

機関番号：32665

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20500379

研究課題名 (和文) 培養による卵胞卵子成熟とその成熟卵子由来胚からの産子生産に関する基礎的研究

研究課題名 (英文) Basic study on follicular oocyte maturation by in vitro culture and production of offspring from embryos derived from IVM-maturation oocytes

研究代表者

佐藤 嘉兵 (SATO KAHEI)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：20059778

研究成果の概要 (和文)：

本研究はマウスの卵胞卵子を用いて効率的に成熟させる方法の検討の確立を主目的として新鮮および凍結卵巣組織由来の卵胞卵子を用いて体外成熟 (IVM) について検討した。その結果、リコンビナント FSH(recFSH)を使用した IVM で高い成熟率得られる方法が確立できた。また、幼弱マウス由来繊維芽細胞を用いた共培養法を行うと、安定した卵胞卵の成熟が得られること、更に卵丘細胞除去卵胞卵子あるいは過熟卵子でも成熟卵子を得ることができた。recFSH 使用による IVM 法で得られた成熟卵子は正常に受精し、その胚は正常産子に発生することが確認された。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, using recombinant FSH (recFSH) the in vitro maturation (IVM) of mouse follicular oocytes was investigated. Using recFSH IVM showed high maturation rate of the oocytes obtained from fresh or frozen/thawed ovarian tissues. Fertilization of the mature oocytes obtained showed high rate and its embryos developed into offspring by transfer into foster mothers. Co-culture of follicular oocytes with mouse fibroblasts also resulted in constant maturation rates compared with control (in vivo maturation oocytes).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：卵胞卵子成熟、共培養、リコンビナント FSH、IVM、vitrification

1. 研究開始当初の背景

実験動物の卵巣内に存在する多数の卵胞

卵胞を体外成熟(IVM)させ、これを体外受精(IVF)によって受精卵子を得て、この受精

卵子から産子を生産するためのシステムが十分に確立していなかった。この方法が確立できれば効率的な実験動物の生産に応用できるものと考えられた。特に、遺伝的に貴重な動物個体の維持、生産への応用が期待できるが、そのためにも、その基礎となる研究が必要と考えられた。それには有効な IVM を確実に実行する方法を確立させること。その成熟卵子を用いた成熟卵子の受精・発生法およびその移植による産子の生産に関するシステムの樹立が考えられた。

2. 研究の目的

本研究は上述した様に卵胞卵子を用いて成熟卵子を体外成熟(IVM)法によってより効率的に成熟させる方法の確立をするためにマウスの卵胞卵子を用いて以下の項目について検討することを研究目的とした。

(1) マウス卵巣組織の効果的な凍結保 (vitrification) を完成させる。

(2) 安定した培養卵子の生存性および成熟を効率的に促進できる培養法を検討する。

(3) 通常 IVM には FSH を始めとするゴナドトロピンが使用されるが、夾雑物が極めて少ないことが明らかにされているリコンビナント FSH (recFSH) を用いた卵胞卵子の成熟法について確立する。

(4) IVM で得られた成熟卵子について体外受精 (IVF) を行ってその受精能と受精後の胚発生についての検討を行い、正常産子への発生能について検討する。

(5) 付着していない卵丘細胞が少ない卵子は成熟あるいは受精率が低いとされているが、これ等の機能を有する程度維持可能な IVM 法について検討する。

3. 研究の方法

(1) 成熟雌マウス (35-4 日齢) を用いて、これに 8 IU の妊馬血清性ゴナドトロピンの腹腔内注射を行い、その 4 8 時間後に卵巣を摘出し凍結実験に使用した。凍結に使用した保護物質 EFS で、そのうちエチレングリコール 10、20、40% の液を作成し、25°C /8min、25°C /8min、4°C /4min の順で耐凍剤処理を行い、LN2 中に凍結保存した。

(2) 成熟雌マウス (35-4 日齢) を用いて、これに 8 IU の妊馬血清性ゴナドトロピンの腹腔内注射を行い、その 4 8 時間後に卵巣を摘出し大型卵胞から卵丘細胞付着 GV

卵子(COC)を採取して実験に用いた。リコンビナント FSH を用いて新鮮および凍結／融解卵巣由来卵胞卵子の IVM を行い、効率的に卵子を成熟させる条件を検討した。

