

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K05944

研究課題名(和文)長期維持型卵胞の形成増強法の開発と卵巣機能への影響の解析

研究課題名(英文)Studies on the development of the enhancement method of reserved-type follicle formation and effects on the ovarian function

研究代表者

杉本 実紀(Sugimoto, Miki)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：20243074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：長期維持型顆粒層前駆細胞の分離および特性の解析のために、当初、マウス胎仔卵巣中のLgr5発現細胞の分離処理の改善を試みたが結果不良であったため局在に基づく分離・回収に切り換え、胎仔卵巣の表面を標識して分離した細胞とそれ以外の細胞間で発現遺伝子の比較を行った。分離された細胞で発現が高い遺伝子から数種を選択して発現・局在を検討した中で、陽性と判定でき細胞分画に使用できる可能性を示唆する結果が得られた。長期維持型原始卵胞形成の増強因子の探索としては、R-spondin 1および他因子の共添加等をマウス胎仔卵巣の器官培養で調べたが、検討条件内では明確に有効と言える結果は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で個体成熟後の卵子の供給源となりうる長期維持型卵胞の顆粒層前駆細胞の分離のための指標の候補が得られた。研究期間内でこれにより分離した細胞を用いた長期維持型卵胞の形成増強が可能かの検討や、長期維持型卵胞の増強因子として有効なものを同定することはできなかったが、今後の研究で有効な処理方法を開発し、加齢に伴う卵子の枯渇の延期が可能になれば、家畜の繁殖寿命の延長による生産効率の上昇や、ヒトの加齢性不妊の抑制等により少子化対策に貢献し得る。

研究成果の概要(英文)：For separation of granulosa precursor cells for reserved-type follicles and analysis of their properties, improvement of the fractionation procedure by the cell surface marker Lgr5 was initially attempted; however, separation by localization was applied as an alternative approach. The surface of mouse fetal ovaries was labelled, cells were fractionated based on labelling, and gene expression was compared between the fractionated and remaining cells. Localization of selected genes expressed higher in fractionated cells was examined in the ovaries, and candidates for cell makers were found. To identify the enhancer for reserved-type follicle formation, the effects of R-spondin 1 and co-treatment with other supplements and factors were examined; however, no clearly effective results were obtained to the extent examined.

研究分野：組織生理学

キーワード：卵巣 哺乳類 雌 生殖 生殖寿命 卵胞

1. 研究開始当初の背景

生殖寿命終了の原因の一つは生殖細胞の枯渇である。哺乳動物の雌では生殖細胞が早期に卵母細胞となりその後は増殖しないため、枯渇までの期間は、幹細胞による補充の可能性もあるが、基本的には卵母細胞数の初期値と減少速度が決定する。卵母細胞の減少は排卵の他に卵胞発育過程での変性退行が多く、排卵の開始する性成熟以前でも顕著である。未成熟期の卵母細胞減少は細胞死、無排卵性発育の開始等によるが、本研究では発育開始の制御に着目した。

卵母細胞は胎生期から出生期に顆粒層細胞と複合して原始卵胞を形成するが、原始卵胞は未成熟期から発育を開始する早期発育型と、性成熟後まで休眠・維持される長期維持型に分かれる。マウスにおいて、この差異が顆粒層細胞の由来と関連することや、長期維持型卵胞の顆粒層前駆細胞(以下、長期維持型顆粒層前駆細胞)として出生期卵巣の表層細胞(Mork et al., Biol Reprod. 2012;86:37 他)および胎仔卵巣中の幹細胞マーカーLgr5 発現細胞(Rastetter et al., Dev Biol. 2014;394:242)が報告されており、種類の異なる卵胞として形成されていることが明らかになってきた。これらの顆粒層前駆細胞の補強により、未成熟期の卵母細胞減少の要因である早期発育型卵胞に対して生殖寿命後期の卵子産生に寄与する長期維持型卵胞を増加させ、生殖寿命を延長する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生殖寿命後期の卵子産生に寄与する長期維持型卵胞の形成を増強することにより雌の生殖寿命の延長は可能か、また、早期発育型の卵胞は必要かを明らかにすることであり、具体的には、長期維持型卵胞の形成能を持つ顆粒層前駆細胞を追加した卵巣の作製、長期維持型卵胞を増加させる顆粒層前駆細胞の増殖・機能制御因子の探索とこの因子の卵胞動態に対する影響の検討を計画している。これらの研究により、生殖寿命の延長および卵巣疾患の治療の新たな手段を提供し、人間では少子化の解消、家畜では繁殖供用年数の延長による総合的生産性の向上に貢献するとともに、卵母細胞の発育・死滅の調節は生殖機能を最適化するものかという疑問を解決することが目標である。

