

平成21年5月15日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18780213

研究課題名（和文） 体細胞クローン胎子の胎盤機能に関する基礎研究：分娩遅延の要因解明

研究課題名（英文） Study on the placental function of somatic clone fetuses: the possible cause of prolonged gestation

研究代表者

平山 博樹（HIRAYAMA HIROKI）

北海道立畜産試験場・基盤研究部・受精卵移植科

研究者番号：60390861

研究成果の概要：

体細胞クローン胎子の受胎牛は、分娩兆候が弱く難産が起こりやすい。そこで母牛の血中ホルモン濃度や胎盤機能からその原因の解明を試みた。クローン胎子を受胎した牛は、妊娠末期になっても産道の軟化や乳房の発達に必要なエストロジェンの血中濃度が低く、反対に不活性型のエストロジェンの濃度が高いことから、低い活性型/不活性型エストロジェン比が分娩兆候の微弱化の原因であると考えられた。これは、胎盤におけるエストロジェンの活性を制御する遺伝子の発現に異常があることが原因であり、その他にも分娩の進行に関連する遺伝子の発現異常が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,000,000	0	1,000,000
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	360,000	3,860,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：クローン牛、胎盤、エストロジェン、分娩

## 1. 研究開始当初の背景

体細胞クローン（以下クローンとする）牛は遺伝子導入、家畜増殖および家畜改良等への活用を目的として研究が進められている。しかし、その生産効率は低く、要因としてクローン胚の生産効率、流死産あるいは異常分娩の発生等、様々な段階での損耗が挙げられる。これらの要因のうち、着床前のクローン胚に関する研究は世界的に実施されており、

我々のグループでもクローン胚の遺伝子発現に関する研究を進めている。一方で、過大子や流死産など受胎後の胎子にみられる異常に関する研究は進んでいない。また、クローン受胎牛に頻発する分娩遅延は難産を引き起こし、生産現場では産子や母牛の損耗が経済的および労力的に大きな損失となっている。今後、クローン技術に寄せられる社会的ニーズに対応するためには、最終的な生産物であるクローン牛の健全性を高め、生産物

率を向上させる必要がある。本研究は、クローン受胎牛にみられる分娩遅延の要因解明を目的として実施した。

## 2. 研究の目的

申請者は、クローン受胎牛に明瞭な分娩兆候が見られない理由として、①分娩機構の内分泌学的異常および②胎盤における遺伝子発現異常を想定し本研究計画を立案した。本研究では、クローン受胎牛の胎盤機能を内分泌学的および分子生物学的に解析し、分娩遅延の要因を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) クローン子牛の生時体重および生存率とコルチゾル分泌能

分娩誘起処理後に経膣あるいは帝王切開により分娩したクローン子牛の生時体重を記録し、生後7日目での生存率を調査した。出生直後、2日目および7日目における血漿コルチゾル濃度を測定した。

### (2) クローン受胎牛における分娩時のホルモン動態

クローン受胎牛の妊娠257日目、271日目、分娩誘起開始前、分娩誘起2日目および分娩直前の血漿エストロン(E1)、エストラジオール17β(E2)、エストロンサルフェート(E1S)、プロジェステロン(P4)濃度を測定した。

### (3) 胎盤におけるエストロゲン合成と活性制御

分娩時に採取した胎子胎盤および母胎盤におけるアロマトラーゼ(CYP19)、サルファトランスフェラーゼ(SULT1E1)およびサルファターゼ(STS)の遺伝子発現量を解析し、発現部位を組織学的に解析した。胎盤に存在する二核細胞数を調査した。

### (4) 胎盤におけるプロスタグランジン合成関連遺伝子の発現解析

分娩時に採取した胎子胎盤および母胎盤におけるシクロオキシナーゼ2(COX2)、プロスタグランジンFシンターゼ(PGFS)およびプロスタグランジンEシンターゼ(PGES)の遺伝子発現を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) クローン子牛の生時体重および生存率とコルチゾル分泌能

クローン子牛の生時体重と生存率を表1に示した。

クローン子牛の生時体重は、対照牛に比較して有意に重かった。出生後7日目のクロー

ン子牛の生存率は50%と低く、経膣よりも帝王切開で分娩したクローン子牛で低い傾向を示した。

表1 クローン子牛の生時体重および生存率

子牛	分娩方法	供試頭数	生時体重 (kg)	生存率 <sup>1)</sup>
クローン	経膣	19	43.3±2.1	63%
	帝王切開	15	57.9±3.0	33%
	合計	34	49.7±2.1 <sup>a</sup>	50% <sup>b</sup>
対照	経膣	9	29.0±1.6 <sup>b</sup>	100% <sup>a</sup>

