

氏名	宗 像 祥 久
学位（専攻分野の名称）	博 士（畜産学）
学位記番号	甲 第 798 号
学位授与の日付	令和 2 年 3 月 21 日
学位論文題目	体外発育培養系を用いた卵母細胞の質を制御する要因の解明
論文審査委員	主査 教 授・博士（農学） 岩 田 尚 孝 教授・博士（畜産学） 桑 山 岳 人 准 教 授・博士（農学） 白 砂 孔 明 博士（農学） 木 村 康 二* 博士（農学） 橋 本 周**

論文内容の要旨

顆粒膜細胞および卵胞液は卵母細胞の発育に重要な環境要因である。大型哺乳動物の未発育卵母細胞を効率よく発育させるための体外発育培養系は未だ確立されていない。これまで一般的に用いられてきた培養系では、卵胞発育に伴う顆粒膜細胞の増殖が悪く卵母細胞周囲の顆粒膜細胞数が少ない。本研究では、ブタの未発育卵母細胞を用いて、1)高い発生能力を持つ体外発育卵母細胞を得るための新規の体外発育培養系の構築、2) 卵母細胞の能力を決定する要因の同定、3) とその要因の分子背景の解明に取り組んだ。

1) 培養基質の性質がブタ未発育卵母細胞の体外発育に及ぼす影響

既存の未発育卵母細胞の体外発育培養系ではプラスチックシャーレのような硬い基質が用いられている。その結果、得られる卵母細胞の質は低く周囲の顆粒膜細胞の数も体内発育卵胞に比べて著しく少ない。そこで基質の硬さを調整するため、ポリアクリルアミドゲル（PAG）を培養基質に用いた培養系を構築し、初期胞状卵胞由来の卵母細胞-顆粒膜細胞複合体（OGCs）の体外培養に用いた。すると PAG 上で培養した OGCs の顆粒膜細胞数が有意に増加した。また PAG 上で発育した卵母細胞は直径が大きく、含有する ATP および脂質量が有意に多くなった。さらに H4K12 のアセチル化レベルも有意に高い結果となった。これらの卵母細胞を単為発生処理すると、胚盤胞期胚への発生率は PAG 上で発育させた卵母細胞において高い値を示した。PAG を用いた培養系における卵母細胞の質の向上は顆粒膜細胞数が増加した結果であると考え、次に卵母細胞の発育指標であるエネルギー含量およ

*岡山大学大学院 環境生命科学科 教授

**大阪市立大学大学院 医学研究科 特任准教授

びヒストンのアセチル化レベルと周囲の顆粒膜細胞数の関係性について検討した。

2) 顆粒膜細胞の数と卵母細胞内エネルギー含量の関係性の検証

卵母細胞内のエネルギー含量は卵母細胞の発生能力の指標として多くの研究で用いられている。卵母細胞では解糖系の活性が低く、グルコースをエネルギー基質として利用するためには周囲の顆粒膜細胞でグルコースを代謝し、その代謝物を卵母細胞へ供給する必要がある。この供給元である顆粒膜細胞の数と卵母細胞の質との関係性についてこれまで明らかにした研究は無い。そこで卵母細胞内のエネルギー含量と周囲の顆粒膜細胞数の相関について精査した。まず卵子の脂質量が個体ごとの特徴であるのかどうか、同一個体から回収した10個の卵母細胞を2グループ用意し比較したところ高い相関が得られたため、10個の卵子で個体の卵母細胞内平均脂質含量を推定できることが示された。そして同一個体の卵母細胞内の平均脂質含量と、卵胞内の平均顆粒膜細胞数および卵丘細胞数の間の関係性について検討した。その結果、同一個体において平均顆粒膜細胞、平均卵丘細胞数、卵母細胞内の平均脂質含量それぞれの間に関連が見られた。次に体外発育培養で得られた OGCs を用いて卵母細胞内の ATP および脂質含量、H4K12 アセチル化レベルと卵母細胞周囲の顆粒膜細胞数およびグルコース消費量それぞれの間関係性を調べた。すると顆粒膜細胞数およびグルコース消費量はその卵母細胞の ATP 含量、脂質含量および H4K12 アセチル化レベルと有意な正の相関を示した。この結果より、個体ごとに顆粒膜細胞数が大きく異なり、卵母細胞内のエネルギー状態は周囲の顆粒膜細胞数が決定している可能性が示唆された。

