

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：21301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08048

研究課題名(和文) Hippoシグナル経路の抑制によるウシ卵巢の活性化と繁殖性向上技術の開発

研究課題名(英文) Development of bovine ovarian activation and improvement of fertility by inhibiting the Hippo signaling pathway

研究代表者

小林 仁 (Kobayashi, Jin)

宮城大学・食産学群(部)・教授

研究者番号：40234827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウシのHippoシグナル抑制による二次卵胞活性化法の開発を目的とした。ウシ卵巢の断片化培養を行ったところ、培養6h後にYapの核内への移行と細胞内のアクチン重合の増加が確認され、Hippoシグナル経路の抑制が確認された。断片化培養によりHippoシグナル下流の細胞増殖因子のCCN2およびBirc5遺伝子は、有意ではないものの増加傾向を示した。経産牛4頭による卵巢穿刺試験では、卵胞数は穿刺刺激直後から増加傾向を示し、2ヶ月目は合計卵胞数と小卵胞数がピークを示し($p < 0.01$)、5ヶ月後に穿刺刺激前に戻った。Hippoシグナルの抑制により二次卵胞を活性化できることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

雌牛の繁殖機能は加齢と共に低下するが、その原因の一つが卵巢中の発育途上の卵胞数の減少にあると考えられている。原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞といった初期の卵胞ほど卵巢中の割合が高いことから、これらの卵胞を活性化して退行を抑えることができれば、卵巢中の胞状卵胞数の増加につながる。そこで、本研究では二次卵胞の活性化法を検討し、Hippoシグナルを抑制することで、二次卵胞を活性化できることが明らかとなった。本成果により雌牛の繁殖機能が向上し、過排卵処理による回収胚数の増加や、超音波ガイド経膈採卵(OPU)による胚盤胞の作出効率の改善が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to develop a method for activating secondary follicles by suppressing Hippo signaling in cattle. When a culture of bovine fragmented ovary was performed, transfer of Yap into the nucleus and increase of actin polymerization in the cell was confirmed after 6 hours of culture, and suppression of the Hippo signaling pathway was confirmed. By the culture of fragmented ovary, CCN2 and Birc5 genes, which are cell growth factors downstream of Hippo signal, showed a non-significant increase tendency. In an ovarian puncture test using 4 heifers, the antral follicle count showed a tendency to increase after puncture stimulation, and the total number of follicles and the number of small follicles showed a peak at the second month ($p < 0.01$). After 5 months, it returned to the level of the follicle count before puncture stimulation. Inhibition of Hippo signal could be a useful treatment for activating secondary follicles.

研究分野：動物生殖学

キーワード：卵胞活性化 卵胞発育 卵巢断片化培養 Hippoシグナル 二次卵胞 OPU 卵巢穿刺刺激

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウシの繁殖機能は加齢と共に低下するが、その原因の一つに卵巣中の発育途上の卵胞数の減少がある。ウシの卵胞発育は、多数の原始卵胞から一群の卵胞が一次卵胞へと発育を開始し、二次卵胞、胞状卵胞へと卵胞発育が進行すると共に卵胞の閉鎖・退行が起きることで、徐々に卵胞数を減らし、最終的に排卵されるのは、1個の主席卵胞である。卵胞発育過程の卵胞を活性化して卵胞発育を促進することができれば、卵巣中の発育途上の卵胞数が増加し、ウシの繁殖性を向上させる可能性がある。ヒトでも、卵巣内の卵胞数と卵の質(卵巣予備能)を高めることは、女性の生殖機能を向上させることから、卵巣中の発育途上の卵胞を増やすことは母胎の妊孕性を高める上で重要な課題となっている。

