

卵形成の制御機構の解明と卵巣卵の体外成熟法の開発

佐藤 英明*

東北大学大学院農学研究科
宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町1-1 〒981-8555

2012年11月6日受付, 2012年12月3日受理

1. はじめに

家畜を含む哺乳動物の卵形成は独特である。卵母細胞は卵胞の中で特有の構造をもつ細胞に分化するが、多くの卵母細胞の中から一定数が選抜され、さらにその中の一部が発育分化を継続し、成熟して、受精可能となり、排卵される。そして排卵に至らなかった卵母細胞は退行・死滅する。このような卵形成を選択的卵形成と呼んでいるが、筆者は選択的卵形成の制御機構に興味をもって研究を続けてきた。マウス、ラットの研究成果を踏まえ、ブタ、ウシについても研究を行い、優良家畜雌から多数の受精可能卵子を得る技術開発に取り組んできたが、今回、主に東北大学赴任後の研究成果について紹介したい。

卵胞発育は卵巣内外の因子の調節を受けているが、卵巣外からの因子は、血管網の流れに乗って卵胞に到達して機能を発現するので、その機能発現は卵胞の血管構築に影響される。レクチンアンジオグラフィやコロジオンキャスト法で卵胞の血管構築を観察すると、卵巣内の血管網分布には大きな偏りがある(佐藤, 1994)。すなわち、小さな卵胞や閉鎖卵胞への血管網は疎であり、大きな卵胞には豊富な血管網が伸びている(Jiang et al., 1999; 2002)。筆者は、このような血管分布の偏りと、一部の卵胞が発育し、大多数が閉鎖するいわゆる卵胞の選択的発育に相関があるのではないかと考え研究を行ってきた。すなわち、卵胞の発育・閉鎖の結果として血管網発達に差異が生じるのではなく、血管網の発達の違いが卵胞の発育、閉鎖を左右するのではないかと考えてきた。さらに筆者は血管増殖因子が卵胞の血管増殖を誘起

するとともに、閉鎖卵胞を救助し、卵胞発育を直接的に促進することを示してきた。

一方卵胞の血管増殖は、卵胞膜に局限して特定の時期に急激に誘起され、整然とした網目状構造をつくる。このような血管網構築に見られる血管新生はガン組織における血管形成とは異なる。卵胞膜に局限して、急激に網目状構造をつくるメカニズムはどのようなものかに興味を持ち、研究を行ってきた。

2. 卵胞の血管増殖能

筆者は性成熟前のマウスにPMSGやhCGを投与し、その後卵巣を採取、ホモゲナイズし、凍結乾燥した粉末の血管誘導能を調べたことがある(Sato et al., 1982)。ホルモン未投与やhCG投与マウス卵巣粉末よりも、PMSG投与マウス卵巣粉末に強い血管増殖能を観察し、卵巣には血管増殖因子があり、卵胞刺激ホルモン(FSH)により、その発現が増強されることを示した。また、卵胞における血管新生は、BuddingとSproutingによって誘起されることも示した(Jiang et al., 2008)。

3. 卵胞発育・閉鎖と血管網発達の相関

筆者らがマウスを用いて組織学的に解析したところ、卵胞発育と血管網の発達・退行には明確な相関のあることが明らかになった。筆者らの組織学的観察から血管網と卵胞発育の相関について次のように推察している(Miyamoto et al., 1996)。

卵胞につつまれるようになった卵母細胞は血管に接触することによって発育が促進・選抜される。選抜された卵胞のうち、次に周辺に血管新生を誘起するものの発育がさらに促進されるが、このような卵胞の中で卵母細胞

* 連絡者: 佐藤 英明 (さとう えいめい)
(東北大学大学院農学研究科)
〒981-8555 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町1-1
Tel. 022-717-8685 Fax. 022-717-8879
E-mail: eimei@bios.tohoku.ac.jp

は卵子特有の構造に分化する。なお、平滑筋の収縮により卵胞への血流量が抑制されると発育が阻害される。周囲に豊富な血管網をもつようになった卵胞の中で、血管の透過性が更新したものがさらに大きく発育し、排卵へと近づく。血管の透過性亢進とともに卵胞は急激に発育し、排卵時の大きさに達するが、卵胞の中で卵母細胞は成熟し、受精能を備えるようになる。選抜されなかった卵胞は退行・閉鎖する。退行・閉鎖に至る卵胞周囲には血管の退行像が観察される。

