

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：32701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23709

研究課題名（和文）乳牛の胎盤由来副甲状腺ホルモン関連タンパク質と新生子牛の血液中ミネラル濃度の関係

研究課題名（英文）Relationship between placenta derived parathyroid hormone-related protein in dairy cows and blood mineral concentrations in newborn calves

研究代表者

風間 啓（Kazama, Kei）

麻布大学・獣医学部・助教

研究者番号：80845298

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：副甲状腺ホルモン関連タンパク質（PTHrP）は、胎盤におけるカルシウム（Ca）の輸送に関与するが、乳牛の胎盤における作用は不明な点が多い。本研究では、微量ミネラルを含むミネラル輸送に着目し、乳牛の胎盤におけるPTHrPの役割について検討した。PTHrP、Caは母牛よりも新生子牛の血液で高かった。さらに新生子牛の血液中PTHrPとCa、コバルト、クロム、およびモリブデンとの間に相関があった。またPTHrP遺伝子は母胎盤において発現量が高かった。以上のことから、PTHrPは乳牛の胎盤のCa輸送に関与しており、胎盤由来のPTHrPが新生子牛の微量ミネラル代謝にも影響すると推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子牛の死亡は畜産業に大きな経済的損失をもたらすが、毎年数万頭に及ぶ子牛が死産や虚弱子で生後まもなく死亡してしまう。副甲状腺ホルモン関連タンパク質（PTHrP）は、胎盤においてカルシウム（Ca）輸送に関与することが知られている。本研究の結果から、新生子牛の血液中PTHrPとCa、コバルト、クロムとの間に負の相関が、モリブデンとの間に正の相関があった。さらに、乳牛の胎盤においてPTHrP遺伝子の発現が認められ、ミネラル輸送に関与すると考えられた。これらの結果から、健康な胎子が成長するために必要な胎盤におけるミネラル代謝にPTHrPが関与すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) is involved in the transport of calcium (Ca) in the placenta, but the role of PTHrP in the placenta of dairy cows remains unclear. In this study, we focused on the transport of minerals containing trace elements and investigated the role of PTHrP in the placenta of dairy cows. PTHrP and Ca were higher in blood of neonatal calves than in mother cows. In addition, there were correlation between PTHrP and Ca, cobalt, chromium, molybdenum in neonatal calves. The expression level of the PTHrP gene was high in the maternal placenta. From the above, it was speculated that PTHrP is involved in Ca transport in the placenta of dairy cows, and that placenta-derived PTHrP also affects the metabolism of trace elements in neonatal calves.

研究分野：産業動物内科学

キーワード：副甲状腺ホルモン関連タンパク質 PTHrP カルシウム感受体 CaSR 乳牛 胎盤 微量ミネラル カルシウム

## 1. 研究開始当初の背景

乳牛は、大量の乳汁を生産するため、常にカルシウム (Ca) を喪失している。特に、分娩前後における急激な胎子の発育、乳汁中への Ca 喪失、および血液中の Ca 濃度の恒常性を維持する生理的機構の破綻から、低 Ca 血症を発症し、時には死亡することもある。通常、低 Ca 血症になると、副甲状腺のカルシウム感知受容体 (calcium-sensing receptor, CaSR) が血液中の Ca 濃度を感知し、副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone, PTH) が分泌され、Ca の恒常性が維持される。さらに、泌乳期の乳腺においても CaSR が発現し、乳腺からの副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (parathyroid hormone-related protein, PTHrP) の分泌を促進することで、Ca 恒常性の維持に寄与していると考えられている。PTHrP はヒトの悪性腫瘍に随伴する高 Ca 血症の原因物質のひとつとして分離されたが、健康な乳牛の血液中からは検出されないのに対し、乳汁中には大量に分泌されていることが知られている。また、PTHrP はマウスの胎盤においても遺伝子発現が認められ、母体から胎子への Ca 移行に関与していると考えられている。胎盤における Ca の輸送は、transient receptor potential vanilloid 6 (TRPV6)、calbindin-D9K (CaBP-9K)、plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase (PMCA) といった、様々な輸送体が関与していることが報告されている。さらに、胎盤は Ca のみならず、様々なミネラルを含む栄養素を母体から胎子へと輸送し、健康な胎子の発育に必須の臓器である。主要なミネラルとして、Ca、無機リン (iP)、マグネシウム (Mg) が挙げられるが、胎盤からは胎子の発育に必要な微量ミネラルの輸送も行われていると考えられている。これらのことから、胎盤における PTHrP の発現異常や微量ミネラルを含むミネラル輸送の過不足は、正常な胎子の発育に異常をきたすと考えた。しかし、乳牛の胎盤における PTHrP のミネラル輸送に対する生理的役割は明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、乳牛の胎盤および胎子における PTHrP の生理的役割を明らかにし、健康な子牛が出生するために重要なミネラル代謝について解明することである。多くの子牛が新生子異常で死亡しており、そのほとんどは死産や、虚弱子のため産まれてまもなく死亡してしまう。PTHrP は母体から胎子への Ca 輸送に関与すると考えられており、PTHrP 遺伝子を欠損させたマウスは、骨軟骨の成長不全から生後まもなく死亡してしまう。このことから、胎盤における PTHrP の発現の異常は、胎子の成長異常につながる可能性が考えられる。胎盤における正常な PTHrP およびミネラル代謝について明らかにし、新生子異常により死亡する子牛を減らせるように、臨床応用の可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

