

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2009

課題番号：18380164

研究課題名(和文)

哺乳類卵子の品質の判定法の開発：卵胞選抜の分子制御機構に基づいて

研究課題名(英文)

Development of estimation method for mammalian oocyte quality based on molecular mechanism of follicular selection

研究代表者

眞鍋 昇 (MANABE NOBORU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：80243070

研究成果の概要(和文)：哺乳類卵巣に潜在する数十万の原始卵胞の1%以下が排卵に至り、残りは選択的に閉鎖する。多くの内分泌研究が行われてきたが選択調節機構は未解明である。近年、顆粒層細胞のアポトーシス、特に細胞死リガンド・受容体系と細胞内シグナル伝達が調節の鍵であることが分かってきた。本研究は、これらを精査し、アポトーシス・シグナル阻害因子(cFLIPとXIAP)が選択調節に支配的に関わり、卵子品質判定の指標として有用であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Many primordial follicles are present in the mammalian ovary. Less than 1% develop and ovulate, and the remainders are eliminated *via* atresia. The endocrinological mechanisms involved in follicular development have been characterized, but the precise mechanisms involved in the regulation of follicle selection remain unknown. Recent studies suggest that apoptosis in granulosa cells plays a crucial role in follicular selection. Notably, death ligand and receptor system and intracellular signaling are the key mechanisms regulating granulosa cell apoptosis. In this study, the mechanisms of granulosa cell apoptosis regulated by death ligand and receptor system and signaling, and the roles of apoptosis inhibitory factors (cellular FLICE-like inhibitory protein: cFLIP and X-linked inhibitor of apoptosis protein: XIAP) were revealed. The inhibitors are useful to assess damaged and/or healthy oocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2007年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：家畜繁殖・卵胞選抜・卵母細胞・アポトーシス・細胞死阻害因子

## 1. 研究開始当初の背景

21世紀になってから哺乳類でも核移植技術を用いた体細胞やES細胞由来のクローン動物の作出、体外成熟・受精法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動物発生工学・生殖医療技術が編み出されて実用化レベルの成果が蓄積されてきているが、未だに成功率が低く、その理由のひとつとして用いられる卵子（厳密には卵母細胞とよぶべきであるが、慣例に従って以下卵子とよぶ）の「品質」が低いことが挙げられる。しかしながら卵子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。

ダウン症の発症頻度が母親の加齢にもなると等比級数的に高まるように、様々な要因で卵子の品質は損なわれ、それを監視する機構が母体の加齢などによって甘くなる場合があることが経験的に知られている。このような卵子の品質の低下は、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って長い休眠期にはいつてしまう哺乳類卵子にとっては避けて通れない宿命である。上述のように、近年様々な領域で広範に卵子が使われるようになってきているので、卵子の品質を的確に評価できる技術を開発することは急務である。幸いなことに、申請者らは10年以上にわたって哺乳類の卵子が休眠後減数分裂を再開して発育成熟する過程で99.9%以上をを選択的に死滅させてしまうことで不都合な卵子を取り除く分子機構の解明研究を進め、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ことができるようになってきている。本研究は、この申請者らが継続してきた卵胞とそれに内包される卵子を選択して死滅させる分子制御機構を解明する研究の成果を活用して、死滅すべき卵胞とそれに内包される卵子（すなわち品質が劣るもの）を判定して排除し、残りの排卵に至る卵胞に内包される高品質の卵子を動物発生工学や生殖医療に供する技術システムを開発しようとするもので、学術的に独創的であり、かつ社会に貢献する意義深いものである。

## 2. 研究の目的

1988年、申請者らは哺乳類における細胞死受容体を介する生理的な細胞死の分子制御について調べはじめ、1992年からは哺乳類の卵巣における卵胞とそれに内包される卵子の選抜機構に焦点を絞って今日まで研究を継続してきた結果これまでに下記のことを明らかにしてきた。

卵子の死滅は、卵胞の中で卵子を適切に発育・成熟させる役割をになう保育担当卵胞である卵胞上皮細胞（慣例に従って以下顆粒層細胞とよぶ）がアポトーシスによって死滅するために卵胞が閉鎖して消滅してしまい、その結果として卵子も死滅する。

