

平成21年5月29日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591892  
 研究課題名（和文）体外受精の着床率向上に向けた卵子機能マーカーの確立を目指して  
 研究課題名（英文）Oocyte-Granulosa-Theca Cell Interactions during Preantral Follicular Development: A translational research for the selection of the best quality oocytes in assisted reproduction

研究代表者  
 折坂 誠（ORISAKA MAKOTO）  
 福井大学・医学部附属病院・講師  
 研究者番号：80324143

研究成果の概要：早期の卵胞(前胞状卵胞)において、卵子由来の GDF-9 は、 莢膜細胞のアンドロゲン産生促進、および 顆粒膜細胞のアポトーシス抑制を介して、卵胞発育を促進するメカニズムが、明らかになった。このように、GDF-9 が卵胞の生存や発育に極めて重要な物質であることから、卵子に発現する GDF-9 の量、あるいは GDF-9 によって制御されている様々な物質を調べることにより、卵子の質を評価できる可能性が推測された。

## 交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,900,000 | 570,000   | 2,470,000 |
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000   | 2,080,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖医学、体外受精、卵胞発育、卵胞閉鎖、卵子、GDF-9、アンドロゲン、アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

近年の深刻な少子化社会において、不妊治療とくに体外受精など生殖補助医療に寄せられる期待は極めて大きい。体外受精で未解決な課題の1つに、「いかにして最も妊娠する確率の高い卵子あるいは受精卵を選択し、子宮に戻すことができるか?」という問題がある。すなわち、従

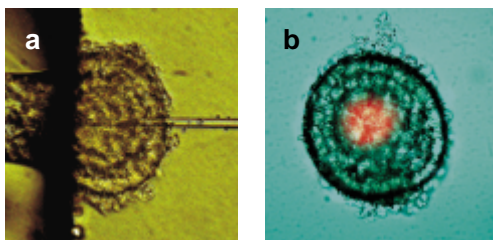
来の形態学的な「見た目の良さ」に基づいた選別法では実際の着床(妊娠)率を約10～15%しか反映しておらず、本当に妊娠の可能性が高い良質な卵子や受精卵を評価する方法が確立していない。そこで私たちは、卵子由来の GDF-9 が、早期の卵胞(前胞状卵胞)の発育や生存をコントロールするメカニズムの解明を試みた。

## 2. 研究の目的

私たちは、卵子の質を評価する方法を確立する目的で、卵子自身が産生する成長因子であるGDF-9という物質に着目している。卵子は、女性卵巣の卵胞という袋の中で発育しやがて排卵に至るが、卵子の質は排卵よりもかなり以前に既に決められている可能性がある。そこで私たちは、卵子由来のGDF-9が、早期の卵胞(前胞状卵胞)の発育や生存をコントロールするメカニズムの解明を試みた。

## 3. 研究の方法

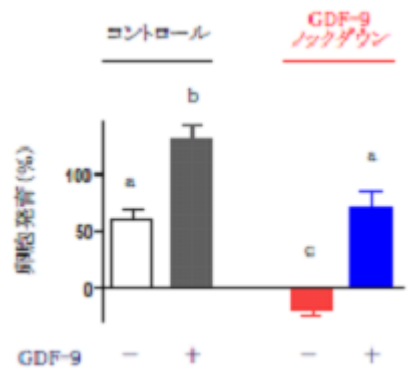
本研究を遂行するにあたり、卵子局所での遺伝子ノックダウン・システムと卵胞培養系を組み合わせ、新たな*in vitro*実験系を確立した。具体的には、幼弱ラット卵巣から単離した前胞状卵胞 (preantral follicles; 直径150~180 μm) の組織構築を保ちながら、卵子局所へ特異的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドをマイクロ・インジェクションすることにより、卵子におけるGDF-9遺伝子の発現をノックダウンした。



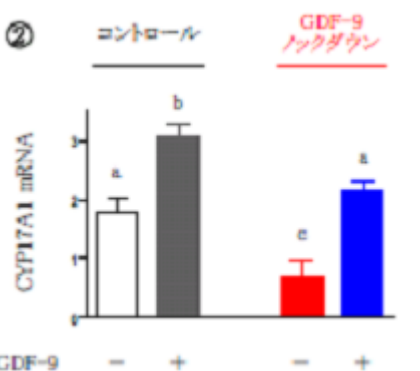
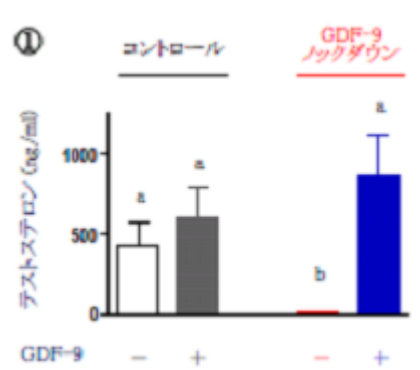
さらにインジェクションされた卵胞を、引き続き一定期間*in vitro*培養することによって、卵子におけるGDF-9遺伝子の発現が、卵胞発育や閉鎖に及ぼす影響を解析した。

