

## 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24年 5月7日現在

機関番号：25406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22780251

研究課題名（和文）卵丘細胞を標的とした卵子成熟促進因子の探索とその卵子培養法への応用

研究課題名（英文）The study for development of *in vitro* culture system of mammalian oocyte by global analysis of cumulus cell-stimulating substrate during ovulating process

研究代表者

山下 泰尚 (YAMASHITA YASUHISA)

県立広島大学生命環境学部・准教授

研究者番号：50452545

研究成果の概要（和文）：

排卵期において、卵胞内の大部分を占める顆粒層細胞由来の分泌因子が卵丘細胞を刺激する結果、卵丘細胞における様々な遺伝子が発現し、卵子成熟が誘導される。現在の体外培養系は、卵丘細胞卵子複合体（COCs）のみを複数個培養することから、顆粒膜細胞由来の卵丘細胞を標的とする卵子成熟促進因子を考慮していないものであったが、プロテアーゼである TACE/ADAM17 の働きにより顆粒膜細胞と卵丘細胞から分泌される EGF-like factor が卵丘細胞の EGFR-ERK1/2 系を活性化すること、顆粒膜細胞および卵丘細胞から分泌される PGE2 系により TACE/ADAM17-EGF-like factor 系が維持され、その結果持続的に卵丘細胞の ERK1/2 系が活性化され、卵成熟が促進することを明らかにした。さらに、FSH-PKC により活性化される c-Src が TACE/ADAM17 と結合することにより EGF-like factor が効率的に顆粒膜細胞と卵丘細胞から分泌されることを明らかにした。さらに、EGF-like factor と TACE/ADAM17 発現、c-Src 活性を誘導する FSH を至適濃度添加する培養系により卵成熟率の向上に成功した。

研究成果の概要（英文）：

During ovulation phase, granulosa cells-derived secretion factors stimulate cumulus cells, which result in completion of oocyte maturation. Since current culture system of oocyte employs only cultivation of cumulus-oocyte complexes (COCs), rate of oocyte maturation is low compared with that of oocyte collected from *in vivo* due to lack or insufficient of granulosa cells-derived oocyte maturation factors. In this research, we showed that TACE/ADAM17 expressed in granulosa cells and cumulus cells cleaved EGF-like factors from granulosa cells and cumulus cells, which resulted in induction of oocyte maturation via EGFR-ERK1/2 pathway in cumulus cells during ovulation process. We also investigated that PGE2-PTGER2, 4 pathways enhanced expressions of TACE/ADAM17 and EGF-like factors, thereby sustained EGFR-ERK1/2 pathway in cumulus cells during oocyte maturation. Furthermore, c-Src phosphorylated by FSH-PKC stimuli induced association with TACE/ADAM17, which required for protease activity of TACE/ADAM17 in granulosa cells and cumulus cells. Finally, optimization of expression and activation pattern of TACE/ADAM17 in cumulus cells of COCs by PGE2 or FSH-c-Src improved maturation rate of oocyte during *in vitro* maturation of porcine COCs

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	870,000	3,900,000

研究分野：応用動物学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物学

キーワード：繁殖，卵子成熟，排卵

1. 研究開始当初の背景

食肉処理場由来のウシやブタ卵巣から卵子を回収し、体外で受精可能な状態へと成熟させることは、メスの優良形質の効率的利用に重要である。しかし、これらの動物種において、既存の体外成熟培養法により作出した卵子の胚盤胞期胚への発生能は低いことから、体外成熟培養法の改善が必須であった。

体内では、FSH 刺激およびサージ状の LH により、それぞれ卵胞発育と排卵が制御されている。FSH や LH に対する受容体は卵胞壁を構成する顆粒膜細胞に多数存在することから、顆粒膜細胞から卵丘細胞を刺激する二次因子の存在が示唆されている。本研究では、顆粒膜細胞から分泌され卵丘細胞を刺激する新規経路の同定を目的として、研究を行った。

