

令和元年5月22日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08043

研究課題名(和文)牛卵胞発育モデルを用いた卵子発生能改善の試みと野生動物種卵子の体外生産

研究課題名(英文) The attempt to improve the developmental competence of oocytes using in vitro growth model of bovine follicles and the application for the production of wildlife oocytes

研究代表者

永野 昌志 (Nagano, Masashi)

北海道大学・獣医学研究院・准教授

研究者番号：70312402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：牛卵胞の発育および退行中のホルモン産生能と卵子発生能の関係を明らかにするため、顆粒層細胞に覆われた発育途上の卵子を培養した。培地に卵胞刺激ホルモンおよび骨形成タンパク質(BMP)4を添加したところ顆粒層細胞の黄体化が抑制されるが、移植可能胚への発生能は低下した。そこで、BMP-4等の成長因子を分泌する内卵胞膜細胞を添加する培養系の開発を試みた。卵子と内卵胞膜細胞を共培養したところ、内卵胞膜細胞によるアンドロステンジオン産生および顆粒層細胞によるエストラジオール産生が確認され、移植可能胚産生も可能であった。しかし、発生率は低く、内卵胞膜細胞機能を維持可能な培養法開発が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体外受精は家畜生産およびヒトの不妊治療分野で広く用いられているが作製された胚の発生能は低い。本研究の成果は卵子が発生能を獲得する過程を体外で明らかにする培養系の開発につながり、発生能の高い胚の体外生産にも資する。すなわち、家畜生産効率や不妊治療成功率の向上につながり、絶滅の危機にある野生動物の増殖にも寄与できる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the relationship between the steroidogenesis and the acquisition of developmental competence of bovine oocytes during follicular development or degradation, I cultured the developing bovine oocytes surrounded by granulosa cell layers. When FSH and BMP-4 were added to culture media of oocytes, luteinization of granulosa cells were inhibited but the developmental competence of oocytes decreased. Then I try to develop the new co-culture system with oocyte-granulosa cell complex (OGC) and theca cells which secretes several growth factors having the function for the development and the acquisition of developmental competence of oocytes. When OGC cultured with theca cells, theca and granulosa cells secreted androstenedione and estradiol-17 β , respectively. And oocytes acquired the developmental competence to transferrable embryos. However, the developmental rate was low. We should develop the culture system which can support the function of theca and granulosa cells.

研究分野：繁殖学

キーワード：卵子 体外受精 体外発育培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

牛における胚移植技術は乳・肉牛の遺伝的改良に大きく貢献し、泌乳量増加による牛乳の安定的生産や良質な肉の増産に大きく寄与してきた。一般的に胚移植に用いられる受精卵の大部分は雌牛へのホルモン投与による過剰排卵処理によって産生されており、採取できる移植可能胚数は1回の処理について5~10個程度と報告されている。しかし、実際の臨床現場で受精卵回収を行うと、数十個の移植可能胚が回収できる牛がいる一方、同じ処理を行っても排卵すら起こらない牛や、多くの卵子が排卵されているにもかかわらず正常な受精卵がほとんど回収されない牛も多く存在することが分かる。1回の胚回収に10万円以上の経費が必要であるにもかかわらず、安定的な胚生産ができない現状の過剰排卵処理法は経済的余裕のある大規模農家では効率的に使用され、牛群改良が効果的に行われているものの、経営基盤の脆弱な中小規模農家においては敷居の高い技術のままである。排卵が起こらないケースでは排卵を誘発する黄体化ホルモン(LH)の分泌が十分に起こっていない、あるいは成長した卵胞(直径8~9mm以上)に発現するLHレセプター量が十分でないなどの理由が考えられるが、その原因について詳細に検討した報告はない。これは、多くの生きた牛から卵巣を採取し、卵巣状態を精査することが困難なためである。しかし、卵胞の体外培養系を体内発育卵胞のモデルとして行っていることができれば、時間経過に伴う卵胞状態の変化を精査することが可能となり、卵胞の機能不全や卵子の発生成能低下の原因解明に繋がる。

