

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05937

研究課題名(和文)ウシ卵母細胞の機能的完全性を裏打ちする卵丘細胞の分子生物学的特徴

研究課題名(英文)Transcriptomic signature of cumulus cells that underpin the functional completeness of bovine oocytes

研究代表者

杉村 智史 (Sugimura, Satoshi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00728454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：卵母細胞の機能である発生能はそれを取り囲む卵丘細胞や顆粒層細胞といった卵胞細胞により制御されている。これまでにFSHによる卵胞発育処理が卵母細胞の発生能を向上させることを明らかにした。RNA-seq、メタボローム解析からFSHによる卵胞発育処理は、卵胞細胞の過度なグルコース代謝を抑制し、これにより、卵胞細胞の退行や遊走が抑制されることが示された。卵胞細胞-卵子間シグナリングネットワークの共役により卵母細胞の発生能が獲得・維持されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、卵母細胞の機能的完全性、すなわち、発生能の獲得・維持機構の一旦が明らかになった。卵母細胞の発生能獲得機構の全容解明の一助になるだけでなく、本研究の知見に基づいた卵母細胞の体外培養系の開発により、家畜の効率的生産、育種改良の迅速化が期待される。

研究成果の概要(英文)：The developmental competence, which is a function of oocytes, is regulated by follicular cells such as cumulus cells and granulosa cells that surround them. So far, I showed that follicle growth treatment (FGT) with FSH improves the developmental competence of oocytes. From RNA-seq and metabolome analysis, it was shown that FGT with FSH suppresses excessive glucose metabolism of follicle cells, thereby suppressing follicle cell regression and migration. Hence I demonstrated that the developmental competence of oocytes is acquired and maintained by the coupling of the follicular cell-oocyte signaling network.

研究分野：動物生殖学

キーワード：卵母細胞 発生能 卵胞細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵胞細胞は卵母細胞の発生能、すなわち、受精能、初期胚発生能、および個体発生能を制御する。この卵丘細胞や顆粒層細胞といった卵胞細胞は卵胞刺激ホルモン(FSH)や黄体形成ホルモン(LH)といった性腺刺激ホルモン、そして、それらに關与する成長ホルモンやステロイドの制御下にある。したがって、卵母細胞の発生能は、FSH や LH の刺激による卵胞の發育過程で徐々に向上すると考えられている。しかしながら、通常、ウシ体外受精(IVF)胚の作製には十分に卵胞發育が完了していない小胞状卵胞(3-6 mm)由来の卵丘細胞卵母細胞複合体(COCs)が用いられる。これまでに申請者はFSHを卵母細胞採取前の個体に漸減投与することで、卵胞發育の誘導と共に卵母細胞の初期胚発生能(胚盤胞発生能)が向上することを明らかにした(Sugimura et al., Sci Rep, 2017)。この高い胚盤胞発生能の有する卵母細胞を囲む卵丘細胞の分子生物学的特徴をRNAシーケンス(RNA-seq)により解析したところEGF受容体(EGFR)シグナリングが促進していること、遊走や移動が抑制されていること、退行が抑制されていること、そして抗炎症作用が促進していることが明らかとなった(Sugimura et al., Sci Rep, 2017)。EGFRシグナリングの促進は卵母細胞の発生能向上のキーコンポーネントであること(Sugimura et al., Dev Biol, 2015)、これに加え、卵胞細胞の遊走や移動が抑制され、また抗炎症作用の亢進により卵胞細胞の健全性が保たれたことで細胞間情報伝達が密になった結果、卵母細胞の発生能が向上したと推察される。その一方、これら高発生能卵母細胞からIVF胚を作製し、借り腹牛へ移植した場合の正常個体への発生率は30-40%と依然低率であった。つまり、卵胞細胞におけるEGF受容体シグナリングの促進や、密な細胞間コミュニケーションは、胚盤胞発生能における必要条件ではあるが、その後の正常個体への発生能を保証する十分条件ではないことが示唆される。卵母細胞の機能とは精子との受精を経て最終的には個体発生を成し遂げることであるが、その卵母細胞の機能的完全性を裏打ちする卵丘細胞の分子生物学的特徴は明らかになっていない。

2. 研究の目的

ウシ卵母細胞の発生能、特に個体発生能を制御する卵丘細胞の分子生物学的特徴を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

