

平成18年度 学術創成研究費 研究終了報告書 (事後評価用)

平成18年3月31日

ふりがな	まなべ のぼる		所属研究機関・ 部局・職	東京大学・農学生命科学研究科・ 教授				
研究代表者 氏名	眞鍋 昇							
研究課題名 (英訳名)	<p>哺乳類卵胞の選択的死滅制御機構とその人為支配による潜在的卵巣卵の利用 Regulation mechanism of follicular atresia in mammalian ovaries and artificial control for availableness of potential oocytes in the ovaries</p>							
研究経費 (千円未満切捨)	年度	研究経費(千円)		使用内訳(千円)				
		交付額	支出額	設備備品費	消耗品費	旅費	謝金等	その他
	平成13年度	64,000	64,003	29,726	27,327	2,661	626	3,663
	平成14年度	69,000	69,001	18,321	27,706	8,969	186	13,819
	平成15年度	69,000	69,000	7,110	49,419	5,793	723	5,955
	平成16年度	65,000	65,000	15,997	32,509	7,434	4,160	
	平成17年度	64,500	64,500	14,277	27,677	11,652	6,975	3,919
	総計	331,000	331,504					
研究組織 (研究代表者及び研究分担者)								
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担 (研究実施計画に対する分担事項)					
眞鍋 昇	東京大学・農学生命科学研究科・教授	家畜生殖生理学	哺乳類卵子-卵胞の選択的死滅を制御する新規細胞死受容体系の細胞内シグナル伝達の解明、デコイ受容体と細胞内シグナル伝達阻害因子を介した細胞死制御系の解明と利用、遺伝子導入法による卵胞・卵母細胞の人為的救命法の確立、および研究の総括					
宮野 隆	神戸大学・農学部・教授	家畜生殖工学	未成熟卵母細胞の成熟機構の解明と異種移植法等による卵母細胞の新規な発育・成熟技術の開発、選択的死滅を人為制御して得た卵子の人為的成熟法の創出、安定した体外授精・移植技術の確立による潜在的卵巣卵活用法の開発					
酒巻 和弘	京都大学・生命科学研究科・助教	分子細胞生物学	細胞死シグナルの細胞内伝達系因子の解明とその調節機構の解明に基づく人為的制御技術の開発					
若山 照彦	理化学研究所神戸研究所発生再生総合研究センター・ゲノムリプログラミング研究チーム・チームリーダー	動物発生工学	救命した卵母細胞の正常性の評価と初期胚の作出技術の開発、受精と胚発生制御のための新しい発生工学的手法の開発(平成15年度より)					
(杉本 実紀)	京都大学・農学研究科・助手	家畜繁殖学	新規細胞死受容体系因子の核磁気共鳴装置による構造生物学的分子構造の解明と生殖資源(卵巣組織・卵胞、卵母細胞・胚等)の超低温保存法の開発(平成16年度まで)					
(中山 瑞穂)	日本学術振興会・特別研究員(PD)	家畜生体機構学	卵胞顆粒層細胞における生存因子の解明(平成14年度まで)					
計 6 名								

当初の研究目的

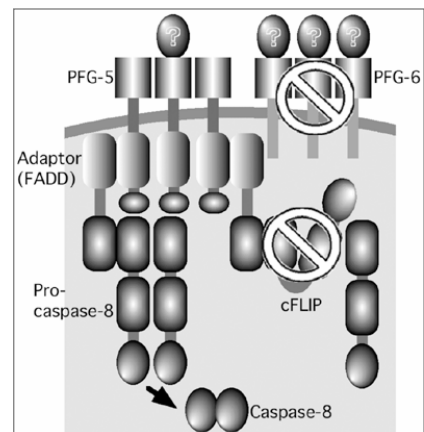
哺乳類の卵母細胞は特殊である。胎児期に始原生殖細胞が体細胞分裂を繰り返して増殖した後、減数分裂を開始して卵母細胞と呼ばれるようになる。これが前期後半（ディプロテン期）で減数分裂を休止し、その後出生をへて性成熟するまで卵巣内で休眠し続ける。性成熟に達した哺乳類の卵巣には20～100万個の卵母細胞が顆粒層細胞に包まれて休眠し続けている。性周期毎に、顆粒層細胞が卵母細胞の保育を開始し、卵母細胞は成熟・排卵される。この過程で99%以上の卵胞が選択的に閉鎖・消滅してしまい、残りが排卵にいたる。この卵胞・卵母細胞の選択的死滅を制御している分子機構は未解明である。申請者らは、顆粒層細胞に特異的に発現する新規細胞死受容体が卵胞の選択に支配的に関わっていることを見出したが、内因性リガンド、シグナル伝達系因子、分子制御機構の詳細が未だ不明である。

- ・ 研究目的 - I: 選択的卵胞閉鎖を制御している分子制御機構を解明すること。
- ・ 研究目的 - II: 目的-Iの成果をもとに、細胞死を制御している因子の発現を人為的に制御することで卵胞の発達を支配し、卵巣内に潜在している卵母細胞を救命して有効利用できる技術を開発する。これによって、従来廃棄され続けてきた優良遺伝子資源の有効利用を実現することが研究の最終目的である。

研究成果の概要 研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。

生物にとって「いかに多くの子孫を的確に残していくか」という命題が最重要であり、これに対応して様々な繁殖戦略が生み出されてきた。脊椎動物においては、魚類のように卵巣にある全ての卵母細胞を成熟・排卵して多くの仔を得てこのうちで能力に優れ幸運なものだけが生き残る戦略と、哺乳類のようにわずかな仔を丁寧に育てて生き残る戦略がある。上述のように哺乳類の胎仔卵巣では卵原細胞が体細胞分裂を繰り返して増殖した後減数分裂を開始してディプロテン期で休止し、その後性成熟期までの長い期間にわたって休眠し続ける。新生仔の卵巣にはこの休止状態の卵母細胞が数十万個以上含まれ、性成熟後に性周期毎に動物種毎に決まっている一定数の卵母細胞が発育し始める。卵母細胞は卵胞上皮細胞層（卵胞発育の途中で顆粒層細胞と卵丘細胞に分化する）に取り囲まれた卵胞の中で発育・成熟するのだが、この過程で選抜されて最終的に0.1～1.0%以下のごく一部のみが排卵に至り、大部分は死滅する。これまで卵母細胞の発育・成熟に関わる「生」の仕組みの研究は詳細に進められてきたが、死滅に関わる「死」の仕組みの研究知見は乏しい。99.9%以上の卵母細胞を選抜的に死滅させることは、母体側からみると大変無駄なことを行っているように思えるが、より強靱な子孫を残すために優れた卵母細胞を繁殖に供するための選抜である。未だに解明されていないこの選抜の分子制御機構を明らかとすることは、獣医畜産学のみならず医学生物学にとっても重要課題である。

