

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：25406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780271

研究課題名(和文) プロゲステロン非活性化酵素依存的な優勢卵胞選抜とブタ、ウシの新規IVG法の開発

研究課題名(英文) The exploitation of IVG system based on selection of dominant follicle dependent on progesterone deactivation enzyme.

研究代表者

山下 泰尚 (YAMASHITA, Yasuhisa)

県立広島大学・生命環境学部・准教授

研究者番号：50452545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ブタにおいて卵胞発育時に発現するプロゲステロン(P4)非活性化酵素AKR1C1に注目し、この発現とエストロゲン(E2)合成遺伝子、P4合成遺伝子の発現とE2、P4値を測定し優勢卵胞選抜機構解明とこれに基づくブタ卵の新規培養法の開発を目的とした。この結果、優勢卵胞と退行卵胞ではAKR1C1やE2、P4合成遺伝子の発現が異なる結果、卵胞液中のE2、P4量も異なっていた。さらに、優勢卵胞のE2、P4を基に、退行卵胞由来のCOCも効率的に培養可能なIVG-IVM法を考案した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on progesterone (P4) deactivation enzyme, AKR1C1, which expression had been firstly found in our laboratory during follicular development in pig, and investigated for revealing follicular selection system of dominant follicle by measuring expression pattern of the enzyme and the other gene for estrogen (E2) and P4 synthesis (E2; Cyp19a1, P4; Star, Cyp11a1, Hsd3b1) and concentration of E2 and P4 in follicular fluid. Furthermore, we exploited the novel in vitro development (IVG) and in vitro maturation (IVM) system based on above data.

As the results, we showed that expression pattern of Akr1c1 mRNA and E2/P4 synthesis gene were different between dominant follicle and regression follicle, resulting in differing E2 and P4 concentration in these follicular fluid. In addition, based on E2 and P4 level in dominant follicle, we invented novel IVG-IVM system that can produce blastocyst with high efficiency derived from regression follicle.

研究分野：畜産学・獣医学

科研費の分科・細目：応用動物科学

キーワード：IVG 卵胞発育 優勢卵胞選抜 卵成熟 AKR1C1 プロゲステロン

1. 研究開始当初の背景

ブタやウシでは、未成熟卵を体外培養系により産子を得ることは難しい。マウスと異なりブタやウシでは黄体存在化で卵胞発育が起こり優勢卵胞が選抜されるが、当研究室では黄体存在下のウシおよびブタ卵巣の未成熟卵胞で黄体由来と考えられたプロゲステロンが蓄積することを明らかにしている。未成熟卵胞から採取した顆粒層細胞の初代培養系にプロゲステロンを添加して培養すると増殖が著しく抑制されることから、黄体由来のプロゲステロンを代謝する経路の存在が示唆され、これが卵胞選抜に関与することが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、黄体存在下で卵胞発育が誘導されるウシやブタなどの産業動物に特異的に存在すると考えられるプロゲステロン代謝機構の存在を明らかにすることを目的に研究を行った。さらに、卵胞発育期の顆粒層細胞に発現するエストロゲン合成遺伝子とその代謝酵素遺伝子、プロゲステロン合成遺伝子および卵胞液のエストロゲン量、プロゲステロン量を測定し、プロゲステロン代謝酵素の結果と合わせ、卵胞発育期におけるステロイドホルモン環境の変化を詳細に解析することを目的に研究を行った。また、これらステロイドホルモンの変化を考慮した、哺乳動物卵の新規体外培養法の確立を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

