

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450441

研究課題名(和文)牛卵胞の発育培養による主席卵胞モデル作製と野生動物種卵子の体外生産への応用

研究課題名(英文) In vitro growth culture of bovine follicles for developing model of dominant follicle and for application to in vitro production of wildlife oocytes

研究代表者

永野 昌志 (Nagano, Masashi)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・准教授

研究者番号：70312402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：牛卵巣中に存在する初期胞状卵胞から採取した発育途上にある卵子を、卵子-卵丘細胞-顆粒層細胞複合体(OGC)として体外発育培養(IVG)法の改善に取り組んだ。その結果、世界で3例目の産子を作出し、本IVG系により発育した卵子の正常性が確認された。また、骨形成タンパク質4は、培養中の顆粒層細胞の直径を小さくし、プロゲステロン分泌を抑制することから、顆粒層細胞の黄体化を抑制することが明らかになった。さらに、卵巣内胞状卵胞数(AFC)由来OGCのIVGを行った場合、OGCの生存性に差は認められないものの、高AFC群の方が顆粒層細胞数は多く、卵子ミトコンドリア活性と核成熟率は高いことが分かった。

研究成果の概要(英文)：I tried to improve the culture system of oocyte-granulosa complexes (OGCs) derived from bovine early antral follicles. As the results, I produced offspring effectively by my developed system, and it was the third case in the world. The result indicates the embryos derived from the culture system have normality the same as in vivo derived embryos. When I added bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) to culture medium, the mean diameter of granulosa cells became smaller and progesterone secretion from granulosa cells was inhibited. These mean that BMP-4 inhibits the luteinization of granulosa cells. In addition, I compared the developmental competence of OGCs derived from ovaries having different antral follicle count (AFC). OGCs derived from high and low AFCs showed similar viability during growth culture; however, the mean number of granulosa cells was higher in high AFC group. Oocytes derived from high AFC have higher activity of mitochondria and showed higher nuclear maturation rate.

研究分野：繁殖学

キーワード：牛 卵 子 体 外 発 育 体 外 受 精 卵 胞

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は、牛卵子の成熟及び発生能の獲得について長年研究を行ってきた。その過程で、卵子の直径が排卵されるサイズと同等の 120  $\mu\text{m}$  程度まで発育してしまうと、既に発生能力が決定していることを見出した( )。そこで、卵子発生能が確定する前の卵子を体外で効率良く発育させ、高い発生能を持った卵子を数多く得ることができれば、体外受精由来産子の効率的生産が可能と考えた。しかし、牛における当時の卵子体外発育培養系では発生能が著しく低く( ) 改善が求められていた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、哺乳動物の卵巣内に存在する卵胞の発育および変性の制御機構を明らかにし、産業動物の効率的生産および野生動物の保護・増殖に寄与することを目的としている。卵胞は、卵子と顆粒層細胞、卵胞膜細胞および間質細胞が高度に統制された集合体である。その制御機構が明らかになれば過剰排卵処理による牛体内受精卵の効率的生産に役立つとともに、高泌乳牛の分娩後の卵胞発育異常に関係した低受胎などの問題解決に寄与できる。また、一般的な体外受精に用いることができる卵子は、ある程度発育した卵胞から採取される核成熟能を獲得したもののみであり、その数には限りがあるが、卵巣内に数多く存在する発育前期の小卵胞を効率的に体外発育させる方法が開発されれば体外受精卵の効率的生産にも寄与できると考えられる。また、この技術は、発情周期の明らかでない絶滅に瀕した野生動物の卵子を体外で生産・保存する技術にも繋がる。