3. 研究の方法

(1) マウスにおいて長期維持型顆粒層前駆細胞として報告されている胎仔/新生仔期卵巣中のLgr5 発現細胞について、卵巣への追加による機能解析および特異的発現遺伝子の検索のために十分な品質および量を得るため、卵巣の分散処理と抗体結合ビーズを用いた細胞分離における純度・収率の改善のための検討を行った。マウス胎仔卵巣を採取し、酵素処理により細胞を分散させた後、抗Lgr5 抗体を結合させたビーズと反応させた。これを洗浄して得られたビーズ非結合細胞を陰性画分、洗浄後のビーズから解離させた細胞を陽性画分として回収し、Lgr5 の免疫染色およびmRNA 発現量の測定により検討した。前段階の研究でも同様の手法による細胞分離を行っていたが、回収細胞が想定されるより少なかったことと、分離後の免疫染色による確認に不具合があったことから、異なる抗体についても検討するとともに、酵素処理による細胞分散過程での細胞保護剤の添加および細胞分散処理後の回復培養による改善等を試みた。

(2) 長期維持型原始卵胞の形成を促進する因子の培養系での検索として、マウス胎仔卵巣の器官培養系において、Lgr5 に作用するR-spondin 1 および細胞保護剤(Y-27632) R-spondin 1/Lgr5 がシグナル伝達を増強するWnt3a の共添加の効果ならびにG タンパク質活性化因子の添加の効果を検討した。これらの因子を添加した培養液または無添加の培養液で6日間、培養液液面に保持したメンブレンフィルター上において培養した。また添加因子以外の培養条件として異なる培養手法であるhanging drop culture の適用や培養器内の酸素濃度を5%とした低酸素培養(胎仔体内の環境に近い条件とする目的)について試行した。培養後の卵巣を固定、パラフィン包埋、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色または卵母細胞に対する免疫染色を施して、卵胞数および発育段階(卵胞の形態または卵母細胞直径により)を組織学的手法により調べた。また、R-spondin 1 をマウス新生仔に出生後1-3日の間、腹腔内投与し、出生後7日時点で卵巣を採取し、組織学的解析を行った。

(3) Lgr5 発現による選択に代わり、局在に基づく分離・回収法を検討した。出生前後のマウス胎仔/新生仔期卵巣の表層にこれらの細胞が存在するという報告に基づき、出生直前にあたる日齢の胎仔の卵巣を材料として、細胞の種類によらず表層の細胞を採取する目的では特定の抗原に対する抗体の使用などは適さないと考えたことから、卵巣表面をビオチン化して分離する計画を立て、抗ビオチン抗体ビーズによる分離、アビジンによるパニング法、ストレプトアビジン標識磁気ビーズとの結合による細胞の分画・回収を試みた。

(4) 出生直前にあたる日齢のマウス胎仔の卵巣の表面をビオチン化し、ストレプトアビジン標識磁気ビーズとの結合により分画した細胞(表層細胞濃縮画分)とそれ以外の細胞(残存画分)

の間で RNA シーケンス法による発現遺伝子の比較を行った。解析は外部委託により行ったが、委託先が異なる 1 セットの処理に他の 2 セットと違いがあり結果に差異が生じている可能性が考えられたため、同様な手順となるように再解析して検討した。表層細胞濃縮画分で発現が高い遺伝子を抽出するとともに、どのような機能の遺伝子で発現に差が見られたかをエンリッチメント解析により検討した。また表層細胞濃縮画分で発現が高い遺伝子から、細胞分離のマーカーとなりうる候補を発現量が比較的多い、細胞表面に存在すると推定されている、過去の研究で卵胞形成等の卵巣機能との関連が報告されている等の条件により選択した。出生前後のマウス卵巣を採取して組織標本作製し、mRNA およびタンパク質発現の発現局在の検出を *in situ* hybridization chain reaction 法 (*in situ* hybridization 法の種類) および免疫組織化学法により試みた。

(5) 各実験において顕微鏡画像の解析には ImageJ (Rasband WS, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018) および MosaicJ Plugin(Thevenaz P, Unser M. *Microsc Res Tech.* 2007;70:135-46)、Cell counter Plugin、Colour Deconvolution 2 (Landini G, Martinelli G, Piccinini F. *Bioinformatics.* 2021;37:1485-7、Ruifrok A, Johnston D. *Anal Quant Cytol Histol.* 2001;23:291-9) を使用した。統計解析には R (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) の graphical user interface である EZR (自治医科大学附属さいたま医療センター、埼玉) を使用した(Kanda Y. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48:452-458)。

