

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月10日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580324

研究課題名（和文）完全合成培地を用いたブタ体外成熟卵子の成熟機構の解明と胚の体外生産技術の向上

研究課題名（英文）Improvement of in vitro production system for porcine embryos by elucidation of mechanism for oocyte maturation in a chemically defined medium

研究代表者

吉岡 耕治 (YOSHIOKA KOJI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・病態研究領域・上席研究員

研究者番号：20355192

研究成果の概要（和文）：ブタ体外成熟培地への卵胞刺激ホルモン（FSH）あるいはトランスフォーミング増殖因子（TGF）- α 添加は、卵子の成熟および卵丘細胞の膨化を促進し、体外受精後の発生能を向上させることが明らかとなった。FSH と TGF- α は、卵丘細胞を介してブタ卵子の成熟を促進するが、一部は異なる経路により相乗的に作用していると考えられた。成熟培地への卵丘細胞膨化関連因子の添加は、体外成熟における卵丘細胞の膨化を促進した。

研究成果の概要（英文）：The addition of follicle-stimulating hormone (FSH) and transforming growth factor (TGF)- α to the defined IVM medium synergistically enhanced nuclear maturation, cumulus expansion and the developmental ability of porcine embryos. FSH and TGF- α appear to enhance porcine oocyte maturation through cumulus cells by partly different modes of action. Exogenous hyaluronan and proteoglycan binding link protein 1 and versican also stimulated cumulus expansion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用動物科学

キーワード：発生・分化、卵子成熟

1. 研究開始当初の背景

ブタ卵巢から未成熟卵を取り出し、体外で成熟、受精、培養して胚を作出する胚の体外生産は、卵子や胚発生の生理機構の解明に有用である。また、ブタ胚の体外生産は屠場由来の卵巢を利用できることから胚を低コストで作出できる大きなメリットがあり、ブタ体外生産胚由来産子の作出が可能になっている。しかし、体外生産胚の胚盤胞への発生率は体内で発育した胚に比べ低く、移植後に得られる産子の生産効率も低い。

研究代表者らは、これまでに成分既知の完全合成体外成熟培地を開発し、ブタ体外生産胚からの産子作出に成功している。しかし、卵胞液や血清など未知因子を含む動物由来成分を添加しない成分既知培地を用いた体外成熟培養では、卵丘卵子複合体（COCs）における卵丘細胞の膨化は、体内成熟卵子や卵胞液を添加した培地で体外成熟培養した場合に比べ、貧弱であった。

卵丘細胞の膨化は、卵子の減数分裂の再開に伴う卵子成熟過程に認められ、卵子の成熟

や受精後の胚の発生成能に関与していると考えられる。卵丘細胞の膨化における細胞外マトリックスの主成分は、ヒアルロンタンであるが、それ自体ではマトリックスを組織化するのに十分ではない。マトリックスを組織化するためには、ヒアルロンタンが血清由来成分であるインター- α トリプシンインヒビター (ITI) や卵丘細胞で産生されるヒアルロンタンプロテオグリカン結合連結タンパク質 (HAPLN-1)、バーシカン (VCAN)、腫瘍壊死因子刺激遺伝子 6 タンパク質 (TSG-6) 等のヒアルロンタン結合タンパク質と結合する必要がある。そのため、卵丘細胞の膨化機構の解明と胚の体外生産効率の向上のためには、ヒアルロンタンおよびその結合タンパク質の発現や機能の解析が必要である。

2. 研究の目的

ブタにおける胚の体外生産技術の高度利用のため、成分既知体外成熟培地を用いて、卵子の細胞質成熟と卵丘細胞の膨化に関与する因子の同定と機能解析を行い、卵細胞質成熟の改善と多精子受精率の低減による高品質体外生産胚の作出技術を開発する。すなわち、性腺刺激ホルモン、ヒアルロンタン結合タンパク質等が卵子成熟や卵丘細胞の膨化機構に及ぼす影響やその作用機構などを解析し、体内成熟と遜色ない発生成能を持つ体外成熟卵子を作出することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 卵胞刺激ホルモン (FSH) およびトランスフォーミング増殖因子 (TGF) - α がブタ卵子の成熟に及ぼす影響を調べた。

①屠場由来ブタ卵巣から採取した COCs は、10 ng/ml TGF- α の添加あるいは無添加の体外成熟培地 (POM) に、0~0.1 IU/ml の FSH (前半 20 時間のみ) を添加した培地で合計 44 時間体外成熟培養を行い、卵子の核相を調べた。

②TGF- α を含む POM に種々の濃度の FSH を添加して COCs を成熟培養した後、体外受精・発生培養を行い、胚の発生成績を検討した。

③TGF- α と FSH の一方あるいは両方を含む POM で COCs あるいは裸化卵子の体外成熟培養を行い、卵子の核相を調べた。

④TGF- α と FSH の一方あるいは両方を含む POM で COCs を培養した場合の上皮成長因子レセプター阻害剤である AG1478 の影響を調べた。

⑤TGF- α と FSH の一方あるいは両方を含む POM で COCs を培養し、培養 0、20 および 44 時間目の COCs の面積を計測するとともに、COCs のヒアルロンタン合成酵素 2 (HAS-2)、HAPLN-1、VCAN および TSG-6 mRNA の発現量を定量 RT-PCR 法により解析した。

