胞数を計測し平均値を算出した。

AM がウシ栄養膜細胞におけるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 発現および活性に及ぼす効果の検証

BT-1 細胞に AM (0、10、100nM) および AM (100nM) + AM アンタゴニスト (1000nM) を添加して 24 時間培養した後、細胞ライセートにおける MMP (MMP-2、-9、-13、-14) とその調節因子 (TIMP-1、-2 および CD44) の遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR により解析するとともに、MMP 活性を Amplitude Universal Fluorimetric MMP 活性測定キット (AAT Bioquest 社) を用いて解析した (n=6)。

AM がウシ栄養膜細胞と子宮内膜上皮細胞の接着に及ぼす効果の検証

ウシ子宮内膜上皮細胞を播種した細胞培養プレートに、蛍光色素 (CytoTracker™: Cell Biolabs 社) をラベリングした BT-1 細胞を加え、AM (0、10、100nM) および AM (100nM) + AM アンタゴニスト (1000nM) を添加して 24 および 48 時間共培養した。共培養後に非接着細胞を除去し、接着細胞を溶解して蛍光強度を測定した (n=5)。

4. 研究成果

(1) 母体末梢血中 AM 濃度の後期胚死滅の発生を予察する指標としての有用性の検証

妊娠初期における末梢血中 AM 動態の把握と後期胚死滅牛における変化の解析

妊娠鑑定の結果、妊娠牛は 19 頭 (ホルスタイン種 12 頭、黒毛和種 7 頭)、後期胚死滅牛は 3 頭 (ホルスタイン種 2 頭、黒毛和種 1 頭) だった。ホルスタイン種および黒毛和種ともに、血中 AM 濃度は PAG1 や P4 濃度と同様に非妊娠時 (人工授精直前) と比較して妊娠 4 週目から 2 倍程度の増加が見られたが、妊娠に伴う血中 AM 濃度の増加率は PAG1 濃度や P4 濃度よりも小さかった (図 1)。これは、AM が PAG1 や P4 のような胎盤や黄体の組織特異的なホルモンでは無いと推察された。一方で、後期胚死滅牛において血中 AM および PAG1 濃度の妊娠に伴う顕著な増加は見られず、胚死滅確認時 (60 日目) の血中濃度は非妊娠時と同様であった。血中 ET1 濃度は非妊娠時と妊娠初期で変化は無く、胚死滅牛における変化も見られなかった。

胚死滅の経過に伴う血管作動性物質を含む母体末梢血中の内分泌動態の解析

胚死滅誘起後、胎心拍動および血流は 6 時間以内に消失し、子宮の妊娠腔の消失と黄体退行は 10 日目に観察された。発情は胚死滅誘起後 12~14 日目に回帰した。血中 AM 濃度は胚死滅誘起後 2 日目から減少した。一方、血中 PAG1 濃度および P4 濃度は胚死滅誘起後 10 日目以降に減少した (図 2)。血中 ET1 濃度は胚死滅による変化はなかった。この結果から、後期胚死滅後の母体において、血中 AM 濃度は PAG や P4 よりも早期に減少することが初めて明らかとなり、胚死滅発生の指標として有用である可能性が示された。

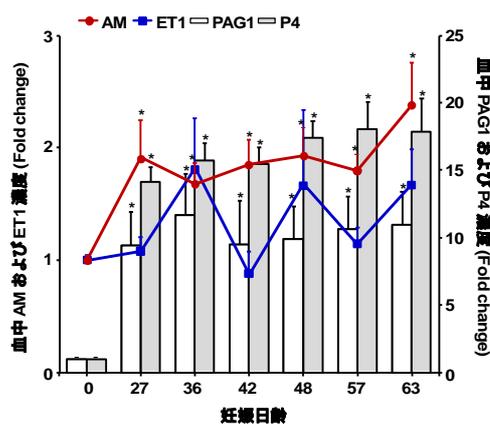


図 1. 黒毛和種経産牛における妊娠初期の血中 AM、ET1、PAG1 および P4 動態の変化

* : 非妊娠時と比較して有意差あり (P<0.05)

