

第 60 回日本産科婦人科学会・学術講演会

## シンポジウム 2 「卵の発育・成熟・老化機構の解明と臨床応用」

## (2) 母体由来パラクライン因子による卵成熟および胚発育の調節

秋田大学医学部生殖発達医学講座産婦人科分野

助教 河村 和弘

## Regulation of Oocyte Maturation and Preimplantation Embryo Development by Maternal Paracrine Factors

Kazuhiro KAWAMURA

Department of Obstetrics and Gynecology, Akita University School of Medicine, Akita

## 目 的

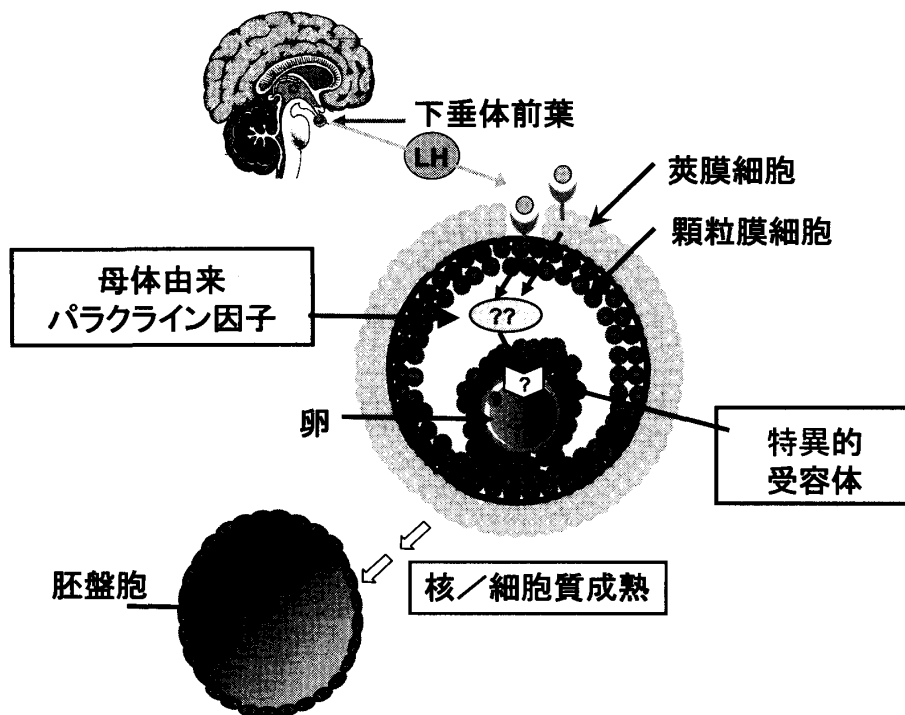
生殖の重要な過程である卵成熟および受精後の胚発育は、近年の生殖補助技術の発達により生体外でも行われるようになったが、その成績は生体内のものに比べ劣る。さらに動物実験において、体外培養によって得られた胚を移植した時の妊娠率は、生体内で発育した胚を移植した場合に比べ低下する。また、受精卵を体外培養後に移植した際の体外培養環境が、得られた仔の行動パターンに影響を及ぼすことが報告されており<sup>1)</sup>、ヒトでは生殖補助医療により胚の遺伝子異常が生じ、出生児の特定疾患の頻度が上昇することが知られている<sup>2,3)</sup>。生体内での卵成熟および受精後の胚発育は、それぞれ卵巣および卵管・子宮由来のパラクライン因子により制御されていると考えられ、生体外では、これらの母体由来パラクライン因子が欠如することで、さまざまな異常が生じていると推測される。

卵巣内に存在する第 1 減数分裂前期の卵母細胞は、完全に成長したものでも、受精・発生能をも

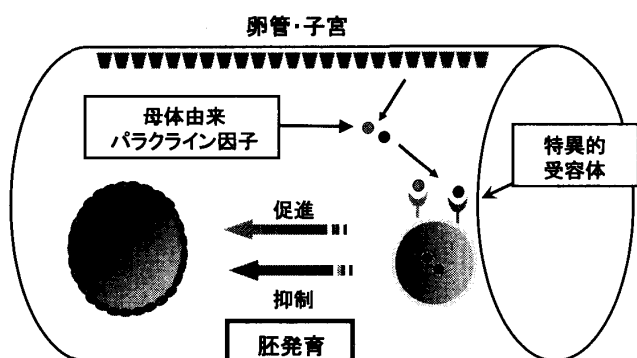
たない未成熟な卵である。卵成熟には核成熟と呼ばれる、第 1 減数分裂前期で停止していた卵が減数分裂を再開し、第 2 減数分裂中期に達する核の形態学的な変化と、細胞質成熟と呼ばれる、核成熟とは区別される、卵の受精能および初期胚へと発生する能力がある。卵の核成熟および細胞質成熟は、LH サージによって誘導されることが知られている。しかし、卵巣における LH 受容体は、顆粒膜細胞、莢膜細胞に局在しており、卵にはほとんど発現していないため、卵の核成熟および細胞質成熟には、顆粒膜細胞、莢膜細胞由来のパラクライン因子が関与していると考えられるが、その詳細は明らかではない(図 1)。一方、着床前期胚の発育には、卵管・子宮由来のパラクライン因子が重要な役割をもつことが解明されつつある(図 2)。

現在、体外成熟によって得られた卵を用いた体外受精・胚移植が試みられているが、その成績は十分なものでなく、母体由来パラクライン因子の欠如による卵成熟不全、特に細胞質成熟の異常による卵の質の低下が考えられている。また、受精

Key Words: Paracrine factor, Oocyte maturation, Preimplantation embryo development, Apoptosis, Signaling system