完全性周期動物であるブタの卵巣を材料とした。卵胞液のプロゲステロン/エストラジオール比を指標にして健全卵胞と閉鎖卵胞を分別し、各々の顆粒層細胞を抗原としてモノクローナル抗体を作製し、これらをプローブとして顆粒層細胞に発現している新規細胞死受容体（PFG-5）と卵胞閉鎖時に消滅する囮受容体（decoy; PFG-6）を見出した（右図）。両者の細胞外ドメインはtumor necrosis factor（TNF）受容体に酷似し、PFG-5は細胞内に細胞死ドメイン（DD）を持つが、PFG-6は欠いているのでアポトーシスシグナルを伝達できずリガンド・トラッパーとして働いてアポトーシス誘導を阻害していると考えられた。ヒトやブタなどの完全性周期動物の卵巣の一次卵胞には細胞死受容体系が発現しておらず、顆粒層細胞が重層化する二次卵胞以後の顆粒層細胞にPFG-5系、TNF受容体系、Fas系、TRAIL受容体系が発現することがわかった。マウスなどの不完全性周期動物の卵巣ではPFG-5系が検出されなかったが、他は同様に検出された。完全性周期動物においてはPFG-5系が卵胞閉鎖の調節に支配的に関わり、他の細胞死受容体系は支配的ではないと考えられた。すなわち、TNFR系は増殖・生存因子として働き、Fas系は主に黄体退行の制御に、TRAIL受容体系はPFG-5系を補助していると考えられた。

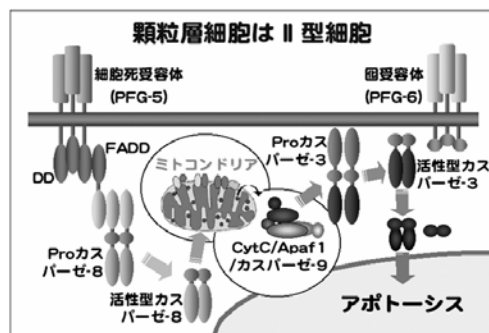


次いで、細胞内におけるアポトーシスシグナルの伝達経路の解明を進めた。その結果、ブタ卵胞の顆粒層細胞はII型アポトーシス細胞（細胞死受容体から細胞内に伝わったアポトーシスシグナルが一度ミトコンドリアを介して下流に伝わる）であることを見出した。リガンドと結合（続く）

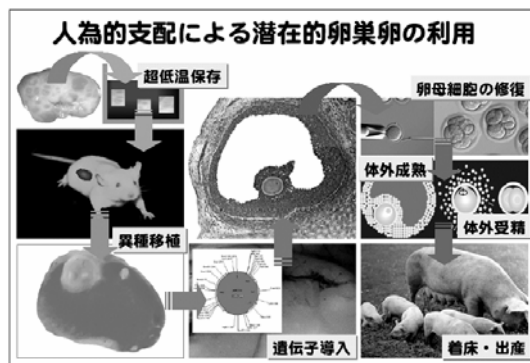
研究成果の概要

(続き)

して活性化した細胞死受容体にはアダプタータンパク (FADD)、 ついでイニシエータータンパク分解酵素 (procaspase-8) が結合して活性化する (右図)。 活性化型 caspase-8は、 従来考えられていたようにprocaspase-3を直接分解して活性化するのではなく、 Bidタンパクを切断し、これがミトコンドリアに作用してcytochrome Cを放出させる。 Cytochrom Cは細胞質中のApaf-1と結合してprocaspase-9を活性化させ、これがprocaspase-3を分断して活性化させ、下流のnucleaseを活性化させる。これが核内に移行して染色体DNAをヌクレオソーム単位で分断することでアポトーシスが実行されることを示した。 併行して生細胞を用いてcaspaseカスケード活性化部位をリアルタイムに可視化できる *in situ* fluorescence resonance energy transfer (FRET) 観測法を開発し、アポトーシスシグナルが一度ミトコンドリアを介して下流にむかって伝達するという知見と符合する所見(caspase-8は核近傍で-3は細胞膜近傍で活性化する)を得た。



次いで健常卵胞の顆粒層細胞ではFADDあるいはprocaspase-8と結合してFADD-procaspase-8間のシグナル伝達を阻害するcFLIP (スプライシングバリエーションのcFLIP-longと-shortがあるが顆粒層細胞では主に前者が発現している) が発現して細胞死を防いでいることを見出した (前頁図)。 cFLIPは完全性周期動物の二次卵胞以後に発現し、閉鎖直前に消滅することが分かった。 cFLIPの機能は、培養顆粒層細胞にcFLIP遺伝子を組込んだベクターを導入して強制発現させ、これに細胞死受容体を介してアポトーシスを誘導しても死滅しないこと、逆にcFLIP mRNAに対応するinterference RNAを発現するベクターを導入してcFLIP発現を阻害するとアポトーシス誘導後速やかに全てが死滅することなどによって実証した。 受容体とcFLIPの発現はTNF によって亢進し、それはinterleukin-6によって調節されていることなどを明らかとした。 加えて、cFLIPは黄体細胞の生存と死滅にも支配的に関わっていることが分かってきた。



これら基盤研究と併行して食肉処理場で廃棄される家畜卵巣に含まれる原始卵胞・未熟卵母細胞を救命する技術システムを開発した (右図)。 卵巣組織片を凍結して融解後、重症複合免疫不全 (SCID) マウスの腎漿膜下に異種移植した。 移植組織片にアデノウイルスベクターに組込んだcFLIP遺伝子を導入して強制発現させることで、SCIDマウス体内で原始卵胞を効率的に三次卵胞まで発育させることが可能となり、これから回収した卵母細胞を体外で成熟培養して体外受精して初期胚を得ることができた。 このようにして救命した卵母細胞とそれ由来の初期胚には顕著な異常は認められなかった。 人為的に卵胞・卵母細胞を救命して卵母細胞の発育・成熟を調節している機構を究明するとともに卵母細胞回収、体外成熟培養、体外受精、胚移植などの様々な生殖工学的技術の改良を進めた。 マウスなどごく一部の種では未成熟卵母細胞を体外で長期間培養することによって発育させることができるが他では不成功に終わっている。 原始卵胞や極めて発達初期の卵胞のみを含んでいる胎仔や新生仔の卵巣組織を免疫不全動物に異種移植する方法で卵母細胞を発育できる。 成熟雌動物の卵巣の場合は、上述のようにうまく細胞死を阻害できると成熟して受精することができる。 この卵胞・卵母細胞の人為的発育方法は実験室レベルにあるが、実用的に安定して大量に供給できる「卵子銀行」への道を開いた。 即ち卵巣組織を凍結保存し、必要な時に融解して卵母細胞を発育・成熟させて体外受精に供することが可能となり、貴重な野生種を含む種の保存、優良な雌性哺乳類の遺伝子保存、ヒトの不妊症治療の新技術開発などに貢献する。