(2) TGF- α と FSH を含む POM に HAPLN-1、VCAN、TSG-6 あるいは ITI を種々の濃度で添加して COCs を培養し、培養 0、20 および 44 時間目の COCs の面積を計測して卵丘細胞の膨化に及ぼす影響を調べた。HAPLN-1 および VCAN については、成熟培養後に体外受精・発生培養を行い、体外受精および胚の発生成績を調べた。

(3) TGF- α と FSH を含む POM に HAPLN-1、VCAN および ITI を組み合わせて添加して COCs を培養した後、体外受精・発生培養を行い、体外受精および胚の発生成績を調べた。

4. 研究成果

(1) ブタ体外成熟培地への FSH あるいは TGF- α 添加は、卵子の成熟および卵丘細胞の膨化を促進し、体外受精後の発生成能を向上させることが明らかとなった。また、FSH と TGF- α は、卵丘細胞の膨化に関与するヒアルロンタン関連因子の遺伝子発現を変化させ、卵丘細胞を介してブタ卵子の成熟を促進するが、一部は異なる経路により相乗的に作用していると考えられた。すなわち、

①TGF- α 無添加の場合、第二減数分裂中期 (MII) に達した卵子の割合は、各濃度の FSH 添加 (50.4~62.5%) で FSH 無添加 (22.5%) に比べて有意に増加した。TGF- α を添加した場合、FSH 添加区の MII 卵子の割合 (84.5~89.9%) は、FSH 無添加 (43.7%) に比べて有意に高く、FSH 単独での添加と比べても有意に高かった。

②受精率および胚盤胞への発生率は、FSH を 0.05 IU/ml 以上添加すると FSH 無添加に比べて有意に増加した。

③TGF- α と FSH は、裸化卵子の核成熟を促進しなかった。

④AG1478 を添加して培養すると、TGF- α による核成熟促進作用は完全に阻害されたが、FSH による核成熟促進作用は完全には阻害されず、FSH+AG1478 添加区の MII 卵子の割合は TGF- α +AG1478 添加区に比べて有意に高かった (図 1)。

⑤FSH の添加は卵丘細胞の膨化を促進したが、TGF- α の効果は認められなかった。培養 20 または 44 時間目の COCs における HAS-2、HAPLN-1 および VCAN の mRNA 量は、FSH あるいは TGF- α 添加により無添加に比べ有意に増加した (図 2)。しかし TSG-6 の mRNA 量は、処置による差を認めなかった。

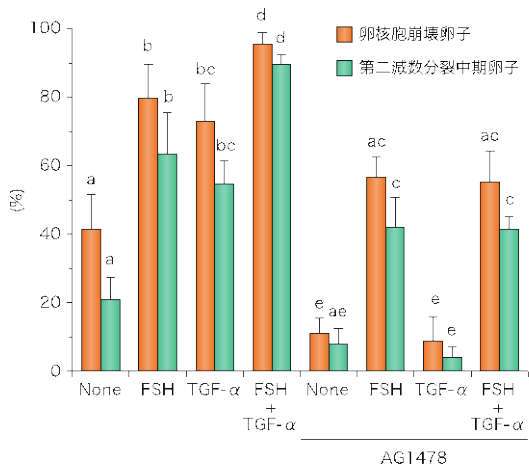


図1 rhFSH および TGF- α 添加体外成熟培地によるブタ卵子の体外成熟における EGR レセプター阻害剤 (AG1478) の核成熟への影響
a-e: 異なる文字間に有意差あり (P<0.05)

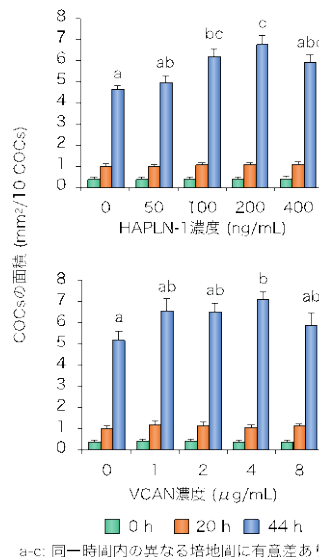


図3 ブタ卵子体外成熟培養における HAPLN-1 または VCAN 添加が卵丘卵子複合体の膨化に及ぼす影響
a-c: 同一時間内の異なる培地間に有意差あり (P<0.05)

