

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380148

研究課題名(和文) 卵胞選抜の分子機構に基づく家畜卵子の品質判定法の創出

研究課題名(英文) Creation of judging method for livestock egg quality based on the molecular mechanism of follicular selection

研究代表者

眞鍋 昇 (MANABE, Noboru)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：80243070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円、(間接経費) 4,590,000円

研究成果の概要(和文)：家畜の卵巣内では、減数分裂が途中で停止して休眠状態にある数十万の原始卵胞の1%以下が排卵に至り、残りは選択的に閉鎖する。これまで多くの内分泌研究が行われてきたが選択調節機構は未解明である。私たちは、卵胞顆粒層細胞死を調節している細胞死リガンド・受容体系の細胞内シグナル伝達系が調節の鍵であることを示してきた。本研究でこの系を精査し、シグナル阻害因子が選択調節に支配的に関わること、それらが卵子品質判定の指標として有用であることなどを示した。

研究成果の概要(英文)：Less than 1% of several hundreds of thousand primordial follicles in livestock ovary leads to ovulation, and the rest to selectively disappear by atresia. Many studies in endocrine have been performed but follicle selection mechanism is unknown. We have shown that intracellular signaling pathway of cell death ligand-receptor system that regulates follicle granulosa cell apoptosis is the key to control the follicle selection. In the present project, the factors in this signaling pathway were precisely examined. We indicated that the signal inhibitors are involved in dominant factor to control the follicle selection, and that they are useful as an indicator of oocyte quality determination.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：動物生命科学・動物生産科学

キーワード：卵子品質 卵胞閉鎖 細胞死阻害因子 顆粒層細胞 アポトーシス 家畜卵巣 発現制御

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

全世紀末から、家畜でも体細胞やES細胞を用いた核移植によるクローン家畜の作出、卵母細胞（以下、卵子）の体外成熟と受精の広領域での実用化、卵細胞質内顕微授精法の開発など様々な生殖工学技術が編み出され、実用化レベルの成果が蓄積されてきている。しかしながら、これらの成功率は未だに低い。理由のひとつとして、供される卵子の品質が低いことが考えられるが、これまで卵子品質を科学的に分子レベルで評価しようとした研究は皆無である。

母親の加齢とともに、ダウン症の発症頻度が、等比級数的に高まるように、様々な要因で卵子の品質は損なわれる。生体にはこれを監視する機構が備わっているが、母体の加齢などによって監視が甘くなる。このような卵子の品質の低下は、胎児期に体細胞分裂を終えて減数分裂を開始するにもかかわらず、途中のディプロテン期で分裂を停止してしまって長い休眠期にはいつてしまう哺乳類の卵子にとっては避けて通れない宿命である。近年様々な生殖工学領域で卵子が使われるようになってきているので、卵子の品質を科学的に評価できる技術システムを開発することは急務である。

申請者らは20年以上にわたって、家畜卵子が長い休眠後、減数分裂を再開して発育・成熟する過程で99%以上を選択的に死滅させることで不都合をもつ低品質の卵子を取り除く機構を解明する研究を進めてきた。排卵に至る健全な卵胞と閉鎖されて消滅する卵胞との判別の指標となる可能性が高い分子を挙げることができるようになってきた。本研究では、申請者らが継続してきたこれまでの成果を活用して、死滅すべき卵胞とそれに内包される卵子（低品質卵子）を判定して排除し、残りの排卵に至る卵胞に内包される卵子（高品質卵子）を生殖工学などに供する技術システムを開発しようとした。本研究は、学術的に独創的であるだけでなく社会に貢献する意義深いものである。

2. 研究の目的

申請者らは、1992年から今日までは、家畜卵巣における卵胞とそれに内包される卵子の選抜機構に焦点を絞って研究を続けてきた結果、下記のことが分かってきた。

卵子の死滅は、卵胞の中で卵子を適切に発育・成熟させる役割をになう保育担当卵胞である顆粒層細胞がアポトーシスによって死滅する。その結果卵胞が閉鎖して消滅してしまい、卵子も死滅する。