2. 研究の目的

近年、米国あるいは申請者をはじめとするいくつかの日本のグループにより DNA マイクロアレイが導入され、多彩な因子が卵子成熟に関与することが次々と明らかとなってきている。その中でも、顆粒層細胞あるいは卵丘細胞において発現する EGF-like factor である Amphiregulin (AREG) や Epreparin (EREG) は、卵丘細胞の EGF 受容体に結合し、その結果卵子成熟を誘起することから、卵子成熟を誘起させる重要な因子である。しかし、一方で、EGF-like factor は、細胞膜貫通型のタンパク質であり、分泌型へ変化するためにはプロテアーゼによる切断・修飾が必須であることから、この修飾酵素の存在とその重要性が示唆されていた。申請者は、プロテアーゼである TACE/ADAM17 が、卵子成熟期の顆粒層細胞および卵丘細胞で LH の刺激により発現することを見出し、その機能解析を行った。その結果、TACE/ADAM17 阻害剤あるいは siRNA でノックダウンすると、EGF 受容体 (EGFR) の下流シグナル系と卵

子成熟が完全に抑制されることを世界で初めて明らかとし、EGF-like factor に加えて、その切断プロテアーゼも卵子成熟のキープクターであることを示した。この結果から、顆粒膜細胞由来因子が卵丘細胞を刺激し、卵成熟が誘導されることが明らかとなったことから、卵丘細胞を標的として分泌される因子による下流シグナル系の網羅的解析を行い、卵子の成熟率を誘導する経路の同定とそれによる卵子の体外成熟培養法の確立を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

本研究では、LH の刺激により卵丘細胞で活性化する新規経路を抗体アレイを用いて網羅的に解析した。本研究の開始前において、既に hCG 刺激後のマウスにおいて発現する遺伝子の DNA マイクロアレイ解析を実施済みであったことから、DNA マイクロアレイ解析結果と抗体アレイ解析結果から機能性を有する候補因子のスクリーニングを行った。

培養系として、卵成熟促進を誘導する因子の分泌を促進した分泌促進系 (LH 添加区) と分泌抑制区 (LH+Galardin 添加区) を設けて解析を行った。

4. 研究成果

本研究の結果、卵成熟を促進する因子として EGF-like factor 以外に PGE2 があることを明らかにした。さらに、FSH/LH 刺激により EGF-like factor が分泌されるが、PGE2 もその受容体である PTGER2,4 系を介して分泌されること、これらの両者はクロストークすることで卵成熟を誘起することを見出した。すなわち、FSH/LH 刺激により卵丘細胞のそれに対する受容体は、すぐに発現低下するが、EGF 受容体-ERK1/2 系による発現上昇する *Ptgs2* と *Ptger2,4* により、それぞれ PGE2 とその受容体が作られること、

PGE2-PTGER2,4 系により、卵丘細胞の cAMP 産生量が増大し、この結果さらに EGF-like factor と TACE/ADAM17 の発現が維持される結果、持続的に ERK1/2 が活性化され、卵成熟が誘導することを明らかにした。さらに、卵丘細胞で c-Src が特異的にリン酸化することを抗体アレイ解析結果から見出し、この c-Src の活性化は FSH-PKC 刺激により誘導されること、発現した TACE/ADAM17 が c-Src と結合することにより酵素活性が増加し、EGF-like factor が分泌されることを明らかにした。また、ブタ COC の体外培養系を用いて、FSH, EGF, PGE2 の分泌時期と c-Src の活性化時期を至適化した体外培養系を構築し、卵成熟率を向上させることに成功した。

#### 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 7 件)

① Yamashita Y, Kawashima I, Gunji Y, Nishimura R, Hishinuma M, Shimada M. Progesterone is essential for maintenance of *Tace/Adam17* mRNA expression, but not EGF-like factor in cumulus cells, which enhances the EGF receptor signaling pathway during in vitro maturation of porcine COCs. *Journal of Reproduction and Development*, 査読有, 56, 2010, 315-323, Outstanding Paper Award 受賞

② Shah S, Nagano M, Yamashita Y, Hishinuma M. Microencapsulation of canine sperm and its preservation at 4 degree C. *Theriogenology*, 査読有, 73, 2010, 560-567

③ Shimada M, Yamashita Y. The key signaling cascades in granulosa cells during follicular development and ovulation process. *Journal of Mammalian Ova Research*, 査読有, 28, 2011, 25-31

④ Sha S, Otsuki T, Fujiwara C, Yamamoto N, Yamashita Y, Higaki S, Hishinuma M. Cryopreservation of microencapsulated canine sperm. *Theriogenology*, 査読有, 75, 2011, 679-686