(3) 卵丘細胞除去卵子、あるいは過熟によって卵丘細胞が脱離した卵子を用いて、新鮮卵子から採取した卵丘細胞を用いて共培養を行って、これ等卵子の成熟率およびその成熟卵子について IVF による受精実験を行って受精率とその胚の発生率について調べた。

(4) 体外成熟卵胞卵子の受精能及び発生を検討するために IVF を行い、受精及び受精卵の発生について調べ、更に、胚を仮親に移植し産子の発生について調べた。

4. 研究成果

(1) EFS による凍結保存胚の融解は 20%/5min/4°C、10%/5min/25°C、0.5M スクロース/8min/25°C での条件でその生存率が他の組み合わせに比べて最も優れた生存率を示した。その後、卵巣凍結実験ではこの方法を使用した。

(2) recFSH 50、100 あるいは 200 mIU/ml を添加し、更に FBS 10% を添加した HTF 液中で新鮮卵胞および凍結／融解卵胞から採取した卵丘細胞付着 GV 卵子 (COC) を 19~21 時間培養すると、100 及び 200 mIU/ml を添加した群では他の群に比べて有意に高い成熟率を示した。新鮮卵胞卵子の成熟率は凍結融解卵胞卵子の成熟に比べて高い傾向をしめしたが、新鮮および凍結／融解群間には 100 および 200 mIU/ml で有意な差は無かった。

(3) 一方、卵丘細胞を付着した新鮮あるいは凍結融解卵胞の胞状卵胞から採取した COCs を recFSH100 または 200 mIU/ml および、これに FBS10%(v/v) を添加した HTF あるいは α MEM 液中で培養した。これをコントロールとして、卵丘細胞を除去した未成熟卵子をこの培養液中で培養して、成熟について比較検討した。その結果、新鮮卵巣組織から採取した COCs を培養した群 (コントロール) では、(2) で得られた成熟率とほぼ同じであった。これに対して、卵丘除去未熟卵子群では成熟率は低かったが、新鮮卵巣組織から採取した recFSH 無添加群に比べて有意に高い成熟率を示した。一方、凍結融解した卵巣組織から採取した COCs では (2) で得られた成熟率と有意な差は見られなかったが、卵丘細胞除去群では無添加群と同様に極めて低率であった。

この結果は、recFSH は卵丘細胞を予め除去した卵子においても成熟促進効果を示す可能性を示しており、興味を持たれた。

(4) IVM により成熟した卵子で IVF を行い、その受精能力について調べた。その結果、コントロール(排卵卵子)に比較して recFSH 100 あるいは 200 mIU/ml 添加群では、受精率に有意な差はみられなかった。一方、凍結卵胞から採取し、成熟した卵子の受精率は recFSH 100 あるいは 200 mIU/ml 添加群において他群に比較しても有意に高い割合を示した。しかしながら、新鮮卵胞由来卵子に比べて若干低い受精率であった。この原因については不明であるが、凍結/融解の過程において、卵子の細胞質に何らかの障害を受けた結果、形態的な異常は特に見られないが、機能的な障害があり、その結果として受精率が低下したことが考えられた。特に、IVM-IVF による産子生産システムを構築する場合、この点の改善が重要であると思われた。

(5) recFSH 添加培養系と比較するために新鮮な卵丘細胞を増殖させた細胞群との共培養系を用いて未熟卵胞成熟、新鮮卵胞由来の成熟卵子、同卵丘除去卵子および過熟卵子との成熟培養実験を行った。培養時間は 19—20 時間とした。その結果、卵丘細胞付着卵子(COCs)では卵丘除去卵子、過熟卵子に比較して有意に高い成熟率を示した。これに対して卵丘除去卵子では過熟卵子に対して成熟率は有意に高かったが、卵丘細胞と卵丘除去卵子群との共培養では卵丘除去群は成熟率が回復していた。この結果は卵丘細胞除去卵子でも新鮮な卵丘細胞との共培養はその成熟に有効であることを示唆した。これらの結果から、卵丘細胞と共培養系は COCs あるいは卵丘細胞と共培養系は卵子成熟に有効であり、また卵丘細胞除去卵子の成熟にも有効性が示された。

