

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06261

研究課題名(和文) 卵母細胞の発生過程における品質管理機構の解析

研究課題名(英文) Quality control of oocytes during development

研究代表者

永松 剛 (Nagamatsu, Go)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：70453545

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)：ライブイメージングの手法によって卵母細胞のシストブレイクダウンは徐々に進行していることを明らかとし、この際に失われていく細胞は大きく移動していることを見出した。さらにミトコンドリア状態を観察する独自のES細胞(TREloxMtGR)の解析から卵母細胞のシスト間でミトコンドリアが移動していることを示唆する結果を得ている。

一方で、卵母細胞の品質管理において排卵サイクルの起点となる原始卵胞の制御機構の重要性に着目し、生体内の原始卵胞の解析をすすめた。そして、原始卵胞は卵巣皮質に存在し、豊富な細胞外基質により加圧状態にあり、圧力状態が原始卵胞の制御に関わることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の卵母細胞は出生後に増えることはなく、原始卵胞において静止期、活性化を制御することにより持続した排卵サイクルを維持している。この原始卵胞が物理的圧力下にあるという成果はこれまであまり解析されてきていない原始卵胞の置かれている環境要因の重要性を示唆する学術的に意義深いものであり、加圧培養という新たな手法によって生体外でこれまでは誘導できなかった原始卵胞の誘導に成功している。このことは今後の生殖補助医療分野への発展につながる社会的意義も大きいものである。

研究成果の概要(英文)：First of all we have generated live imaging system to analyze oocyte development. Using this system, we clarified that the cyst breakdown of oocytes was gradually progressing, and the cells going to be lost at this time were largely moved. Furthermore, we also generated mitochondria imaging ES cells (TREloxMtGR) which suggested that mitochondria are migrating between oocyte cysts.

On the other hand, we focused on the importance of primordial follicles which serve as storage for continuous ovulatory cycles. We found that primordial follicles are surrounded with extracellular matrix (ECM) which generated physical pressure. Whereas digestion of ECM induced oocyte activation, exogenous pressure prevented it. From these findings we concluded that the pressure state is involved in the control of primordial follicles.

研究分野：発生生物学

キーワード：生殖細胞 卵母細胞 イメージング 圧力

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

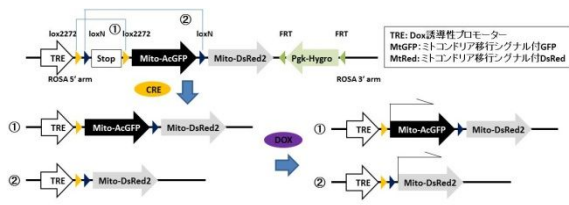
個体を形成するすべての細胞系列の中で唯一発生能を賦与される卵母細胞系列は種の維持のために極めて重要である。しかしながら、(少なくともマウスとヒトを含む)哺乳類においてその数は胎児期の始原生殖細胞(卵原細胞)をピークに減少する。ひとつの卵原細胞に由来する30個前後の卵母細胞は細胞間橋を介して連結する合胞体(シスト)を形成したのちに、シスト崩壊とともにアポトーシスをおこし、約70-80%の卵母細胞が失われる。生き残った卵母細胞は原始卵胞を形成し、個体の生殖期間における卵母細胞のストックとして機能する。この卵母細胞の大規模な細胞死を含む卵母細胞の品質管理機構は明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

哺乳類の生殖細胞系列において雄では精子幹細胞の増殖により継続的に精子を産生するのに対し、雌の卵母細胞は出生以降に増えることはない。ヒトの早期閉経の多くは原始卵胞の枯渇により引き起こされていることを考慮すると、出生時における原始卵胞のプールは生涯の生殖期間を賄うために十分な量であるとは言いがたい。それにもかかわらず出生直後に大きく数を減らすということは、卵母細胞が積極的に選択を受けている可能性が示唆される。このシスト崩壊時の卵母細胞の現象と、生き残った卵母細胞が形成する原始卵胞の長期にわたる維持に着目し卵母細胞の品質管理機構を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

