凍結保存によるウシ受精胚のミトコンドリア機能低下と品質管理機構を介した回復

林　武司

2021

＊東京農業大学　審査学位論文

目次

第１章　緒論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1

第２章　レスベラトロール処理が緩慢凍結したウシ受精胚におけるミトコンドリアと融解後の胚発生に及ぼす影響

第１節　緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4

第２節　材料および方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5

第３節　結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9

第４節　考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・18

第３章　レスベラトロール凍結前処理が融解後のウシ受精胚品質およびミトコンドリア DNA コピー数に及ぼす影響

第１節　緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・20

第２節　材料および方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・21

第３節　結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・27

第４節　考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・34

要約・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・38

Summary・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・39

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・41

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・48

第１章　緒論

わが国における畜産農家の飼養戸数は、高齢化等に起因する事業継続の困難さから減少が続いている。一方で飼養頭数は近年横ばいで推移しており、一戸当たりの飼養頭数の増加が進んでいる。

牛枝肉卸売り価格は景気の低迷等を背景として、平成 19 年度以降和牛去勢牛肉を中心に価格が低下したが、平成 23 年度以降は上昇に転じ、生産量の減少を背景に黒毛和牛枝肉単価は平成 28 年度に過去最高水準まで高騰した。平成 29 年度以降は最高水準を下回ってはいるものの、依然として高価格で推移している。一方で高い枝肉価格にも関わらず畜産農家の経営収支は低く、経営状況としては苦しい局面にある。この背景には、繁殖雌牛の減少に伴う肥育素牛の不足とそれによる素牛価格の高騰がある。

肥育素牛価格は上昇をつづけており平成 20 年度の 351 千円から平成 28 年度には 851 千円と 8 年間で約 2.4 倍も増加した。繁殖雌牛頭数が上昇に転じた後も依然として高水準で推移しており、黒毛子牛の生産力向上による素牛価格の適正化はわが国の畜産業における喫緊の課題である。

乳用種への黒毛和種受精胚の移植は、産子による酪農家の副収入になるとともに、黒毛和種子牛の生産を増やす有効な手段として期待されている。牛受精胚の移植はわが国では杉江らによってはじめて報告され、その移植数は年々増加し、平成 30 年度では年間 4 万 7080 頭、わが国の黒毛子牛の 9.7%を生産するまで普及した技術である（大呂.2019)。畜産分野において受精胚移植は遺伝的改良や、長期不受胎対策に有効な技術であるが、移植可能な胚のステージは限られており、受胚牛側の発情同期化が不可欠である。移植適期のレシピエントが準備できない場合は保存が必要となるため、胚の凍結保存は胚移植技術を活用するうえで必須の技術である。凍結保存は受精胚の長期保存、長距離輸送を可能にし、利便性の面では新鮮胚に比べ極めて活用の幅が広く重要な技術である。

ウシ胚の凍結保存は現場での取り回しが容易であるが、一方で凍結受精胚の受胎率は新鮮胚に比べて低い(農林水産省 HP)。この原因として凍結保存時の損傷が融解後の胚品質を低下させ、受胎率の低下を招いていると考えられる。この凍結由来の受精胚品質の低下の主要因としてミトコンドリア機能の低下があげられる（Do *et al.*2017、Hayashi *et al.* 2019)。ヒト卵子において、ミトコンドリア数は卵子の質を決める大きな要因であり、受精した卵子と非受精卵子を比較すると受精卵子のミトコンドリア含量が多いことが報告されている（Santos *et al.*2006)。さらにミトコンドリアの主要な機能の一つに ATP 合成があり、卵子では ATP 含量が高い方が発育性に優れているという報告がある(Van *et al.*1995、Stojkovic *et al.* 2001)。

凍結によるミトコンドリアの障害は電子顕微鏡によって観察されており (Gualtieri *et al.* 2009, Dai *et al.* 2015)、ヒツジ胚を用いた検討では、凍結によりミトコンドリア形状が膨

化状態にあることが報告されている（Dalcin *et al.*2013, Moussa *et al.*2014）。また凍結によるミトコンドリアゲノムや核ゲノムの損傷を示唆する報告もある（Hayashi *et al.*2019）。ミトコンドリアは細胞における ATP 合成の 80%以上を占めていることから、その損傷は細胞の生存とエネルギー代謝に重大な支障を来す。一方で融解後、胚を観察すると囲卵腔の再拡張、透明帯脱出や移植後の受胎等、新鮮胚に比べて低調ではあるが、回復が十分に認められ、移植により産子が得られることから、凍結によりうけた損傷は、その後の発育過程で回復すると考えられる。しかしながら、凍結融解後の胚内ミトコンドリアがどのように増減し、質を変化させ、受精胚の恒常性の維持に関与するのかは明らかにされていない。

ミトコンドリアが障害を受けると、品質管理機構が活性化し、ダメージを受けたミトコンドリアは除去される(Campello *et al.*2014)。細胞を用いた実験ではミトコンドリアの膜電位を喪失させると細胞のミトコンドリアは小さく分割し、その後、細胞中ミトコンドリア数の減少が認められる(Lyamzaev *et al.* 2008)。これらの機序は大変複雑ではあるが、よく知られているものでは膜電位が低下すると、PINK1 が外膜に蓄積しここに誘導された PARKIN がユビキチン化を促し、蛋白分解が誘導される経路、損傷を受けたミトコンドリアがオートファジーを介して分解されるマイトファジーの経路が示されている（Koyano *et al.*2014, Shiba-Fukushima *et al.* 2012）。細胞中でのミトコンドリア動態をリアルタイムで観察するには高度な細胞工学が必要であるが、簡易にこれをモニタリングする指標として、細胞外 DNA がある。Kansaku らは（2017）細胞のミトコンドリアに障害を与えた場合、細胞培養した培地中に放出されるミトコンドリアゲノム由来の細胞外 DNA が増減することから細胞内でのミトコンドリアの動態を追跡できることを示している。これらの報告から胚内ミトコンドリアの、凍結後の動的変化を従来の方法で観察するのに加えて、ミトコンドリアに由来する細胞外 DNA で評価することが出来ると考える。

豚の卵子を用いた研究では、卵子をミトコンドリア膜電位の脱分極剤（CCCP）で処理すると ATP が減少するが、その後卵子の発育能力が回復し発生能力に影響しない（Itami *et al.* 2015）。このとき卵子内ではミトコンドリアの DNA 複製が活性化し、TFAM 活性の上昇が観察され、さらに SIRT1 とリン酸化 AMPK の発現量が増える事が報告されている。

SIRT1 はヒストンの脱アセチル酵素であり、多くのタンパク質の制御にかかわっている。SIRT1 はその主要なターゲットである PGC1α や、その下流の TFAM を介してミトコンドリア合成を司る重要な制御因子である（Vendramin *et al.* 2017）。この SIRT 1 を活性化させる物質として代表的なものがレスベラトロールである。レスベラトロールはブドウや桑、ナッツの皮などに含まれているフラボノイドであり、その処理の手軽さや効果の範囲から非常に多くの研究がおこなわれている。その効果は細胞の代謝や炎症抑制等幅広く、特に抗老化の効果が期待されて利用されている。しかしながら、レスベラトロールの作用メカニズムはすべてが明らかになっているわけではなく、不明な点も多い。SIRT1 ノック

アウトマウスではレスベラトロールの効果が消失することから（Price *et al.* 2012）、レスベラトロールが SIRT1 を介して働いている説が有力視されているが、SIRT1 の N 末端部分にレスベラトロール結合部位があり、この部分の変異によりレスベラトロールが機能しなくなることから（Hubbard *et al.* 2013）、レスベラトロールが直接 SIRT1 に働きかけていると考えられている。また、cAMP 依存的な AMPK の活性化とそれに伴う NAD＋の増加が間接的に SIRT 1 の活性化をもたらす事や（Denu *et al.* 2012）、また AMPK の活性化には SIRT1 による LKB1 の脱アセチル化が必要であるため、レスベラトロールは様々な因子を介して SIRT1 の活性化を招くと考えている研究者もおり、その効果の分子的背景は注意深く考察する必要がある。一方で、レスベラトロールを用いて卵子や胚の品質を改善する試みは増加してきており、繁殖分野での応用も期待されている。レスベラトロールをマウスに給餌すると加齢による卵子の質や量的低下が抑制されることが報告されている（Liu *et al.* 2013）。また、ブタ卵子をレスベラトロールで処理すると卵子内のミトコンドリア活性が上昇し、ミトコンドリアの分解と合成が上昇し、胚発育が改善する（Sato *et al.* 2014）。この効果は SIRT1 阻害剤である EX527 で処理することにより失われることから、レスベラトロール処理により SIRT1 の活性化が起こり卵子内のミトコンドリア合成と分解を促進し、結果として卵子の質を改善したと考えられる。Gaviria ら(2019) はウシ初期胚へのレスベラトロール添加により活性酸素の生産を減少させ、活性ミトコンドリアの増加を抑制することができると報告している。本研究ではウシ胚を用い、凍結保存が胚に与える影響やレスベラトロールが受精胚に及ぼす影響の解明を主眼としながら、畜産現場での応用を視野に入れ各試験を設定した。１）ウシの初期胚盤胞を緩慢凍結し、凍結保存が受精胚に及ぼすダメージを調べるとともに融解後にレスベラトロール添加培地で培養することにより、受精胚の生存性に及ぼす影響について調べた。２）さらにウシやヒトにおいて胚移植の現場では、凍結胚は融解後培養を行わず速やかに移植に用いられている。そのため、凍結融解後長時間の培養時間を必要とする方法では、畜産現場での応用が難しく、胚移植の成績改善に貢献することができない。そこで、凍結前にレスベラトロールで処理を行いあらかじめ SIRT1 活性を上昇させた後、凍結保存を行うことで、融解後の受精胚の品質を改善しうるかを調べた。

これらの研究によりレスベラトロールを用いて凍結に起因する障害から品質管理機構を介しミトコンドリアの回復を促し、融解胚の質を改善することで、移植による受胎率が改善することを示した。

第２章　レスベラトロール処理が緩慢凍結したウシ受精胚におけるミトコンドリアと融解後の胚発生におよぼす影響

第１節　緒言

ウシ受精胚の凍結保存技術は、ウシ胚を畜産現場で広範囲に利用するために極めて重要な技術である。一方で、この技術には未解決の問題があり、融解された胚の生存性が低下することが報告されている（Dalcin *et al.* 2013、 Moussa *et al.* 2014）。そのため、凍結胚の生存率は新鮮胚と比べて未だに低いのが現状である（Do *et al.* 2017）。凍結による受精胚の品質低下の潜在的要因の一つとしてミトコンドリアの機能障害があげられる。凍結融解胚は ATP 含量が非凍結胚に比べて低いことが報告されており、凍結によるミトコンドリア機能低下が受精胚の品質を低下させている一因と考えられる（Hayashi *et al.* 2018）。さらに新鮮胚においても ATP が低いと胚の発達能力が低い報告もある（Brevini *et al.* 2005）。凍結によるミトコンドリアの形態的な変化については、電子顕微鏡検査による観察で、凍結解凍卵母細胞のミトコンドリア膜損傷や(Gualtieri *et al.* 2009, Dai *et al.* 2015)、ミトコンドリアの膨化が報告されていある（Dalcin *et al.* 2013）。これらの報告から、凍結保存することで受精胚の生存性に重要なミトコンドリアの量と質の低下が誘起されていると考えられる。そこで、凍結保存によって誘発された損傷ミトコンドリアの回復は、凍結融解後の受精胚の生存率を改善するための対策になりうる。ただし、細胞内ミトコンドリアの維持には、分解、生合成、融合、分裂等の複数の過程が存在するため、胚内のミトコンドリア動態や質をリアルタイムに観察することは困難である(Sato *et al*. 2014, Youle *et al*. 2012)。Hara ら（2018）はレスベラトロールが凍結融解したウシ８細胞期胚のミトコンドリアの合成と分解を介して胚の質を回復させたことを報告している。この報告では、レスベラトロールによって誘発されるミトコンドリアの分解と合成は、胚の使用済み培養液中のミトコンドリアゲノムに由来する細胞外 DNA（ミトコンドリア無細胞 DNA； mt-cfDNA）の増加として反映されることを示した。レスベラトロール（trans-3,5,4'-トリヒドロキシスチルベン）は、ブドウ、ピーナッツ、ベリーなどの多くの植物種に含まれるファイトアレキシンであり、ミトコンドリアの恒常性および他の細胞プロセスの調節に重要な役割を果たす、クラス III ヒストン脱アセチル化酵素である SIRT1 の活性化因子である（Gomes *et al*. 2013）。本研究では、レスベラトロールが凍結融解ウシ胚盤胞の生存性に及ぼす影響を調査し、従来のミトコンドリアの指標に加えて、使用済み培地中の mt-cfDNA を検証することにより凍結後のミトコンドリアの動態を調べた。