2. 研究の目的

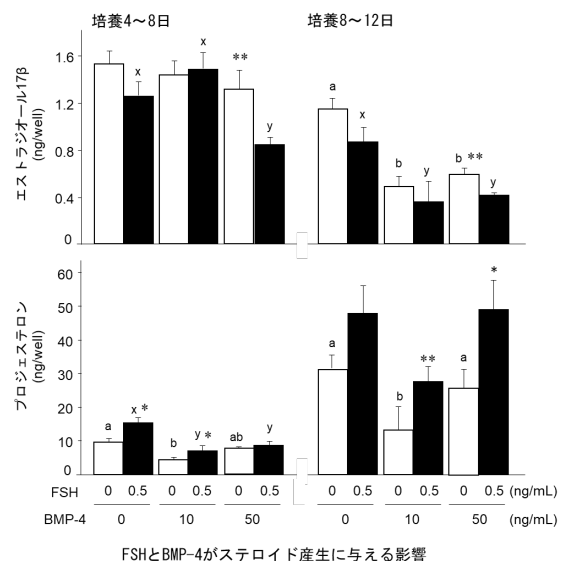
哺乳動物の卵巣内に存在する卵胞は、生殖細胞(卵子)と体細胞(顆粒層細胞、卵胞膜細胞および間質細胞)が高度に統制された集合体である。その制御機構が明らかになれば過剰排卵処理による牛体内受精卵のより効率的な生産に役立つとともに、近年問題となっている高泌乳牛の分娩後の卵胞発育異常に関係した低受胎などの問題解決に寄与できる。また、一般的な体外受精による胚生産に用いることができるのは、ある程度発育した卵胞から採取される核成熟能を獲得した卵子のみであり、その数には限りがある。卵巣内に数多く存在する発育前期の小卵胞を効率的に体外発育させる方法の開発は移植可能胚の体外での効率的な生産にも寄与できる。この技術は、発情周期の明らかでない絶滅に瀕した野生動物の卵子を体外で生産・保存する技術にも繋がる。

3. 研究の方法

食肉衛生検査所で処理された雌牛より採取した牛卵巣の皮質に存在する直径0.5~1mmの初期卵胞状卵胞を採取して実験に用いる。内卵胞膜細胞を除去した培養系では、卵胞は卵子-顆粒層細胞複合体(OGC)として、卵細胞質の直径が100µm以下のOGCを培養に供する。培養容器には96ウェルプレートを用い、OGCは各ウェルに1個ずつ入れて個別に体外発育培養に供する。また、内卵胞膜細胞とOGCの共培養方法について検討を行う。内卵胞膜細胞やOGCから分泌される性ステロイドホルモンの測定とともに発育卵子の発生成能を体外受精によって確認し、機能評価を行う。また、添加するホルモンや各種成長因子が培養細胞のエストラジオール17β(E)およびプロゲステロン(P)分泌能について検討した。

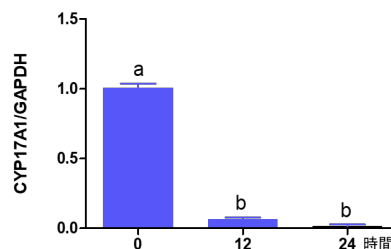
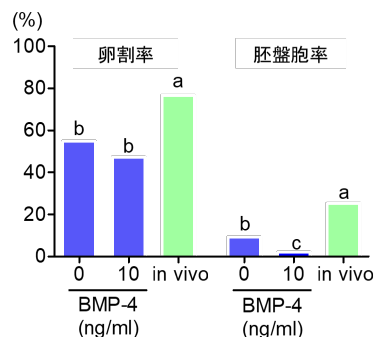
4. 研究成果