【図1】 卵成熟と母体由来パラクライン因子



【図2】 胚発育と母体由来パラクライン因子

卵の体外培養では、生体内で発育したものと比較してアポトーシスが高頻度に発生することが知られており<sup>4)</sup>、母体由来パラクライン因子によるアポトーシス関連因子の制御が欠如することに由来すると推測される。

本研究では、母体由来パラクライン因子に着目し、その卵成熟および胚発育制御について、1) LHが誘導する母体由来卵成熟パラクライン因子の網羅的検索、2) 母体由来パラクライン因子による胚発育・アポトーシス調節の解明、の観点から検討を行い、適正な体外成熟-体外受精-胚培養環境の

基礎を作ることを目的とした。

## 方法

### 1. 母体由来卵成熟パラクライン因子の網羅的検索

卵成熟を誘導する母体由来パラクライン因子を網羅的に同定するため、DNA マイクロアレイ (Affymetrix mouse MGU74v2 array; 遺伝子数 > 45,000 genes) を用いて、LH サージ後にマウス卵巣で発現が上昇する、リガンドとしての分泌タンパクまたはその受容体の遺伝子を候補因子として抽出した。これらの候補因子の卵巣内局在を、単離した卵、顆粒膜細胞、卵丘細胞における (real-time) RT-PCR、卵および卵巣における免疫染色または ELISA により、LH によるリガンドおよび受容体の発現調節について RNA・タンパクレベルで検証した。受容体が卵または卵丘細胞に存在し、体細胞にてリガンドが産生されている因子で、リガンドまたは受容体の発現が LH にて誘導されるものを最終的な候補因子とし、その卵成熟への作用について、in vitro および in vivo アッセイを用いて検討した。In vitro アッセイとしては、卵核胞

【表 1】 卵巣における、リガンド・受容体の局在

	卵	卵丘細胞	顆粒膜細胞	莢膜/間質細胞
BDNF	-	+	+	-
TrkB	+	-	-	-
INSL3	-	-	-	+
LGR8	+	-	-	-
レプチン	+?	+	+	+
Ob-Rb	+	+	+	NA
KitL	-	-	+	+
c-kit	+	-	-	NA

?, mRNA(-), タンパク(+), NA: not available

崩壊(germinal vesicle breakdown: GVBD)を検討するため、排卵前卵胞培養を行った。第1極体の放出への作用は、卵-卵丘細胞複合体培養を用いて検討した。さらに、細胞質成熟への作用を調べるため、未成熟卵の体外成熟-体外受精-胚培養を行い、受精率、胚盤胞到達率を測定した。また、卵の受精能を反映し、細胞質成熟の指標の一つとして考えられている卵細胞内グルタチオン濃度を測定した。In vivo アッセイは、FSH 刺激した雌マウスに intrabursal injection によりリガンドを投与し、その GVBD への影響について調べた。また、FSH 刺激後に雌マウスに受容体の抑制剤投与し、hCG 投与により排卵させて第1極体放出率を測定した。さらに、この受容体の抑制剤を投与したマウスを交配させ、動物あたりの得られた胚盤胞数、胚盤胞あたりの細胞数を調べた。

## 2. 母体由来パラクライン因子による胚発育・アポトーシス調節の解明

卵管・子宮内膜では種々の成長因子・サイトカインが産生されている。その中には、受容体が着床前期胚に存在するものがあり、胚発育に関与する可能性が考えられる。胚発育を調節する新規母体由来パラクライン因子を同定するため、母体でのリガンドの産生、着床前期胚での受容体の発現を調べ、候補因子の胚への生物学的作用について、胚発育・アポトーシスへの関与を検討した。リガンドの産生は、マウス卵管および子宮内膜を交配前、交配後に経時的に採取し、real-time RT-PCR および ELISA によって発現量の変化を測定した。また、各発育段階のマウス着床前期胚を採取

し、受容体の発現量を real-time RT-PCR で定量した。さらに、免疫染色を用いてタンパクレベルでの発現を、経時的かつ空間的に調べた。胚への作用については、2細胞期胚を採取し、リガンドを添加培養して胚発育、胚盤胞到達率、胚盤胞接着率、胚盤胞 outgrowth 率への影響を調べた。作用の特異性は、受容体の抑制剤、リガンド/受容体の中和抗体、またはリガンドのアンタゴニストを用いて検討した。また、免疫手術-differential staining により胚盤胞の内細胞塊、栄養膜外胚葉層の細胞数を測定した。胚のアポトーシス発生に関しては、caspase-3 assay, TUNEL assay を用いて検討した。さらに、アポトーシス発生の分子機構を解明するため、各種 caspase 抑制剤を用いてアポトーシス抑制の経路について検討した。また、ミトコンドリア機能の破綻を調べるため、活性化型ミトコンドリアのみを検出できる dye を用いた。また、免疫染色により、破綻したミトコンドリアから細胞質へ流出したシトクロム C の検出を行った。

アポトーシスは、種々の刺激によりアポトーシスカスケードが始まり、アポトーシス促進因子と抑制因子のバランスで最終的にアポトーシスの執行が決定される。着床前期胚の体外培養では、母体由来パラクライン因子の欠如によりアポトーシス抑制因子の発現調節が失われ、アポトーシスが生じる可能性がある。着床前期胚のアポトーシス制御に重要なアポトーシス抑制因子を、ノックアウトマウスの表現型解析により検索し、得られた候補分子について、マウス着床前期胚にアンチセ

ンスを用いた遺伝子発現抑制を行い、アポトーシスの発生について検討した。また、母体由来パラクライン因子による胚のアポトーシス抑制因子の発現調節についても、アンチセンスによる遺伝子発現抑制モデルを用いて検討した。