第２節　材料および方法

1）試薬、培地および培養条件

特に明記しない限り、すべての試薬は、Sigma-Aldrich（米国ミズーリ州セントルイス）から購入した。 Medium 199（12340-030、Gibco、Grand Island、NY、USA）、5%ウシ胎児血清（FCS）（15K116、Nichirei Bioscience Inc.、東京、日本）、100IU / ml ペニシリン、および 100 μg / ml ストレプトマイシンを添加し、卵母細胞の成熟に使用した。レスベラトロール（富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本）をエタノール（99.5%）で 2000 倍に希釈して、使用濃度 0.5 μM（ストック溶液の濃度、1 mM）として使用した。レスベラトロールの使用濃度については、既報の胚盤胞の研究に基づき選択した（Abe *et al.* 2017, Hayashi *et al.* 2018）。試験において、対照区では試験区と同量のエタノール（99.5%）を媒剤として培地に添加した（最終濃度：1/2000）。体外受精培地として、5mM カフェイン、5mM テオフェリンおよび 10%BSA を添加して BO 液を用いた（Brackett *et al.* 1975）。体外培養後 6 日間はグルコースを除いた修正 199 培地（Mori *et al.*2012）に 10%FCS を加えて用いた。6 日目で 10%FCS を添加した M199 に培地交換を行った。気相条件は CO_2：3%、O_2：10%、N_2：87%で温度は 38℃、湿度は最高湿度で培養した。

2）卵巣および卵子採取

ウシ卵巣は地域の食肉センターから PBS 中に保管し、25℃で維持して 3 時間以内で研究室に運び入れた。卵子卵丘細胞複合体（COCs）は 18G の針を装着したシリンジを用い、3~8 ㎜の卵胞から吸引採集した。

3）体外受精および発生

COCs を成熟培地内で 20 時間成熟培養後、BO 培地ドロップ内へ移動させたのち、凍結融解精液を用い 5 時間媒精した。その後胚盤胞を、10%FCS を添加したグルコースフリーの修正 199 で培養した。媒精から 2 日後、8~16 細胞期の受精胚を包む卵丘細胞をピペッティングで除去した。さらに 6 日後、グルコースフリーの修正 199 から、10%FCS 添加 199 に培地交換を行った。受精胚は IETS のマニュアル(Robertson *et al.*1998)に従い分類し、１～2 グレードのもののみ試験に用いた。

4）受精胚の凍結保存と融解

受精胚は 20%NBCS を含む PBS で洗浄後、凍結液（5% ethylene glycol, 6% propylene glycol, 0.1 M sucrose and 4 mg/ml BSA in PBS）に移動させた。受精胚は凍結液に移した後、0.25ml ストロー(IMV technologies, L'Aigle, France)内に封入し、常温（20-25℃）で 15 分平衡させた。その後、−7℃のエタノールを充填したプログラムフリーザー（Fujihira industry

Co. Ltd, Tokyo, Japan）に入れ、液体窒素で冷却したピンセットを用い、植氷を行った後、凍結プログラムを実行した。凍結プログラムは−7℃で 10 分間維持させた後、−0.3℃/min の速度で−30℃まで温度を低下させた。凍結されたストローは試験に用いるまで液体窒素内で保存した。試験時はストローを液体窒素内から取り出し、室温に 10 秒間さらした後、30℃の温湯内にて 20 秒間融解した。次に受精胚を 5%FCS 含有 199 内で 24 時間培養し、胚の生死について形態学的に判断した。

6）ATP 含量の測定

個々の受精胚の ATP 含量については、ルシフェリンールシフェラーゼ反応によって生成される発光を基に測定した。試薬は ATP Assay Kit（TOYO B-Net CO., Ltd., Tokyo, Japan)を用い発光はルミノメーターを用いて、測定した(Spark Control, Tecan Japan Co., Ltd., Kanagawa, Japan)。

7）胚盤胞および使用培地からの DNA 抽出

受精胚の DNA について、6µl の融解溶液(20 mM Tris, 0.4 mg/ml proteinase K, 0.9% Nonidet P-40, and 0.9% Tween 20)内で 55℃、30 分間培養後、98℃で 5 分間培養することで抽出した。凍結融解胚は、試験区はエタノールで融解した 0.5µM レスベラトロールを添加し、対象区では溶媒であるエタノールのみ(0µM レスベラトロール)を添加した 5%FCS 含有 6µl ドロップの M199 で 1 日培養した。さらに、新鮮胚をエタノールのみを添加した同様の 5%FCS 含有 6µl ドロップの M199 で培養した。培養後、胚盤胞の生存率を実体顕微鏡で調べ、生存胚の胚盤胞の使用済み培地を DNA 抽出のために収集した。受精胚の使用済み培地から DNA を取得するために、6 µl の培地を等量 6 µl の 2×mtDNA 抽出バッファー（40 mM Tris、0.8 mg / ml プロテイナーゼ K、1.8%Nonidet P-40、および 1.8%Tween 20）と混合し、55° C で 30 分間培養した後、98° C で 5 分間培養した。

8）培地および胚盤胞におけるミトコンドリア DNA（mtDNA）コピー数の定量化

mtDNA コピー数（Mt 数）は、Corbett Rotor Gene 6000 リアルタイムロータリーアナライザー（Corbett Research、シドニー、オーストラリア）を使用したリアルタイム PCR 方法で測定した。リアルタイム PCR は、95° C で 3 分間の初期解離反応を行った後、98℃で 5 秒、59℃で 11 秒を 1 サイクルとし、40 サイクル繰り返した。プライマーセットは、Primer-BLAST を使用して設計した（NC_006853.1、Forward：5'-GTAACCGCACACGCATTTGT-3'、Reverse：5'-GGAATGAGGGAGGGAGGAGT-3'、短い配列：5858〜6014、157 bp）。Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を使用してプラスミドベクターにクローニングされた PCR 産物を外部標準とし

て連続希釈し、各アッセイにおける標準曲線を作成した。また使用前に PCR 産物はシークエンスによって確認した。

9）MtDNA 完全性の分析

新鮮胚（非凍結保存胚、n = 5）および凍結融解胚（融解直後、n = 5）を 24μl の DNA 抽出バッファーに移し、上記と同様に胚盤胞から DNA を抽出した。さらに MtDNA の 2 つの異なる対象配列を基設計したプライマーセットを用いてリアルタイム PCR を実施した (long sequence: 736–7156, 6321 bp; forward primer: 5'-ATACCAAATAGGGTTAAATTCTAASTAA-3', reverse primer: 5'-ATGATGAAAACTATTAGTATAACTGCTG-3'; and short sequence: 5858–6014, 157 bp; プライマーは mtDNA 定量に使用したものと同様)。抽出した各 DNA サンプル（6 μl）をリアルタイム PCR に使用した。また、測定は二回行いその平均 CT 値を決定し、相対 Mt 数の予測に使用した。新鮮（非凍結）胚の平均 Mt 数を 1.0 とし、式 $2^{\text{fresh-CT}} / 2^{\text{frozen-CT}}$ を使用して、凍結胚の相対 Mt 数を決定した。長鎖ミトコンドリア配列を標的とする PCR は、95℃で 10 分間の初期解離反応に続いて、95℃で 20 秒間、59℃で 30 秒、および 72℃で 3 分を 40 サイクル行った。短鎖ミトコンドリア配列を標的とする PCR のプログラムは、胚の Mt 数を測定したものと同様のものを使用した。ミトコンドリアゲノムの完全性分析は合計 80 個の胚盤胞（16 回実施）を用いて各実験グループ（新鮮または緩慢凍結および融解胚）で実施した。

10）免疫染色

胚盤胞は 4%パラホルムアルデヒド内で 1 晩固定し、既報の免疫測定を実施した(Sato *et al*., 2014)。一次抗体は、rabbit polyclonal anti-SIRT1 (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)または mouse monoclonal anti-double-strand DNA (dsDNA) (1:200; Abcom, Cambridge, UK)のいずれかを使用した。二次抗体は anti-rabbit IgG (H+L) (F (ab')2 fragment, Alexa Fluor 555 Conjugate; 1:1000; Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA) もしくは goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 conjugate (1:500; Cell Signaling Technology Inc. ,Tokyo, Japan)をそれぞれ使用した。その後胚を DAPI(4′,6-diamidino-2-phenylindole)入り退色防止剤(ProLong™ Gold, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)と共にスライドガラス上で封入した。Leica Application Suite Advanced Fluorescence（LAS AF）ソフトウェア（Leica、Wetzlar、Germany）を搭載した、Leica　DMI 6000B 顕微鏡で胚を観察した。SIRT1 発現を調べるために、胚盤胞全体の画像を取り込み、発現レベルを DAPI 染色により決定された胚盤胞の総細胞数で割った。胚盤胞の dsDNA の画像を取得するために、各胚の最大径領域（赤道面）を 5 つの 0.03 μm 厚のスライスで撮影し立体画像を構築した。画像処理は、3D deconvolution software（Leica、Wetzlar、ドイツ）を使用して処理した。さらに各実験について、一次抗体なしで染色され

たネガティブコントロール胚の非特異的蛍光強度も調べ、すべての測定値から引いた。蛍光強度は、蛍光顕微鏡（ライカ）で観察され、ImageJ ソフトウェア（NIH）を使用して定量化した。

11）統計解析

本試験で得られたデータについて、2 つのグループ内のデータの比較は、スチューデントの t 検定を使用した。3 つのグループ間のデータは、one-way ANOVA の後に Tukey’s Post Hoc Test を使用して分析した。分析の前に、発生率はアークサイン変換した。胚の生存率はカイ二乗検定を行った。すべての統計処理において $P < 0.05$ を有意差の基準とした。

第３節　結果

凍結融解胚のミトコンドリア機能に対する緩慢凍結の影響を評価するために、これらの胚の ATP 含有量を測定したところ、融解後に有意に低下することが分かった(Fig. 1-A; 2.17 ± 0.16 vs. 0.94 ± 0.07 pM, P < 0.05)。さらに、mtDNA の凍結保存による損傷の頻度は短いミトコンドリアシーケンスよりも長いミトコンドリアシーケンスの方が高いという前提で、リアルタイム PCR により mtDNA 完全性を調査した。短いシーケンスを対象としたリアルタイム PCR によって明らかになった凍結融解胚に対する新鮮胚の Mt 数の比率は、新鮮胚と凍結融解胚で差は見られなかった (Fig. 1-B;Fresh; 1±0.07 vs Frozen; 1.15±0.09)。長いミトコンドリアシーケンスを対象とするリアルタイム PCR によって決定された比率は、凍結融解胚では有意に低かった(Fig. 1-C; Fresh 1.0 ± 0.15, Frozen; 0.39 ± 0.06, P < 0.05)。さらに、凍結融解胚の Mt 数の比率（長いシーケンス/短いシーケンス）でも有意に低かった(Fig. 1-D, Fresh 1.0 ± 0.27, Frozen; 0.31 ± 0.08, P < 0.05)。次に、胚盤胞の細胞質に存在する二本鎖 DNA(dsDNA)に対する凍結保存の影響を免疫染色により調べた。Fig.2 にみられるように、非凍結状態(新鮮胚)で観察された胚盤胞(A)と比較して凍結融解した胚盤胞(B)は、胚の内部に多くの凝集した dsDNA があり、さらに胚表面および透明帯にも付着した dsDNA が観察された。また凍結融解した胚盤胞を 24 時間培養すると、生存胚の mtDNA コピー数は新鮮胚よりも凍結融解胚で有意に少なかった(Fig.3)。凍結融解した胚盤胞を、レスベラトロール（0(対照)または 0.5 μM）を添加した培地で 1 日間培養したところ、レスベラトロール処理は、胚盤胞における SIRT1 の発現レベルを 1.58 倍増加させた（Fig.4）。1 日間培養後の生存率は対照群よりレスベラトロール処理した胚盤胞の方が大きかったが(Table 1;52.3% vs. 68.2%, respectively, P < 0.05)、一方で胚盤胞の総細胞数は処理間で差はみられなかった。また、レスベラトロール処理は、融解胚の ATP 含有量を有意に減少させた（Fig.5-A；1.31 ±0.1 vs. 1.08±0.08、P<0.05）が、融解後の胚盤胞の MtDNA コピー数は、レスベラトロールと対照群で同等であった(Fig.5-B;Mt-DNA copy number 281,008 ± 51,019 vs. 209,600 ± 29,834, P = 0.23)。

新鮮胚（非凍結保存）は、レスベラトロールのストック溶媒(エタノール)のみを含む 6 μl ドロップで個別に培養し、凍結融解胚は、レスベラトロールまたは溶媒のみを含む 6 μl ドロップで個別に培養した。1 日間培養後、形態的に胚盤胞の生存率を決定し、生存した胚盤胞があったドロップ培地（使用済み培地サンプル）をそれぞれ収集し、合計 17 個の使用済み培地サンプルを使用して、mt-cfDNA 含有量を測定した。新鮮胚の使用済み培地の mt-cfDNA 含有量は、6μl 培養液あたり 152.6±35.4 であり、凍結融解胚では、6μl 培養液あたり 325.7±78.9 に増加した(Fig.6)。ただし、この二つのグループ間に有意差は認められなかった。一方で、レスベラトロールで処理を行った胚の使用済み培地中の mt-cfDNA 量は新