近年、アクチン重合化による Hippo シグナル経路の抑制により、発育途上の卵胞を活性化する方法が開発された。卵巣を小断片化培養することで Hippo シグナル経路を抑制し、卵巣内の二次卵胞を活性化できることが、ヒトやマウスで確認された(Kawamura et al., 2013)。Hippo シグナルは細胞増殖を制御し、臓器の大きさを規定する重要な細胞内シグナルであり、細胞同士の接着の傷害や細胞骨格の変化により Hippo シグナルは不活性化し抑制される。Hippo シグナルが抑制されると、エフェクタータンパクである YAP(Yes-associated protein)が脱リン酸化されて核内に移行し、CCNなどの成長因子が産生され、顆粒層細胞の増殖を促し卵胞発育が促進されると考えられている。ヒトでは早発閉経の治療に、卵巣の断片化培養による人為的活性化法(IVA)が用いられ、閉経した卵巣の一部を断片化して体外で培養することにより休眠中の二次卵胞が活性化し、その後体外受精により嬰兒を得ることに成功している(Kawamura et al., 2013)。一方、ウシではこれまで卵巣の断片化による IVA をウシ卵巣に応用した報告はなく、卵巣断片化培養の基礎的研究が必要である。また、卵胞活性化法を体外受精胚や OPU などの繁殖技術に組み込むためには、断片化した卵巣を体外で培養するよりも、生体内で卵胞を活性化する方法が求められる。

2. 研究の目的

(1) ウシ卵巣の断片化培養により、卵胞活性化が誘起できるかどうかを確認するために、断片化培養後の卵巣で、Hippo シグナル経路の YAP の核移行やアクチンの重合について調べるとともに、Hippo シグナル経路の下流遺伝子である CCN2、Birc5 などの細胞増殖因子の発現解析を行った。

(2) 卵巣穿刺刺激が生体内卵巣の卵胞活性化法としての有効性を調べるために、穿刺刺激の方法、穿刺刺激による卵胞発育への影響についてウシ生体を用いて調べた。

3. 研究の方法

(1) ウシ卵巣の断片化培養による卵胞活性化

食肉処理場由来のウシ未経産卵巣の表面を 1mm の深さで剥離し、1~2mm 角に断片化した卵巣片を 10 個ずつミリセル(ミリポア)にのせ、気相液相界面培養を行った(38.5℃、5% CO₂ in 空気)。培養液は、10%ウシ胎児血清、FSH、ITS-G、L-アスコルビン酸を添加した DMEM/F12 を用い、培養時間を 0、2、4、6 時間としたが、一部は 48 時間まで延長して行った。

培養後の卵巣断片は、一方を 4℃ のブアソ液で固定した後パラフィン包埋し、薄切片を作製し、もう一方は RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて RNA 抽出を行い、逆転写反応で cDNA の合成を行った。また、卵巣断片の一部はウエスタンブロット法によるアクチン重合を測定(Cytoskeleton)した。

YAP の局在は、免疫染色により調べた。薄切切片を脱パラ、水和/洗浄した後抗原の不活化を行い、抗 YAP 抗体 (Cell Signaling) で反応させ、二次抗体 (Vector) を用いて発色させた。

培養後の卵巢断片サンプルの遺伝子発現解析は、Real-Time PCR 法で行い、CCN2、Birc5、FGF1、BMP15、GDF9 および Smad7 の各遺伝子について調べた。

(2) 卵巢穿刺刺激によるウシ生体内卵巢の卵胞活性化

ウシ卵巢穿刺試験には、黒毛和種 4 頭を供した。穿刺刺激は、超音波ガイド経膈採卵 (OPU) 用の採卵針 A-タイプ (ミサワ医科工業) を用い、経膈で卵巢表面から 30 回または 50 回穿刺して行った。穿刺による出血を抑えるために、採卵針の先端部に、レーザー照射デバイス (ユニタック) を装着し、採卵針で穿刺する度にレーザー照射を行い焼灼止血した。穿刺刺激は片側卵巢に行い、もう一方の卵巢は対照として無処理とした。

穿刺処理の前後の卵巢内の卵胞数について、超音波画像診断装置 (HS-2200V 富士平工業) を用いて調査した。卵胞観察は穿刺刺激 4 ヶ月前から行い、穿刺刺激後 6 ヶ月間行った。卵胞は、診断装置の画面上のスケールにより小卵胞 (2 ~ 5 mm)、中卵胞 (5 ~ 10 mm)、大卵胞 (10 mm 以上) に分類し、その数を週 1 回計測した。

