

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：34429

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292136

研究課題名(和文) 家畜卵子の品質評価法の創出：卵胞選抜の分子機構に基づいて

研究課題名(英文) Evaluation method for quality the farm animal egg: Based on the molecular mechanism of follicle selection

研究代表者

眞鍋 昇 (MANABE, Noboru)

大阪国際大学・その他部局等・教授

研究者番号：80243070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の卵巣では原始卵胞の卵母細胞(卵子)が胎児期に減数分裂が停止して休眠している。性成熟後、一定数が発育・成熟を開始し、1%以下だけが排卵に至るが残りは選択的に死滅する。これまで内分泌学的にこの選択機構を解明しようとする研究が行われてきたが、未解明である。本研究は、卵胞顆粒層細胞死(アポトーシス)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、特にシグナル阻害因子がこの選択に支配的に関わること、および卵母細胞の品質判定の指標としてシグナル阻害因子の発現が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, which include primary oocytes, in livestock ovary leads to ovulation, and the rest to selectively disappear by atresia. Many endocrinologic studies have been performed to reveal the follicular selection, but the follicle selection mechanism has been 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, especially cell death signaling inhibitors, 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 estimation.

研究分野：農学

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

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

20世紀の末から体細胞や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(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、実用化研究の成果が蓄積されてきた。これら新技術が普及してきているが、成功率は未だに低く、その理由のひとつとして供される卵母細胞の品質が低いことが考えられる。しかしこれまで卵母細胞の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。

ヒトではダウン症の発症頻度が母親の加齢にともなって等比級数的に高まることが知られている。このように、様々な要因で卵母細胞の品質が損なわれるが、生体にはこれを監視する機構が備わっている。しかし母体の加齢などの要因によってこの監視機構が甘くなると考えられる。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えば長い休眠期にはいってしまう哺乳類の卵母細胞にとっては加齢にともなう品質の低下は避けて通れない宿命である。生殖工学領域で卵母細胞が使われるようになってきているのでその品質を科学的に評価できるシステムを開発することが急務である。20年以上にわたって、長い休眠後減数分裂を再開して発育・成熟する過程で99%以上の卵母細胞が選択的に死滅することで低品質のものを取り除く機構を解明する研究を進め、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ができるようになってきた。このような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母細胞(低品質卵母細胞)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母細胞(高品質卵母細胞)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

家畜の卵巣における卵胞とそれに内包される卵母細胞の選抜機構に焦点を絞って1992年から今日までは研究を継続してきた。その結果下記のようなことが分かってきている。

- 1) 卵胞の中で卵母細胞を適切に発育・成熟させる役割を担っている顆粒層細胞がアポトーシスによって死滅する結果、卵胞が閉鎖して消滅してしまい、卵母細胞も死滅する。
- 2) 卵胞の顆粒層細胞には複数の細胞死リガンドと細胞死受容体が発現している。それらのうちのFas ligand (FasL)・Fas系によってアポトーシスが支配的に制御されている。
- 3) 顆粒層細胞内のアポトーシス・シグナル

の伝達経路において、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。これが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、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が高発現している。

4) 閉鎖する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・シグナルが下流に伝達されて、アポトーシスが実行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て「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母細胞の健全度を見極めることができる」という仮説をたてて研究を遂行した。主要家畜であるブタと反芻家畜の代表としてヤギを供し、これらの末梢血中の性腺刺激ホルモン(FSHとLH)と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)濃度および超音波画像診断によって卵胞発育ステージを把握し、各ステージの卵胞から外科的に卵母細胞を取り出して、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、仮説の適否を確認するとともに卵母細胞品質評価システムを構築した。

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は卵母細胞の健全性の指標となる」との仮説の確認: 卵母細胞の形態学的正常性、体外授精時の受精能、初期胚の発生能とその形態学的正常性、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調べた。

休眠後に減数分裂を再開して発育・成熟する過程で99%以上の卵母細胞を死滅させて、ごく一部の正常な卵母細胞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母細胞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が、卵母細胞を用いて品質を評価したのでは、評価後の卵母細胞を繁殖工学などに供することができなくなるので、外科的に単離した個々の卵胞毎に卵母細胞の健全性を顆粒層細胞の正常性を介して評価するシステムを創出した。す

なわち、体外授精させた初期胚発生の正常性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を比較検討した。併せて卵胞腔を満たす卵胞液の性状も調べ、アポトーシス・シグナル阻害因子の発現レベルが卵母細胞品質を見極める指標として適切であることを下記のように調べた。