鮮胚に比べ有意に高くなった（Fig.5;732.7±176.7、P＜0.05）。

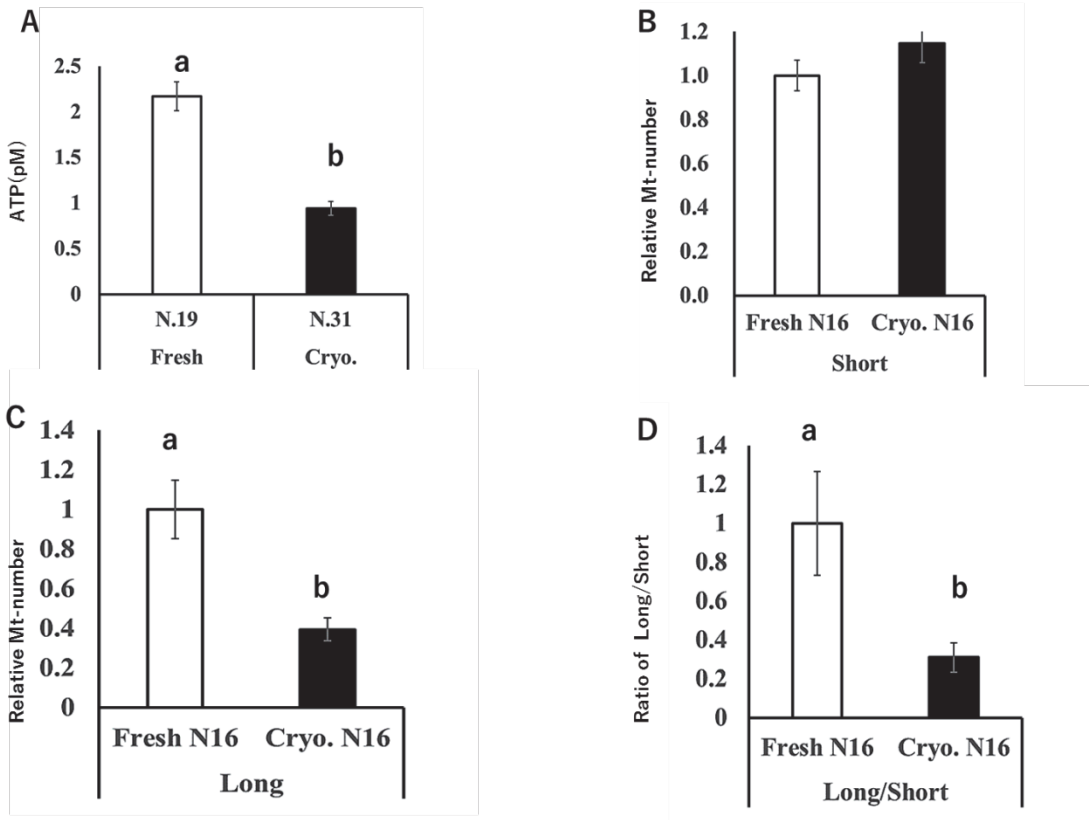

Figure1.凍結融解胚盤胞の ATP 含量およびミトコンドリア完全性に対する凍結保存の影響

A) 新鮮および凍結融解胚盤胞（解凍後 30 分）の ATP 含有量（pM）を測定した。
B-C) 短鎖および長鎖ミトコンドリア配列を標的とするリアルタイム PCR により予測される相対 Mt 数。新鮮胚を 1.0 とした相対値を示す。
D）Mt 数の比率（長鎖シーケンスをターゲットとするリアルタイム PCR によって予測される Mt 数/短鎖シーケンスをターゲットとするリアルタイム PCR によって予測される Mt 数）
N.は検査された胚の数を表し、データは平均±標準誤差として表示した。
ab；異なる a-b 間は $P<0.05$ で有意差あり

Hayashi *et al.*(2019)Animal Science Journal

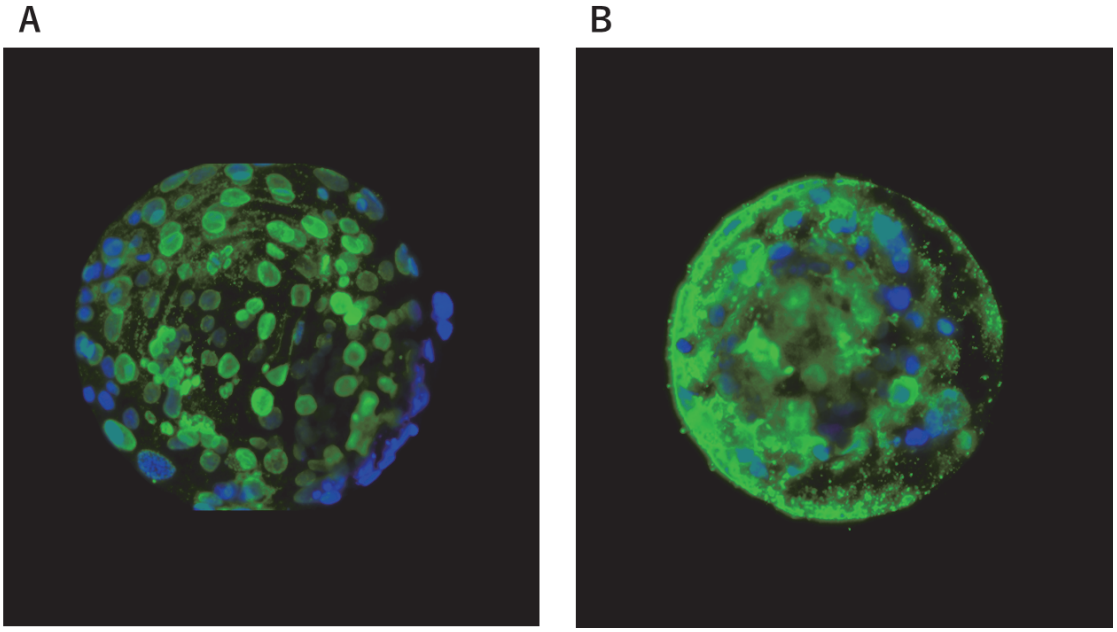

Figure 2. 融解直後の胚盤胞 dsDNA における凍結保存の影響

A）新鮮胚
B）凍結融解胚の代表的な写真
　緑色は dsDNA を表し、青色は核を表す。

Hayashi *et al.*(2019)Animal Science Journal

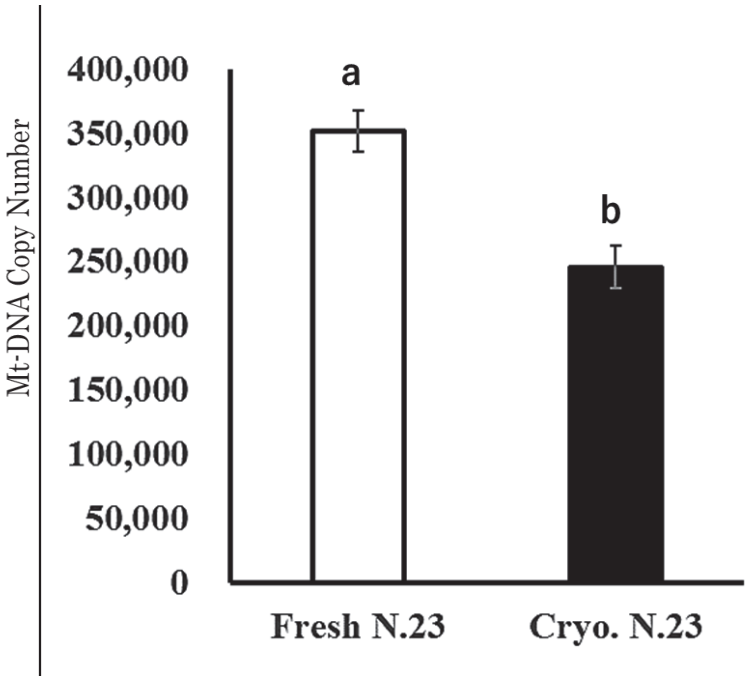

Figure3. 胚盤胞のミトコンドリア DNA コピー数に対する凍結保存の影響

新鮮または凍結融解した胚盤胞を 24 時間培養し、胚のミトコンドリア DNA コピー数を調べた。
N.は検査された胚の数を表し、データは平均±標準誤差として表示した。
ab；異なる a-b 間は P＜0.05 で有意差あり

Hayashi *et al.*(2019)Animal Science Journal

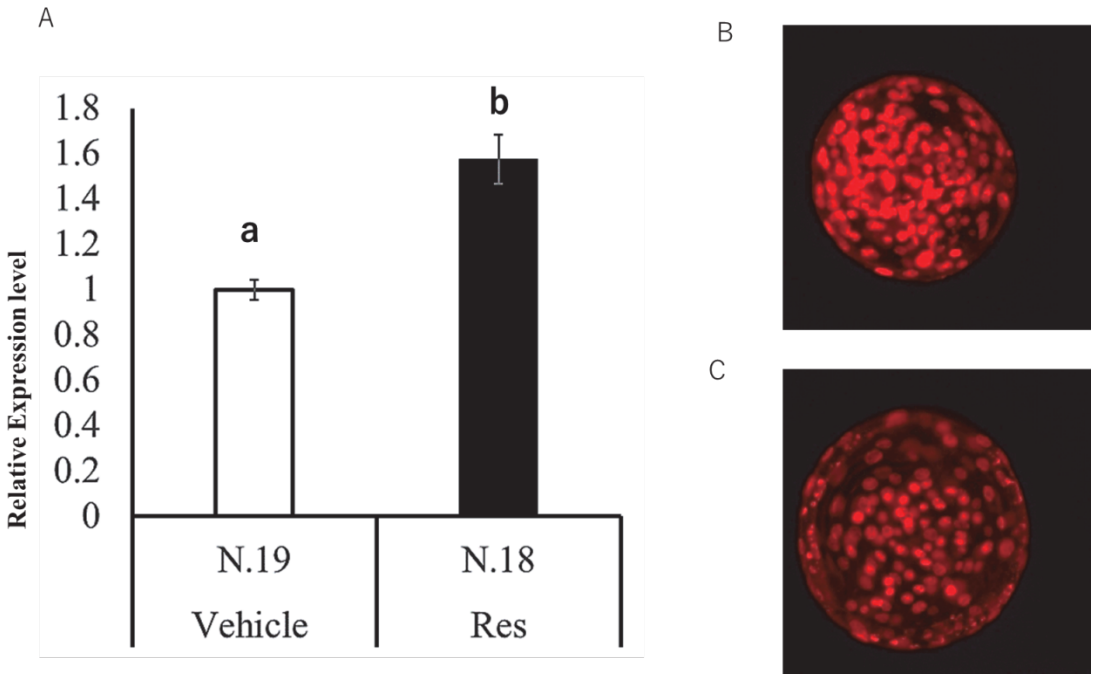

Figure4.　胚盤胞における SIRT1 発現レベル差と代表的な写真

A）未処理胚の発現レベルを 1.0 と定義した場合の SIRT1 の相対発現レベル。

B-C）レスベラトロール処理または未処理条件下で 24 時間培養した凍結融解胚での SIRT1 発現の写真。

N.は検査された胚の数を表し、データは平均±標準誤差として示した。

ab；異なる a-b 間は P＜0.05 で有意差あり

Hayashi *et al.*(2019)Animal Science Journal

Table1.レスベラトロールが凍結融解胚における生存率と細胞数に及ぼす影響

	Suvival rate		Cell number	
Res.(μM)	No.	(%)	No.	Ave.±SEM
0	56/107	(52.3) a	17	108.6 ± 9.1
0.5	73/107	(68.2) b	21	117.3 ± 10.8

ab；異なるa-b間はP＜0.05で有意差あり

Hayashi *et al.*(2019)Animal Science Journal

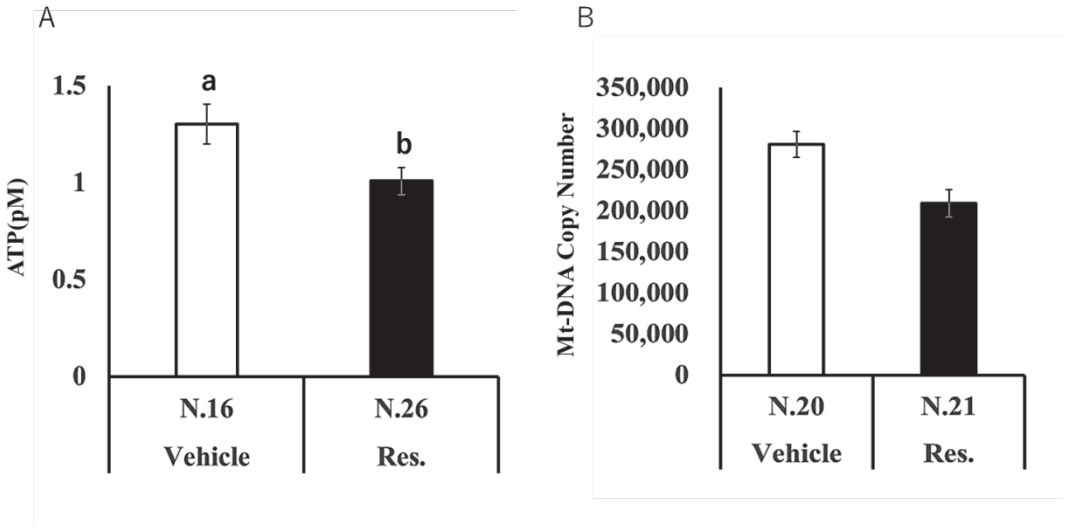

Figure5. レスベラトロール処理または無処理で培養した凍結融解胚の ATP 含有量と MtDNA 数。

凍結胚盤胞を融解し、媒体または 0.5 μM レスベラトロールを含む培地で 24 時間培養し、その後胚の ATP（A）およびミトコンドリア DNA コピー数（B）を測定した。
N.は検査された胚の数を表し、データは平均±標準誤差として示した。
ab；異なる a-b 間は P＜0.05 で有意差あり

