

論文内容要旨 (和文)

平成 16 年度入学 大学院博士後期課程 地球共生圏科学専攻 共生圏発達科学講座

氏名 趙 駿 鎬



論文題目 The study for an establishment of in vitro growth culture of bovine oocytes derived from early antral follicles (ウシ発育途上卵子の体外発育培養法の確立に関する研究)

哺乳動物の卵巣内には多数の発育途上卵が存在している。卵子は数個の体細胞（顆粒膜細胞）で取り囲まれた原始卵胞の状態に卵巣内に貯蔵されており、性周期に応じて少数の原始卵胞が選抜され、発育を開始する。原始卵胞から発育を開始した卵子は、最終的に排卵直前まで発育したグラーフ卵胞となる。この時期の卵胞直径は十数ミリにまで達し、完全発育した卵子直径は約 120 μm まで増加して、発育を完了する。しかし、生体内においては、卵子の大多数は発育を開始しないか、もしくは、発育途上で退行する運命にある。卵巣から発育途上卵子を単離し、体外培養系において効率的に卵子を完全発育させることが可能となれば、卵胞・卵子発育機序の解明という基礎的研究はもちろんのこと、卵子の有効活用により家畜繁殖、絶滅危惧種の保護・再生、ひいてはヒトの不妊治療等、応用面においても重要な技術となりうる。

本研究では、ウシ発育途上卵子の発育を可能とする体外培養法の確立について検討を行った。最初に発育途上卵子を長期間培養するために、ウシ初期三次卵胞(卵胞直径 = 400–700 μm 、卵子直径 = 90–100 μm)から卵子・顆粒膜細胞複合体(COCGs)を分離し、培養を行った。この研究の具体的項目を以下に示す。

1. 最適培養条件の検討 (基本培地の選択、ヒポキサンチンの濃度、培養日数)
2. 卵子・顆粒膜細胞複合体 (COCGs) の正常形態維持と卵子発育促進に関わる因子の同定
3. 顆粒膜細胞の増殖に対する角質細胞増殖因子 (KGF) の効果と KGF によって誘導される生理活性物質の遺伝子発現量における半定量的解析
4. 新たに樹立された体外卵子発育培養法で作製した発育卵子の成熟及び体外受精操作後の胚発生能の検討

発育途上のウシ卵子体外培養法として、COCGs 培養系を用いた。COCGs 培養法に用いる基本培地を検討したところ、Waymouth 培地は COCGs 形態の正常維持に優れていることを明らかにした。また、4 mM ヒポキサンチンを培地に添加すると、COCGs の正常形態維持に効果のあることを示した。エストラジオール-17 β (E2) とインスリンは、COCGs の正常形態維持と発育途上卵子の直径増大に効果のあることを示した。また、KGF は、強力な卵子直径増大

(10pt 2,000 字程度 2 項以内)

氏 名 趙 峻 鎬

効果のあることを示した。KGFにより誘導される因子について Real-time PCR 法で解析したところ、KIT ligand とそのレセプターである KIT の遺伝子発現が特異的に増加することを明らかにした。この結果より、KGF による卵子発育機序に KITLG を介したシグナル伝達系が深く関与しているものと推察できた。新たに樹立した卵子体外発育培養法により作製した卵子は体外成熟を行い卵子の核相を調べたところ、受精可能な核相として知られる第二分裂中期 (M II 期) の成熟卵子に到達していることを示した。さらに、この成熟培養後の卵子を体外受精、体外胚培養を行ったところ、移植可能な胚盤胞にまで発生が進むことを発見した。

本研究で確立したウシ発育途上卵子の体外発育培養法は、卵子の発育や成長に関する因子の特定やそれらの因子の作用機序の解明のみならず、受精卵移植に利用可能な胚の生産、トランスジェニックウシ作製のためのクローン胚の作製などの応用にも必須の基盤技術として利用が期待される。

論文内容要旨 (英文)

平成 16 年度入学 大学院博士後期課程 地球共生圏科学専攻 共生圏発達科学講座

氏名 趙 峻鎬



論文題目 The study for an establishment of in vitro growth culture of bovine oocytes derived from early antral follicles (ウシ発育途上卵子の体外発育培養法の確立に関する研究)

A large number of oocytes are present at various growing stage in mammalian ovary. However, most oocytes undergo atresia and only a few oocytes can develop to an ovulatory stage in vivo. Growing oocytes could be a potentially large source of genetic materials for animal reproduction, transgenesis and conservation of endangered species, if it is possible to grow and to have a developmental competence in vitro.

The present study was aimed for establishing an efficient culture system of bovine growing oocytes derived from early antral follicles (diameter = 400-700 μm , oocyte diameter = 90-100 μm) as enclosed in granulosa cells complexes (COCGs; Cumulus-Oocyte Complexes with Granulosa cells).

The research subjects were followings;

- 1) the optimization of culture conditions (the selection of basal medium, the determination of proper concentration of hypoxanthine and in vitro culture period)
- 2) the identification of essential factors effective on maintaining of normal COCGs morphology and stimulating the oocyte growth
- 3) the effect of keratinocyte growth factor (KGF) on the proliferation of granulosa cells and quantitative analysis of mRNA expression levels of different factors induced by KGF
- 4) the ability of the meiotic and developmental competence of in vitro grown oocytes obtained in the newly established culture system

(12pt シングルスペース 300 語程度)

氏 名 趙 駿 鎬

Basal medium (Waymouth medium) and 4 mM hypoxanthine were superior to maintain the high rates of normal COCGs morphology. Estradiol-17 β (E2) and insulin supported the maintenance of healthy COCGs morphology and increased the oocyte growth. KGF was found to be one of most essential factors to stimulate the oocyte growth. The addition of KGF in COCGs culture enhanced the mRNA expression levels of *KITLG* and its receptor (*KIT*). It is likely that KGF may act on in vitro grown oocytes derived from the early antral follicles via KITLG-KIT signaling pathway. These oocytes could reach at the fully grown stage (metaphase II) after in vitro oocyte maturation and have an ability of a developmental competence after in vitro fertilization and in vitro embryo culture. The improved COCGs culture system established in this study is useful to identify and analyze important factors for the oocyte growth and development as well as to produce a large number of fully grown oocytes for the application of embryo transfer and nuclear cloning.

