

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850189

研究課題名(和文) アドレノメデュリンのウシ胎盤機能調節因子としての生理的役割の解明

研究課題名(英文) Physiological role of adrenomedullin in the regulation of placental function during bovine pregnancy

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・研究員

研究者番号：70563625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000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物質である。本研究は、ウシ妊娠中の胎盤機能調節機構におけるAMの役割を明らかにすることを目的とし、妊娠中の母体末梢血中AM分泌動態の測定、AMの胎盤細胞における作用機序の解析および胎盤細胞間の相互作用における生理的役割の検証を行った。その結果、胎盤由来のAMは妊娠中の母体血中に反映しているとともに、胎仔側と母体側の両方の胎盤細胞において、細胞増殖等に関与することで胎盤の発達を促す役割を担うことが推察された。本研究より、AMはウシ胎盤における重要な機能調節因子として作用していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Adrenomedullin (AM) is a potent vasodilator peptide and is also involved in various physiological activities. The aim of this study is to determine the physiological role of AM in the regulation of bovine placental function during pregnancy. The results of present study demonstrate that secretion profile of AM in maternal plasma is almost consistent with AM gene expression pattern in the placenta, suggesting locally produced AM in bovine placenta is secreted into maternal circulation during pregnancy. The microarray analysis of bovine trophoctoderm cells revealed that AM treatment up-regulates genes involved in lipid biosynthetic process, cell proliferation and apoptosis and down-regulates genes involved in cytoskeleton organization and cell adhesion. In addition, AM stimulated proliferation of both fetal and maternal placental cells. These findings suggest that AM may play a crucial role in the regulation of placental function on establishment and maintenance of bovine pregnancy.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：妊娠 胎盤 ウシ アドレノメデュリン

1. 研究開始当初の背景

現在、日本国内のウシの生産現場における受胎率は乳用牛、肉用牛ともに約 50%程度である。哺乳動物では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。よって、正常な妊娠の成立と維持のための胎盤機能は繁殖成績に大きな影響を与える要因の一つと考えられる。アドレノメデュリン (AM) は 1993 年にヒト褐色細胞腫から発見された 52 個のアミノ酸からなるペプチドで、強力な血管拡張作用により血圧を下げる働きに加えて、血管新生、アポトーシス調節、細胞の増殖や遊走および内分泌調節など多岐にわたる生理作用を有する。近年、ヒトやげっ歯類において、子宮および胎盤局所で産生される AM が、着床、胎盤形成および胎児発達に不可欠であることが明らかにされている。一方、研究代表者はこれまでにウシ妊娠期間中の子宮および胎盤における AM 発現変化を解析することで、次の 2 つの知見を得ている。1) ウシ子宮および胎盤における AM およびその受容体の mRNA 発現は、胎盤形成期および妊娠後期で高く、妊娠経過に伴い大きく変化する。2) ウシ胎盤において、AM の mRNA およびタンパク質は胎仔側胎盤の二核細胞にのみ局在する一方で、受容体は胎仔側胎盤の栄養膜細胞および母体側胎盤の子宮内膜上皮細胞に局在する。二核細胞はウシなどの反芻類胎盤に特異的な細胞集団で、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、上記の知見は、AM がウシ胎盤局所で産生されていることに加え、パラクリン/オートクリン作用により胎盤機能調節にも関与していることを示唆する。

2. 研究の目的

本研究は、1)ウシ妊娠経過に伴う母体末梢血中 AM 分泌動態を決定する。2)ウシ胎盤を構成する栄養外胚葉細胞における AM の作用機序を、マイクロアレイを利用した

バイオインフォマティクス解析により明らかにする。3)胎盤細胞間の相互作用における AM の関与を検証することにより、強力な血管作動性物質である AM 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する。

3. 研究の方法

1)ウシ妊娠経過に伴う母体末梢血中 AM 分泌動態を決定する

ホルスタイン種未経産雌牛 20 頭の妊娠期間中 (人工授精時から分娩まで) に週 1 回および分娩後に尾静脈より 20ml の採血を行い、市販の ELISA キット (USCN Life Science) を用いて血中 AM 濃度変化を測定した。