卵胞の顆粒層細胞には複数の細胞死リガンド-細胞死受容体が発現しており、顆粒層細胞のアポトーシスは主にFas ligand (FasL)-Fas系システムによって支配的に制御されている。健全に発育している卵胞の顆粒層細胞においては、アポトーシスシグナルの細胞内伝達経路は、細胞死リガンドと結合して活性化した細胞死受容体に細胞内で結合するシグナル伝達介在タンパク (FADD) とFADDと結合することで活性化して下流にシグナルを伝達する開始タンパク分解酵素 (procaspase-8) を介して伝わっていく。これはFADDやprocaspase-8と結合する因子 (cFLIP) によって阻害され、これによって顆粒層細胞はアポトーシスを免れているアポトーシス・シグナル阻害因子 cFLIPは1次卵胞後期（未熟な卵子を一層の顆粒層細胞が取り囲んでいる）から発現が始まり、2次卵胞（顆粒層細胞が盛んに細胞分裂を繰り返して重層化する）以降は卵胞発育と平行して高まる。健全に発育してやがて排卵にいたるであろう3次卵胞（卵胞腔が形成されている）の顆粒層細胞には豊富に発現している。しかし閉鎖卵胞の顆粒層細胞には発現していない。これらの成果をふまえて、申請者らは「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子の健全度を見極めることができる」という仮説をたてた。本研究では、研究代表者が在籍する東京大学農学生命科学研究科附属牧場で飼育しているブタとシバヤギ（反芻家畜のモデル）の性周期を性腺刺激ホルモン (FSHとLH) や性ステロイドホルモン（エストラジオールとプロゲステロン）などの末梢血ホルモン濃度測定と卵巣の超音波画像診断（精密に卵胞の発育ステージを判断）によって正確に把握し、各々の卵巣から外科的に卵胞を個別に切り出し、そこから取り出した卵子の受精能と初期胚の発生正常性および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、仮説の適否を実証レベルで確認する。

## 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を指標にすれば卵子の健全度を見極めることができる」との仮

説の確認のために、以下のような方法で研究を進めた。卵子の正常性、体外授精後の初期胚の発生の正常性、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の精査：休眠後に減数分裂を再開して発育・成熟する過程で何らかの不具合をもつ 99.9%以上の卵子を死滅させて、正常な卵子を選抜する機構が存在する。この生来もっている評価システムを利用して卵子の「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、卵子そのものを用いてその品質を直接評価したのでは、品質評価を終えたものを動物発生工学や生殖医療に供することができない。そこで外科的に単離した個々の卵胞別に、ひとつひとつの卵子の正常性とそれを体外授精させた初期胚の発生の正常性および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ならびに卵胞腔を満たす卵胞液の性状を調べて、これが卵子の「品質」を見極める優れた指標であることを下記のように実証するために、(A1・卵胞の調製)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(エストラジオールとプロゲステロン)の濃度測定と卵巣の超音波3次元画像診断を繰り返すことによって、性周期と個々の卵胞の発育ステージを精密に把握したブタを供して卵胞期の卵巣から外科的に卵胞を個別に切り出し、実体顕微鏡下に卵胞液を吸引回収した後切開して卵子、顆粒層細胞、卵丘細胞を単離した。(A2・卵子と初期胚の正常性の評価)回収した卵子の形態学的正常性を判定した後、体外成熟して正常に卵核胞崩壊、極体放出が起こるか否か、起こる場合には体外受精を施して受精能を評価し、続いて得られた初期胚を培養器内で培養して発生の正常性、特に胚盤胞まで正常に発生が進み、ハッチングできるか否かを判定した。次いで正常に胞状胚まで発生してハッチングできたものが実際に仮親の子宮に胚移植して着床できるか否か着床能とその後の発生が正常に進行するか否かを実証的に評価した。(A3・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)顆粒層細胞と卵丘細胞(顆粒層細胞の一部が直接卵子を取り囲んでおり、特に卵丘細胞とよぶ)をホモジネートしてアポトーシス・シグナル阻害因子であるcFLIP-long form(cFLIP-1)とshort form(cFLIP-s)のmRNAの発現を定量的real-time PCR法にて、タンパク発現をWestern blot法にて測定した。加えて一部の卵子についても同様にしてcFLIP-1とcFLIP-s mRNAの発現を調べた。なお予備的にcFLIP-1 mRNAの発現を調べたところ顆粒層細胞と卵丘細胞における発現量には有意な差異が認められず、卵子においては消滅の直前まで一定レベル