180日齢のブタにeCGを投与し72時間後にhCGを投与した。各処理時間の卵巣から顆粒層細胞を回収し、卵巣におけるプロゲステロン代謝酵素遺伝子の発現を調べた。また屠殺場由来のブタ卵巣の未成熟卵胞におけるプロゲステロン代謝酵素が卵胞選抜に関与するかを検討するために、それぞれ3mm以下、4-7mm、8mm以上のサイズに卵胞を分類した。卵胞選抜時に退行する卵胞では卵胞表面に血管新生が無いことが報告されていることから、卵胞表面の血管新生の有無で卵胞をそれぞれ血管新生卵胞 (Angiogenic Follicle ; AF) および非血管新生卵胞 (Non-angiogenic Follicle ; NAF) と分類した。分類した卵胞から顆粒層細胞と卵胞液を回収し、顆粒層細胞におけるエストロゲン合成酵素遺伝子 (*Cyp19a1* mRNA) とエストロゲン代謝酵素 (*Sult1e1* mRNA) の発現と卵胞液におけるエストロゲン濃度、および顆粒層細胞におけるプロゲステロン合成遺伝子群 (*Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1* mRNA) とプロゲステロン代謝酵素 (*Akr1c1* mRNA) の発現と卵胞液におけるプロゲステロン濃度をそれぞれ Realtime RT-PCR 法および ELISA 法により測定した。また4-7mmのAFおよびNAFからCOCを採取し、体外培養後の卵核胞崩壊 (GVBD) 率および第二減数分裂中期 (MII) 率を調べ

た。また、4-7mmの卵胞の組織切片を作成し、HE染色により内景観察とTUNEL法による生死判定を行った。この結果から黄体存在下に卵胞発育が誘導されるブタにおいて、プロゲステロン代謝酵素遺伝子の発現が、優勢卵胞選抜に関与するかを検討した。また、AFおよびNAFの4-7mmの未成熟卵胞からCOCを採取し、AKR1C1とそれ以外のステロイドホルモン合成遺伝子と代謝遺伝子の動態を考慮した体外成熟培養系を考案し培養した。培養後の卵丘細胞における卵胞発育・排卵に関与することが報告されているマーカー遺伝子 (*Ccnd2*, *Areg* mRNA) の発現、卵丘細胞の膨潤、卵丘細胞の生死判定、MII率および新鮮精液を用いた体外受精により作出される胚盤胞期胚率を調べ、プロゲステロン代謝酵素遺伝子により誘導される体内でのステロイドホルモン変化を考慮した体外培養法の開発を行った。

4. 研究成果

eCGおよびhCGを投与したブタ個体の顆粒層細胞における*Akr1c1*の発現は、eCG刺激前では発現量は低値を示したが、eCG投与後この発現量が有意に上昇した。さらにhCG投与後には、この発現が低下し、この値はeCG投与前と同レベルであった。

3mm以下のAFから採取した顆粒層細胞における*Cyp19a1* mRNA発現は低値を示したが、4-7mmで有意に上昇し、その後8mm以上で低下したが、NAFでは4-7mmの上昇が生じず、8mm以上で高値を示した。*Sult1e1* mRNA発現は、AF、NAF共に全ての卵胞サイズで同程度の発現量を示していた。これらの結果と同調して卵胞液中のエストロゲン濃度は、AFでは4-7mmで上昇し、8mm以上までこの濃度を維持していたが、NAFでは8mm以上で濃度上昇が起こり、AFと比較して濃度上昇時期が遅延していた。また、プロゲステロン合成遺伝子の*Star*と*Hsd3b1* mRNAの発現は、AFおよびNAFに関係なく全ての卵胞で同程度の発現量を示した。一方*Cyp11a1* mRNA発現は、AFでは恒常的に発現していたが、NAFでは8mm以上で有意に低下した。*Akr1c1* mRNA発現は、4-7mmのAFにおいて有意に上昇した。これらの遺伝子発現に伴い4-7mmより小さなAFの卵胞液ではプロゲステロン濃度が低く、8mm以上で高値を示していたが、NAFでは、全ての卵胞サイズで低値を示していた。また、HE染色によるAFおよびNAFの内景観察の結果、AFでは顆粒層細胞が重層したものであったのに対し、NAFでは顆粒層細胞が薄い層をなしたものとなっていた。さらにTUNEL法による生死判定の結果、AFでは顆粒層細胞および卵丘細胞において死細胞は検出されなかったが、NAFではほとんどの顆粒層細胞が死細胞となっており、卵丘細胞においても約半数の卵丘細胞が死んでいる状態であった。さらに、4-7mmの卵胞直径のAFおよびNAFからCOCを採取し、既存の培養法により体外培養

