

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870839

研究課題名(和文)ブタ未成熟卵子の効率的な超低温保存手法の確立

研究課題名(英文) Establishment of an efficient cryopreservation method for immature porcine oocytes

研究代表者

ソムファイ タマス (Somfai, Tamas)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・家畜育種繁殖研究領域・上級研究員

研究者番号：90547720

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)：超低温保存したブタ未成熟卵子による胚生産をさらに効率的にするために、ガラス化処理によって細胞質に生じる障害を調べるとともに、ガラス化処理法と胚培養条件の最適化を試みた。一部の卵子では核成熟の時期が異常に早かった。また、核小体と細胞骨格にも障害が現れたが、それらはやがて回復した。ガラス化保存の改良点として、処理に用いる薬剤や温度を細かく調整し、最適な組み合わせを見出した。さらに、アポトーシスを抑制するレスペラトロールを使用することで胚盤胞への発生率が向上した。これらの改良点を取り入れることで、従来よりも簡便な方法となり、当初の目的であった胚生産の効率化も達成することができた。

研究成果の概要(英文)：To improve the efficacy for embryo production from cryopreserved porcine oocytes, we investigated cytoplasmic damages caused by vitrification and optimized the vitrification and subsequent culture protocol. Vitrification did not affect dramatically the cytoplasmic maturation, redox status, energy levels and RNA content in oocytes and gap junctional communication between oocytes and cumulus cells but caused premature nuclear resumption and reversible damage in nucleolus and microfilaments in oocytes. We optimized the vitrification procedure by defining the best cryoprotectant combination, treatment regimen and temperature. Supplementation of the culture medium with the antiapoptotic agent resveratrol during post-warming maturation culture improved the ability of vitrified oocytes to develop to the blastocyst stage. By these modifications we could set up a simplified defined cryopreservation system for porcine oocytes with improved efficacy according to the aim of the project.

研究分野：農学

キーワード：ブタ ジーンバンク 生殖補助医療技術 卵子 超低温保存 ガラス化保存 発生能

1. 研究開始当初の背景

FAOによると、現在、世界には401の在来豚品種が存在するが、その多くが絶滅の危機に瀕している。絶滅危惧品種は、自然災害や2010年に宮崎県を襲った口蹄疫などの伝染病に弱い。一方、一旦絶滅の危機に瀕した貴重な在来豚品種には、高品質食品を生産し利益を得る事ができる品種もあり(スペイン産イベリコ、ハンガリーのマンガリツァ日本アグー品種など)、豚肉生産への再導入が可能となっている。したがって、豚の遺伝的多様性を維持するために、遺伝資源の生息地での維持ではない凍結保存は、畜産にとって戦略的重要性を持つ。豚では精液の凍結保存は確立されたが、メスの生殖細胞(卵母細胞)の凍結保存は現在でも難しい。これまでに我々は、豚卵母細胞のガラス化保存手法を確立し、世界で初めて凍結未成熟卵子からの子豚生産に成功した。しかし、ガラス化後の高い生存率にもかかわらず、胚への発生能は大幅に低下する。この現象の背後にあるメカニズムや原因は不明であるが、ガラス化した卵母細胞の核成熟は正常であるようなので、ガラス化によって細胞質の機能が損傷するものと推察される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ガラス化による卵子細胞質の変化を明らかにし、その知見をもとにガラス化や卵子成熟培養手法を改善し、ガラス化保存豚卵子の胚発生能を高めることである。哺乳類の卵母細胞の細胞質は、母性 mRNA を貯蔵し、初期胚の発生に必要なエネルギー(ATP)とグルタチオン(GSH)を提供するという重要な役割を果たしている。卵母細胞の周りにある卵丘細胞は、核成熟再開のタイミングの決定、有害な活性酸素種(ROS)レベルの軽減、ギャップ接合部コミュニケーションを通じた卵母細胞のATPレベルの制御など多くの重要な働きを担っている。そこで本研究では、以下の実験を行った。

