

令和元年6月23日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08059

研究課題名(和文) 臨床応用に向けたウシ卵子成熟培養法の開発

研究課題名(英文) Improvement of in vitro maturation of bovine oocytes for clinical application

研究代表者

玉田 尋通 (Tamada, Hiromichi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：10155252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、食肉処理場で得たウシ卵巣から採取した卵子-卵丘細胞複合体(COCs)を用いた成熟培養の最初の2時間にMAPKK阻害剤であるU0126(5  $\mu$ M)を添加することにより、卵子の発生能が著しく改善され、多くの移植可能胚が得られること、U0126処置により卵丘細胞-卵子間のGAP結合の崩壊が遅延し、抗酸化物質であるグルタチオンの卵丘細胞から卵子へのGAP結合を介した流入が増加すること、超音波ガイド経腔採卵法によりウシから採取したCOCsにおいても、U0126処置により移植可能胚の発生率が著しく増加し、それらの胚を受胎牛に移植することで正常な産子が得られることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウシ卵子を成熟培養して体外受精後に発生培養を実施する場合、胚盤胞の発生率が低いことが従来から問題となっていた。成熟培養法の改良により胚盤胞発生率が高くなることが示唆されてきたが、遺伝的に優良な雌ウシから卵子を採取して後継牛を得ることができる経腔採卵法を用いた臨床的に実用性のある方法は知られていない。本研究では、従来実施されている成熟培養の最初の2時間にU0126を培養液に添加することで、その後の胚盤胞発生率が著しく改善されることを明らかにし、得られた胚盤胞から正常な産子も得られることを示した。本法を臨床応用することにより、優良牛から得た卵子を用いて効率的に後継牛が得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study clarified that treatment with the MAPK kinase inhibitor U0126 (5  $\mu$ M) during the first two hours of in vitro maturation on the cumulus-oocyte complexes (COCs) collected from bovine ovaries obtained at a slaughterhouse improves oocyte developmental competence and increases production rates of transferable embryos after in vitro fertilization and in vitro culture, the treatment with U0126 delays breakdown of the GAP junctions between oocytes and cumulus cells and increases the influx of an anti-oxidant glutathione from cumulus cells to oocytes via GAP junctions, the treatment with U0126 on COCs derived from the ovum pick up method efficiently develop transferable embryos, and normal calves develop by transferring these embryos to recipient cows.

研究分野：獣医繁殖学

キーワード：卵子 成熟培養 ウシ 経腔採卵

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

酪農や肉用牛生産において、遺伝的に優良な後継牛の維持と増加が近々の課題となっている。この問題を解決する唯一の方法として、遺伝的に優れた雌ウシから超音波ガイド経膈採卵法 (OPU) で卵子を採取し、成熟培養、体外受精、発生培養、得られた胚の移植による産子の生産という一連の技術が開発された。しかし、OPU で採取した卵子の中で移植可能な胚 (胚盤胞) まで発育する確率は 20-30% 程度であり、十分に優良遺伝子を後代に展開できていない。

高い胚盤胞発生率を得るには、成熟培養時に卵子を十分に成熟させる必要がある。近年、成熟培養に際して卵子あるいは卵子の周辺に付着している卵丘細胞の cAMP レベルを調整することにより、胚盤胞発生率を高める方法が報告されたが、安定した効果が得られず、成熟培養時間が 30 時間のために卵子採取後の翌日深夜での処置が必要という欠点がある。一方、卵子と卵丘細胞間の GAP 結合の崩壊を遅延させることにより、卵子細胞質の成熟が改善され、胚盤胞発生率が高くなる可能性が示唆されている。

### 2. 研究の目的

優良雌ウシを用いた OPU により得られた卵子から多くの後継牛を生産することを目的として、移植可能胚の生産効率を安定的に高く維持できる新規成熟培養法を検討した。

卵子と卵丘細胞間の GAP 結合は成熟培養の過程で MAPKK を介して MAPK を活性化することにより崩壊することが知られている。そこで、成熟培養時に MAPKK 阻害剤である U0126 を添加することで GAP 結合の崩壊を遅延させ、GAP 結合を介した卵丘細胞から卵子への卵子成熟に必要な因子の流入を増加することで、その後の体外受精と発生培養による胚盤胞発育効率を増加させることができるか否かについて調べた。また、どのような因子が卵子成熟に影響しているのか、並びに得られた胚盤胞を受胎牛に移植して正常な産子が得られるか否かについても調べた。