卵胞顆粒層細胞には複数の細胞死リガンド・細胞死受容体が発現しており、顆粒層細胞のアポトーシスは主に Fas ligand (FasL)・

Fas 系によって支配的に制御されている。顆粒層細胞の細胞内のアポトーシス・シグナル伝達経路は、以下の状態にある。すなわち、細胞死受容体は、細胞死リガンドと結合して活性化し、シグナル伝達介在タンパク (FADD) と結合する。これは、下流にシグナルを伝達するカスパーゼ8前駆体 (procaspase-8) と結合してこれを活性化する。健全に発育している卵胞においては FADD や procaspase-8 が、アポトーシス阻害因子 (cFLIP) と結合しており、アポトーシス・シグナルの伝達が停止している。cFLIP は、一次卵胞後期から発現が始まり、二次卵胞以降では卵胞発育と平行して発現が高まる。健全に発育してやがて排卵にいたる三次卵胞の顆粒層細胞には cFLIP の高発現が認められる。しかし、閉鎖卵胞の顆粒層細胞では cFLIP が発現しておらず、アポトーシス・シグナルが伝達されて、細胞は死滅する。これらの先行研究の成果をふまえ、申請者らは「卵胞顆粒層細胞におけるアポトーシス・シグナル阻害因子の発現を指標にすれば、卵胞とそれに内包されている卵子の健全度を見極めることができる」という仮説をたてた。本研究では、研究代表者が在籍する東京大学附属牧場で飼育しているブタとヤギの末梢血中の性腺刺激ホルモン (FSH と LH) や性ステロイドホルモン (エストラジオール E₂ とプロゲステロン P₄) の濃度の測定と卵巣の超音波画像診断によって精密に卵胞の発育ステージを把握し、各々から外科的に卵子を取り出して、受精能と初期胚の発生能および正常性、ならびにこれらと顆粒層細胞におけるアポトーシス・シグナル阻害因子の発現との関連性を精査し、仮説の適否を実証レベルで確認するとともに、卵子品質評価システムを構築する。

3. 研究の方法

1) 「顆粒層細胞におけるアポトーシス・シグナル阻害因子の発現を指標にすれば卵子の健全度を見極めることができる」との仮説の確認：卵子の正常性、体外受精時の受精能、その後の初期胚の発生能とその正常性、卵胞液の性状およびこれらと顆粒層細胞におけるアポトーシス・シグナル阻害因子の発現レベルとの関連性を精査した。

休眠後に減数分裂を再開して発育・成熟する過程で不具合をもつ99%以上の卵子を死滅させて、ごく一部の正常卵子を選抜する機構が生来もっている評価システムを利用して卵子品質を見極めるシステムを創出することが本研究の骨子である。卵子そのものを用いて品質を評価したのでは、品質評価を終えた後の卵子を繁殖工学に供することができない。外科的に単離した個々の卵胞別に

卵子の正常性とそれを体外授精させた初期胚の発生の正常性および顆粒層細胞におけるアポトーシス・シグナル阻害因子の発現レベルならびに卵胞腔を満たす卵胞液の性状を調べ、アポトーシス・シグナル阻害因子の発現レベルが卵子品質を見極める優れた指標であることを下記のように実証した。

A 1 . 卵胞の調製：末梢血中の性腺刺激ホルモンと性ステロイドホルモンの濃度測定と卵巣の超音波画像診断を繰り返すことによって、ブタの性周期と個々の卵胞の発育ステージを精密に把握した。このブタを供して、卵胞期卵巣から外科的に卵胞を切り出し、実顕微鏡下に卵胞液を吸引回収した後切開して卵子、顆粒層細胞、卵丘細胞を単離した。

A 2 . 卵子と初期胚の正常性の評価：回収した卵子の形態学的正常性を判定・記録した後、体外成熟処理して正常に卵核胞崩壊、極体放出が起こるか否か調べた。起こる卵子には体外受精を施して受精能を評価した。続いて、得られた初期胚を培養して発生の正常性、特に胚盤胞まで正常に発生が進んでハッチングできるか否か判定した。正常に胞状胚まで発生してハッチングできたものが、実際に仮親の子宮に胚移植した場合に着床できるか否か調べた。次いで着床後の発生が正常に進行するか否かを実証的に評価した。

A 3 . 顆粒層細胞におけるアポトーシス・シグナル阻害因子の発現の評価：顆粒層細胞と卵丘細胞をホモジネートしてアポトーシス・シグナル阻害因子である c F L I P、X I A P、阻受容体 3、可溶性受容体の m R N A の発現を定量的 P C R 法にて測定し、タンパク発現を Western blot 法にて測定した。

A 4 . 顆粒層細胞における性腺刺激ホルモン受容体等の発現：卵胞の発育・成熟に深く関わる性腺刺激ホルモン受容体およびアクチビン、インヒピン、フォリスタチン、血管新生因子と受容体などの m R N A とタンパクの発現を上述と同様にして定量的に調べた。

A 5 . 卵胞液中のホルモン等の測定：卵胞発育ステージの判定のために、卵胞液中で P 4 と E 2 濃度を測定し、P 4 / E 2 比が 1 5 以上の場合を閉鎖と判定した。卵胞液アクチビン、インヒピン、フォリスタチン、血管新生因子量をイムノアッセイ法にて測定した。