(1) 細胞質の機能に及ぼすガラス化の影響についての基礎研究

細胞質の mRNA レベルを調べた；ガラス化によって影響を受ける遺伝子を調べた。

細胞質の ATP と GSH レベルを調べた。

卵母細胞と卵丘細胞間のギャップ接合コミュニケーションの正常性を調べた。

卵母細胞の核の成熟進行と活性酸素種レベルの正常性を調べた。

ガラス化保存後に生存している卵母細胞の核および細胞骨格における損傷を検出した。

ガラス化が卵母細胞における Ca^{2+} 制御システムにもたらす変化を調べた。

(2) ガラス化およびその後の体外胚生産システムの最適化によるガラス化卵母細胞からの胚生産の改善

ガラス化後の生存率改善のためのガラス化プロトコルを修正する試み。

上述の(1)の結果に基づいて、成熟培養システムを改善することによるガラス化卵母細胞の発生能の改善。

3. 研究の方法

(1) 卵母細胞の細胞質の機能にガラス化が及ぼす影響についての基礎的な検討

各500個のガラス化および非ガラス化豚卵母細胞を体外成熟後にプールし、RNAレベルを調べ(3反復)、1色のマイクロアレイを用いて豚全体のゲノムのRNAを比較した。ガラス化および非ガラス化豚卵母細胞において、発現のレベルが異なる候補遺伝子が選択され、その mRNA のレベルは量的なリアルタイムPCR(qRT-PCR)によって確認された。

異なる体外成熟培養時間(0, 20, および44h)におけるガラス化および非ガラス化卵母細胞のATPとGSHレベルは、それぞれ、発光によるATPアッセイ(Sigma-Aldrich Co)および5,5'-ジチオビス-2-ニトロ安息香酸-グルタチオン二硫化物の還元酵素リサイクルアッセイによって測定した。

ギャップ結合については、透明帯を貫通している突起を可視化するためにF-アクチンをアレクサ488ファロイジン(分子プローブ)で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。突起の数をもとにギャップ結合の数を比較した。また、卵母細胞の卵丘細胞の膨潤化(ギャップ結合の正常性を示す)については、異なる体外成熟培養時間(0, 20, および44h)においてデジタル画像解析手法を用いて測定した。

ガラス化、非ガラス化卵母細胞と耐凍剤で処理しただけの卵母細胞について、体外成熟培養時間(0, 20, および44h)の異なる時点における核の形態を比較した。従来のオルセインによるクロマチン染色後に、位相差顕微鏡を用いて観察した。また、その時の卵母細胞の活性酸素種については、活性酸素種特異的2',7'-dichlorodihydrofluoresceinジアセテートを取り込ませて蛍光測定によって比較した。卵母細胞の骨格の整合性は、卵母細胞のF-アクチンをアレクサ488ファロイジンで染色後に、共焦点顕微鏡を用いて調べた。

細胞質の遊離 Ca^{2+} レベルについては、 Ca^{2+} 特異的 Fura3-AM を卵母細胞に取り込ませたのち蛍光強度を測定して調べた。また、卵母細胞のガラス化液とその後の加温処理液に Ca^{2+} キレート剤である BAPTA-AM の添加を取り込ませ、胚発生に及ぼす影響を調べた。さらにそれらの処理液に Ca^{2+} を含まない培養液を用いた場合の胚発生を調べた。

(2) 凍結保存後の体外胚生産システムの最適化による胚生産効率の改善

冷却の前処理における糖と透過性耐凍剤(pCPA)の組み合わせと平衡時間の最適

化によるガラス化プロトコルの改良を行った。ついで、氷晶の形成を妨げるポリエチレングリコール (PEG) およびスーパークール X-1000 がガラス化卵母細胞の発生を改善できるか否かを調べた。また、ガラス化液で卵母細胞を処理する際、毒性が最も少ない最適な平衡時間と温度を調べた。(1)の F-アクチンの障害がガラス化卵母細胞で顕著であったことから、アクチンの形状を変えるサイトカラシン B (凍結保存で以前に使用されている)が卵母細胞の発生能に及ぼす影響を調べた。最後に、科学的組成が明らかではない(従って潜在的に病原体キャリアである可能性を否定できない)ウシ血清アルブミンに替えてポリビニルピロリドンを利用した。

予備的検討において、ガラス化卵母細胞でアポトーシスの増加がみられたことから、抗アポトーシス試薬であるレスベラトロールの体外成熟培養液への添加がガラス化卵母細胞の胚発生の改善につながるか否かを調べた。システムの有効性は、ガラス化卵母細胞が体外受精や単為発生後の7日間の体外培養において胚盤胞期に到達するかどうかによって検定した。

4. 研究成果

(1) ガラス化が細胞質機能へ及ぼす影響についての基礎的検討

ガラス化および非ガラス化卵母細胞におけるRNAの発現レベルは同様であった。さらにqRT-PCRによって7つの候補遺伝子を調べたが、どれもがガラス化と非ガラス化卵母細胞において同様に発現していた。従って、ガラス化は貯蔵されたmRNAには影響しないと結論した。