(6) (5) で述べた様に、IVM を行う前に卵丘細胞をヒアルロニダーゼにより除去して成熟培養を行った場合、成熟率は COC に比べ低率であった。この卵子を用いて IVF を行ったところ、COCs 由来卵子に比較して受精率は低く、その発生率は有意に低率であった。過熟卵子裸化卵子は更に低率であった。裸化卵子の成熟あるいは受精に関しては、更に有効な方法の検討が必要と思われた。

(7) 培養液 α MEM 液に 10% ウシ胎児血清 (FBS) を添加し、これに recFSH 200 mIU を添加した。その結果、新鮮卵胞由来卵子では胚盤胞へ発生率は卵丘細胞除去卵子、

過熟卵子に比較しては高く、特に、胚盤胞への発生は高率であった。

(8) 受精した卵子由来の胚では 2-cell から胚盤胞への発生率は、新鮮卵胞由来胚と正常受精卵子由来胚の間には有意な差はみられなかった。これに対し、凍結/融解卵胞由来胚では正常受精卵子由来胚に比較して低率であった。この結果は、凍結/融解卵胞はその操作過程で何らかのダメージがあり、形態的には正常に成熟したと思われる卵子であるが、その受精および初期発生の過程において、その障害が発現することが考えられた。今後、凍結/融解卵胞卵子を使用するには、この点に関する改良の検討が必要と思われた。

(8) 卵胞卵子の IVM による実験から得られた成熟卵子を培養し、その得られた胚が 2-cell から 4-cell になった時点で、これを仮親への卵管内へ移植した。コントロール胚 (recFSH 無添加群) で 40%、新鮮卵胞由来胚移植では 45%、凍結卵胞由来胚では 50% の仮親が妊娠した。コントロールと新鮮卵胞由来胚では、正常な産子が得られた。一方、凍結胚移植では 5 頭の産子が娩出されたが、その分娩の翌日に 4 頭が死亡した。これら凍結胚の移植により生まれた産子は虚弱であった。今後、IVM によって得られた受精卵 (胚) を用いて移植による産子生産に関する効率を向上させるための更なる検討が必要であると思われた。

(9) 以上、本研究で得られたマウスを用いた実験結果は、卵胞成熟、特に recFSH を用いた方法は有効であることが示された。また、凍結卵胞組織由来の卵子を用いた IVM に関する基礎的な情報が得られたものと考えられた。更に、卵丘細胞との共培養法が卵丘離脱した卵胞の成熟に有効であることが示された。しかしながら、IVM-IVF を基本とする産子生産には、さらに効率的な方法の確立が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Tarumi Wataru, Suzuki Nao, Takahashi noriyuki, Kobayashi Yoichi, Kiguch Kazubari, Sato Kahei, and Ishizuka Bunpei. Ovarian toxicity of paclitaxel and effect on fertility in the rat. *Obstet. Gynecol. Res.* 35 (3) 414-20, 2009

(Jun)
査読有

[学会発表] (計 4 件)

① 小林達也、佐藤嘉兵、マウス凍結生殖
器および冷凍屠体より採取した精子の受精
能力に関する検討、第 28 回日本受精着床
学会、平成 22 年 7 月 28-29 日、パシフィ
コ横浜

② 梅川由衣、辻麻美、佐藤嘉兵、卵丘細
胞を用いた共培養系が卵子成熟に及ぼす影
響、第 5 回日本生殖再生医学会、2010 年 2
月 21 日、シェーバツハサボー・東京

③ Umekawa Yui, Yamamoto Mizuki
and Sato Kahei. In vitro maturation of
mouse oocytes by using recombinant
FSH. . The International Ovarian
Conference 2009. Otemachi Sankei
Plaza, 2009 年 11 月 5 日

④ Tsuji Asami, Yamamoto Mizuki,
Kobayashi Tatsuya, Sato Kahei. Oocyte
maturation by a co-culture system using
cumulus cells. The International
Ovarian Conference 2009. Otemachi
Sankei Plaza, 2009 年 11 月 5 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 嘉兵 (SATO KAHEI)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：20059778

(2) 研究分担者

新井 直人 (ARAI NAOTO)
日本大学・生物資源科学部・講師
研究者番号：70297795

(2) 連携研究者

鈴木 直 (SUZUKI NAO)
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師
研究者番号：90246356