【表2】新規卵巣由来パラクライン因子の卵成熟作用

	核成熟		
	GVBD	第1極体放出	細胞質成熟
BDNF	-	++	++
INSL3	++	-	?
レプチン	+	+	+
KitL	-	++	-

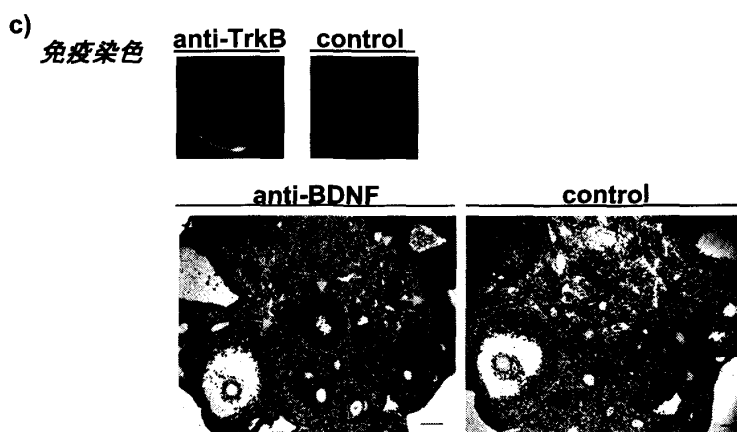
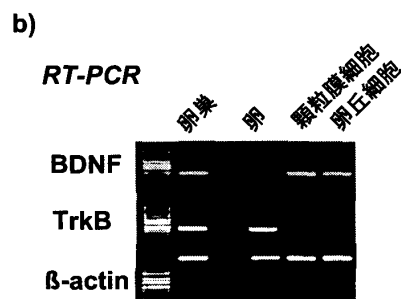
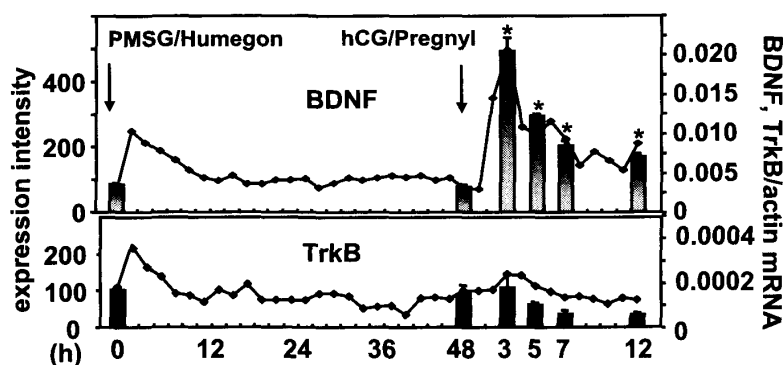
## 成 績

### 1. 母体由来卵成熟パラクライン因子の網羅的検索

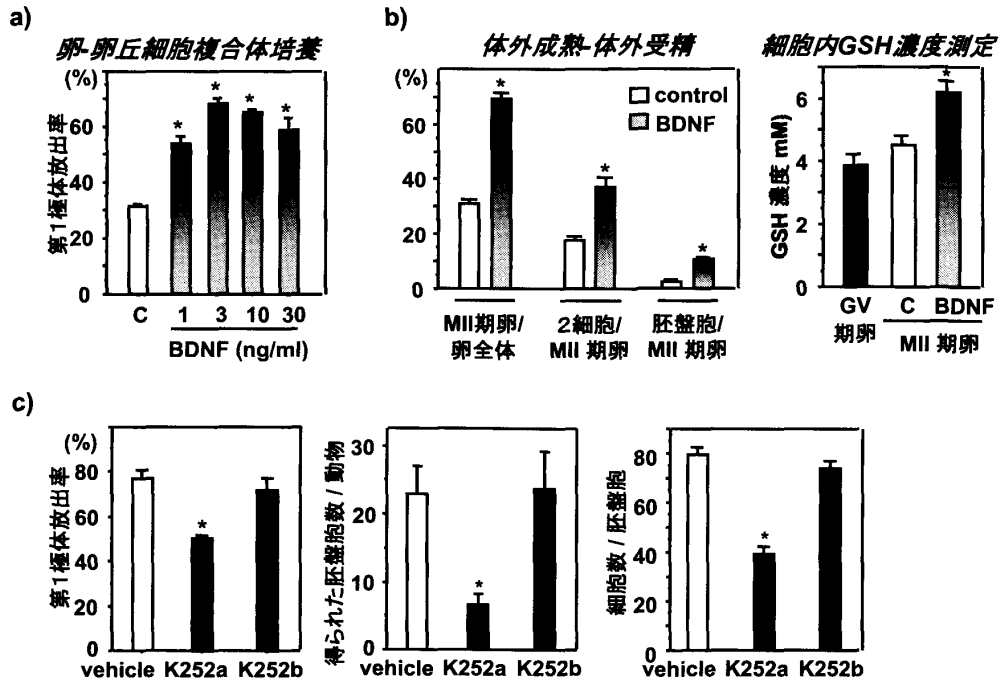
#### (1) 新規母体由来卵成熟パラクライン因子の同定

LHサージ後にマウス卵巣で発現が上昇する、リガンドとしての分泌タンパクまたはその受容体の遺伝子を候補因子として抽出したところ、45,000以上の遺伝子の中から、100以下の遺伝子数に絞り込むことができた。さらに、受容体が卵/卵丘細胞に存在し、リガンドが体細胞で産生されるものを最終的な候補因子としたところ、最終候補遺伝子数は24となった。これらの候補因子に対して、*in vitro* および *in vivo* アッセイにより、卵成熟への作用を検討した結果、母体由来新規卵成熟因子として、brain-derived neurotrophic factor (BDNF)<sup>5)</sup>、insulin-like 3 (INSL3)<sup>6)</sup>、レプチン(投稿

a) line graph: DNA マイクロアレイ; bar graph: real-time RT-PCR



【図3】マウス卵巣における、BDNF、TrkBのゴナドトロピン投与による発現変化(a)とBDNF、TrkBの局在(b, c)(文献5より一部改変)



