

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21658092

研究課題名（和文） アポトーシス阻害因子遺伝子導入・異種移植による潜在的卵母細胞救命法創出

研究課題名（英文） Creation of rescue system for potential oocytes by apoptosis inhibitory factor gene transfer and xenotransplantation techniques

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）：哺乳類では、胎仔期にディプロテン期で減数分裂を休止して休眠している卵母細胞が卵巣内に数十万個含まれており、性周期毎に一定数の卵母細胞は発育・成熟して排卵に至る。優秀な子孫を残す戦略としてこの過程で99%以上の卵胞・卵母細胞が選択的に死滅するが、分子制御機構は未解明である。本研究は重要家畜であるブタの卵巣において繰り返される卵胞の選択的な死滅を調節している分子制御機構を解明し、これに基づいて卵巣組織を凍結保存して卵巣内で休眠している潜在的卵母細胞を救命して雌性遺伝子資源の保存を実現するとともにそれを活用する手法を開発しようとするものである。これまでに卵胞閉鎖は顆粒層細胞アポトーシスによって調節されていることが分かってきているので、顆粒層細胞における細胞死受容体を介するアポトーシスシグナル細胞内伝達系を解析し、ミトコンドリアを介して細胞内アポトーシスシグナルが伝達するII型アポトーシス細胞であることを明らかとした。ついで細胞内でアポトーシスシグナル伝達を阻害している因子(cFLIPとXIAP)および細胞膜外で阻害している可溶性細胞死受容体を見出し、これらの活用を図った。すなわち免疫不全マウス腎にブタ卵巣組織細片を異種移植し、阻害因子にてアポトーシスを阻害することで、卵胞救命率を高めることができた。

研究成果の概要（英文）：In mammals, hundreds of thousands of oocytes are contained in adult ovaries, and small part of oocytes restart meiosis in each estrous cycle. More than 99% of follicles are regenerated as atresia, however, molecular control mechanism to select ovulating oocytes which is an important strategy to get excellent offspring has not been revealed. The present study performed to elucidate the molecular control mechanism that regulates a selective killing of ovarian follicles in porcine ovaries, in other words, to examine the apoptosis regulating molecular mechanism in granulosa cells. I analyzed the transmission system of apoptotic signal in granulosa cells. I revealed that granulosa cell was a type II apoptosis cell in which apoptotic signal transduced via mitochondria. I found that a novel soluble receptor, an outside factor of cell membrane, inhibited cell death in granulosa cells. Moreover, I demonstrated two inhibitors, cFLIP and XIAP, which interrupted apoptotic signaling within the cells. For application of these apoptosis inhibiting factors, I created the rescue system for potential oocytes in frozen small ovarian tissues by apoptosis inhibitory factor gene transfer and xenotransplantation techniques to raise the follicle survival rate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1100,000	0	1100,000
2010年度	1000,000	0	1000,000
2011年度	1000,000	300,000	1300,000
総計	3100,000	300,000	3400,000

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：卵胞閉鎖・卵母細胞・アポトーシス・細胞死阻害因子・ブタ

1. 研究開始当初の背景

哺乳類でも体細胞核クローン作出が可能となったのが1997年であるが、10年以上経過したにもかかわらず成功率が極めて低いままである。成功率を上げる研究が必要なことは言うまでもないが、優れた遺伝子資源をもった高品質の卵母細胞を安定的に供給することで成功率の低さをカバーすることも重要である。哺乳類の卵巣には胎仔期に体細胞分裂を終えて減数分裂を開始してディプロテン期で分裂を停止してしまっている長い休眠期にはいつている卵母細胞が数十万含まれているので、これらを活用できる技術システムを確立することが肝要である。しかしながら、休眠中の卵母細胞を多量に含む卵巣皮質の凍結保存とそこからの卵母細胞の救命する技術の開発研究は皆無であった。

