

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06372

研究課題名（和文）基底膜の構成成分が哺乳類卵母細胞の体外発育に及ぼす影響の解明とその利用

研究課題名（英文）Effects of basement membrane components on oocyte development in vitro

研究代表者

平尾 雄二（Hirao, Yuji）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・グループ長

研究者番号：10355349

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）：ウシやマウスなどの哺乳類卵母細胞の体外発育培養では卵胞全体を培養する三次元（3D）培養と基底膜から内側の卵母細胞・顆粒膜細胞複合体を平面的な支持体上で培養する二次元（2D）培養が行われている。卵母細胞の発育期後半を達成させる培養については、2D培養の成績は3D培養よりも優れている。しかし、生体内の発育には及ばず、2D培養にさらに添加すべき因子があるものと考えられる。2D培養で除去する基底膜は様々な機能をもつことが明らかにされてきている。本研究では基底膜を構成する成分を培養系に添加してその影響を調べた。その結果、培養インサート上のラミニン被膜が卵母細胞の発育に影響を及ぼすことが認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵母細胞のみならず哺乳類の組織培養において3D培養の利用が増えている。ただし、卵母細胞の体外発育においては、主な研究対象であるマウスとウシでは2D培養が優れている。効果の優劣が生じる理由は不明だが、2D培養では卵胞の基底膜を除去する点で3D培養と異なる。基底膜には裏打ちシートの役割に加えて、能動的な機能を有することが明らかとなりつつある。2D培養における卵母細胞の発育が生体内よりも劣るため、基底膜の機能的な側面を調べるための有効な培養モデルとなる可能性がある。本研究は発育途上の卵母細胞を2Dの方法で培養し、発育における基底膜成分の役割を理解し、優れた培養系の開発を目指すものである。

研究成果の概要（英文）：In vitro culture of growing oocytes in mammals, such as cattle and mice, has been conducted in two ways: three-dimensional (3D) culture, in which oocytes and granulosa cells are enclosed with the basement membrane are cultured, and two-dimensional (2D) culture, in which oocyte-granulosa cell complexes extracted from the follicles are cultured on the flat substrate. The outcome of oocyte growth in vitro is better in 2D culture than in 3D culture, though it is worse in 2D culture than that in vivo. Therefore, some factor(s) must be missing in the culture conditions. Since the basement membrane has been shown to have various functions, components of the basement membrane were added to the culture conditions and their effects on oocyte growth were examined. It was found that the formation of a laminin coat on the culture insert can support survival and growth of bovine oocytes.

研究分野：農学

キーワード：卵母細胞 顆粒膜細胞 体外発育 基底膜 コラーゲン ラミニン 成長因子 ウシ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の発育途上卵母細胞は、発育期の後半になると GDF9 や BMP15 など自ら発するシグナルによって周囲の顆粒膜細胞の活動を制御し、発育完了にむけて環境を整えることが知られている。卵胞の内部環境を体外培養で再現することにより、マウスやウシの卵母細胞を正常に発育させることができるが、卵母細胞の集団全体では生体内と同等レベルの発育には至っていない。卵母細胞・顆粒膜細胞複合体を培養する場合、卵胞の一部である基底膜が除かれていることから、その機能を欠いているために卵母細胞の発育が損なわれている可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究は、基底膜を取り去った発育培養系を用いて、発育における基底膜成分の役割を理解し、より優れた培養系の開発を目指すものである。

### 3. 研究の方法

全般的な研究材料として、主にウシおよびマウスの卵巣を使用する。ウシについては、食肉処理場由来の卵巣あるいは繁殖農家で雌ウシより割去された卵巣を材料とする。また、マウス卵巣については購入もしくは自家繁殖させる。