が発現していた。(A4・顆粒層細胞における性腺刺激ホルモン受容体等の発現)卵胞の発育と成熟に深く関わる性腺刺激ホルモン(FSH、LH)の受容体およびアクチビン、インヒビン、フォリスタチン、血管新生因子とこれらの受容体などのmRNAとタンパクの発現を上述と同様にして定量的に調べた。

(A5・卵胞液中のホルモン等の測定)併せて卵胞発育に関与する卵胞液中のプロゲステロン(P4)とエストラジオール(E2)を測定し、P4/E2比が15以上の場合を閉鎖と判定する。卵胞液中アクチビン、インヒビン、フォリスタチン、血管新生因子などの含有量をイムノアッセイ法にて測定した。

(2)顆粒層細胞・卵丘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子の品質を見極めようとするとき、簡便かつ高感度に検出することができる判定システムを開発しなくては実用性のない技術で終わってしまうので簡便かつ高感度な判定システムの開発を進めた。卵子を核移植などに使おうとする場合高い細胞毒性をもつRNA分解酵素阻害剤と共存させることはできず、阻害剤が存在しない場合mRNAはRNA分解酵素によって容易に分解されるので、cFLIP mRNAを検出するシステムは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を開発しなくてはならない。そこで、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ぐ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のホモジネートを遠心分離した上清を添加し、他方からルシフェラーゼ標識した抗cFLIP-1抗体を添加して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)cFLIP発現の調節因子探索とその分子制御機構の解明研究を進めた。(B1・アポトーシス・シグナル阻害因子cFLIPの発現を調節している因子の探索)健全に発育している卵胞の顆粒層細胞に高発現しているcFLIP-1が急速に消滅して卵胞閉鎖が誘導されるのだが、この消滅を調節している機構は未だに未解明である。cFLIP-1 mRNAをup-regulateあるいはdown-regulateする因子の探索の最初のステップは、カナダ・サスカチュワン大学のロドリゲス教授が確立し、彼から分与されたJC-410細胞(ブタ顆粒層細胞が不死化したものであるが、形質転換はしておらず、様々な顆粒層細胞の特性を保持している)を用い、この細胞と卵胞に対して成長因子・生存因子としてはたらくサイトカイン(TNF $\alpha$ 、IL1 $\beta$ 、IL6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β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(不安定なので産生基質)などを添加して培養し、これらのなかからの候補物質の絞込を進めた。なおブタやウシなどの完全性周期動物の卵胞顆粒層細胞ではTNF $\alpha$ が増殖・生存因子として働いていること、これがアポトーシス・シグナルを伝達することができずに細胞増殖シグナルを伝達するTNF2型受容体のみが発現していることに起因すること、しかし齧歯類ではアポトーシス・シグナルも伝達できるTNF1型受容体が発現していること、培養細胞を用いた実験ではTNF $\alpha$ がcFLIPの発現をup-regulateすること、そしてTNF $\alpha$ の発現はinterleukin-6(IL6)によってup-regulateされていること(IL6-TNF $\alpha$ 軸)等を見出したので、これらの知見を道しるべにしてアポトーシス・シグナル阻害因子cFLIPの発現を支配的に制御しているマスター因子の同定を目指した。(B2・アポトーシス・シグナル阻害因子cFLIPの発現調節機構の解析)cFLIP-1とcFLIP-sがスプライシングバリエーションであることを確認したが、スプライシング過程がどのように巧みな調節を受けて2種のバリエーションが産生されているのか不明であるので、ブタゲノムのcFLIP遺伝子の5'-側の転写開始コード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、予備的にFOXO3aなどの転写因子が転写制御していると思われる成績を得た。次いで上記IL6-TNF $\alpha$ 軸がアポトーシス・シグナル阻害因子cFLIPの転写をup-regulateする場合、あるいは未探索な因子が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た。これによってcFLIPの発現を直接的に制御している分子機構が明らかとなると考えている。

(4)アポトーシス・シグナル阻害因子cFLIPの発現を人為的に調節することで卵子の救命が可能か否かを確認することで、阻害因子の生理作用の確認を以下のように行った。この成果は、卵子の品質を評価するマーカーとして役立つのみならず、cFLIPの発現を人為的にup-regulateすることで食肉処理場で日々廃棄されている卵巣内の卵子(潜在的卵巣内卵子)の救命に役立つと考えられる。(C1・卵巣組織細片の凍結保存):食肉処理場で採取した家畜卵巣のうちで1次卵胞を豊富に含む皮質部を細切してガラス化凍結した。(C2・異種移植と遺伝子導入)この凍結保存した卵巣組織を融解後、雄性重症複合免疫不全(SCID)マウス腎漿膜下に異種移植し、このマウスの血管内にcFLIP-1遺伝子をアデノウイルス由来遺伝子導入ベクターの