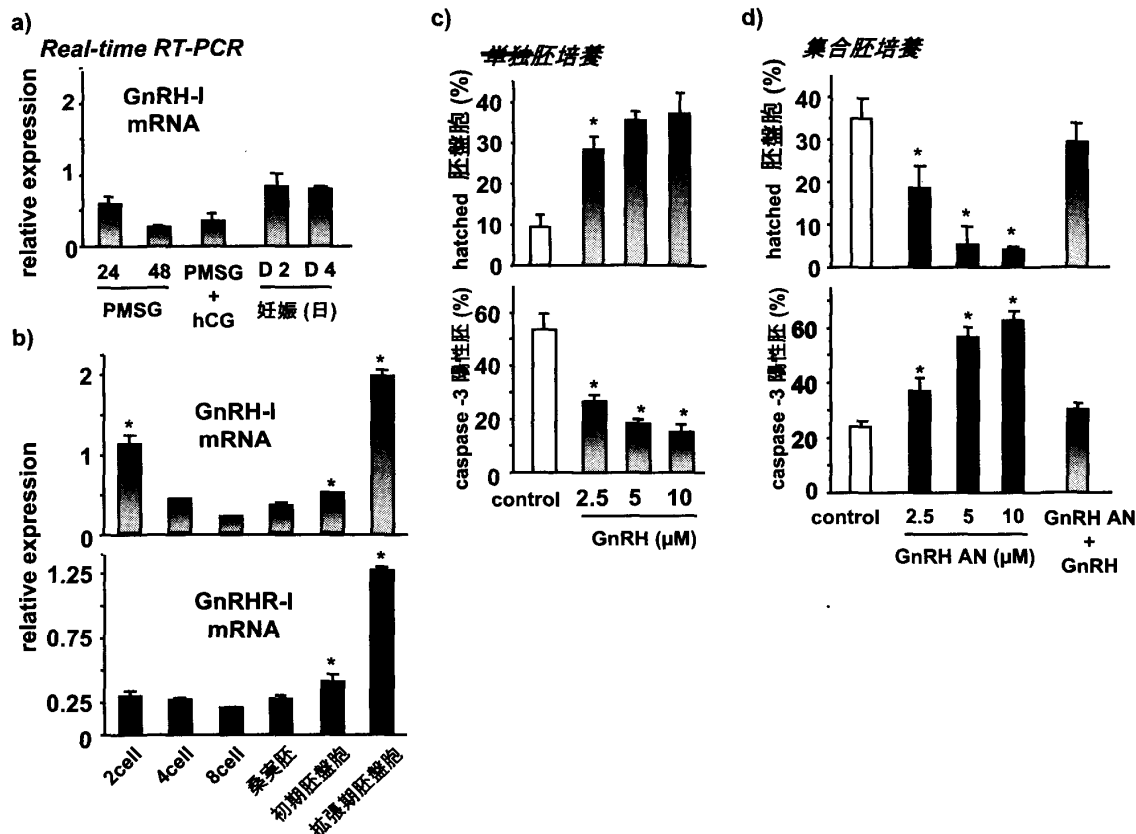
【図4】 BDNFの卵成熟作用(a)in vitroにおける第1極体放出作用 C: control, (b)in vitroにおける細胞質成熟作用, (c)in vivoにおける卵成熟作用 K252a: Trk抑制剤, K252b: 細胞膜非透過型(文献5より一部改変)

中), kit ligand(投稿中)を見出した。これらのリガンドおよびその特異的受容体の卵巣内局在を表1にまとめた。また、これらの新規卵成熟因子の卵成熟への作用について、核成熟および細胞質成熟促進作用に分けてまとめた(表2)。それぞれの新規卵成熟因子の卵巣内局在はさまざまであったが、その特異的受容体は卵のみに局在しているものが多く認められた。卵成熟への作用も新規卵成熟因子によって異なっていた。今後は、これらの因子の卵成熟への相互作用について検討していく必要がある。

## (2) BDNFの卵成熟促進作用

本講演では、我々が同定した新規卵成熟因子の中から代表例として、BDNFの成績を提示した。DNAマイクロアレイとreal-time RT-PCRによる検証の結果、マウス卵巣におけるBDNF mRNAの発現は、hCG投与後に発現が増加し、3時間でピークに達し、その後漸減した。一方、受容体のTrkB mRNAの発現はhCGにて変化しなかった(図3a)。ELISAによるタンパクレベルの検討では、BDNFの発現はhCG投与後7時間でピークに達することから<sup>5)</sup>、BDNFの核成熟への作用は、

GVBD促進ではなく、第1極体放出を誘導する可能性が示唆された。免疫染色およびRT-PCRの結果から、BDNFは卵巣顆粒膜細胞にて産生され、受容体のTrkBは卵に特異的に発現していることが明らかとなった(図3b, c)。排卵前卵胞培養では、BDNFは卵核胞崩壊を誘導しなかったが<sup>5)</sup>、卵-卵丘細胞複合体培養では第1極体の放出を促進した(図4a)。この作用はTrkBの細胞外ドメインまたはTrk抑制剤でブロックされ、TrkBを介した特異的な作用であった<sup>5)</sup>。また、BDNFは卵の体外成熟-体外受精-胚発育試験で、受精率・胚盤胞到達率を向上させる作用を有し、成熟卵のグルタチオン(glutathione; GSH)レベルを増加させ、卵の細胞質成熟を促進することが明らかとなった(図4b)。さらに、Trk抑制剤(K252a)を用いたin vivoの実験においても、第1極体放出の抑制、胚盤胞数・胚盤胞細胞数の減少が認められ(図4c)、BDNFが生体内で卵成熟因子として重要な働きを持つことが示された。