東北大学に赴任した1997年当時、梅津元昭助教授が甲状腺機能障害をもつモデルラット (rdw) について研究されていた。rdw ラットの雌は排卵不全で不妊であったが、卵巣内の血管増殖を誘導することにより、閉鎖に至る卵胞を救助することが可能であった。すなわち rdw ラット卵巣の卵胞はすべてが退行し閉鎖に至る像を示すが、甲状腺ホルモンを投与したり、血管増殖因子を発現させると、血管新生が誘導され、退行卵胞は救助されるとともに発育し、排卵を誘起する。このようにして排卵した卵子は受精可能で、受精すると発生分化を継続し、子へと発育した (Jiang et al., 2003; 2008)。

4. 卵胞における血管増殖因子の局在化のメカニズム

卵胞の血管新生・増殖は卵胞膜に局限して観察される。どのようなメカニズムでこのような局限した血管増殖が可能になるかについて筆者らは次のような実験を行っている (Sato et al., 1991)。

上皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF) は、成長因子の中でもっとも生物活性の高いものの一つであるが、培養系において EGF は血管内皮細胞に対して分裂促進作用を示す。EGF は卵巣の顆粒層、卵胞膜層、間質に同定されるので選抜されて発育を進める卵胞周囲の血管新生にも EGF が関与していると思われる。EGF は組織液に溶解し組織の中を移動し、内皮細胞の増殖を促進することにより毛細血管形成に関与すると推察される。しかしながら卵胞での急激な血管増殖は卵胞の特定の部位、すなわち卵胞膜に限定される。このような血管の局所的増殖には EGF の血管増殖能を局所的に発現させる因子が関与しているのではないかと考えられる。筆者らは EGF の血管増殖能の局所的発現に関与する卵巣因子の検索を行い、卵巣由来グリコサミノグリカン (ovarian glycosaminoglycans, oGAGs) にそのような作用のあることを明らかにした (Sato et al., 1990)。すなわち EGF と oGAGs を同時に与えると EGF の血管増殖能は顕著に上昇する。また、EGF と oGAGs は複合体をつくることも明らかにし、卵巣、とくに卵胞において

EGF は oGAGs と結合して血管増殖作用を示すと思われる。

また卵母細胞が oGAGs 産生促進因子を産生・分泌し、顆粒層細胞での oGAGs 産生を促進して、oGAGs は卵胞膜に蓄積することを示した (Nakayama et al., 1996)。

これらの事実を踏まえると卵胞膜に蓄積する oGAGs が EGF を結合し、卵胞膜において急激な血管増殖を誘起することが卵胞に特徴的な血管増殖を誘導することにつながると推察される (図1)。

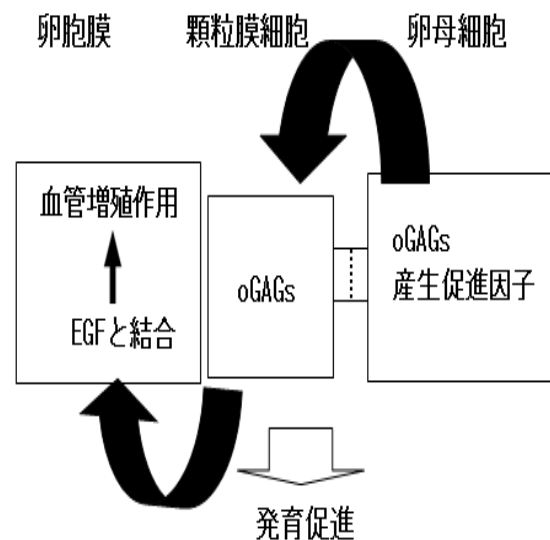


図1 卵胞の血管増殖メカニズム

卵母細胞は卵巣由来グリコサミノグリカン (oGAGs) 産生促進因子を産生分泌し、顆粒層細胞の oGAGs の産生分泌を促進させる。分泌された oGAGs は卵胞膜に蓄積する。卵胞膜に蓄積した oGAGs は血管増殖因子 (EGF など) を結合し、血管増殖因子の局所的集中を誘起し、周囲の血管網に作用して急激な血管増殖を誘起する。

