

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580397

研究課題名(和文)ブタ発育途上卵母細胞から産子を作成する培養系の構築

研究課題名(英文)In vitro growth of porcine growing oocytes

研究代表者

橋本 周 (HASHIMOTO, Shu)

近畿大学・生物理工学部・研究員

研究者番号：30570949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ブタ発育途上卵母細胞の体外培養によるミトコンドリア活性の低下を防ぐため、アポトーシス抑制、ミトコンドリアへの長鎖脂肪酸の取込促進、ベータ酸化によるATP合成の促進効果を有するカルニチンによるブタ発育途上卵母細胞の発育能の改善に取り組んだ。L-カルニチンを添加することにより、ブタ発育途上卵母細胞の生存性が向上し、超微小レベルでの形態観察により、活性型ミトコンドリアの存在を確認した。さらに、顆粒膜細胞に取り込まれたカルセインが卵母細胞に移行することを確認した。ブタ体外受精で多発する多精子受精を回避するため、体外培養により発育した卵母細胞への顕微授精に成功した。

研究成果の概要(英文)：We have focused attention on the mitochondrial activity of in vitro grown (IVG) oocytes and shown that L-Carnitine, which acts as a carrier of fatty acids across the inner mitochondrial membrane for subsequent beta-oxidation, supported the viability of growing oocytes. Moreover, we have successfully obtained fertilized ova by ICSI which developed from growing oocytes in vitro.

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：発生工学 生殖工学 生殖医療 卵母細胞

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の配偶子ならびに胚を取り扱う生殖工学技術あるいは生殖医療において、十分に発育し、受精可能で、発生能力のある卵子を得ることは必須条件となる。ヒトやブタの場合、卵母細胞の直径が115マイクロメートルに満たない発育途上の卵母細胞は受精可能な成熟卵子まで細胞周期を進めることが難しく、現在の生殖医療技術では115マイクロメートルに満たない発育途上卵母細胞から児を得ることは困難である。それ故、体外でヒト発育途上卵母細胞を培養することができれば、生殖医療におけるコスト、時間の削減ならびに患者に及ぼす副作用の低減につながるだけでなく、現在の技術では児を得ることができない患者にも児を得る道を開く。そこで、生殖医療への応用ならびに効率的な家畜生産と改良を目指して、特に、体外培養によるミトコンドリア活性の低下を防ぐため、アポトーシス抑制、ミトコンドリアへの長鎖脂肪酸の取込促進、ベータ酸化によるATP合成の促進効果を有するカルニチンによるブタ発育途上卵母細胞の発育能の改善に取り組んだ。

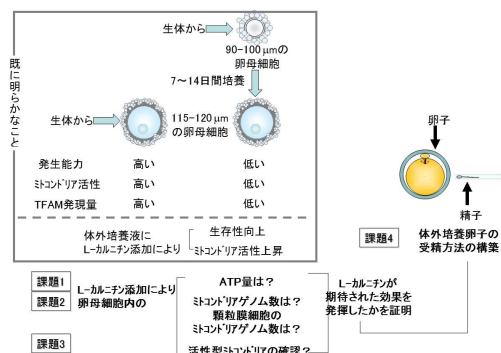
### 2. 研究の目的

細胞内の脂肪酸代謝の促進(図)によるエネルギー生産に加えて、ミトコンドリア非依存性のアポトーシス経路に關与するカスパーゼ活性の抑制や、神経細胞の生存性の調節に關与するTrkBレセプターの発現を促進するなど新たな生物活性が示されてきているL-カルニチンにより、体外発育培養卵母細胞の生存性の向上を目的として本研究を企画した。

### 3. 研究の方法

本研究は図のとおり、

- (1)L-カルニチンを添加して培養した卵母細胞内のATP量の測定
- (2)L-カルニチンを添加して培養した卵母細胞と顆粒膜細胞のミトコンドリアDNAコピー数の測定
- (3)L-カルニチンを添加して培養した卵母細胞の超微小レベルでの形態観察により活性型ミトコンドリアの有無を検討
- (4)体外培養により得られた卵母細胞の体外受精系の構築の4項目(課題)を行った。



### 4. 研究成果

本研究により得られた成果は下記のとおり、  
 (1)L-カルニチンを添加して培養した卵母細胞内のATP量が増加することを明らかにした。  
 (2)L-カルニチンを添加して培養した顆粒膜のアポトーシスが抑制され、顆粒膜細胞が機能的なギャップ結合を有していることを明らかにした。  
 (3)L-カルニチンを添加して培養した卵母細胞の超微小レベルでの形態観察により活性型ミトコンドリアが存在することを確認した。  
 (4)体外培養により得られた卵母細胞より受精卵を獲得した。

### 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 12件)

Maezawa T, Yamanaka M, Hashimoto S, Amo A, Ohgaki A, Nakaoka Y, Fukuda A, Ikeda T, Inoue M, Morimoto Y. Possible selection of viable human blastocysts after vitrification by monitoring morphological changes. J Assist Reprod Genet, 査読有 in press, 2014 DOI: 10.1007/s10815-014-0260-x

Larman MG, Hashimoto S, Morimoto Y, Gardner DK. Cryopreservation in ART and concerns with contamination during cryobanking. Reprod Med Biol 査読有 in press, 2014.

DOI:10.1007/s12522-014-0176-2

Nishihara T, Hashimoto S, Ito K, Nakaoka Y, Matsumoto K, Hosoi Y, Morimoto Y. Oral melatonin supplementation improves oocyte and embryo quality in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. Gynecological Endocrinology. 査読有 2014; DOI:10.3109/09513590.2013.879

Hashimoto S, Amo A, Hama S, Ohsumi K, Nakaoka Y, Morimoto Y. A closed system supports the developmental competence of human embryos after vitrification. J Assist Reprod Genet 査読有 30:371-376, 2013.

