

令和元年5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15023

研究課題名(和文) 排卵数を支配的に制御する新規な卵巣内因子の同定

研究課題名(英文) Search for novel ovarian factors that dominantly regulate ovulation number

研究代表者

松田 二子 (Matsuda, Fuko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：10608855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類が一度に排卵する卵子の数は種によって厳密なコントロールがなされているが、その制御機構は解明されていない。本研究では排卵数を支配的に制御する卵巣内因子を探索するため、ウシ卵巣の顆粒層細胞を用いたトランスクリプトーム解析(RNA-seq)を実施した。その結果、最も大きく排卵まで至る「主席卵胞」と、二番目に大きく排卵されない「次席卵胞」の顆粒層細胞で発現量に差がある500以上の遺伝子を得た。このうち3個を「排卵数決定候補因子」として詳細な組織学的解析を行い、RNA-seqと同様の結果となることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では排卵数の決定に関わる可能性がある複数の因子を同定することに成功した。これらの因子の機能を促進あるいは抑制することで、家畜やヒトの排卵数を任意に調節できるようになる可能性がある。それによって、双子の出産が問題となるウシでは双胎の回避、ブタでは産子数を増やすことによる生産効率向上、卵巣機能障害を持つ家畜やヒトにおいてはその治療などへの応用が可能となり、獣医畜産・医療分野へ大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The ovulation number is strictly controlled depending on species in mammals, but the mechanism is still unclear. In this study, I performed transcriptome analysis (RNA-seq) using bovine ovarian granulosa cells to search for the factors that dominantly regulate ovulation number. As a result, I identified more than 500 genes which expression levels are significantly different between granulosa cells of dominant follicles (the biggest follicle that will be ovulated) and subordinate follicles (the second biggest follicle that will not be ovulated). I choose 3 factors as candidate factors that regulate ovulation number and performed detailed morphological analysis confirming similar results with the RNA-seq analysis.

研究分野：獣医繁殖学

キーワード：獣医学 畜産学 応用動物 細胞・組織

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

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の成熟雌の卵巣では、性周期ごとに一定数の卵母細胞が発育を開始するが、最終的に排卵されるものは1~10個程度に限られ、その他は発育の過程で死滅(閉鎖)する。一度に排卵される卵母細胞の数は、ウシで1個、ヤギやヒツジで1~4個、ブタで10個前後、ヒトなどの霊長類で1個と種によって厳格にコントロールされており、決まった排卵数が変化することはほとんどない。排卵数は各動物種の胎子数にほぼそのまま反映され、その制御が効率的な子孫の生産と母体の安全を確保している。このように排卵数の決定機構は繁殖過程の中でも極めて重要であるが、その詳細は未だ解明されていない。卵母細胞選抜(卵母細胞発育および閉鎖)は、下垂体が分泌する性腺刺激ホルモン(FSH, LH)のみならず、卵巣局所における成長因子、細胞内シグナル伝達因子、アポトーシス関連因子等によって制御されていることが様々な動物種において示されており、排卵数を支配的に決定する未知の卵巣内因子が存在すると考えられる。

2. 研究の目的

哺乳類の雌が一度に排卵する卵母細胞の数は種によって決まっており、厳密なコントロールがなされているが、その制御機構は未だ解明されていない。本研究では、重要な家畜であり排卵数が通常1個に限られるウシの卵巣サンプルを用いて、排卵数を支配的に制御する卵巣内分子の探索を試みた。本研究成果を応用し排卵数を任意に調節できるようになれば、ウシの双胎回避、ブタの生産効率向上、家畜およびヒトの卵巣疾患治療などへの応用が可能となり、獣医畜産・医療分野へ大きく貢献する。

3. 研究の方法

(1)ウシ卵巣の顆粒層細胞を用いて排卵数を支配的に制御する卵巣内因子を探索した。成熟雌ウシ4頭にホルモン製剤を投与して性周期を同期化し、卵胞期および黄体期に卵巣をサンプリングした。直径の最も大きいものを主席卵胞、それに続く大きさのものを次席卵胞として、卵胞液と顆粒層細胞をそれぞれから採取した(図1)。顆粒層細胞からはtotal RNAを抽出し、次世代シーケンサーによる発現遺伝子のトランスクリプトーム解析(RNA-seq)に供した。また、RNA-seqに使用した残りのtotal RNAからはcDNAを合成した。

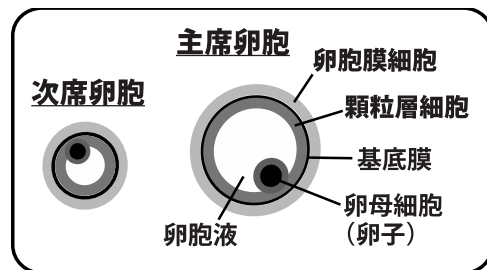


図1. ウシの卵胞構造

(2) 食肉処理場にて成熟雌ウシの卵巣を採取した。両側の卵巣を確認し、いずれにも黄体がないものを卵胞期の卵巣として採取した。卵胞期の卵巣から主席卵胞、次席卵胞、それらより小さい三次卵胞を切り出し、パラフィン切片作製用または凍結切片作製用に包埋した。また、卵胞期の卵巣の主席卵胞、次席卵胞、その他の直径5mm以上の三次卵胞から卵胞液および顆粒層細胞を採取した。