4. 研究成果

(1) ウシ卵巢の断片化培養による卵胞活性化

断片化卵巢を 0, 6, 48 時間培養したウシ卵巢標本について YAP の免疫染色を行った。培養 0 時間では顆粒層細胞の細胞質が陽性に染色され核内は陰性であったが、培養 6, 48 時間後では核も含め細胞全体が陽性に染色され、YAP の細胞質から核内への移行が認められた。(図 1) また、F アクチンと G アクチンの比より、断片化培養による G アクチンの増加が認められ、アクチン重合が確認された。

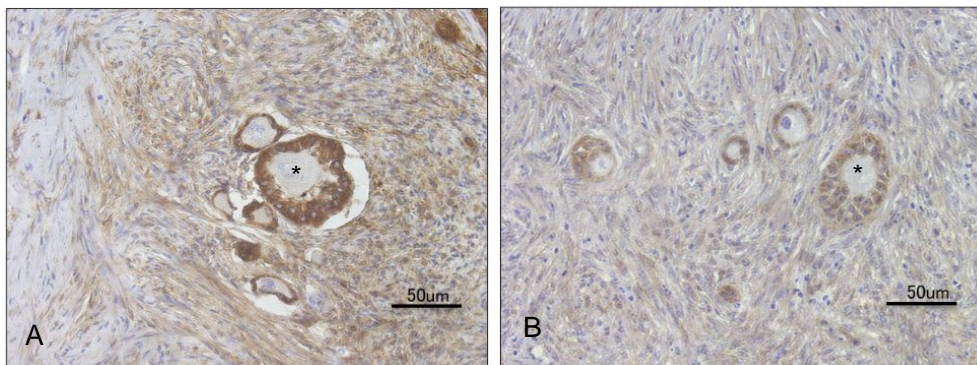


図 1. 小断片化培養したウシ卵巢中の YAP の局在. A: 培養 0 時間 卵母細胞の周辺の顆粒層細胞の細胞質が YAP に陽性であるのに対し核内は陰性、B: 培養 48 時間、顆粒層細胞の全体が YAP に陽性. *: 卵母細胞.

断片化培養後の遺伝子発現では、Hippo シグナルの下流遺伝子である CCN2、Birc5、FGF1 は培養時間 2 時間において増加傾向を示したものの、有意な差は認められなかった。

初期の卵胞発育に関連する BMP15 は、培養時間に関わらず常に一定の発現傾向を示したのに対し、GDF9 は有意な差は認められないものの培養時間依存的に増加傾向を示した。

細胞増殖抑制性の Smad7 遺伝子は、培養 2 時間後に顕著な遺伝子発現を示し、その後は減少傾向を示した。Smad7 は細胞増殖を促す Smad2/3 を抑制し、細胞増殖因子を抑制することが報告されている。炎症性サイトカインの増加によって Smad7 の発現が誘導されることが知られて