これまでに研究者を含む研究グループによって卵母細胞の体外培養系が確立された。この培養系は生体の始原生殖細胞(PGCs)およびES細胞由来の始原生殖細胞様細胞(PGCLCs)から成熟卵子まで誘導でき、誘導卵子からは受精をへて次世代個体を得ることができる。このように卵母細胞の発生過程を体外で再現できることで体内へのアクセスの問題が解消され、ライブイメージング解析が可能となった。そこで卵母細胞の品質管理機構の解明をめざし、シスト崩壊時のライブイメージングを行う。これによって細胞死を起こす大多数の細胞と生存する細胞との動態をそれぞれ明らかにする。またES細胞に同一アレルからランダムに異なる波長の蛍光タンパクを発現させてミトコンドリアを可視化するコンストラクト(TREloxMtGR)(図1)をROSA26 locusに導入し、このES細胞から分化誘導した卵母細胞のシスト間でミトコンドリアの移動の有無をライブイメージングにより解析する。



さらに、シスト崩壊後に生存し長期にわたり排卵サイクルを支える原始卵胞の静止期維持機構について外的環境、特に細胞外基質に着目して解析を行う。

### 4. 研究成果

始めに、光毒性を抑えたLED光源と東海ヒット社製の培養チャンバーを組み合わせた長期培養のタイムラプス撮影が可能なZeiss社の顕微鏡システム(Zeiss Axio Observer)を構築し、このシステムを用いて胎児卵巣から卵母細胞の分化培養系のライブイメージングによる観察をすすめた。生殖細胞に特異的にCFPを発現するStella-CFPトランスジェニックマウスの胎児期卵巣を用いて、CFPの蛍光により卵母細胞をトラックして解析した結果、シスト崩壊はある一定のタイミングで一斉に起きるのではなく、徐々に進行していることが明らかとなった。さらにその際に失われていく細胞は消失する直前に残っている細胞に比べて大きく移動していることを見出した。このことは細胞死を起こす卵母細胞は先行してシストから離脱している可能性を示唆するものであると考えている。

次に、ES細胞を用いた卵母細胞誘導の培養系によりミトコンドリア動態のイメージングを行った。まず、不完全な細胞質分裂によりつながったシスト間でミトコンドリア移動を可視化するために、同一アレルからランダムに異なる波長の蛍光タンパクを発現させるコンストラクト(TREloxMtGR)をROSA26 locusに導入したES細胞を作製した。この細胞を用いて卵母細胞誘導の培養系を行うことにより同一細胞由来のシスト間でミトコンドリアをAcGFPもしくは

DsRed2 で標識することが可能となった。そして、この ES 細胞からエピプラスト様細胞、始原生殖細胞様細胞を経て卵母細胞の分化誘導を行い、誘導された卵母細胞シストにおいてミトコンドリア動態のイメージングを行った(図2)。その結果、同一シスト内で異なる蛍光タンパクの発現が観察され、シスト間でミトコンドリアが移動していることを示唆する結果が得られた。

さらに、卵母細胞の品質管理において排卵サイクルの起点となる原始卵胞の制御機構の重要性に着目し、生体内の原始卵胞の解析をおこなった。原始卵胞は卵巣皮質に存在し、その周囲は豊富な細胞外基質で囲まれていることを見出した。そして、酵素処理による細胞外基質を消化することで、原始卵胞の活性化が促進されることを明らかとした。

細胞外基質により卵母細胞が加圧状態にあるのではないかという仮説の元に、この酵素処理を人為的加圧下で行ったところ、原始卵胞の活性化の促進がキャンセルされることを見出した。このことから圧力状態が原始卵胞の制御に関わると考えている。さらに、加圧状態で原始卵胞内の卵母細胞は核を回転させていることを見出し、この核の回転はダイニン依存的事であること、その阻害によって卵母細胞の活性化が促進されることを明らかにした。

一方で、卵母細胞誘導の体外培養系では生体内と異なり原始卵胞が誘導されてこないという問題があった。体内環境と体外培養の相違としては環境要因が挙げられる。そして、原始卵胞がさらされている圧力はその大きな要因になっているのではないかと考え、卵母細胞誘導の体外培養を加圧条件下によって行った。その結果、これまで体外培養系では誘導されてこなかった原始卵胞の誘導に成功した。