20世紀末に体細胞クローン動物作出技術が開発され、多面的な応用展開が期待されている。 しかし成功率が未だに10%未満である。 その原因のひとつとして除核後ドナーの体細胞核を受け入れるレシピエント卵母細胞の品質が高くないことが考えられる。 上述のように卵胞・卵母細胞の選択的死滅の制御機構を解明する過程で、顆粒層細胞に発現しているcFLIPの量が卵胞とこれに含まれる卵母細胞の健全性を示す優れたパラメーターであることが分かってきた。 顆粒層細胞にcFLIPを高発現している健常卵胞から回収した卵母細胞を用いると成功率が向上することが分かってきた。

以上の成果は獣医畜産学の基礎と臨床領域ばかりでなくヒト臨床領域での様々な応用展開が期待できる基盤的研究成果であるので遂次学術誌や関連学会に発表し高い注目を受けている。

特記事項

この研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。

- (1) **特異的な細胞死受容体の同定**: 生命樹の継続性を担う卵母細胞は卵胞のなかでひとつひとつが「ゆりかご」に相当する顆粒層細胞に包まれて丁寧に保育される。顆粒層細胞に特異的に発現している細胞死受容体 PFG-5 が存在することが分かったことが最大のインパクトである。細胞死リガンドとその受容体が少なくとも 26 および 18 種存在することが現在までに報告されており、完全性周期動物の二次卵胞以後の顆粒層細胞には PFG-5 系、TNF 受容体系、Fas 系、TRAIL 受容体系が発現することがわかったが、成熟して排卵の準備が整った雌動物で、脳下垂体からの性腺刺激ホルモンの分泌後最初に発現する細胞死受容体が PFG-5 系であること、排卵数の異なるブタの品種間で両受容体の発現レベルに差異があったこと等多くの知見からこれがドミナントに働いていると考えられた。
- (2) **二重の安全装置の発見**: 完全性周期動物の二次卵胞以降では、囿受容体と細胞内阻害因子が二重の安全装置として働き、安易にアポトーシスが誘導されないように顆粒層細胞を守っていることが分かったことは新発見である。
 - (a) **囿受容体**: 細胞死受容体は death domain (DD) をもつ。この DD を介してアダプタータンパク (FADD) と結合して下流の caspase 系を活性化することでアポトーシスシグナルを伝達する。健常卵胞顆粒層細胞の細胞膜には DD が欠損している囿受容体が過剰に発現しており、細胞死受容体に内因性リガンドが結合することを阻害している。囿受容体は DD を持たないので FADD が結合できないためシグナルの伝達は途切れる。卵胞閉鎖に先立って囿受容体が消失し、内因性リガンドが細胞死受容体に結合できるようになると考えられる。
 - (b) **細胞内阻害因子**: 健常卵胞の顆粒層細胞に cellular FLICE like protein (cFLIP) が発現し、受容体を介したシグナル伝達を阻害している。これは FADD あるいは procaspase-8 と結合する death effector domain (DED) を持つ。細胞死受容体と結合した FADD の DED と procaspase-8 の DED が結合すると後者が活性化してシグナルが伝わっていくが、これらと cFLIP が結合することでシグナル伝達を遮断していると考えられる。
 - (c) **第3のトラップ**: 顆粒層細胞では Fas と細胞外ドメインが共通な囿受容体が発現していること、排卵後の顆粒層細胞が分化した黄体細胞では可溶性細胞死受容体が分泌されて内因性リガンドが細胞死受容体に結合することを防いでいることなどを発見した。
- (3) **生細胞 FRET 法の開発**: 生きている細胞における caspase (タンパク分解酵素) 系を介したシグナル伝達の詳細は未解明である。Fluorescence resonance energy transfer (FRET) 現象を応用して real time かつ視覚的に酵素活性化部位を捉えることに成功した。即ち caspase の基質となる peptide を linker として 3 種の蛍光タンパク (RFP, CFP, YFP) を繋いだ融合タンパクが生成される発現ベクターを作製し、細胞に導入して融合タンパクを発現させると FRET が観察できた。従来法では不可能であった、生細胞内におけるシグナル伝達の経時的局在変化が検出可能になり、caspase 系の活性化部位が従来考えられていたものとは異なることを発見した。
- (4) **Type II 型アポトーシス細胞であることの発見**: 顆粒層細胞は、細胞死受容体を介した細胞内アポトーシスシグナルがいちどミトコンドリアを介して伝わる特殊な細胞であることを見出した。
- (5) **異種移植法による卵巣凍結保存と成熟卵作製技術の創出**: 完全性周期動物であるブタ、ウシ等家畜の卵巣組織を凍結保存後、重症複合免疫不全 (SCID) マウス腎漿膜下に移植し、cFLIP を遺伝子導入して強制発現させることで卵胞・卵母細胞を救命し、三次卵胞まで発育・成熟させる技術システムを創出した。この卵胞から卵母細胞を取り出して授精させ得るまで成熟させる無血清培養法も開発した。
- (6) **生存シグナルと細胞死シグナルの卵母細胞・顆粒層細胞間クロストークの発見**: 卵母細胞の生存・成熟には受容体型チロシンキナーゼ c-Kit を介した生存シグナルが必須であるということが定説であったが、顆粒層細胞で細胞死受容体を介するアポトーシスシグナルが抑制されていれば、卵母細胞は c-Kit シグナルがなくても生存できることを発見した。c-Kit 受容体変異マウスおよびアンタゴニスティック抗 c-Kit 抗体を投与した野生型マウスなどでは卵母細胞はともに死滅したが、Fas KO マウスでは卵胞形成にも障害が起き、Fas と c-Kit 受容体を KO したマウスでは卵母細胞が生存していた。

研究成果の発表状況 (1 / 3)

この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（投稿中の論文を記入する場合は、掲載が決定しているものに限り、）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）及び国際会議、学会等における発表状況について3頁以内に収めて記入してください。

学術誌等に発表した論文

(2001年・他に英文原著論文8報)