5. 卵胞内での血管増殖因子遺伝子の発現とその影響

筆者らは臓器で発現し血管新生を誘導する VEGF 遺伝子ベクターを構築し、これを卵巣に直接導入してその影響を調べた。卵巣へ導入した VEGF 遺伝子が顆粒層細胞に取り込まれて発現し、卵胞周囲の血管網が発達することを確認した。すなわち、VEGF 遺伝子をミニプタ卵巣皮質にニードルを用いて直接注射するとその後1週間程度で卵巣表面に大卵胞が多数出現するとともに卵巣容積が増大した (Shimizu et al., 2003)。VEGF 遺伝子を投与された卵巣では、投与しない卵巣に比べ閉鎖卵胞数が減少した。顆粒層細胞での発現が認められ、卵胞液中には VEGF タンパク質濃度が上昇した。ラットにおいても VEGF 遺伝子を投与すると卵胞発育が促進され、

FSHの作用を増強し、通常の過排卵に比べ有意に排卵数が増加した。卵巣へのVEGF遺伝子投与は卵巣周囲の血管新生を促進させ、卵巣閉鎖を抑制することが明らかになった。すなわち、卵巣発育不全に起因する繁殖障害はVEGF遺伝子ベクターによる遺伝子治療とも呼ぶべき方法によって改善されると考えられる。

6. 卵子の成熟

卵子形成の最終段階で卵子は成熟する。多くの哺乳動物では、第一減数分裂前期で停止状態の卵母細胞は受精能をもたない未成熟な卵母細胞である。排卵に至る過程で、卵母細胞はゴナドトロピンの刺激によって減数分裂を再開し、卵核胞崩壊(GVBD)を引き起こす。その後、第一極体を放出して第二減数分裂中期に進行し、再び減数分裂を停止し、卵母細胞はこの状態で排卵され受精を待つ。この第二減数分裂中期で停止した状態の卵母細胞は受精能を獲得しており、成熟卵母細胞と呼ばれる。このように、第一減数分裂で停止した卵母細胞が減数分裂を再開し、第二減数分裂中期に至る一連の過程を「卵成熟」と定義されている(佐藤, 1990)。卵成熟については魚類、両生類およびヒトデといった下等動物において1960年代から研究が盛んに行われており、これらの動物では卵成熟を制御する因子が解明されている。すなわち、卵成熟においては主に3つの因子が順次動く。第1の因子は、脳下垂体から分泌されるゴナドトロピンである。これは卵母細胞を取り囲む卵巣細胞の受容体で受け取られ、第2の因子である卵成熟誘起ホルモン(MIH)を産生・分泌させる。MIHはさらに卵母細胞膜上の受容体に作用し、卵母細胞内で第3の因子である卵成熟促進因子(MPF)を活性化させる。このMPFの作用で卵母細胞は減数分裂を再開し、成熟する。3つの主要な因子のうちMPFだけが種を超えて共通の分子構造を持ち、ゴナドトロピン及びMIHの構造は動物種によって特異性を示す。また、MIHからMPFに至る情報伝達についても、動物種によって異なっている。現在、哺乳動物の卵成熟についてはFSH/LH刺激による卵母細胞内の卵成熟抑制因子(cAMPなど)の濃度低下によってMPFが活性化され、減数分裂の再開が誘起されると考えられている。しかしながら、哺乳動物のMIHの正体が何であるか、ゴナドトロピンから下流の情報伝達機構やMPFの活性化機構については筆者らが研究を開始した時点では不明であった。

哺乳動物の卵母細胞は、周囲を卵丘細胞層に取り囲まれ、卵丘細胞-卵母細胞複合体(COCs)を形成しているが、排卵前、ゴナドトロピンの刺激により卵成熟が開

始すると、COCsの体積が著しく膨張する現象が観察される。この現象は卵丘膨化と呼ばれる。卵丘膨化の生理的意義としては、卵胞壁からのCOCsの遊離と排卵、卵管上皮との相互作用によるCOCsの卵管内移動の促進および透明帯の構造の安定化に関与すること、さらに受精の際に精子のアクロゾームリアクションを促進し、機能的・形態的に欠陥のある精子に対し選択的バリアーとして働くことなどが挙げられる。卵丘膨化は体外成熟培養においてもゴナドトロピンの刺激により誘起される。さらにCOCsを高密度で培養した場合や卵丘細胞数が少ないCOCsを培養した場合、卵丘膨化が抑制されるだけではなく、卵成熟も有意に阻害されることから、卵丘膨化は、前述のような排卵や受精に関する機能だけでなく、卵成熟においても積極的に機能している可能性が高いと考えられる。