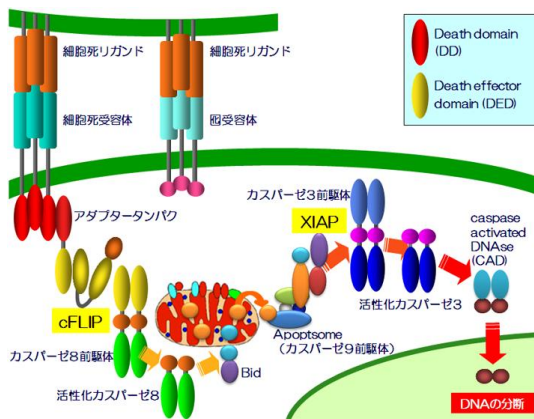
$\beta$ -actin enhancerとCMV promoterの下流にcFLIP-1遺伝子とEGFP遺伝子を組み込んだものを投与することで*in vivo*遺伝子導入を行い、cFLIP-1を強制発現させた。この処置の後2週間バイオハザードベンチ内でマウスを飼育して異種移植した家畜卵巣における卵胞の発育を調べた。なお2週間培養することで卵胞腔をもつ3次卵胞にまで発育することは確認したので、実験期間を2週間とした。(C3・卵子の体外成熟と体外受精)このようにして2週間培養した後、腎臓から卵巣組織を回収して卵胞発育ステージ(卵胞腔をもたない2次卵胞と腔をもつ3次卵胞)を判定した。引き続き3次卵胞から卵子を取り出して体外成熟培養に供した。卵核胞崩壊、第一極体の放出を指標として成熟した卵子に体外受精を施した。このようにして卵子の発生能と受精能を評価した(C4・初期胚の体外培養)受精した初期胚を体外で培養して2細胞、8細胞、桑実胚、胚盤胞までの発生と各ステージの胚の形態異常の判別およびハッチング能の有無を確認することで、発生能が正常か否か評価した。

(5)cFLIP以外の阻害因子の探索とその卵子の品質評価のための有用性を見極めを以下のように進めた。細胞死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これまでの研究の過程でcFLIP以外に卵子の品質評価に役立つ可能性のある分子が見出されてきた。卵胞の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受容体は、健常卵胞の顆粒層細胞には豊富に発現しているが、閉鎖過程の卵胞では発現していなかった。発現パターンはcFLIPと極めて類似していた。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が、この過程でゲートキーパー(p53)が伝達阻害因子として働いている可能性が高いことが分かった。これらを含むcFLIP以外の阻害因子を探索して、卵子の「品質」を評価するマーカーとして適しているか否か調べた。

#### 4. 研究成果

哺乳類卵巣では胎児期に第一減数分裂前期のディプロテン期で停止した卵母細胞が顆粒層細胞に包まれた原始卵胞の状態休眠しており、性周期毎に一定数が発育する。卵胞内では顆粒層細胞が卵母細胞を保育し排卵に至るが、99%以上が閉鎖する。重要な家畜であり完全性周期動物であるブタおよび反芻家畜のモデルとしてヤギ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

のアポトーシスが閉鎖の調節に深く関わっていることを示し、この分子制御機構の解明を進めた。二次卵胞以降の顆粒層細胞には tumor necrosis factor (TNF) family に属するリガンド (TNF $\alpha$ 、TRAIL、FasL) と TNF 受容体 (TNFR) family に属する受容体 [TNFR-II、TRAIL 受容体 (DR4、DR5、 $\text{TRAILR1}$ )、FasL 受容体 (Fas、 $\text{TRAILR3}$ 、可溶性 Fas)、リガンド不明受容体 (PFG-5)] が発現していること、TNF $\alpha$ /TNFR-II 系は細胞増殖の亢進を担っていることを明らかにした。これら細胞死リガンドと受容体は、閉鎖卵胞のみならず発育している健常卵胞 (顆粒層細胞は増殖中) の顆粒層細胞でも発現していたので、細胞死阻害因子が存在すると考え、その探索を行った結果、顆粒層細胞はミトコンドリアを介してシグナルが伝わる II 型アポトーシス細胞であることが分かるとともに 2 種類の細胞内阻害因子の存在が判明した。