### 3. 研究の方法

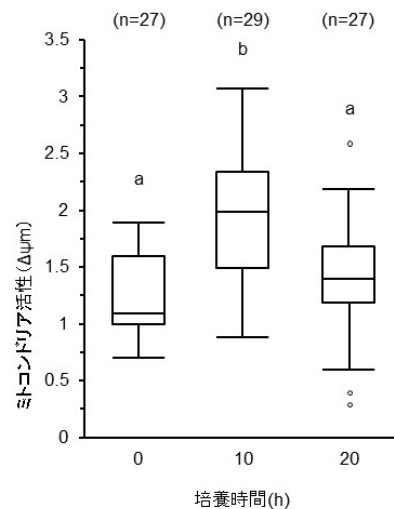
1) 食肉衛生検査所で採取した牛の卵巣から初期卵胞を採取し、初期卵胞由来の顆粒層細胞-卵子複合体(OGC)を回収して、OGCを体外発育培養した。エストロゲン(E2)添加培地を基礎培地として用い、体外発育した卵子の核成熟能および発生能を調べた。また、成熟培養前にイソブチルメチルキサンチン(IBMX)を添加した培地で様々な時間培養を行い、卵子内のミトコンドリア活性の変化を調べ、核成熟能および体外受精後の発生能との関係を精査した。得られた胚盤胞の一部を生体牛に移植し、体内での発生能を確認した。

2) 顆粒層細胞における性ステロイドホルモン産生能と卵子核成熟能に影響を与える因子を検討するため E2 の前駆物質であるアンドロステンジオン添加培地を用いて、卵胞刺激ホルモン(FSH)と骨形成タンパク質 4(BMP-4)の添加実験を行った。卵子の核成熟能を確認するとともに、発育培養中に顆粒層細胞が産生する E2 およびプロゲステロン(P4)量を測定した。

3) 生体牛を用いて、卵胞発育ウェーブの各ステージ(リクルート、セレクト、ドミナント期)から卵子を採取し、受精能への影響を調べた。牛卵巣には固有の発育卵胞数があることが知られている( )ことから、卵胞数(AFC)が卵子発生能に与える影響について、体外発育卵子を用いた検索も行った。

### 4. 研究成果

1) 体外で 12 日間発育させた卵子のミトコンドリア活性を体外成熟培養前(pre-IVM)に IBMX 添加培地で 10 および 20 時間培養し検査したところ、pre-IVM 前に低かったミト

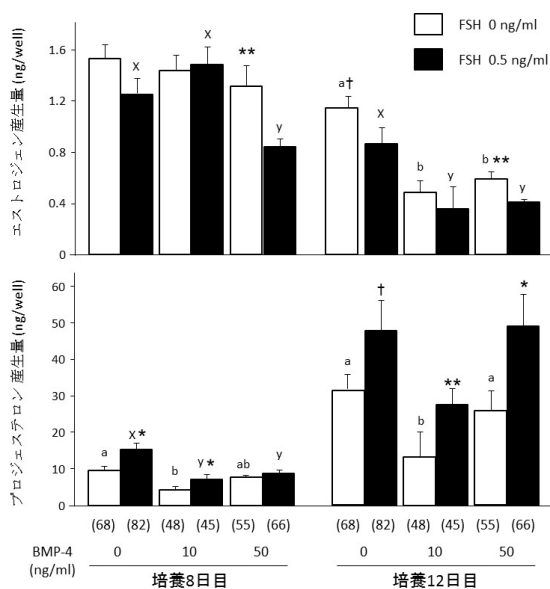


コンドリア活性は 10 時間後に最も高くなり、20 時間後には低下することが明らかになった。

次に、これら pre-IVM 時間の異なる IVG 卵子を体外成熟・受精に供した。その結果、10 時間 pre-IVM した IVG 卵子は核成熟率 (92%) および胚盤胞への発生率 (39%) が体内成熟卵子と同等まで向上した。12 日間の IVG の後、10 時間の pre-IVM を実施した卵子から作出した胚盤胞をレシピエント牛に移植し、発情周期 16 日目 (移植後 9 日目) に胚回収を行って胚の発育を確認したところ、移植胚の半数以上 (6/11) が体内受精正常胚と同程度まで発育していることが分かった。また、別のレシピエント牛 (1/2) は正常な子牛を分娩した。体外発育卵子由来の産子は世界 3 例目である。

