

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月17日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780284

研究課題名（和文） ウシ妊娠におけるエンドセリン1のインパクト：胎盤機能局所調節機構への関与

研究課題名（英文） Impact of endothelin-1 on bovine pregnancy: possible involvement of local regulation system of placental function

研究代表者

林 憲悟 (HAYASHI KENGO)

独立行政法人農業生物資源研究所・動物生産生理機能研究ユニット・任期付研究員

研究者番号：70563625

研究成果の概要（和文）：エンドセリン-1(ET-1)は強力な血管収縮作用をもつ血管作動性物質である。本研究は、ET-1のウシ妊娠中の胎盤機能の局所調節機構における生理的役割を明らかにすることを目的とした。本研究では、胎盤組織におけるET-1前駆体、変換酵素および受容体のタンパク質発現局在および妊娠期間中の末梢血中ET-1分泌動態の解析とともに胎盤組織遺伝子発現に及ぼすET-1の効果を検証した。その結果、ウシ胎盤局所で産生されたET-1は母体末梢血中に分泌されるとともに、胎盤機能や血管緊張の調節において、他の血管作動性物質や血管新生因子との相互作用や胎盤ホルモン産生に関与することにより重要な役割を担う可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Endothelin-1 (ET-1) is known as a most potent vasoconstrictor and participates in feto-placental growth and development during pregnancy. The aim of this study was to investigate physiological role of ET-1 in the regulation of placental function during pregnancy in cattle. The results of present study demonstrate that ET-1 is locally produced in bovine placenta and secreted into maternal circulation during pregnancy. In addition, ET-1 interacts with various vasoactive peptides, angiogenic factors and placental hormones within bovine placenta. These findings suggest a crucial role of ET-1 in the regulation of placental function and involvement of vasoactive substances including ET-1 on maintenance of bovine pregnancy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：ウシ、胎盤、妊娠、エンドセリン

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物では、受精した胚が子宮に着床して胎盤が形成され、胎盤を介して胎仔の発育が維持される。現在、乳牛および肉牛の生産現場において受胎率低下が深刻な問題となっており、受胎成立および受胎後の胎仔成長を維持するための子宮・胎盤機能は、繁殖成績に大きく影響する要因の一つと考えられている。したがって、種に特異的な胎盤の生理メカニズムを解明する基礎的研究は、早産や

流産を防止し正常な妊娠を維持するための新たな知見と新規技術の開発基盤の提供に不可欠である。胎盤は発達段階において非常に高度な血管網を構築する。近年、ウシの胎盤発達における血管系の重要性が注目され、血管網構築に様々な血管新生因子が作用していることが明らかとなった。一方で、血管作動性物質を中心とする、血管の収縮や拡張などの血管機能の調節を司る因子の妊娠期間を通じた胎盤機能調節における役割は不

明である。強力な血管収縮作用をもつ血管作動性物質であるエンドセリン-1 (ET-1) は、ウシ胎盤において妊娠期間を通じて二核細胞に mRNA が発現している。ウシなどの反芻類胎盤に特異的な細胞集団である二核細胞は、全栄養膜細胞数のうち約 20%を占め、様々なホルモンや成長因子に加えて胎盤特異的ホルモンである胎盤性ラクトジェン(PL)、妊娠関連糖タンパク質(PAG)やプロラクチン関連タンパク質(PRP)を産生し、妊娠維持や胎仔成長のための胎盤機能の中心を担う。したがって、ET-1 はウシ胎盤において血管機能調節のみならず、胎盤局所で産生される生理活性物質や成長因子と相互作用することで、内分泌機能調節などにも関与していることが強く示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究は、主要な血管作動性物質である ET-1 に着目し、ウシ妊娠中の胎盤機能の局所調節機構における生理的役割を、以下の生体レベルおよび組織レベルでの生理機能の解析を行うことで明らかにする。(1) ウシ胎盤における ET-1 系の発現局在を明らかにするため、ET-1 前駆体、変換酵素および受容体のタンパク質発現局在を免疫組織化学法により解析する。(2) ウシの妊娠経過に伴う ET-1 を含む血管作動性物質の分泌動態を明らかにするため、妊娠期間中の末梢血中における血管作動性物質分泌濃度を測定する。(3) ウシ胎盤における ET-1 の胎盤機能調節機構に及ぼす影響を検証するため、ウシ生体から摘出した胎盤外植片への ET-1 および受容体アンタゴニスト処置による胎盤組織の遺伝子発現の変化を解析する。受胎成立と正常な妊娠を維持するための胎盤機能の生理的メカニズムの解明に寄与する新たな知見と、受胎率向上に向けた新規技術の開発基盤を提供することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ウシ胎盤における ET-1 系のタンパク質発現局在の解析

