

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06015

研究課題名(和文) ライブセルイメージングによる卵胞基底膜形成過程の可視化と機構解明

研究課題名(英文) Visualization of the formation process of follicular basement membrane by live cell imaging and its mechanism

研究代表者

諸白 家奈子 (Morohaku, Kanako)

信州大学・学術研究院農学系・助教

研究者番号：90815250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体内では観察することができない卵母細胞およびそれを包む袋状の構造をした卵胞の発育現象を解明することを目的として、ライブセルイメージング技術に適したマウス新生子卵巣および前卵胞状卵胞の培養方法の検討を行なった。その結果、培養開始時に40 $\mu$ m未満であった卵母細胞直径は、ハンギングドロップ法で培養後、成熟期卵母細胞のサイズである80 $\mu$ m以上まで発育した。また、マウス二次卵胞の体外培養において、無血清培地へのPVP添加により卵母細胞の生存性が向上することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、卵巣および卵胞の体外培養技術とイメージング技術を融合し、生体内では観察することができない複雑な現象である卵母細胞・卵胞の発育現象を可視化することを目的としている。この技術により卵母細胞・卵胞の発育と選抜機構の詳細なメカニズムを明らかにすることで、ヒト不妊に関する基礎的研究の発展や、ウシ・ブタなどの産業動物をより効率的に増産させる技術の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, to elucidate in vivo developmental process of the oocyte and its enclosing follicle in the ovary, we aimed to develop culture protocols for mouse neonatal ovaries and preantral follicles, which enable us to a technique of live cell imaging, and also to examine improvement of serum-free culture medium. As a result, the culture by hanging droplets was shown to allow for development of preantral follicles, concomitant with oocyte growth from less 40 $\mu$ m in diameter before culture to over 80 $\mu$ m after culture. In addition, the supplement of PVP into the serum-free culture may increase the survival of secondary follicles.

研究分野：動物生殖学

キーワード：卵胞 体外培養

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類動物の雌個体が、一生涯で排卵する卵子の数は発生・分化した全生殖細胞のうち1%未満であるということが知られているが、実際にどのような資質をもつ卵母細胞・卵胞が発育を開始するのか、また発育の過程で死滅する卵母細胞・卵胞はどのような特徴をもつのかは明らかになっていない。

これまで、単離した卵胞や卵胞から取り出した卵母細胞のみを体外で培養することにより、発育に必要な因子を同定することが試みられてきたが、生体内での現象である卵母細胞・卵胞の発育は、卵巣内で卵胞同士や卵巣の間質細胞といった要因から影響を大きく受けることから、卵胞単独あるいは卵母細胞のみの培養では卵巣内での複雑な現象を解明することは難しい。

そこで本研究では、卵母細胞・卵胞の発育・選抜過程における重要な役割を果たすと近年報告されている細胞外マトリックスに着目し、連続的に卵巣内に存在する卵母細胞および卵胞を顕微鏡下で観察する体外培養技術を応用し、その合成経路および働きを詳細に解明する。

## 2. 研究の目的

本研究では、生体内では観察することができない卵母細胞およびそれを包む袋状の構造をした卵胞の発育現象を、卵巣の体外培養技術とイメージング技術とを融合することにより可視化し、これまで明らかになっていなかった卵母細胞・卵胞の発育過程、さらには、発育過程で生き残り排卵される卵母細胞・卵胞はどういう資質を持つのか、退行(細胞死)する卵母細胞・卵胞はどのように決まるのか、選抜過程を解明することを目的として、ライブセルイメージング技術に適したマウス新生子卵巣および前胞状卵胞(一次卵胞・二次卵胞)の培養方法を検討した。さらに、これまでに卵巣の体外培養にはウシ胎仔血清(FBS)が不可欠であったが、FBSは動物由来の成分であり微量の未知成分を含むことから、細胞外マトリックス分解酵素が阻害される可能性があると考え、FBS無添加の体外卵巣培養培地を検討した。

また、これまでに開発された体外培養法では、培養基材となる培養膜およびプラスチックディッシュが共焦点レーザー顕微鏡下で蛍光像を取得する際に干渉することが課題であったことから、蛍光観察に干渉しにくいガラスボトムディッシュによる卵巣の体外培養法を検討した。しかしながら、ガラスボトムディッシュは細胞が接着しにくく、接着培養が不可欠な卵巣組織のライブセルイメージングには不向きであった。そこで、我々はガラスボトムディッシュ上で卵巣組織の形態を維持しながら培養する目的で、細胞接着試薬および卵胞発育培地の検討を行なった。

