

機関番号：10105  
 研究種目：研究活動スタート支援  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21880006  
 研究課題名（和文） ウシ黄体形成における血管新生制御機構：VEGF-Vasohibin による局所調節  
 研究課題名（英文） Control mechanisms of angiogenesis in the developing corpus luteum in the cow: local regulation by VEGF-Vasohibin  
 研究代表者  
 白砂 孔明 (Shirasuna Koumei)  
 帯広畜産大学・畜産学部・助教  
 研究者番号：20552780

## 研究成果の概要（和文）：

妊娠を成立させることは、種の保存戦略で最も基本的な事象である。哺乳動物では、妊娠成立に黄体が分泌するプロゲステロンが必須である。本研究は、黄体形成の分子機構を解明することで、受胎率向上への技術開発の展望を得ようとする企画である。

本研究の結果から、ウシ黄体内に VEGF-Vh システムが存在する事を初めて見出した。また、VhはVEGFによって発現が誘導され、VEGFで刺激された血管新生に抑制的に働く事が示された。血管新生が盛んな初期黄体では、VEGFが血管新生を促進すると同時に、Vh発現を誘導する血管新生抑制機構を制御することで、血管新生が過剰に起こるのを防ぐ役割を果たしている可能性が考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

Establishment of pregnancy is basic phenomenon for the conserved strategy of species. In mammals, progesterone released from the corpus luteum has key role to establish pregnancy. The aim of the present study is the elucidation of molecular mechanisms about development of the bovine corpus luteum, and the presentation a vision of developing technologies for improvement of conception rate in the cow.

From the results of the present study, we clearly demonstrated that VEGF-Vasohibin system exists in the bovine corpus luteum. Also, VEGF stimulated vasohibin expression and vasohibin inhibited angiogenesis induced by VEGF *in vitro* cell culture model. These findings suggest that vasohibin has a potential to control angiogenesis with the proper level in the developing corpus luteum in the cow.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用動物科学

キーワード：ウシ、血管新生、繁殖生理、黄体

## 1. 研究開始当初の背景

妊娠を成立させることは、乳牛の繁殖戦略において最も基本的な事象である。現在、先進

国の乳牛では初回人工授精による受胎率は50%を下回っており、我が国を含む各国で受

胎率向上へ向けたホルモン投与技術開発が精力的に進められているが、抜本的解決策には至っていない。ウシ卵巢では、発育した主席卵胞が LH サージによって排卵し、活発な血管新生を伴い黄体が形成される。黄体は、妊娠の成立・維持に必要なプロジェステロン (P) を分泌し、1 週間程度で成熟する。近年、胚発育における黄体機能 (P 分泌) の重要性が示されている。黄体からの P 分泌増加が遅いウシは、授精後の胚由来インターフェロン  $\gamma$  (INF) 産生 (栄養膜から分泌される早期受胎認識因子) が低い。一方、P 分泌増加が早いウシは、授精後の INF 産生が高く、胚も大きく成長した。つまり、迅速に黄体形成・P 分泌機能を発達させるウシでは、胚発育・妊娠成立が起きやすいと考えられる。ウシ黄体は約 30% 程度の黄体細胞と 50% 以上の血管内皮細胞で主に構成されており、黄体形成および P 分泌機能獲得に及ぼす血管新生の重要性が極めて大きい。血管新生を調節し、黄体機能・形成不全に陥らない、妊娠可能な黄体が作出されれば、繁殖に関わる問題による淘汰牛を減少させることが可能であり、乳生産を介した食の安定供給に貢献することができる。しかし、この方法論を確立するには、ウシ黄体形成メカニズムの詳細な知見が未だ不十分である。本研究はウシ黄体形成における血管新生調節の分子生物学的機構を解明することで、受胎率向上への技術開発の展望を得ようとする企画である。

## 2. 研究の目的

妊娠不成立の場合、子宮からプロスタグランジン F<sub>2</sub> $\alpha$  (PGF) が放出され、黄体は短時間で血流減少と共に P 分泌機能が減少し、続いて萎縮する。この黄体退行調節で極めて興味深いことは、中期黄体 (発情後 7-15 日) を持つウシに人為的に PGF を投与すると黄体退行

を引き起こすことが可能だが、初期黄体 (発情後 1-5 日) では不可能である。しかしながら、この原因は未だ解明されていない。通常、生体には恒常性を維持するために、行き過ぎた反応を負に制御するネガティブフィードバック機構が備わっている。Vasohibin (Vh) は、血管新生促進因子 (VEGF など) に応答した細胞において産生され、血管新生を抑制することから、血管新生のネガティブフィードバック調節機構を担う血管新生抑制因子として発見された。そこで私達は、上記の疑問に対して黄体形成の基礎現象である血管新生の視点から、準備研究を進め、キーとなる現象を発見した。中期黄体で PGF は VEGF 発現を抑制したことから、黄体退行・崩壊を誘導するために血管新生を停止させたと考えられる。反対に、初期黄体では PGF は VEGF 発現を刺激したことから、血管成熟度が異なる黄体ステージで PGF が反対の作用を持つことが考えられた。以上のことから私達は、ウシ黄体において血管新生のネガティブフィードバック調節機構が存在し、本機構を抑制調節できれば、より血管新生が活発で、構造的・機能的に充実した大型黄体を作出できるという仮説を立てた。従って、本研究では「血管新生が活発で構造的・機能的に充実した黄体の作出」を目指し、黄体形成において血管新生に関するネガティブフィードバック調節機構の概念を提案する着想に至った。