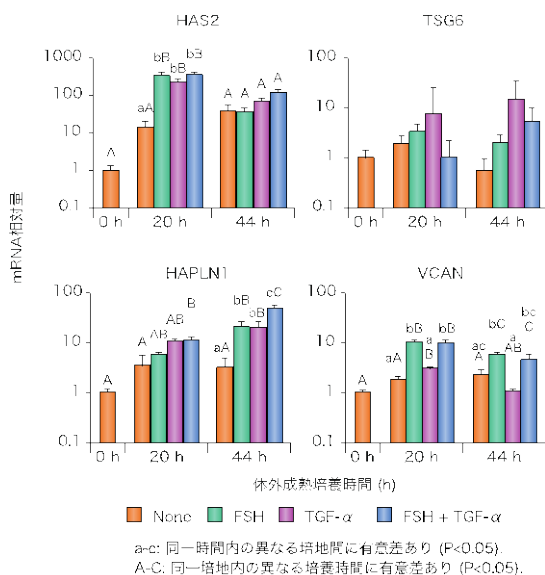


図2 ブタ卵子体外成熟培養における卵丘卵子複合体の膨化関連因子の mRNA 量の変化
a-c: 同一時間内の異なる培地間に有意差あり (P<0.05)
A-C: 同一培地内の異なる培養時間に有意差あり (P<0.05)

(2) TSG-6 あるいは ITI を POM に添加した場合、COCs の面積変化は無添加と比べ差を認めなかった。200 ng/ml HAPLN-1 を POM に添加した場合、COCs の面積変化は無添加および 25 ng/ml 添加に比べ有意に増加した(図3)。また、4 μ g/ml VCAN を POM に添加した場合、COCs の面積変化は無添加に比べ有意に増加し、HAPLN-1 や VCAN が卵丘細胞の膨化に関与していると考えられた。

一方、200 ng/ml HAPLN-1 あるいは 4 μ g/ml VCAN を POM に添加して体外成熟した卵子を体外受精・体外培養したところ、体外受精率 (73.7~77.3%)、胚盤胞への発生率 (41.6~44.0%) および胚盤胞の細胞数 (43.3~43.7 個) は、無添加と比べ差を認めなかった。

(3) HAPLN-1、VCAN および ITI を単独あるいは組み合わせて添加して成熟培養したところ、体外受精率、胚盤胞への発生率および胚盤胞の細胞数は、すべての組み合わせ間で差を認めなかった(図4)。しかし、VCAN を添加した場合は、添加しない場合に比べ、多精子受精率が有意に高く、胚盤胞の細胞数が少なかった。

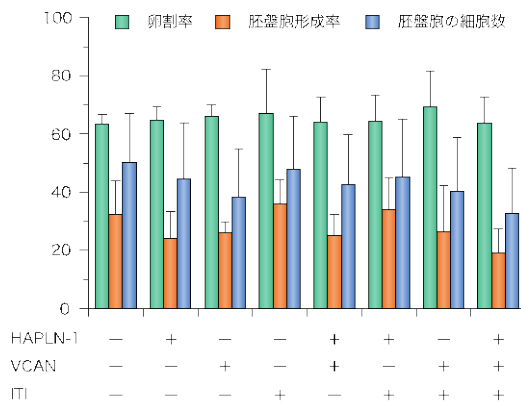
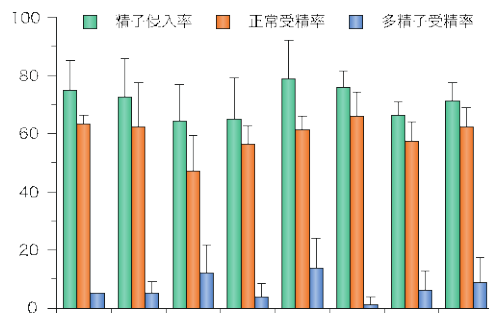


図4 体外成熟培地への卵丘細胞膨化関連因子の添加がブタ卵子の体外受精および体外発育に及ぼす影響

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2件)

- ① Mito T, Yoshioka K, Noguchi M, Yamashita S, Hoshi H. Recombinant human follicle-stimulating hormone and transforming growth factor- α enhance in vitro maturation of porcine oocytes. Mol. Reprod. Dev. May 31 (2013) 査読有 doi: 10.1002/mrd.22190
- ② Yoshioka K. Development and application of chemically defined media for in vitro production of porcine embryos. J. Reprod. Dev. 57, 9–16 (2011). 査読有 doi: 10.1262/jrd.10-196E

[学会発表] (計3件)

- ① Yoshioka K, Noguchi M, Mito T. Hyaluronan and proteoglycan binding link protein 1 and versican enhance cumulus expansion during in vitro maturation of porcine cumulus oocyte complexes. The 17th International Congress on Animal Reproduction, July 31, 2012, Vancouver, Canada
- ② 吉岡耕治. 化学組成の明らかな培地によるブタ胚の体外生産に関する研究. 第103回日本繁殖生物学会大会、十和田市、2010年9月3日
- ③ 水戸友美、吉岡耕治、鈴木千恵、山下祥子、星宏良. ブタ卵子の成熟におけるリコンビナントヒト卵胞刺激ホルモン(rhFSH)およびTGF- α の影響と作用機構の解明. 第103回日本繁殖生物学会大会、十和田市、2010年9月2日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 耕治 (YOSHIOKA KOJI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・病態研究領域。上席研究員

研究者番号：20355192

(2) 連携研究者

星 宏良 (HOSHI HIROYOSHI)

株式会社機能性ペプチド研究所・取締役所長

研究者番号：50500708

水戸 友美 (MITO TOMOMI)

株式会社機能性ペプチド研究所・研究員