Hayashi *et al.*(2019)Animal Science Journal

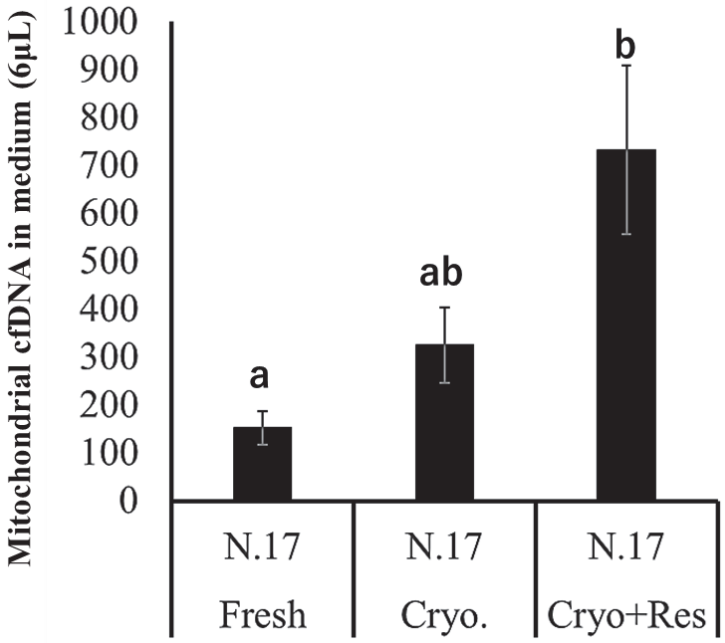

Figure6.　胚盤胞の使用済み培地中の mt-cfDNA 量に対するレスベラトロールの効果

新鮮胚および凍結融解胚についてレスベラトロール含有培地で 1 日間培養した。胚が形態学的に生存可能であった培地のミトコンドリア無細胞 DNA（mt-cfDNA）を調べた。N.は検査された胚の数を表し、データは平均±標準誤差として示した。
ab；異なる a-b 間は P＜0.05 で有意差あり

Hayashi *et al.*(2019)Animal Science Journal

第４節　考察

本研究では、胚盤胞の凍結保存により、胚のミトコンドリア機能とゲノムの完全性が低下することが明らかになった。さらに凍結融解後 24 時間の胚盤胞では新鮮胚に比べてミトコンドリア数(Mt 数)の減少が認められた。レスベラトロール処理は Mt 数と ATP 含有量の減少をひきおこし、その後品質管理機構によるミトコンドリアの除去を活性化させ融解胚の生存性を向上させた。またこの除去は融解後の生存胚盤胞の使用済み培地内の mt-cfDNA の増加という形で観察された。

凍結処理は、融解卵子や胚盤胞の発生能力や ATP 含量が低下することから、胚盤胞に負の影響をもたらすことは広く知られている(Shi *et al*. 2007; Zhang *et al*. 2009; Dai *et al*. 2015; Chen *et al*. 2016)。Zhao ら（2011）は融解後の ATP 含有量は、ガラス化融解したウシ卵母細胞では低かったと報告した。本試験でも凍結融解後の胚盤胞は、新鮮胚よりも ATP 含量が低く、これらの報告と一致した。さらに、凍結融解胚の ATP 含有量は、同じ条件下で調べた新鮮胚と比較して、24 時間の培養後もまだ低かった（1.31 pM、Figure5-A）。さらに、凍結融解胚のミトコンドリアコピー数も新鮮胚と比較して低く(Fig. 3)、これらの結果は、凍結保存が胚盤胞のミトコンドリアの機能を低下させることを示唆している。また電子顕微鏡による観察では、凍結保存がミトコンドリアの形態に影響を与えることが明らかになっている（Dalcin *et al*. 2013）。本研究では、短い mtDNA シーケンスと長い mtDNA シーケンスをターゲットとする 2 つのプライマーセットを使用したリアルタイム PCR により、凍結保存によるミトコンドリアの損傷について調べた。この方法は、長いおよび短い mtDNA シーケンスをターゲットとするリアルタイム PCR を使用して、ヒト神経芽細胞腫細胞の DNA の完全性を評価した過去の研究（Rothfuss *et al*. 2010）においても同様の論理で用いている。凍結胚においてミトコンドリアの長い配列をターゲットにしたリアルタイム PCR により決定された Mt 数は少なくなり、短い配列では新鮮胚と大きな違いは観察されず、両者の比は mtDNA 損傷のため PCR が効率よく増えなかった方が凍結胚である事を示唆しており、ミトコンドリアのゲノムの障害頻度が凍結胚のほうが高いことを示している。さらに免疫染色により、細胞質内および凍結融解胚の表面上に凝集した dsDNA が明らかになった。このことは小さく断片化された DNA が凍結胚の細胞質に存在することを示しており、凍結保存が細胞小器官と DNA の完全性を損なう事を示唆している。損傷したミトコンドリアの分解は細胞内の恒常性を維持するために必要である(Wu *et al*. 2011, Mc Lelland *et al*. 2014)。それゆえ、融解胚盤胞では、損傷したミトコンドリアは融解後の培養中に除去されると考えられる。レスベラトロールは、SIRT1 の強力な活性化因子であり、細胞の恒常性の調節と維持に必要なミトコンドリアの品質を高めることができる(Price *et al*. 2012, Sosulski *et al*. 2015)。ブタ卵母細胞では、体外成熟培地にレスベラトロールを添加すると、卵母細胞の発育能力が向上し、SIRT1 の活性化を通じてミトコンドリアの分解と生合成が

促進される(Sato *et al*. 2014)。一方で他の報告では、レスベラトロールはガラス化されたブタ卵母細胞の発達能力を改善したが、作用メカニズムは不明としている(Santos *et al*. 2018)。本研究では、凍結融解後の胚培養液にレスベラトロールを添加すると、SIRT1 の発現レベルが向上し、融解後の胚盤胞生存率が向上した。興味深いことに、凍結融解胚をレスベラトロール処理すると、ATP 含有量が大幅に減少し、レスベラトロール非処理（対照群）の胚盤胞と比較して Mt 数が減少したが、胚盤胞の総細胞数は両方の場合で差は認められなかった。割球数に比較して Mt 数が少ないことは、胚盤胞からのミトコンドリアが除去された可能性を支持すると考えられる。大型動物における胚のミトコンドリア量を継時的に観察することは困難であるが、使用済み培地に mt-cfDNA が存在することは、ミトコンドリア変性の有用なマーカーであると報告されている(Hara *et al*. 2018)。我々の仮説どおり、レスベラトロールと共に培養した胚盤胞の使用済み培地で、mt-cfDNA 含有量が高いことが分かった。顆粒膜細胞をミトコンドリアの脱共役剤で処理すると、細胞は細胞死を伴わずに培地中により多くの mt-cfDNA を分泌したことが報告されている(Kansaku *et al*. 2018)。したがって､胚盤胞中の mtDNA の減少と同時に観察される培地での mt-cfDNA の増加は、レスベラトロールがミトコンドリアの分解を促進し、培地に mt-DNA を分泌したことを示唆していると考えられる。ただし、割球からの mtDNA 分泌のメカニズムはまだ不明であり、今後の研究で対処する必要がある。

第３章　レスベラトロール凍結前処理が融解後のウシ受精胚品質およびミトコンドリア DNA コピー数に及ぼす影響

第１節　緒言

前章において、凍結融解後のレスベラトロール処理により受精胚における SIRT１の発現が促進され、損傷ミトコンドリアの排出と共に融解胚の生存性が向上したことを明らかにした。しかし、畜産現場やヒトの不妊治療現場では、凍結胚は融解後速やかにレシピエントへ移植することが一般的であり、融解後に長時間培養処理を行うことは難しく、現場での応用が即可能な技術であるとは言えない。そこで、本試験では現場での応用を視野に入れ、レスベラトロールで処理し SIRT1 の活性をあらかじめ上昇してから凍結する手順で、融解後のミトコンドリア機能および胚の品質が改善できるのかを検証した。

Itami ら(2015)はブタ卵母細胞をミトコンドリア脱共役剤（CCCP）で処理して人為的にミトコンドリア機能障害を起こすと、ミトコンドリア DNA コピー数が増え TFAM 発現が上昇したことからミトコンドリアの新規合成が誘発されたと報告している。さらに、ブタ卵母細胞を SIRT1 の活性化因子であるレスベラトロールで処理すると、ミトコンドリアの合成と分解が亢進され、卵子の胚盤胞期胚への発生が改善した(Sato *et al.* 2014)。さらにウシを用いた研究では、卵母細胞の発育培地や培養成熟培地へのレベラトロール添加は、卵母細胞のミトコンドリア機能と体外発育を改善し、成熟培地では卵子のミトコンドリア数や受精率を改善することが示されている(Sugiyama *et al.* 2015、Takeo *et al.* 2014)。これらの報告から、凍結保存前の SIRT1 の亢進処理は、ミトコンドリアの凍結損傷からの胚の回復を補助し、凍結融解胚の受胎率を改善する可能性があると考えられる。

これらのことから凍結保存前に胚をレスベラトロールで前処理し、その後凍結融解の胚の生存率、ミトコンドリア数、および受胎率に対する処理の影響を調べた。

第２節　材料および方法

1）試薬、培地および培養条件

特に記載のない限り、すべての薬物は Sigma Chemical Co.（米国セントルイス）から購入した。 体外成熟には、5%ウシ胎児血清（FCS、55301105、Moregate Biotech、オーストラリア）を添加した培地 199（GIBCO、Invitrogen）を使用した。 レスベラトロール（和光純薬工業株式会社、大阪、日本）はエタノールに融解し、最終濃度が 1000 倍となるように希釈した。各実験では、対照区に試験区と同じ量のエタノールを加えた。IVF 培地として Brackett and Oliphant（BO）(Brackett *et al.* 1975)培地を使用した。 BO 培地には、5 mM caffeine、5 mM Theophylline、および 10%Fatty acid-free BSA を添加し、受精後 6 日間、胚を 10%FCS、100 IU / ml ペニシリン、および 100 µg / ml ストレプトマイシンを含み、グルコースを除いた m-199 培地 (Mori *et al.* 2012)で培養した。 受精胚は 6 日齢（IVF=0 日）で、培地は 199 に 10%FCS を添加したもの（IVC 培地）に変更した。培養中のインキュベーター内の 気相条件は、IVM、IVF、IVC において、3%CO_2、10%O_2、87%N_2、温度は 38℃とした。

2）卵巣および卵子採取

卵巣は地元の食肉処理場で収集され、抗生物質を含む 25℃のリン酸緩衝生理食塩水内で保管し、3 時間以内に研究室に運ばれたものを用いた。卵丘卵母細胞複合体（COCs）は、18G 針をシリンジに装着し、卵胞から吸引し収集した。

3）体外成熟、受精、発生培養

COCs は IVM 培地で 20 時間成熟し（4well-dish:50 COCs / 500 µl）、その後 COCs を BO 培地（50 COCs /ドロップ）の 100 µl ドロップで凍結融解した精子と共培養した。媒精時間は 5 時間とし、その後 COCs を無グルコース IVC 培地に移した（4well-dish: 50 胚 / 500 µl）。 媒精から 2 日後、受精胚をピペッティングで周囲の卵丘細胞から剥がし、続いて顆粒膜細胞シート上で共培養した。 培養 6 日目（IVF = 0 日目）に、培養培地を無グルコース IVC 培地から 10%FCS および抗生物質を含む TCM-199（GIBCO Invitrogen）に変更した。