## 3. 研究の方法

【検証 1】発情周期中における VEGF 及び Vh の発現変動：食肉処理場由来のウシ卵巢から初期 (days3-5), 中期 (days8-10), 後期 (days13-15), 退行期 (days18 以降) の黄体を採取し、VEGF 及び Vh の mRNA とタンパク発現を測定した。

【検証 2】PGF 誘起による黄体退行中における Vh 発現：中期黄体 (Days8-12) を持つウシへの PG 投与後、0, 0.5, 2, 12 時間後に黄体組織を採取した (n=5/time point)。

【検証 3】黄体由来細胞培養系を用いた VEGF-Vh ネガティブフィードバック機構の解明：初期黄体から単離した黄体細胞及び黄体由来血管内皮細胞に VEGF (1, 10, 100 ng/ml) または Vh (1, 10, 100, 250 ng/ml) を添加し、24 時間後に細胞を回収した。

【検証 4】黄体培養系を用いた Vh の血管新生調節機能の解析：黄体由来血管内皮細胞 (EC) をマトリゲルでコーティングしたプレートに播種し、VEGF (10, 100 ng/ml) 及び Vh (10, 100 ng/ml) による管腔形成への影響を検証した。

#### 4. 研究成果

【成果 1】Vh mRNA 及びタンパク発現はウシ黄体において発現が確認され、さらに血管内皮細胞と黄体細胞の両細胞において発現がみられた。VEGF mRNA 発現は黄体期初期、中期及び後期に比べ、退行期に減少した。Vh mRNA 発現は、血管新生が活発に起こっている黄体期初期に比べて血管構造が安定した中期に増加し、後期及び退行期に減少する傾向がみられた。Vh タンパク発現は黄体期初期に比べ、退行期において減少した。以上より、血管内皮細胞に特異的に発現するとされていた Vh は、VEGF とともに発情周期を通して黄体内の血管内皮細胞及び黄体細胞に発現している事が分かり、この事から黄体内の血管構造が VEGF-Vh システムによって制御されている可能性が考えられた。

【成果 2】PGF 投与後 0 時間と比較して、Vh

mRNA 発現は 0.5, 12 時間において有意に減少し、Vh タンパク発現は 2, 12 時間で有意に減少した。従って、PGF の刺激により血管新生調節因子である VEGF 及び Vh の発現が減少することで血管新生及び血管構造の維持が抑制される事が示された。

【成果 3】10ng/ml VEGF 添加区において、Vh mRNA 及びタンパク発現が対照区と比較して有意に増加した。Vh 添加による VEGF mRNA 及びタンパク発現に変化はなかった。以上から、ウシ黄体において、VEGF が Vh の発現を誘導することで VEGF-Vh フィードバックシステムを構築している事が示唆された。

【成果 4】VEGF を添加することで、対照区に比べて EC の管腔形成が有意に増加した。Vh を単独で添加しても管腔形成に影響はなかったが、VEGF と Vh を同時に添加すると、Vh は VEGF で刺激した管腔形成を完全に抑制した。

以上、妊娠に必須である P を分泌するウシ黄体の形成に不可欠な血管新生について、ウシ黄体内に VEGF-Vh システムが存在する事を初めて見出した。また、Vh は VEGF によって発現が誘導され、VEGF で刺激された血管新生に抑制的に働く事が示された。血管新生が盛んな初期黄体では、VEGF が血管新生を促進すると同時に、Vh 発現を誘導する血管新生抑制機構を制御することで、血管新生が過剰に起こるのを防ぐ役割を果たしている可能性が考えられた。今後、ウシ黄体形成における血管新生調節の局所フィードバック系の実態をより詳細に調べることが、受胎率向上に寄与するために重要であると考えられる。

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)

Shirasuna K, Sasahara K, Matsui M, Shimizu T,  
Miyamoto A. Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  differentially  
affects mRNA expression relating to angiogenesis,  
vasoactivation and prostaglandins in the early and  
mid corpus luteum in the cow. *J Reprod Dev*  
2010; 56: 428-436 (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

Shirasuna K, Sasahara K, Akabane Y, Matsui M,  
Meidan R, Shimizu T, Miyamoto A. Vasohibin  
expression in the bovine corpus luteum:  
Regulation by VEGF and prostaglandin  $F_{2\alpha}$ . *42<sup>th</sup>  
annual meeting; Society for the Study of  
Reproduction*. Pennsylvania (USA). 2009 July.

[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：  
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

白砂 孔明 (Shirasuna Koumei)  
帯広畜産大学・畜産学部・助教  
研究者番号：20552780

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：