細胞質のATPとGSHレベルは、いずれの成熟培養時間においてもガラス化と非ガラス化卵母細胞で違いは認められなかった。これは、ガラス化後のエネルギーバランス、ミトコンドリア活性および卵丘細胞の機能が正常であったことを意味している。

透明帯貫通突起の数は、非ガラス化卵母細胞と比較してガラス化卵母細胞で約30%減少した。しかし、卵丘細胞の膨潤化はガラス化と非ガラス化卵母細胞間で同じであった。この結果と、上記の結果はともに、卵母細胞・卵丘細胞間のギャップ結合によるコミュニケーションがガラス化後も大きく損なわれないことを示唆している。

ガラス化によって核の成熟が早められた。しかし、この成熟開始は耐凍剤処理のみによっては引き起こされない。したがって、ガラス化卵母細胞はガラス化処理を受けなかった卵母細胞よりも早く成熟するために、エイジング(老化)の影響を受けやすいことが考えられる。卵母細胞の活性酸素レベルはガラス化の影響を受けなかった。

ガラス化の過程で、耐凍剤処理によって核小体の断片化が起こり、F-アクチンのクラスターが形成される。しかし、その後の培養

で卵母細胞はその損傷から回復していた。

ガラス化卵母細胞においてCa²⁺調節が変わったことを示す結果は得られなかった。

(2) 卵母細胞のガラス化とそれに続く体外胚生産システムの最適化による胚生産効率の改善

ガラス化におけるトレハロースとスクロースの効果は同等である。また、最適な耐凍剤処理は、4% (v/v)のエチレングリコール (EG) + プロピレングリコール (PG) 平衡液中で5~15分の平衡処理の後に、35% (v/v)のEG + PGガラス化液を用いてガラス化することである。さらに、PEGとスーパークールX-1000による改善は認められなかった。耐凍剤処理の最適な時間と温度(それぞれ、30秒と25℃)を決定することにより、卵母細胞に与える有害な影響を減らすことができる。また、それらに加えて、処理液からサイトカラシンBを除き、ウシ血清アルブミンをポリビニルピロリドンに置き換える処理を加えることによって、ガラス化保存後の卵母細胞の生存率が80%以上になり、単為発生刺激後の胚盤胞への発生率が30%へと大幅に改善した。

抗アポトーシス試薬のレスベラトロール2μMを体外成熟培養液に添加すると、ガラス化卵母細胞の胚発生能が改善する。

結論として、上述の様々な最適化処理によって、プロジェクトの目的に沿った胚発生の効率化がなされ、卵母細胞凍結保存システムの改善が達成された。

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3件)

- 1) Somfai T, Men NT, Noguchi J, Kaneko H, Kashiwazaki N, Kikuchi K. Optimization of cryoprotectant treatment for the vitrification of immature cumulus-enclosed porcine oocytes: comparison of sugars, combinations of permeating cryoprotectants and equilibration regimens, *J. Reprod. Dev.* 61:571-579, 2015 (査読有)
DOI: 10.1262/jrd.2015-089
- 2) Santos EC, Somfai T, Appeltant R, Dang-Nguyen TQ, Noguchi J, Kaneko H, Kikuchi K (2016). Effects of polyethylene glycol and a synthetic ice blocker during vitrification of immature porcine oocytes on survival and subsequent embryo development. *Anim. Sci. J.* in press. (査読有)
DOI: 10.1111/asj.12730.
- 3) Appeltant R, Somfai T, Santos E, Dang-Nguyen TQ, Nagai T, Kikuchi K. Effects of vitrification of

cumulus-enclosed porcine oocytes at the germinal vesicle stage on cumulus expansion, nuclear progression and cytoplasmic maturation. *Reprod. Fertil. Dev.* in press. (査読有)
DOI:
<http://dx.doi.org/10.1071/RD16386>

[学会発表](計 14 件)