筆者らは主にブタを対象にして研究を行い、卵成熟における卵丘膨化の役割を明らかにした。

7. 卵丘膨化現象とヒアルロン酸

マウスでは、ゴナドトロピン刺激前では卵丘細胞間に細胞外マトリックスはほとんど見られないが、ゴナドトロピン刺激の5時間後までにCOCsが部分的に膨張し、その後、排卵直前にはCOCsはゴナドトロピン刺激前体積の20倍程度に膨張する。マウスでは、卵丘細胞間隙に蓄積する細胞外マトリックス成分はグリコサミノグリカンの一種であるヒアルロン酸である。ブタにおいても、ゴナドトロピン刺激に反応し卵丘細胞から粘着性の物質が分泌され、卵丘細胞間質に蓄積し、細胞外マトリックスを形成し、卵丘膨化が誘起されるが、その詳細は不明であった。筆者らはまずブタの卵丘膨化の細胞外マトリックス成分の分析を行った。卵胞より採取したCOCsを「3H」標識したグリコサミン(グリコサミノグリカンの構成成分)を含む培地で培養し、培養後、膨化したCOCsの細胞外マトリックスを各グリコサミノグリカン分解酵素(ヒアルロニダーゼ、ヘパリナーゼ、コンドロイチナーゼ)で分解した。その結果、無処理区と比較してヘパリナーゼ処理区では変化は見られなかったが、ヒアルロニダーゼもしくはコンドロイチナーゼを使用した実験区では無処理区と比較して有意に細胞外マトリックスが分解された。コンドロイチナーゼがコンドロイチン硫酸とヒアルロン酸のいずれも分解することを考慮するとヒアルロニダーゼ処理区とコンドロイチナーゼ処理区とで有意差は見られなかったことから、ブタCOCsの卵丘膨化に卵丘細胞間隙に蓄積したグリコサミノグリカンの主成分はヒアルロン酸と考えられた

(Nakayama et al., 1996)。そこで卵丘膨化時のヒアルロン酸の蓄積状態を調べた結果、培養6時間後からヒアルロン酸が卵丘細胞間隙に蓄積することが観察され始め、その後、卵丘細胞間隙におけるヒアルロン酸の蓄積の増加に伴って卵丘膨化が増大することが観察された (Kimura et al., 2002)。

近年3種類のヒアルロン酸合成酵素 (has1, has2, has3) が哺乳動物で同定され、これらの酵素を発現させることでヒアルロン酸合成を促すことができることから、これらの酵素がヒアルロン酸の生合成に重要であると考えられている。筆者らは卵丘膨化時にブタ COCs で発現するヒアルロン酸合成酵素遺伝子を RT-PCR で解析し、has2 mRNA が卵丘細胞で、has3 mRNA が卵母細胞で発現していることを明らかにした。さらに、これらの遺伝子発現に及ぼすゴナドトロピンの影響を調べた結果、has3 mRNA は FSH および LH いずれにも反応は示さなかったが、has2 mRNA の発現は FSH の濃度依存的に増加することを確認している (Kimura et al., 2002)。これらの結果からブタ COCs における卵丘膨化は、FSH によって発現が誘導される has2 由来のヒアルロン酸によって引き起こされると考えられる。

8. ヒアルロン酸結合タンパク質 CD44 の検出

ヒアルロン酸はグルクロン酸と N-アセチルグルコサミンという2糖が直鎖状に繰り返し結合した構造をとるもっとも単純なグリコサミノグリカンであるが、ヒアルロン酸は脊椎動物において広範囲の生物学的役割を担っている。ヒアルロン酸は他のグリコサミノグリカンとは異なり、硫酸化されず、またコアタンパク質とも結合しない単純な構造を持つため、ヒアルロン酸を主成分とする細胞外マトリックスでは、ヒアルロン酸がマトリックス内で機能するためにヒアルロン酸結合タンパク質 (HABP) が必要である。そこで卵丘膨化時にブタ COCs において機能する HABP の検出を試みた。卵成熟前後の COCs に発現する HABP を FITC 標識ヒアルロン酸によるリガンドプロット法を用いて検出したところ、85kDa の HABP のみが成熟に伴って発現していることが確認され、この HABP を解析した結果、85kDa の HABP はヒアルロン酸の代表的なレセプターである CD44 であることを明らかにした。さらにブタ COCs における CD44 の局在を調べた結果、CD44 は卵母細胞では発現しておらず、卵丘細胞で発現していることが確認された。これらの結果は RT-PCR による CD44 mRNA 発現の結果と一致した。また、細胞分画法や CD44 の蛍光免疫染色を用いることで、CD44 タンパク質が卵丘細胞