- Teruhiko Wakayama, Tabar, V, Rodriguez I, Perry ACF, Studer, L, Mombaerts P. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science*, 292 (3):740-743, 2001.
- Perry ACF, Rothman A, de Las Heras JJ, Feinstein P, Mombaerts P, Cooke HJ, Teruhiko Wakayama. Efficient metaphase II transgenesis with different transgene archetypes. *Nature Biotechnology*, 19 (6): 1071-1073, 2001.
- Noboru Manabe, Akira Myomoto, Chiemi Tajima, Mizuho Nakayama, Misuzu Yamaguchi. Monoclonal antibodies recognize a novel cell death receptor and a decoy receptor on granulosa cells of porcine ovarian follicles. *J Mam Ova Res*, 18 (1): 20-32, 2001.
- Mizuho Nakayama, Noboru Manabe, Kozue Uchio-Yamada, Hajime Miyamoto. Changes in localization of type I, III and IV collagens and their mRNA expression during follicular atresia in bovine and porcine ovaries. *J Reprod Dev*, 47 (1): 27-36, 2001.
- Minako Kiso, Noboru Manabe, Kohji Komatsu, Noriyuki Nisioka, Nami Nakai-Sugimoto, Hajime Miyamoto. Abnormal accumulation of luteal bodies in ovaries of the senescence accelerated mouse (SAM). *J Reprod Dev*, 47 (2): 153-164, 2001.
- Eiichi Hondo, Tohru Kobayashi, Tsunehiko Aita, Noboru Manabe, Nobuo Kitamura, Junzo Yamada, Yoshitaka Nagahama. Molecular cloning and expression of suppressor of potassium transport defect 3 (SKD3) in rat testis. *J Reprod Dev*, 47 (2): 173-180, 2001.
- Yoshinori Okamura, Akira Myomoto, Noboru Manabe, Nobuyuki Tanaka, Hitoshi Okamura, Manabu Fukumoto. Protein tyrosine kinase expression in the porcine ovary. *Mol Hu Reprod*, 7 (6): 723-729, 2001.
- Brüssow K-P, Torner H, Kanitz W, Ratky J, Noboru Manabe, Solti L. Biotechnological aspects of embryo transfer in swine. *Hungarian Journal of Animal Breeding and Nutrition*, 50: 481-493, 2001.
- Teruhiko Wakayama, Yanagimachi R. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol Reprod Dev*, 58 (2): 376-383, 2001.
- Teruhiko Wakayama, Yanagimachi R. Effect of cytokinesis inhibitor, DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei. *Reproduction*, 122 (1): 49-60, 2001.
- Ohgane J, Teruhiko Wakayama, Kogo Y, Senda S, Hattori N, Tanaka S, Yanagimachi R, Shiota K. DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis* (1), 30: 45-50, 2001.
- Kawase Y, Iwata T, Toyoda Y, Teruhiko Wakayama, Yanagimachi R, Suzuki H. Comparison of intracytoplasmic sperm injection for inbred and hybrid mice. *Mol Reprod Dev*, 60 (1): 74-78, 2001.
- Tanaka S, Oda M, Toyoshima Y, Teruhiko Wakayama, Tanaka M, Yoshida N, Hattori N, Ohgane J, Yanagimachi R, Shiota K. Placentomegaly in cloned mouse concepti caused by expansion of the spongiotrophoblast layer. *Biol Reprod*, 65 (6):1813-1821, 2001.
- Yamazaki Y, Teruhiko Wakayama, Yanagimachi R. Contribution of cumulus cells and serum to the maturation of oocyte cytoplasm as revealed by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Zygote*, 9 (2): 277-282, 2001.
- Noboru Manabe, Miki Sugimoto, Mizuho Nakayama, Naoko Inoue, Minako Kiso, Misuzu Yamaguchi, Takako Tanaka, Kozue Uchio-Yamada, Hajime Miyamoto. Physiological roles of apoptosis in granulosa cells of atretic follicles in porcine ovaries. *J Emb Trans*, 23 (1): 1-10, 2001.
- Miki Sugimoto, Noboru Manabe. Update on cryopreservation of mammalian ovaries. *Obst Gynecol*, 68 (2): 207-212, 2001.
- Naoko Inoue, Akihiro Kiya, Noboru Manabe, Hajime Miyamoto, Katsuhiko Fukuta. Elongation of cell cycle of early stage tetraploid murine embryos induced by cytochalasin B. *J Emb Trans*, 23 (1): 44-51, 2001.
- Noboru Manabe, Mizuho Nakayama, Misuzu Yamaguchi, Minako Kiso, Takako Tanaka, Naoko Inoue, Miki Sugimoto, Hajime Miyamoto. A novel cell death receptor and a decoy receptor on follicular granulosa cells of porcine ovaries. *J Emb Trans*, 23 (1): 52-60, 2001.

(2002年・他に英文原著論文6報)