⑤ Sahashi Y, Otsuki T, Higaki S, Nagano M, Yamashita Y, Hishinuma M. Effect of butylated hydroxytoluene on dog sperm longevity in chilling storage and

cryopreservation. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 査読有, 73, 2011, 1355-1357

⑥ Yamashita Y, Okamoto M, Kawashima I, Nishimura R, Gunji Y, Hishinuma M, Shimada M. Positive feedback loop between prostaglandin E2 and EGF-like factors is essential of the sustainable activation of MAPK3/1 in cumulus cells during in vitro maturation of porcine cumulus-oocyte complexes. *Biology of Reproduction*, 査読有, 85, 2011, 1073-1082

⑦ Yamashita Y, Shimada M. The release of EGF domain from EGF-like factors by specific cleavage enzyme activates EGFR-MAPK3/1 pathway in both granulosa cells and cumulus cells during ovulation process, *Journal of Reproduction and Development*, 査読有, in press

[学会発表] (計 9 件)

① 山下 泰尚, 岡本 美奈子, 菱沼 貢, 島田 昌之 ブタ顆粒膜細胞において、PKC と c-Src 依存的な TACE./ADAM17 の活性化が、EGF-like factor の分泌を介して顆粒膜細胞の黄体化、卵丘膨化、および卵成熟を促進する 第 52 回日本哺乳動物卵子学会、2010 年 5 月 21 日、栃木県

② 伊従留南, 山下泰尚, 檜垣彰吾, 菱沼貢, 鳥取県内に生息する野生ヌートリアの繁殖生理, 第 44 回鳥取県獣医学会, 2010 年 7 月 17 日, 鳥取市

③ Shah S, 大月翼, 藤村千加, 山本直樹, 山下泰尚, 檜垣彰吾, 菱沼貢, Cryopreservation of microencapsulated canine sperm, 第 150 回日本獣医学会, 2010 年 9 月 16 日, 帯広市

④ 山下泰尚, 菱沼貢, 島田昌之, 哺乳動物卵子の成熟・排卵機構の基礎的解析とその応用, 第 151 回日本獣医学会, 2011 年 3 月 31 日, 東京都 (招請講演)

⑤ 藤村千加, 檜垣彰吾, 郡司庸介, 大月翼, 泉千尋, 岡崎哲司, 島田昌之, 山下泰尚, 菱沼貢, 犬精子の凍結保存における凍結保存液の浸透圧とグリセリン濃度の検討, 第 152 回日本獣医学会, 2011 年 9 月 20 日, 大阪府

⑥ 西村亮, 奥田潔, 郡司庸介, 光藤弘俊, 檜垣彰吾, 山下泰尚, 菱沼貢, 牛卵胞および黄体における BNIP3 の発現, 第 152 回日本獣医学会, 2011 年 9 月 20 日, 大阪府

⑦郡司庸介, 武井直樹, 渡邊貴之, 光藤弘俊, 西村亮, 山下泰尚, 檜垣彰吾, 鈴木稔, 菱沼貢, 卵胞液中ホルモン濃度の経時的变化を模倣した牛卵子体外培養法の開発, 第 152 回日本獣医学会, 2011 年 9 月 21 日, 大阪府

⑧光藤弘俊, 郡司庸介, 西村亮, 山下泰尚, 檜垣彰吾, 菱沼貢, 牛卵巢における黄体の有無が体外胚の生産に及ぼす影響, 第 152 回日本獣医学会, 2011 年 9 月 21 日, 大阪府

⑨山下泰尚, 菱沼貢, 島田昌之, EGF-like factor-ADAM17 network により誘導される哺乳動物卵の成熟機構の解析と応用, 第 153 回日本獣医学会, 2012 年 3 月 28 日, 埼玉県 (招請講演)

[図書] (計 1 件)

島田昌之, 山下泰尚, 京都大学出版会, 卵子学, 2011 年, 818-829

[その他]

ホームページ等

[http://www.pu-hiroshima.ac.jp/10\\_research/01\\_researcher/post\\_392/post\\_532/index.htm](http://www.pu-hiroshima.ac.jp/10_research/01_researcher/post_392/post_532/index.htm)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山下 泰尚 (YAMASHITA Yasuhisa)

県立広島大学・生命環境学部・准教授

研究者番号: 50452545