牛卵子の体外発育(IVG)培養中の性ステロイドホルモン産生能と卵子核成熟能の関係を明らかにするため、OGCをアンドロステンジオン(A)添加培地で培養した。IVG培地に0あるいは0.5ng/ml FSHおよび0、10あるいは50ng/ml骨形成タンパク質(BMP)4を添加してE・P産生およびIVG後のOGC生存率、卵子直径および核成熟能について検討した。培養4日目に形態的に正常と判定されたOGCでは死滅群に比べてE産生が高く、P産生は低かった。生存OGCのE産生量は、全実験群において培養8日目まで増加し、12日目には低下したがP産生は培養期間を通して増加した。BMP-4添加に拘らず、FSH添加はE産生を低下させ、P産生を増加させた。50ng BMP添加によりE・P産生は共に低下したが、10ng BMP-4添加ではE産生は低下せず、P産生のみ低下させた。培養12日後のOGC生存率はFSH添加によって高くなり、FSH無添加+50ng BMP-4添加で低くなった。卵母細胞の直径はFSH添加+50ng BMP添加の場合に最小となった。IVG卵子の核成熟率はFSH無添加+10ng BMP-4添加で低くなったが、他群では70-80%で同等であった。以上の結果から、牛OGCのIVGでは、生存OGCは発育中の卵胞に近いEおよびP産生能を示すがIVG期間の延長と共に退行卵胞様のE/P比低下が認められた。こ



の結果は、BMP-4 添加により顆粒層細胞の黄体化が抑制されていることを示唆している。しかし、10 ng/ml BMP-4 添加培地に由来する卵子を体外受精に供したところ、胚盤胞への発生が抑制された。

そこで、次の実験では OGC の発育培養期間を延長することで、卵子の発育を促進することを試みた。BMP-4 の添加にかかわらず 12 日目に約 85% であった OGC の生存率は、BMP-4 無添加では 16 日目に 58.9% に低下したが、10 ng/ml BMP-4 を添加した場合は 12 日目と同等であった (83.2%)。また、16 日間培養により、卵子直径は 12 日間培養よりも大きくなった (それぞれ 114.6 μm および 111.7 μm)。しかし、10 ng/ml BMP-4 添加時の胚盤胞への発生率は、12 日間培養 (9.0%)、14 日間培養 (1.8%) および 16 日間培養 (0%) と培養期間の延長に伴って低下した。以上の結果から、BMP-4 添加は、16 日間まで培養期間を延長しても顆粒層細胞の生存性を維持し、卵子発育を促すことが示された。また、16 日間培養後の卵子発生能の低下は、BMP-4 添加による培養期間延長が牛 OGC の体外培養系改善に繋がらないことが示唆された。次に、牛 OGC 発育培養に BMP-4 等の成長因子を分泌する内卵胞膜細胞を添加する培養系の開発を試みた。ステロイドホルモンを含まない培地で OGC と内卵胞膜細胞を共培養したところ、培養 12 日目に 82.7% の OGC が生存していた。また、内卵胞膜細胞による A 産生および顆粒層細胞による E 産生が確認された。しかし、A 産生は培養 1 日目のみに限られることが、内卵胞膜細胞における *CYP17A1* 遺伝子発現によって確認できた。OGC と内卵胞膜細胞の共培養に由来する卵子を体外受精に供したところ、17.3% が胚盤胞まで発生したが、この発生率は体内発育卵子の 33.8% よりも低かった。これらの結果から、卵子が高い発生能を獲得するためには、内卵胞膜細胞の機能を長期間維持できる培養法の開発が必要であると考えられた。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- Sakaguchi K, Maylem ERS, Tilwani RC, Yanagawa Y, Katagiri S, Atabay EC, Atabay EP, Nagano M: Effects of follicle-stimulating hormone followed by gonadotropin-releasing hormone on embryo production by ovum pick-up and in vitro fertilization in the river buffalo (*Bubalus bubalis*), Anim Sci J 90: 690-695, 2019. DOI: 10.1111/asj.13196 査読あり
- Abdel-Ghani MA, Yanagawa Y, Balboula AZ, Sakaguchi K, Kanno C, Katagiri S, Takahashi M, Nagano M: Astaxanthin improves the developmental competence of in vitro grown oocytes and modifies the steroidogenesis of granulosa cells derived from bovine early antral follicles, Reprod Fertil Dev 31: 272-281, 2019. DOI: 10.1071/RD17527 査読あり
- Sakaguchi K, Tanida T, Abdel-Ghani MA, Kanno C, Yanagawa Y, Katagiri S, Nagano M: Relationship between the antral follicle count in bovine ovaries from a local abattoir and steroidogenesis of granulosa cells cultured as oocyte-cumulus-granulosa complexes, J Reprod Dev 64: 503-510, 2018. DOI: 10.1262/jrd.2018-080 査読あり
- Erdenetogtokh P, Kanno C, Sakaguchi K, Yanagawa Y, Katagiri S, Nagano M: Effect of astaxanthin addition to an individual culture system for in vitro maturation of bovine oocytes on accumulation of reactive oxygen species and mitochondrial activity, Jpn J Vet Re 66: 325-329, 2018. DOI: 10.14943/jjvr.66.4.325 査読あり
- Abdel-Ghani MA, Sakaguchi K, Kanno C, Yanagawa Y, Katagiri S, Nagano M: Effects of pre-maturational culture duration on developmental competence of bovine small-sized oocytes, J Reprod Dev 64: 365-369, 2018. DOI: 10.1262/jrd.2018-004 査読あり
- Kanno C, Yanagawa Y, Takahashi Y, Katagiri S, Nagano M: Effects of semen preservation