3) 顆粒膜細胞数を決定している因子および分子メカニズムの解明

卵胞液は顆粒膜細胞と共に、卵母細胞の発育を支える周辺環境の一つである。そこで卵胞内の顆粒膜細胞数を決定している因子として卵胞液に着目し、個体の卵胞あたりの平均顆粒膜細胞の数と、その個体由来の卵胞液の卵母細胞および顆粒膜細胞支持能力との関係性を検証した。まず平均顆粒膜細胞数とその個体の卵母細胞の胚盤胞期胚への発生率には有意な正の相関が示された。さらに各個体から卵胞液を採取し、卵母細胞の体外成熟培養および顆粒膜細胞の培養へ添加したところ、卵胞液を採取した個体の平均顆粒膜細胞数と卵胞液が持つ卵母細胞への発生支持能力、顆粒膜細胞の増殖支持能力の間に有意な正の相関が見られた。さらに詳細な検証を行うため25個体の平均顆粒膜細胞数を測定し、上位5個体を GC-rich 区、下位5個体を GC-poor 区とし卵胞液を採取し混合した。得られた GC-rich 卵胞液の体外成熟培地への添加は、poor 卵胞液の添加に比べて、卵母細胞の胚盤胞期胚への発生を促

進した。続いて卵胞内の顆粒膜細胞数を決定している分子メカニズムを明らかにするため、GC-rich 区および poor 区の顆粒膜細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、発現変動遺伝子を制御している上流因子を予測した。すると GC-rich 区の顆粒膜細胞では解糖系が亢進し、エストラジオール合成経路である cAMP/PKA-GATA4-CYP19A1 経路および細胞増殖促進につながる EGF-RAF1-MAPK1 経路が活性化している可能性が示唆された。

以上の研究より 1) PAG を培養基質に用いることで、エネルギー含量が高く発生能力の高い卵母細胞を作成できる培養系を確立できた。2) 卵母細胞内のエネルギー含量は卵母細胞周囲の顆粒膜細胞数と密接な関係性があることが示された。3) 同一の発育段階の卵胞であっても各個体の平均顆粒膜細胞数は大きく異なり、この顆粒膜細胞数および卵母細胞の発生能力は卵胞液が決定している可能性が示唆された。

審査報告概要

大型哺乳動物において、未発育な卵母細胞から高い発生能力を持った体外発育卵母細胞を得るための体外発育培養の方法は確立されていない。本研究では未発育な卵母細胞の培養方法の確立と卵母細胞の発育を左右する重要因子の解明を目的として、軟質なゲルを基質に用いた体外培養系の開発、顆粒膜細胞数と卵母細胞内のエネルギー状態の関係性の検証、さらに個体ごとに異なる顆粒膜細胞数で分画した卵胞液の発育支持能力の検討が行われた。その結果、ゲルを用いた培養系では顆粒膜細胞数の増加、卵母細胞のエネルギー状態および胚発生能力が向上した。さらに顆粒膜細胞数が卵母細胞内のエネルギー状態の決定要因であることを明らかにした。又、卵母細胞を取り囲む顆粒膜細胞数が個体ごとに大きく異なり、顆粒膜細胞数が多い個体の卵胞液は卵母細胞の発生支持能力が高く、顆粒膜細胞への増殖支持能力も高いことを明らかにし、顆粒膜細胞における網羅的な遺伝子発現解析から細胞数を決定していると考えられる細胞内シグナル経路を予測した。本研究では大型哺乳動物の卵母細胞の発育に関する主要因子に関して新規性のある知見を得たことから、審査員一同は博士（畜産学）の学位を授与する価値があると判断した。