

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658231

研究課題名(和文) アポトーシス阻害因子遺伝子導入と異種移植による卵巣内潜在的卵母細胞の救命法の創出

研究課題名(英文) Rescue of potential oocytes in livestock ovaries by artificial control of apoptosis inhibitor

研究代表者

眞鍋 昇 (MANABE, Noboru)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：80243070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：食肉処理場では優れた形質の雌家畜の卵母細胞が無為に廃棄され続けている。本研究によって卵子の品質を評価し、それを調節している細胞死阻害因子を人的に制御することで卵胞とその中の卵子を救命する手法の開発がすすめられ、無為に廃棄されている卵子(卵巣内潜在的卵子)の有効利用の路が開かれてきて、雌家畜側からの高効率の育種改良が期待される。加えて家畜のみならず担癌患者の卵母細胞を救命できる基盤的技術が整ってきており、この成果は農学や医学等の広領域で社会に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Many primordial follicles in livestock ovaries are discarded without being effectively used in the slaughterhouse. The aim of my study is to save the oocytes with excellent genetic traits in the ovaries, which are discarded without being effectively used. Less than 1% of primordial follicles are ovulated, and the remainders are eliminated via atresia. The precise mechanisms involved in the regulation of follicle selection remain unknown. Recent my studies suggest that apoptosis in follicular granulosa cells plays a crucial role in the oocyte selection. Cell death ligand and receptor systems are the key mechanisms regulating granulosa cell apoptosis. I revealed the roles of intracellular apoptosis inhibitory factors (cFLIP, XIAP, DcR3 etc.), which are useful to assess the damaged and/or healthy oocytes and save the oocyte including the follicle. Then, I have developed a method to save the oocyte with the help of these inhibitors.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：アポトーシス アポトーシス阻害因子 卵巣内潜在的卵母細胞 家畜卵巣 卵胞 顆粒層細胞 細胞死  
リガンド・受容体系 カスパーゼ系

### 1. 研究開始当初の背景

20世紀前半に体細胞核移植によるクローン動物の作出が両棲類で成功したが、哺乳類では長い間成功しなかった。それが21世紀になってから成功し、様々な哺乳類の様々な体細胞やES細胞の核に由来する体細胞核クローン動物が作出されるようになってきている。しかしながら、このように体細胞核クローン動物の作出が可能となってきたとはいえ、雌の形質は核内の遺伝子のみならずミトコンドリアDNAにも大きく支配されており、優れた雌の遺伝形質の保全のためには卵母細胞(卵子)の保存は未だに避けてはとれない大きな研究課題である。

### 2. 研究の目的

家畜の卵子は、胎児期に体細胞分裂によって増殖した後、卵胞上皮細胞(顆粒層細胞)に包まれた卵胞内で減数分裂を開始して副糸期で休眠し、出産した後性成熟を迎えると減数分裂を再開して発育・成熟する。この発育・成熟の過程で99%以上が選択的に死滅されてしまうことで不都合な卵子が取り除かれる。申請者は、20年以上にわたってこれを調節している分子機構を解明するための研究を遂行してきた。その結果、排卵に至る健全な卵胞と閉鎖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いくつか挙げるまでになってきた。

これまでの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、卵胞に内包される高品質の卵子を積極的に救命して動物発生工学や生殖医療に供する技術システムを開発することが本研究の目的である。このことは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。

### 3. 研究の方法

(1) 卵胞の閉鎖に支配的に関与している顆粒層細胞における重要なアポトーシス阻害因子であるcellular FLICE-like inhibitory protein(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。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が急速に消滅して卵胞閉鎖が誘導される。このcFLIPのmRNAをup-あるいはdown regulateする因子の探索を、様々な顆粒層細胞の特性を保持しながら不死化したブタ顆粒層細胞JC-410を用いてすすめた。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、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、プロスタグランジン類、血管新生因子類、一酸化窒素などを添加して培養し、これらのなかからの候補の絞込を進めた。

(2) 細胞内のアポトーシス・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て探索をすすめた。cFLIPにはスプライシングバリエーションとしてcFLIP-1とcFLIP-sが存在するが、スプライシングの過程がどのように調節を受けてこれら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'-側の転写開始コドン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た。

(3) 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。この凍結保存した卵巣組織を融解後、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。

### 4. 研究成果

(1) ブタやウシなどの完全性周期動物である家畜の卵胞顆粒層細胞では、多くの基盤的研究に供されている不完全性周期動物のマウスなどとは異なって、腫瘍壊死因子(TNF) $\alpha$ が細胞死滅因子としてではなくて増殖生存因子として働いていることを見いだした。その理由は、家畜の顆粒層細胞においては、アポトーシスを誘導するTNF1型受容体と異なり、細胞増殖を誘導するTNF2型受容体のみが発現していることに起因することにも分かった。さらにJC-410細胞を用いた実験では、TNF $\alpha$ がcFLIPの発現をup regulateすることも分かった。興味深いことに、TNF $\alpha$ の発現は、JC-410細胞でも食肉処理場で採材した経産豚卵巣から調製した初代培養顆粒層細胞でも重要なサイトカインのひとつであるインターロイキン(IL)6によってup regulateされていること等を見出した。

