

## 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25年5月10日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780250

研究課題名（和文） 紡錘体の形態的評価による高い受精能・発生能をもつ体外成熟卵子の選抜法の確立

研究課題名（英文） Establishment of the method of selecting in vitro matured oocyte with high developmental competence by morphological evaluation of metaphase spindle.

研究代表者

星野 由美（HOSHINO YUMI）

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：10451551

研究成果の概要（和文）：哺乳動物の卵子は、体外で培養し操作することが可能になっているが、効率的に発生能力の高い胚を生産し、個体作出に繋げるためには、質の高い成熟卵子を選別して利用する必要がある。本研究では、成熟卵子の紡錘体に着目し、質の高い卵子の特徴を明らかにした。さらに、これに関わる因子を同定し、分子レベルでの解析結果に基づいて、卵子の質の評価につながる指標を確立した。

研究成果の概要（英文）： It is important to identify reliable indicators of oocyte quality for efficient embryo production and infertility treatment. Determination of oocyte quality by morphological assessment is a relatively popular method because it is noninvasive and convenient. In this study, the feature of the high quality oocyte was clarified based on the meiotic spindle of a mature oocyte. Furthermore, the factor in connection with this was identified and the index which leads to evaluation of the quality of an oocyte was established based on the result in a molecular level.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用動物科学

キーワード：マウス、卵子、体外成熟培養、卵子の質評価、受精能・発生能、紡錘体

## 1. 研究開始当初の背景

未成熟卵子の体外培養技術は、高い受精能や発生能を持つ質の高い成熟卵を大量に確保することを必要とする家畜改良・増産技術、さらには体細胞クローン動物の研究に重要かつ必要不可欠な技術となっている。しかしながら、実際に体外成熟培養で得られた成熟

卵は高い成熟率を示すものの、体内で成熟した卵子と比較して受精率・発生率が極めて低く、満足な成績が得られていないのが現状である。現在、この問題に対して、体外成熟培養の質に問題があると考えられているが、家畜のみならず哺乳動物の卵成熟機構の詳細は未だ解明されていないため、根本的な改良

は行われていない。すなわち、哺乳動物の卵成熟機構が明らかになれば、卵成熟を人為的に制御することが可能となり、より質の高い成熟卵を安定して作出するための体外培養系を構築することができる。また、体外成熟培養で得られた卵子の質を、染色を施すことなく評価し、大量に得られた卵子からより受精能・発生能の高い卵子を選抜し、体外受精や体細胞核移植などに利用することが出来れば、発生率の向上、さらには体外培養技術の向上に大きく貢献できる。申請者のこれまでの研究成果から、Akt が紡錘体の形成・維持に不可欠であり、他の関連因子との相互作用により紡錘体形成・維持を制御していると考えられる。紡錘体やそれを束ねる中心小体は、染色体の整列や分裂を制御する重要な細胞小器官であるが、体内成熟卵子と体外成熟卵子の紡錘体の形態を比較すると両者で異なる。すなわち、体外成熟卵子の紡錘体は大きく、紡錘体極の長さも異なる。これらのことから、受精能・発生能の高い卵子の紡錘体の形態を明確化し、成熟能の評価に適用することが出来れば、質の高い卵子の選抜と体外培養技術の向上に貢献するものと考えられる。

## 2. 研究の目的

体外培養技術の改良により、体外成熟培養で受精・発生可能な多くの成熟卵子を得ることが可能となった。しかしながら、得られた多くの卵子の中から質の高い卵子を確実に、かつ効率的に選抜する必要性が高まっている。これまででは、得られた卵子の成熟度合いを核相で判定してきたが核相のみの所見では卵子の受精能やその後の発生能を判定することは難しい。本研究では申請者のこれまでの研究成果を基に、成熟卵子の受精能・発生能を紡錘体の形態の評価により行い、多数の成熟卵子の中からより質の高い卵子を迅速でかつ効率的に選抜するシステムを確立し、体外培養技術のさらなる向上を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究は、以下の5項目で遂行した。

(1) マウスの体内成熟卵子の紡錘体の形態的特徴の解析：受精能・発生能の高い成熟卵子として、体内成熟卵子の紡錘体の形態をプロファイリングした。この際、極体放出後の紡錘体の形態的变化を継続的に観察した。次に紡錘体の形態に大きく影響する中心小体周辺物質(PCM)の位置と距離を測定した。γチューブリン抗体またはPCM抗体を用いた免疫蛍光染色後、共焦点レーザー顕微鏡を用いてPCMの2点の距離を測定した。