胎盤を介した母牛、胎子における PTHrP の動態を明らかにするため、妊娠末期の乳牛について、帝王切開を実施した。母牛頸静脈、臍動脈、臍静脈、および新生子牛頸静脈より採血を行った。また、母牛および新生子牛の血液サンプルは、経膈分娩によって出生した母子からも採取した。血液中の PTHrP 濃度は、イムノラジオメトリックアッセイ法 (IRMA 法) にて測定した。さらに、Ca、iP、および Mg 濃度を測定した。微量ミネラルとして、クロム (Cr)、マンガン (Mn)、鉄 56 (56Fe)、鉄 57 (57Fe)、コバルト (Co)、銅 (Cu)、亜鉛 (Zn)、ガリウム (Ga)、セレン (Se)、ルビジウム (Rb)、ストロンチウム (Sr)、モリブデン (Mo)、セシウム (Cs) およびバリウム (Ba) 濃度を誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS 法) にて分析した。

帝王切開を実施した牛について、胎子摘出後、胎盤節を採取し、用手にて母胎盤と胎子胎盤を分離した。Ca 輸送に関わる因子として、母胎盤、胎子胎盤それぞれの PTHrP、CaSR、TRPV5、TRPV6、CaBP-9K、PMCA1、PMCA2、および low density lipoprotein-related protein 2 (LRP2) の相対的遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法にて解析した。同様に、微量ミネラルの輸送因子として、copper transporter 1 (CTR1)、divalent metal transporter 1 (DMT1)、ferroportin 1 (FPN1)、transferrin receptor (TFRC)、zinc transporter SLC39A7 (ZIP7) および zinc transporter SLC30A5 (ZNT5) の相対的遺伝子発現量を解析した。

## 4. 研究成果

通常、母牛の血液中からは検出されない PTHrP が、本研究で用いた IRMA 法によって新生子牛頸静脈血、臍静脈血、および臍動脈血から検出することができた (Table. 1)。また、母牛の頸静脈血に比べ、新生子牛、臍静脈、および臍動脈血中の Ca、iP の濃度は有意に高い値を示した。Mg は、各血液中に有意差を認めなかった。また、母牛および新生子牛血液中の微量ミネラルを ICP-MS 法にて測定した結果、Cu、Se は新生子牛よりも母牛血液中で、Zn、Rb、Cs は母牛よりも新生子牛血液中でそれぞれ有意に高値を示した。さらに、PTHrP を検出できた新生子牛血液中に於いて、PTHrP と Ca、Cr、および Co の間に有意な負の相関が、Mo との間に有意な正の相関が認められた。

Table. 1. 母牛頸静脈、新生子牛頸静脈、臍静脈および臍動脈血中の PTHrP、Ca、iP、Mg 濃度

	母牛 頸静脈血	n	新生子牛 頸静脈血	n	臍静脈血	n	臍動脈血	n
PTHrP (pmol/L)	<1.0	(11)	3.6 ± 1.44	(17)	4.0 ± 1.14	(11)	4.2 ± 1.38	(11)
Ca (mg/dL)	8.5 ± 1.72	(21)	13.1 ± 1.44**	(17)	13.9 ± 1.53**	(12)	13.5 ± 0.65**	(12)
iP (mg/dL)	5.3 ± 1.55	(21)	7.7 ± 1.08**	(17)	7.5 ± 2.02**	(12)	7.3 ± 1.57**	(12)
Mg (mg/dL)	1.7 ± 0.45	(19)	2.1 ± 0.80	(19)	2.3 ± 0.94	(12)	2.2 ± 0.93	(12)

