

## 論文の内容の要約

氏名	佐藤 あかね
学位の種類	博士 (農学)
学府又は研究科・専攻	連合農学研究科 生物生産科学 専攻
指導を受けた大学	東京農工大学
学位論文名	イヌ卵子の体外成熟に及ぼす insulin-like growth factor-1 の影響

## 【論文の内容の要約】

多くの哺乳動物において、未成熟卵子の体外成熟培養(in vitro maturation: IVM)による成熟率は 80-90%と高い(ヒト:Coticchio et al., 2012; マウス:Fulka et al., 1995; ウシ: Rodrigues et al., 2016; ブタ:Coy et al., 1999)。一方、イヌ卵子の IVM による成熟率は 0-20%と低いままである(Chastant-Maillard S et al., 2011; Chebrou M et al., 2009)。Insulin like growth factor-1 (IGF-1)が卵子の成熟を促進する効果について、マウス(Kiapekou et al., 2005)、ウシ(Herrler et al., 1992)およびブタ(Xia et al., 1994)において報告されている。さらにイヌにおいて、卵胞の発育と並行して、血中 IGF-1 濃度が上昇することが報告されている(Reynaud et al., 2010)。よって、イヌ卵子の成熟に IGF-1 が関与している可能性が考えられる。そこで本研究では、イヌ卵子の成熟に及ぼす IGF-1 の影響について検討した。

第 1 章ではこれまでのイヌ卵子の IVM に関する研究の経緯と、本研究で IGF-1 に着目した背景について整理した。第 2 章において、イヌ卵子の IVM における IGF-1 の成熟促進効果について検討した。イヌ未成熟卵子を種々の濃度(0, 0.5, 5, 10 および 50 $\mu$ g/ml)の IGF-1 を添加した培養液で培養し、IVM 後に卵丘細胞の状態を評価した後、卵子を固定・染色し、核の状態から成熟ステージを評価した。その結果、第二減数分裂中期(metaphase II: MII)の割合が、50  $\mu$ g/ml IGF-1 添加区において有意に高かった。そこで次に、IGF-1 が成長因子として機能していることを確認するため、IVM 前後の卵子および卵丘細胞におけるインスリンレセプター(INSR)、IGF-1 レセプター(IGF-1R)および IGF-2 レセプター(IGF-2R)の遺伝子発現を調べた。その結果、IVM 後の卵丘細胞における IGF-1R が有意に上昇し、IGF-2R が上昇する傾向にあった。IGF-1 は IGF-1R または IGF-2R に結合した後、Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt および Ras/Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)経路を活性化する(Murphy and Hu, 2013)。このうち PI3K/Akt 経路は、細胞内で Phosphatase and tensin homolog (PTEN)により抑制されている。そこで、PTEN の阻害剤である bisperoxovanadium (bpV)を培養液中に添加することで、IGF-1 との相乗効果により PI3K/Akt 経路を活性化し、減数分裂を促進できるのではないかと考え、IGF-1 を含む培養液中に bpV を種々の濃度で添加した。しかしながら、卵子の成熟を促進する効果は見られなかった。以上、第 2 章の結果より、培養液中に至適濃度

で添加された IGF-1 は、成熟培養途中の卵丘細胞で発現が増加する IGF-1R または IGF-2R を介して、イヌ卵子の MII への成熟を促進することが示唆された。bpV により IGF-1 による成熟促進効果をさらに高めることはできなかったため、イヌ卵子の成熟には Ras/MAPK 経路がより強く関与している可能性が示唆された。第 3 章において、イヌ卵子は生体内で高プロジェステロン(P)濃度下で成熟することから(Fahiminiya et al., 2010)、イヌ卵子の成熟における P の役割を解明することを目的に、IGF-1 が卵丘細胞における P 産生に及ぼす影響ならびに培養液中に産生された P が卵子に及ぼす影響について検討した。供試個体は、血中 P 濃度およびエストラジオール濃度から、発情休止期、発情前期および発情後期に分類した。実験 1 において、卵丘細胞における P 産生関連遺伝子発現を quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR)を用いて調べた。実験 2 において、卵丘細胞から培養液中に分泌された P 濃度を検討した。実験 3 において、第 2 章と同様に卵子の成熟を評価した。

その結果、発情休止期においては、IGF-1 添加区において、ミトコンドリア(MIT)内にコレステロール(CHO)を取り込む StAR の発現が有意に高く、プレグネノロン(PRG)から P へ変換する酵素である HSD3B2 の発現が高い傾向にあり、卵子の変性率が有意に低かった。発情前期において、CHO から PRG へ変換する酵素である CYP11A の発現および卵子の MII 期率が IGF-1 添加区において高い傾向を示した。発情後期において、IGF-1 添加区における HSD3B2 の発現が高い傾向を示し、減数分裂再開率が有意に高かった。以上、第 3 章の結果より、IGF-1 は発情休止期において MIT 内への CHO の取り込みに寄与し、PRG から P への変換を促し、分泌された P が卵子の変性を抑制した可能性が示唆された。また、IGF-1 は、発情前期における CHO の PRG への変換を促進し、発情後期における PRG から P への合成を促進し、減数分裂の進行を促した可能性が示唆された。第 4 章において、イヌの肥満と血中 IGF-1 濃度および繁殖能力に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、血中 IGF-1 および関連物質濃度とイヌの体重ならびに卵子成熟の関係について検討した。その結果、血中グルコース(GLU)濃度と体重の有意な相関は見られなかった。その一方、高濃度に GLU を含む培養液中でイヌ卵子を培養した際に、減数分裂再開率が有意に低く、変性率が有意に高かった。さらに、体重と血中 IGF-1 濃度に有意な負の相関が見られた。以上、第 4 章の結果より、イヌにおいて、食事量の増加などによる血中 GLU 濃度の上昇による一定時間以上の卵胞液中の GLU 濃度の上昇や、体重増加による血中 IGF-1 濃度の低下により、卵子の成熟能が低下する可能性が示唆された。

以上、本研究により、IGF-1 は卵丘細胞に存在する IGF-1R または IGF-2R を介し、Ras/MAPK 経路の活性化をすることによる直接的作用、ならびに卵丘細胞からの P 分泌を刺激することによる間接的作用により、イヌ卵子の成熟を促進することが明らかとなった。また、イヌ生体においては、肥満に伴い血中 IGF-1 濃度が減少し、繁殖能が低下する可能性が示唆された。今後、IGF-1 に着目した卵子成熟機序のさらなる解明により、イヌ卵子の成熟培養技術の確立や育種・繁殖の効率化が進むことが期待される。