【図5】 GnRH-Iの着床前期胚発育促進，アポトーシス抑制作用(a)子宮におけるGnRH-I mRNAの発現変化 PMSG：pregnant mare serum gonadotropin, hCG：human chorionic gonadotropin, (b)着床前期胚におけるGnRH-I, GnRHR-I mRNAの発現変化, (c)GnRHアゴニスト(GnRH)の胚発育(上段)，アポトーシス(下段)への作用, (d)GnRHアンタゴニスト(GnRH AN)の胚発育(上段)，アポトーシス(下段)への作用, \*,  $P < 0.05$ (文献7より一部改変)

## 2. 母体由来パラクライン因子による胚発育・アポトーシス調節の解明

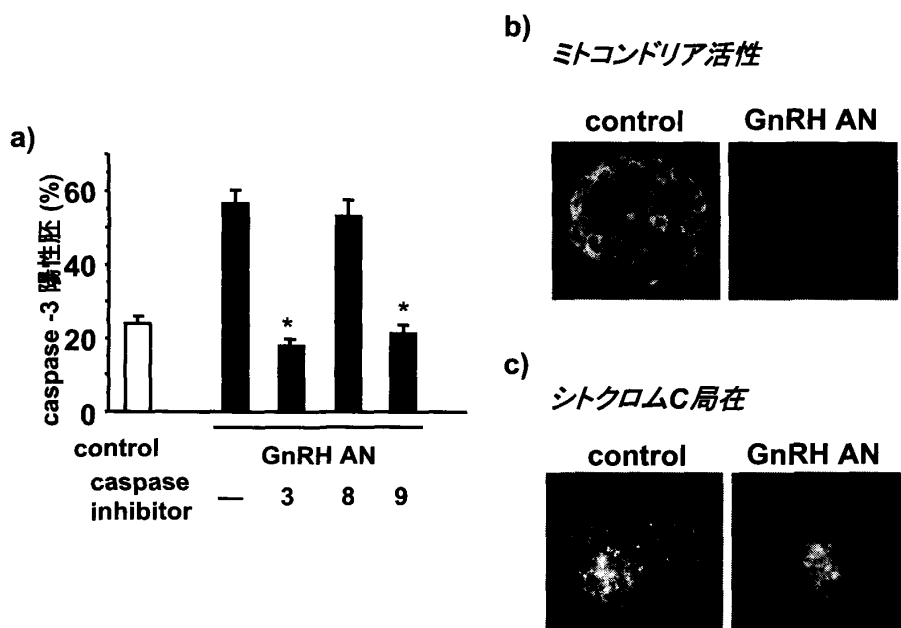
### (1) 新規母体由来胚発育調節パラクライン因子の同定

我々は新規胚発育調節因子として、GnRH-I, レプチン, transforming growth factor alpha (TGFA), BDNF, glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF)を同定した<sup>7)~11)</sup>。これらの因子は卵管・子宮内膜で産生され、その受容体を発現している着床前期胚に直接作用し、胚発育を促進、アポトーシスの発生を抑制した。また、グレリン, tumor necrosis factor alpha (TNFα)が逆に胚発育を抑制することを見いだした<sup>12)13)</sup>。

### (2) GnRH-Iの着床前期胚発育促進，アポトーシス抑制作用

本講演では、我々が同定した新規胚発育調節因

子の中から代表例として、GnRH-Iの成績を提示した。Real-time RT-PCRによる測定の結果、GnRH-Iは子宮で発現しており、交配の前後で発現量の有意な増加は認められなかった(図5a)。一方、着床前期胚におけるGnRH-I受容体(GnRHR-I)の発現量をReal-time RT-PCRで定量したところ、初期胚盤胞期以降に発現が急増した(図5b)。さらに、GnRH-Iの発現は胚自身でも認められ、2細胞期に高発現しており、その後発現が低下し、初期胚盤胞期以降に再度発現が増加した(図5b)。また、胚盤胞ではGnRH-I, GnRHR-Iともに、内細胞塊, 栄養膜外胚葉層の双方で発現が認められた<sup>7)</sup>。これらのリガンド, 受容体の発現パターンから、GnRH-Iはパラクラインおよびオートクライン双方の作用によりその受容体を発現している胚の発育を調節することが想定された。