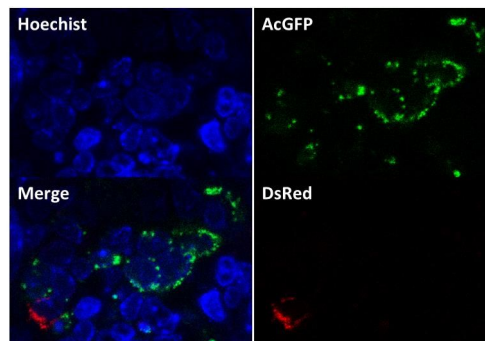


図2 同一シスト内の異なる蛍光タンパクによるミトコンドリア標識  
図1に示すような遺伝子を導入したES細胞を卵母細胞へ分化誘導させ蛍光タンパク(+ミトコンドリア局在シグナル)を発現させた。Hoechst染色(左上)で示される連なった同一シスト内においてAcGFP(右上), DsRed(右下)をそれぞれ発現する卵母細胞が確認できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hamada N, Hamazaki N, Shimamoto S, Hikabe O, Nagamatsu G, Takada Y, Kato K, Hayashi K.	4. 巻 16
2. 論文標題 Germ cell-intrinsic effects of sex chromosomes on early oocyte differentiation in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS Genetic s	6. 最初と最後の頁 e1008676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1008676	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakajima K, Ono M, Radovic U, Dizdarevic S, Tomizawa SI, Kuroha K, Nagamatsu G, Hoshi I, Matsunaga R, Shirakawa T, Kurosawa T, Miyazaki Y, Seki M, Suzuki Y, Koseki H, Nakamura M, Suda T, Ohbo K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Lack of whey acidic protein (WAP) four-disulfide core domain protease inhibitor 2 (WFDC2) causes neonatal death from respiratory failure in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	6. 最初と最後の頁 dmm040139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dmm.040139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Terada M, Kawamata M, Kimura R, Sekiya S, Nagamatsu G, Hayashi K, Horisawa K, Suzuki A.	4. 巻 57
2. 論文標題 Generation of Nanog reporter mice that distinguish pluripotent stem cells from unipotent primordial germ cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genesis	6. 最初と最後の頁 e23334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvg.23334	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagamatsu G, Shimamoto S, Hamazaki N, Nishimura Y, Hayashi K.	4. 巻 5
2. 論文標題 Mechanical stress accompanied with nuclear rotation is involved in the dormant state of mouse oocytes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaav9960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aav9960.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimamoto S, Nishimura Y, Nagamatsu G, Hamada N, Kita H, Hikabe O, Hamazaki N, Hayashi K.	4. 巻 116
2. 論文標題 Hypoxia induces the dormant state in oocytes through expression of Foxo3.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 12321-12326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1817223116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 永松剛, 林克彦
2. 発表標題 卵母細胞の活性化、静止期維持を制御する外的環境の解明
3. 学会等名 繁殖生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永松剛, 林克彦
2. 発表標題 原始卵胞の活性化、静止期維持を制御する外的環境の解析
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 始原生殖細胞をin vitroで原始卵胞に分化する方法	発明者 永松剛、西村洋平、 林克彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-117988	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 始原生殖細胞をin vitroで原始卵胞に分化する方法	発明者 永松剛、西村洋平、 島本走、林克彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/21209	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

マウスES細胞から休止状態の卵母細胞を体外培養で作製することに世界で初めて成功  
<https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/338>  
原始卵胞卵の維持機構に物理的圧力が関わることを解明  
<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/app/modules/information/detail.php?i=1111&c=10>  
NEWS RELEASE 26-JUN-2019  
[https://www.eurekalert.org/pub\\_releases/2019-06/ku-kur062519.php](https://www.eurekalert.org/pub_releases/2019-06/ku-kur062519.php)  
卵巣皮質に眠る「原始卵胞」は、加圧下で細胞核を回転し静止期を維持している  
<https://academist-cf.com/journal/?p=11942>

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
---------	---------