2)ウシ胎盤を構成する栄養外胚葉細胞における、AM の作用機序を明らかにする

食肉処理場由来のウシ卵巣から採取した卵子を体外受精・体外成熟することで胚盤胞を作成した。体外受精後 8 日目の脱出胚盤胞を 24 ウェルプレートに 1 個ずつ静置して、10%FBS 含有 DMEM/F12 培地を用い 37°C、5%CO₂ 条件下で 10 日間培養することにより、栄養外胚葉細胞の細胞塊を作出した。無血清培地に交換後、AM (無添加、1nM、10nM) または AM (10nM)+AM 受容体アンタゴニスト (100nM) を添加して 24 時間後に細胞を回収し総 RNA を抽出した。AM 無添加区 (n=3) および AM 10nM 添加区 (n=3) の遺伝子発現動態を、Agilent Technologies 社製 15k ウシオリゴ DNA マイクロアレイにより解析し、データマイニングソフト (GeneSpring および DAVID) を用いてバイオインフォマティクス解析を行った。両実験区の間で発現差が見られた既知遺伝子の上位 3 個、機能アノテーションでカウントされた回数の多い遺伝子の上位 3 個について、リアルタイム PCR により定量的解析を行った。さらに、各実験区

の AM 添加前後の栄養外胚葉細胞の細胞塊面積の変化を、画像解析ソフト(ImageJ)を用いて解析した。

3)胎盤細胞間の相互作用における AM の生理的役割を検証する

(i) 子宮内膜上皮細胞の増殖におよぼす効果の検証。96 ウェルセルカルチャーインサート内にウシ栄養膜細胞株(BT-1)を、マイクロプレートにウシ子宮内膜上皮細胞をそれぞれ播種し、1)無添加区、2) AM 添加区(10nM)、3) AM(10nM)+AM アンタゴニスト(100nM)添加区を設定した。対照区は、BT-1 細胞を播種しないセルカルチャーインサートのみを設置したマイクロプレートに子宮内膜上皮細胞を播種して、同様の試薬添加を行った。試薬添加 72 時間後に、WST-8 を用いた発色法により子宮内膜上皮細胞の細胞増殖アッセイを行った。

(ii) 子宮内膜上皮細胞の遺伝子発現におよぼす効果の検証。12 ウェルセルカルチャーインサート内に BT-1 細胞を、マイクロプレートにウシ子宮内膜上皮細胞をそれぞれ播種し、上記(i)の細胞増殖試験と同一の実験区を設定した。試薬添加 72 時間後に子宮細胞を回収して総 RNA 抽出を行った。リアルタイム PCR により、アポトーシス関連因子 (BAX、BCL2、BAK1)、線溶系関連因子 (SERPINE1、SERPINE2、SERPINF2、PLAUR、TIMP1)および細胞増殖因子 (bFGF、VEGF、MIF)の遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

1)ウシ妊娠経過に伴う母体末梢血中 AM 分泌動態を決定する

人工授精時の血中 AM 濃度に対する相対値は、妊娠 2 - 3 ヶ月および 9 ヶ月での増加が見られた(図 1)。この血中動態は胎盤における AM 遺伝子発現動態と概ね一致しており、ウシ妊娠において胎盤由来の AM

が母体の末梢血中に反映していることが示唆された。

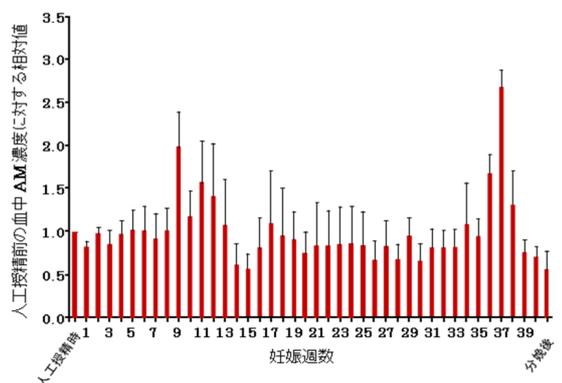


図 1：ウシ妊娠中の母体末梢血中 AM 動態

2)ウシ胎盤を構成する栄養外胚葉細胞における、AM の作用機序を明らかにする

マイクロアレイ解析の結果、栄養外胚葉細胞において AM 添加により無添加と比較して発現が増加した 231 遺伝子と減少した 73 遺伝子が同定された (>2 fold, P<0.05)。これらの遺伝子のうち、AM 添加により発現が増加した既知遺伝子の上位 3 個は *PITPNB*、*KLHDC3*、*CXCR5* で、発現が減少した上位 3 個は *CD9*、*ACTB*、*SCP2* だった(図 2)。