食肉処理場より採取した胎仔頭臀長約 100cm (妊娠約 250 日齢) のウシ胎盤を、ホルマリン固定の後にパラフィン包埋し、7 $\mu$ m 厚の切片を作成した。免疫組織化学法により ET-1 前駆体 (PreproET-1)、ET 変換酵素 (ECE)、ET 受容体 A (ETAR) および ET 受容体 B (ETBR) のタンパク質発現局在を解析した。

### (2) ウシ妊娠期間中の末梢血中における血管作動性物質分泌動態の解析

人工授精により受胎させたホルスタイン種未雌牛 8 頭、および胎盤形成に異常が多発することが報告されている、体細胞クローン胚を受胎したホルスタイン種雌牛 5 頭から、妊娠期間 (約 9 ヶ月) を通じて月に一度採血を

行い、市販の ELISA キットを用いて 3 種類の血管作動性物質 (ET-1、アドレノメデュリン (AM)、アンジオテンシン II (AngII)) の血中濃度の変化を測定した。

(3) 胎盤外植片培養を用いた、ET-1 がウシ胎盤機能調節機構に及ぼす影響の検証  
強力な血管収縮因子である ET-1 が、ウシ胎盤局所の血管作動性物質および胎盤ホルモンの遺伝子発現に及ぼす効果を検証するため、妊娠 150 日齢のウシ 4 頭から採取した胎盤を裁断した外植片に、ET-1 単独 (0, 1, 10, 100nM)、ET-1 (100nM) + ETAR アンタゴニスト (BQ123, 1000nM)、ET-1 (100nM) + ETBR アンタゴニスト (BQ788, 1000nM) をそれぞれ添加し、12 時間培養した。リアルタイム PCR を用いて、胎盤外植片における、5 種類の血管作動性物質 (AM、AngII、一酸化窒素 (NO)、プロスタサイクリン、トロンボキサン) のリガンド、合成酵素および受容体、2 種類の血管新生因子 (血管内皮増殖因子 (VEGF) および塩基性線維芽細胞増殖因子) および 3 種類の胎盤ホルモン (PL、PAG1、PRP1) の遺伝子発現の変化を解析した。

## 4. 研究成果

### 1) ウシ胎盤における ET-1 系のタンパク質発現局在の解析

ウシ胎盤において、ECE は血管内皮細胞と胎仔胎盤の栄養膜二核細胞にのみ発現が見られた。一方、PreproET-1、ETAR および ETBR は血管内皮細胞、胎仔胎盤の栄養膜細胞および母体胎盤の子宮内膜上皮細胞に局在することが明らかとなった (図 1)。この結果は、申請者がこれまでに *in situ* ハイブリダイゼーションにより解析した mRNA 発現の局在と一致しており、ウシ胎盤において ET-1 は二核細胞において前駆体から変換され、栄養膜細胞や子宮内膜上皮細胞に作用していることが示唆された。

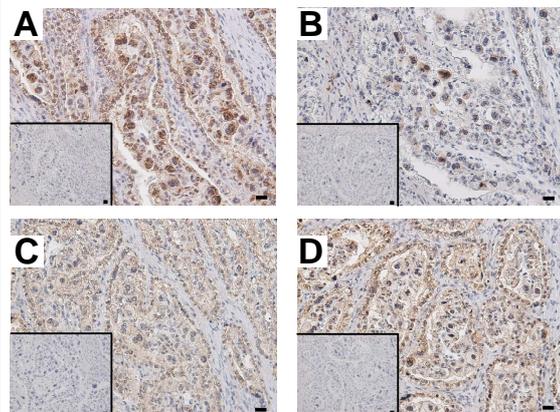


図 1: 妊娠 250 日齢ウシ胎盤における、(A) preproET-1、(B) ECE、(C) ETAR および (D) ETBR のタンパク質の発現局在。

(2) ウシ妊娠期間中の末梢血中における血管作動性物質分泌動態の解析

ウシ妊娠期間中の末梢血中における ET-1 濃度は妊娠前期から後期にかけて増加し、AM 濃度は妊娠後期で増加した (図 2)。これらの血管作動性物質の血中動態は胎盤における遺伝子発現動態とほぼ一致しており、胎盤由来の血管作動性物質が末梢血中に反映していることが示唆された。さらに、体細胞クローン胚受胎牛における妊娠中の血中 AM 濃度は、通常の妊娠牛と比べて妊娠前期および中期で高いことが明らかとなり、体細胞クローン胚受胎牛では胎盤の血管作動性物質分泌に変化が生じている可能性が示された。

