

氏 名	WANNIARACHCHIGE THARINDU LAKSHITHA FONSEKA		
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	7 1 5 9	号
学位授与の日付	2 0 2 4 年 9 月 2 5 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	The impact of cumulus cell viability and pre-culture on glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity, meiotic progression, and developmental competence in suboptimal porcine oocytes (卵丘細胞の生存率と前培養が低品質ブタ卵母細胞におけるグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH) 活性、減数分裂の進行および発生能力に及ぼす影響)		
論文審査委員	教授 木村 康二	准教授 若井 拓哉	教授 辻 岳人
学位論文内容の要旨			
Oocyte cumulus complexes (OCCs) derived from ovaries of prepubertal domestic animals are extensively utilized for in vitro production (IVP) of embryos, despite of exhibiting lower meiotic and developmental competencies compared to those from cycling females. However, establishing an effective in vitro maturation (IVM) systems capable of producing developmentally competitive mature oocytes from the material resources derived from developing follicles remains a challenge across mammalian species, including human, emphasizing the growing importance of such techniques for disease modeling and xenotransplantation via genome editing. Objectives of the present study were to investigate the characteristics including glucose-6-phosphate dehydrogenase activity, as determined by Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining, of suboptimal porcine oocytes and to enhance the meiotic competence of those through pre-culture with cumulus cell masses (CCMs). Percentage of OCCs derived from small follicles (SF; with <3 mm in diameter) containing the oocytes that were assessed as BCB-negative (BCB-) was significantly higher than those derived from medium follicles (MF; with 3–6 mm in diameter). Degrees of dead cumulus cells were significantly higher in OCCs containing BCB-oocytes, regardless of the origin of OCCs (MF vs. SF), than those containing BCB-positive (BCB+) ones. Exposing OCCs containing BCB+ oocytes to the apoptosis inducer, carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine, for 20 h significantly induced the transition to BCB- and meiotic progression of exposed OCCs were significantly reduced in both SF and MF derived ones. Transit of BCB- oocytes to BCB+ was induced when OCCs were pre-cultured with CCMs of MF derived OCCs containing BCB+ oocytes for 20 h before IVM. This pre-culture also significantly increased the meiotic competence of BCB- oocytes, particularly in SF derived ones. However, reactive oxygen species levels were significantly higher in BCB+ oocytes as compared with BCB- ones, regardless of pre-culture with CCMs, whereas no significant differences were found in the ATP contents among the treatment groups. In conclusion, the BCB result of oocytes could be regulated by the healthy status and content of surrounding cumulus cells and the meiotic competence of suboptimal BCB- porcine oocytes is improved by pre-culture with healthy CCMs.			

論文審査結果の要旨

本研究は、小中胞状卵胞由来のブタ卵母細胞の品質評価およびその改善について検討を行った報告である。家畜種、特にブタへの遺伝子編集など発生工学技術は、ヒトへの代替臓器提供や様々な疾病抵抗性・付加価値性を有する家畜個体の作出への試みに適用されており、材料となる品質の高い卵母細胞を大量に効率的よく供給することが求められている。しかし、食肉用に利用される雌畜の卵巢に多く存在する卵胞のうち、体外成熟培養の後に利用されるのは、直径3～6 mmの中型胞状卵胞(MF)由来の卵母細胞に限られている。また、グルコース6リン酸脱水素酵素活性を反映するBrilliant cresyl blue (BCB)染色によって卵母細胞の品質が長く評価選別されているが、直径3 mm未満の小型卵胞(SF)由来の卵母細胞の評価や一度低いと評価された卵母細胞の品質が可逆的に改善可能なのかについては明らかではなかった。本研究は、BCB染色で評価されたSF由来卵母細胞や一度品質が低いと評価された卵母細胞の特徴を評価するとともに、それらの卵母細胞の発生能を改善できるか否かについて検討を行っている。

まず、SF由来卵母細胞にBCB染色を施し、染色の有無で選別された卵母細胞の特徴を調べたところ、SF由来卵母細胞でもBCB染色によって体外成熟能の高い卵を選別可能であることと、卵母細胞周囲に存在する卵丘細胞のアポトーシスの度合いが卵母細胞のBCB評価に高く影響することを明らかにした。次いで、BCB染色によって品質が低いと評価された卵母細胞を品質が高いと評価された卵母細胞周囲の卵丘細胞塊とともに前培養することで、当該卵母細胞のBCB染色評価や体外成熟能を可逆的に改善することができることを見出し、これらの効果は酸化ストレスの改善以外の要因によるものと推察している。

これらの成果は、原著論文1編にまとめられ、査読のあるQ1国際学術雑誌に採択され、電子版が既に公表されている。これらの成果はまた、学位論文としてさらなる考察を加え、よくまとめられており、ブタ卵母細胞を用いた発生工学技術の適用による家畜生産の更なる発展に寄与する情報や根拠を分かり易く提供しており、学術的に高く評価できる。

ゆえに、本学位審査委員会は、本学位論文が博士（学術）の授与に十分値すると評価する。