A 1 . 卵胞の調製：E L I S A法で測定した末梢血中性腺刺激ホルモンと性ステロイドホルモン濃度と超音波画像診断とによって性周期と卵胞の発育ステージを把握し、卵胞期卵巣から外科的に卵胞を切り出し、卵胞液を吸引回収した後実体顕微鏡下に切開して卵母細胞、顆粒層細胞、卵丘細胞を単離して回収した。

A 2 . 卵母細胞と初期胚の形態学的正常性の評価：外科的に単離した卵胞毎に回収した卵母細胞の形態学的正常性を判定後、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。正常卵母細胞に体外受精して受精能を評価し、続いて初期胚を培養して発生の形態学的正常性（胚盤胞まで発生してハッチングするか否か）を判定した。正常にハッチングできた胚の一部では仮親の子宮に胚移植した場合に着床できるか否か検討した。

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：卵胞毎に回収した顆粒層細胞と卵丘細胞をホモジネート後アポトーシス・シグナル阻害因子（c F L I P、X I A P、図受容体3および可溶性受容体）のm R N Aの発現を定量的P C R法にて、タンパクの発現を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などの発現：卵胞の発育・成熟に深く関わる性腺刺激ホルモン受容体、アクチビン、インヒビン、フォリスタチンおよび血管新生因子とその受容体などのm R N Aとタンパクの発現をA 3と同様に定量的に調べた。

A 5 . 卵胞液中ホルモンなどの測定：卵胞発育ステージの確定診断のために、卵胞毎に卵胞液中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診断した。卵胞液中アクチビン、インヒビン、フォリスタチン、血管新生因子をイムノアッセイ法にて測定した。

2) 卵母細胞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母細胞の品質を評価できることが1)の成果からわかったので、実用できる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母細胞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高感度であが非現実的であるので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。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：下記のように研究を進めた。

B 1 . アポトーシス・シグナル阻害因子c F L I Pの発現調節因子の探索：健常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が、調節機構は未解明であるので、カナダ・サスカチュワン大学ロドリゲス教授らが確立したJ C 4 1 0細胞（ブタ顆粒層細胞が形質転換することなく不死化した細胞で、様々な生理学的特性を保持している）を用いてup-regulateあるいはdown-regulateする因子の探索を進めた。成長/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、インヒビン、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を探索した結果、ブタ、ヤギなどの完全性周期家畜ではT N Fが顆粒層細胞に対して増殖/生存因子として働いていることが分かった。不完全性周期である齧歯類と異なり、完全性周期家畜では細胞増殖シグナルを伝達するT N Fの受容体2のみが発現していることも分かった。培養細胞を用いた実験で、T N FはI L 6の発現をup-regulateし、その結果c F L I Pの発現がup-regulateされることが分かったので、T N Fの発現を制御している上流のマスター因子の同定を目指した探索を継続している。

B 2 . アポトーシス・シグナル阻害因子c F L I Pの発現調節機構：c F L I P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結果、F O X O 3 aなどの

転写因子によって転写が制御されていることが分かってきているので、TNF・IL6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ていくことが望まれる。

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る。

4) 他のアポトーシス阻害因子の探索とその卵母細胞の品質評価における有用性の評価：これまでの細胞死リガンド・受容体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研究の過程でcFLIP以外にもXIAP、兜受容体3、可溶性受容体などのいくつかの卵母細胞品質の評価に役立つ可能性のある因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兜受容体3が発現していることを見出した。この兜受容体3は、健常卵胞の顆粒層細胞には豊富に発現しているが、閉鎖する卵胞の顆粒層細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(Ⅱ型アポトーシス伝達経路)が、この過程でゲートキーパー(gp53)が伝達阻害因子として働いている可能性が高いことが推察された。これら阻害因子と各々の調節因子を精査して、卵母細胞品質を評価する最適マーカーを探索する。

4. 研究の成果

胎児期に増殖し、その後減数分裂を開始し、第一減数分裂前期ディプロテン期で分裂を停止した卵母細胞が、顆粒層細胞(卵胞上皮細胞)に包まれた原始卵胞の状態では休眠している。性成熟後、性周期毎に一定数が発育しはじめる。卵胞内では顆粒層細胞が卵母細胞を保育し、やがて排卵に至るが、この過程で99%以上が閉鎖する。重要な家畜の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。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におけるア