- Tamashiro KL, Teruhiko Wakayama, Akutsu H, Yamazaki Y, Lachey JL, Wortman MD, Seeley RJ, D'Alessio DA, Woods SC, Yanagimachi R. Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. *Nature Medicine* 8 (2): 262-267, 2002.
- Satoko Wada, Noboru Manabe, Naoko Inoue, Mizuho Nakayama, Toshikatsu Matsui, Hajime Miyamoto. TRAIL-decoy receptor-1 disappears in granulosa cells of atretic follicles in porcine ovaries. *J Reprod Dev*, 48 (2): 167-173, 2002.
- Satoko Wada, Noboru Manabe, Naoko Inoue, Mizuho Nakayama, Toshikatsu Matsui, Hajime Miyamoto. TRADD is involved in apoptosis induction in granulosa cells during atresia in pig ovaries. *J Reprod Dev*, 48 (2): 175-181, 2002.
- Satoko Wada, Noboru Manabe, Mizuho Nakayama, Naoko Inoue, Toshikatsu Matsui, Hajime Miyamoto. TRAIL-decoy receptor-1 plays inhibitory role in apoptosis of granulosa cells from pig ovarian follicles. *J Vet Med Sci*, 64 (3): 435-439, 2002.
- Chiemi Tajima, Noboru Manabe, Mizuho Nakayama, Naoko Inoue, Toshikatsu Matsui, Eiichi Hondo, Hajime Miyamoto. Monoclonal antibody recognizes follicular granulosa cell antigens in porcine ovaries. *J Reprod Dev*, 48 (4): 567-572, 2002.
- Miki Sugimoto, Noboru Manabe. Cryopreservation techniques for ovarian tissues. *Hormon Front Gynecol*, 9 (2): 135-140, 2002.
- Noboru Manabe. Molecular mechanism of follicle selection in mammalian ovaries. *Journal of Laboratory Animals*, 23 (1): 71-78, 2002.
- Kanayama M, Takashi Miyano, Lee J. Progesterone treatment of boar spermatozoa improves male pronuclear formation after intracytoplasmic sperm injection into porcine oocytes. *Zygote*, 10 (1): 95-104, 2002.
- Kanayama M, Takashi Miyano, Lee J. Acquisition of meiotic competence in growing pig oocytes correlates with their ability to activate Cdc2 kinase and MAP kinase. *Zygote*, 10 (2): 261-270, 2002.
- Moritake S, Hirao Y, Takashi Miyano. Hypoxanthine promotes the acquisition of meiotic competence in pig oocytes from early antral follicles during growth culture. *J Mam Ova Res*, 19 (1): 39-45, 2002.
- Senbon, S, Miyano, T. Bovine oocytes in early antral follicles grow in serum-free media -effect of hypoxanthine on follicular morphology and oocyte growth. *Zygote*, 10 (2): 301-309, 2002.
- Kourou, Y, Fujita, E, Jimbo, A, Kikuchi, T, Yamagata, T, Momoi, M.Y, Kominami, E, Kuida, K, Sakamaki Kazuhiro, Yonehara, S. Polyglutamine aggregates stimulate ER stress signals and caspase-12 activation. *Hum Mol Genet*, 11 (6): 1505-1515, 2002.
- Sakamaki Kazuhiro, Inoue, T, Asano, M, Sudo, K, Kazama, H, Sakagami, J, Sakata, S, Ozaki, M, Nakamura, S, Toyokuni, S, Osumi, N, Iwakura, Y, and Yonehara, S. Ex vivo whole-embryo culture of caspase-8-deficient embryos normalize their aberrant phenotypes in the developing neural tube and heart. *Cell Death Different*, 9 (8): 1196-1206, 2002.
- Sakamaki K, Ueda T, Nagata S. The evolutionary conservation of the mammalian peroxidase genes. *Cytogen Genome Res* 98 (1): 93-95, 2002.

(2003年・他に英文原著論文5報)

- Mizuho Nakayama, Noboru Manabe, Naoko Inoue. Changes in the expression of tumor necrosis factor (TNF) , TNF Receptor (TNFR) 2 and TNFR-associated factor 2 in granulosa cells during atresia in pig ovaries. *Biol Reprod*, 68 (3): 530-535, 2003.
- Kohji Komatsu, Noboru Manabe, Minako Kiso, Munetake Shimabe, Hajime Miyamoto. Changes in localization of immune cells and cytokines in corpora lutea during luteolysis in murine ovaries. *Journal of Experimental Zoology*, 296 (2): 152-159, 2003.
- Kohji Komatsu, Noboru Manabe, Minako Kiso, Munetake Shimabe, Hajime Miyamoto. Soluble Fas (FasB) regulates luteal cell apoptosis during luteolysis in murine ovaries. *Mol Reprod Dev*, 65 (3): 345-352, 2003.
- Toshikatsu Matsui, Noboru Manabe, Yasufumi Goto, Mizuho Nakayama, Naoko Inoue. Changes in the expression and activity of caspase-9 and Apaf1 in granulosa cells during follicular atresia in pig ovaries. *Reproduction*, 126 (1): 113-120, 2003.
- Istvan Egerszegi, Falk Schneider, Jozsef Rátky, Ferenc Soós, Noboru Manabe. Comparison of luteinizing hormone and steroid hormone secretion during the peri- and post-ovulatory periods in mangalica and landrace gilts. *J Reprod Dev*, 49 (3): 291-296, 2003.
- Naoko Inoue, Noboru Manabe, Toshikatsu Matsui, Akihisa Maeda. Roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling pathway in granulosa cell apoptosis during atresia in pig ovaries. *J Reprod Dev*, 49 (3): 313-321, 2003.
- Miki Sugimoto, Noboru Manabe, Hajime Miyamoto. Cryopreservation of ovarian tissue. *Igakuno Ayumi*, 204 (6): 921-925, 2003.
- Wakayama S, Cibelli JB, Teruhiko Wakayama. Effect of timing of the removal of oocyte chromosomes before or after injection of somatic nucleus on development of NT embryos. *Clon Stem Cell* 5 (2): 181-189, 2003.

研究成果の発表状況 (2 / 3)