## 4. 研究成果

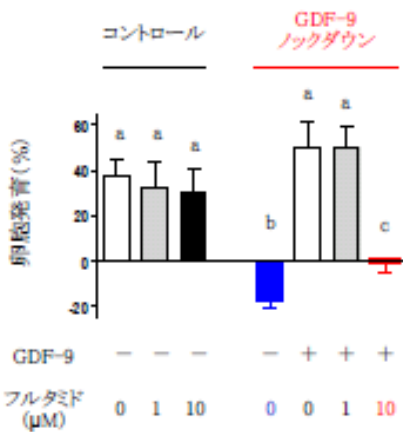
- (1) 卵子由来のGDF-9は前胞状卵胞の発育を促進するが、GDF-9が働かないようにすると(ノックダウン)卵胞の発育は停止した。



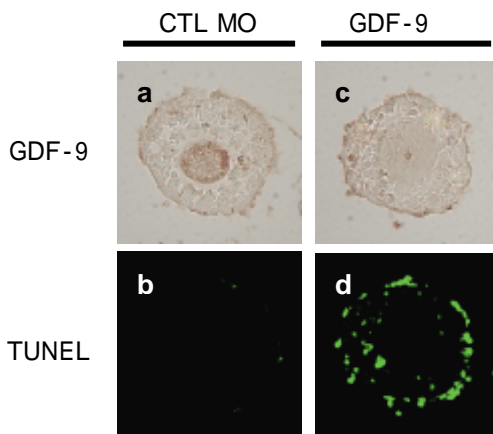
- (2) GDF-9は、卵胞の莢膜細胞に含まれるCYP17A1という酵素の発現を介して、男性ホルモン(アンドロゲン)の産生を促進した。



- (3) アンドロゲンが働かない環境では、GDF-9による卵胞の発育促進効果が抑制されたことから、GDF-9は莢膜細胞からのアンドロゲン産生を介して、卵胞の発育を誘導するメカニズムが初めて明らかになった。



(4) さらに、GDF-9は卵胞の顆粒膜細胞が死んでいく(アポトーシス)のを防ぐが、GDF-9をノックダウンすると顆粒膜細胞のアポトーシスが誘導された。



以上の結果より、卵子由来のGDF-9は、莢膜細胞のアンドロゲン産生促進、および顆粒膜細胞のアポトーシス抑制を介して、前胞状卵胞の発育を促進するメカニズムが、初めて明らかになった。



このように、GDF-9が卵胞の生存や発育に極めて重要な物質であることから、卵子に発現するGDF-9の量、あるいはGDF-9によって制御されている様々な物質を調べることにより、卵子の質を評価できる可能性が推測された。

#### 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 3 件)

Orisaka M, Jiang JY, Orisaka S, Kotsuji F, Tsang BK. Growth differentiation factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis. *Endocrinology*. 2009 Jun;150(6):2740-2748. 査読有

Tajima K, Orisaka M, Mori T, Kotsuji F. Ovarian theca cells in follicular function. *Reprod Biomed Online*. 2007 Nov;15(5):591-609. 査読有

Craig J, Orisaka M, Wang H, Orisaka S, Thompson W, Zhu C, Kotsuji F, Tsang BK. Gonadotropin and intra-ovarian signals regulating follicle development and atresia: the delicate balance between life and death. *Front Biosci*. 2007 May 1;12:3628-3639. 査読有

[学会発表](計 5 件)

Orisaka M, Tsang BK, Kotsuji F. Growth differentiation factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis. 42nd Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction. 18-22 July 2009. Pittsburgh, Pennsylvania, USA

折坂 誠, 折坂 早苗, 福田 真, 田嶋 公久, 吉田 好雄, 小辻 文和. 卵特異的成長因子 GDF-9 による前胞状卵胞の発育

促進メカニズム. 第60回日本産科婦人科学会総会並びに学術講演会. 2008年4月12~15日. 横浜市

折坂 誠, 福田 真, 田嶋 公久, 小辻 文和. Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) はアンドロゲン産生を介して前胞状卵胞の発育を促進する. 第52回日本生殖医学会総会・学術講演会. 2007年10月25~26日. 秋田市

Orisaka M. GDF9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. The 4<sup>th</sup> Canada-Japan Bilateral Workshop on Human Reproduction & Reproductive Biology. 2007年7月31日~8月2日. 弘前市

折坂 誠, 折坂 早苗, 福田 真, 田嶋 公久, 小辻 文和. 卵による卵胞発育・閉鎖調節機構の研究 ~ Growth Differentiation Factor-9 は前胞状卵胞の閉鎖を抑制し発育を促す ~. 第59回日本産科婦人科学会学術講演会. 2007年4月14~17日. 京都市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

折坂 誠 (ORISAKA MAKOTO)  
福井大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 80324143

### (2) 研究分担者

福田 真 (FUKUDA SHIN)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号: 40397279

田嶋 公久 (TAJIMA KIMIHISA)  
福井大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 60303377