2. 研究の目的

優秀な遺伝形質をもつ雌家畜の卵巣が、食肉処理場では廃棄され続けている。これに含まれて未利用のまま死滅する運命にある卵母細胞を「卵巣内潜在的卵母細胞」とよぶ。雄の場合は20世紀半ばに精子の凍結保存技術が確立されたので容易に保存可能であるが、雌の遺伝子と卵母細胞のミトコンドリア遺伝子を遺伝子資源として安定的に保存し、これを将来利用できるシステムは未だ完成していない。近年世界中で大きな社会問題となっている様々な新興感染症蔓延や地球環境要因の変化に速やかに対応するためには、多様で優秀な遺伝子を保存しておかなくてはならず、雌家畜卵母細胞の保存技術開発は、畜産学に関わる者の責務である。本研究は、申請者が20年以上継続してきた「卵胞の選択的死滅を制御している分子機構の解明研究」の成果を活用して卵巣内潜在的卵母細胞を救命するものである。すなわち豚卵巣の卵胞顆粒層細胞においては、アポトーシスが主に Fas ligand (FasL) -Fas 系システムによって支配的に制御されている。健常な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され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 (未熟な卵母細胞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。健常な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ということが分かってきている。これらの知見をいかして、食肉処理場で得られる未熟卵胞を含む卵巣の皮質細片を凍結保存・融解後、免疫不全マウスに異種移植し、そこでアポトーシス阻害因子の遺伝子導入によって卵胞死滅を阻止することで卵母細胞を救命するという、最先端技術を複合的に駆使して、卵巣内潜在的卵母細胞を救命して有効利用するシステムを創出するものである。

3. 研究の方法

アポトーシス阻害因子の cFLIP と XIAP の遺伝子導入と異種移植法を組み合わせ、家畜の卵巣内の潜在的卵母細胞を救命できるシステムの開発を目指した。すなわち以下のように卵巣皮質組織細片の調製、細片のガラス化凍結・融解、免疫不全マウスへの異種移植、細片移植マウスを介した遺伝子導入、卵胞の発育・成熟、成熟卵胞から得た卵母細胞の体外受精と初期胚の体外培養、着床の確認という一連のシステムを確立した。

(1) ブタの卵胞では cFLIP のスプライシング・バリエーションの short form は発現しておらず long form (cFLIP-1) が発現していることを見出したので、本研究では cFLIP-1 と XIAP とに焦点を絞り、これらを人為的に up-regulate することで、食肉処理場で廃棄されている卵巣内潜在的卵巣内卵母細胞の救命を試みた。二次卵胞 (重層した顆粒層細胞で卵母細胞が覆われる) を豊富に含む卵巣皮質部の細片を申請者が開発した等容 15% polyethylene glycoldimethyl sulfoxide 溶液を主剤とする凍結保護剤に浸漬後、液体窒素中でガラス化凍結した (Nakagawa et al., J Reprod Dev, 57: 335-41, 2011)。

(2) 凍結卵巣細片を融解して8週齢雄重症複合免疫不全 (SCID) マウスの腎臓膜下に申請者らの開発した方法 (Kagawa et al., J Reprod Dev, 51: 77-85, 2005) で異種移植

し、この卵巣移植マウスを P2 バイオハザードクリーンベンチ内にて無菌的に飼育した。(3) 卵胞の発育ステージを判定、計数後実体顕微鏡下に発育、成熟が進んだ三次卵胞を切開して卵母細胞を取り出して形態異常を評価し、次いで体外成熟培養して成熟ステージと形態異常を判定、計数を行った。成熟の進んだ卵母細胞に体外受精を施して受精能を調べ、次のステップとして受精した初期胚を体外で培養して発生が正常か否かを評価した。(4) cFLIP-1 と XIAP を組込んだベクターが卵母細胞に導入されることは望ましくないもので、これらが卵母細胞には導入されていないことを確認した。

4. 研究成果

哺乳類の卵巣では胎仔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、発育の過程で 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を用いて申請者らは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 に属するリガンドと TNF 受容体 (TNFR) family に属する受容体が発現していること、TNF α /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 (松田ら, 比較分泌学, 38: 27-32, 2012)。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全卵胞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。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。ブタの健全な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 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 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。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。これらの細胞死受容体を介する細胞内シグナル伝達を解明する研究の過程で cFLIP と XIAP 以外にも卵胞救命に役立つ候補分子を見出した。ブタのような完全性周期動物の顆粒層細胞には囹受容体 (DcR3) が発現していることを見出した (Sugimoto et al., J Reprod Dev, 56: 467-74, 2010)。顆粒層細胞は、アポトーシスシグナルがカスパーゼ 8 とミトコンドリア機能を制御する Bit (Bcl-2 ファミリー) を介してミトコンドリアに伝えられ、ミトコンドリアからチトクローム C が放出されて下流のカスパーゼ前駆体を活性化する II 型アポトーシス細胞であり (Matsuda et al., J Reprod Dev, 57: 151-58, 2011)、ゲートキーパー p53 が伝達を阻害している。この発現を人為的に高めれば顆粒層細胞の生存を確保できると考えられた。