- 1) Somfai T. Oocyte cryopreservation for gene banking in pigs. The 17th AAAP Animal Science Congress (招待講演), 2016 年 08 月 22-25 日, 九州産業大学 (福岡県・福岡市).
- 2) Santos EC, Somfai T., Appeltant R, Dang-Nguyen TQ, Kikuchi K (2016). The effects of polyethylene glycol and a synthetic ice blocker on survival and development of immature porcine oocytes vitrified by the Cryotop method. The 18th International Congress on Animal Reproduction (ICAR). 2016 年 6 月 26 日 ~ 17 日, Tours (France).
- 3) Appeltant R, Somfai T., Kikuchi K (2016). The effects of vitrification at the germinal vesicle stage on transzonal projections and cumulus expansion in porcine cumulus-oocyte complexes. The 18th International Congress on Animal Reproduction (ICAR). 2016 年 6 月 26 日 ~ 17 日, Tours (France).
- 4) Santos ECS, Somfai T., Appeltant R, Dang-Nguyen TQ, Kaneko H, Noguchi J, Nagai T, Kikuchi K (2017). The effects of resveratrol during *in vitro maturation* on the developmental competence of porcine oocytes vitrified at the immature stage. 43rd annual conference of International Embryo Technology Society. 2017 年 1 月 15 日 ~ 17 日, Austin (USA).
- 5) Appeltant R, Somfai T., Santos ECS, Kikuchi K (2017). The effect of exposure time on the toxicity of vitrification solution on porcine cumulus-oocyte complexes before *in vitro* maturation. The 43rd annual conference of International Embryo Technology Society. 2017 年 1 月 15 日 ~ 17 日, Austin (USA).
- 6) Santos ECD, Somfai T., Kikuchi K. The effects of polyethylene glycol and Supercool X-1000 during the vitrification of immature porcine oocytes, 第 121 回日本畜産学会. 2016 年 3 月 29 日, 日本獣医生命科学大学 (東京都・武蔵野市).
- 7) Somfai T., Men NT, Kaneko H, Noguchi J, Haraguchi S, Santos ECD, Nagai T, Kikuchi K. Vitrification at the germinal vesicle stage triggers precocious meiotic resumption but does not affect cytoplasmic maturation in cumulus-enclosed porcine oocytes during *in vitro* maturation. The 42nd International Embryo Transfer Society Annual Conference. 2016 年 1 月 25 日, Louisville (USA).
- 8) Somfai T., Kikuchi K, Kaneko H, Noguchi J, Men NT, Santos ECD, Nagai T. Update on the cryopreservation of porcine oocytes. The 3rd Fatty Pig Science and Utilization International Conference (招待講演), 2015 年 11 月 19 日, Herceghalom (Hungary).
- 9) Nagai T, Somfai T., Men NT, Kaneko H, Tanihara F, Kikuchi K. The effects of collection season and storage duration in liquid nitrogen on post-warming survival and nuclear maturation of immature porcine oocytes preserved by solid surface vitrification. The 41th International Embryo Transfer Society Annual Conference. 2015 年 1 月 10 日, Versailles (France).
- 10) Somfai T., Men NT, Kaneko H, Noguchi J, Haraguchi S, Nagai T, Kikuchi K. Comparison of sugars, combinations of permeable cryoprotectants, and equilibration regimens for the solid surface vitrification of immature porcine oocytes. The 41th International Embryo Transfer Society Annual Conference. 2015 年 1 月 10 日, Versailles (France).
- 11) Somfai T., Yoshioka K, Kashiwazaki N, Egerszegi I, Ratky J, Nagai T, Kikuchi K. Recent progress in the vitrification of porcine oocytes. The 11th Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society (招待講演). 2014 年 11 月 3 日, Bangkok (Thailand).
- 12) ソムファイタマス, Istvan Egerszegi, Nguyen Thi Men, 金子 浩之, 野口 純子, Jozsef Ratky, 柏崎 直巳, 菊地 和弘. The effects of season, medium storage at 4 C and sample storage in liquid nitrogen on post-warming survival of vitrified porcine oocytes. The 107th Meeting of the Society for Reproduction and Development, 2014 年 8 月 24 日, 帯広畜産大学 (北海道・帯広市).
- 13) ソムファイタマス, 菊地 和弘, 吉岡 耕治, 柏崎 直巳, 永井 卓. Recent progress in the cryopreservation of immature porcine oocytes. The 107th Meeting of the Society for

Reproduction and Development, 2014 年
8 月 24 日, 帯広畜産大学 (北海道・帯
広市).

- 14) Somfai T, Kikuchi K, Yoshioka K,
Kashiwazaki N, Nagai T.
Cryopreservation of in vitro produced
embryos and immature oocytes in pigs.
International Symposium on
Cutting-Edge Reproductive
Technologies and Perspectives for
their Usage in Swine (招待講演). 2014
年 6 月 5 日, Tainan (Taiwan).

〔図書〕(計 1 件)

- 1) Somfai T, Hirao Y. Synchronization of
In Vitro Maturation in Porcine Oocytes.
(in "Cell Cycle Synchronization", 2nd
edition, Humana Press), 2017,
pp255-264.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

ソムファイ タマス (SOMFAI TAMAS)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構 畜産研究部門家畜育種繁殖研
究領域・上級研究員

研究者番号：90547720