

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292192

研究課題名(和文) 家畜卵母細胞における周辺細胞巻き込み型の自己完成プログラムの解明

研究課題名(英文) Self-regulation program of oocytes involving differentiation of surrounding somatic cells in domestic species

研究代表者

宮野 隆 (MIYANO, Takashi)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80200195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウシおよびブタの初期胞状卵胞より採取した、発育途上の卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞-顆粒膜細胞複合体を、高濃度のポリビニルピロリドン(PVP)とステロイドホルモンを含む培養液中で14日間培養すると、複合体はドーム様構造を形成し、構造内部で卵母細胞は発育し、成熟能力を獲得した。ブタ複合体では、FSHとPVPが卵丘細胞の増殖を促進した。ウシでは、ステロイドホルモンが卵母細胞と卵丘細胞との結合を維持した。また、PVPは卵母細胞を取り囲む顆粒膜細胞の細胞外マトリックスに関わる遺伝子の発現を低下させた。体外で発育したウシ卵母細胞は正常に受精し、胚盤胞へと発生した。

研究成果の概要(英文)：Bovine and porcine oocyte-cumulus-granulosa cell complexes collected from early antral follicles were cultured for 14 days in a medium with appropriate concentrations of polyvinylpyrrolidone (PVP) and steroidal hormones. Complexes from both species formed dome-like (antral follicle-like) structures, in which oocytes grew to the final sizes and acquired the maturational competence. FSH and PVP promoted proliferation of porcine cumulus cells to make dome-like structures. In bovine oocyte-cumulus-granulosa cell complexes, steroidal hormones maintained connections between oocytes and cumulus cells via transzonal projections, which extended from cumulus cells through the zona pellucida to the oolemma. High concentrations of PVP down-regulated gene expression of extracellular matrices in both bovine and porcine granulosa cells surrounding oocytes. In vitro-grown bovine oocytes were similar to in vivo grown oocytes in fertilization ability and developed to blastocysts.

研究分野：農学

キーワード：応用動物 卵母細胞 卵胞 体外培養 顆粒膜細胞

1. 研究開始当初の背景

マウスの ES 細胞と iPS 細胞から 2011 年には精子が、2012 年には産仔へと発生する能力を備えた卵子の作出が報告された。しかし、成熟・受精・発生する能力を備えた卵母細胞を生み出すには、ES 細胞や iPS 細胞から誘導された始原生殖細胞様細胞を動物体内に戻して育てる必要があり、体外培養系のみでこれらの細胞に成熟・受精・発生する能力を賦与することは、現時点では困難である。

マウスでは、1996 年に卵巣内の最も小さな原始卵胞中の卵母細胞を体外で最終の大きさへと発育させ、この卵母細胞に由来する産仔が得られているが (Eppig と O'Brien, Biol Reprod, 54: 197-207, 1996), マウス以外の動物種では同等の体外培養技術は未だ開発されていない。大動物の卵母細胞の発育培養としては、1999 年の報告 (Yamamoto ら, Theriogenology, 52: 81-89, 1999) と 2004 年の報告 (Hirao ら, Biol Reprod, 70: 83-91, 2004) において、ウシ卵巣内の卵母細胞から産仔の作出が報告されている。いずれも初期胞状卵胞から採取した成熟能力のない直径 90~99 μm の発育途上の卵母細胞を 2 週間体外培養して発育させたものである。しかし、卵母細胞の成熟率や発生率は、卵巣内で発育した卵母細胞と比べて低いものであった。

2004 年に平尾らが開発したウシ卵母細胞の発育培養系は、初期胞状卵胞より採取した卵母細胞と顆粒膜細胞の複合体のみを材料とし、コラーゲンゲルやアルギン酸ゲルなどに包埋することなく、複合体を直に培養液中で培養する「開放型培養系」である。この発育培養系を用いると、卵巣内で起こる卵母細胞 (卵胞) の選抜は起こらず、培養した発育途上の卵母細胞は、培養日数の経過とともにそろって発育する。この培養系を用いれば、調べたい因子を培養液に直接添加することによって、その役割を知ることができる。例えば、添加するステロイドホルモン量を調節することにより、ウシ卵母細胞が最終の直径へと発育し、成熟能力を獲得する培養系を組み立てることができ (Taketsuru ら, Zygote, 20: 407-415, 2012), ブタにおいても dbcAMP と FSH を添加すると、高率に成熟卵を作出することができる可能性が示唆された (Cayo-Colca ら, Theriogenology, 75: 1602-1612, 2011)。

マウスでは胞状卵胞を形成する時点で卵母細胞がほぼ最終の大きさへと発育してい

るのに対して、ウシやブタなど大型の動物では卵胞腔形成後も卵母細胞が発育し続ける点で大きく異なる。これが、マウスで開発された卵母細胞の発育培養系が、大型動物やヒトに直ちに適用できない一因となっている。卵母細胞の発育過程における周囲の顆粒膜細胞との相互作用については、これまで主にマウスで研究が進められているが、大型動物ではほとんど研究がない。これは、卵母細胞のよい体外発育培養系がないことに起因している。申請らの改良した「開放型培養系」を用いれば、ウシおよびブタ卵母細胞の発育の最終段階で起こる成熟・受精・発生能力獲得過程における顆粒膜細胞の役割を詳細に検討することが可能と考えられる。