卵胞閉鎖は顆粒層細胞アポトーシスによって調節されており、この細胞はミトコンドリアを介して細胞内アポトーシスシグナルが伝達する II 型アポトーシス細胞であるので、細胞内でアポトーシスシグナル伝達を阻害している因子 (cFLIP と XIAP) にて免疫不全マウス腎に異種移植したブタ卵巣組織細片におけるアポトーシスを阻害することで、この卵巣細片に含まれている卵胞の救命率を高めることができることがわかってきた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (総計 27 件)

1. Nguyễn Việt Linh, Kazuhiro Kikuchi, Thanh Quang Dang-Nguyen, Bui Xuan Nguyen, Noboru Manabe, Takashi Nagai. Effects of cysteine during *in vitro* maturation of porcine oocytes under low oxygen tension on their subsequent *in vitro* fertilization and development. The Journal of Reproduction and Development (査読有), 55: 594-598, 2009.
2. Takuo Hojo, Mohamad Omar Al-Zi'abi, Junichi Komiyama, Noboru Manabe, Tomas J Acosta, Kiyoshi Okuda. Expression and localization of cFLIP, an anti-apoptotic factor, in the bovine corpus

- luteum. The Journal of Reproduction and Development (査読有), 56:230-235, 2010.
3. Miki Sugimoto, Noriko Kagawa, Maki Morita, Shin-Ichi Kume, Kannika Wongpanit, Hua-Zi Ji, Noboru Manabe. Changes in the expression of decoy receptor 3 (DcR3) in granulosa cells during atresia in porcine ovaries. The Journal of Reproduction and Development (査読有), 56: 467-474, 2010.
 4. Fuko Matsuda, Naoko Inoue, Akihisa Maeda, Yuan Cheng, Takafumi Sai, Hiroshi Gonda, Yasufumi Goto, Kazuhiro Sakamaki, Noboru Manabe. Expression and function of apoptosis initiator FOXO3 in granulosa cells during follicular atresia in pig ovaries. The Journal of Reproduction and Development (査読有), 57: 151-158, 2011.
 5. Naoko Inoue, Fuko Matsuda, Yasufumi Goto, Noboru Manabe. The role of cell-death ligand-receptor system of granulosa cells in selective follicular atresia in porcine ovary. The Journal of Reproduction and Development (査読有), 57: 169-175, 2011.
 6. Shoma Nakagawa, Naoki Maedomari, Kazuhiro Kikuchi, Takashi Nagai, Takashi Miyano, Josef Fulka Jr., Noboru Manabe. Rescue of vitrified fully grown and growing porcine oocytes by germinal vesicle transfer. The Journal of Reproduction and Development (査読有), 57: 335-341, 2011.
 7. Takafumi Sai, Yasufumi Goto, Ryosuke Yoshioka, Akihisa Maeda, Fuko Matsuda, Miki Sugimoto, Kannika Wongpanit, Hua-Zi Jin, Jun-You Li, Noboru Manabe. Bid and Bax are involved in granulosa cell apoptosis during follicular atresia in porcine ovaries. The Journal of Reproduction and Development (査読有), 57: 421-427, 2011.
 8. Nguyễn Việt Linh, Kazuhiro Kikuchi, Michiko Nakai, Junko Noguchi, Hiroyuki Kaneko, Thanh Quang Dang-Nguyen, Naoki Maedomari, Bui Xuan Nguyen, Takashi Nagai, Noboru Manabe. Improvement of porcine oocytes with low developmental ability after fusion of cytoplasmic fragments prepared by serial centrifugation. The Journal of Reproduction and Development (査読有), 57: 620-626, 2011.
 9. Fuko Matsuda, Naoko Inoue, Noboru Manabe, Satoshi Ohkura. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. Journal of Reproduction and Development (査読有), 58 (1): 44-50, 2012.
 10. Takafumi Sai, Fuko Matsuda, Yasufumi Goto, Akihisa Maeda, Miki Sugimoto, Hong-Mei Gao, Abul Khair Mohammad Ahan Kabir, Jun-You Li, Noboru Manabe. Effect of RNA interference of Bid and Bax mRNAs on apoptosis in granulosa cell-derived KGN cells. Journal of Reproduction and Development (査読有), 58 (1): 112-116, 2012.
 11. 松田二子, 眞鍋昇. 抗アポトーシス因子 cellular FLICE-inhibitory protein (cFLIP)による哺乳類の卵胞選抜制御機構. 比較内分泌学 (査読有), 38 (144): 27-32, 2012.
- [学会発表] (総計 60 件)
1. Noboru Manabe. Role of prion homo-knockout cattle on prevention of spontaneous bovine spongiform encephalopathy. DASAN (Korean Federation of Science and Technology Societies: KOFST) Conference (招待講演), 2009年11月19日, Jeju, Korea
 2. Noboru Manabe. Characteristics of prion, bovine spongiform encephalopathy pathogen, gene knockout cows. Joint Conference of Chinese, Japanese and Korean Societies of Animal Reproduction (招待講演), 2010年8月17日, Tianjin, China
 3. Noboru Manabe. XIAP, an apoptosis inhibitor, regulates apoptosis induction granulosa cells during follicular atresia in porcine ovaries. The 14th Annual Conference of European Society of Domestic Animal Reproduction (招待講演), 2010年9月18日, Eger, Hungary
 4. Noboru Manabe. Characteristics of prion, bovine spongiform encephalopathy pathogen, homo-knockout cow. Czech-Japan Joint Symposium for Animal Reproduction from Gametes to Stem Cells (招待講演), 2010年9月21日, Liblice Castle, Czech
 5. 黄体における tumor necrosis factor alpha 関連因子の発現解析. 第103回日本繁殖学会, 2010年9月3日, 十和田 (北里大学)
 6. 眞鍋昇. 家畜防疫体制の再点検: 昨年の口蹄疫対策の検証を踏まえて. 茨城県畜産研究会 (招待講演), 2011年6月14日, 石岡 (茨城大学)