したところ、AF に比べ NAF 由来の卵の GVBD 率、MII 率共に有意に低値を示していた。このことから、NAF は AF に比べ 8mm 以上の卵胞になって初めてエストロゲンが合成され、プロゲステロンは合成されない環境であること、この卵胞由来の COC を既存の培養法により体外培養しても十分に成熟した卵を得ることができないことが明らかとなった。

そこで、既存の培養法改善を目的に、NAF 由来の COC を AF のステロイドホルモン環境で培養する AF 環境培養法を以下のように考案した(図1)。まず 4-7mm までは AF における卵胞発育ステージのステロイドホルモン環境で 24 時間体外発育培養(IVG)し(エストロゲン 85ng/ml、プロゲステロン 50ng/ml)、その後 8mm 以上の AF のステロイドホルモン環境(エストロゲン 85ng/ml、プロゲステロ

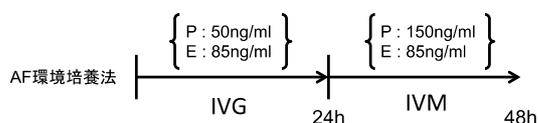


図1. 体外発育培養(IVG)と体外成熟培養(IVM)法に用いるAF環境のステロイドホルモン濃度と培地替えのタイミング

ン 150ng/ml) で体外成熟培養を行った。培養後、卵丘細胞の膨潤とアポトーシス、卵の成熟率と新鮮精液を用いた胚盤胞期胚の作出率を調べた。

この結果、培養前の卵丘細胞は半数程度が死滅していたが、AF 環境で培養することにより生細胞の増殖に伴った死細胞は低下し、このレベルは AF 由来の COC を AF 環境で培養する程度まで回復していた。また、卵丘細胞の膨潤についても NAF 由来の COC を AF 環境で培養すると AF 由来の COC を AF 環境で培養したときと同レベルまで回復していた。卵の MII 率、胚盤胞率も NAF 由来の COC を AF 環境で培養することで AF 由来の COC を AF 環境で培養したときと同程度まで回復した(MII 率: AF 約 60% vs NAF 約 60%、胚盤胞率: AF 約 40% vs NAF 約 40%)。

卵巣一個当たりの AF と NAF の割合を算出した結果、約 1:1 であったことから、本研究により考案した新規 IVG IVM 法は、卵巣一個当たりの COC から算出される胚盤胞期胚の作出数を 2 倍に向上させる培養法であることが明らかになった。さらに 4-7mm 程度の卵胞では、優勢卵胞では Akr1c1 mRNA 発現が低値を示し、AF では高値を示したことから、Akr1c1 mRNA 発現は、卵胞選抜のマーカー遺伝子となりうるということが研究により明らかとなった。

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4件)

Yamashita Y, Shimada M

The release of EGF domain from EGF-like

factors by a specific cleavage enzyme activates the EGFR-MAPK3/1 pathway in both granulosa cells and cumulus cells during the ovulation process.

The Journal of Reproduction and

Development、査読有り、58、

2012、pp.510-514、

<http://dx.doi.org/10.1262/jrd.2012-056>

Yamashita Y, Okamoto M, Ikeda M, Okamoto

A, Sakai M, Gunji Y, Nishimura R, Hishinuma

M, Shimada M

Protein Kinase C (PKC) increases

TACE/ADAM17 enzyme activity in porcine

ovarian somatic cells, which is essential

for granulosa cell luteinization and

oocyte maturation.

Endocrinology、査読有り、155(3) 2014、doi:

10.1210/en.2013-1655.pp.1080-1090

[学会発表](計1件)

池田真規、島田昌之、山下泰尚

健常卵胞と退行卵胞における経時的ステロ

イドホルモン比較解析とそれを応用した退

行卵胞由来ブタ卵の新規 IVM 法の確立

第 118 回日本畜産学会つくば大会、日本畜産

学会優秀発表賞受賞、2014 年 3 月 27 日、つ

くば国際会議場

[図書](計1件)

島田昌之、山下泰尚

卵の成熟における EGF 受容体の活性化と活性化因子

生体の科学、査読無し、64(5)、2013、

pp.462-463、ISSN 1883-5503

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 泰尚 (YAMASHITA, Yasuhisa)
県立広島大学・生命環境学部・准教授
研究者番号：5 0 4 5 2 5 4 5

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：