- Senbon S, Moritake S, Hirao Y, Takashi Miyano. Bovine oocytes in secondary follicles grow and acquire the meiotic competence in severe combined immuno-deficient mice. *Zygote*, 11 (1): 139-149, 2003.
- Okada K, Miyano T. Activation of pig oocytes by intracytoplasmic injection of strontium and barium. *Zygote*, 11 (2): 159-165, 2003.
- Shiota M, Moritake S, Hirao Y, Takashi Miyano. Correlation of mitogen-activated protein kinases with cell survival and apoptosis in porcine granulosa cells. *Zoological Science*, 20 (2): 193-201, 2003.
- Miyano, T. Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. *Theriogenology*, 59 (1): 61-72, 2003.
- Senbon S, Hirao Y, Takashi Miyano. Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: Lessons from *in vitro* culture. *J Reprod Dev*, 49 (2): 259-269, 2003.
- Kren R, Senbon S, Takashi Miyano. Intracytoplasmic sperm injection in the pig: where is the problem? *J Reprod Dev*, 49 (2): 271-273, 2003.
- Minako Kiso, Noboru Manabe, Kohji Komatsu, Munetake Shimabe. Abnormal structural luteolysis in ovaries of the senescence accelerated mouse (SAM): expression of Fas Ligand/Fas-mediated apoptosis signaling molecules in luteal cells. *J Reprod Dev*, 49 (3): 457-463, 2003.
- Takashi Miyano, Fulka J Jr. G2/M transition of pig oocytes: how oocytes initiate maturation? *Reprod Med Biol* 2 (1): 91-99, 2003.
- Takashi Miyano, Hirao Y. *In vitro* growth of oocytes from domestic species, *J Mam Ova Res*, 20 (1): 78-85, 2003.
- Sakata, S, Sakamaki Kazuhiro, Watanabe, K, Nakamura, N, Toyokuni, S, C. Yonehara, S. Involvement of death receptor Fas in germ cell degeneration in gonads of Kit-deficient Wv/Wv mutant mice. *Cell Death and Differentiation* 10 (5): 676-686, 2003.
- Jimbo, A, Fujita, E, Kourouki, Y, Ohnishi, J, Inohara, N, Kuida, K, Sakamaki Kazuhiro, Yonehara, S, Momoi, T. ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation. *Exp Cell Res*, 283 (1): 156-166, 2003.
- Sakamaki Kazuhiro. Physiological and pathological cell deaths in the reproductive organs. *Cell Struct Funct* 28 (1): 31-40, 2003.
- (2004年・他に英文原著論文 8報)
- Karin Wollenhaupt, Harald Welter, Ralf Einspanier, Noboru Manabe, Klaus-Peter Brüssow. Expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R)-, vascular endothelial growth factor receptor (VEGF-R) and fibroblast growth factor receptor (FGF-R) systems in porcine oviduct and endometrium during the time of implantation. *J Reprod Dev*, 50 (2): 269-278, 2004.
- Yasufumi Goto, Fuko Matsuda, Toshikatsu Matsui, Noboru Manabe. The porcine (*Sus scrofa*) cellular Flice-like inhibitory protein (cFLIP): molecular cloning and comparison with the human and murine cFLIP. *J Reprod Dev*, 50 (4): 549-555, 2004.
- Noboru Manabe, Yasufumi Goto, Fuko Matsuda-Minehata, Naoko Inoue, Kazuhiro Sakamaki, Takashi Miyano. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. *J Reprod Dev*, 50 (4): 493-514, 2004.
- Singh U, Fohn LE, Teruhiko Wakayama, Ohgane J, Steinhoff C, Lipkowitz B, Schulz R, Orth A, Ropers HH, Behringer RR, Tanaka S, Shiota K, Yanagimachi R, Nuber UA, Fundele R. Different molecular mechanisms underlie placental overgrowth phenotypes caused by interspecies hybridization, cloning, and Esx1 mutation. *Dev Dynam*, 230 (1): 149-164, 2004.
- Yanagimachi R, Teruhiko Wakayama, Kishikawa H, Fimia GM, Monaco L. and Sassone-Corsi P. Production of fertile offspring from genetically infertile male mice. *Proceedings of National Academy of Science in USA* 101 (4): 1691-1695, 2004.
- Ohgane J, Teruhiko Wakayama, Senda S, Yamazaki Y, Inoue K, Ogura A, Tanaka S, Yanagimachi R, Shiota K. The Sall3 locus is an epigenetic hotspot of aberrant DNA methylation associated with placentomegaly of cloned mice. *Gene Cell*, 9 (2):253-260, 2004.
- Lanza R, Moore MA, Teruhiko Wakayama, Perry AC, Shieh JH, Hendrikx J, Leri A, Chimenti S, West MD, Kajstura J, Anversa P. Regeneration of the infarcted heart with stem cells derived by nuclear transplantation. *Circ Res*, 94 (4): 820-827, 2004.
- Kishigami S, Wakayama S, Nguyen VT, Teruhiko Wakayama. Similar time restriction for ICSI and ROSI into activated oocytes for efficient offspring production. *Biol Reprod*, 70: 1863-1869, 2004.
- Ohta H, Teruhiko Wakayama, Nishimune Y. Commitment of fetal male germ cells to spermatogonial stem cells during mouse embryonic development. *Biol Reprod*, 70 (5): 1286-1291, 2004.
- Ohta H, Teruhiko Wakayama. Full-term development of offspring using ectopically produced haploid germ cells from fetal male germ cells. *J Reprod Dev*, 50 (4): 429-437, 2004.
- Senda S, Teruhiko Wakayama, Yamazaki Y, Ohgane J, Hattori N, Tanaka S, Yanagimachi R, Shiota K. Skewed X-inactivation in cloned mice. *Bioch Biophys Res Comm*, 321 (1): 38-44, 2004.
- Wakayama S, Thuan NV, Kishigami S, Ohta H, Mizutani E, Hikichi T, Miyake M, Teruhiko Wakayama. Production of offspring from one-day-old oocytes stored at room temperature. *J Reprod Dev*, 50 (5): 627-637, 2004.
- Kishigami S, Thuan NV, Wakayama S, Hikichi T, Teruhiko Wakayama. A new separation method of the round-spermatid cytoplasm before ROSI in mouse. *Zygote*, 12 (1): 321-327, 2004.
- Villa-Diaz LG, Takashi Miyano. Activation of p38 MAPK during porcine oocyte maturation. *Biol Reprod*, 71 (4): 691-696, 2004.
- Bui HT, Yamaoka E, Takashi Miyano. Involvement of histone H3 (Ser10) phosphorylation in chromosome condensation without Cdc2 kinase and mitogen-activated protein kinase activation in pig oocytes. *Biol Reprod*, 70 (8): 1843-1851, 2004.
- Tamura M, Yamaoka E, Takashi Miyano. Cellular functions of mitogen-activated protein kinases and protein tyrosine phosphatases in ovarian granulosa cells. *J Reprod Dev*, 50 (1): 47-55, 2004.
- Kren R, Ogushi S, Takashi Miyano. Effect of caffeine on meiotic maturation of porcine oocytes. *Zygote*, 12 (1) 31-38, 2004.
- Senbon S, Yamaoka E, Takashi Miyano. Bovine oocytes grown in serum-free medium acquire fertilization competence. *J Reprod Dev*, 50 (4): 541-547, 2004.
- Senbon S, Yamaoka E, Takashi Miyano. Xenografting of bovine secondary follicles into ovariectomized female severe combined immunodeficient mice. *J Reprod Dev*, 50 (4): 439-444, 2004.
- Hirao Y, Senbon S, Yamaoka E, Takashi Miyano. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces retrogressive chromatin decondensation in the germinal vesicle of fully grown porcine oocytes. *J Mam Ova Res*, 21 (2): 110-117, 2004.
- Okada, K, Miyano, T, Miyake, M. Activation and development of pig oocytes after microinjection of crude sperm extract. *J Mam Ova Res*, 21 (2): 134-140, 2004.
- Senbon S, Senbon S, Yamaoka E, Takashi Miyano. Xenografting of bovine secondary follicles into male and female SCID mice. *J Mam Ova Res*, 21 (2): 157-161, 2004.
- Yajima N, Sakamaki Kazuhiro, Yonehara S. Age-related thymic involution is mediated by Fas on thymic epithelial cells. *Internat Immunol* 16 (5): 1027-1035, 2004.
- Zhang L, Shimizu S, Sakamaki Kazuhiro, Yonehara S, Tsujimoto Y. A caspase-8-independent signalling pathway activated by Fas ligation leads to exposure of Bax N-terminus. *J Biol Chem*, 279 (12): 33865-33874, 2004.
- Sakamaki Kazuhiro, Takagi C, Kominami K, Sakata S, Yaoita Y, Nozaki M, Yonehara S, Ueno N. The adaptor molecule FADD from *Xenopus laevis* demonstrates evolutionary conservation of its pro-apoptotic activity. *Genes Cells* 9 (8): 1249-1264, 2004.
- Sakamaki K, Regulation of endothelial cell death and its role in angiogenesis and vascular regression. *Cur Neurovasc Res* 1 (2): 305-315, 2004.
- (2005-2006年・他に英文原著論文 10報)
- Fuko Matsuda-Minehata, Yasufumi Goto, Naoko Inoue, Noboru Manabe. Changes in expression of anti-apoptotic protein, cFLIP, in granulosa cells during follicular atresia in porcine ovaries. *Mol Reprod Dev*, 72 (1): 145-151, 2005.
- Noriko Kagawa, Yohichiro Sakurai, Takashi Miyano, Noboru Manabe. Effects of long-term grafting on follicular growth in porcine ovarian cortical grafts xenopanted to severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J Reprod Dev*, 51 (1): 77-85, 2005.
- Jozsef Rátky, Helmut Torner, Istvan Egerszegi, Falk Schneider, Peter Sarlós, Noboru Manabe, Klaus-Peter Brüssow. Ovarian activity and oocyte development during follicular development in pigs at different reproductive phases estimated by the repeated endoscopic method. *J Reprod Dev*, 51 (1): 109-115, 2005.
- Yuan Cheng, Naoko Inoue, Fuko Matsuda-Minehata, Yasufumi Goto, Akihisa Maeda, Noboru Manabe. Changes in expression and localization of connexin 43 mRNA and protein in porcine ovary granulosa cells during follicular atresia. *J Reprod Dev*, 51 (5): 627-637, 2005.
- Noriko Kagawa, Takashi Miyano, Noboru Manabe. Growth and maturation of porcine follicles and oocytes following xenotransplantation of ovarian tissues and *in vitro* maturation culture. *J Reprod Dev*, 51 (6): 741-748, 2005.
- Ogushi S Fulka JJr, Takashi Miyano. Germinal vesicle materials are requisite for male pronucleus formation but not for change in the activities of CDK1 and MAP kinase during maturation and fertilization of pig oocytes. *Dev Biol*, 286 (2): 287-298, 2005.