学位論文の審査及び最終試験の結果の要旨

平成19年2月19日

理工学研究科長 殿

課程博士論文審査委員会

主 査 星 宏 良



副 査 品 川 敦 紀



副 査 半 澤 直 人



学位論文の審査及び最終試験の結果を下記のとおり報告します。

記

1. 論文申請者

専攻名 地球共生圏科学専攻
氏 名 趙 峻 鎬

2. 論文題目 (英文の場合は、その和訳を併記すること。)

The study for an establishment of *in vitro* growth culture of bovine oocytes derived from early antral follicles (ウシ発育途上卵子の体外発育培養法の確立に関する研究)

3. 学位論文公聴会

開催日 平成19年2月16日
場 所 山形大学理学部26番教室

4. 審査年月日

論文審査 平成19年 2月 1日 ~ 平成19年 2月16日
最終試験 平成19年 2月16日 ~ 平成19年 2月16日

5. 学位論文の審査及び最終試験の結果 (「合格」・「不合格」で記入すること。)

- (1) 学位論文審査 合 格
(2) 最終試験 合 格

6. 学位論文の審査結果の要旨(1,200字程度)

別紙のとおり

7. 最終試験の結果の要旨

別紙のとおり

専攻名	地球共生圏科学専攻	氏名	趙 峻 鎬
学位論文の審査結果の要旨			
<p>哺乳動物卵巣内には数万から数十万個という大量の発育途上卵子が存在している。近年、卵子・卵胞発育機構の解明、胚移植による有用家畜の生産、絶滅危惧種の繁殖・再生、ヒトの不妊治療など、研究・産業・環境・医療など幅広い分野において、哺乳動物卵子の利用に関するニーズが高まっている。大量の発育途上卵子を有効利用するためには完全に発育させることが必要であり、その手段として体外培養システムの確立が試みられてきた。体外培養法によりマウスでは卵子の完全発育に成功した例が報告されているが、ウシ等の大型家畜では、マウスに比べて長期間培養が必要であること、卵子発育に関わる必須の生理活性物質の解明が十分でないことなどにより、満足できる体外培養システムの確立が遅れている。</p> <p>申請者は、屠体から採取したウシ卵巣から発育途上の卵子を含む初期胞状卵胞(三次卵胞：卵子直径90・100μm)を分離し、それから卵子一卵丘・顆粒膜細胞複合体(COCGs)を単離して、発育途上卵子を効率的に完全発育させる体外培養系の樹立を試みた。種々の基本培地を検討した結果、Waymouth培地がCOCGsの長期間培養における正常形態維持に優れていることを明らかにした。卵子発育の指標として卵子直径の増加を測定する方法で、培地に estradiol-17β、インスリンを添加することにより、卵子直径を増大させる効果を示した。また、細胞成長因子として知られるKGFに卵子直径を増大させる効果があることを発見し、最適濃度では、完全発育卵子の直径(約120μm)とほぼ同等のサイズにまで成長することを示した。種々の卵子発育促進因子の遺伝子発現を調べた結果、KGFはKIT ligandとそのレセプターであるKITの遺伝子発現を増加させることを示した。これまで卵胞では夾膜細胞でKGFが作られることが知られていたが、KGFが卵子発育に関与している作用機序については明らかではなかった。申請者は、独自に樹立した体外培養系を用いて、初めてKGFによる卵子発育促進作用がKIT ligand-KITシグナル伝達系の関係した作用機序で誘導されることを示唆した。発育途上卵子が開発した体外培養法で完全に発育していることを証明するためには、卵子発育培養後の卵子を成熟培養して受精可能な卵子(第二減数分裂中期:MII期)が得られるか、また、体外受精した後の胚培養で移植可能胚(胚盤胞)を作製できるかを調べる必要がある。卵子発育体外培養で作製した卵子は、生体で完全発育した卵子とほぼ同様に卵子の成熟(MII期)が進み、体外受精・胚培養で効率よく胚盤胞を作製できることを明らかにした。</p> <p>本研究成果は、卵子発育に関与する因子の特定や作用機序の解明に重要な知見を得ている。また、新たに開発した卵子発育体外培養システムは、卵子・卵胞発育研究の優れた実験モデル系として注目されると同時に、応用面として、ウシ胚移植やクローン胚作製などに大量の発育途上卵子を有効活用できる道を拓いた。以上を総合的に判断して、十分価値ある学位論文であると認める。</p>			
最終試験の結果の要旨			
<p>最終試験の可否判断のために申請者の公聴会を実施した。申請のあった学位論文に基づいた研究発表及びその内容に対する質疑応答を行うことで学位取得に十分な素養を有しているかどうかの審査を行った。申請者の発表は、研究の意義、実験結果についての理解、研究成果のポイント等について公聴会参加者に十分理解できるように的確な説明がなされた。質問に対しては質問者に良く理解出来る返答がなされた。研究内容についてはもう少し卵子発育促進因子の作用機構について詳細な検討がなされていればもっと良いとの意見も出されたが、多数のウシ卵子を利用することが難しいという限られた条件などを考慮して、概ね妥当な研究成果と判断した。以上の結果を総合的に判断して、審査委員会として最終試験を合格と認定する。</p>			