(1) リガンドと結合した活性化受容体とアダプタータンパク (FADDやTRADD) が互いの death domain を介して結合すると、アダプタータンパクの death effector domain を介してカスパーゼ 8 前駆体 (カスパーゼは特異性の高い蛋白分解酵素で、下流の蛋白を分解してシグナルを伝達する) 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 が下流のカスパーゼ 3 前駆体を直接分解するが、顆粒層細胞ではカスパーゼ 8 がミトコンドリア外膜の透過性を調節する Bid を活性化してミトコンドリアからチトクローム C を放出させ、このチトクローム C が Apaf-1 およびカスパーゼ 9 前駆体と結合して apoptosome を形成し、ここでカスパーゼ 9 が活性化されてカスパーゼ 3 前駆体を分解する。活性化したカスパーゼ 3 が caspase activated DNase (CAD) を活性化させ、活性化 CAD が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。

(2) 健常卵胞顆粒層細胞では FADD と結合して

カスパーゼ 8 前駆体との結合を阻害する cellular FLICE-like inhibitory protein (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 X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) が発現しており、これらがアポトーシスを阻止していることを示した。顆粒層細胞由来細胞で阻害因子を過剰発現させた場合、受容体依存性アポトーシスが阻害され、逆に RNA silencing 法で発現を停止させると細胞は死滅した。阻害因子は、TNF $\alpha$  と interleukin-6 によって亢進することが分かった。加えて、リガンド・受容体結合を阻害する  $\text{TRAILR3}$  が発現して細胞死を防いでいることも分かった。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。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 77 件)

- ① Moniruzzaman M ら (4 名 4 番目) 査読有 Knockdown of FOXO3 induces primordial oocyte activation in pigs. *Reproduction* 139:337-48, 2010.
- ② Kyogoku H ら (3 名 3 番目) 査読有 Nucleoli from growing oocytes support the development of nucleolated full grown oocytes in the pig. *Mol Reprod Dev* 77: 167-173, 2010
- ③ Moniruzzaman M ら (4 名 4 番目) 査読有 Development of vitrified porcine primordial follicles in xenografts. *Theriogenology*. 72: 280-288, 2009
- ④ Bui HT ら (6 名 6 番目) 査読有 Effect of vanadate on the chromatin configuration in pig GV-oocytes. *J Reprod Dev* 55: 367-372, 2009
- ⑤ Al-zi'abi MO ら (3 名 3 番目) 査読有 Survival role of locally produced acetylcholine in the bovine corpus luteum. *Biol Reprod*, 80: 823-832, 2009
- ⑥ Lee HY ら (3 名 3 番目) 査読有 Prostaglandin F2 $\alpha$  stimulates 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-1 enzyme bioactivity and protein expression in bovine endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 80: 657-664, 2009
- ⑦ Woclawek ら (6 名 5 番目) 査読有 Lysophosphatic acid modulates PG secretion in the bovine uterus. *Reproduction* 137: 95-105, 2009
- ⑧ Skarzynski DJ ら (7 名 7 番目) 査読有 Effects of exogenous tumour necrosis factor- $\alpha$  on the secretory function of the bovine reproductive tract depend on tumour necrosis factor $\alpha$  concentrations. *Reprod Dom Anim*, 44: 371-379, 2009
- ⑨ Taniguchi H ら (4 名 4 番目) 査読有 The expression of the nuclear receptors NR5A1 and NR5A2 and transcription factor GATA6 correlates with steroidogenic gene expression in the bovine corpus luteum. *Mol Reprod Dev* 76: 873-886, 2009
- ⑩ Acosta TJ ら (8 名 7 番目) 査読有 Acute