(2) 予備的ではあるが、転写因子であるFOXO3aなどが制御していると思われる成績を得た。さらに、上述のようにIL6-TNF $\alpha$ 軸が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探索をすすめている。

(3) 凍結融解した卵巣細片をSCID)マウス腎漿膜下に移植して2週間生体内で培養することで卵胞腔をもつ3次卵胞にまで発育させることができたことを確認した。

2週間生体内で培養した後、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成と受精能を評価した。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、発生成が正常か否か評価している。

このように、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行った。阻害因子 cFLIP 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において日々廃棄され続けている卵巣内卵子（潜在的卵巣内卵子）の救命に役立つと考えられた。

申請者のこれまでの研究から、顆粒層細胞の生死を支配しているアポトーシス・シグナル阻害因子には、活性化した細胞死受容体の直下で FADD と結合してカスパーゼ 8 前駆体との結合することを阻害している cFLIP の他に、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) が発現していることを見いだしている。本研究では主に cFLIP についての見識を深めたが、XIAP については不十分なままで終わってしまった。今後は XIAP などの他のアポトーシス・シグナル阻害因子の制御機構の理解を深めて、卵母細胞救命に一層有効に活用できるようにしていくことが肝要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 33 件)

- ① Suzuki C (5名5番目). Expressions of tumor necrosis factor- $\alpha$ , its receptor I, II and receptor-associated factor 2 in the porcine corpus luteum during the estrous cycle and early pregnancy. 査読有 Vet Res Comm, 38: 1-10, 2014.
- ② Tamura K (7名7番目). Gene expression analysis detected low expression level of C1s gene in ICR-derived glomerulonephritis (ICGN) mice. 査読有 Nephron Exp Nephrol, 123: 34-45, 2013.
- ③ Takahashi T (5名5番目). Effect of linolic acid albumin (LAA) on the freezability of bovine spermatozoa. 査読有 Reprod Fertil Dev, 25: 589-599, 2013.
- ④ Matsuda F (4名4番目). Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: Regulation by survival and death of granulosa cells. 査読有 J

Reprod Dev, 58: 44-50, 2012.

- ⑤ Sai T (9名9番目). Effect of RNA interference of Bid and Bax mRNAs on apoptosis in granulosa cell-derived KGN cells. 査読有 J Reprod Dev, 58: 112-116, 2012.
- ⑥ Kominami K (15名15番目). In vivo imaging of hierarchical spatiotemporal activation of caspase-8 during apoptosis. 査読有 PLoS ONE 7 (11): e50218, 2012.
- ⑦ Kominami K (11名11番目). The molecular mechanism of apoptosis upon caspase-8 activation: quantitative experimental validation of a mathematical model. 査読有 Biochim. Biophys. Acta (Mol. Cell Res.) 1823: 1825-1840, 2012.

〔学会発表〕 (計 21 件)

- ① Manabe N. Cutting edge of bovine reproductive technology. 招聘講演. The 2<sup>nd</sup> Symposium of the Thai Society for Animal Reproduction, Bangkok, Thailand, 2014年3月20-21日.
- ② Fukumoto Y, Manabe N et al. Critical role of DcR3 in regulation of granulosa cell apoptosis in pig ovarian follicle. The 3<sup>rd</sup> World Congress of Reproductive Biology, Edinburgh, United Kingdom, 2014年9月2-4日.
- ③ Manabe N et al. Production of prion gene homo-knockout cows to prevent spontaneous bovine spongiform encephalopathy and their characteristics. 招聘講演. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of Society of Physiology and Pathology of Reproduction, Gdańsk, Poland, 2013年2月27-3月1日.
- ④ Manabe N. High expression of Bid in follicular granulosa cells is characteristics in Mangalica ovaries. 招聘講演. The 2<sup>nd</sup> International Conference of Fatty Pigs, Herceghalom, Hungary, 2013年11月22-24日.
- ⑤ Manabe N et al. Roles of decoy receptor 3 in physiological programmed cell death in ovarian follicular granulosa cells. 招聘講演. The 15<sup>th</sup> Asian Animal Science Congress, Bangkok, Thailand, 2012年11月26-27日.
- ⑥ Manabe N et al. Bcl-2 members, Bid and Bax, are involved in granulosa cell apoptosis in sows. The 17<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction, Vancouver, Canada, 2012年7月29-8月2日.

[図書] (計9件)

- ① 眞鍋昇. インターズ社, 生殖細胞と生殖器, 「繁殖生物学」, 日本繁殖生物学会編, 2013, 18-39/313頁.
- ② Manabe N et al. Elsevier Science Publishers 社, Abnormalities of ovarian and testicular function in senescence accelerated mice, 「The Senescence-Accelerated Mouse」, Takeda T eds., 2013, 273-286/580頁.
- ③ Manabe N et al. Springer 社, Changes in the transfer of fallout radiocesium from pasture harvested in Ibaraki Prefecture, Japan, to cow milk two months after the Fukushima Daiichi nuclear power plant accident, 「Agricultural Implications of the Fukushima Nuclear Accident」, Nakanishi T, Tanoi K eds., 2013, 87-95/204頁.

[その他]

<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