培養について、研究期間を通して同じ手法を使って遂行する。具体的には、マウスおよびウシの発育途上卵胞から、成熟能力を獲得する前の卵母細胞・顆粒膜細胞複合体を採取し、2週間程度培養して発育、成熟させる。その際、卵母細胞を2D培養で発育させるために開発した高濃度の高分子化合物(ポリビニルピロリドン; PVP)を添加する培養液を用いる。また体外発育後には卵母細胞の発育の程度、成熟能力・受精能力・胚発生能力を確認する。

本研究の目的である基底膜の構成要素については、市販のコラーゲンゲルやマトリゲルなどを用いる。

以上の基盤となる条件をもとに、次の実験を行う。

(1) 基底膜の構成成分を含んだ抽出液を購入し、顆粒膜細胞の移動、増殖、分化に及ぼす影響を調べる。該当するゲルは数社によって市販されており(I型コラーゲンゲル、IV型コラーゲンゲル、マトリゲル、ラミニン)、卵母細胞の生存率と発育へ及ぼす影響も含めて比較検討する。

(2) サイトカイン・成長因子については、EGF、IGF-1、TGF- $\beta$ 、NGF等を添加した培地における卵母細胞の発育を比較検討する。

(3) 添加する基底膜構成要素を決定し、作出した卵母細胞に由来する体外受精卵を作成し、卵母細胞の品質を比較する。

### 4. 研究成果

ウシ初期胞状卵胞から直径約 100  $\mu$ m の成熟能力を有さない卵母細胞を含む卵母細胞・顆粒膜細胞複合体を採取して2D培養を用いて14日間培養し、以下の結果を得た。

(1) 培養インサートであるミリセルを基本の培養基質とし(対照区)、I型コラーゲンゲル(市販)あるいはマトリゲル(市販)を塗布した直径2mmないし3mmのスポットを作成し、同一インサート上でマトリックス成分のみ異なるスポットにそれぞれ2個ないし3個の複合体を載せて培養した。対照区を含む全てのスポット上で卵母細胞周囲に顆粒膜細胞によ

るドームが形成され、卵母細胞による顆粒膜細胞の分化誘導が確認された。

I型コラーゲングル区では培養の初期に裸化した卵母細胞が多く認められ、その原因は培養初期における顆粒膜細胞の遊走によるものと考えられた。培養14日後に複合体として回収された生存卵母細胞の率（生存率）はコラーゲングル区では33%であった。マトリゲル区においても顆粒膜細胞の遊走が認められたが、卵母細胞の裸化はコラーゲン区と比較すると少なく、培養14日後の生存率は68%であった。顆粒膜細胞の移動がコラーゲングル上よりも遅かったか、あるいはマトリゲルの成長因子により細胞の増殖が活発となり、裸化に至らなかった可能性がある。対照区における卵母細胞の生存率は78%であった。培養14日後の卵母細胞の体積（平均）は、対照区、I型コラーゲングル区、マトリゲル区がそれぞれ787817  $\mu\text{m}^3$ （直径114.2  $\mu\text{m}$ ）、848515  $\mu\text{m}^3$ （直径117.3  $\mu\text{m}$ ）、764587  $\mu\text{m}^3$ （直径113.1  $\mu\text{m}$ ）となったが、コラーゲングル区では低い生存率が課題として残された。

次いで、マトリックス成分を様々な濃度と組み合わせでミリセルに塗布し、ウシ卵母細胞・顆粒膜細胞複合体（計378個）を14日間培養した。

ミリセルに付着せず、複合体がスフェロイドとなる現象も観察された。しかしそのような場合、複合体内部の卵母細胞は培養終了時の14日後までに死滅することから、卵母細胞を発育させるには基質へ接着させる必要があると確認された。そこで、ウシ胎児血清とコラーゲンの混合物（8:2）を塗布して乾燥させたインサートで試した結果、培養1日でコラーゲンへ接着した顆粒膜細胞の遊走が認められ、数日後には卵母細胞が裸化や扁平化していた。したがって、当該の比率による混合物でのインサート処理を施した場合、顆粒膜細胞のインサートへの接着が強すぎるということが明らかとなった。