DOI 10.1007/s10815-012-9928-2.

Hashimoto S, Amo A, Hama S, Ito K, Nakaoka Y, Morimoto Y. Growth retardation in human blastocysts increases the incidence of abnormal spindles and decreases implantation potential after vitrification. Hum Reprod 査読有 28: 1528-1535, 2013; doi: 10.1093/humrep/det059

Hashimoto S, Suzuki N, Amo A, Yamochi T, Hosoi Y, Morimoto Y. Good thermally conducting material supports follicle

morphologies of porcine ovaries cryopreserved with ultrarapid vitrification. J Reprod Dev 査読有 59: 496-499, 2013.

Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, Ho CH, Kawamura N, Tamura M, Hashimoto S, Sugishita Y, Morimoto Y, Hosoi Y, Yoshioka N, Ishizuka B, Hsueh AJ. Hippo Signaling Disruption and Akt Stimulation of Ovarian Follicles for Infertility. Proc Nat Acad Sci USA 査読有 110: 17474-17479, 2013.

doi:10.1073/pnas.1312830110

Miyamoto Y, Teramura T, Izumi H, Hashigami Y, Hashimoto S, Fukuda K, Morimoto Y, Hosoi Y. Cysteamine Supplementation During In Vitro Maturation (IVM) of Rabbit Oocyte Improves the Developmental Capacity after Intracytoplasmic Sperm Injection. Reprod Med Biol 査読有 2013; 12: 179-185.

DOI 10.1007/s12522-013-0157-x

Hashimoto S, Kato N, Saeki K, Morimoto Y. Selection of high potential embryos by culture in poly-(dimethylsiloxane) microwells and time-lapse imaging. Fertil Steril 査読有 97:332-337, 2012. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.11.042 Suzuki N, Hashimoto S, Igarashi S, Takae S, Yamanaka M, Yamochi T, Takenoshita M, Hosoi Y, Morimoto Y, Ishizuka B. Assessment of long term function of heterotopic transplants of vitrified ovarian tissue in cynomolgus monkeys. Hum Reprod 査読有 27: 2420-2429, 2012.

doi:10.1093/humrep/des178

鈴木 直、吉岡伸人、杉下陽堂、高江正道、洞下由記、五十嵐 豪、橋本 周、森本義晴、石塚文平 がん・生殖医療の実践に基づいた化学療法後の妊孕性温存の可能性について 癌と化学療法, 査読無, 39:151-157, 2012.

Yamanaka M, Hashimoto S, Amo A, Ito-Sasaki T, Abe H, Morimoto Y. Developmental assessment of human vitrified-warmed blastocysts based on oxygen consumption. Hum Reprod 査読有 26:3366-3371, 2011,

doi:10.1093/humrep/der324.

〔学会発表〕(計 6 件)

橋本 周、山縣一夫、森本義晴 ヒト発育遅延胚の発育経過のイメージング：紡錘体形成異常の増加と着床能の低下 第31回日本受精着床学会総会・学術講演会、2013年8月8日～9日、別府国際コンベンションセンター（大分県別府市）

橋本 周、天羽杏実、濱 聡子、伊藤啓二郎、中岡義晴、森本義晴 ヒト発育遅延胚では紡錘体形成異常が増加し、着床能が低下した 第31回日本受精着床学会総会・学術講演会、2013年8月8日～9日、別府国際コンベンションセンター（大分県別府市）

橋本 周、加藤暢宏、佐伯和弘、森本義晴 ヒト胚個別培養系の構築と経時的な形態変化を取り入れた胚の発育能力の予測に関して 第30回日本受精着床学会総会・学術講演会、2012年8月30日～31日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）ヒト初期胚発育過程における染色体挙動変化の可視化 橋本 周、中岡義晴、天羽杏実、中野達也、山縣一夫、森本義晴 第30回日本受精着床学会総会・学術講演会、2012年8月30日～31日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）

Hashimoto S, Nakaoka Y, Amo A, Nakano T, Yamagata K, Morimoto Y. Live cell imaging reveals human chromosome dynamics during embryo development. The 28th Annual Meeting of ESHRE, 2012年7月1日から4日、Istanbul Congress Center（トルコ、イスタンブール）

Hashimoto S. Development estimation of human frozen-thawed blastocysts based on their oxygen consumption. The 4th Japan-Korea ART Conference 2012, 2012年3月24日、大阪大学中之島センター（大阪府大阪市）

〔図書〕(計 3 件)

橋本 周、鈴木 直、森本義晴 卵巣組織の超急速凍結法 医歯薬出版株式会社 卵巣組織凍結・移植 新しい妊孕性温存療法の実践 2013年発行 37-45.

杉下陽堂、橋本 周、星名真理子、川越雄太、吉岡伸人、高江正道、洞下由記、五十嵐 豪、津田千春、矢持隆之、竹之下 誠、細井美彦、河村和弘、森本義晴、鈴木 直 卵巣組織のガラス化保存法：Cryo Support (Cryo Kit Type M) 医歯薬出版株式会社 卵巣組織凍結・移植 新しい妊孕性温存療法の実践 2013年発行 46-59.

橋本 周、鈴木 直、河村和弘、杉下陽堂、森本義晴 卵巣組織凍結 医歯薬出版株式会社 がん・生殖医療：妊孕性温存の診療 2013年発行 166-175.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 周 (HASHIMOTO, Shu)  
近畿大学・生物理工学部・研究員  
研究者番号：30570949

(2) 研究分担者

細井 美彦 (HOSOI, Yoshihiko)  
近畿大学・生物理工学部・教授  
研究者番号：70192739

(3) 連携研究者

なし