2) OGC を 4 日間発育培養し、形態が正常な OGC (生存群) と顆粒層細胞が卵子から遊走あるいは卵細胞質が変性している OGC (死滅群) の E2 および P4 産生を比較したところ、形態的に正常と判定された OGC では死滅群に比べて E2 産生が高く、P4 産生は低かった。次に、生存群の培地に 0 あるいは 0.5 ng/ml FSH および 0、10 あるいは 50 ng/ml BMP-4 を添加して 6 実験群を作製し、さらに 8 日間培養して E2 および P4 産生および発育培養後の OGC 生存率、卵子直径および核成熟能について検討した。生存 OGC の E2 産生量は、全実

験群において発育培養 8 日目まで増加し、12 日目には低下した。しかし、P4 産生は培養期間を通して増加した。

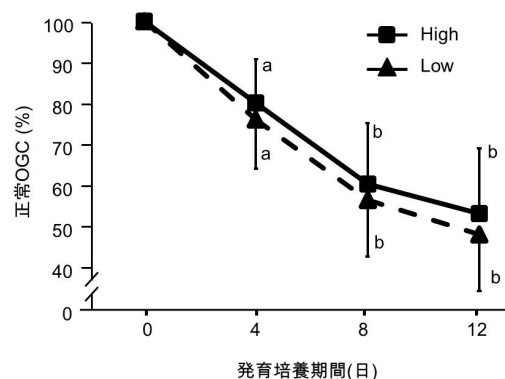


BMP 添加に拘らず、FSH 添加は E 産生を低下させ、P4 産生を増加させた。50 ng BMP-4 添加により E2・P4 産生は共に低下したが、10 ng BMP-4 添加では E2 産生は低下せず、P4 産生のみ低下させた。体外培養 12 日後の OGC 生存率は FSH 添加によって高くなり、FSH 無添加+50 ng BMP-4 添加で低くなった。

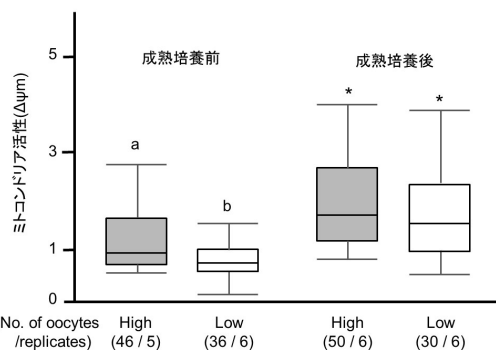
3) 発情周期中に超音波画像で確認可能な胞状卵胞数 (AFC) が少なくとも 1 回は 30 個以上となった雌牛を High 群とし、その他の牛を Low 群として実験を行った。これら 2 群を 3~4 日あるいは 7 日間隔で経膈採卵法により卵子を反復採取し、卵子品質に対する卵胞数および採卵間隔の影響を検討した。採取した卵丘卵子複合体 (CO) は卵丘細胞の付着程度により形態学的に分類するとともに、全てを成熟培養後に体外受精に供した。その結果、3~4 日間隔で採卵した場合、COC 形態および体外受精後の精子侵入率には 2 群間で差異は認められなかったが、正常受精率は High 群が高くなった。7 日間隔で採卵した場合、High 群では卵丘細胞を欠く低品質 COC の割合が Low 群および 3~4 日間隔で採卵した場合に比べて高くなり、正常受精率および精子侵入率は低くなった。しかし、Low 群では採卵間隔は、COC 形態および体外受精成績に影響を与えなかった。両群の卵胞発育について超音波画像による解析を行ったところ、High 群では採卵後 7 日目までに卵胞発育は停止するが、Low 群においては卵胞が発育を継続することが明らかになった。これら結果は、両群の卵胞発育動態が異なり、採卵間隔を 7 日間に延長すると High 群では卵胞退行が始まり、卵子品質が低下することを示唆している。