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見出し、これを調節している分子制御機構の解明を進めた。減数分裂を再開し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など)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、兜受容体1)、FasL受容体(Fas、兜受容体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、TNF受容体2は細胞増殖亢進を担っていることなどを明らかにした。細胞死リガンドと受容体は、閉鎖卵胞の顆粒層細胞のみならず、健常卵胞の増殖中の顆粒層細胞でも発現していたことから、アポトーシス・シグナル伝達を細胞死阻害因子が阻害することで顆粒層細胞は死滅から逃れられていると考えられた。さらに顆粒層細胞のアポトーシス・シグナルは、ミトコンドリアを介して伝わる(Ⅰ型アポトーシス伝達経路)ことが分かった。すなわち、リガンドと結合して活性化した受容体とシグナル伝達介在タンパク(FADDやTRADD)とが結合すると、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(Ⅲ型アポトーシス伝達経路)が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を分解して活性化し、これによってミトコンドリアからチトクロームCが放出させる。チトクロームCはApaf-1とカスパーゼ9前駆体と結合してapoptosomeを形成し、カスパーゼ9を活性化する。これがカスパーゼ3前駆体を分解して活性化し、これが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。ま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には受容体依存性アポトーシスが阻害されること、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することが確認できた。これら阻害因子の発現はTNFとIL6によって亢進することやリガンド・受容体結合を阻害する兜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。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、卵母細胞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。今後は阻害因子を指標として高品質と低品質の卵子の体外成熟・受精能、初期胚の体外培養・発生能および初期胚発生の正常性を調べて卵子の品質評価システムの有用性を確認するとともに阻害因子発現を調節している分子機構の解明を深めて、より高感度な判定システムの開発につなげる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計64件・英文・査読有)

Uchio-Yamada K (3名3番目) C1r/C1s deficiency is insufficient to induce murine systemic lupus erythematosus. *Genes Immunity* (査読有) 3: 1-10 (2018) doi:10.1038/s41435-018-0020-5

Kikuchi K (8名3番目) Evaluating the electrical impedance and mucus related gene expression of uterine endometrial tissues in mares. *Journal of Reproduction and Development* (査読有) 64(2): 193-197 (2018) Doi: 10.1262/jrd.2017-128

Nishie T (5名5番目) Acute stimulation of a smooth muscle constrictor by estradiol-17 via GPER1 in bovine oviducts. *Reproduction in Domestic Animals* (査読有) 53(2): 326-332 (2018) Doi: 10.1111/rda.13108

József Rátky (5名5番目) Reproductive physiology in commercial and premium pig breeds History of 30 year long cooperation. *Archives Animal Breeding* (査読有) 60: 253-257, (2017).

Yoshimoto Y (7名7番目) Adrenomedullin regulates the speed of oviductal fluid flow in cattle. *Molecular Reproduction and Development* (査読有) 84(8): 712-718 (2017). Doi: 10.1002/mrd.22852.

Nishimura R (10名10番目) Hypoxia increases glucose transporter 1 in bovine corpus luteum at the early luteal stage. *Journal of Veterinary Medical Science* (査読有) 79 (11): 1878-1883(2017)Doi:10.1292/jvms.17-0284.

〔学会発表〕(計46件・招聘講演9件)

Manabe N. Production of prion gene *Cow* to prevent spontaneous BSE and their characteristics. The 13th Asian Reproductive Biotechnology Congress, Taipei, Taiwan (2018年5月3-6日)

Miyano T. In vitro growth of oocytes:

from mice to domestic animals. The 4th World Congress of Reproductive Biology 2017, Okinawa, Japan (2017年9月26-29日)

Manabe N. Roles of DcR3, a decoy receptor, in granulosa cells during follicular atresia in mammalian ovaries. The 35th International Forum of European Society of Cellular and Molecular Physiopathologist, Paris, France (2017年3月11-16日)

Manabe N. Bcl-2 members are involved in granulosa cell apoptosis during follicular atresia in sows. The International Symposium on Recent Progress in Swine Breeding and Raising Technologies. Tainan, Taiwan (2014年6月10-14日)

〔図書〕(計8件)

眞鍋昇(分担執筆)生殖細胞と生殖器, 「繁殖生物学」第2版, 日本繁殖生物学会編, インターズー, 東京, 18-39/313頁(2017)

宮野隆(分担執筆)卵子の形成と成熟. 「生殖補助医療・胚培養の理論と実際」日本卵子学会編, 51-57/339頁, 近代出版, 東京(2017)

Manabe N(分担執筆)Adverse effect of radiocesium due to the Fukushima Daiichi nuclear power plant accident on the promotion of sustainable circular agriculture including livestock「Agricultural Implications of the Fukushima Nuclear Accident: The First Three Years」Nakanishi T eds, Springer, Heidelberg, Germany, 91-98/263頁(2016)

〔その他〕

ホームページ等: 該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

眞鍋昇(MANABE Noboru)

大阪国際大学・学長補佐・教授

研究者番号: 80243070

(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: 80200195

奥田潔(OKUDA Kiyoshi)

帯広畜産大学・学長・教授

研究者番号: 40177168