の細胞膜に発現していることが示された (Yokoo et al., 2002a)。これらの結果から CD44 が卵丘膨化時にヒアルロン酸レセプターとして機能している可能性が示された。

9. 卵成熟機構におけるヒアルロン酸-CD44 の作用

CD44 は細胞外ドメインにヒアルロン酸結合活性を有する代表的なヒアルロン酸レセプターであり、近年、CD44 の細胞内ドメインが細胞骨格タンパク質と相互作用する機能を持つことから、CD44 がヒアルロン酸のシグナル伝達に係わることが報告されている。筆者らは、ヒアルロン酸が卵丘膨化に伴って卵丘細胞間隙に蓄積し、さらに CD44 が卵成熟に伴い卵丘細胞の細胞膜に発現することを明らかにした (Yokoo et al., 2002b)。CD44 がヒアルロン酸のシグナル伝達に関与する報告があることから、COCs においても CD44 がヒアルロン酸の卵成熟誘起シグナルを卵母細胞へ伝達している可能性がある。そこで次に、卵成熟に対するヒアルロン酸-CD44 の影響について調べた。ヒアルロン酸の卵成熟に及ぼす影響を調べるため、ヒアルロン酸合成阻害剤 (DON) あるいは CD44 とヒアルロン酸の結合を阻害する抗 CD44 抗体を添加した培地で COCs を培養し、培養24時間の卵母細胞内 MPF (p34cdc2 kinase 活性) 及び GVBD 率を調べた。無処理区における培養24時間の卵母細胞内 MPF 活性は、培養0時間の MPF 活性を1とすると、培養24時間後の MPF 活性は 5.9 ± 0.4 倍であった。一方、DON もしくは抗 CD44 抗体を添加した培養24時間では卵母細胞内 MPF の活性化は阻害され、それぞれの MPF 活性は 2.5 ± 0.4 および 2.2 ± 0.2 倍で無処理区の培養24時間の MPF 活性と比較して有意に低かった (Lin et al., 2001)。また、GVBD 率も同様に DON 添加区および抗 CD44 抗体添加区の培養24時間後ではそれぞれ 19.0% および 13.3% と、無処理区 (63.8%) と比較して有意に低かった。これらの結果は、卵成熟過程においてヒアルロン酸が CD44 を介して MPF 活性を上昇させる機構が存在していることを示唆している。

10. ヒアルロン酸-CD44 の COCs ギャップ結合閉鎖作用

ヒアルロン酸-CD44 が卵成熟を誘起していることが示されたが、CD44 は卵母細胞には発現しておらず、卵丘細胞に局在している。つまり、ヒアルロン酸-CD44 の卵成熟誘起作用は卵母細胞に直接作用するのではなく、卵丘細胞を介して間接的に作用していると考えられる。COCs は卵丘細胞および卵丘細胞-卵母細胞がギャ

ップ結合で結合しているが、ギャップ結合タンパク質であるコネクシン 43 (Cx43) は COCs で発現するギャップ結合タンパク質の中で発現量をもっとも多く、卵巣内の生殖機能に重要である。そこで COCs ギャップ結合タンパク質・Cx43 に着目して、卵成熟に及ぼすヒアルロン酸-CD44 の影響について解析した。Cx43 の発現は、無処理区、DON 添加区及び抗 CD44 抗体添加区いずれにおいても大きな変化は見られなかった。Cx43 は他のコネクシンと異なり、リン酸化によりその機能が調節されることから、リン酸化型の Cx43 を調べる必要がある。そこで培養に伴って検出されるチロシンリン酸化 Cx43 を調べたところ、DON および CD44 抗体の添加により Cx43 のチロシンリン酸化が有意に阻害されることが明らかになった。最近、Cx43 で形成されるギャップ結合は、Cx43 のチロシン 247 とチロシン 265 の 2 カ所のチロシンがリン酸化されることでギャップ結合が閉鎖することが報告されている (Lin et al., 2001)。このことからブタ卵成熟においてヒアルロン酸-CD44 は Cx43 のチロシンリン酸化を誘導し、COCs ギャップ結合を閉鎖させる働きがあると考えられる。哺乳動物の卵成熟において、ゴナドトロピン (FSH/LH) 刺激による卵母細胞内の卵成熟抑制因子濃度の低下により MPF が活性化され、減数