1) 生後7日目の生存率

a,b: クローン合計と対照の間に有意差あり (p<0.01)

子牛の血漿コルチゾル濃度は、分娩後のいずれの時期においても、各群間に有意差はみられなかった。分娩直後には、帝王切開によるクローン子牛のコルチゾル濃度が低い傾向を示したが、産道を通するストレスを受けていないことが原因と推察された。

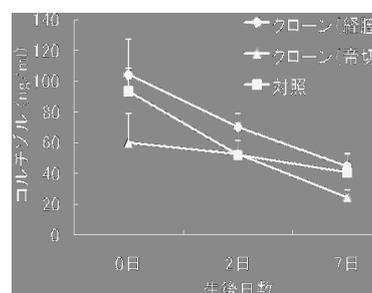


図1 分娩後のクローン子牛における血中コルチゾル濃度

以上のように、クローン子牛では生時体重が有意に増加しており、生後7日目までの生存率が低かった。これらの異常は、分娩前のクローン胎子におけるコルチゾルの分泌不足が原因ではないかと推察された。しかし、分娩後のクローン子牛の血中コルチゾル濃度は正常な値を示しており、少なくとも本試験で分娩誘起処理を行なった胎齢において、分娩時のクローン子牛ではコルチゾルの生産能力に問題がないことが確認された。

### (2) クローン受胎牛における分娩時のホルモン動態

クローン受胎牛の血漿E1およびE2濃度は、対照牛に比較して低い値を示した。血漿E1S濃度は、対照牛では分娩直前に上昇したのに対し、クローン受胎牛では分娩誘起処理前から上昇を開始し、分娩直前まで対照牛に比較して高い値を示した。E1/E1S比は、経膣分娩したクローン受胎牛はわずかなE1/E1S比の上昇を示したものの、帝王切開により分娩したクローン受胎牛ではE1/E1S比の上昇が認められなかった(図2)。

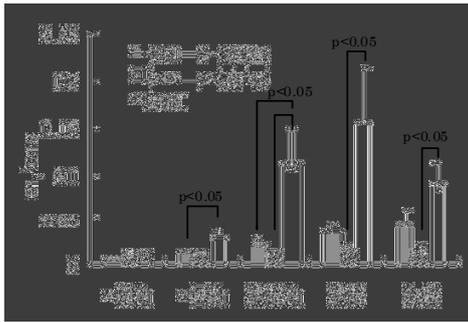


図2 クローン受胎牛の血中 E1/E1S 比

血漿 P4 濃度は、分娩誘起処理以降に低下し、各群間に差はみられなかった。

以上の結果から、クローン受胎牛では分娩前の血中活性型エストロゲン濃度の上昇が十分ではなく、分娩遅延が発生する要因のひとつと考えられた。クローン受胎牛では、血中 P4 濃度は分娩前に低下していることから、分娩誘起処理による黄体の退行は正常に進行していたと考えられた。

一般に、生時体重、胎盤重量および母体血中 E1S 濃度が正の相関を示すことが知られている。クローン受胎牛では、胎盤の直径や重量が増すと報告があり、本試験においても生時体重の増加と母体血中 E1S 濃度の上昇がみられることから、すべて一般牛にみられる現象と一致する。一方、一般牛では分娩前に活性型と不活性型のエストロゲン濃度がいずれも上昇するのに対し、クローン受胎牛では活性型のエストロゲン (E1 および E2) 濃度の上昇が少なく、エストロゲンの合成や活性化に異常があることが考えられた。また、クローン受胎牛の血中 E1S 濃度が高く、E1/E1S 比が低いことから、エストロゲンへの硫黄分子の結合により、活性型のエストロゲン (E1 および E2) 濃度の上昇が妨げられていることが示唆された。