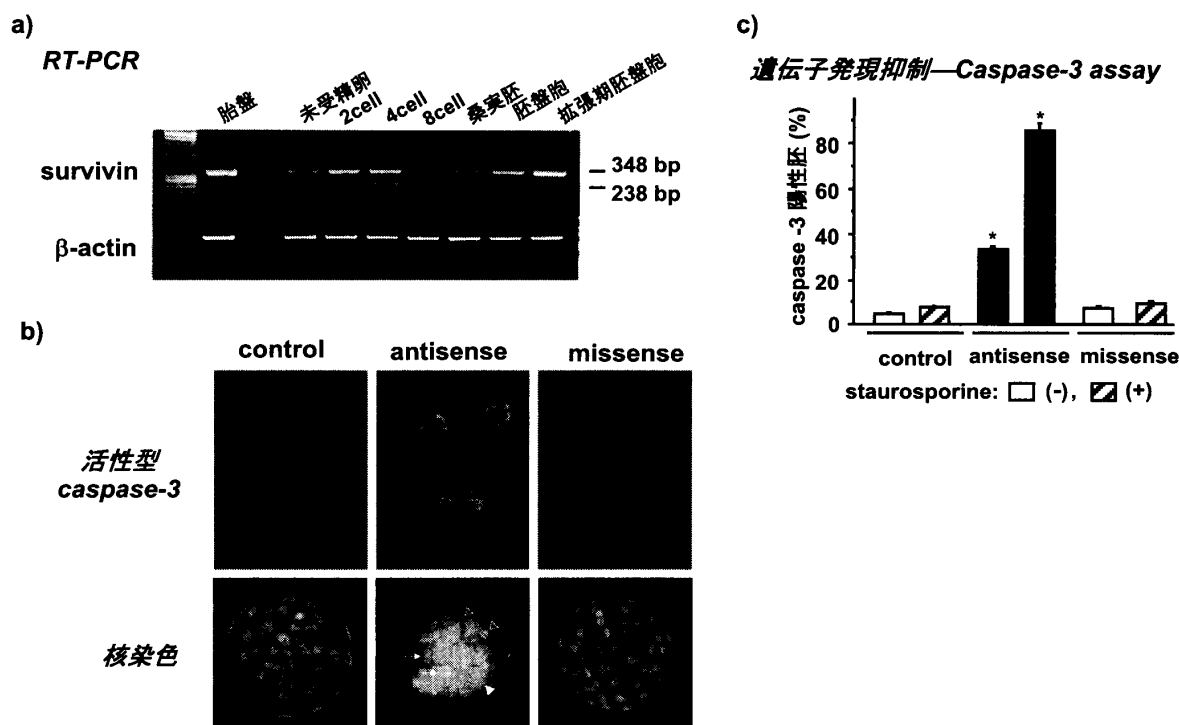
【図6】GnRH-Iの胚のアポトーシス抑制機構(a)GnRHアンタゴニスト(GnRH AN)による胚のアポトーシス誘導に対する各caspase抑制剤の作用, (b, c)GnRHアンタゴニストによってアポトーシスを誘導した胚のミトコンドリア活性(b)とシトクロムCの細胞内局在(c), \*,  $P < 0.05$ (文献7より一部改変)

GnRH-Iのパラクライン作用を検討するため、胚から産生されるGnRH-Iの効果を減弱させるべく2細胞期胚を多量の培養液中で個別に培養し(単独胚培養), GnRH-Iアゴニストを添加した。培養後の2細胞期胚のhatched胚盤胞への到達率を観察し, caspase-3 assayにより胚のアポトーシス発生を測定したところ, GnRH-Iアゴニストは胚の発育を促進し, アポトーシスの発生を抑制することが明らかとなった(図5c)。次に, GnRH-Iのオートクライン作用を検討するため, 2細胞期胚を少量の培養液中で多数同時に培養し(集合胚培養), 培養液中のGnRH-I濃度を増加させた状態でGnRH-Iアンタゴニストを添加した。パラクライン作用の検討と同様の方法で, hatched胚盤胞到達率, 胚のアポトーシス発生を調べたところ, GnRH-Iアンタゴニストにより胚の発育は抑制され, アポトーシスの発生が増加した(図5d)。さらに, GnRH-Iアンタゴニストによるアポトーシスの発生は, アポトーシスの内因経路に関与するcaspase抑制剤の同時添加によりブロックされたことから, ミトコンドリアの機能破綻が重要となる内因経路が関与していることが示唆された(図

6a)。実際, GnRH-Iアンタゴニストにより, 胚盤胞の活性化ミトコンドリアの減少(図6b), ミトコンドリア内のシトクロムCの細胞質への放出が認められた(図6c)。以上から, GnRH-Iはパラクラインおよびオートクライン作用により胚の発育を促進し, アポトーシスを抑制することが明らかとなった。

### (3) 着床前期胚のアポトーシス制御に重要なアポトーシス抑制因子の同定

着床前期胚に発現しているアポトーシス抑制因子のうち, ノックアウトマウス表現型の文献的考察から, inhibitor of apoptosis(IAP)ファミリーであるsurvivin(baculoviral IAP-repeat-containing 5; BIRC5)以外のノックアウトマウスのホモ着床前期胚は正常に発育することから, survivinが着床前期胚のアポトーシス抑制に重要であると考え, 着床前期胚においてアンチセンスによるsurvivinの発現抑制を行い, そのアポトーシス抑制作用について調べた。RT-PCRによる検討では, survivinはすべての発育段階の胚に発現が認められた(図7a)。また, エクソン2が消失したスプライスバリエント(238bp)は4細胞期胚, 胚盤胞, 拡張



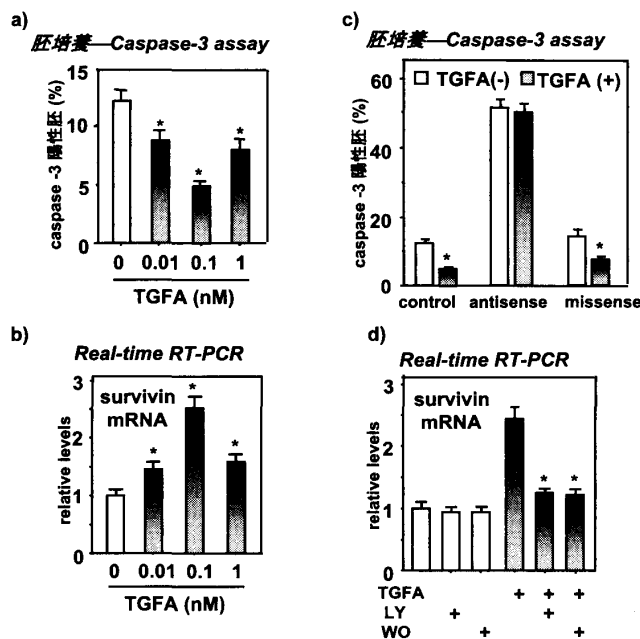
【図7】着床前期胚における survivin のアポトーシス抑制因子としての役割 (a) 着床前期胚の survivin mRNA の発現, (b, c) アンチセンスによる survivin 発現抑制の胚の変化 (b), アポトーシスの誘導 (c), \*,  $P < 0.05$  (文献 14 より一部改変)