分裂再開が誘起されると考えられている。この MPF 活性をコントロールする仕組みは不明であるが、COCs ギャップ結合の閉鎖によって卵丘細胞で産生される卵成熟抑制因子の卵母細胞内への流入が抑制され、卵母細胞内で抑制されていた MPF 活性が亢進するのではないかと考えられている。このような考え方と筆者らの卵丘膨化に関する研究結果からブタ卵成熟の調節機構は次のように考えられる (Yokoo と Sato, 2004)。まず、ゴナドトロピン刺激によって卵丘細胞においてヒアルロン酸合成が起これ、卵丘膨化が誘導される。卵丘細胞間マトリックスに蓄積したヒアルロン酸-CD44 の作用により、Cx43 のチロシンリン酸化が誘起され、COCs ギャップ結合が閉鎖される。その結果、卵丘細胞から卵母細胞内への卵成熟抑制物質の流入が低下し、MPF が活性化され、卵成熟が誘起される (図 2)。このヒアルロン酸-CD44 の作用が、哺乳動物卵成熟において MIH としての役割を担うのか否か、未だ明確に答えることはできないが、筆者らの研究からヒアルロン酸-CD44 が哺乳動物の MPF の活性化に重要であることが示された。

11. 体外成熟卵子の受精・体細胞初期化能

現在多くの家畜で未成熟卵母細胞の体外成熟 (IVM) が可能となっており、IVF を経て産子が得られている。しかし IVM-IVF 由来胚は胚盤胞への発生率が低率で、排卵卵子に比較して雄性前核形成率が低い。またブタでは多精子受精が多く見られるなど改良すべき点がいくつかあげられる。これらは卵細胞質成熟の不十分さによるものと考えられる。筆者らが開発したブタの IVMFC の例では、正常受精率 69% 及び胚盤胞への発生率 14% である (Miyoshi et al., 2000)。また、筆者らはウシで未成熟卵の凍結保存に成功した (Abe et al., 2005)。また体外成熟卵は体細胞クローンのレシピエント細胞質体 (サイトプラスト) としても活用できることを示してきた (Sugimura et al., 2010)。

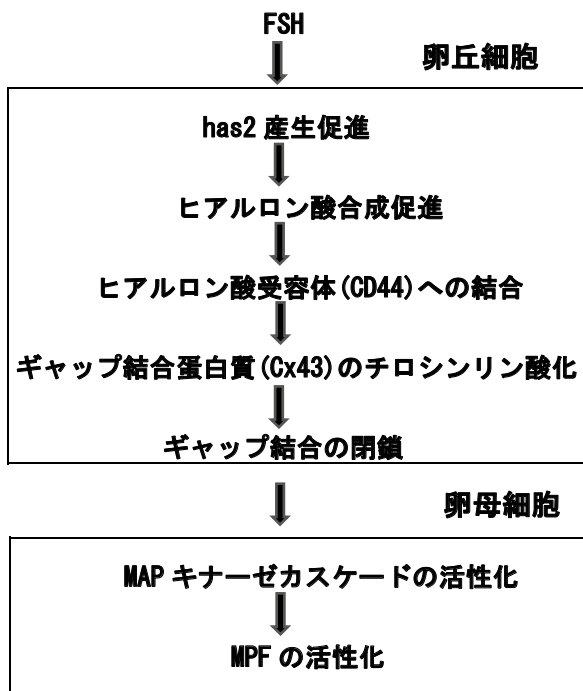


図 2 FSH による卵成熟開始 (卵核崩壊誘起) の分子機序 (ヒアルロン酸-CD44 シグナルによるギャップ結合の閉鎖)

FSH の作用により図示するカスケードが動き、ギャップ結合が閉鎖する。これにより卵母細胞周囲からの卵成熟抑制因子 (cAMP) 卵母細胞内への流入が途絶え、卵母細胞は卵成熟抑制因子の作用から解放され、MAP キナーゼや MPF が活性化し、卵成熟の開始である卵核崩壊を誘起する。