(2) 卵成熟過程における紡錘体形成・維持の分子メカニズムの解析：紡錘体形成・維持に関わると考えられる因子の局在を調べ、培養条件の違いによる局在への影響を調べた。この結果を基に、紡錘体形成・維持の分子メカニズムを解析した。減数分裂過程にある卵子の紡錘体形成メカニズムは体細胞のそれと異なることから、体細胞との違いについても明確化し、卵子の紡錘体形成・維持の特徴を明らかにした。

(3) 体外成熟卵子の紡錘体を体内成熟卵子に近づけるための適切な培養条件の選定：自発的成熟卵子と卵胞刺激ホルモン(FSH)や自発的成熟を抑制するヒポキサンチンを含む培地で成熟させた卵子で紡錘体形態を比較した。異なる成熟条件で卵子を培養し、成熟率や受精・発生率を比較した。ヒポキサンチンは卵子の自発的な成熟を抑制させるが、FSHと共に添加した場合の紡錘体形成・維持への影響を解析した。染色体の整列や異常の有無についても継続的に観察した。

(4) 成熟過程における紡錘体形成・維持の分子メカニズムの解析：Akt や mTOR、MAPキナーゼなどに着目して、紡錘体形成メカニズムを解析した。また、紡錘体の形態を調節する微小管安定性・不安定性に関わる因子についても解析した。

(5) 成熟卵子の紡錘体形態の迅速な評価と受精能・発生能の高い卵子の選抜システムの確立：受精・発生能の高い卵子の紡錘体の形態的特徴を明らかにし、それに基づいた卵子の質の評価を倒立顕微鏡下で実現化させることを試みた。

## 4. 研究成果

(1) 培養条件の違いにより紡錘体の形態が異なることを明らかにした。すなわち、FSHとヒポキサンチンを含むゴナドトロピン成熟培養では紡錘体面積が小さく体内成熟卵子に近い形態であったが、自発的成熟培養では大きな紡錘体が形成された。基礎培地の違いによる影響を調べたところ、HTF 培地よりもWaymouth's 培地を用いた場合で体内成熟に近い形態の紡錘体が観察された。

(2) 体内および体外成熟卵子の紡錘体形態を経時的に観察したところ、中心小体周辺物質(PCM)の2点の局在に特徴的な変化が見られた。すなわち、PCMの2点間の距離は極体放出直後は離れていたが(phase I)、時間の経過に伴いその2点が寄り(phase II)、再び離れる(phase III)という変化が観察

された。これらの卵子を体外受精に供したところ、PCMの2点が寄るポイントで卵子の受精・発生能が高まることが明らかとなった。この結果は、IntegrinのmRNA発現と一致した。体外成熟では、18時間のゴナドトロピン成熟培養がこの形態に近かった。

以上の結果から、PCM2点が近接するタイミング(phase II)が培養条件の違いに関わらず、受精能力が高く、この状態の卵子を選抜することがシステムの確立の鍵になることが示された。これまでに、この点について指摘した報告はなく、受精・発生能力の高い卵子の形態的特徴を明確に出来たことは大きな成果であると言える。

(3) 1、2で挙げた結果がどのようなメカニズムによって調節されているのかを調べるために、PCMの構成タンパク質であるPericentrinを用いて、卵細胞質中の微小管形成中心(MTOC)の局在と活性レベルを調べた。Phase IにおいてMTOCは細胞質に均一に散在しているが、phase IIでは細胞質中にクラスターを形成し、蛍光輝度が高まることを確認している。このことは、phase IIにおいてMTOCが活性化されていることを示すものである。

(4) 紡錘体の形態は微小管の重合と関係するのではないかと仮説を立て、微小管の安定化・不安定化に関わるタンパク質の発現を解析した。安定化に関与するタンパク質としては、CLIP-170(微小管形成促進因子)を不安定化に関わるタンパク質としてMCAK(微小管抑制因子)を選択した。CLIP-170はphase Iで紡錘体上に局在せず、phase IIで強い局在が観察されたが、phase IIIでは再び発現が低下した。MCAKの局在は、これとは逆の傾向を示した。すなわち、受精・発生能が高まるphase IIでは微小管が安定して重合が促進されるが、受精・発生能が低いphase I、IIIでは微小管の脱重合が促進されることが明らかとなった。以上の結果から、卵子の質と紡錘体の形態には相関があり、これは微小管形成能力に深く関わっていることが明らかとなった。

ここまでの結果より、受精・発生能力の高い卵子では、紡錘体極のPCM2点が近接する特徴をもち、微小管形成能力が高く、MTOCの活性が高いことが明らかとなった。成熟卵子が受精すると第二極体の放出が起こり、減数分裂が完了する。その際、染色体が正常に分配されることが必須であるため、微小管が十分束ねられていることが精子侵入前に必要であることが示された。受精適期に精子侵入