4）過剰排卵処置と受精胚の回収

過剰排卵処置について Fig.7 に示した。正常な黄体を有する黒毛和種雌牛に 1.55 g のプロゲステロンを含む膣内留置型プロジェステロン製剤（PRID）（PRID DELTA、CEVA Salud Animal、バルセロナ、スペイン）を挿入した。 PRID 挿入日を 0 日と定義し、6 日目から FSH（合計 18 AU、アントリン、東京、共立、東京）を 3 日間漸減投与した。 8 日

目の朝に、$PGF_{2}\alpha$（d-クロプロステノール、ダルマジン、共立、東京、日本）を投与し、その 8 時間後に PRID を除去した。 10 日目、$PGF_{2}\alpha$ 投与から 56 時間後に GnRH（Buserelin、Estmal、Intervet、大阪、日本）を投与し、さらにその 8 時間後に人工授精を実施した。 子宮内の受精胚は、授精後 6.5 日で非外科的な灌流処置によって回収された。 受精胚は IETS マニュアル(Robertson *et al.* 1998)によって分類され、グレード 1 または 2 に分類された胚のみを試験に使用した。

5）ミトコンドリア DNA コピー数の評価

胚のミトコンドリア DNA 数は、Rotor-Gene 6500 リアルタイムロータリーアナライザー（Corbett Research、シドニー、オーストラリア）を使用して、一部修正を加えて実施した(Takeo *et al.* 2013)。手法として、各胚を 6 µl の溶解バッファー（20 mM Tris、0.4 mg / ml プロテイナーゼ K、0.9%Nonidet-40、0.9%Tween 20）で 55° C で 30 分間、続いて 5 分間 95° C を保持した。PCR プライマーは 5'-ATTTACAGCAATATGCGCCC-3 ' および 5'-AAAAGGCGTGGGTACAGATG-3'であり、酵素は SsoAdvancedTM Universal SYBR Green mix（Bio-rad、Hercules CA、米国）を用いた。 PCR は、95℃で 3 分間の初期変性を行った後、98℃で 5 秒間、59℃で 11 秒間を 40 サイクル行った。 SYBR Green 蛍光は、各伸長ステップの終わりに測定した。外部標準のコピーを表す 10 倍連続希釈を使用して、実行ごとに標準曲線を作成した。使用した外部標準は、Zero Blunt TOPO PCR クローニングキット（Invitrogen、Carlsbad、CA、USA)、ベクターにクローニングされた対応する遺伝子の PCR 産物を用いた。ベクターは使用前にシーケンスによって挿入 PCR 配列を確認した。

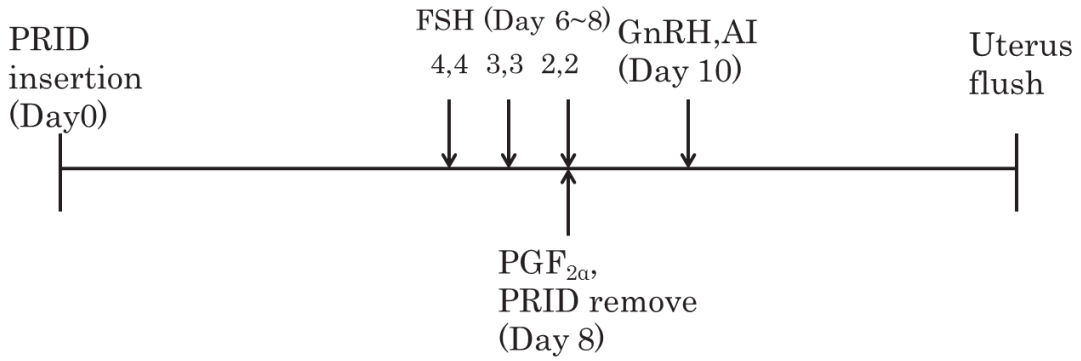

Figure 7. 過剰排卵処置と受精胚回収のプログラム

膣内留置型プロジェステロン製剤（PRID; PRID TEIZO, Ceva Santé Animale, Libourne, France)挿入時を Day0 として、Day6～8 日間に FSH (total 18 AU, Antrin, Kyouritsu, Tokyo, Japan)を漸減投与した。Day8 の朝に $PGF_{2\alpha}$(Dalmazin, Kyouritsu, Tokyo, Japan)を 3ml 投与し、その 8 時間後に PRID を抜去した。さらに Day10 の朝に GnRH を 4ml 投与し、投与から 8 時間後に人工授精を行った。人工授精から 6.5 日後非外科的に子宮洗浄を行い、受精胚を回収した。

Hayashi *et al.*(2018)Theriogenology

6）受精胚における凍結保存、融解および生存性

受精胚は、20%New Born Calf Serum（NBCS、Funacoshi Co. Ltd、Tokyo、Japan）を含む PBS で洗浄した後、凍結保存液（5%エチレングリコール、6%プロピレングリコール、0.1 M スクロースおよび 4 mg / PBS 中の ml BSA）と共に胚を 0.25 ml のストロー（IVM Technologies、L'Aigle、フランス）に入れ、室温で 15 分間維持し、その後、ストローを緩慢凍結用のプログラムフリーザー（藤平工業株式会社、東京、日本）のアルコール槽にセットし、液体窒素で冷却したピンセットを用いストローに植氷した。－7℃で 10 分間保持した後、－0.3℃ / min の速度で－30℃に冷却し、10 分間平衡化した後、液体窒素内で保管した。融解について、ストローを空気中に 10 秒間保持し、30℃の温水に 20 秒間入れ完全に解凍させた後、胚を IVC 培地で洗浄し、インキュベーター内で培養した。解凍後 24 時間および 48 時間で胚の生存率および透明帯から脱出した胚の割合を調べた。また胚の生存については、融解後の受精胚の再拡張をもって形態的に判断した。

７）免疫染色

胚盤胞の免疫染色は、Shiratsuki ら（2011）によって以前に報告されたように実施した。受精胚を 4%パラホルムアルデヒドで一晩固定した後、0.25%Triton X - 100 を含む PBS (0.2%ポリビニルアルコール（PVA）を用いて室温で 1 時間透過処理した。その後、ブロッキング溶液（5%BSA、0.1%Tween 20、および 5%ヤギ血清含有 PBS; Funakoshi、Tokyo、Japan）内で 1 時間培養した。受精胚を、SIRT1（ウサギポリクローナル、1：200;Santa Cruz Biothchnology、Santa Cruz、CA、USA）に対する一次抗体を用い、4℃で一晩処理した。次に、胚を二次抗体（抗ウサギ IgG（H＋L）、F（ab '）2 フラグメント、Alexa Fluor 555 コンジュゲート、1：1000、Cell Signaling Technology Inc.、Bevely, MA）と 1 時間培養した。受精胚をスライドガラス上に DAPI を含む退色防止溶液でマウントし、蛍光デジタル顕微鏡（BZ-8000; Keyence、Tokyo、Japan : 緑色蛍光、感度 ISO 200、曝露 1/6 秒、および青色蛍光、感度 ISO 200、露出 1/2 秒）を用い胚の蛍光画像を撮影した。上記の手順を使用して、一次抗体を使用せずに陰性の対照区を設けた。ImageJ ソフトウェア（NIH, Bethesda, MD）を使用して測定し、割球数で除し、蛍光強度を求めた。

8）受精胚移植

凍結保存胚は封入されたストローと共に移植前まで液体窒素内で保管し、移植時に 10 秒間室温でエアーソーイングした後、30℃の温湯につけ融解した。融解胚をストローから子宮深部注入器である YT ガン（株式会社ヤマネテック、長野、日本)に移動させた後、YT ガンにセットした 1ml シリンジによって黄体を有する側の子宮角内へ注入し移植した。レシピエント牛は、発情日から 7 日目に直腸検査によって黄体が確認されたホルスタイン雌牛とした。またレシピエント牛は正常な発情周期を示し、かつリピートブリーダーではな

いものを用いた。

９）試験設計

試験１

本実験は胚発生のために最適なレスベラトロール濃度を決定するために実施した。受精後 2 日目に分割胚（> 4 細胞）をランダムに選択し、分割胚を 0（対照区）、1 および 10μM レスベラトロールを含む IVC 培地で 7 日間培養し、その後胚盤胞への発生率を調べた。実験は 10 回実施した。

試験２

短時間のレスベラトロール処理（6 時間または 24 時間）が胚の発生率に影響を与え、SIRT1 発現レベルを増加させるかを調べた。 授精後 6 または 7 日目に、培地を 0(対照区)または 1μM のレスベラトロールを含む IVC 培地に交換し、それぞれ 24 時間および 6 時間培養した。 処理時間およびレスベラトロール処理の有無(0μM、 1 μM)で胚盤胞への発生割合を調査した。また、ランダムに選択された胚盤胞を用いて、免疫染色を行い SIRT1 の発現を調べた。

試験３

本実験では、レスベラトロールの凍結前処理が、融解後の受精胚の生存性や品質に及ぼす影響について調べた。受精胚は、実験 2 で説明した同様の方法でレスベラトロール処理した。レスベラトロール処理後、胚盤胞を IETS 標準に基づいて選択し、凍結保存後融解し、生存性と透明帯脱出率を調査した。この実験において、IETS 標準を使用して良好な胚として試験に用いられた胚盤胞の割合は、レスベラトロール処理区と対照区で同程度だった（6 時間;対照区：85.7%、レスベラトロール：84.2%、24 時間;対照区：90.6% 、レスベラトロール：87.7%）。

試験４

凍結保存前後の胚におけるミトコンドリア DNA コピー数に対するレスベラトロール処理の影響を調べた。 受精胚は実験 2 と同様にレスベラトロールで処理を行った。レスベラトロール処理後、胚盤胞をランダムに選択し、凍結保存前および融解後 48 時間の胚盤胞をミトコンドリア DNA コピー数の測定に用いた。

試験５

体外および体内培養で生産された胚盤胞に対するレスベラトロール処理が受胎率に及ぼす影響について検討した。ドナー牛の体内で生産された受精胚は 24 時間培養した場合、

ほとんどの胚は透明帯から脱出し、凍結保存や胚移植に適さない（IETS 標準)。よって、体内受精胚は人工授精から 6.5 日後に子宮灌流によって回収し、インキュベーター内で 6 時間 1μM レスベラトロールで処理した。体外受精胚は、媒精後 6 日目から 24 時間 1μM レスベラトロールで処理した。これらの胚を凍結保存して融解し、黄体を有する卵巣側の子宮角に移植した。 移植から 40 日後、直腸検診により胎児膜の存在に基づいて受胎を確認した。

10）統計処理

胚盤胞形成の割合を、分散分析後(ANOVA)後 Tukey 検定を用いて比較した。 また生存率と透明帯脱出率の分析にはカイ二乗検定を使用した。 胚盤胞の SIRT1 発現とミトコンドリア DNA コピー数をスチューデントの t 検定で分析した。 ミトコンドリア DNA のコピー数に関しては、相互保存性がないことを確認するために、凍結保存とレスベラトロール処理との相互作用を、2 元配置分散分析(two- way ANOVA)を使用して調べた。 体内胚および体外胚を用いた移植試験はカイ二乗検定で分析し、体内胚と体外胚を合わせた総受胎率はマンテル・ヘンツェル法を使用して分析した。有意差は P 値が 0.05 未満のものを有意差ありとした。

第３節　結果

初期分割胚を 0、1、および 10μM レスベラトロールを含む培地で培養した場合、1μM レスベラトロール処理が最も高い発生率となり、10μM は胚発生に悪影響をおよぼした (Table2; 0μM: 47.0%, 1 μM: 57.0%, 10 μM: 22.0%, P<0.05).

短期間のレスベラトロール処理が胚盤胞の発生に影響するかどうかを検討したところ、24 時間と 6 時間のレスベラトロール処理はいずれも胚発生に影響を与えず、IETS 標準で決定された胚盤胞の形態はグループ間で類似していた。(Table 3; 24 h; 0μM: 26.5 % vs. 1μM resveratrol: 27.6 %、 6 h: 0μM: 35.8 % vs. 1μM resveratrol: 38.4 %)。 一方で、短期間のレスベラトロール処理により、6 時間処理と 24 時間処理の両方で SIRT1 発現レベルが大幅に増加した（Fig.8)。

凍結融解後、ほとんどの受精胚は形態学的に損傷がみられず、その割合は 2 つのレスベラトロール濃度（1μM と 0μM）の間で同程度だった。 ただし、処理時間（6 および 24 時間）に関係なく、レスベラトロール前処理を行った受精胚は、融解後 48 時間での透明帯脱出率が有意に向上した(Table 4; 24 h; 0μM: 48.9 % vs. 1μM resveratrol: 70.5 %, 6h; 0μM: 51.9 % vs. 1μM resveratrol: 69.6 %, P< 0.05).