\*\* P < 0.01 vs 母牛頸静脈血

また、乳牛の母胎盤、胎子胎盤における遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により解析したところ、*PTHrP* は胎子胎盤よりも母胎盤で、*CaSR* は母胎盤よりも胎子胎盤で有意に高い遺伝子発現量を認めた (Fig. 1)。さらに、胎盤における Ca をはじめとしたミネラル輸送に関与すると考えられている、*TRPV5*、*TRPV6*、および *LRP2* についても、母胎盤よりも胎子胎盤で有意に高い遺伝子発現を認めた。一方、*CaBP-9K*、*PMCA1*、および *PMCA2* の遺伝子発現は、母胎盤、胎子胎盤ともに認められたが、両者の間に有意な差は認められなかった。また、微量ミネラルの輸送因子である、*CTR1*、*DMT1*、*FPN1*、*TFRC*、*ZIP7*、および *ZNT5* の遺伝子発現は、母胎盤、胎子胎盤ともに認められたが、母胎盤と胎子胎盤の間に有意な発現量の差は認められなかった。

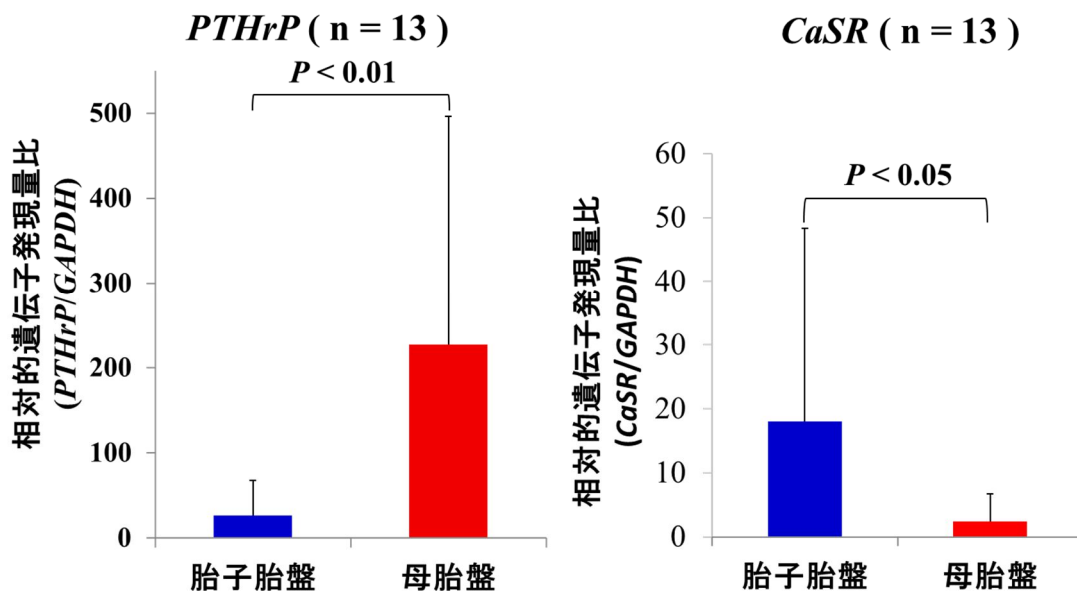


Fig. 1. 乳牛の胎盤における *PTHrP* と *CaSR* の相対的遺伝子発現量比

以上のことから、胎子側の Ca 濃度を胎子胎盤の *CaSR* が感知し、母胎盤の *PTHrP* の発現量を調節している可能性があった。また、母牛から検出されない *PTHrP* が臍動静脈血、および新生子牛血液中から検出されたことから、胎盤由来の *PTHrP* が胎子に移行していると推測された。さらに、新生子牛の体内で、*PTHrP* は Ca のみならず、微量ミネラル代謝にも影響を及ぼす可能性があった。

一方、ウシ栄養膜由来の培養細胞を用いて、ウシ胎盤におけるミネラル輸送について検討したが、用いた細胞はインターフェロン- $\gamma$  遺伝子を発現しており、着床期のモデルと考えられた。また、胎盤性ラクトジェン、妊娠関連糖タンパク質の遺伝子発現が認められないことから、妊娠末期の胎盤モデルとしては不十分と考えられた。今後、妊娠末期のウシ胎盤モデルを確立し、乳牛の胎盤における *PTHrP* の機能解析を進め、健康な胎子の発育に必須のミネラル代謝機構について明らかにしたい。

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 風間啓、恩田賢
2. 発表標題 妊娠末期の乳牛の胎盤におけるミネラルトランスポーターの遺伝子発現
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------