7. 眞鍋昇, 才貴史, 松田二子, 井上直子, 小野山一郎, 東福望, 後藤康文. Bid と Bax はブタ顆粒層細胞アポトーシスに関与しており, 発現を阻害するとアポトーシス率が低下する. 第104回日本繁殖学会, 2011年9月16日, 盛岡(岩手大学)
8. Noboru Manabe, Takafumi Sai, Fuku Matsuda, Naoko Inoue, Yasufumi Goto, Ichiro Onoyama, Jun-You Li. Bid and Bax are involved in follicular granulosa cell apoptosis and suppression of their expression by small interfering RNA decreases in apoptotic rate in sows. The 2nd World Congress on Reproductive Biology, 2011年10月10日, Cairns, Australia
9. Noboru Manabe, József Rátky, Keiichi Sezaki, Yasufumi Goto, Ichiro Onoyama, Jun-You Li. High expression of Bid, which is a key molecule controlling the selection of oocyte and follicle and is involved in granulosa cell apoptosis, is characteristics in Mangalica ovaries. Fatty Pig - Science and Utilization International Conference (招待講演), 2011年11月17日, Budapest, Hungary
10. 眞鍋昇, 才貴史, 松田二子, 小野山一郎, 東福望, 後藤康文, A. K. M. A. KABIR, 高紅梅, 李俊佑. ブタ顆粒層細胞のBidとBax発現を阻害するとアポトーシス率が低下する. 第153回日本獣医学会, 2012年3月28日, 大宮(感染症研究所)

[図書] (計7件)

1. 眞鍋昇, CMC出版、食の安全科学の展開：食のリスク予測と制御にむけて・プリオン遺伝子ホモノックアウト牛の作出と有用性、2010、287
2. 眞鍋昇, チクサン出版、カラーアトラス 獣医解剖学・増補改訂版(上巻・下巻)、2010、837
3. 眞鍋昇, 学窓社、獣医発生学・細胞の分裂, 成長および分化、2010、392
4. 眞鍋昇, 木村順平, 大塚沙織, 学窓社、獣医組織学第5版・第14章雌性生殖器官、2011、361
5. 眞鍋昇, 他、岩波書店、生物学辞典第5版、2011、2、837
6. 眞鍋昇, 学窓社、新動物生殖学、2011、216
7. 眞鍋昇, 松田二子、京都大学出版会、卵子学・第4章顆粒層細胞アポトーシスの分子機構、2011、1、195

[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