レスベラトロール処理は、凍結前胚盤胞のミトコンドリア DNA コピー数には影響しなかった（Table 5; 24h; 0μM: 737,954 vs. 1μM resveratrol: 725,700、6h; 0μM: 402,710 vs. 1μM resveratrol: 423,550)。ただし、融解後 48 時間で、レスベラトロール処理胚（6 および 24 時間）でミトコンドリア DNA コピー数が増加した（Table 5; 24h; 0μM: 264,730 vs. 1μM resveratrol: 489,840、6h; 0μM: 352,537 vs. 1μM resveratrol: 591,878、P <0.05)。二元配置分散分析では、レスベラトロール処理と凍結保存の間に相互作用は認められなかった。 24 時間処理胚では、解凍した胚のミトコンドリア DNA コピー数は新鮮胚のそれよりも低かった（Table5; 0μM : 新鮮胚 737,954、凍結融解胚 264,730、1μM resveratrol : 新鮮胚 725,700、凍結融解胚 489,840, P <0.05)、6 時間の処理時間ではミトコンドリア DNA コピー数の有意な減少は観察されなかった。

レスベラトロール処理を実際の移植に応用したところ、体内生産胚を 1μM レスベラトロールで 6 時間処理すると、0μM 処理（60.5%）よりも高い受胎率（76.1%）が得られた。媒精後 6 日目にレスベラトロールで 24 時間処理した体外生産胚は、移植試験を行ったところ 55.9%の受胎率となり、これは 0μM 処理（41.8%）よりも高かった。 体外および体内で生成された胚移植はどちらもそれ単独で有意に達しなかったが、合計すると無処理胚（50%）に比べてレスベラトロール処理胚（67.5%）は有意に高い受胎率となった（Table 6; P<0.05)。

Table2. レスベラトロールの濃度と胚盤胞発生率

Resveratrol (μM)	No. of cleaved embryos	No. of trials	Blastocysts (%)
			Average ± SEM
0	100	10	47.0 ±3.3 a
1	100	10	57.0 ±4.1 a
10	100	10	22.0 ±4.7 b

ab；異なるa-b間はP＜0.05で有意差あり
10個の胚をさまざまな濃度のレスベラトロールを含むIVC培地で培養し、実験を10回繰り返した。

Hayashi *et al.*(2018)Theriogenology

Table 3. 短時間のレスベラトロール処理が胚盤胞発生率に及ぼす影響

Treatment		Resveratrol	No. of	No.of	Blastocysts (%)
Timing(Days)	Duration(h)	(μM)	embryos	trials	Average±SEM
Day 6	24h	0	291	10	26.5±3.7
		1	275	10	27.6±2.3
Day 7	6h	0	419	10	35.8±6.5
		1	450	10	38.4±6.0

胚盤胞の生産は、10の異なる卵巣ロットを使用して実行した。

Hayashi *et al.*(2018)Theriogenology

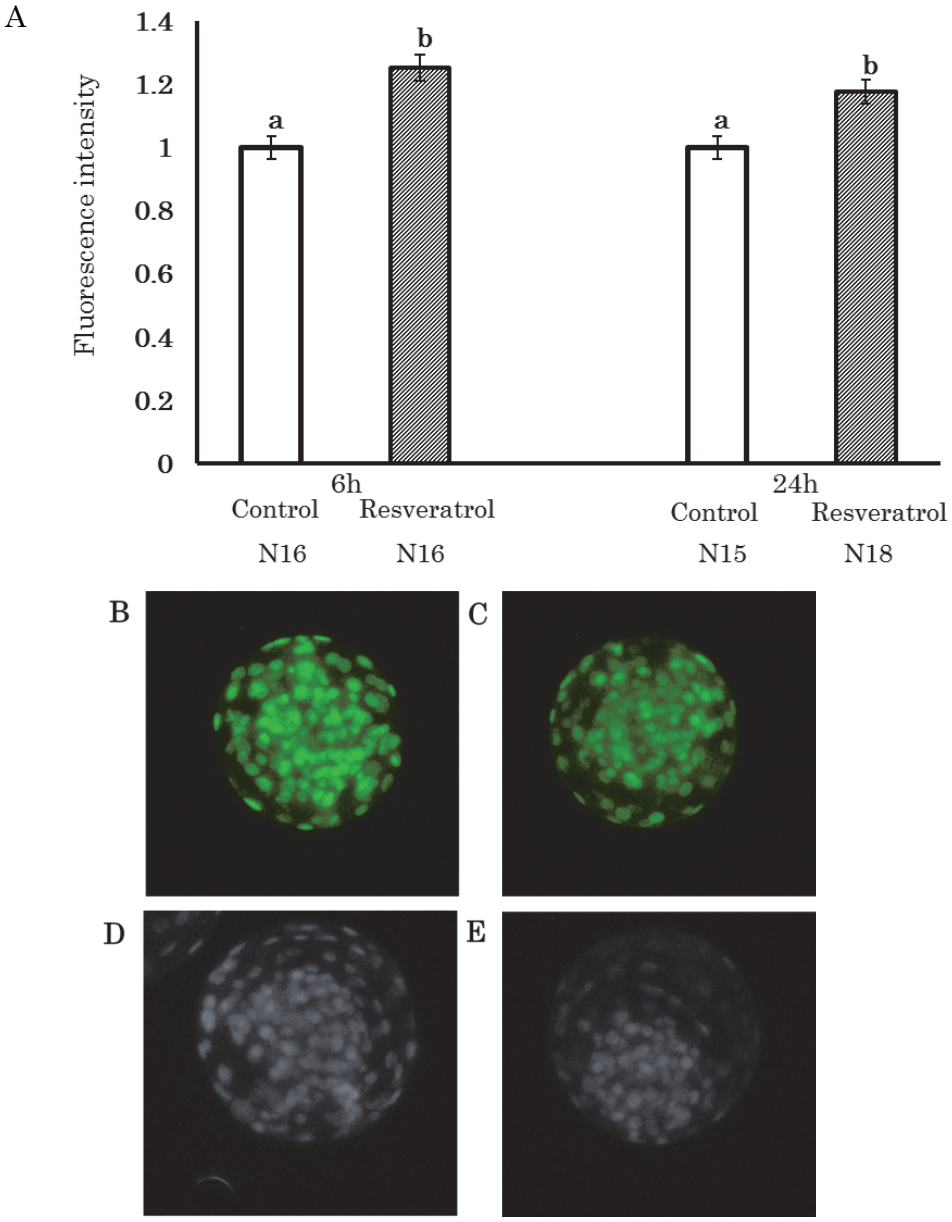

Figure8. 6 時間および 24 時間レスベラトロール処理を行った胚の SIRT 1 発現

A) 免疫染色された SIRT1 の発現強度。胚盤胞を、レスベラトロールを含むもしくは含まない培地で 6 時間および 24 時間培養したもの。非レスベラトロール処理を行った胚盤胞の平均蛍光強度を 1.0 とした。

B~E)それぞれの処理における胚の代表的な写真。B、D）受精胚をレスベラトロールで 6 時間および 24 時間処理したもの。C,E)受精胚を、レスベラトロールを含まない培地で 6 時間及び 24 時間処理したもの。

異なる上付き文字 a と b は、$P < 0.05$ で有意差あり。

Hayashi *et al.*(2018)Theriogenology

Table4. 凍結前レスベラトロール処理が融解後の胚盤胞生存率と透明帯脱出率に及ぼす影響

Treatment		Res (μM)	No.of Blastocysts	No.of survived (%)		No. of Hatching (%)	
Timing (Days)	Duration (h)			24h[A]	48h[A]	24h[A]	48h[A]
Day6	24h	0	47	45 (95.7)	45 (95.7)	4 (8.5)	23 (48.9)a
		1	44	44 (100)	42 (95.5)	7 (15.9)	31 (70.5)b
Day 7	6h	0	81	76 (93.8)	68 (84.0)	15 (18.5)	42 (51.9)a
		1	79	75 (94.9)	68 (86.1)	12 (15.2)	55 (69.6)b

a-b；異なるa-b間はP＜0.05で有意差あり
[A]：融解後の培養時間。本実験は４回の異なるロットの卵巣群を使用し、受精胚は試験まで凍結保存されたものを用いた。

Hayashi *et al.*(2018)Theriogenology

Table5. レスベラトロール処理胚の凍結保存前後におけるミトコンドリアDNA（MtDNA）のコピー数

Treatment		Res (μM)	Before[A]		After[A]	
Timing (Days)	Duration (Hours)		No.of Blastocysts	Mt-DNA copy number	No.of Blastocysts	Mt-DNA copy number
Day 6	24h	0	13	737,954 ± 73855	12	264,730 ± 33085 a
		1	16	725,700 ± 66389	11	489,840 ± 32163 b
Day 7	6h	0	8	402,710 ± 67972	17	352,537 ± 19639 a
		1	8	423,550 ± 74033	19	591,878 ± 23918 b

a-b；異なるa-b間はP＜0.05で有意差あり
[A]：ミトコンドリアDNAのコピー数は、凍結保存前または解凍の48時間後に調べた。
各処理時間（6時間または24時間）について、胚盤胞は4つの異なるロットの卵巣から生成した。

Hayashi *et al.*(2018)Theriogenology

Table6. 凍結保存胚におけるレシピエント牛への移植後の妊娠率

Category	Res. Treatment		Res (μM)	No. of embryos transferred	No. of pregnant	Pregnancy rate (%)
	Timing (Days)	Duration (h)				
in vitro	Day 6	24	0	55	23	41.8
			1	34	19	55.9
in vivo	Day 6.5	6	0	43	26	60.5
			1	46	35	76.1
total			0	98	49	50.0 a
			1	80	54	67.5 b

a-b；異なるa-b間はP＜0.05で有意差あり。Res：レスベラトロール
体外受精胚は10個の異なる卵巣ロットから生成され、体内受精胚は10頭の牛から回収されたものを使用した。

Hayashi *et al.*(2018)Theriogenology

第４節　考察

本研究ではレスベラトロールによる胚盤胞の凍結前処理により、凍結融解後の胚の透明帯脱出率が高くなり、胚盤胞のミトコンドリア数が増加することを示した。さらにレスベラトロール前処理を行うことで胚移植後の受胎率を改善できることを明らかにしたものである。

高濃度(10μM)のレスベラトロール添加は受精胚の発生にとって有害であり、低濃度（1μM）胚盤胞への発生率を向上させたことは過去の報告と一致している(Wang *et al.* 2014)。よって以降の試験では 1μM 濃度のレスベラトロールを用いて胚を処理した。5 日間のレスベラトロール処理は胚盤胞の発生を改善させたが、6 時間や 24 時間といった短時間のレスベラトロール処理では無処理胚と比較しても胚発生に影響を及ぼさなかった。この結果によりその後任意に選んだ胚には発生率の違いによるバイアスが含まれないと考えた。従来の報告では、レスベラトロールは卵母細胞と受精胚の SIRT1 発現を増強するために使用されており、処理時間は 1 ～7 日間となっている(Takeo *et al.* 2014, Salzano *et al.* 2014)。今回の試験では、驚くべきことにレスベラトロール処理が 6 時間と極めて短時間であっても SIRT1 の発現レベルを高めることが明らかになった。この結果により体内受精胚を用いた 6 時間の凍結前処理といった、国内における畜産現場での具体的な利用方法を提示することができた。

SIRT1 は卵母細胞および胚において、ミトコンドリア機能および細胞代謝の調節にさまざまな働きをする。凍結保存が胚と卵母細胞の生存率を損なうことはよく知られており、マウス、ヒト卵母細胞でも凍結保存がミトコンドリア機能障害を誘発し、ATP 含量が低くなり、ROS が高くなることが報告されている(Manipalviratn *et al.* 2011, Bang *et al.* 2016, Dai *et al.* 2015)。また、Dai らは、マウス卵母細胞で凍結保存によりミトコンドリアの形態変化が起きることを示している(Dai *et al.* 2015)。これらの報告と同様に、本試験においても融解した胚盤胞のミトコンドリア DNA コピー数は、新鮮胚のものより著しく少ないことが確認された。この結果は、凍結保存がミトコンドリアの完全性または細胞代謝に影響を与え、ミトコンドリア数の減少を引き起こしたことを示唆している。卵母細胞と初期胚のミトコンドリア数はドナー間で異なることが報告されている(Takeo *et al.* 2013)。本研究では実験グループ間で凍結前のミトコンドリア DNA コピー数に大きな差が観察された。これらは 2 つの実験が異なる季節に行われたため、卵巣群の違いによって引き起こされた可能性があると推測した。SIRT1 は、PGC-1α の脱アセチル化と TFAM の活性化を介して、ミトコンドリアの生合成において主要な役割を果たすことが報告されている(Lagouge *et al.* 2006, Brenmoehl *et al.* 2013)。このカスケードを刺激するため、ブタ卵母細胞をレスベラトロールで処理すると、ミトコンドリアの生合成と分解が促進され、ミトコンドリア機能が改善されたことが報告されている(Sato *et al.* 2014)。

