

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年5月28日現在

機関番号：80122
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21780255
 研究課題名(和文) クローン受胎牛の分娩遅延と分娩誘起法の研究:胎子性コルチゾルからのアプローチ
 研究課題名(英文) Studies on prolonged gestation and induction of parturition in cows carrying somatic clone fetuses
 研究代表者
 平山 博樹 (HIRAYAMA HIROKI)
 北海道立総合研究機構・農業研究本部・畜産試験場・基盤研究部・主査
 研究者番号：60390861

研究成果の概要(和文)：

体細胞クローン胎子の過大化や受胎牛における分娩遅延は、体細胞クローンの生産効率を低下させる要因となっている。本研究では、体細胞クローン受胎牛における妊娠末期の血中グルコース濃度の上昇が少なく、胎盤節におけるグルコース輸送体の mRNA 発現が高いことを明らかにした。これらのことから、妊娠末期の体細胞クローン胎子におけるコルチゾール生産能が不十分であることが示唆された。デキサメサゾンを用いた分娩誘起では、体細胞クローン受胎牛および体内受精卵の移植による受胎牛のいずれにおいても胎盤節のアポトーシスが十分に誘起されないことが明らかとなった。持続型コルチゾール製剤を用いて、体細胞クローン受胎牛の分娩誘起が可能であった。本研究の成果は、体細胞クローン受胎牛だけでなく、一般の妊娠牛の分娩誘起技術の改良にも有用な知見となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：

Pre-partum abnormalities such as prolonged gestation and a lack of readiness for birth in the recipient cows cause dystocia and mortality in perinatal somatic clone calves. This study showed that plasma glucose concentration was low in cows carrying a clone fetus. In addition, mRNA abundance of glucose transporters in placentome was high in the clone pregnancy. These results raise the possibility of insufficiency in cortisol secretion from adrenal cortex of clone fetuses. The induction of parturition could not caused placental apoptosis compared with spontaneous parturition regardless of whether the fetus was derived from a nuclear transfer embryo or an in vivo fertilized embryo. Long-acting cortisol induced parturition in clone pregnancy. The findings in this study might be valuable for improving the technique of parturition induction in clone and normal pregnancies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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・分娩・コルチゾール・分娩誘起・胎盤

1. 研究開始当初の背景

体細胞クローン（以下クローン）牛は遺伝子導入、家畜増殖および家畜改良等への活用が期待されてきた。しかし、クローン牛の生産効率は低く、その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広く実施されている。一方、過大子や流死産など受胎後の胎子にみられる異常やクローン受胎牛に高頻度で発生する分娩遅延に関する研究は進んでいない。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

妊娠末期に胎子の副腎から分泌されるコルチゾールは、分娩開始の引き金となるホルモンであり、クローン胎子はコルチゾール分泌能に問題があるために分娩遅延が発生するのではないかと考えられている。

本研究では、コルチゾールやデキサメサゾン等のグルココルチコイドが妊娠末期に引き起こす母体血中グルコース（Glu）濃度の上昇および胎盤のアポトーシスについて解析し、クローン胎子のコルチゾール分泌能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) 血中グルコース濃度

クローン受胎牛および体内受精卵の移植による受胎牛（対照（DEX））の妊娠 257 日、271 日および分娩前、ならびに分娩直後の子牛の血漿 Glu 濃度を測定した。妊娠牛はデキサメサゾン、プロスタグランジン（PG） $F_{2\alpha}$ およびエストリオール（E3）を用いて分娩を誘起した。

分娩直後に胎盤節を採取し、Glu 輸送体（GLUT）1 および GLUT3 の mRNA 発現量を解析した。対照として上記の対照（DEX）に加え、PG $F_{2\alpha}$ と E3 による誘起分娩（対照（PG））と自然分娩（対照（自然））の試料を解析した。

2) 胎盤節におけるアポトーシス

上記と同様に、クローン受胎牛および体内受精卵の移植による受胎牛（対照（DEX、PG および自然））の分娩直後に胎盤節を採取した。胎盤節における BCL2A1 mRNA 発現、二核細胞数および TUNEL 陽性細胞面積を解析した。

3) 持続型コルチゾール製剤による分娩誘起

クローン受胎牛にトリアムシノロンアセトニド（TA）を投与して分娩誘起を行った。

4. 研究成果

1) 血中グルコース濃度

妊娠末期に胎子の副腎から分泌されるコルチゾールは、インスリン拮抗作用を有するため母体の血中 Glu 濃度を上昇させる。また、コルチゾールは胎盤節における GLUT の発現を抑制し、母体から胎子への Glu 輸送を制御することが知られている。