### 3. 研究の方法

成熟培養初期における U0126 添加が胚発生能に及ぼす影響

食肉処理場で得られたウシ卵巣から卵子-卵丘細胞複合体 (COCs) を採取し、IVMD101 (機能性ペプチド研究所) を用いて 24 時間の成熟培養を実施した。実験群には成熟培養の最初の 2 時間に U0126 を 5 あるいは 10  $\mu$ M の濃度で添加し、対照群には U0126 の溶媒のみを添加した。各群、200 個の COCs を実験に供した。その後、体外受精と卵丘細胞を除去した卵子の発生培養をそれぞれ、IVF100 と IVD100 (機能性ペプチド研究所) を用いて実施し、発生培養開始 8 日後に胚盤胞発生率を調べた。また、成熟培養の最初の 2 時間に 5  $\mu$ M の U0126 を添加した群と対照群の COCs について、成熟培養開始時と開始後 4、18、24 時間後に GAP 結合の主な構成因子であるコネキシン 43 を免疫染色して、卵子と卵丘細胞間の GAP 結合崩壊率を調べた。

成熟培養初期における U0126 添加が卵子における抗酸化因子グルタチオン含量に及ぼす影響

成熟培養法を と同様に実施した。5  $\mu$ M の U0126 を添加した群と対照群について、成熟培養開始 4 および 24 時間後に卵子内のグルタチオンと活性酸素の含量を調べた。グルタチオンと活性酸素はそれぞれ、モノクロロピマンと DCHFDA で染色し、共焦点顕微鏡と蛍光顕微鏡で調べた。また、抗酸化因子である NRF2、Cat、Sod1、PRDX1 および卵子成熟関連因子の BMP15、MT-CO1 の卵子内遺伝子発現量を RT 後にリアルタイム PCR 法で測定した。

成熟培養初期に U0126 処置した OPU 卵子から得られた胚盤胞の受胎牛への移植

2 頭の黒毛和種に過排卵処置と OPU を計 8 回実施した。1 頭のウシは 5  $\mu$ M の U0126 を添加した卵子回収液で COCs を採取し、 と同様に 5  $\mu$ M の U0126 を添加した培養液で成熟培養を実施した。もう一方のウシについては U0126 を添加しない卵子回収液で COCs を回収し、U0126 の溶媒のみを添加した培養液で成熟培養を実施した。OPU 毎に 2 頭のウシを入れ替えて U0126 処置群と対照群に振り分けた。成熟培養終了後、体外受精と著者らが開発した発生培養法 (合成卵管液を基本とし、100 ng/mL EGF、50 ng/mL IGF1、5 ng/mL セレニウムおよび 5  $\mu$ g/mL トランスフェリンを添加した培養液を用いて発生培養 5 日目からグルコース 4 mM を添加) で卵丘細胞除去卵子の発生培養を行い、発生培養開始 8 日後に胚盤胞発生率を調べた。また、得られた胚盤胞の内、8 個を受胎牛に移植し、受胎率、妊娠期間、産子の性状を調べた。

### 4. 研究成果

成熟培養初期における U0126 添加が胚発生能に及ぼす影響

胚盤胞発生率は対照群 (15%) と比べて U0126 5  $\mu$ M 添加群 (28%) で有意に増加した ( $P < 0.05$ ) が、10  $\mu$ M 添加群 (18%) では差がなかった。GAP 結合の崩壊が推定された卵子の割合は成熟培養開始時では 0% であったが、4 時間後では添加群は 25% であり、対照群の 44% と比べて有意に低かった ( $P < 0.05$ )。18、24 時間後では両群の値は 75% 以上であり、群間に差はなかった。

成熟培養初期における U0126 添加が卵子における抗酸化因子グルタチオン含量に及ぼす影響

卵子内グルタチオン含量については、成熟培養開始 4 時間後における U0126 添加群の値は対照群と比べて有意に高かった ( $P<0.05$ ) が、24 時間後の値は群間で差はなかった。卵子内活性酸素含量については、4 時間後の値は群間で差はなかったが、24 時間後では U0126 添加群の値は対照群と比べて有意に低かった ( $P<0.05$ )。