クローン受胎牛の血中 E1/E1S 比は、経膣で分娩した個体よりも帝王切開で分娩した個体の方が低い傾向を示した。本試験では、帝王切開の実施の判断を胎子の推定サイズに基づいて行なったことから、生時体重は経膣よりも帝王切開で産まれたクローン子牛のほうが重かった。ただし、帝王切開の実施は産道の開口程度も考慮していることから、帝王切開を実施した受胎牛は血中の活性型エストロゲン濃度が不足し、産道の開口程度が低かったと考えられる。これらのことから、生時体重の増加と母体血中の活性型エストロゲン濃度上昇の不足を引き起こす共通の要因があることが考えられる。胎子性コルチゾルは、このいずれもの制御に関与することが知られているが、胎子期のクローン子

牛のコルチゾル分泌能は明らかになっておらず、今後の研究が求められる。

### (3) 胎盤におけるエストロゲン合成と活性制御

分娩時の胎盤における CYP19 の発現量は、母胎盤に比較して胎子胎盤で有意に高く、クローン受胎牛と対照牛の間には差がなかった。SULT1E1 の発現量は、胎子胎盤と母胎盤で発現量の差はなかったが、クローン受胎牛が経膣分娩および帝王切開ともに対照牛よりも有意に高い値を示した (図3)。STS の発現量は、胎子胎盤に比較して母胎盤で有意に高く、クローン受胎牛と対照牛の間に差はなかった。

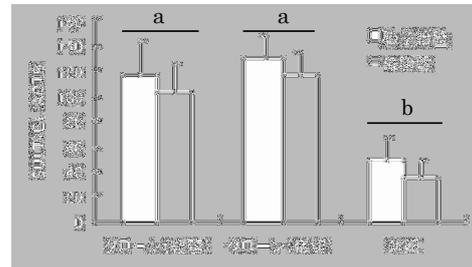


図3 胎盤における SULT1E1 発現量  
胎子胎盤と母胎盤の間に有意差なし  
a,b グループ間に有意差あり (p<0.05)

これらの結果から、クローン受胎牛の胎盤では CYP19 および STS の発現量に異常はみられず、それぞれエストロゲンの新規合成と不活性型から活性型のエストロゲンへの変換能力は正常であると考えられた。しかし、クローン受胎牛の胎盤では SULT1E1 の発現量が高く、活性型のエストロゲンに硫黄分子を結合させて不活性型へと変換する働きが強いと考えられた。

そこで実際に分娩時の母体血中ホルモン濃度と胎盤における遺伝子発現の相関を調べた (表2)。CYP19 および STS 発現量は、E2 濃度と正の相関を示し、それぞれエストロゲンの新規合成と硫黄分子の解離によるエストロゲンの活性化に関与していることが示された。SULT1E1 は、E1 濃度と負の相関を、E1S 濃度と正の相関を示し、SULT1E1 の高発現が E1 濃度の低下と E1S 濃度の上昇による E1/E1S 比の低下の原因であることが示された。

表2 クローン受胎牛の分娩時の胎盤における遺伝子発現量と母体血中エストロゲン濃度の相関係数

エストロ ジェン	CYP19		SULT1E1		STS	
	胎子 胎盤	母胎盤	胎子 胎盤	母胎盤	胎子 胎盤	母胎盤
E1	0.45	0.60	-0.71*	-0.48	0.56	0.32
E1S	0.05	-0.13	0.79*	0.25	-0.23	-0.07
E2	0.50	0.84**	-0.65	-0.39	0.62	0.69*

\* p<0.05, \*\* p<0.01

次にこれらの遺伝子の胎盤における発現部位を解析した。CYP19 は胎子胎盤における二核細胞と母胎盤における上皮細胞で発現していた (図 4)。SULT1E1 は二核細胞において特異的に発現しており、STS は二核細胞と母胎盤の上皮細胞で発現していた (図 5)。このことから、リアルタイム RT-PCR で検出された母胎盤における SULT1E1 の発現は、胎子胎盤と母胎盤を手法的に分離した際に母胎盤試料に二核細胞が混入したためと考えられた。

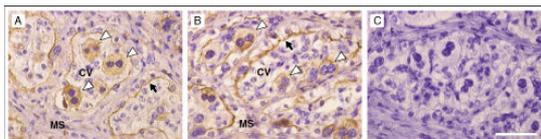


図 4 分娩時の胎盤における CYP19 の免疫染色  
A: クローン受胎牛, B: 対照牛, C: 陰性コントロール  
CV: 胎子胎盤絨毛, MS: 母胎盤, 矢頭: 二核細胞, 矢印: 母胎盤上皮細胞  
スケールバー: 50 $\mu$ m

