HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	The effects of theca cell-derived bone morphogenetic protein-4 on in vitro growth, fertilization and subsequent development of bovine oocytes [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	楊, 応華
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第12847号
Issue Date	2017-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67867
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yinghua_YANG_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：　楊　応華

審査委員	主査　教授	片桐　成二
	副査　教授	昆　　泰寛
	副査　教授	坪田　敏男
	副査　准教授	永野　昌志

学位論文題名

The effects of theca cell-derived bone morphogenetic protein-4 on *in vitro* growth, fertilization and subsequent development of bovine oocytes

（内卵胞膜細胞由来骨形成タンパク質 4 が牛卵子の体外発育、受精および胚発生に与える影響）

哺乳動物卵胞の構成要素には卵子、顆粒層細胞および内卵胞膜細胞があるが、牛の卵子体外発育培養では、卵子と顆粒層細胞のみが用いられている。近年、内卵胞膜細胞から分泌される骨形成タンパク質 4（BMP-4：bone morphogenetic protein-4）は、ラットにおいて卵胞の黄体化や退行を抑制する作用を持つことが報告された。そこで、本研究では、内卵胞膜細胞の機能に着目し、牛の卵子顆粒層細胞複合体（OGC：oocyte-granulosa complex）の培養時に BMP-4 あるいは内卵胞膜細胞を添加して、体内での卵胞発育を模倣することによる牛体外発育卵子の発生能改善を試みた。

第 I 章では、牛卵巣内の初期胞状卵胞から OGC を採取して 12 日間の体外発育培養に供した。培地に BMP-4 を 0（コントロール）、10 あるいは 50 ng/ml 添加して、OGC の発育、ステロイドホルモン分泌および卵子の体外受精後の発生能を調べた。その結果、BMP-4 無添加では培養期間の延長に伴って増加するプロジェステロン濃度が、BMP-4 添加によって抑制されることが分かった。また、BMP-4 添加時に顆粒層細胞の直径が小さくなった。これらの結果は、BMP-4 添加により顆粒層細胞の黄体化が抑制されていることを示唆している。また、培養 12 日後の OGC 生存率はコントロール群と 10 ng/ml BMP-4 添加群で差異は見られなかったが、50 ng/ml BMP-4 添加群では低下した。コントロール群と 10 ng/ml BMP-4 添加群に由来する卵子を体外受精に供したところ、両群卵子の核成熟率、受精率に差異は認められなかったが、胚盤胞への発生率は BMP-4 添加群の方が低くなった。以上の結果から、体外発育培養中の OGC において、

BMP-4 添加は顆粒層細胞の正常性を維持するが、体外受精後の卵子発生能を抑制することが明らになった。

第Ⅱ章では、OGC の発育培養期間を延長することで、卵子の発育を促進することを試みた。BMP-4 の添加にかかわらず 12 日目に約 85%であった OGC の生存率は、BMP-4 無添加では 16 日目に約 60%に低下したが、10 ng/ml BMP-4 を添加した場合には 12 日目と同等の高い生存率が維持された。また、卵子直径は 16 日間培養することにより 12 日間の培養よりも大きくなった。しかし、10 ng/ml BMP-4 添加時の胚盤胞への発生率は、12 日間から 16 日間へと培養期間が延長するのに伴って低下した。以上の結果から、BMP-4 添加は、16 日間まで培養期間を延長しても顆粒層細胞の生存性を維持し、卵子の発育を促すことが示された。一方、16 日間培養後の卵子発生能の低下は、BMP-4 添加による培養期間の延長のみでは牛 OGC の体外培養系改善に繋がらないことを示唆した。

第Ⅲ章では、牛 OGC 発育培養に BMP-4 等の成長因子を分泌する内卵胞膜細胞を添加する培養系の開発を試みた。ステロイドホルモンを含まない培地で OGC と内卵胞膜細胞を共培養したところ、培養 12 日目に約 80%の OGC が生存していた。また、内卵胞膜細胞によるアンドロステンジオンおよび顆粒層細胞によるエストラジオール 17β の産生が確認された。しかし、内卵胞膜細胞における CYP17A1 遺伝子発現の解析結果からアンドロステンジオン産生は培養 1 日目に限られることが分かった。OGC と内卵胞膜細胞の共培養に由来する卵子を体外受精に供したところ、約 20%が胚盤胞まで発生したが、この発生率は体内発育卵子の約 35%よりも低かった。これらの結果から、卵子が高い発生能を獲得するためには、内卵胞膜細胞の機能を長期間維持できる培養法の開発が必要であると考えられた。

本研究により、内卵胞膜細胞に由来する BMP-4 は体外発育培養時の顆粒層細胞の黄体化および細胞の変性を抑制し、培養期間中の顆粒層細胞の正常性を保持することによって牛卵子の発育を促進することが示された。一方、牛卵子の発生能獲得には BMP-4 以外の因子が必要であることも示唆されたため、内卵胞膜細胞との共培養法開発を試みた。その結果、共培養により一部の体外発育卵子は発生能を獲得できることが示されたが、内卵胞膜細胞の機能を維持すｗｓるための培養系の改良が必要なことも明らかとなった。これらの研究成果は、牛卵子の体外発育培養技術の発展に寄与すると考えられる。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者　楊　応華　氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第６条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。