procedure in egg yolk-tris based extender on bull spermatozoa characteristics, Jpn J Vet Res 65: 151-157, 2017. DOI: 10.14943/jjvr.65.3.151 査読あり

Kanno C, Sakamoto KQ, Yanagawa Y, Takahashi Y, Katagiri S, Nagano M: Comparison of sperm subpopulation structures in first and second ejaculated semen from Japanese black bulls by a cluster analysis of sperm motility evaluated by a CASA system, J Vet Med Sci 79: 1359-1365, 2017. DOI: 10.1292/jvms.17-0012 査読あり

Yang Y, Kanno C, Sakaguchi K, Yanagawa Y, Katagiri S, Nagano M: Extension of the culture period for the in vitro growth of bovine oocytes in the presence of bone morphogenetic protein-4 increases oocyte diameter, but impairs subsequent developmental competence, Anim Sci J 88: 1686-1691, 2017. DOI: 10.1111/asj.12841 査読あり

Sakaguchi K, Huang W, Yang Y, Yanagawa Y, Nagano M: Relationship between in vitro growth of bovine oocytes and steroidogenesis of granulosa cells cultured in medium supplemented with bone morphogenetic protein-4 and follicle stimulating hormone, Theriogenology 97: 113-123, 2017. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.04.030 査読あり

[学会発表](計25件)

Sakaguchi K, Yanagawa Y, Yoshioka K, Suda Tomoko, Kawano Kohei, Katagiri S, Nagano M: Effects of antral follicle count in ovaries on follicular development and endocrine dynamics of FSH and steroid hormones in cattle. 45th Annual Conference of the International Embryo Technology Society, New Orleans, Louisiana, USA. 2019.

Torii Y, Matsumoto Y, Sakamoto H, Nagano M, Katagiri S, Yanagawa Y: Monitoring of follicular dynamics using ultrasonography and ovulation induction by GnRH in captive brown bear (*Ursus arctos*). Asian Society of Conservation Medicine (ASCM) 2018 Bali, Indonesia. 2018.

Madalitso C, Abdel-Ghani MA, Sakaguchi K, Yanagawa Y, Katagiri S, Nagano M: Usefulness of gas permeable culture device in in vitro production of competent bovine oocytes by shortened culture period, 第161回日本獣医学会学術集会, つくば国際会議場, 2018.