おり、断片化培養によって誘導された炎症反応が、細胞増殖因子の発現を抑制している可能性が推察された。

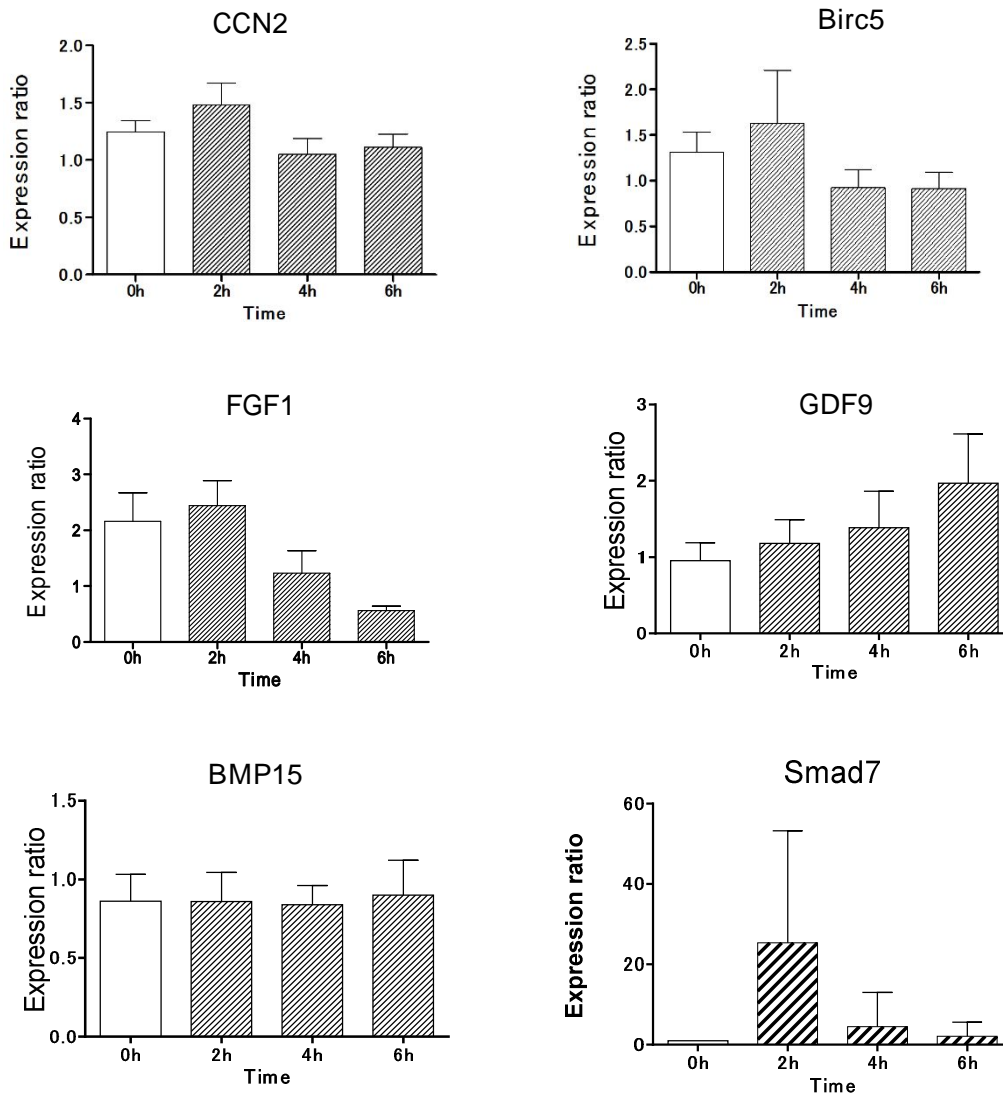


図 2. ウシ卵巢断片化培養による遺伝子発現量の比較 (n=5, ±SE)

断片化培養を行ったサンプルにおいて、遺伝子によって発現傾向が異なるものの、有意な差を検出するには至らなかった。この原因を明らかにするために、卵巢の組織標本から卵巢断片 1mm³ 当たりの卵胞数を計測した。活性化の対象となる二次卵胞数は、0.21 個/mm³ ± 0.11 (平均 ± SD) で、変動係数は 0.52 であった。10 個の卵巢断片から RNA を抽出した場合、平均 2.1 個の二次卵胞が含まれているものの、変動係数が大きいことから、卵巢片に含まれる卵胞数のばらつきが遺伝子発現に影響を与えている可能性が示唆された。

(2) 卵巢穿刺刺激によるウシ生体内卵巢の卵胞活性化

穿刺刺激後の卵巢では、2 週間目から卵胞数が増加する傾向が両側の卵巢に認められた。穿刺処理を行った卵巢と、無処理の卵巢の卵胞数の推移に有意な差は認められなかったことから、両側の卵胞数の合計を図 3 に示した。小卵胞数および全卵胞数は 2 ヶ月後にピークを示した。平均全卵胞数では、穿刺刺激時と 1 ヶ月後および 2 ヶ月後の間に有意な差が認められた (1 ヶ月後 p<0.05、2 ヶ月後 p<0.01)。

