

[研究区分： 学際的・先端的研究 (A)]

研究テーマ： 鉄イオン輸送タンパク質・トランスフェリンの雌性生殖細胞への新たな機能-卵の減数分裂再開抑制メカニズムの解明とその体外培養系への応用-	
研究代表者： 生命環境学部 生命科学科 准教授・山下泰尚	連絡先： yamayasu@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者	
【研究概要】 卵巣には 40 万個以上の未成熟卵が存在するが、排卵される成熟卵の数は極少数である。未成熟卵の利用は、優良形質を有した個体の増産に繋がるため、体内の成熟機構を反映させた新規体外成熟培養法の開発が必要である。我々は、卵胞発育とともに肝臓で鉄イオンの放出系(Ferroportin)と輸送系(Transferrin; TF)の発現量が増加し、TF が卵胞発育期の卵巣に蓄積し卵成熟が促進されることを見出した。さらに、ブタ卵の体外培養時の培地に TF を添加すると卵成熟率が上昇することを見出した。	

【研究内容・成果】

哺乳動物の卵巣では、FSH の刺激により動物種によっては数十個の二次卵胞が卵胞発育し、初期胞状卵胞を経て、極一部の優勢卵胞のみが成熟卵の存在する後期胞状卵胞へと発育する。この間卵は減数分裂を停止しているが、卵胞発育した後期胞状卵胞に LH 刺激（排卵刺激）が加わると卵は減数分裂を再開し、第二減数分裂中期(MII 期)へ減数分裂を進行した成熟卵のみが排卵される。したがって、多数存在する未熟な初期胞状卵胞から卵・卵丘細胞複合体(COC)を採取し、高確率に成熟可能となれば、産業動物の効率的増産、希少動物の保存、ヒトの高度生殖補助医療などに応用可能である。しかし、体内成熟卵の成熟率と比べ体外成熟卵のそれは低い。その理由の一つに、まだ発育段階の卵胞に強制的に排卵刺激を与え、MII 期の成熟卵を得る方法に問題があると考えられる。このことから、卵成熟が起こる卵胞発育期を詳細に理解する基礎研究と、それを体外で模倣する応用研究を一貫して行う必要がある。

本研究では、体外成熟培養法の問題点を改善するために、排卵刺激前の優勢卵胞の特徴的形態である血管新生の有無から、血液由来物質の Transferrin (TF)(Fe²⁺担体タンパク質)に着目し、以下の点について検討を行った。

- マウス体内における TF と Fe²⁺放出に関わる因子群の性周期変動と発現制御機構の解明
- マウス卵巣における TF-Fe²⁺の生理的役割
- ブタ COC の体外培養時における TF-Fe²⁺の役割

マウス体内における TF と Fe²⁺放出に関わる因子群の性周期変動と発現制御機構の解明

21~27 日齢マウスに卵胞発育を誘導する FSH 様の PMSG および排卵を誘導する LH 様の hCG を腹腔内投与し、PMSG 投与前、投与後および hCG 投与後の卵巣および顆粒膜細胞を採取し、顆粒膜細胞における *Tf* mRNA および TF 受容体(*Tfr1* および *Tfr2*) mRNA 発現を Realtime PCR により解析した。この結果、PMSG 刺激により卵巣内の TF 量は PMSG 刺激前と比較して有意に上昇し、その後の hCG 刺激により低下したが、*Tf* mRNA は PMSG 刺激、hCG 刺激により変化しなかった(図 1)。また、*Tfr2* mRNA はほとんど発現せず、*Tfr1* mRNA が肝細胞と同レベルの高い発現量を維持していたことから、TF は TFR1 を介して取り込まれることが考えられた。この結果は、PMSG 刺激後の卵巣では TF 量の増加に伴う Fe²⁺の要求量が増加するが、PMSG 刺激により卵巣では TF は合成されず、他組織から卵巣へ運搬される TF が Fe²⁺を供給していると推察された。