坂口謙一郎, 柳川洋二郎, 吉岡耕治, 須田智子, 植芝滉己, 河野光平, 宮本祥代, 片桐成二, 永野昌志: 乳牛の卵巣内胞状卵胞数が血中卵胞刺激ホルモン動態と卵胞における性ステロイドホルモン産生に与える影響, 第161回日本獣医学会学術集会, つくば国際会議場, 2018.

植芝滉己, 呉ユエ, 陳震, 坂口謙一郎, 柳川洋二郎, 片桐成二, 千葉仁志, 千葉仁志, 惠淑萍, 永野昌志: 液体クロマトグラフィー高分解能質量分析を用いた牛卵子中遊離脂肪酸およびトリアシルグリセロールの分析, 第161回日本獣医学会学術集会, つくば国際会議場, 2018.

菅野智裕, 菅野智裕, 柳川洋二郎, 片桐成二, 永野昌志: クラスタ解析の精子受胎性評価への応用: 性選別および通常凍結精液中の精子運動性サブポピュレーション構成の比較, 第161回日本獣医学会学術集会, つくば国際会議場, 2018.

坂口謙一郎, Excel Rio S. Maylem, Ramesh C. Tilwani, 柳川洋二郎, 片桐成二, Edwin C. Atabay, Eufrocina P. Atabay, 永野昌志: 卵胞刺激ホルモンおよび性腺刺激ホルモン放出ホルモン投与による卵巣刺激が河川型水牛 (*Bubalus bubalis*) における経膣採卵-体外受精成績に及ぼす影響, 第37回北海道牛受精卵移植研究会研究発表大会, 札幌, 2018.

柳川洋二郎, 菅野智裕, 兼子明久, 印藤頼子, 佐藤容, 木下こづえ, 今井啓雄, 平井啓久,

片桐成二, 永野昌志, 岡本宗裕: ペレット法により凍結したニホンザル精液に対する融解法の違いが精子性状に与える影響, Cryopreservation Conference 2017, 文部科学省研究交流センター(つくば), 2017.

Kanno C, Takahashi Y, Yanagawa Y, Katagiri S, Nagano M: Transition of sperm motility subpopulation in bull's semen during freezing process in a conventional egg-yolk tris extender evaluated by cluster analysis, Fourth World Congress of Reproductive Biology, Okinawa Convention Center, 2017.

Sakaguchi K, Tanida T, Nagai K, Yang Y, Yanagawa Y, Katagiri S, Nagano M: Relationships between antral follicle count, developmental competence of oocytes, and steroidogenesis of granulosa cells in cattle, Fourth World Congress of Reproductive Biology, Okinawa Convention Center, 2017.

菅野智裕, 柳川洋二郎, 片桐成二, 永野昌志: 精子運動能自動解析装置(CASA)を用いた受精能獲得精子の運動性評価, 第160回日本獣医学会学術集会, 鹿児島大学(鹿児島), 2017.

鳥居佳子, 菅野智裕, 簗原悠太郎, 坂元秀行, 松本直也, 富安洵平, 松井基純, 永野昌志, 片桐成二, 柳川洋二郎: ヒグマ精液の凍結保存液に添加する糖の種類および冷却速度が凍結融解後の精液性状に及ぼす影響, 第160回日本獣医学会学術集会, 鹿児島大学(鹿児島), 2017.

坂口謙一郎, 谷田孝志, 楊応華, 菅野智裕, 永井克尚, Mohammed. A. Abdel-Ghani, 柳川洋二郎, 片桐成二, 永野昌志: 牛卵巣内胞状卵胞数と初期胞状卵胞由来卵子-顆粒層細胞複合体の顆粒層細胞増殖能および卵子発生能の関連性, 第160回日本獣医学会学術集会, 鹿児島大学(鹿児島), 2017.

Abdel-Ghani MA, Kanno C, Sakaguchi K, Yanagawa Y, Katagiri S, Nagano M: Astaxanthin improves the growth parameters, developmental competence, and quality of in vitro grown oocytes derived from bovine early antral follicle, 第160回日本獣医学会学術集会, 鹿児島大学, 2017.