クローン受胎牛の Glu 濃度はいずれの時期も対照に比較して有意に低く（図 1）、妊娠 257 日に対する分娩前の上昇も有意に低かった（図 2）。分娩直後の子牛の Glu 濃度に差はなかった（図 3）。クローン受胎牛の Glu 濃度は子牛の生時体重と負の相関を示した（図 4）。クローン受胎牛における Glu 濃度の低下は、過大化したクローン胎子による Glu 要求量の増加が原因であり、生時体重の大まかな推定に利用できると考えられた。また、クローン受胎牛では分娩時の Glu 濃度の上昇が少ないことから、胎子のコルチゾール分泌が不十分で、インスリン拮抗作用が充進していない可能性が示唆された。

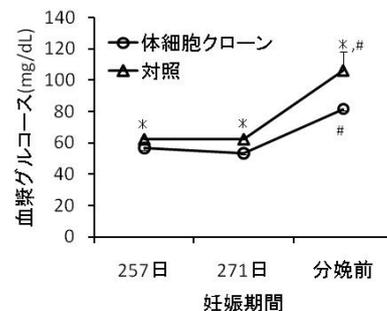


図 1 妊娠末期の血漿グルコース濃度

*: $p < 0.05$, 体細胞クローン vs. 対照

#: $p < 0.01$, 257 日・271 日 vs. 分娩前

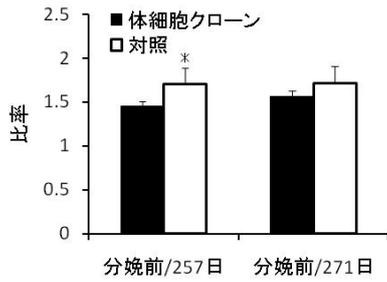


図2 分娩時の血漿グルコース濃度の上昇
*:p<0.05, 体細胞クローン vs. 対照

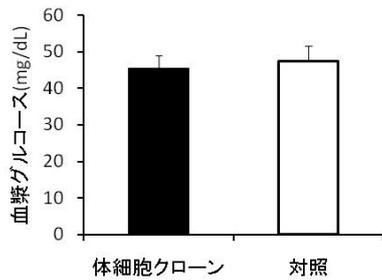


図3 新生子牛の血漿グルコース濃度

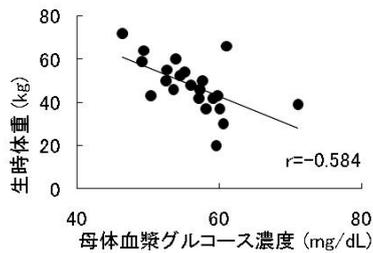
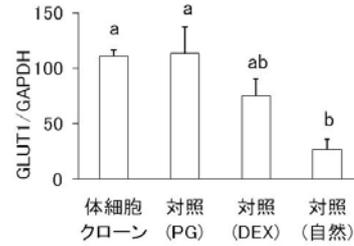


図4 体細胞クローン受胎牛の血漿グルコース濃度 (妊娠 257 日)と体細胞クローン牛の生時体重の相関

分娩時の胎盤節における GLUT 発現量は対照 (自然) で最も低く、次いでデキサメサゾンを用いて分娩誘起した対照 (DEX) で低かった (図 5)。デキサメサゾンを用いて分娩誘起したクローン受胎牛の GLUT 発現量は高く、PGF_{2α}と E3 のみで分娩誘起した対照 (PG) と同様の値を示した。これらから、自然分娩における胎児性コルチゾールの分泌亢進およびデキサメサゾンの投与は胎児への Glu 輸送を抑制すると考えられた。クローン受胎牛ではデキサメサゾンを投与したにも関わらず GLUT 発現が高く、胎児からのコルチゾールの分泌が不足している可能性が示唆された。