(3) 上記(1)あるいは(2)で採取したウシ卵巣サンプルを用いて、(1)のRNA-seqで同定した排卵数決定候補因子の発現量を確認する実験を行った。RNA-seqで得られたmRNAの発現量を確認するため、RT-PCRを行った。また、mRNAの局在を調べるため卵胞組織切片を用いてin situ hybridizationを行った。さらに、タンパク質レベルでの局在を調べるため卵胞組織切片を用いて免疫組織化学染色を行った。排卵数決定候補因子のうち分泌タンパク質については、卵胞液中における濃度を測定するためenzyme immunoassay (EIA)を行った。

4. 研究成果

(1) 2個の主席卵胞と4個の次席卵胞から顆粒層細胞における網羅的mRNA発現のデータを得られた。RNA-seqの結果、合計24,596遺伝子のmRNA発現が確認された。そのうち、主席卵胞の顆粒層細胞で次席卵胞より2倍以上発現量が多い遺伝子は1,404個、次席卵胞で主席卵胞より2倍以上発現量が多い遺伝子は5,734個であった。これまで顆粒層細胞で卵胞発育における機能が報告されているアロマターゼ遺伝子、インヒビンA遺伝子のmRNAが顆粒層細胞で多く発現しており、主席卵胞で次席卵胞より量が多いことが明らかとなった(表1)。また、ウシにおいて低酸素状態によって誘起されるHIF1-VEGF経路が顆粒層細胞の増殖を促進することが過去に報告されているが、本RNA-seqの結果から、HIF1-VEGF経路に関わる遺伝子群が次席卵胞より主席卵胞の顆粒層細胞で発現が高いことが示された。RNA-seqで得られたデータから、これまで卵胞発育への関与が明らかになっておらず、発現量が比較的高く、主席卵胞と次席卵胞での発現量の差が大きいもの10個程度を選び、排卵数決定候補遺伝子として以降の詳細な解析を進めた。

(2) RNA-seqにて主席卵胞と次席卵胞の顆粒層細胞で発現量に差があった遺伝子のうち、これまでに卵胞発育における機能が明らかになっている遺伝子と、排卵数決定候補遺伝子について、主席卵胞と次席卵胞から採取した顆粒層細胞のcDNAを用いてRT-PCRを行い、RNA-seqの結果が再現されるかを確認した。その結果、いずれの遺伝子においてもRNA-seqで得られた遺伝子発現量と同様の傾向がRT-PCRでも得られた。以上のことから、本研究で得られたRNA-seqでは主席卵

卵と次席卵胞の顆粒層細胞における遺伝子発現量を正確に解析できており、信頼性の高いデータであることが示唆された。

表 1 . RNA-seq の結果

	主席卵胞での 平均発現量	次席卵胞での 平均発現量	Fold change(主席 卵胞 / 次席卵胞)
アロマターゼ遺伝子	126	3.0	42
インヒピン A 遺伝子	3918	656	5.9
HIF1A 遺伝子	55	25	2.2
VEGFA 遺伝子	33	7.8	4.2
転写因子 A 遺伝子	4.5	0.2	29
転写因子 B 遺伝子	5.5	79	0.07
分泌タンパク質 C 遺伝子	72	589	0.12
-アクチン遺伝子	462	494	0.9

* 各遺伝子の発現量は RPKM (reads per kilobase of exon model per million mapped reads) で示した。

(3) RNA-seq の結果において主席卵胞の顆粒層細胞で次席卵胞より mRNA が多く発現していた転写因子 A について、免疫組織化学染色を行った。その結果、顆粒層細胞と卵胞膜細胞に強い染色がみられ、転写因子 A のタンパク質レベルでの局在を確認できた (図 2)。さらに、RNA-seq の結果と同様に、主席卵胞の顆粒層細胞で次席卵胞より強い染色が認められた。RNA-seq において次席卵胞の顆粒層細胞で主席卵胞より発現が多かった転写因子 B と分泌タンパク質 C について in situ hybridization と免疫組織化学染色を行った。In situ hybridization の結果、転写因子 B も分泌タンパク質 C も顆粒層細胞が強く染色され、小さい胞状卵胞で主席卵胞より強い発現が認められた。免疫組織化学染色の結果、転写因子 B も分泌タンパク質 C も小さい胞状卵胞や次席卵胞の顆粒層細胞に多く局在し、主席卵胞には局在が少ないことが示された。以上の通り、排卵数決定候補因子についての組織学的解析により、RNA-seq と同様の発現傾向が見られること、さらにタンパク質が局在し発現量の傾向も mRNA と同様であることを確認することができた。