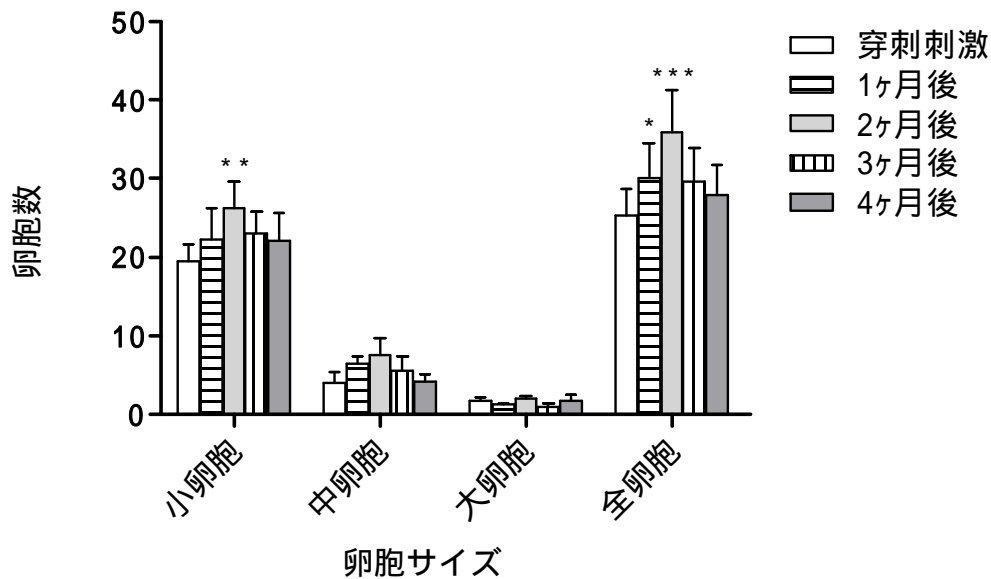


図 3. 穿刺刺激後の胞状卵胞のサイズごとの卵胞数の推移 (n= 4, ± SE)

穿刺刺激後の卵胞数のピークは 2 ヶ月後に認められた。直径 130 μm の胞状卵胞が主席卵胞に発育するためには約 42 日を必要とすることが報告されており (Lussier et al., 1987)、3 ヶ月後も穿刺次今回誘起された卵胞には胞状卵胞より以前の二次卵胞も増加した卵胞中に含まれていると推察された。

卵胞数の変動は、小卵胞及び中卵胞で観察されたものの、大卵胞ではほとんど見られなかった。この理由として、大卵胞では主席卵胞が他の卵胞発育を抑制して、排卵卵胞数を 1 個に選抜していることが考えられた。このため、穿刺刺激によって卵胞発育を開始した卵胞数を全て計測するためには、胞状卵胞の退行を抑制する事が必要であり、FSH 投与の必要性が示唆された。

以上のことから、ウシ卵巣の穿刺刺激は、未成熟卵胞の発育を促進する効果を有していることが確認された。また、穿刺刺激 1 週間後の卵巣には、ほとんど卵胞が確認できなかったことから、断片化直後の卵巣片においても卵胞発育が一時的に抑制されている可能性が考えられた。その場合、顆粒層細胞を活性化する細胞増殖因子の抑制に Smad7 が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林 仁、長谷川昇司、渥美孝雄、横尾正樹
2. 発表標題 低エネルギー飼養管理下で発情が回帰した長期不受胎繁殖牛の代謝プロファイルテスト
3. 学会等名 日本胚移植技術研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	河村 和弘 (Kawamura Kazuhiro) (10344756)	国際医療福祉大学・医学部・教授 (32206)	
連携研究者	横尾 正樹 (Yokoo Masaki) (10396541)	秋田県立大学・生物資源科学部・准教授 (21401)	