同様の強い細胞接着と遊走は、マトリゲルをリン酸緩衝生理食塩水で50倍希釈した場合、あるいは50倍希釈した上で100倍希釈のコラーゲングルと混合した場合にも観察された。200倍ないし1000倍程度に希釈したマトリゲルを単独で用いた場合には顕著な遊走は観察されなかった。IV型コラーゲンについても試みたが、ゲル化が困難という特徴に加え、使用していた製品が製造中止となったことから、以降の実験では使用しなかった。培養された卵母細胞・顆粒膜細胞複合体の形態に関してはI型コラーゲンと大きな相違は認められなかった。

最後に、対照区、マトリゲル区、ラミニン区（市販）で比較した結果、細胞の接着、伸展においてラミニン区が良好な成績となった。いずれの実験区においても培養1日後の体積よりも培養14日後の体積が有意に大きな値を示したが、実験区間における差は有意ではなかった（図1）。

動物種の違いとして、コラーゲングル上での顆粒膜細胞の遊走による卵母細胞の裸化は、マウスではウシの場合ほど問題とはならなかった。

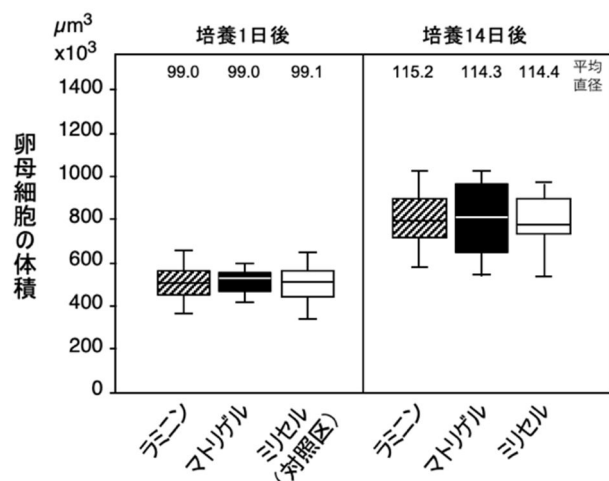


図1. 市販の基底膜構成成分を塗布した培養インサートにおけるウシ卵母細胞の体積の増大

(2) サイトカイン・成長因子を添加して効果を調べたが、それらの添加よりも卵母細胞そのもの（放出される成長因子）の発育および複合体の生存・発育・形態に及ぼす（良い）影

響が明らかであった。オートクライン・パラクライン的な作用があったと考えられる。卵母細胞の死滅と複合体の崩壊のタイミングが一致しており、正常の形態から逸脱しつつある複合体に対して、サイトカイン・成長因子を添加しても卵母細胞の退行を阻止することは困難であった。

卵母細胞から放出される成長因子の代表は GDF9 と BMP15 とされており、いずれも TGF-ファミリーに分類されている。しかし、TGF-、アクチビン、EGF などの成長因子は本研究で用いた 2D 培養系では必ずしも卵母細胞の生存性や発育を高める効果を示さず、むしろ一部の実験では卵母細胞に悪影響が認められた。

GDF9 および BMP15 を培養液に添加することによって生存率は向上したが、体積の増大率はむしろ低下した。GDF9 および BMP15 の添加によって、すでに発育不良となっている本来退行すべき卵母細胞までも延命する結果となった可能性が考えられる。

(3) 以上の結果に基づき、基底膜の成長因子ではなくラミニン上で培養することが好ましいと考えられたことから、体外受精を行い、胚盤胞への良好な発生を確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>平尾雄二                       |
| 2. 発表標題<br>卵胞培養における卵母細胞の体外成長をめぐる現状と課題 |
| 3. 学会等名<br>第67回日本生殖医学会学術講演会（招待講演）     |
| 4. 発表年<br>2022年                       |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（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 |
|---------|---------|
|---------|---------|