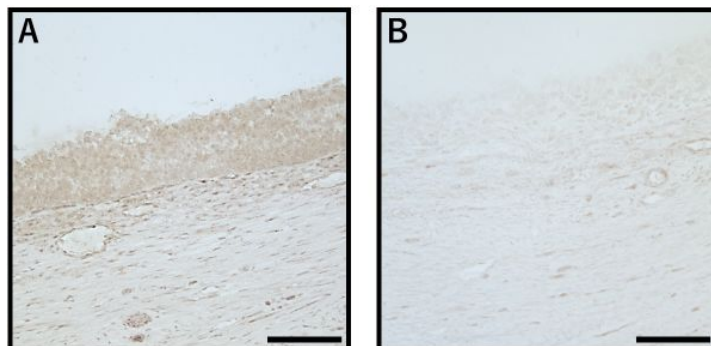


図 2 . ウシ卵巣の顆粒層細胞における転写因子 A の免疫組織化学染色結果 . A は主席卵胞、B は次席卵胞の代表的な写真を示した。スケールバーは 100 μm。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Hassaneen ASA, Naniwa Y, Suetomi Y, Matsuyama S, Kimura K, Ieda N, Inoue N, Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda KI, **Matsuda F**, Ohkura S. Immunohistochemical characterization of the arcuate kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) and preoptic kisspeptin neuronal populations in the hypothalamus during the estrous cycle in heifers. *Journal of Reproduction and Development* 2016; 62: 471-477
doi: 10.1262/jrd.2016-075

松田二子, 前多敬一郎, 大蔵聡, 上野山賀久, 東村博子. 中枢からのアプローチ: 新たな神経内分泌メカニズムを利用した繁殖制御. *臨床獣医* 2017; 35 (7): 98-101.

Ishiyama D, Nakamura Y, Tanaka T, Magata F, **Matsuda F**, Maeda KI. Severe incomplete fusion of the Müllerian ducts influences reproduction in Holstein cattle. *Theriogenology* 2018; 123: 209-215.
doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.09.035

[学会発表] (計 10 件)

末富裕太, 館林亮輝, 東村博子, 大蔵聡, **松田二子** 「シバヤギ KNDy ニューロン不死化細胞株の樹立」第 109 回日本繁殖生物学会大会 2016 年

堀畑慶、家田菜穂子、井上直子、上野山賀久、末富裕太、**松田二子**、前多敬一郎、束村博子
「ラットキスペプチンニューロン不死化細胞株の樹立」第 109 回日本繁殖生物学会大会 2016 年

Suetomi Y, Tatebayashi R, Tsukamura H, Ohkura S, **Matsuda F**. Establishment of a neuronal cell line derived from KNDy neuron in a goat. The 49th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction 2016 年

Tatebayashi R, Sakuma T, Yamamoto T, Ohkura S, **Matsuda F**. Modification of *KISS1* gene in goat embryonic fibroblasts using TALEN. International Symposium on Pituitary Gland and Related Systems 2016 2016 年

Ozaki R, Suetomi Y, Matsuyama S, Kimura K, Ohkura S, **Matsuda F**. Establishment of immortalized cell lines derived from cattle GnRH neurons. International Symposium on Pituitary Gland and Related Systems 2016 2016 年

高橋宙大、後藤哲平、平林真澄、中村翔、戴明道、池上花奈、**松田二子**、上野山賀久、束村博子、前多敬一郎「遺伝子改変ラットを用いた kappa opioid receptor (KOR) 発現細胞の解析」第 43 回日本神経内分泌学会学術集会 2016 年

松田二子、渡辺雄貴、大蔵聡、井上直子、上野山賀久、前多敬一郎、束村博子「排卵中枢キスペプチンニューロンの性分化には種差がある」第 13 回 GPCR 研究会

松田二子、真方文絵、束村博子、前多敬一郎「家畜における生殖技術の進歩」第 91 回 日本内分泌学会学術集会（招待講演）2018 年

松田二子「キスペプチンニューロンによる繁殖制御メカニズムの新知見」第 161 回 日本獣医学会学術集会（招待講演）2018 年

石山大、内田誠、清水秀茂、**松田二子**「腔鏡を用いた衛生的な人工授精方法がホルスタイン種経産牛の受胎性に及ぼす影響」第 111 回 日本繁殖生物学会学術集会 2018 年

〔図書〕(計 1 件)

日本動物学会 編(松田二子、前多敬一郎)丸善出版 動物学の百科事典(ストレスとホルモン)
2018 年発行 総ページ数 770 (454-455)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ 東京大学 獣医繁殖育種学教室
<http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/ikushu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者
なし

(2) 研究協力者
研究協力者氏名：大蔵 聡
ローマ字氏名：(OHKURA, satoshi)

研究協力者氏名：前多 敬一郎
ローマ字氏名：(MAEDA, kei-ichiro)

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。