本研究では凍結保存前の新鮮胚のミトコンドリア DNA コピー数は、レスベラトロール処理間で同等だった。また 8 細胞期胚からレスベラトロール 0.5μM を含む培地で 5 日間処理しても、生産された胚盤胞のミトコンドリア DNA コピー数は非処理胚と差がなかったという報告がある（Abe *et al.* 2017)。一方で融解後 48 時間では、凍結前にレスベラトロール処理を行った区の胚盤胞では、処理時間に関係なく、ミトコンドリア DNA コピー数が増加した。さらに、レスベラトロールの凍結前処理により、融解した胚盤胞の透明帯脱出率が向上することを明らかにした。Salzono ら(2014)は、ウシ胚を発生培地でレスベラトロールとともに 6 日間培養すると、結果として生じる胚盤胞は耐凍性が高くなることを示したが、この効果の理由は明らかにされなかった。 本研究の結果は、レスベラトロールによる凍結前処理が、SIRT1 活性化によるミトコンドリアの新規合成または損傷したミトコンドリアの分解を介して、ミトコンドリア数を回復するのに役立つ可能性を示唆している（Fig. 9)。酸化状態がウシ胚の発生に対し大きな影響を与えることが報告されており(Assis *et al.* 2015, Guérin *et al.* 2001)、ウシ胚のグルタチオン（GSH）含有量は凍結保存後に急激に減少することが報告されている(George *et al.* 2008)。 レスベラトロールは抗酸化剤としても機能し、IVM 中にレスベラトロールで処理されたウシおよびブタの卵母細胞は、GSH の増加と ROS の減少により胚盤胞への発生能力が改善したことが報告されている(Wang *et al.* 2014 , Kwak *et al.* 2012)。 ウシ胚を、0.5μM レスベラトロールを含む培地で 5 日間培養すると、胚盤胞の ROS 含有量がレスベラトロール非含有培地で培養した胚盤胞よりも 8 割に減少したという報告がある(Abe *et al.* 2017)。加えて我々の追加試験では 6.5 日齢胚をレスベラトロールで 24 時間処理したところ胚盤胞内の ROS は 73%へ減少した。このことはミトコンドリアの質改善に加えて抗酸化剤としての働きがあったことも否定できない。

今回の我々の試験は、レスベラトロール前処理が受精胚の受胎率に及ぼす影響について報告した最初の事例となる。移植試験に用いたレシピエント牛の数が十分ではなく、体内胚および体外胚それぞれで受胎率を比較した場合では有意差は得られなかったが、レスベラトロール前処理を行った受精胚として体内、体外受精胚を合計した場合、未処理の胚よりも有意に高い受胎率となった。本試験では移植適期レシピエント牛の十分な確保の難しさから、各試験グループの新鮮胚での移植は実施していない。マウス胚では、ミトコンドリア DNA 数が少ないため、着床後の胚の生存率が低下し(Wai *et al.* 2010)、さらに、ヒトではミトコンドリア DNA 数が多い胚の方が妊娠成功率は高くなることが報告されている(Stigliani *et al.* 2014)。これらの報告から、凍結前レスベラトロール処理は、凍結融解胚のミトコンドリア DNA コピー数を増加させ、レスベラトロールで処理胚の高い受胎率の要因となったと考えられる(Fig.9)。これらの効果は、短時間の培養と安価な化学薬品しか必要としないため、体内胚および体外胚双方で利用可能な凍結保存胚改善技術として、畜産現場での活用を推進できるものである。

結論として、レスベラトロールによる胚盤胞の凍結前処理は、融解後の胚盤胞内のミトコンドリア DNA コピー数と透明帯脱出率を増加させ、移植後の受胎率を改善することができた。

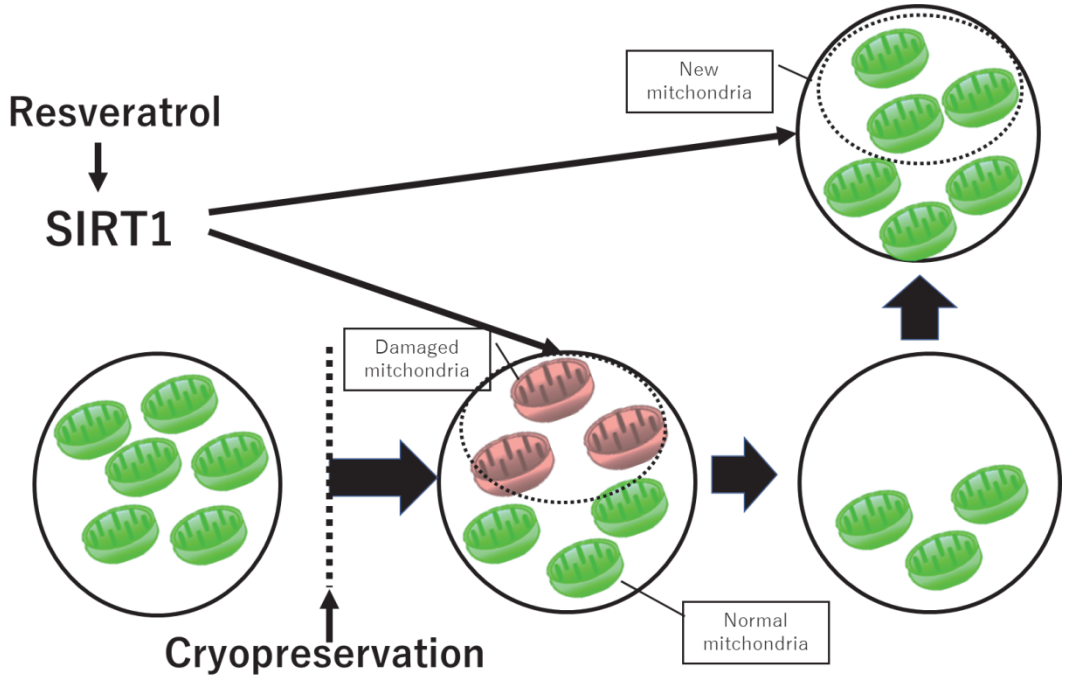

Figure9. 受精胚におけるレスベラトロール凍結前処理効果仮説の概略図

レスベラトロールによる胚の前処理は、損傷したミトコンドリアの除去と胚内ミトコンドリアの新規合成を誘導する SIRT1 の発現を増強し、凍結損傷からの回復に役立ったと考えられる。

Hayashi et al.(2018) Theriogenology

要約

受精胚の凍結保存は、胚の利便性を大きく高め、効率の良い移植を可能にするが、凍結による受精胚の損傷は、融解後の品質や受胎率の低下を招いている。凍結による損傷は細胞内 DNA やミトコンドリアへ及んでいることが報告されている。受精胚のエネルギー生産のうち多くを賄うミトコンドリアの損傷は凍結融解後の受精胚の回復や生存性を低下させる可能性が考えられる。本研究では、1）ウシ胚のミトコンドリア機能、DNA の完全性、および発達能力に対する緩慢凍結保存の影響を評価し、凍結融解後培地へのレスベラトロール添加が凍結融解胚盤胞の生存性を改善するかどうかを調べた。2）さらに凍結保存前のレスベラトロール処理が凍結融解後の受精胚に及ぼす影響を調べるとともに、移植後の受胎率について調査した。1）受精胚に対して凍結保存が及ぼす影響を調べるために、短鎖および長鎖ミトコンドリアシーケンスをターゲットとするリアルタイム PCR によって測定したミトコンドリア DNA 完全性（mtDNA）や、ATP 含有量を測定したところ、新鮮胚と比較して、凍結融解後 24 時間培養した受精胚では有意に減少した。加えて二本鎖 DNA に対する免疫染色により、凍結融解胚の DNA 損傷が明らかになった。凍結融解胚を 0.5μM レスベラトロールを含む培地で培養すると、胚の SIRT1 発現と生存率は、溶媒処理胚（対照区）と比較して著しく改善した。 さらに、融解後の培養中培地に含まれた mtDNA 含有量は、溶媒処理胚よりもレスベラトロール処理胚の方が高かった。これらの結果から融解後培養液添加へのレスベラトロールが受精胚の生存性向上に働くことが示唆されたが、ウシ、ヒト等の受精胚移植は凍結融解後から速やかに移植することが一般的であり、融解後の長時間培養は現場での利用に即さない。よって現場での利用を考慮し、凍結保存前にレスベラトロール処理を行い融解後は速やかに移植することを想定して以下の試験を行った。2）ウシ受精胚における凍結保存前のレスベラトロール処理による SIRT1 発現増加が、凍結損傷からの回復を助け、受精胚の品質を改善するという仮説のもとに試験を実施した。供試胚は受精後 6 日目または 7 日目の体外受精胚を用い、レスベラトロール 1μM とともに 6 時間また は 24 時間培養した。レスベラトロール処理（6 時間または 24 時間）は、胚盤胞発生率や胚盤胞のグレードには影響しなかったが、処理胚では SIRT1 の発現レベルが大幅に増加した。レスベラトロールで前処理した受精胚を凍結融解した後、48 時間培養後の透明帯脱出率は、レスベラトロール処理した受精胚の方が有意に高かった。さらに、レスベラトロールの前処理により、処理時間に関係なく、受精胚のミトコンドリア DNA のコピー数が大幅に増加した。移植試験では 6 日齢の体外受精胚と、6.5 日齢の体内受精胚を用い、体外受精胚は 24 時間、体内受精胚は 6 時間レスベラトロールで凍結前処理を行った。レスベラトロール前処理（6 または 24 時間）は、体内および体外生産胚の両方で、対照区に比べ受胚牛への移植後の受胎率が高かった。結論として、ウシ受精胚の緩慢凍結は、胚盤胞のミトコンドリアの完全性と機能を低下させる。一方で融解後の培養中にレス

ベラトロールで処理することで SIRT1 発現が向上し、受精胚内ミトコンドリアが低下し、胚の生存率が向上する。さらにウシ受精胚をレスベラトロールで凍結前処理すると、ミトコンドリア合成により凍結解凍後の受精胚の品質が改善されることが明らかになった。

Summary

The price of fattening calves has continued to rise due to decline of breeding cows in Japan, and this has subsequently led to a decline in the business of livestock farmers. Embryo production and transplantation can increase the number of live born calves and accelerate the improvement of their genetic ability. However, as the developmental stage at which embryos may be successfully transplanted is limited, blastocysts must be cryopreserved. Cryopreservation is a useful technology for the widespread use of embryo transfer. A remaining unsolved problem regarding embryo cryopreservation is the cryoinjury of embryos. Cryoinjury reduces embryo viability, which results in low pregnancy rate following embryo transfer compared with that in fresh embryos. The main causal factor of the damage derived from cryopreservation is mitochondrial dysfunction. Mitochondria are important organelles for cells as well as embryos, and the quality and quantity of the mitochondria is a major marker of embryos. It is therefore necessary to study mitochondrial damage in cryopreserved embryos in detail as a step to improve the quality of thawed embryos. Resveratrol was reported to activate the expression of SIRT1 in oocytes and induce degradation and de novo synthesis of mitochondria. The present study addressed a hypothesis that upregulation of the mitochondrial quality control system before or after cryopreservation could help the recuperation of embryos after thawing.

In the first series of experiments, I found that cryopreservation indeed induced mitochondrial dysfunctions, which were determined by low ATP content, low mitochondrial genome integrity test, and high amount of double stranded DNA in the cytoplasm of the frozen-thawed embryos. I also examined the effect of resveratrol treatment of frozen-thawed embryos on the developmental ability of the embryos. Culturing frozen-thawed embryos with resveratrol for 1-2 days enhanced the expression levels of SIRT1. In addition, resveratrol treatment improved the viability of

the frozen-thawed embryos compared with those of resveratrol untreated counterparts. Interestingly, the spent culture medium of the resveratrol-treated blastocysts contained greater amounts of cell-free mitochondrial DNA compared with those of untreated blastocysts, indicating that resveratrol treatment affects mitochondrial dynamics in frozen-thawed embryos. In the next series of experiments, I examined the effect of resveratrol treatment before cryopreservation on embryonic development and pregnancy rate following embryo transfer. Culturing embryos in a medium containing resveratrol for a short period (6 h) significantly increased the expression levels of SIRT1 and resveratrol treatment before cryopreservation improved survival rate and embryonic development. In addition, resveratrol pretreatment increased mitochondrial DNA copy number in the blastocysts after thawing and improved the pregnancy rate following embryo transfer. In conclusion, the results obtained in the study suggest that resveratrol treatment both before and after cryopreservation improves embryonic viability, possibly through the activation of the mitochondrial quality control system in embryos. This technology could contribute to improving pregnancy rate in bovine embryo transfer.

引用文献

農林水産省ホームページ．家畜生産．牛受精卵移植実施状況．http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_katiku/attach/pdf/index-10.pdf

大呂興平. 2019.日本の和牛受精卵移植の進展とその「仕組み」づくり.畜産の情報.10：53-71

Abe T, Kawahara-Miki R, Hara T, Noguchi T, Hayashi T, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. 2017. Modification of mitochondrial function, cytoplasmic lipid content and cryosensitivity of bovine embryos by resveratrol. J Reprod Dev. 63 :455-461

Assis PM, Castro LS, Siqueira AF, Delgado Jde C, Hamilton TR, Goissis MD, Mendes CM, Nichi M, Visintin JA, Assumpção ME. 2015. System for evaluation of oxidative stress on in-vitro-produced bovine embryos. Reprod Biomed Online. 31：577-80.