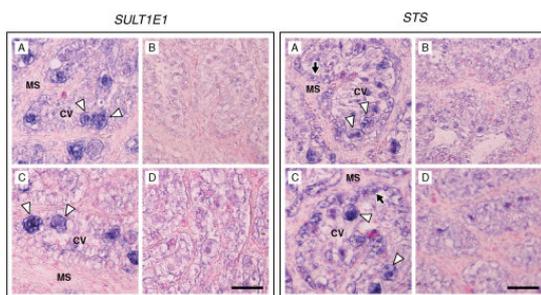


図 5 分娩時の胎盤における SULT1E1 および STS の in situ ハイブリダイゼーション  
A: クローン受胎牛, B: クローン受胎牛 (陰性コントロール), C: 対照牛, D: 対照牛 (陰性コントロール)  
CV: 胎子胎盤絨毛, MS: 母胎盤, 矢頭: 二核細胞, 矢印: 母胎盤上皮細胞  
スケールバー: 50 $\mu$ m

二核細胞は、胎子の栄養膜細胞が多核化した胎盤に特徴的な細胞であり、妊娠の成立や維持に重要な働きをされると考えられている。本項の結果は、この二核細胞が分娩時のエストロゲン活性の制御に重要な働きをすることを示した。そこで、胎盤中の二核細胞数をカウントしたが、クローン受胎牛と対照牛の間に差はみられなかった (表 3)。この結果から、クローン受胎牛における E1/E1S 比の減少の原因は、胎盤における二核細胞数の増加ではなく、二核細胞における SULT1E1 の高発現あるいは SULT1E1 陽性二核細胞数の増加であり、このことが分娩遅延を引き起こしていると考えられた。しかし、これまでに胎盤における SULT1E1 の発現制御機構は明らかになっておらず、クローン受胎牛の分娩時胎盤

において、SULT1E1 の発現が亢進している、あるいは正常に抑制されていない理由は不明である。

表 3 分娩時の胎盤節中の二核細胞数

子牛	供試頭数	二核細胞数 (/0.1mm <sup>2</sup> )
クローン (経膈)	9	19 $\pm$ 1
クローン (帝切)	10	19 $\pm$ 2
対照	4	19 $\pm$ 2

#### (4) 胎盤におけるプロスタグランジン合成関連遺伝子の発現解析

クローン受胎牛の胎子胎盤および母胎盤における COX-2 および PGFS の遺伝子発現量は対照と比較して差がなかったが、クローン受胎牛では胎子胎盤における PGES の発現量が有意に低下していた (図 6)。この結果から、クローン受胎牛では、分娩時に胎子性コルチゾルの分泌を促すと考えられている PGE2 を生産するために必要な PGES の発現量が少ないことが示された。

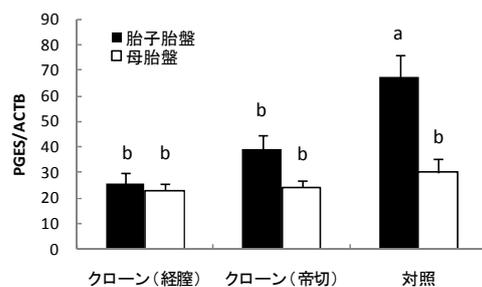


図 6 分娩時胎盤における PGES の遺伝子発現量  
異符号間に有意差あり

#### 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)

- ① Hirayama H., Sawai K, Moriyasu S, Hirayama M, Goto Y, Kaneko E, Miyamoto A, Ushizawa K, Takahashi T, Minamihashi A. Excess estrogen sulfoconjugation as the possible cause for a poor sign of parturition in pregnant cows carrying somatic cell clone fetuses. *Reproduction*, 136, 639-647, 2008, 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- ① Hirayama H. Excess estrogen sulfoconjugation causes a weak sign of delivery in somatic cell clone recipient cows. The 1st World Congress of Reproductive Biology. 2008.5.24. 米国ハ

ワイ州

- ② 平山博樹、体細胞クローン胎盤節における分娩関連遺伝子の発現解析、第 100 回日本繁殖生物学会大会、2007.10.21 東京大学
- ③ Hirayama H. Prepartum hormonal changes in recipient cows for somatic cell cloned fetuses. The 33rd Annual Conference of the International Embryo Transfer Society 2007.1.4. 京都国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平山 博樹 (HIRAYAMA HIROKI)

北海道立畜産試験場・基盤研究部・受精卵移植科

研究者番号 : 60390861