が起こらなければ、染色体の不分離にも繋がるため、受精適期を正確に判定することが必要である。本研究の成果は、受精適期判定にも大きく貢献するものである。

(5) 紡錘体の形態維持に関わるタンパク質を調べたところ、AktとmTORおよびその結合タンパク質であるRaptorが紡錘体上で共局在し機能していることが明らかになった。Aktを阻害すると紡錘体の機能維持に影響を与え、受精後の第二極体放出を阻害したことから、受精・発生能の高い卵子でみられる紡錘体形態の維持には、AktやmTORが積極的に関与しており、これらの因子が卵子の質(受精・発生能力)を判定する一つの指標になり得ると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

- ① Yuhei KOGASAKA, Yumi HOSHINO, Yuki HIRADATE, Kentaro TANEMURA, Eimei SATO, Distribution and association of mTOR with its cofactors, raptor and rictor, in cumulus cells and oocytes during meiotic maturation in mice, Molecular Reproduction and Development, 査読有, Vol.80, No.4, 2013, 334-348.  
DOI: 10.1002/mrd.22166.
- ② Chizuka SAKAI, Yumi HOSHINO, Yusuke SATO, Eimei SATO, Evaluation of maturation competence of metaphase II oocytes in mice based on the distance between pericentriolar materials of meiotic spindle, Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 査読有, Vol.28, No.1, 2011, 157-166.  
DOI: 10.1007/s10815-010-9496-2.
- ③ Manami NISHIO, Yumi HOSHINO, Eimei SATO, Effect of different culture conditions on mouse oocyte quality in in vitro maturation: droplet size and the number of oocyte examined, Journal of Mammalian Ova Research, 査読有, Vol. 28, No.1, 2011, 53-60.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmor/28/1/28\\_1\\_53/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmor/28/1/28_1_53/_pdf)
- ④ Yumi HOSHINO, Yusuke SATO, Chizuka SAKAI, Eimei SATO, The signal transduction of meiotic progression in mammalian oocyte, Journal of Mammalian Ova Research, 査読有, Vol. 27, No.1, 2010, 21-26.

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmor/27/1/27\\_1\\_21/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmor/27/1/27_1_21/_pdf)

- ⑤ 星野由美、佐藤優介、坂井知津香、佐藤英明、卵成熟における紡錘体形成と染色体分配の分子メカニズム、Journal of Clinical Embryologist、査読有、12巻、2010年、1-7。  
<http://embryologist.jp/special/?id=6356>

[学会発表] (計9件)

- ① 星野由美、卵成熟機構からみたARTに利用できる基礎研究、第31回日本受精着床学会総会・学術講演会、2013年8月8日、大分。
- ② 小賀坂祐平、星野由美、種村健太郎、佐藤英明、マウス卵丘細胞・卵母細胞におけるmTORおよびその複合体構成因子raptor, rictorの局在解析、第54回日本卵子学会、2013年5月25日、東京。
- ③ 星野由美、坂井知津香、佐藤英明、微小管形成能力による成熟卵子のクオリティ評価、第104回日本繁殖生物学会、2011年9月17日、岩手。
- ④ 星野由美、卵子の成熟と胚の品質評価：卵成熟メカニズムに基づいた成熟卵子のクオリティ評価、第29回日本受精着床学会総会・学術講演会、2011年9月9日、東京。
- ⑤ Yumi HOSHINO, Key molecules active during oocyte maturation responsible for oocyte quality, FertiLink 2010 Key Issue Facing Fertility Specialists in Asia, 2010年10月16日、京都。
- ⑥ 星野由美、佐藤優介、坂井知津香、佐藤英明、IVMの現状と将来：IVM卵子の成熟機構、第28回日本受精着床学会総会・学術集会、2010年7月29日、横浜。
- ⑦ Yumi HOSHINO, Yusuke SATO, Chizuka SAKAI, Eimei SATO, Inhibition of mTOR induces cumulus expansion and meiotic maturation in mouse oocytes without gonadotropin stimulation, The Society for Reproduction and Fertility Annual Conference 2010, 2010年7月11日、英国 ノッティンガム。
- ⑧ 星野由美、卵成熟における紡錘体形成と染色体分配の分子メカニズム、日本臨床エンブリオロジスト学会、2010年1月10日、東京。
- ⑨ Yumi HOSHINO, Functional role of Akt and mTOR in meiotic resumption and completion, International Ovarian Conference 2009, 2009年12月5日、東京。

[図書] (計1件)

- ① 星野由美 (鈴木秋悦 編)、医歯薬学出版株式会社、カラーアトラス 不妊治療のための卵子学、2010年、22-27。

[その他]

ホームページ等

<http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/48ad67dd1a6fbaa690afc373471de193.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

星野 由美 (HOSHINO YUMI)  
東北大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：10451551

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：