



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_review.pdf, 審査の要旨



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：坂 口 謙 一 郎

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

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、牛胚生産は、ホルモン処理を用いた体内生産から、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、胚生産の割合は体内と体外が同等になっている。しかし、体外発育卵子の発生能は体内発育卵子より低く、卵子が高い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内卵子の発生能獲得機構について検討するため、生体内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、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、卵子発生能に関わる要因を精査した。

第 I 章では、牛卵巣内の初期胞状卵胞（直径 1 mm 未満）から卵子-卵丘-顆粒層細胞複合体（OCGC）を採取して IVG を行った。IVG 培地に、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-17 β （E₂）産生について検討した。その結果、BMP-4 添加により、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（P₄）産生は抑制され、E₂産生は増加したが、それ以降は BMP-4 無添加の場合と同様に P₄産生が増加した。体内で E₂産生を促進する FSH の添加は、IVG では E₂ではなく P₄産生を促進した。また、体内で発育する卵胞様の高 E₂・低 P₄産生を示す OCGC 由来卵子は、低 E₂・高 P₄産生の OCGC 由来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 添加は顆粒層細胞の黄体化を抑制する一方、FSH 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、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 OCGC を IVG に供した。その結果、OCGC の E₂ 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 群卵子の一部は胚盤胞まで発育したが、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 E₂ 産生能が低く、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、ホルスタイン種雌牛を左右卵巣内総卵胞数により、30 個以上の High 群および 30 個未満の Low 群に分類し、発情周期中の卵胞発育動態を調べると共に、血中 FSH、E₂、テストステロン (T)、P₄ 濃度および FSH 応答性の E₂ 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、黄体期および排卵期）から卵胞液を採取し、E₂、T、P₄ 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、培地内 E₂、P₄ 濃度および AMH 濃度を測定した。その結果、胞状卵胞数は High 群では増減を伴う波状の動態を示したが、Low 群では変化しなかった。血中 FSH 濃度は、すべての周期で Low 群が高く、E₂ および T 濃度は High 群の方が高かった。また、排卵期卵胞液中の E₂ 濃度は、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、卵胞液および培地のすべてで High 群の方が Low 群より高かった。以上の結果から、牛生体内でも胞状卵胞数が少ない牛における E₂ 産生能の低下が示され、卵子発生能低下の一因となることが示唆された。

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ることが可能な卵胞発育モデルを開発し、卵巣内胞状卵胞数が少ない牛では、顆粒層細胞の E₂ 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 E₂ 濃度が高く、主席卵胞内の卵子は健康に発育する一方、その他の多くの卵胞では主席卵胞から分泌される E₂ 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 を含めた体外での胚生産効率の向上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 坂口 謙一郎 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。