FSH投与による卵胞發育処理を施した雌牛もしくは施さない雌牛から、経膣採卵(OPU)により卵丘細胞卵子複合体(COCs)および卵胞液を採取した。卵胞發育処理には、FSHの漸減投与区および1回投与区を設けた。採取したCOCsは体外成熟、体外受精の後、体外発生培養に供した。培養後2日の卵割率、8日の胚盤胞発生率を評価した。得られた胚盤胞は借り腹牛に移植した。また、卵胞液はCE-TOFMSメタボローム解析に供した。卵胞發育処理を体外で模倣するため、FSHの2次メッセンジャーであるcAMPモジュレーター dbcAMP および IBMX)を体外成熟に先駆けて2時間処理をした(pre-IVM区)。発生能(胚盤胞形成能)およびRNA-seqによる卵丘細胞の転写プロファイルを無処理区(対照区)と比較した。

4. 研究成果

OPUに先駆けた卵胞發育処理は、漸減投与区、1回投与区ともに、胚盤胞への発生能および移植後の発生能を改善した。メタボローム解析の結果、131の代謝産物が認められた。その得られた代謝産物の主成分分析から、対照区および卵胞發育処理との間で代謝産物の違

いが認められた。一方、漸減投与区および1回投与区では違いは認められなかった。卵胞発育処理の方法に関わらず卵胞発育処理を施すことで、卵胞液中のグルコースの代謝産物であるG6P、乳酸、酸化ストレスマーカーである酸化型グルタチオン濃度の低下が認められ、特に漸減投与区でこれらの濃度が低かった。このことは、卵胞発育処理を施すことで、卵胞細胞のグルコース代謝が抑制されること、酸化ストレスが抑制されることを示唆している。また、卵胞発育処理を模倣した体外培養系(pre-IVM区)において、卵丘細胞のRNA-seqの結果から、転写に関連する遺伝子群が増加していた。特に、卵胞発育過程において卵胞細胞の分化に関連すると考えられている *JUNB* や *FOSB* といった AP1 因子の増加が確認された。また、KEGG 解析から、グリコサミノグリカンの分解が亢進していた。Pre-IVM を施すことで、胚盤胞形成能が以上、卵胞発育処理は、卵胞細胞の分化を促し、その一方で、細胞外マトリックスの分解を促進することで、卵胞細胞間コミュニケーションを維持している可能性が示唆された。本研究で、卵母細胞の発生能を裏打ちする卵胞細胞の特徴の一端を明らかにした。今後、卵母細胞の発生能獲得機構の解明、家畜の効率的生産および育種改良の迅速化が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Suzuki Ryosuke, Okada Mai, Nagai Hiroki, Kobayashi Junichi, Sugimura Satoshi | 4. 巻 166 |
| 2. 論文標題 Morphokinetic analysis of pronuclei using time-lapse cinematography in bovine zygotes | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Theriogenology | 6. 最初と最後の頁 55～63 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.theriogenology.2021.02.021 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Nagai H, Okada M, Nagai Y, Sakuraba Y, Okae H, Suzuki R, Sugimura S | 4. 巻 562 |
| 2. 論文標題 Abnormal cleavage is involved in the self-correction of bovine preimplantation embryos | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 76-82 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.05.028 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Ieda S, Akai T, Sakaguchi Y, Shimamura S, Sugawara A, Kaneda M, Matoba S, Kagota M, Sugimura S, Kajjima H | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 A microwell culture system that allows group culture and is compatible with human single media | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Assisted Reproduction and Genetics | 6. 最初と最後の頁 1869-1880 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10815-018-1252-z | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yao T, Suzuki R, Furuta N, Suzuki Y, Kabe K, Tokoro M, Sugawara A, Yajima A, Nagasawa T, Matoba S, Yamagata K, Sugimura S. | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Live-cell imaging of nuclear-chromosomal dynamics in bovine in vitro fertilised embryos | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 7460 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-25698-w | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Sugimura S, Yamanouchi T, Palmerini MG, Hashiyada Y, Imai K, Gilchrist RB. | 4. 巻 64 |
| 2. 論文標題 Effect of pre-in vitro maturation with cAMP modulators on the acquisition of oocyte developmental competence in cattle. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development | 6. 最初と最後の頁 :233-241 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2018-009 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 長井博紀、杉村智史 |
| 2. 発表標題 ウシ体外受精胚のコンパクション時に排除される動態解析 |
| 3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Okada M, Nagai Y, Matoba S, Sakuraba Y, Sugimura S |
| 2. 発表標題 Analysis of chromosomal abnormality of bovine in vitro fertilized embryos based on next-generation sequencing |
| 3. 学会等名 International Embryo Technology Society 46th Annual Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sugimura S, Richani D, Gilchrist RB |
| 2. 発表標題 Follicular guidance for oocyte developmental competence |
| 3. 学会等名 10th International Ruminant Reproduction Symposium (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|