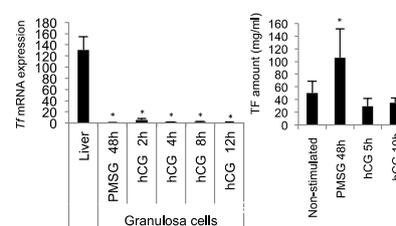


図1. マウス卵巣における *Tf* mRNA 発現および TF 量

一般的に Fe^{2+} は TF により体内循環するが、その主な供給元は肝臓である。肝臓での Fe^{2+} の排出は Ferroportin(FPN)と Hpcidin(HPD)によりそれぞれ正、負に調節される。卵巣に PMSG 刺激後に蓄積される TF- Fe^{2+} は肝臓から供給されると仮定し、PMSG 刺激前後、hCG 刺激後のマウスから肝臓を採取し、*Tf*、*Fpn*、*Hpd* mRNA 発現を解析した。*Tf* mRNA 発現は、PMSG 刺激前に発現量が上昇し、PMSG 刺激後もこの高発現は維持していたが、hCG により高い発現量は低下した。*Fpn* mRNA 発現は、PMSG 刺激前は低値を示したが、PMSG 刺激より発現量が有意に上昇し、hCG 刺激により低下した。*Hpd* mRNA 発現は、PMSG 刺激前と hCG 刺激後に高値を示し、PMSG 刺激により低値を示した(図 2)。上記結果は、これまで全く報告のない卵巣-肝臓のコミュニケーションが存在することを示しており、卵巣の性周期変動に伴い肝臓の Fe^{2+} 排出・運搬システムが活性化することを初めて見出した。このことから、PMSG で刺激された卵巣から分泌される因子が肝臓の Fe^{2+} の放出運搬を誘導すると考えられるが、この因子の同定には至っておらず、更なる検討が必要であると考えられた。

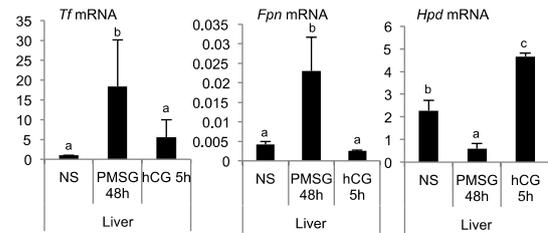


図2. マウス肝臓における*Tf*、*Fpn*および*Hpd* mRNA発現

マウス卵巣における TF- Fe^{2+} の生理的役割

卵巣における TF- Fe^{2+} の生理的役割を調べるために、21 日齢マウスを通常試料(Wild type 区)と低鉄試料(Low Fe^{2+} 区)で 3 週間飼育し、その後 PMSG および hCG を投与した。PMSG 投与前後、hCG 投与後の卵巣から組織切片を作製し、HE 染色により卵巣形態を観察した。また一部の卵巣から卵を回収し、卵の減数分裂再開を示す指標である GVBD 率、MII 率、排卵数を調べた。

Wild type 区では PMSG 刺激により卵胞発育が誘導され、排卵直前の発達した胞状卵胞が認められたが、Low Fe^{2+} 区では PMSG 刺激後の正常な卵胞発育が阻害され(図 3)、これらの卵は高い GVBD 率、MII 率を示すとともに、卵の変性率が高い値を示した。排卵 COC 数は Wild type 区で 20 個程度であったが、Low Fe^{2+} 区では 5 個程度と有意に低値を示した。このことから、卵胞発育期に卵巣に蓄積される TF- Fe^{2+} は、顆粒膜細胞を刺激する結果、正常な卵胞発育と卵の減数分裂停止に関わると考えられた。しかし、卵巣における Fe^{2+} のターゲット因子の同定には至っていないことから、本年度は顆粒膜細胞の初代培養系に TF- Fe^{2+} を添加し、メタボローム解析を行うことで Fe^{2+} のターゲット因子を網羅的に解析する予定である。

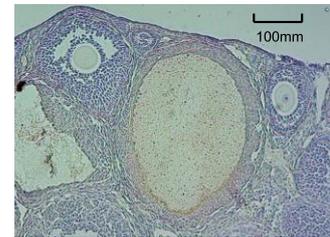


図3. PMSG投与後の鉄欠乏モデルマウスの卵巣

ブタ COC の体外培養時における TF- Fe^{2+} の役割

家畜 COC の体外培養時における TF- Fe^{2+} の役割を調べることを目的に、食肉処理場由来のブタ卵巣の 1-3mm、4-7mm、8mm 以上の卵胞から卵胞液および COC を採取した。卵胞液は ELISA 法による TF 量測定、COC は卵胞液中 TF 量を添加した培地で体外成熟培養を行った。卵胞液中の TF 量は、卵胞サイズが大きくなるのに伴い上昇し、8mm 以上の卵胞では 14mg/ml と血中の 4 倍以上の TF が含まれていた。TF- Fe^{2+} を添加していない培地で COC を培養すると、卵は自発的に GVBD を誘起したが、8mm 以上の卵胞液中の TF- Fe^{2+} 量を添加してブタ COC を体外培養すると、卵の自発的 GVBD が抑制され、この抑制効果は生理的 GVBD を誘起する FSH の添加により解除され、GVBD が誘起された。今後はマウスのメタボローム解析結果から得られる Fe^{2+} のターゲット因子の活性化を促した TF- Fe^{2+} 添加量の至適濃度をさらに検討するとともに、TF- Fe^{2+} の添加が卵の発生率に及ぼす影響を調べる予定である。またウシにおいても同様の研究を行い、家畜卵の発生率向上を目指した新規体外成熟培養系の構築を試みる。

[研究区分：学際的・先端的研究 (A)]