A) GLUT1



B) GLUT3

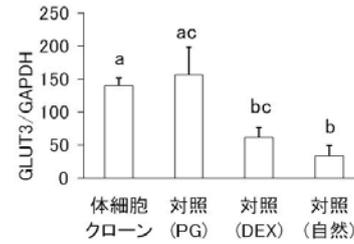


図5 分娩時の母胎盤におけるグルコース輸送体 (GLUT) の mRNA 発現量
p<0.05

2) 胎盤節におけるアポトーシス

コルチゾールやデキサメサゾン等のグルココルチコイドは、胎盤におけるアポトーシスを誘導することが知られている。

アポトーシスに対して抑制的に作用する BCL2A1 mRNA の発現量は対照 (自然) で有意に低下した (図 6)。デキサメサゾンを投与したクローン受胎牛および対照 (DEX) では、対照 (PG) と比較して BCL2A1 mRNA 発現量は変化しなかった。BCL2A1 mRNA は胎児胎盤の二核細胞で強く発現しており、対照 (自然) における二核細胞数の低下は、BCL2A1 mRNA 発現量の低下の要因のひとつと考えられた (図 7)。TUNEL 陽性細胞は対照 (自然) およびデキサメサゾンを投与したクローン受胎牛と対照 (DEX) で増加しており、アポトーシスが亢進していた (図 8)。以上より、一般的に分娩誘起に用いられるデキサメサゾンの投与量 (20mg) は胎盤節のアポトーシスを誘起するが、二核細胞数の減少や BCL2A1 遺伝子の発現抑制を引き起こすには不十分であることが示唆された。また、クローン受胎牛における BCL2A1 mRNA 量、二核細胞数および TUNEL 陽性細胞は対照 (DEX) と差がなく、これらの結果からは体細胞クローン胎児におけるコルチゾールの分泌不足の可能性は示されなかった。

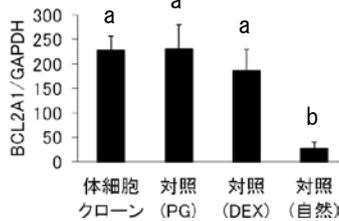


図6 分娩時胎盤節におけるBCL2A1 mRNA発現量
p<0.05

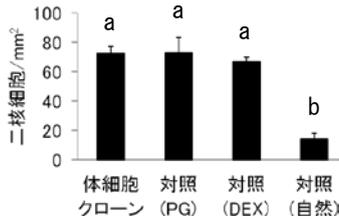


図7 分娩時胎盤節における二核細胞数
p<0.05

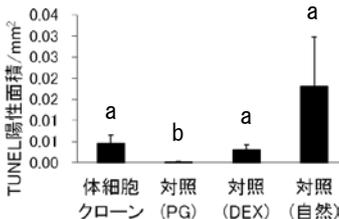


図8 分娩時胎盤節におけるTUNEL陽性面積
p<0.05

3) 持続型コルチゾール製剤による分娩誘起
持続型コルチゾール製剤であるTAを投与したクローン受胎牛のうち1頭は帝王切開により分娩し、残りの2頭は経膣で分娩したものの分娩時の事故で子牛は死亡した(表1)。子牛の体重は場内の黒毛和種の平均生時体重(35kg、2004~2008年)よりも重く、経膣で分娩した1頭で筋肉水腫がみられたが、そのほかにはクローン牛に特徴的な異常は認められなかった。

表1 TAによる体細胞クローン胎子受胎牛の分娩誘起

受胎牛	TA投与時胎齢	分娩時胎齢	子牛体重	分娩状況
512P	276日	283日	51kg	帝王切開(7日齢剖検、異常なし)
715G	276日	282日	41kg	事故 ²⁾ (異常なし)
519P	279日	281日	47kg	事故 ³⁾ (筋肉水腫)

TAはデキサメサゾンに比較して血中に存在する時間が長く、TAを用いた分娩誘起は

分娩の開始前に胎子から分泌されるコルチゾールの分泌パターンを模倣できると考えられている。今後、TAの投与量や投与時期等についても検討する必要があると考えられた。

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2件)

1. Hirayama H, Sawai K, Hirayama M, Hirai T, Kageyama S, Onoe S, Minamihashi A, Moriyasu S. Parturition maternal plasma glucose concentrations and placental glucose transporter mRNA expression in cows carrying somatic cell clone fetuses. *J Reprod Dev*. 2011 57:57-61, 査読有り

2. 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 placenta between spontaneous and induced parturition. *J Reprod Dev*. 2012 in press, 査読有り

[学会発表](計3件)

1. 平山 博樹・澤井 健・陰山 聡一・尾上 貞雄・南橋 昭・平山 宗幸・平井 朋和・松井 義貴・森安 悟、妊娠末期の体細胞クローン受胎牛における血中グルコース濃度と胎盤におけるGLUT発現、第102回日本繁殖生物学会大会、2009.9、近畿大学

2. 平山 博樹・牛澤 浩一・高橋 透・澤井 健・森安 悟・陰山 聡一・尾上 貞雄・南橋 昭、体細胞クローン牛の分娩時胎盤におけるアポトーシス解析、第103回日本繁殖生物学会大会、2010.9、北里大学

3. Hiroki Hirayama, Plasma estrogen concentration and placental regulation of estrogen activity at parturition in cows carrying a somatic clone fetus, *JSPS Japan-Poland Joint Seminar Cutting-edge Reproductive Physiology -from Gamete to Baby-*, 2011.9, いわて県情報交流センター・アイーナ

6. 研究組織

(1)研究代表者

平山 博樹 (HIRAYAMA HIROKI)

北海道立総合研究機構・農業研究本部・

畜産試験場・基盤研究部・主査

研究者番号：60390861