引用文献

- Abe Y, Hara K, Matsumoto H, Kobayashi J, Sasada H, Ekwall H, Rodriguez-Martinez H, Sato E. Feasibility of a nylon mesh holder for vitrification of bovine germinal vesicle oocytes in subsequent production of viable blastocysts. *Biol. Reprod.*, 72 : 1416-1420. 2005.
- Kimura N, Konno Y, Miyoshi K, Matsumoto H, Sato E. Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol. Reprod.*, 66 : 707-717. 2002.
- Jiang JY, Macchiarelli G, Miyabayashi K, Sato E. Follicular microvasculature in the porcine ovary. *Cell Tissue Res.*, 310 : 93-101. 2002.
- Jiang JY, Macchiarelli G, Tsang BK, Sato E. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. *Reproduction*, 125 : 211-223. 2003.
- Jiang JY, Miyoshi K, Umezumi M, Sato E. Superovulation of immature hypothyroid rdw rats by thyroxine therapy and the development of eggs after in vitro fertilization. *J. Reprod. Fertil.*, 116 : 19-24. 1999.
- Jiang JY, Wakabayashi K, Nottola A, Umezumi M, Cecconi S, Sato E, Macchiarelli G. Thyroxine treatment stimulated ovarian follicular angiogenesis in immature hypothyroid rats. *Histol. Histopathol.*, 23 : 1397-1398. 2008.
- Lin R, Warm-Cramer BJ, Kurata WE, Lau AF. v-Src phosphorylation of connexin 43 on Tyr247 and Tyr265 disrupts gap junctional communication. *J. Cell Biol.*, 154 : 815-827. 2001.
- Miyamoto Y, Nakayama T, Haraguchi S, Miyamoto H, Sato E. Morphological evaluation of microvascular networks and angiogenic factors in the selective growth of oocytes and follicles in the ovaries of mouse fetuses and newborns. *Develop. Growth Differ.*, 38 : 291-298. 1996.
- Miyoshi K, Taguchi Y, Sendai Y, Hoshi H, Sato E. Establishment of a porcine cell line from in vitro-produced blastocysts and transfer of the cells into enucleated oocytes. *Biol. Reprod.*, 62 : 1640-1646. 2000.
- Nakayama T, Inoue M, Sato E. Effect of oocytectomy on glycosaminoglycan composition during cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro. *Biol. Reprod.*, 55 : 1299-1304. 1996.
- 佐藤英明 . 卵母細胞の減数分裂の制御機構 . 蛋白質核酸酵 , 35 : 1525-1536. 1990.
- 佐藤英明 . 卵子の形成と死滅の制御因子 . 蛋白質核酸酵素 , 39 : 60-65. 1994.
- Sato E, Ishibashi T, Koide SS. Inducement of blood vessel formation by ovarian extracts from mice injected with gonadotropins. *Experientia*, 38 : 1248-1249. 1982.
- Sato E, Miyamoto H, Koide SS. Hyaluronic acid-like substances from mouse ovaries with angiogenic activity. *Z. Naturforsch.*, 45c : 873-880. 1990.
- Sato E, Tanaka T, Takeya Y, Miyamoto H, Koide SS. Ovarian glycosaminoglycans potentiate angiogenic activity of epidermal growth factor in mice. *Endocrinology*, 128 : 2402-2406. 1991.
- Shimizu T, Jiang JY, Iijima K, Miyabayashi K, Ogawa Y, Sasada H, Sato E. Induction of follicular development by direct single injection of vascular endothelial growth factor gene fragments into the ovary of miniature gilts. *Biol. Reprod.*, 69 : 1388-1393. 2003.
- Sugimura S, Yokoo M, Yamanaka K, Kawahara M, Moriyasu S, Wakai T, Nagai T, Abe H, Sato E. Anomalous oxygen consumption in porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell. Reprogram.*, 124 : 463-474. 2010.
- Yokoo M., Miyahayashi Y, Naganuma T, Kimura N, Sasada H, Sato E. Identification of hyaluronic acid-binding proteins and their expressions in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol. Reprod.*, 67 : 1165-1171. 2002a.
- Yokoo M, Sato E. Cumulus-oocyte complex interactions during oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol.*, 235 : 251-291. 2004.
- Yokoo M, Tienthai P, Kimura N, Niwa K, Sato E, Rodriguez-Martinez H. Localization of the hyaluronan receptor CD44 in porcine cumulus cells during in vivo and in vitro maturation. *Zygote*, 10 : 317-326. 2002b.