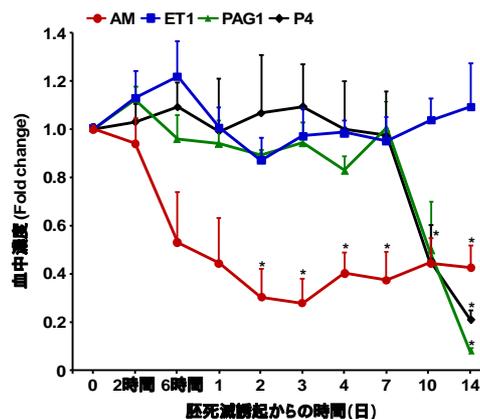


図 2. 胚死滅誘起後の血中 AM、ET1、PAG1 および P4 動態の変化

* : 胚死滅誘起前と比較して有意差あり (P<0.05)

(2) ウシの胎盤形成における、主要な機能調節因子としての AM の生理的役割の解明

AM がウシ栄養膜細胞の遊走能および浸潤能に及ぼす効果の検証

BT-1 細胞の遊走は AM (100nM) 添加により、浸潤は AM (10、100nM) 添加によりそれぞれ促進された (図 3)。これにより、AM は栄養膜細胞の遊走や浸潤を促進することで、ウシ胎盤形成における組織リモデリングの調節に関与する可能性が初めて示された。

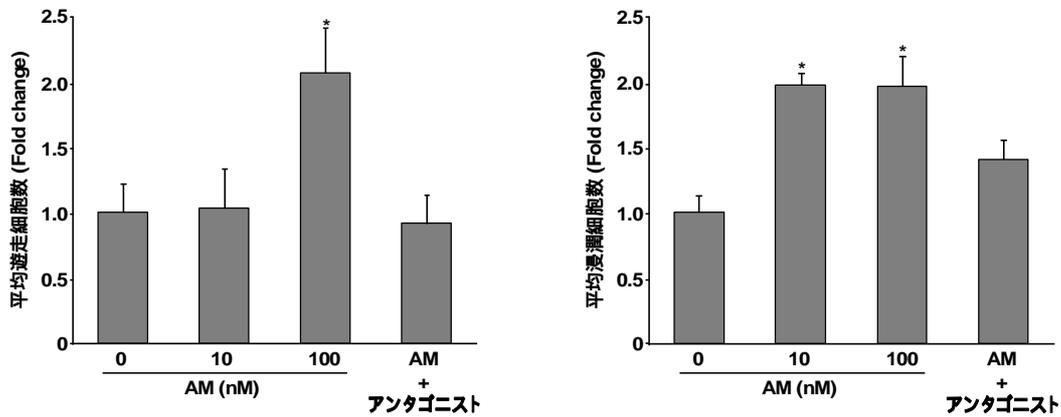


図 3. AM が BT-1 細胞の遊走能および浸潤能に及ぼす効果
* : AM 0nM 区と比較して有意差あり (P<0.05)

AM がウシ栄養膜細胞の MMP 発現および活性に及ぼす効果の検証

BT-1 細胞における MMP-9 および CD44 mRNA 発現量は AM (10、100nM) 添加により、MMP-14 mRNA 発現量は AM (100nM) 添加によりそれぞれ増加した。また、細胞における MMP 活性は AM (10、100nM) 添加により増加した。この結果から、AM はウシ栄養膜細胞において MMP の産生や活性化を介して細胞外基質の分解を亢進することにより、細胞の遊走や浸潤を促進していると推察された。

AM がウシ栄養膜細胞と子宮内膜上皮細胞の接着に及ぼす効果の検証

子宮内膜上皮細胞と BT-1 細胞の接着において、AM 添加による効果は見られなかった。したがって、AM はウシ胎盤形成における栄養膜細胞と子宮内膜上皮細胞の接着には積極的に関与していない可能性が示された。

<引用文献>

Hayashi KG, Hosoe M, Sakumoto R, Takahashi T. Temporo-spatial expression of adrenomedullin and its receptors in the bovine placenta. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2013, 11; 62.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林憲悟, 細江実佐, 作本亮介
2. 発表標題 アドレノメデュリンがウシ栄養膜細胞株の遊走能および浸潤能に及ぼす効果
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----