4. 研究成果

(1) Lgr5 抗体結合ビーズを用いた細胞分離で陽性および陰性分画として回収された細胞を抗 Lgr5 抗体で免疫染色して検討したが、いずれの条件でも回収される細胞が少数であるとともに反応が弱い/反応が認められる細胞の比率が小さい状態で、陰性分画の細胞と比較して明瞭な差異があるとは言えなかった。一部の条件について Lgr5 mRNA 発現量でも検討したが、標本数が少なく確定できないが、陽性分画、陰性分画ともに同時期の胎仔卵巣より低く、分画間では同程度であった。これは細胞分離過程での細胞の損失による可能性があり、細胞分離過程での細胞の損失による可能性が酵素処理による細胞分散過程での細胞保護剤の添加および細胞分散処理後の回復培養 (比較的短時間) により改善を試みたが、いずれの方法でも回収後の細胞での Lgr5 の免疫染色において明瞭な陽性反応は見られず、結果不良であった。

(2) 器官培養での検討においては、高濃度の R-spondin 1 を単独添加または細胞保護剤と共添加した実験回で卵胞形成期～原始卵胞の頻度の上昇等がみられたが、卵巣ごとの差異が大きいこと、無添加の培養液を使用した対照群での計測結果を他の実験回と比較して見られた差異等から確実ではないと考えられた。異なる培養法として試した Hanging drop culture での検討でも、解析できた標本数が少なく確実ではないが顕著な差異はみられなかった。また、低酸素条件での培養では、標本作製した対照群の一標本で強度の変性が発生しており (卵巣組織ではなかった可能性もある)、定量的評価ができなかった。全体に組織傷害が散見され、今回試行した酸素濃度 5% の条件は厳しすぎた可能性がある (図 1)。全体として、検討した条件内では明確に有効であると言える結果は得られなかった。R-spondin 1 のマウス新生仔への投与に関しても、今回調べた出生後 7 日時点では処理区間で卵胞数および発育段階に差異は見られなかった。

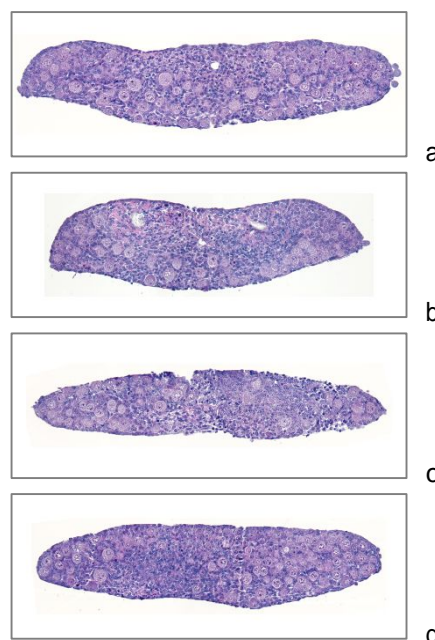


図 1 低酸素培養したマウス胎仔卵巣の組織像 (画像コントラスト、余白サイズは調整)。

a: 無添加培地, b: R-spondin 1 添加, c: Wnt3a 添加, d: R-spondin 1 + Wnt3a 共添加。

(3) マウス胎仔卵巣の表層細胞の分離法の検討では、当初、抗ビオチン抗体を使用した方法を試みたが、顕著な細胞の損失が発生した。アビジンをコートした培養ディッシュにビオチン化した細胞を吸着させるパニング法も検討したが、より効率が良いと言われている磁気ビーズ法を採用した。卵巣表層細胞の蛍光色素標識後にストレプトアビジン標識磁気ビーズとの結合により細胞の分画・回収を行って検討した結果から分画が十分ではない可能性は高かったが、この方法で分画した細胞で遺伝子発現解析を行うことにした。

(4) RNA シーケンス法による発現遺伝子の比較では、技術的トラブルや解析委託先の違いにより少し条件が異なるが、複数回の細胞採取・解析で共通して画分間で発現変動が見られる遺伝子があり、同様な手順となるように再解析した結果を再解析前のデータでの結果と比較したとこ

る、数値に違いはあるが傾向としては同様であった。エンリッチメント解析により残存画分では生殖細胞に関連した遺伝子群が検出されたが、表層細胞濃縮画分では卵胞形成との直接の関係は不明な遺伝子群が検出された。組織切片上での検出では、mRNA 発現は 5 遺伝子について解析を行なったが、おそらく技術的問題でいずれも検出ができなかった。タンパク質発現は 7 遺伝子について検討を行い、2 遺伝子で陽性と判定でき細胞分画に使用できる可能性があると考えられる結果が得られた。計画していた長期維持型卵胞の形成能を持つ顆粒層前駆細胞を追加した卵巣の作製まで進めることができなかったが、本研究で得られたデータは、今後、目的の細胞の採取やそれを用いた卵巣の操作等の研究を進める上での基礎になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------