## 3. 研究の方法

### 1) マウス一次卵胞の体外培養

出生後6~8日目のマウス卵巣から採取した一次卵胞を細胞接着性のある培養膜上、あるいはハンギングドロップ(吊り下げ式ドロップ)で、5% CO<sub>2</sub>、95% 空気の下、37°CのMEMに5% FBS、0.1 IU/ml FSHを用いて22日間培養を行った。培養後、卵母細胞の生存率、卵母細胞の平均直径および体外成熟率を比較した。培養開始日を培養0日目とし、培養2日目以降1日おきに培地を新鮮なものと半量交換した。

### 2) マウス二次卵胞の体外培養

出生後 2 週齢前後のマウス卵巣から直径 100-120 $\mu$ m の二次卵胞を採取し、細胞接着性を持つ培養膜上で静置培養した。卵胞発育培地は、栄養成分や成長因子等を供給するウシ胎仔血清( FBS )を含む培地に代わり、無血清培地で培養を行い、培養後、卵母細胞の生存率、卵母細胞の平均直径および体外成熟率を比較した。培養開始日を培養 0 日目とし、培養 2 日目以降 1 日おきに培地を新鮮なものと半量交換した。

### 3) マウス新生子卵巣の体外培養

採取した卵巣は、細胞接着性を有する培養膜上で 10% FBS 添加 MEM 培地(CtI 区)または 10% FBS 添加 Fluoro Brite DMEM 培地(Fluoro Brite 区)でそれぞれ培養する実験区、さらに、10% ポリ-L-オルニチン溶液をコーティングしたガラスボトムディッシュ上で 10%FBS 添加 MEM とともに培養するオルニチン区に無作為に供試した。培養開始日を培養 0 日目とし、培養 2 日目以降 1 日おきに培地を新鮮なものと半量交換した。培養後、卵巣内における卵胞形成および卵胞の発育ステージを比較した。

## 4 . 研究成果

### (1)マウス一次卵胞の体外培養法の改良

一次卵胞の培養後、卵丘細胞と卵母細胞の複合体の中にある卵子の直径を測定した。その結果、培養膜上で培養した卵胞の生存率は 8.6%、ハンギングドロップ培養した卵胞の生存率は 35.3% であった。一方、卵子のサイズは、培養開始時に 40  $\mu$ m 未満であった直径は、それぞれ  $83.8 \pm 6.2$  および  $76.5 \pm 2.9$   $\mu$ m と増加した。また、培養した卵子の一部を体外成熟させ、減数分裂が再開されたか確認した結果、第 2 減数分裂中期に達していた。以上より、本体外培養方法は第一次卵胞から第二次卵胞の初期発生段階に分類されるような、初期卵胞の培養に有用であることが示唆された。

### (2) マウス体外卵胞培養における無血清培地の改良

無血清培地への高分子化合物 polyvinylpyrrolidone (PVP)添加の効果を検証した。二次卵胞を、3 mg/mL BSA 添加 Waymouth 's MB 752/1 培地で 6 日間培養後、3 mg/mL BSA 添加 MEM 培地で 4 日間培養した区を対照区、および前述の両培地に 2% PVP を添加した PVP 区に供試した。培養後、卵母細胞の生存率、卵母細胞の平均直径のどちらも PVP 添加区が対照区に比べ有意に高かった ( $p < 0.05$ )。また、成熟率は対照区( 30% )に比べ PVP 添加区( 50.1% )で高い傾向が示された。以上のことから、マウス二次卵胞の体外培養において、無血清培地への PVP 添加により卵母細胞の生存性が向上することが示唆された。

### (3) 卵巣のライブセルイメージングに適した体外培養基材の探索

体外培養の結果、培養後の卵巣サイズの変化は、培養 0 日目と比べて培養 2 および 12 日目では増大が見られたが、培養 12 日目においては全実験区で同様であった。また、卵胞形成は各実験区において培養 4 日目から確認され、培養 12 日目には一次卵胞が確認された。以上より、培養 12 日目の卵巣サイズおよび一次卵胞への発育に違いは実験区間で認められなかったことから、Fluoro Brite DMEM およびガラスボトムディッシュは最終的な卵巣および卵胞の発育に影響しない可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kanao Morohaku, Tomohiro Kohama
2. 発表標題 In vitro growth of early preantral follicles by two culture protocols
3. 学会等名 Society for the Study of Reproduction, 52th Annual conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真砂舞香、富岡郁夫、高木優二、諸白家奈子
2. 発表標題 マウス体外卵胞培養における無血清培地へのPVP添加の影響
3. 学会等名 日本繁殖生物学会第114回大会
4. 発表年 2021年

〔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
研究協力者	小浜 智大  (Kohama Tomohiro)		
研究協力者	真砂 舞香  (Masago Maika)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	岩崎 友香  (Iwasaki Yuka)		

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