そこで、卵胞発育動態に差異の生じた原因を明らかにするため、牛卵巣を用い、卵胞ウ

ェーブに動員される前の初期胞状卵胞から OGC を採取して 12 日間の体外発育培養に供した。本実験では、卵巣 1 個中に 25 個以上の胞状卵胞を目視できる卵巣を High 群、それ以外の卵巣を Low 群とした。体外発育培養中に正常な形態を示す OGC の割合および顆粒層細胞の増殖能を調べたところ、OGC 形態の正常性には両群間に差異は認められなかった。



しかし、培養 8 日目の顆粒層細胞の生存率は High 群の方が高く、培養 12 日目の総顆粒層細胞数も High 群の方が多くなった。これらのことから、High 群の顆粒層細胞の増殖能の高いことが示唆された。次に、体外発育培養後の卵子について、卵細胞質内のミトコンドリア活性と活性酸素種含量を検査するとともに、成熟培養に供して卵子核成熟能を検査した。その結果、体外成熟培養前の卵子核相および卵細胞質内活性酸素種含量には両群間に差異は認められないものの、ミトコンドリア活性は High 群の方が高く、体外成熟培養後の核成熟率も High 群の方が高くなった。



さらに、一部の卵子を体外受精に供し、卵割および胚盤胞への発生能を調べたところ、胚盤胞発生能には明らかな差異は認められなかったが、卵割率は High 群の方が高い傾向を示した。以上の結果から、High 群では、顆粒層細胞の高い増殖能によって、卵子のミトコンドリア活性が向上し、卵子の核成熟能と受精能が高くなったと推察された。

以上の結果から、12 日間体外で発育培養した牛卵子を 10 時間 IBMX を添加した培地で培養してミトコンドリア活性を高めたのちに成熟培養・体外受精を行うことで効率的な産子生産が行える可能性が示された。しかし、体外発育培養中に顆粒層細胞が P4 産生を始

めることは、顆粒層細胞としての機能が失われ黄体細胞への分化が始まっていることを示唆している。BMP-4 の添加は黄体細胞への分化をある程度抑制するが、培養 8 日目以降にはその効果はほとんど見られなくなった。より効率的な牛卵子の発育培養を行うには、顆粒層細胞の黄体化を阻止する培養系の開発が必要となる。また、牛卵子にもともと発育する胞状卵胞の数が卵子および顆粒層細胞の機能に影響を与えることもわかった。卵巣内胞状卵胞数はヒトの不妊症との関連も示されており、今後、Low AFC 群の卵子の発生能を改善する方法が見つかれば、体外受精をはじめとする人工繁殖技術のさらなる発展につながると考えられる。

#### <引用文献>

Nagano, M., Katagiri, S. and Takahashi, Y.: Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential. *Zygote*, 14: 53-61, 2006.

Hirao, Y., Itoh, T., Shimizu, M., Iga, K., Aoyagi, K., Kobayashi, M., et al. In vitro growth and development of bovine oocyte-granulosa cell complexes on the flat substratum: effects of high polyvinylpyrrolidone concentration in culture medium. *Biology of Reproduction*, 70: 83-91, 2004.

Ireland, J.J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Lonergan, P. and Evans, A.C.O. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Human Reproduction*, 22: 1687-95, 2007.