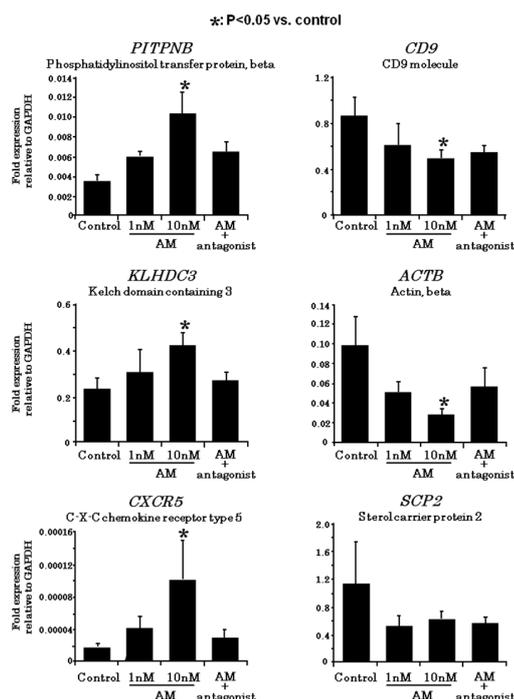


図 2：ウシ栄養外胚葉細胞への AM 添加により発現が変化した既知遺伝子のリアルタイム PCR 解析結果

遺伝子オントロジー解析により、AM 添加で発現が増加した遺伝子群は主に脂質合成、細胞増殖、タンパク質輸送やアポトーシス調節に関わる遺伝子が、発現が減少した遺伝子群は細胞骨格形成や細胞接着に関与する遺伝子が多いことが明らかとなった。これらの機能に関わる遺伝子としてカウントされる回数の多かった上位 3 遺伝子は、発現が増加した遺伝子では *BAX*、*BAK1*、*MIF* で、減少した遺伝子では *RNASE4*、*THBS1*、*SCIN* だった。AM 添加 24 時間後における細胞塊面積の増加率は(添加前を 100%とする)無添加で 122%だったのに対し、AM 10nM 添加では 138%と有意に増加した。一方、AM+AM 受容体アンタゴニスト添加では 126%となり無添加の場合と差が無かった(図 3)。これらの結果から、AM はウシ栄養外胚葉細胞において細胞増殖などに関与することで胎盤の発達を促す役割を担うと推察され、ウシ胎盤における機能調節因子として作用していることが示唆された。

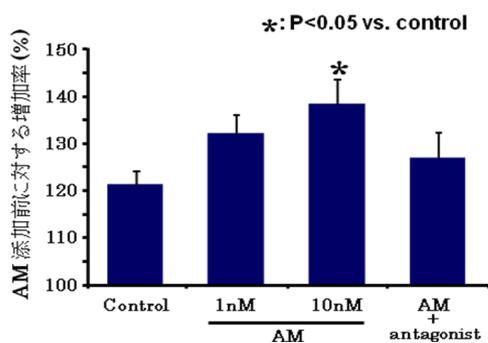


図 3 : AM 添加によるウシ栄養外胚葉細胞の細胞塊面積の変化

3)胎盤細胞間の相互作用における AM の生理的役割を検証する

BT-1 細胞と子宮内膜上皮細胞の共培養において、AM 添加区は他の共培養実験区よりも子宮内膜上皮細胞の細胞数および細胞増殖因子(*VEGF* および *MIF*)の遺伝子発現が増加する傾向が見られたが、これらは子宮細胞単独培養の AM 添加区との間で有

意な差は見られなかった。したがって、本実験系では栄養膜細胞と子宮内膜上皮細胞の明確な相互作用を明らかにするには至らなかったが、AM はウシ胎盤において胎仔側胎盤の細胞である栄養膜細胞に加え、母体側胎盤の細胞である子宮内膜上皮細胞における増殖効果も有することが示唆された。

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, Sakumoto R, Takahashi T. Temporo-spatial expression of adrenomedullin and its receptors in the bovine placenta. *Reproductive Biology and Endocrinology*. (査読有) 2013; 11; 62.

[学会発表](計 2 件)

1. 林憲悟, 細江実佐, 的場理子, 木崎景一郎, 高橋透, 作本亮介. アドレノメデュリンによるウシ栄養外胚葉細胞の遺伝子発現動態の変化. 第 107 回日本繁殖生物学会大会, 2014 年 8 月 21 日, 帯広畜産大学(北海道)

2. 林憲悟, 作本亮介, 細江実佐, 木崎景一郎, 橋爪一善, 高橋透. リピートブリーダーおよび正常に受胎する牛における子宮内膜遺伝子発現の網羅的解析による比較. 第 106 回日本繁殖生物学会大会, 2013 年 9 月 13 日, 東京農工大学(東京都)

[図書](計 0 件)

[産業財産権] 出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林憲悟 (HAYASHI KENGO)

国立研究開発法人 農業生物資源研究所

主任研究員

研究者番号：70563625

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：