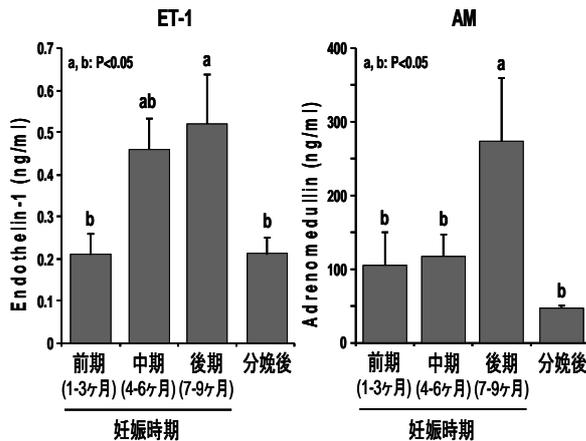


図 2: ウシ妊娠期間中の末梢血中におけるエンドセリン-1 (ET-1) およびアドレノメデュリン (AM) 濃度の変化。

(3) 胎盤外植片培養を用いた、ET-1 がウシ胎盤機能調節機構に及ぼす影響の検証  
胎盤外植片において、ET-1 処置は血管作動性物質である AM とその受容体および内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) の mRNA 発現を刺激した。eNOS mRNA は ET-1 と BQ123 の共添加では発現が刺激されたが、ET-1 と BQ788 の共添加では発現が刺激されなかったことから、シグナルは ETBR を介していることが示唆された。また、血管新生因子 VEGF と胎盤ホルモンである PL および PRP1 の mRNA 発現を刺激した (図 3)。

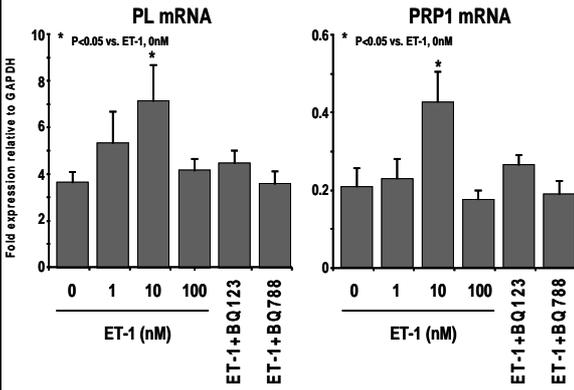
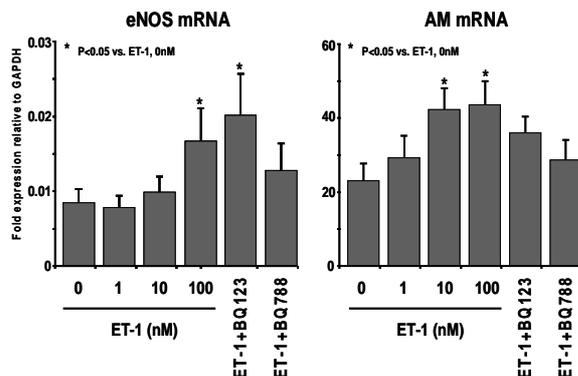


図 3: ウシ胎盤外植片における、ET-1 処置による eNOS、AM、PL および PRP1 mRNA 発現の変化。

これにより、ウシ胎盤局所における血管緊張や胎盤機能の調節において、1) 血管作動性物質は相互作用をしている、2) ET-1 は胎盤ホルモン産生に関与している可能性が示された。

## 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 1 件)

- Hayashi KG, Hosoe M, Takahashi T. (2012): Placental expression and localization of endothelin-1 system and nitric oxide synthases during bovine pregnancy. *Animal Reproduction Science*. 134:150-157. [査読あり]

[学会発表] (計 2 件)

- Hayashi KG, Hosoe M, Takahashi T. Placental expression and localization of adrenomedullin system during bovine pregnancy. 2<sup>nd</sup> World Congress on Reproductive Biology, Cairns (Australia), 2011年10月
- 林憲悟、細江実佐、高橋透 ウシ妊娠期間中の子宮および胎盤におけるアドレノメデュリンの遺伝子発現動態と局在の解析 第 104 回日本繁殖生物学会大会 (岩手大学) 2011年9月

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

林憲悟 (HAYASHI KENGO)

独立行政法人農業生物資源研究所・動物生産生理機能研究ユニット・任期付研究員

研究者番号: 70563625

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：