研究成果の発表状況 (3 / 3)

Senbon S, Ishii K, Fukumi Y, Takashi Miyano. Fertilization and development of bovine oocytes grown in female SCID mice. *Zygote*, 13 (2): 309-315, 2005.

Mochida K, Teruhiko Wakayama, Takano K, Noguchi Y, Yamamoto Y, Suzuki O, Matsuda J, Ogura A. Birth of offspring after transfer of mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) embryos cryopreserved by vitrification. *Mol Reprod Dev*, 70 (3): 464-470, 2005.

Van Thuan N, Wakayama S, Kishigami S, Teruhiko Wakayama. New preservation method for mouse spermatozoa without freezing. *Biol Reprod*, 72 (2), 444-450, 2005.

Hikichi T, Kishigami S, Thuan NV, Ohta H, Mizutani E, Wakayama S, Teruhiko Wakayama. Round spermatids stained with mitotracker can be used to produce offspring more simply. *Zygote*, 13 (1): 55-61, 2005.

Wakayama S, Ohta H, Kishigami S, Van Thuan N, Hikichi T, Mizutani E, Miyake M, Teruhiko Wakayama. Establishment of male and female nuclear transfer embryonic stem cell lines from different mouse strains and tissues. *Biol Reprod*, 72 (4), 932-936, 2005.

Wakayama S, Kishigami S, Van Thuan N, Ohta H, Hikichi T, Mizutani E, Yanagimachi R, Teruhiko Wakayama. Propagation of an infertile hermaphrodite mouse lacking germ cells, using nuclear transfer and embryonic stem cell technology. *Proceedings of National Academy of Science in USA*, 102 (1): 29-33, 2005.

Ohta H, Teruhiko Wakayama. Generation of normal progeny by intracytoplasmic sperm injection following grafting of testicular tissue from cloned mice that died postnatally. *Biol Reprod*, 73 (2): 390-395, 2005.

Fujita K, Ohta H, Tsujimura A, Takao T, Miyagawa Y, Takada S, Matsumiya K, Teruhiko Wakayama, Okuyama A. Transplantation of spermatogonial stem cells isolated from leukemic mice restores fertility without inducing leukemia. *Journal of Clinical Investigation*, 115 (6): 1855-1861, 2005.

Mizutani E, Ohta H, Kishigami S, Van Thuan N, Hikichi T, Wakayama S, Sato E, Teruhiko Wakayama. Generation of progeny from embryonic stem cells by microinsemination of male germ cells from chimeric mice. *Genesis*, 43 (1): 34-42, 2005.

Singh U, Sun T, Shi W, Schulz R, Nuber UA, Varanou A, Hemberger MC, Elliott RW, Ohta H, Teruhiko Wakayama, Fundele R. Expression and functional analysis of genes deregulated in mouse placental over growth models: *Car2* and *Ncam1*. *Dev Dynam*, 234 (8):1034-1045, 2005.

Sakamaki Kazuhiro, Takagi C, Yoshino J, Yokota H, Nakamura S, Kominami K, Hyodo A, Takamune K, Yuge M, Ueno N. Transgenic frogs expressing the highly fluorescent protein *Venus* under the control of a strong mammalian promoter suitable for monitoring living cells. *Dev Dynam*, 233 (3): 562-569, 2005.

Yajima N, Yamada S, Morisaki T, Toyokuni S, Yonehara S, Sakamaki Kazuhiro. Partial correction of abnormal cardiac development in caspase-8-deficient mice by cardiomyocyte expression of p35. *Transgenic Research*, 14 (3): 593-604, 2005.

Sakurai T, Itoh K, Liu Y, Higashitsuji H, Sumitomo Y, Sakamaki Kazuhiro, Fujita J. Low temperature protects mammalian cells from apoptosis initiated by various stimuli in vitro. *Experimental Cell Research*, 309 (2): 264-272, 2005.

Satoh A, Sakamaki Kazuhiro, Ide H, Tamura K. Characteristics of initiation and early events for muscle development in the *Xenopus* limb bud. *Dev Dynam*, 234 (4): 846-857, 2005.

