

氏名	奥平 裕一
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学 術
学位授与番号	博甲第5534号
学位授与の日付	平成29年 3月24日
学位授与の要件	環境生命科学研究科 農生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	ブタおよびヒト小卵胞由来卵母細胞の体外成熟能改善に関する研究
論文審査委員	教授 国枝哲夫 教授 舟橋弘晃 教授 木村康二 准教授 若井拓哉

学位論文内容の要旨

卵巣表層には大小様々な胞状卵胞が存在し、その中の未成熟卵母細胞を効率的に体外成熟 (IVM) させることが出来れば、雌性生殖細胞の高度利用が可能となる。哺乳動物の卵巣では直径 3 mm 未満の小卵胞 (SF) が大半を占めているが、未経産ブタ SF 由来の卵丘細胞 - 卵母細胞複合体 (COC) の IVM 能および胚発生能は、直径 3 - 6 mm の中卵胞 (MF) のそれらに比べて著しく低い。IVM 中の細胞内 cAMP と cGMP 量の劇的な変化は、卵母細胞の減数分裂再開に大きく関与している。そこで本研究では、ブタをモデルとして、IVM 前半 24 時間中の cAMP と cGMP 量の変動を、SF および MF 間で比較した。また、近年ヒトの生殖補助医療では、ゴナドトロピン注射の副作用の回避や、癌患者の妊孕性温存の手段として、卵巣刺激が不要な IVM が注目されているが、SF 由来ヒト卵母細胞を IVM に用いる培養液や培養条件等は未だ確立していない。よって本研究では、SF 由来ヒト COCs の IVM に適した完全合成培地の検討を行った。

IVM 前半 24 時間中のブタ小中卵胞由来 COC および裸化卵母細胞 (DO) 内の、cAMP と cGMP 量を ELISA 法により測定した。IVM 前半 24 時間中の SF および MF 由来 DO の cAMP と cGMP 量に変化はなく、SF と MF 間でも差は無かった。IVM 20 時間で MF 由来 COC の cAMP 量は、SF より高かった。IVM 0 および 10 時間において、MF 由来 COC の cGMP 量は、SF より高かった。以上の結果から、IVM 前半 24 時間での COC 中の cAMP と cGMP 量は、SF と MF 間で異なっていることが明らかになった。

Phosphodiesterase (PDE) 阻害剤を用いて COCs 中の cAMP および cGMP レベルを維持または増加させた時の、ブタ SF 由来卵母細胞の IVM 能および胚発生能に及ぼす影響を調べた。SF 実験区には、IVM 前半 20 時間に PDE4 特異的阻害剤 rolipram (100 μ M) または PDE5 特異的阻害剤 sildenafil (100 μ M) または非特異的 PDE 阻害剤 caffeine (10 mM) を添加した。IVM 44 時間後に、卵母細胞の核相を観察した。また、成熟卵選別後に電気刺激によって単為発生させ、胚盤胞期胚までの発生能を調べた。その結果、PDE4 特異的阻害剤を IVM の前半 20 時間添加すると、SF 由来卵母細胞の IVM 能および胚発生能が改善されることが明らかになった。これから、IVM 前半 20 時間において、COC 中の cAMP レベルを高く維持することが、体外成熟および胚発生に重要であることが考えられる。

無刺激下のヒト卵巣に存在する胞状卵胞由来の COCs の IVM 能を 2 種類の完全合成培地 (ブタ IVM で既に確立されている修正 Porcine oocyte Medium (mPOM) もしくは、ヒト卵胞液組成を参考に mPOM を修正して新規に作成した Human Oocyte Medium (HOM)) を用いて調べた。mPOM を用いた IVM 後の成熟率は、由来卵胞の直径が 5.1 - 6.0 mm および 2.1 - 5.0 mm に比べて、1.0 - 2.0 mm では低かった。けれども、IVM に HOM を用いると、由来卵胞の直径間で成熟率に差は無かった。さらに、1.0-2.0 mm の卵胞由来の卵母細胞の IVM 能は、mPOM に比べて、HOM では上昇した。

本研究の結果は、小卵胞由来卵母細胞の体外成熟能の改善に有用であり、家畜の体外生産やヒトの生殖補助医療の発展に貢献することが期待できる。

論文審査結果の要旨

本提出論文は、哺乳動物の卵巣中に多数存在するものの、これまで胚の体外生産のために利用されてこなかった。またヒトでは、ゴナドトロピンによる刺激後に卵巣から得た卵母細胞を体外成熟に供しても高い成熟率を得ることができず、生殖補助医療のボトルネックとなっている。本研究は、直径3 mm以下の小卵胞由来卵母細胞の体外成熟能の改善を目的として、卵丘細胞のサイクリックAMP及びサイクリックGMPの動態に着目し、最終的には小卵胞由来ヒト卵母細胞の体外成熟能の改善に成功した研究成果をまとめたものである。

先ず、直径3～6 mmの中卵胞由来卵丘細胞-卵母細胞塊と小卵胞由来のそれらのサイクリックAMP及びサイクリックGMPの動態を体外成熟培養の最初の20時間の間モニターし、それらの比較区間に大きな違いが存在することを明らかにし、サイクリックAMP及びサイクリックGMPのそれぞれのレベルの適切な調整が卵母細胞の成熟能を損ねないために重要であることを明らかにした。しかし、次に、小卵胞由来卵丘細胞-卵母細胞塊をサイクリックAMP特異的ホスホジエステラーゼで処理をした場合にのみその卵母細胞の体外成熟能が改善した。また、独自のヒト卵母細胞用体外成熟培地を作り、細胞膜透過性のジブチリルサイクリックAMPを体外成熟培養の前半にのみ添加することで、小卵胞由来卵母細胞の体外成熟能を有意に改善することを明らかにした。これらの成果は、ヒトの生殖補助医療技術で利用される卵母細胞の効率的な準備と利用に極めて有益な情報を提供する。

以上の知見は、実用的かつ効率的なヒト小中卵胞由来卵母細胞の利用技術として、さらにそれに係わる基礎資料として、高く評価できる。また、本提出論文が明らかにした知見は、先進国で深刻な問題となっている不妊を救う生殖補助医療技術の改善に役立つ。以上のことから、本学位審査委員会は、これらの成果をまとめた本論文の内容および参考文献を総合的に審査し、本論文は、博士（学術）の学位に値すると判断した。