期胚盤胞のみに認められた (図 7a). 免疫染色によるタンパクレベルでは, RT-PCR と同様の発現を認め, 胚盤胞においては, 内細胞塊, 栄養膜外胚葉層の双方で発現が認められた<sup>14)</sup>. アンチセンスにより survivin の発現を抑制した胚は, ほとんどが桑実胚から初期胚盤胞で発育が停止し, caspase 3 assay および核の形態学的変化からアポトーシスを生じていることが明らかとなった (図 7b). survivin アンチセンスによる胚のアポトーシス発生は, アポトーシス誘導剤である staurosporine を正常胚ではアポトーシスを誘導しない濃度 (0.1  $\mu\text{M}$ ) で作用させ, 胚にストレスを付加するとより顕著に認められた (図 7c). これらの結果から, survivin が着床前期胚のアポトーシス制御に重要であることが示された.

#### (4) 母体由来パラクライン因子による胚のアポトーシス抑制因子の発現調節

本講演では, 代表例として, TGFA による survivin の発現調節のメカニズムを提示した. Caspase3 assay による検討では, 単独胚培養において TGFA は胚盤胞のアポトーシス発生を抑制し (図

8a), その効果は TGFA の中和抗体によりブロックされた<sup>9)</sup>. 同じ系において, real-time RT-PCR により survivin の発現量を測定したところ, TGFA は survivin の発現量を増加させた (図 8b). さらに, アンチセンスにより survivin の発現抑制をおこなった胚は, コントロール, ミスセンス群で認められた TGFA によるアポトーシス抑制効果が消失した (図 8c). これらの結果から, TGFA は survivin の発現増加により胚のアポトーシス抑制作用を示すことが明らかとなった. さらに, TGFA による胚のアポトーシス抑制の分子機構を明らかにするため, TGFA のアポトーシス抑制のシグナル経路として知られている phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) の着床前期胚における発現を RT-PCR にて調べたところ, 全ての発育段階の胚に発現が認められた<sup>9)</sup>. PI3K の抑制剤である LY294002 (LY) および wortmannin (WO) を胚に作用させ, 胚盤胞における survivin の発現量を real-time RT-PCR で測定したところ, TGFA による survivin の発現増加作用が認められず, TGFA は PI3K 経路を介して survivin の発



【図8】 TGFAによる着床前期胚のアポトーシス抑制機構 (a) TGFAによる着床前期胚のアポトーシス抑制作用, (b) TGFAによる着床前期胚の survivin 発現増加作用, (c) アンチセンスによって survivin の発現を抑制した胚への TGFA のアポトーシス抑制作用, (d) PI3K 抑制剤の TGFA による胚の survivin 発現増加作用のブロック LY: LY294002, WO: wortmannin, \*,  $P < 0.05$  (文献9より一部改変)

現量を増加させることが示された(図8d)。

## 考 察

我々は、母体由来パラクライン因子が卵成熟・胚発育に重要であることを示してきた。DNA マイクロアレイによる卵成熟因子の網羅的検索は、現在検討中の他の候補因子も含め、卵成熟に必須な母体由来パラクライン因子を全て見出すことが可能である。それらを適切に使用することで、体外成熟卵の質の向上が期待される。

卵の質がその後の胚発育を左右することは明らかであるが、生体内ではさまざまな母体由来パラクライン因子が着床前期胚に作用し発育を調節している。また、母体由来パラクライン因子は着床前期胚のアポトーシスの制御にも重要な役割を果たしている。ヒトの着床前期胚は、体外培養下でも発育可能であり、移植により児を得ることができる。しかし、体外受精反復不成功症例に対する GIFT/ZIFT の有用性や、動物実験の胚移植成績

からも、母体由来パラクライン因子が欠如した体外培養環境は、着床前期胚の質を低下させることが示唆される。

胚の良し悪しの評価は、主として形態学的な指標によってなされているが、母体由来パラクライン因子の欠如が分子レベルでどのような影響を及ぼしているかは、現在のところまだ不明であり、体外受精胚移植によって生まれた児の長期予後の調査を進めることは非常に重要である。卵の体外成熟、着床前期胚の体外培養における母体由来パラクライン因子の役割について、さらなる基礎的研究が必要と考える。

本研究の臨床応用の可能性に関しては、次のようなことが期待される。DNA マイクロアレイによる母体由来パラクライン因子の同定は、卵の体外成熟に必要なすべてのパラクライン因子の解明に繋がり、効率的かつ質の高い体外成熟法の開発に応用できる。また、胚の体外培養時に母体由来パラクライン因子を適切に用いることで、胚の質が高まり、IVF-ET の成績の向上に繋がることが期待される。逆に、これら母体由来パラクライン因子の効果的な抑制剤の使用は、新たな避妊法の開発にも貢献すると考える。我々の研究成果は、生殖生理学の新知見のみならず、生殖医学のさらなる発展への可能性を秘めており、臨床応用を目標に研究を進めていきたい。

## 謝 辞

第60回日本産科婦人科学会学術講演会において、シンポジウム講演の機会を与えていただきました岡村州博学術集会長、座長の労をお執りいただいた吉村泰典教授、杉野法広教授に感謝申し上げます。