2) 簡便かつ高感度に検出できる卵子品質判定システムの開発：顆粒層細胞におけるアポトーシス・シグナル阻害因子の発現を指標にして卵子の品質を評価できることがわかってきたので、実用技術とすべく簡便判定システムの開発を進めた。体細胞核移植などに卵子を使おうとする場合、高い細胞毒性をもつ R N A 分解酵素阻害剤と共存させることはできない。阻害剤が存在しない場合、m R N A は R N A 分解酵素によって容易に分解されるので、c F L I P などのアポトーシ

ス・シグナル阻害因子の m R N A を検出するシステムは非現実的である。Western blot 法を改良して免疫化学的にタンパクを定量する手法の開発を進めた。すなわち、濾紙クロマトグラフィー法の原理を応用して、細長く整形して中央部をめがね橋のように丸く盛り上げたニトロセルロース製濾紙の一方から顆粒層細胞ホモジネートの遠心分離上清を添加し、他方からルシフェラーゼ標識抗アポトーシス・シグナル阻害因子抗体を添加し、毛細管現象を利用して両者を中央部で反応させた。その後、暗黒下にルシフェラーゼ活性による発光反応を定量的に検出するシステムの開発を進めた。

3) アポトーシス・シグナル阻害因子の発現調節因子探索とその分子制御機構の解明：

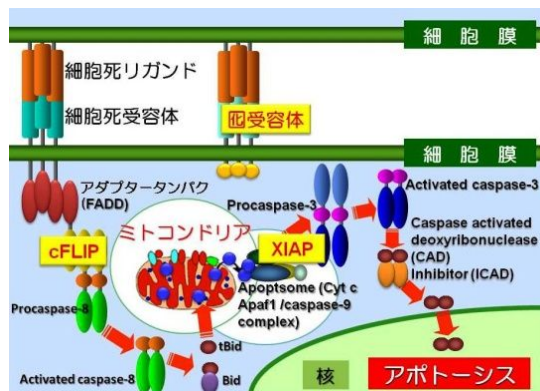
B 1 . アポトーシス・シグナル阻害因子の発現調節因子の探索：c F L I P について研究を進めた。すなわち、健全に発育している卵胞の顆粒層細胞に高発現している c F L I P が急速に消滅して卵胞閉鎖が誘導されることを明らかとした。これを調節している機構は未解明であるので、up-regulate あるいは down-regulate する因子の探索を行った。サスカチュワン大学のロドリゲス教授が確立した J C 4 1 0 細胞（ブタ顆粒層細胞が不死化した細胞であるが、形質転換はしておらず、様々な生理学的特性を保持している）を用いた。成長因子・生存因子としてはたらくサイトカイン（T N F、I L 1、I L 6 など）、性腺刺激ホルモン、ステロイドホルモンおよびアクチビン、インヒピン、フォリスタチン、増殖因子（上皮細胞増殖因子、インスリン様増殖因子、血小板由来増殖因子、線維芽細胞増殖因子、トランスフォーミング増殖因子型など）、プロスタグランジン類、血管新生因子類、一酸化窒素などを添加して細胞を培養し、アポトーシス阻害因子の m R N A の増減を指標として候補物質の絞込を進めた。ブタやヤギのような完全性周期家畜の卵胞顆粒層細胞では T N F が増殖・生存因子として働いていることが分かった。齧歯類と異なり、ブタやヤギではアポトーシス・シグナルを伝達することができずに細胞増殖のシグナルを伝達する T N F 受容体 2 のみが発現していた。培養細胞を用いた実験では T N F は、c F L I P の発現を up-regulate し、T N F の発現は I L 6 によって up-regulate されていることが分かった。アポトーシス・シグナル阻害因子の発現を支配的に制御しているマスター因子の同定を目指して研究を継続している。

B 2 . アポトーシス・シグナル阻害因子の発現調節機構：c F L I P などのアポトーシス・シグナル阻害因子遺伝子の 5' 側の転写開始コドンから上流にむかって順次核酸配列を読み進め、転写制御ドメインの解析を進

めたところ、いくつかの因子についてはFOXO3aなどの転写因子によって転写制御されていることが分かってきた。IL6・TNF軸がアポトーシス・シグナル阻害因子の転写をup-あるいはdown-regulateする場合に、どのような転写制御因子およびその複合体が働いているのか解明を進め、アポトーシス・シグナル阻害因子の発現を直接的に制御している分子機構を明らかにしたい。