卵子における各種遺伝子の発現量については、成熟培養開始 4 時間後と 24 時間のどちらでも U0126 添加群と対照群の間で有意差は認められなかった。

成熟培養初期に U0126 処置した OPU 卵子から得られた胚盤胞の受胎牛への移植

OPU で採取した卵子における U0126 処置群の胚盤胞発生率 (39.1%) は対照群の値 (22.1%) と比べて有意に高かった ( $P<0.05$ )。得られた胚盤胞 8 個を受胎牛 8 頭に移植したところ、5 頭のウシが受胎し、その内 4 頭は正常な妊娠期間を経て、正常な産子を産出した。

以上の結果から、ウシの COCs を用いた成熟培養の最初の 2 時間に U0126 を 5  $\mu$ M の濃度で添加することにより、卵子の発生能が著しく改善されることが明らかになった。その機序の一つとして、U0126 処置により卵子と卵丘細胞の間の GAP 結合の崩壊が遅延し、卵丘細胞から卵子への GAP 結合を介した抗酸化因子グルタチオンの流入が増加することで卵子内の活性酸素が低下することによる可能性が示唆された。さらに、U0126 処置を OPU で採取した COCs に実施した場合にも、胚盤胞発生率が増加し、これら胚盤胞を受胎牛に移植すれば正常な産子を得られることが明らかになった。

本研究により、実用可能で効率的に移植可能胚を作出できるウシ卵子の成熟培養法が明らかになったことから、この成果を応用することで酪農と肉牛生産で問題となっている遺伝的に優良な後継牛の生産に貢献することが期待される。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 2 件)

Sakagami N, Kondo K, Hashimura S, Kawate N, Inaba T, Tamada H/Production of Japanese Black calves by the transfer of embryos developed from in-vitro fertilized oocytes derived by ovum pick up and matured in culture with the mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor U0126/査読あり, Journal of Veterinary Medical Science 2019, 81 379-382/DOI: 10.1292/jvms.18-0460

Shinohara T, Ohta Y, Kawate N, Takahashi M, Sakagami N, Inaba T, Tamada H /Treatment with the MAPK kinase inhibitor U0126 during the first two hours of in vitro maturation improves bovine oocyte developmental competence/査読あり, Reproduction in Domestic Animals 2018, 53 270-273/DOI: 10.1111/rda.13096

### [学会発表](計 5 件)

青山桃子、坂上信忠、川手憲俊、玉田尋通/ウシ卵子成熟培養初期の MAPKK 阻害剤添加による卵子におけるグルタチオンの増加と活性酸素種の減少/平成 30 年度日本獣医師会獣医学術獣医学術学会年次大会 (招待講演)/2019 年 2 月 8 日、新横浜プリンスホテル

青山桃子、坂上信忠、川手憲俊、玉田尋通/ウシ卵子の体外成熟培養時における MAPKK 阻害剤 (U0126) 添加が卵子胚発生能関連因子の遺伝子発現に及ぼす影響/平成 30 年度獣医学術近畿地区学会/2018 年 10 月 14 日、大阪府立大学

坂上信忠、篠原健志、山本和明、橋村慎二、川手憲俊、稲葉俊夫、玉田尋通/ホルスタイン種経膈採卵卵子の成熟培養時における MAPKK 阻害剤 (U0126) 添加がその後の胚発生に及ぼす影響/日本受精卵移植関連共同研究会京都大会 (第 24 回日本胚移植研究会大会、第 33 回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会)/2017 年 9 月 19 日、京都大学

坂上信忠、山本和明、篠原健志、川手憲俊、稲葉俊夫、玉田尋通/ウシ卵子の体外成熟培養時における MAPKK 阻害剤 (U0126) 添加が胚発生と受胎に及ぼす影響/第 160 回日本獣医学学会学術集会/2017 年 9 月 13 日、鹿児島大学

篠原健志、太田祥弘、川手憲俊、高橋正弘、坂上信忠、稲葉俊夫、玉田尋通/ウシ卵子の体外成熟培養時における MAPKK 阻害剤 (U0126) 添加の胚発生に及ぼす影響/第 159 回日本獣医学学会学術集会/2016 年 9 月 6 日、日本大学

### [図書](計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：稲葉 俊夫  
ローマ字氏名：Inaba Toshio  
所属研究機関名：大阪府立大学  
部局名：生命環境科学研究科  
職名：名誉教授  
研究者番号（8桁）：00137241

研究分担者氏名：川手 憲俊  
ローマ字氏名：Kawate Noritoshi  
所属研究機関名：大阪府立大学  
部局名：生命環境科学研究科  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：80221901

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：坂上 信忠  
ローマ字氏名：Sakagami Nobutada

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。