## 共同研究者(敬称略)

秋田大学医学部生殖発達医学講座産婦人科分野 田中俊誠, 福田 淳, 熊谷 仁

秋田大学医学部感覚器学講座皮膚・形成外科学分野 河村七美

スタンフォード大学医学部産婦人科学講座生殖生物学部門 Aaron J.W. Hsueh

## 文 献

- 1) Ecker DJ, Stein P, Xu Z, Williams CJ, Kopf GS, Bilker WB, Abel T, Schultz RM. Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 1595—1600
- 2) Cox GF, Burger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 162—164
- 3) Moll AC, Imhof SM, Cruysberg JR, Schouten-van Meeteren AY, Boers M, van Leeuwen FE. Incidence of retinoblastoma in children born after in vitro fertilisation. *Lancet* 2003; 361: 309—310
- 4) Brison DR, Schultz RM. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol Reprod* 1997; 56: 1088—1096
- 5) Kawamura K, Kawamura N, Mulders SM, Sollewijn Gelpke MD, Hsueh AJ. Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 9206—9211
- 6) Kawamura K, Kumagai J, Sudo S, Chun SY, Pisanska M, Morita H, Toppari J, Fu P, Wade JD, Bathgate RA, Hsueh AJ. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 7323—7328
- 7) Kawamura K, Fukuda J, Kumagai J, Shimizu Y, Kodama H, Nakamura A, Tanaka T. Gonadotropin-releasing hormone I analog acts as an antiapoptotic factor in mouse blastocysts. *Endocrinology* 2005; 146: 4105—4116
- 8) Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, Nakamura A, Tanaka T. Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology* 2002; 143: 1922—1931
- 9) Kawamura K, Fukuda J, Shimizu Y, Kodama H, Tanaka T. Survivin contributes to the antiapoptotic activities of transforming growth factor alpha in mouse blastocysts through phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Biol Reprod* 2005; 73: 1094—1101
- 10) Kawamura K, Kawamura N, Fukuda J, Kumagai J, Hsueh AJ, Tanaka T. Regulation of preimplantation embryo development by brain-derived neurotrophic factor. *Dev Biol* 2007; 311: 147—158
- 11) Kawamura K, Ye Y, Kawamura N, Jing L, Groenen P, Gelpke MS, Rauch R, Hsueh AJ, Tanaka T. Completion of Meiosis I of preovulatory oocytes and facilitation of preimplantation embryo development by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Dev Biol* 2008; 315: 189—202
- 12) Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, Nakamura A, Honda Y, Sato T, Tanaka T. Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology* 2003; 144: 2623—2633
- 13) Kawamura K, Kawamura N, Kumagai J, Fukuda J, Tanaka T. Tumor necrosis factor regulation of apoptosis in mouse preimplantation embryos and its antagonism by transforming growth factor alpha/phosphatidylinositol 3-kinase signaling system. *Biol Reprod* 2007; 76: 611—618
- 14) Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, Shimizu Y, Tanaka T. Survivin acts as an antiapoptotic factor during the development of mouse preimplantation embryos. *Dev Biol* 2003; 256: 331—341

## Synopsis

In mammals, rupture of ovarian follicles and final maturation of oocytes occur in response to stimulation by pituitary-derived luteinizing hormones (LH) that act on the somatic granulosa and theca cells surrounding the oocyte. Because LH interacts only with ovarian somatic cells, its potential regulation of oocyte functions is presumably mediated by local paracrine factors. Shortly after stimulation by the preovulatory surge of LH, oocytes arrested at the late prophase resume meiosis characterized by germinal vesicle (nuclear envelope) breakdown (GVBD), chromosome condensation, and extrusion of the first polar body in preparation for fertilization and early embryonic development. In addition to nuclear maturation exemplified by GVBD and extrusion of the first polar body to complete the first meiotic division, oocytes also undergo cytoplasmic maturation characterized by cytoplasmic changes essential for monospermic fertilization, processing of the sperm, and preparation for development to preimplantation embryos. Although the spermatozoon provides an essential element for embryo generation, the developmental fate of the embryo is principally dictated by the oocyte. Accumulating evidence indicates that a number of growth factors and cytokines act as paracrine and/or autocrine factors during early embryo development. In addition, developing early embryos produce growth factors that act in an autocrine manner to regulate their own growth and differentiation, or to serve as paracrine factors by regulating endometrial receptivity for blastocyst implantation. Apoptosis is an essential physiologic process used in almost all tissues to remove damaged or superfluous cells. However, early embryos are unique because no cell death is found up to the blastocyst stage during normal development. Recent studies have focused on the role of apoptosis on the degradation of preimplantation embryos during in vitro cultures. In the in vitro environment, apoptosis of early embryos has been attributed to the lack of maternal paracrine factors such as essential growth factors and cytokines released by maternal reproductive tracts. Here, we show novel maternal paracrine factors that regulate oocyte maturation and preimplantation embryo development and apoptosis. We performed DNA microarray analyses using ovaries following gonadotropin stimulation and identified candidate ligand-receptor pairs potentially involved in the process of oocyte maturation. Among ovarian genes, we selected the candidates based on the increased expression levels by the preovulatory LH surge and localization of ligands and receptors in ovarian somatic cells and oocytes or cumulus-oocyte complexes, respectively. Using in vitro and in vivo studies for oocyte nuclear and cytoplasmic maturation, we determined novel ovarian paracrine factors for induction of oocyte maturation. We also found novel paracrine factors that stimulate or inhibit early embryonic development and apoptosis based on the localization of ligand-receptor pairs in reproductive tracts and preimplantation embryos. Furthermore, we demonstrated molecular mechanisms of the paracrine factors to inhibit apoptosis by using antisense approach for gene down regulation in the embryos. In this meeting, I have shown brain derived neurotrophic factor, GnRH-I, transforming growth factor/survivin, as representative maternal paracrine factors for oocyte maturation, embryo development, and mechanism of apoptosis in embryos, respectively.

---