柳川洋二郎, 菅野智裕, 南晶子, 兼子明久, 印藤頼子, 佐藤容, 木下こづえ, 岡本宗裕, 片桐成二, 永野昌志: ニホンザルにおける排卵誘起処置を伴う単回人工授精プログラムの検討, 第160回日本獣医学会学術集会, 鹿児島大学, 2017.

Erdenetogtokh P, Yanagawa Y, Katagiri S, Nagano M: Mitochondrial activity and reactive oxygen species (ROS) accumulation in bovine oocytes derived from different culture system for in vitro maturation, 第160回日本獣医学会学術集会, 鹿児島大学, 2017.

鳥居佳子, 菅野智裕, 曾地千尋, 宗内一平, 牛尾佳名子, 吉住和規, 千田圭, 橋本渉, 永野昌志, 片桐成二, 柳川洋二郎: 飼育下アフリカゾウ1個体から採取した精液の輸送後および凍結融解後の精子性状, 第23回日本野生動物医学会, 日本獣医生命科学大学, 2017.

柳川洋二郎, 鳥居佳子, 菅野智裕, 田嶋彩野, 富安洵平, 松本直也, 坂元秀行, 亀井利活, 間野勉, 片桐成二, 永野昌志: 内視鏡を用いたヒグマ(*Ursus arctos*)における子宮内授精の試み, 第23回日本野生動物医学会, 日本獣医生命科学大学, 2017.

坂口謙一郎, 菅野智裕, 楊応華, 柳川洋二郎, 片桐成二, 永野昌志: 牛卵巣の大きさが顆粒層細胞の性ステロイドホルモン産生能および卵子核成熟能に与える影響, 平成29年度日本産業動物獣医学会北海道地区大会, 酪農学園大学, 2017.

菅野智裕, 高橋芳幸, 柳川洋二郎, 片桐成二, 永野昌志: 牛精液の凍結過程および液状保存における精子運動性サブポピュレーションの変化, 第36回北海道牛受精卵移植研究会研究発表大会, 札幌, 2017.

- ②① 楊 応華，坂口謙一郎，菅野智裕，柳川洋二郎，片桐成二，永野昌志：牛卵子-顆粒層細胞複合体と内卵胞膜細胞との共培養が卵子の発生能と顆粒層細胞のステロイド合成能に与える影響，第36回北海道牛受精卵移植研究会研究発表大会，札幌，2017.
- ②② 菅野智裕，柳川洋二郎，片桐成二，高橋芳幸，永野昌志：牛精液の射出順序が精子運動性サブpopulation構成に与える影響，第159回日本獣医学会学術集会，日本大学，2016.
- ②③ 柳川洋二郎，菅野智裕，兼子明久，印藤頼子，岡本宗裕，片桐成二，永野昌志：ペレット法による凍結保存が融解後のニホンザル精液の運動性に与える影響，第159回日本獣医学会学術集会，日本大学，2016.
- ②④ Abdel-Ghani MA, Sakaguchi K, Kanno C, Yang Y, Yanagawa Y, Katagiri S, Nagano M: Effect of prematuration culture duration on developmental competences of bovine small sized oocytes, 第159回日本獣医学会学術集会，日本大学，2016.
- ②⑤ 坂口謙一郎，谷田孝志，永井克尚，楊応華，柳川洋二郎，片桐成二，永野昌志：牛卵巣内胞状卵胞数と初期胞状卵胞由来卵子顆粒層細胞複合体の性ステロイドホルモン産生能の関係，第159回日本獣医学会学術集会，日本大学，2016.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：柳川 洋二郎

ローマ字氏名：(YANAGAWA, Yojiro)

研究協力者氏名：坂口 謙一郎

ローマ字氏名：(SAKAGUCHI, Kenichiro)

研究協力者氏名：菅野 智裕

ローマ字氏名：(KANNO, Chihiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。