

【研究区分：先端的研究】

研究テーマ：卵子の体外成熟における Wnt シグナル物質の添加による高発生胚の作出	
研究代表者：生物資源科学部生命環境学科（生命科学コース）准教授 阿部靖之	連絡先：abe@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者：	
【研究概要】 卵子の培養技術は、畜産業や不妊治療において非常に重要だが、体外成熟卵子は品質が低いことが問題である。本研究では、細胞増殖・分化への関与が知られる Wnt/ β -カテニン経路に着目し、マウスおよびウシ卵成熟過程においてこの経路を制御することで、高品質な胚を効率的に作出することを試みた。マウスまたはウシ卵子を Dkk1 (Wnt 阻害剤) 添加培地で成熟培養した結果、マウス卵子で発生率が増加した一方、ウシ卵子での効果は低かった。さらに、dbcAMP および Wnt7a, Dkk1 の複合処理によって発生率が増加する傾向が見られた。	

【研究内容・成果】

広島県内の和牛肉消費量は約 11,000 頭であるのに対し、県内産和牛頭数は約 4,000 頭で、半数以上が県外から供給されている。また、宮崎県における口蹄疫の発生や東日本大震災により黒毛和牛種の子牛生産体制が崩壊し、全国的に子牛の供給不足に陥っている。これを解決するため、広島県では黒毛和種から生産した胚をホルスタイン種乳用牛へ移植し、黒毛和種産子の生産を行う和牛胚移植によって頭数増産を図っている。和牛胚移植では、生体から得られた卵巣内卵子（未受精）を体外成熟・受精・発生することで胚が生産できれば効率的であるが、体外成熟卵子の品質は低く、胚盤胞（移植する胚ステージ）への発生率は低率である（20～40%）。その原因究明として、本学・堀内俊孝教授は、網羅的遺伝子発現解析により、高発生能牛に由来するウシ卵丘細胞（卵成熟を補助）・未成熟卵子複合体では Wnt/ β -カテニン経路の遺伝子発現が高いことを見出した（平成 29 年度重点研究事業「県立総合技術研究所との共同研究」）。Wnt/ β -カテニン経路では、Wnt タンパク質が β -カテニン（転写促進因子として機能）のタンパク質レベルを調節することによりシグナル伝達が制御され、細胞の増殖や分化を制御する。Wnt ファミリーメンバーは 19 の細胞外性因子で構成され、卵巣および卵子、初期胚で発現するメンバーが多く存在し、マウスでは FZD1 (Wnt 関連タンパク質) 受容体が卵成熟過程に卵細胞質で発現するため、Wnt リガンドが卵成熟に関連する遺伝子の発現を制御することが示された (Rosenbluh et al., 2013)。Wnt 関連遺伝子の発現調節によって卵成熟が向上することが期待できることから、本研究では、マウスおよびウシ卵子の体外成熟において、Wnt リガンドまたは関連タンパク質、阻害剤を処理し、その後の発生能に対する効果を検証した。また、動物種間における差異の有無を確認した。

第一に、Wnt7a (細胞内 β -カテニン濃度を上昇) または DKK-1 (Wnt/ β -カテニン経路を遮断) を処理し、効果を検証した。BDF1 マウス (3-4 週齢) 卵巣および食肉処理場由来のウシ卵巣から卵丘細胞・卵子複合体を採取後、33 ng/ml Wnt7a (W 区) または 1 μ g/ml DKK-1 (D 区) 添加培地でそれぞれ成熟培養し、一部は免疫蛍光染色による β -カテニンの観察、残りは受精後の発生能を調べた。マウスにおいて、卵丘膨化率は実験区間で差異は見られず、全て 80%以上だった。免疫蛍光染色の結果、 β -カテニンは染色体周辺が特に多く、細胞質全体にも均一に局在しており、蛍光強度から算出した濃度において、D 区は無処理区および W 区に比べ有意に低く (12.6 vs. 37.9 および 33.3 rfu), Wnt/ β -カテニン経路を阻害したことが推定できる。胚盤胞への発生率は、無処理区 (34.4%) に比べ W 区 (26.1%) では低下したが、D 区 (48.0%) では向上した。一方、ウシにおいても卵丘膨潤率は全区で高く (80%以上)、 β -カテニン濃度は D 区で低下し、発生率は有意差がないもののマウスと同様な傾向があった (無処理区, 12.3%; W 区, 9.5%; D 区, 19%)。以上の結果から、Wnt/ β -カテニン経路の阻害は、動物種に関係なく発生能の高い胚の作製に有効であることが示唆されたが、ウシでは Dkk1 の効果が低く、濃度検討の必要性も示唆された。