- changes in circulating concentrations of progesterone, nitric oxide and partial pressure of oxygen during prostaglandin F2 $\alpha$  induced luteolysis in cattle. *J Reprod Dev* 55: 149-155, 2009
- ⑪ Manabe N ら(10名1番目)査読有 Role of cell death ligand and receptor system on regulation of follicular atresia in pig ovaries. *Reprod Dom Anim*, 43: 268-272, 2008
- ⑫ Ogushi S ら(6名5番目)査読有 The maternal nucleolus is essential for early embryonic development in mammals. *Science*, 319: 613-616, 2008
- ⑬ Bowolaksono A ら(6名6番目)査読有 Antiapoptotic roles of prostaglandin E2 and F2 $\alpha$  in bovine luteal steroidogenic cells. *Biol Reprod*, 79, 310-317, 2008
- ⑭ Matsuda F ら(6名6番目)査読有 Regulation of granulosa cell apoptosis by death ligand-receptor signaling. *Anim Sci J* 79: 1-10, 2008
- ⑮ Mohamed M ら(6名6番目)査読有 Physiological roles of inhibin in regulation of FSH secretion and follicular development during early pregnancy in goats. *Dom Anim Endocrinol* 35: 157-163, 2008
- ⑯ Maeda A ら(8名8番目)査読有 Molecular cloning of a porcine apoptosis inhibitory ligand, Netrin-1, and its receptor, p53RDL1. *J Reprod Dev* 54: 275-280, 2008
- ⑰ Matsuda F ら(6名6番目)査読有 cFLIP regulates death receptor mediated apoptosis in an ovarian granulosa cell line. *J Reprod Dev*, 54: 314-320, 2008
- ⑱ Cheng Y ら(6名6番目)査読有 Changes in expression and localization of XIAP in follicular granulosa cells during atresia in pig ovaries. *J Reprod Dev*, 54: 454-459, 2008
- ⑲ Lee J ら(8名8番目)査読有 Unified mode of centromeric protection by shugoshin in mammalian oocytes and somatic cells. *Nat Cell Biol* 10: 42-52, 2008
- ⑳ Komiyama J ら(7名7番目)査読有 Cortisol is a suppressor of apoptosis in bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 78: 888-895, 2008
- 21 Nishimura R ら(5名5番目)査読有 Hypoxia promotes luteal cell death in bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 78: 529-536, 2008
- 22 Khalaj M ら(8名7番目)査読有 Leydig cell hyperplasia in ENU induced mutant mouse with germ cell depletion. *J Reprod Dev* 54: 225-228, 2008
- 23 Hama N ら(8名8番目)査読有 Development and evaluation of a rapid EIA system for measurement of urinary estrone-3-glucuronide. *J Reprod Dev* 54: 281-285, 2008
- 24 Sakumoto R ら(3名3番目)査読有 Changes in expression of 11 $\beta$ HSD type-1, -2 and glucocorticoid receptor mRNAs in pig corpus luteum during the estrous cycle. *Mol Reprod Dev* 78: 529-536, 2008
- 25 Korzekwa A ら(6名6番目)査読有 The influence of TNF $\alpha$  on the secretory function of bovine corpus luteum: TNF and its receptors expression during the estrous cycle. *Reprod Biol* 8: 245-262, 2008
- 26 Tanikawa M ら(8名8番目)査読有 Regulation of prostaglandin biosynthesis by interleukin-1 in cultured bovine endometrial cells. *J Endocrinol* 199: 425-434, 2008
- 27 Skarzynski DJ ら(3名3番目)査読有 Regulation of luteal function and corpus luteum regression in cows: hormonal control, immunomechanisms and intercellular communication. *Reprod Domest Anim*, 43: 57-65, 2008
- 28 Matsuda F ら(6名6番目)査読有 Anti-apoptotic activity of porcine cFLIP in ovarian granulosa cell lines. *Mol Reprod Dev*, 74: 1165-1170, 2007

[学会発表] (計76件)

- ① Manabe N. Oocyte quality assessment for animal production with biotechnology. 招聘講演 International Symposium on Animal Production. 2009年7月13日, 北京, 中国
- ② Manabe N. Role of cell death ligand and receptor system on regulation of follicular atresia in pig ovaries. 招聘講演 16th International Congress on Animal Reproduction. 2008年7月15日, Budapest, Hungary

[図書] (計11件)

- ① Miyano T, Manabe N. Oocyte growth and acquisition of meiotic competence. *In: Gamete Biology: Emerging frontiers on fertility and contraceptive development*. Gupta SK, Koyama K, Murray JF eds, Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp531-538/545, 2007

[その他]

ホームページ:  
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/bokujo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞鍋 昇 (MANABE NOBORU)  
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・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)  
 岡山大学・大学院自然科学研究科・教授  
 研究者番号: 40177168