#### 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)

Yang Y, Kanno C, Huang W, Kang SS, Yanagawa Y, Nagano M.: Effect of bone morphogenetic protein-4 on in vitro growth, steroidogenesis and subsequent developmental competence of the oocyte-granulosa cell complex derived from bovine early antral follicles, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14: 3, 2016. 査読有り

Nagai, K., Yanagawa, Y., Katagiri, S. and Nagano, M.: The relationship between antral follicle count in a bovine ovary and developmental competence of in vitro-grown oocytes derived from early antral follicles, *Biomedical Research*, 37: 63-71, 2016. 査読有り

Huang, W., Kang, S.S., Nagai, K., Yanagawa, Y., Takahashi, Y. and Nagano, M.: Mitochondrial activity during pre-maturational culture in in vitro-grown bovine oocytes related to maturational and developmental competences. *Reproduction, Fertility and Development*, 28: 349-356, 2016. 査読有り

Nagai, K., Yanagawa, Y., Katagiri, S. and Nagano, M.: Fertilizability of oocytes derived from Holstein cows having different antral follicle counts in ovaries, *Animal Reproduction Science*, 163: 172-178, 2015. 査読有り

Huang, W., Kang, S.S., Yanagawa, Y., Yang, Y., Takahashi, Y. and Nagano, M.: Effects of in vitro-growth culture duration on fertilizability of bovine growing oocytes and proliferation of cells surrounding oocytes, *Japanese Journal of Veterinary Research*, 62: 135-141, 2014. 査読有り

Koyama, K., Kang, S.S., Huang, W., Yanagawa, Y., Takahashi, Y. and Nagano, M.: Aging-related changes in in vitro-matured bovine oocytes: Oxidative stress, mitochondrial activity and ATP content after nuclear maturation. *The Journal of Reproduction and Development*, 60: 136-142, 2014. 査読有り

Huang, W., Nagano, M., Kang, S.S., Yanagawa, Y. and Takahashi, Y.: Prematurational culture with 3-isobutyl-1-methylxanthine synchronizes meiotic progression of the germinal vesicle stage and improves nuclear maturation and embryonic development in in vitro-grown bovine oocytes. *The Journal of Reproduction and Development*, 60: 9-13, 2014. 査読有り

##### [学会発表](計5件)

永井克尚、杉山ちさと、楊応華、柳川洋二郎、片桐成二、永野昌志：牛の卵子品質と卵巣内卵胞数の関係：体内および体外発育卵子を用いた予備的検討，第108回日本繁殖生物学会大会、2015年9月19日、宮崎大学(宮崎県宮崎市)。

Yinghua Yang, Sung-Sik Kang, Yojiro Yanagawa, Masashi Nagano: Effects of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) on the acquisition of developmental competence of oocytes derived from bovine early antral follicles, The fifth meeting of the Ovarian Club, 2015年2月1日, Hong Kong Convention and Exhibition Centre(香港, 中国)。

Weiping HUANG, Masashi NAGANO, Sung-Sik KANG, Yojiro YANAGAWA, Yoshiyuki TAKAHASHI : Effects of in-vitro growth

(IVG) duration and pre-maturational culture on maturational and developmental competences of oocytes derived from early antral follicles, 第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 22 日、岐阜大学 (岐阜県岐阜市)。

坂口謙一郎、柳川洋二郎、姜成植、黄偉平、高橋芳幸、永野昌志：牛初期胞状卵胞由来卵子の体外発育に及ぼす FSH と骨形成タンパク質 4 の影響, 第 106 回日本繁殖生物学会大会、2013 年 9 月 13 日、東京農工大学 (東京都府中市)。

Weiping HUANG, Masashi NAGANO, Sung-Sik KANG, Yojiro YANAGAWA, Yoshiyuki TAKAHASHI : Pre-IVM culture with IBMX improves maturational and developmental competences of bovine oocytes derived from in-vitro growth culture, 第 106 回日本繁殖生物学会大会、2013 年 9 月 12 日、東京農工大学 (東京都府中市)。

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

永野 昌志 (NAGANO, Masashi)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授  
研究者番号：7 0 3 1 2 4 0 2

### (2)研究協力者

黄 偉平 (HUANG, Weiping)

姜 成植 (KANG, Sung-Sik)

古山 敬祐 (KOYAMA, Keisuke)

永井 克尚 (NAGAI, Katsuhisa)

坂口 謙一郎 (SAKAGUCHI, Kenichiro)

楊 応華 (YANG, Yinghua)