【研究区分：先端的研究】

第二に、マウス卵子において高濃度 Dkk1 (10 µg/ml) の効果を検証した。0 または 1, 10 µg/ml Dkk1 添加時の発生率は、それぞれ 12.8 または 9.2, 14.9% であり、10 µg/ml 区で高い傾向があったが、大きな改善が見られなかった。

第三に、体内における Wnt/ β -カテニン経路の動態を模倣することで、発生率の向上を試みた (図 1)。卵胞発育期では、Wnt シグナル伝達が増加することが報告されており、成熟開始時の卵子に Wnt は高レベルで存在することが予想された。しかし、Wnt タンパク質を成熟培養中に処理すると発生率が低下することが、第一実験によって明らかとなっているため、ジブチル cAMP (dbcAMP) を用いて成熟開始を抑制したうえで Wnt7a を処理し、その後に Dkk1 添加培地で成熟培養することとした。実験区の設定は、dbcAMP 単独処理を A 区、dbcAMP および Wnt7a 複合処理を B 区、dbcAMP および Dkk1 複合処理を C 区、dbcAMP および Wnt7a, Dkk1 複合処理を D 区とした (表 1)。

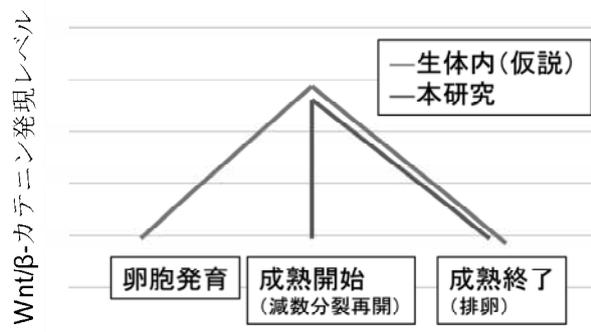


図 1. 卵胞発育から排卵までの Wnt/ β -カテニン発現レベルの推移 (仮説)

表 1. 実験 3 における実験区

添加時期	実験区	非添加	A	B	C	D
前培養	dbcAMP	-	+	+	+	+
	Wnt7a	-	-	+	-	+
体外成熟	Dkk1	-	-	-	+	+

受精率は、無処理区および C 区がそれぞれ 44.0 および 43.3% で低かったが、その他の実験区では同程度だった (56.5-57.9)。発生率は、C 区が 3.3% で低く、B 区 (10.5%) および D 区 (12.9%) がそれに続き、A 区が 16.4% で最も高い傾向があったが、無処理区の 16.0% を大きく上回ることはなかった。本研究では、前処理における 33 ng/ml Wnt7a および IVM における 10 µg/ml Dkk1 処理の明確な効果を見出すことはできなかった。これは、操作の増加により卵子への露光時間ひいてはストレスも増加したことが懸念されることと、各物質のさらなる濃度検討の必要性が考えられる。

以上の結果から、マウス卵子において、Wnt/ β -カテニン経路を制御することで発生率を向上できることと、dbcAMP および Wnt7a, Dkk1 を複合処理することによって、体内での Wnt/ β -カテニン経路動態を模倣できる可能性を明らかにした。しかし、発生率は未だ十分な率とは言えない。また、ウシにおける検証が不十分であった。今後の課題として、dbcAMP および Wnt7a, Dkk1 の複合処理において、それぞれの処理濃度および時間を検討し、最適な条件を設定する。それを参考に、実利性が高いウシにおいて効果の検証と、ウシでの最適条件を検討する。これらの成果が、卵子から高い割合で産子を作成できること、さらには広島県の畜産業振興に大きく貢献することを期待する。