Klaus-Peter Brüssow, Helmut Törner, Jozsef Rátky, Noboru Manabe, Armin Tuchscherer. Experimental evidence for the influence of cumulus-oocyte-complexes on sperm release from the porcine oviductal sperm reservoir. *J Reprod Dev*, 2006, in press

Naoko Inoue, Akihisa Maeda, Fuko Matsuda-Minehata, Kazuhiro Fukuta, Noboru Manabe. Changes in expression levels and localization of Fas ligand and Fas during atresia in porcine ovarian follicles. *J Reprod Dev*, 2006, in press

Fuko Matsuda-Minehata, Yasufumi Goto, Naoko Inoue, Kazuhiro Sakamaki, P Jorge Chedrese, Noboru Manabe. Anti-apoptotic activity of porcine cFLIP in ovarian granulosa cell lines. *Mol Reprod Dev*, 2006, in press

Miki Sugimoto, Noriko Kagawa, Maki Morita, Shin-Ichi Kume, Noboru Manabe. Changes in the expression of decoy receptor 3 (DcR3) in granulosa cells during atresia in porcine ovaries. *Mol Reprod Dev*, 2006, in press

Wakayama S, Eiji Mizutani, Satoshi Kishigami, Nguyen Van Thuan, Hiroshi Ohta, Takafusa Hikichi, Hong Bui Thuy, Masashi Miyake, Teruhiko Wakayama. Mice cloned by nuclear transfer from somatic and ntES cells derived from the same individuals. *J Reprod Dev*, 2006, in press

Kishigami S, Thuan NV, Hikichi T, Ohta H, Wakayama S, Mizutani E, Teruhiko Wakayama. Epigenetic abnormalities of the mouse paternal zygotic genome associated with microinsemination of round spermatids. *Developmental Biology*, 2006, in press

Tamada H, Thuan NV, Reed P, Nelson D, Katoku-Kikyo N, Wudel J, Teruhiko Wakayama, Kikyo N. Chromatin decondensation and nuclear reprogramming by nucleoplasmin. *Mol Cell Biol*, 2006, in press

Bui H-T, Nguyen V-T, Teruhiko Wakayama, Takashi Miyano. Chromatin remodeling in somatic cells injected into mature pig oocytes. *Reproduction*, 2006, in press

Katsuya Kominami, Chiyo Takagi, Tomoko Kurata, Atsushi Kitayama, Masami Nozaki, Tatsuya Sawasaki, Keisuke Kuida, Yaeta Endo, Noboru Manabe, Naoto Ueno, Kazuhiro Sakamaki. The initiator caspase, caspase-10b, and the BH-3-only molecule, Bid, demonstrate evolutionary conservation in *Xenopus* of their pro-apoptotic activities in the extrinsic and intrinsic pathways. *Genes to Cells*, 2006, in press

【書籍】(他に英文書籍の分担執筆 18 編、邦文書籍の分担執筆 12 編)

編集した書籍：Sato E, Miyamoto H, Manabe N eds, *Animal Frontier Sciences*, Hokuto Pub, Kyoto, ISBN: 4-89467-056-9 c3045, 363 pages, 2003. (本書籍中に本研究費の成果を 9 編含む)

同上：Manabe N, Miyamoto H eds, *Reproductive Biotechnology*, Hokuto Pub, Kyoto, ISBN: 4-89467-056-9 c2997, 424 pages, 2001. (本書籍中に本研究費の成果を 8 編含む)

分担執筆した書籍：Manabe N. 第 6 章 Functional Structure of Male and Female Reproductive Organs. In: *Functional Morphology*, Fukuta K eds, Asakura Pub, Tokyo, ISBN: 4-254-45022-2, pp138-166/176, 2006.

同上：Manabe N, Inoue N, Miyano T, Sakamaki K, Sugimoto M, Miyamoto H. 第 21 章 Ovarian follicle selection. In: *The Ovary*, 2nd edition, Leung P, Adashi E eds, Elsevier Science, Amsterdam, ISBN: 0-12-444562-4, pp402-434/750 pages, 2003.

同上：Manabe N. 第 2 章 Ovary. In: *Biology of Reproduction* 2nd edition. Sato E eds., Asakura Pub, Tokyo, ISBN: 0-12-444562-4, pp185-196/315, 2003.

同上：Manabe N. 第 4 章 Methods for in vitro studies of ovarian follicular cells. In: *Methods for Reproductive Physiology*. Sato E eds, Yokenndo Pub, Tokyo, ISBN: 0-12-444562-4, pp124-130/406, 2001.

【国際会議、学会等における発表状況】

- (1) 代表者(真鍋昇)が主催した国際会議・6件(参加国数・演題数・参加人数): (1)アジア獣医解剖学会(8国・44題・87人)つくば, 日本, 2006年3月21日・(2)第3回環太平洋生殖生物学会(6国・44題・65人)京都, 日本, 2004年9月13-15日・(3)第2回環太平洋生殖生物学会(6国・92題・127人)京都, 日本, 2002年10月31日-11月2日・(4)第7回動物生命科学シンポジウム(5国・76題・94人)大分, 日本, 2002年8月20-21日・(5)第1回環太平洋生殖生物学会(7国・102題・245人)清州, 韓国, 2001年10月24-26日・(6)国際哺乳類卵生物学学会(5国・22題・89人)神戸, 日本, 2001年10月13日.
- (2) 国際会議の招待講演：真鍋昇(2006年)アジア獣医解剖学会・(2005年)欧州家畜繁殖学会・アジア動物バイオテクノロジー会議・(2004年)中国畜産学会・(2003年)世界老化促進モデル動物会議・(2002年)フランス国立科学研究センターCNRS夏季講演会・欧州家畜繁殖学会・アジア太平洋生理科学会・国際組織細胞化学会・(2001年)国際細胞分子病理フォーラム・環太平洋生殖生物学会・国際哺乳類卵生物学学会・国際動物生殖保護科学シンポジウム・アジアオセアニア動物バイオテクノロジーシンポジウム・国際分子細胞病理学フォーラム・欧州分子細胞病理学会 宮野隆:(2002年)国際胚移植学会・チェコ共和国科学アカデミーセミナー・環太平洋生殖生物学会・動物生命科学シンポジウム・(2001年)国際クローン動物ワークショップ・国際哺乳類卵生物学学会・日中人工授精研究会 酒巻和弘:(2002年)環太平洋生殖生物学会 若山照彦(2004年)アジア動物バイオテクノロジー会議
- (3) 国内学会の招待講演：真鍋昇(2005年)日本獣医学会・日本畜産学会・(2003年)日本繁殖学会(2002年)実験動物研究会・国立環境研究所シンポジウム・(2001年)日本畜産学会・日本獣医解剖学会・日本獣医学会ワークショップ 宮野隆:(2003年)日本不妊学会・日本受精着床学会・日本動物学会・(2002年)21世紀COEプログラム生命科学分野シンポジウム・日本生殖内分泌学会・日本繁殖生物学会・豚新技術開発研究会・(2001年)日本不妊学会 酒巻和弘:(2002年)生物多様性研究会・実験動物研究会