Bang S, Lee GK, Shin H, Suh CS, Lim HJ. 2016. Vitrification, in vitro fertilization, and development of Atg7 deficient mouse oocytes. Clin Exp Reprod Med. 43：9-14.

Brackett BG, Oliphant G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol Reprod. 12：260-74.

Brenmoehl J, Hoeflich A. 2013. Dual control of mitochondrial biogenesis by sirtuin 1 and sirtuin 3. Mitochondrion. 13：755-61.

Brevini TA, Vassena R, Francisci C, Gandolfi F. 2005. Role of adenosine triphosphate, active mitochondria, and microtubules in the acquisition of developmental competence of parthenogenetically activated pig oocytes. Biol Reprod. 72：1218-23.

Campello S, Strappazzon F, Cecconi F. 2014. Mitochondrial dismissal in mammals, from protein degradation to mitophagy. Biochim Biophys Acta. 1837：451-60

Chen H, Zhang L, Deng T, Zou P, Wang Y, Quan F, Zhang Y. 2016. Effects of oocyte vitrification on epigenetic status in early bovine embryos. Theriogenology. 86：868-78

Dai J, Wu C, Muneri CW, Niu Y, Zhang S, Rui R, Zhang D. 2015. Changes in mitochondrial function in porcine vitrified MII-stage oocytes and their impacts on apoptosis and developmental ability. Cryobiology. 71 : 291-8

Dalcin L, Silva RC, Paulini F, Silva BD, Neves JP, Lucci CM. 2013. Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial activity and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos. Cryobiology. 67 : 137-45

Denu JM. 2012. Fortifying the link between SIRT1, resveratrol, and mitochondrial function. Cell Metab. 15 : 566-7

Do VH, Walton S, Catt S, Taylor-Robinson AW. 2017. A comparative analysis of the efficacy of three cryopreservation protocols on the survival of in vitro-derived cattle embryos at pronuclear and blastocyst stages. Cryobiology. 77 : 58-63]

Gaviria S, Morado SA, López Herrera A, Restrepo Betancur G, Urrego Álvarez RA, Echeverri Zuluaga J, Cética PD. 2019. Resveratrol supplementation promotes recovery of lower oxidative metabolism after vitrification and warming of in vitro-produced bovine embryos. Reprod Fertil Dev. 31 : 521-528

George F, Daniaux C, Genicot G, Verhaeghe B, Lambert P, Donnay I. 2008. Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: embryo development and quality before and after transient transfer. Theriogenology. 69 : 612-23.

Gomes AP, Price NL, Ling AJ, Moslehi JJ, Montgomery MK, Rajman L, White JP, Teodoro JS, Wrann CD, Hubbard BP, Mercken EM, Palmeira CM, de Cabo R, Rolo AP, Turner N, Bell EL, Sinclair DA. 2013. Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. Cell. 155 : 1624-38

Gualtieri R, Iaccarino M, Mollo V, Prisco M, Iaccarino S, Talevi R. 2009. Slow cooling of human oocytes: ultrastructural injuries and apoptotic status. Fertil Steril. 91 : 1023-34.

Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum

Reprod Update. 7 : 175-89.

Hayashi T, Kansaku K, Abe T, Ueda S, Iwata H. 2019. Effects of resveratrol treatment on mitochondria and subsequent embryonic development of bovine blastocysts cryopreserved by slow freezing. Anim Sci J. 90 : 849-856

Hayashi T, Ueda S, Mori M, Baba T, Abe T, Iwata H. 2018. Influence of resveratrol pretreatment on thawed bovine embryo quality and mitochondrial DNA copy number. Theriogenology. 106 : 271-278

Hara T, Kin A, Aoki S, Nakamura S, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. 2018. Resveratrol enhances the clearance of mitochondrial damage by vitrification and improves the development of vitrified-warmed bovine embryos. PLoS One. 13 : e0204571

Hubbard BP, Gomes AP, Dai H, Li J, Case AW, Considine T, Riera TV, Lee JE, E SY, Lamming DW, Pentelute BL, Schuman ER, Stevens LA, Ling AJ, Armour SM, Michan S, Zhao H, Jiang Y, Sweitzer SM, Blum CA, Disch JS, Ng PY, Howitz KT, Rolo AP, Hamuro Y, Moss J, Perni RB, Ellis JL, Vlasuk GP, Sinclair DA. 2013. Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. Science. 339 : 1216-9.

Itami N, Shiratsuki S, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. 2015. Mitochondrial biogenesis and degradation are induced by CCCP treatment of porcine oocytes. Reproduction. 150 : 97-104

Kansaku K, Takeo S, Itami N, Kin A, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. 2017. Maternal aging affects oocyte resilience to carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone -induced mitochondrial dysfunction in cows. PLoS One. 12 : e0188099.

Koyano F, Okatsu K, Kosako H, Tamura Y, Go E, Kimura M, Kimura Y, Tsuchiya H, Yoshihara H, Hirokawa T, Endo T, Fon EA, Trempe JF, Saeki Y, Tanaka K, Matsuda N. 2014. Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. Nature. 510 : 162-6

Kwak SS, Cheong SA, Jeon Y, Lee E, Choi KC, Jeung EB, Hyun SH. 2012. The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic

development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. Theriogenology. 78 : 86-101.

Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. Cell. 127 : 1109-22.

Liu M, Yin Y, Ye X, Zeng M, Zhao Q, Keefe DL, Liu L. 2013. Resveratrol protects against age-associated infertility in mice. Hum Reprod. 28 : 707-17.

Lyamzaev KG, Nepryakhina OK, Saprunova VB, Bakeeva LE, Pletjushkina OY, Chernyak BV, Skulachev VP. 2008. Novel mechanism of elimination of malfunctioning mitochondria (mitoptosis): formation of mitoptotic bodies and extrusion of mitochondrial material from the cell. Biochim Biophys Acta. 1777: 7-8.

Manipalviratn S, Tong ZB, Stegmann B, Widra E, Carter J, DeCherney A. 2011. Effect of vitrification and thawing on human oocyte ATP concentration. Fertil Steril. 95 : 1839-41.

McLelland GL, Soubannier V, Chen CX, McBride HM, Fon EA. 2014. Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control. EMBO J. 33 : 282-95

Mori M, Kasa S, Hattori MA, Ueda S. 2012. Development of a single bovine embryo improved by co-culture with trophoblastic vesicles in vitamin-supplemented medium. J Reprod Dev. 58 : 717-21.

Moussa M, Shu J, Zhang X, Zeng F. 2014. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives. Sci China Life Sci. 57 : 903-14.

Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, Agarwal B, Ye L, Ramadori G, Teodoro JS, Hubbard BP, Varela AT, Davis JG, Varamini B, Hafner A, Moaddel R, Rolo AP, Coppari R, Palmeira CM, de Cabo R, Baur JA, Sinclair DA. 2012. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on

mitochondrial function. Cell Metab. 15 : 675-90

Robertson I, Nelson R, in: D.A. Stringfellow, S.M. Seidel, editors. 1998. Certification and Identification of the Embryo, third ed., Manual of International Embryo Technology Society IETS, Illinoi. : p.180.

Rothfuss O, Gasser T, Patenge N. 2010. Analysis of differential DNA damage in the mitochondrial genome employing a semi-long run real-time PCR approach. Nucleic Acids Res. 38 : e24.

Salzano A, Albero G, Zullo G, Neglia G, Abdel-Wahab A, Bifulco G, Zicarelli L, Gasparrini B. 2014. Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine in vitro produced embryos. Anim Reprod Sci. 151 : 91-6.

Santos E, Appeltant R, Dang-Nguyen TQ, Noguchi J, Kaneko H, Kikuchi K, Somfai T. 2018. The effect of resveratrol on the developmental competence of porcine oocytes vitrified at germinal vesicle stage. Reprod Domest Anim. 53 : 304-312

Santos TA, El Shourbagy S, St John JC. 2006. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. Fertil Steril. 85 : 584-91.

Sato D, Itami N, Tasaki H, Takeo S, Kuwayama T, Iwata H. 2014. Relationship between mitochondrial DNA copy number and SIRT1 expression in porcine oocytes. PLoS One. 9 : e94488

Shi LY, Jin HF, Kim JG, Mohana Kumar B, Balasubramanian S, Choe SY, Rho GJ. 2007. Ultra-structural changes and developmental potential of porcine oocytes following vitrification. Anim Reprod Sci. 100 : 128-40.

Shiba-Fukushima K, Imai Y, Yoshida S, Ishihama Y, Kanao T, Sato S, Hattori N. 2012. PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. Sci Re. 2 : 1002.

Shiratsuki S, Iwata H, Kimura K, Kuge T, Monji Y, Kuwayama T. 2011. Trichostatin A-treated eight-cell bovine embryos had increased histone acetylation and gene

expression, with increased cell numbers at the blastocyst stage. Theriogenology. 75 : 841-8.

Sosulski ML, Gongora R, Danchuk S, Dong C, Luo F, Sanchez CG. 2015. Deregulation of selective autophagy during aging and pulmonary fibrosis: the role of TGFβ1. Aging Cell. 14 : 774-83

Stigliani S, Persico L, Lagazio C, Anserini P, Venturini PL, Scaruffi P. 2014. Mitochondrial DNA in Day 3 embryo culture medium is a novel, non-invasive biomarker of blastocyst potential and implantation outcome. Mol Hum Reprod. 20 : 1238-46.

Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, Wolf E. 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. Biol Reprod. 64 : 904-9.

Sugiyama M, Kawahara-Miki R, Kawana H, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. 2015. Resveratrol-induced mitochondrial synthesis and autophagy in oocytes derived from early antral follicles of aged cows. J Reprod Dev. 61 : 251-9.

Takeo S, Goto H, Kuwayama T, Monji Y, Iwata H. 2013. Effect of maternal age on the ratio of cleavage and mitochondrial DNA copy number in early developmental stage bovine embryos. J Reprod Dev. 59 : 174-9.

Takeo S, Sato D, Kimura K, Monji Y, Kuwayama T, Kawahara-Miki R, Iwata H. 2014. Resveratrol improves the mitochondrial function and fertilization outcome of bovine oocytes. J Reprod Dev. 60 : 92-9.

Van Blerkom J, Davis PW, Lee J. 1995. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. Hum Reprod. 10 : 415-24.

Vendramin R, Marine JC, Leucci E. 2017. Non-coding RNAs: the dark side of nuclear-mitochondrial communication. EMBO J. 36 : 1123-1133.

Wai T, Ao A, Zhang X, Cyr D, Dufort D, Shoubridge EA. 2010. The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. Biol Reprod. 83 : 52-62.

Wang F, Tian X, Zhang L, He C, Ji P, Li Y, Tan D, Liu G. 2014. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. Fertil Steril. 101 : 577-86.

Wu Y, Li X, Zhu JX, Xie W, Le W, Fan Z, Jankovic J, Pan T. 2011. Resveratrol-activated AMPK/SIRT1/autophagy in cellular models of Parkinson's disease. Neurosignals. 19 : 163-74.

Youle RJ, van der Bliek AM. 2012. Mitochondrial fission, fusion, and stress. Science. 337 : 1062-5

Zhang J, Cui J, Ling X, Li X, Peng Y, Guo X, Heng BC, Tong GQ. 2009. Vitrification of mouse embryos at 2-cell, 4-cell and 8-cell stages by cryotop method. J Assist Reprod Genet. 26 : 621-8

Zhao XM, Du WH, Wang D, Hao HS, Liu Y, Qin T, Zhu HB. 2011. Recovery of mitochondrial function and endogenous antioxidant systems in vitrified bovine oocytes during extended in vitro culture. Mol Reprod Dev. 78 : 942-50.

謝辞

本稿を終わるに鑑み、懇切丁寧なご指導とご鞭撻を賜り、本研究の遂行ならびに本論文のご校閲を頂きました、東京農業大学動物生殖学研究室教授　岩田尚孝先生に深甚なる謝意を表します。

岡山大学大学院　環境生命科学研究科教授　木村康二先生、並びに大阪市立大学大学院特任准教授　橋本周先生 東京農業大学動物生殖学研究室教授　桑山岳人先生　同准教授白砂孔明先生には副査としてご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導をいただき、ここに深謝の意を表します。

また研究遂行にあたり、日頃より有益なご討論ご助言を戴いた上田修二研究員、森美幸研究員に深謝いたします。

研究遂行にあたり、農家での受精胚移植を遂行していただいた福岡県農業共済組合広域家畜診療所　桑野俊夫人工授精師、西原 AI・ET サービス　西原武司人工授精師の両名に深く感謝の意を表します。

本研究の一部は一般財団法人畜産ニューテック協会の研究助成によって行われた。