HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on the growth of oocytes and steroidogenesis of granulosa cells in cattle: Effects of bone morphogenetic protein-4, follicle stimulating hormone and antral follicle count in ovaries on in vitro and in vivo follicular development [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	坂口, 謙一郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第13501号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74777
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kenichiro_SAKAGUCHI_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：坂口　謙一郎
Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Study on the growth of oocytes and steroidogenesis of granulosa cells in cattle:
Effects of bone morphogenetic protein-4, follicle stimulating hormone
and antral follicle count in ovaries on *in vitro* and *in vivo* follicular development
(牛卵子の発育と顆粒層細胞の性ステロイドホルモン産生の関係: 骨形成タンパク質 4、
卵胞刺激ホルモンおよび卵巣内胞状卵胞数が体外および体内での卵胞発育に及ぼす影響)

近年、商業的に用いられる牛胚は、ホルモン処理を用いた体内生産から、卵巣から取り出した卵子を体外で成熟および受精させる体外生産に移行しており、体内および体外胚生産の割合は、ほぼ同等になっている。しかし、体外発育卵子の発生能は体内発育卵子よりも低く、卵子が体内で発生能を獲得する過程についての研究が求められている。そこで申請者は、超音波画像診断装置では観察できない小卵胞の発育と卵胞内卵子の発生能獲得機構について検討するため、生体内の卵胞卵子の発育モデルとなる体外発育培養 (IVG) の確立を目的として研究を行った。さらに、卵巣内の卵胞数によって牛個体の繁殖性が異なると報告されていることに着目し、体外および体内で卵子が発生能を獲得する過程を明らかにするため、卵巣内胞状卵胞数と卵子の体外発生能の関係を検討するとともに、牛生体内での卵胞発育動態を解析し、卵子の体外発育環境と比較することで、卵子発生能に係わる要因を精査した。

第 I 章では、食肉検査場由来の牛卵巣から初期胞状卵胞 (直径 1 mm 未満) を採取し、卵子-卵丘-顆粒層細胞複合体 (OCGC) を取り出して IVG を行った。IVG 培地には、内卵胞膜細胞由来の骨形成タンパク質 4 (BMP-4) と卵胞刺激ホルモン (FSH) を添加し、卵胞の発育・成熟に必須であるエストラジオール-17β (E_2) 産生に及ぼす影響について検討した。その結果、BMP-4 を添加した場合、培養 8 日目までは卵胞退行あるいは黄体化の指標であるプロジェステロン (P_4) 産生は抑制され、E_2 産生は増加した。しかし、培養 8 日目以降では BMP-4 無添加の場合と同様に P_4 産生が増加し、退行過程の卵胞と同様の性状となることが分かった。体内で E_2 産生を促進する FSH の添加は IVG では E_2 ではなく P_4 産生を促進した。体内で健康に発育する卵胞様の高 E_2・低 P_4 産生を示す OCGC 由来の卵子は、低 E_2・高 P_4 産生の OCGC 由来の卵子より核成熟能が高かった。以上の結果から、IVG 培地への BMP-4 の添加は顆粒層細胞の黄体化を抑制する一方、FSH の添加は黄体化を促進することが明らかとなった。さらに OCGC の IVG 系は BMP-4 添加によって培養 8 日目までは生体内で発育する卵胞と、8 日目以降は退行する卵胞と相同性を示し、体内発育卵胞のモデルとして利用できることが示唆された。

第 II 章では、雌牛の繁殖能力の指標となることが知られる卵巣内胞状卵胞数に注目し、食肉検査場由来の牛卵巣を直径 2 mm 以上の胞状卵胞数により、High 群 (25 個以上) および Low 群 (25 個未満) に分けて、それぞれの卵巣から採取した初期胞状卵胞由来 OCGC を IVG に供した。その結果、OCGC の E_2 産生は、培養 8 日目において High 群の方が高く、卵子核成熟能も高いことが分かった。さらに、IVG 後の卵子を体外受精に供したところ、High 群卵子は胚盤胞 (9.1%) まで発育したが、Low 群からは胚盤胞は得られなかった。以上の結果から、胞状卵胞数が少ない卵巣由来の OCGC は、顆粒層細胞の E_2 産生が低く、卵子発生能低下の要因となることが示唆された。

第 III 章では、超音波画像診断装置を用いて、経産ホルスタイン種雌牛を左右卵巣内の総卵胞数により、30 個以上の High 群および 30 個未満の Low 群に分類し、発情周期における卵胞発育動態を調べると共に、血中 FSH、E_2、テストステロン (T)、P_4 濃度および卵巣内胞状卵胞数と正の相関を有し、FSH 応答性の E_2 産生を抑制する抗ミューラー管ホルモン (AMH) 濃度を測定した。また、発育ステージの異なる卵胞 (選抜期、黄体期、排卵期) から卵胞液を吸引採取し、E_2、T、P_4 濃度および AMH 濃度を測定した。さらに、第 II 章と同様に IVG を行い、IVG 培地における E_2、P_4 濃度および AMH 濃度を測定した。その結果、High 群の胞状卵胞数は増減を伴う波状の動態を示したが、Low 群では増減は見られなかった。血中 FSH 濃度はすべての周期を通して Low 群で高く、E_2 および T 濃度は High 群の方が高かった。また、卵胞液中の E_2 濃度は、排卵期において High 群の方が Low 群よりも高く、T 濃度も高い傾向にあった。AMH 濃度は、血液、卵胞液および培地中において High 群の方が Low 群よりも高かった。以上の結果から、牛生体内でも IVG と同様に、胞状卵胞数が少ない牛における E_2 産生能の低下が示され、これによって卵子発生能が低下する可能性が示唆された。しかし、High 群において、AMH 濃度が高いにもかかわらず、E_2 濃度も高くなった原因については今後の検討が必要である。

以上のように申請者は、牛卵子の IVG により生体内の性ステロイドホルモン産生と卵子核成熟能の関係を模すことが可能な卵胞発育モデルを開発した。さらに、この卵胞発育モデルを用いて、卵巣内胞状卵胞数が少ない牛では、顆粒層細胞の E_2 産生能が低く、卵子発生能も低くなることを示した。また、胞状卵胞数の多い牛は血中および卵胞液中の E_2 濃度が高く、主席卵胞内の卵子は健康に発育する一方、主席卵胞選抜後はその他の多くの卵胞が主席卵胞から分泌される E_2 の FSH 分泌抑制作用によって退行し、卵子発生能が低下することを示した。これらは牛卵子の発生能獲得機構の解明において有用な知見であり、IVG ならびに体外での胚生産効率の向上に寄与すると考えられる。