さらにこの探索研究の過程で growth hormone secretagogue 受容体の内因性リガンドとして我が国で1999年に発見されたグレリンとその受容体が顆粒層細胞で発現して、アポトーシス・シグナル阻害因子の発現調節を担っていることが見いだされた。これについては論文として取り纏められるだけの知見を得るための実験を重ねている。

4) 他の阻害因子の探索とその卵子の品質評価のための有用性：細胞死リガンド・受容体系を介するアポトーシス・シグナルの伝達システムを解明しようとするこれまでの研究の過程でXIAP、Ⅱ受容体3、可溶性受容体などのいくつかの卵子品質の評価に役立つ可能性のある分子が見出されてきている。卵胞顆粒層細胞には細胞死リガンドと結合する細胞外ドメインが共通であるが、細胞内にシグナルを伝達する細胞内ドメインが欠落しているⅡ受容体3が発現していることを見出して報告した。このⅡ受容体3は、健常卵胞の顆粒層細胞には豊富に発現しているが、閉鎖過程の卵胞では発現しておらず、その発現パターンはcFLIPの場合と類似していた。顆粒層細胞においては細胞死受容体を介したアポトーシス・シグナルはcaspase-8とBidを介して一度ミトコンドリアに伝えられてから下流へと伝達されるという手間暇のかかる伝達経路が使われている(Ⅱ型アポトーシス伝達経路)。この伝達過程でゲートキーパー(p53)が伝達阻害因子として働いている可能性が高いことが分かった。これらを含む阻害因子とその調節因子を精査して、卵子品質を評価する最適マーカーの探索を鋭意遂行している。



4. 研究成果

家畜の卵巣では、胎児期に第一減数分裂前期ディプロテン期で停止した卵子が顆粒層細胞に包まれた原始卵胞の状態休眠している。性周期毎に一定数が発育する。卵胞内では顆粒層細胞が卵子を保育し、やがて排卵に至る。この過程で99%以上が閉鎖する。重要な家畜でありブタと反芻家畜のヤギは、齧歯類とは異なって完全性周期動物であるが、これら家畜を用いて卵胞閉鎖過程を形態学的に精査し、極初期に誘起される顆粒層細胞のアポトーシスが閉鎖の調節に支配的に係わっていることを示した。これを調節している分子制御機構の解明を進めた。二次卵胞以降の顆粒層細胞にはTNFファミリーに属するリガンド(TNF、TRAIL、FasL)とその受容体ファミリーに属する受容体[TNF受容体2、TRAIL受容体(DR4、DR5、Ⅱ受容体1)、FasL受容体(Fas、Ⅱ受容体3、可溶性受容体)、リガンド不明受容体(PFG-5)]などが発現していることを明らかにした。TNF受容体2は、細胞増殖亢進を担っている。これら細胞死リガンドと受容体は、閉鎖卵胞のみならず、発育している健常卵胞の増殖中の顆粒層細胞でも発現していた。よって、細胞死阻害因子がアポトーシス・シグナル伝達を阻害することで、細胞は死滅から逃れられていると考えられた。さらに、顆粒層細胞では、アポトーシス・シグナルがミトコンドリアを介して伝わる(Ⅱ型アポトーシス伝達経路)ことが判明した。リガンドと結合して活性化受容体とシグナル伝達介在タンパク(FADDやTRADD)が結合すると、シグナル伝達介在タンパクのdeath effector domainを介してカスパーゼ8前駆体が結合し、前駆体が分解されて活性化する。免疫系等の多くの細胞では活性化カスパーゼ8は、下流のカスパーゼ3前駆体を直接分解する。しかし、顆粒層細胞では、カスパーゼ8は一端ミトコンドリア外膜の透過性を調節するBidを分解することで活性化し、これによってミトコンドリアからチトクロームCを放出させる。このチトクロームCがApaf-1およびカスパーゼ9前駆体と結合してapoptosomeを形成し、ここでカスパーゼ9が活性化され、下流のカスパーゼ3前駆体を分解する。活性化カスパーゼ3がcaspase activated DNase(CAD)を活性化させる。この活性化CADは、核内に移行して遺伝子DNAを分断することでアポトーシスが実行されることを明らかにした。

健常卵胞の顆粒層細胞では、FADDと結合してカスパーゼ8前駆体との結合を阻害するcFLIPおよびカスパーゼ9とカスパーゼ3前駆体間のシグナル伝達を妨げるXIAPなどが発現しており、これらがアポトーシス

の進行を阻止していることが分かった。顆粒層細胞由来の培養細胞で阻害因子を過剰発現させた場合、受容体依存性アポトーシスが阻害された。逆にRNA silencing法で発現を停止させると、すみやかに細胞は死滅した。このような細胞内の阻害因子の発現は、TNF と IL6 によって亢進した。リガンド・受容体結合を阻害する阻害受容体や可用性受容体が発現して、細胞外でも細胞死を防いでいることも分かった。これら何重にも配置されて顆粒層細胞の死滅を防いでいる阻害因子は、卵子の品質を評価する指標として有用であることも分かってきた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 95 件)

Takahashi T (7 名 7 番目).

Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. 査読有 *Reprod. Fertil. Dev.*, 25: 589-599, 2013. DOI:org/10.1071/ RD11262

Linh N (10 名 10 番目).

Fertilization ability of porcine oocytes reconstructed from ooplasmic fragments produced and characterized after serial centrifugations. 査読有 *J. Reprod. Dev.*, 59: 549-556, 2013. DOI: 10.1262/jrd. 2013-042

Kawaguchi S (4 名 4 番目).

Luteoprotective roles of luteinizing hormone are mediated by not only progesterone production but also glucocorticoid conversion in bovine corpus luteum. 査読有 *Mol. Reprod. Dev.*, 80: 204-215, 2013. DOI: 10.1002/mrd. 22150

Kobayashi Y (5 名 5 番目). Summer heat stress affects prostaglandin synthesis in the bovine oviduct. 査読有 *Reproduction*, 146: 103-110, 2013. DOI: 10.1530/ REP-12-0479

Taketsuru H (5 名 5 番目). Effect of androstenedione on the growth and meiotic competence of bovine oocytes from early antral follicles, 査読有 *Zygote*, 20: 407-415, 2012. DOI: 10.1017/ S0967199411000268

Kominami K (15 名 15 番目). In vivo imaging of hierarchical spatiotemporal activation of caspase-8 during apoptosis. 査読有 *PLoS ONE* 7 (11): e50218, 2012. DOI:10.1371/journal.pone.0050218

Kominami K (11 名 11 番目). The molecular mechanism of apoptosis upon

caspase-8 activation: quantitative experimental validation of a mathematical model. 査読有 *Biochim. Biophys. Acta (Mol. Cell Res.)* 1823: 1825-1840, 2012. DOI.org/10.1016/j.bbamcr.2012.07.003

〔学会発表〕(計 46 件)

Manabe N. Cutting edge of bovine reproductive technology. 招聘講演 The 2nd Symposium of the Thai Society for Animal Reproduction, Bangkok, Thailand, 2014 年 3 月 20-21 日.

Manabe N. High expression of Bid in follicular granulosa cells is characteristics in Mangalica ovaries. 招聘講演 The 2nd International Conference of Fatty Pigs, Herceghalom, Hungary, 2013 年 11 月 22-24 日.

Manabe N. Production of prion gene homo-knockout cows to prevent spontaneous bovine spongiform encephalopathy and their characteristics. 招聘講演 The 46th Annual Meeting of Society of Physiology and Pathology of Reproduction, Gdańsk, Poland, 2013 年 2 月 27-3 月 1 日.

Manabe N. Roles of decoy receptor 3 in physiological programmed cell death in ovarian follicular granulosa cells. 招聘講演 The 15th Asian Animal Science Congress, Bangkok, Thailand, 2012 年 11 月 26-27 日.

Manabe N. Bcl-2 members, Bid and Bax, are involved in granulosa cell apoptosis in sows. The 17th International Congress on Animal Reproduction, Vancouver, Canada, 2012 年 7 月 29-8 月 2 日.

〔図書〕(計 14 件)

眞鍋昇. インターズー, 生殖細胞と生殖器, 「繁殖生物学」, 日本繁殖生物学会編, 2013, 18-39/313 頁.

Manabe N. Elsevier Science Publishers, Abnormalities of ovarian and testicular function in senescence accelerated mice, 「The Senescence-Accelerated Mouse」, Takeda T eds., 2013, 273-286/580 頁
眞鍋昇. 京都大学出版会, 顆粒層細胞アポトーシスの分子機構, 「卵子学」, 森崇英編, 2011, 424-432/1,195 頁.

宮野隆. 朝倉書店, 卵子(卵胞)形成と雌の性周期, 「新動物生殖学」, 佐藤英

明編, 2011, 84-94/203 頁

[その他]

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/bokujo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞鍋 昇 (MANABE Noboru)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：8 0 2 4 3 0 7 0

(2) 研究分担者

宮野 隆 (MIYANO Takashi)

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：8 0 2 0 0 1 9 5

奥田 潔 (OKUDA Kiyoshi)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：4 0 1 7 7 1 6 8