発育培養系において卵母細胞の成熟能力の獲得と連動して起こる典型的な現象は、ウシでは増殖した顆粒膜細胞によるドーム様構造 (胞状卵胞様構造) の形成であり、ブタでは卵母細胞-卵丘細胞複合体が培養液に露出する形態の構造である。ドーム様構造では、顆粒膜細胞の活発な増殖に基づく、卵母細胞を取り囲む卵丘様構造の形成と、さらにその外側を取り囲む壁顆粒膜細胞様の構造の分化が引き起こされる。卵丘様構造の形成が密接に関連することを経験的につかんではいるが、その理由はわからない。本研究ではこの点に着目し、培養下での顆粒膜細胞の分化による卵丘の形成と卵母細胞の相互作用、それに基づく卵母細胞の成熟・受精・発生能力の獲得との関連について解析する。

2. 研究の目的

卵母細胞は発育の最終過程で、成熟・受精・発生する能力を獲得する。全ての能力が揃うまでは卵母細胞は未完成である。ウシやブタの場合、最後の 2 週間で順次これらの能力を獲得すると考えられるが、その間、周囲の顆粒膜細胞との間で、卵母細胞を中心とするパラクライン的制御が行われる。本研究ではそれを「周辺細胞巻き込み型の自己完成プログラム」と呼ぶ。卵母細胞と顆粒膜細胞との関係を直接調べることは、卵巣の複雑な構造と活動が障害となるため困難であることから、申請者が構築した卵母細胞の体外発育培養系を用い、卵巣内の複雑な影響を排除したうえで卵母細胞と顆粒膜細胞の相互作用を調べる。

本研究では、「開放型培養系」を用いて、卵母細胞と顆粒膜細胞との相互作用を単純化した条件で解析し、顆粒膜細胞を巻き込み

ながら自己の完成に至る卵母細胞のプログラムの解明を試みる。また、その結果を培養系の開発へと応用する。

3. 研究の方法

(1) 卵母細胞-卵丘細胞-顆粒膜細胞複合体の採取

と畜場で採取したウシおよびブタの卵巣から、実体顕微鏡下に直径0.4~1.5 mmの初期胞状卵胞を切り出した。直径約0.5 mmの初期胞状卵胞からは、減数分裂再開能力をもたない直径90~100 μ mの卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞-顆粒膜細胞複合体を、直径1.0~1.5 mmの初期胞状卵胞からは、減数分裂再開能力を有するが、第二減数分裂中期へと成熟する能力をもたない直径約110 μ mの卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞複合体(ブタ)または卵母細胞-卵丘細胞-顆粒膜細胞複合体(ウシ)を採取し、以下の実験に用いた。

(2) ブタ卵母細胞の発育培養

直径90~100 μ mの卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞-顆粒膜細胞複合体を、平尾ら(2004)がウシ卵母細胞の発育培養用に開発した培養液に、修正を加えた培養液中で、ペトリディッシュ内のセルカルチャーインサート上で、5% CO₂-95%空気の気相下で、38.5℃、湿潤条件下で14日間培養した。培養液に異なる濃度のFSH、ポリビニルピロリドン(PVP)およびエストラジオール17(E₂)を添加し、卵母細胞の体外発育および成熟能力の獲得に及ぼす影響を調べた。また、複合体によるドーム様構造の形成を観察した。

直径約110 μ mの卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞複合体については、1 mM dbcAMPおよび0.01 IU/mlのFSHを添加した培養液を用い、さらに種々の濃度のE₂を添加して5日間培養した。

(3) ブタ卵丘細胞の増殖性

直径90~100 μ mの卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞複合体を14日間培養し、ドーム様構造の形成を観察した。また、培養2日および10日後に5-ethynyl-2'-deoxyuridine(EdU)を複合体に取り込ませた後、EdUを検出することによって、卵丘細胞の増殖性を調べた。

(4) ブタ卵母細胞の成熟培養

体外で発育させたブタ卵母細胞を含む卵

母細胞-卵丘細胞複合体を、性腺刺激ホルモンを含む培養液中で48時間培養し、卵母細胞に成熟を誘起した。

(5) ブタ卵母細胞の発生培養

E₂添加培養液中で発育させたブタ卵母細胞を成熟培養後、裸化し、電気刺激を与えることによって単為発生を誘起した。その後、PZM-3(porcine zygote medium-3)中で6日間培養して、胚盤胞へと発生させた。

(6) ウシ卵母細胞の発育培養

直径90~100 μ mの卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞-顆粒膜細胞複合体を96穴培養皿またはペトリディッシュ内のセルカルチャーインサート上で14日間培養した。培養液に異なる濃度のE₂、アンドロジェン(アンドロステンジオン:A₄、テストステロン、ジヒドロテストステロン)を単独または組み合わせて添加し、ドーム様構造の形成と卵母細胞の発育に及ぼす影響を調べた。また、卵丘細胞から透明帯を貫通して卵母細胞に伸びるTranszonal Projection中の線維性アクチンを染色することによって、卵母細胞と卵丘細胞間の結合を調べた。

直径約110 μ mのウシ卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞-顆粒膜細胞複合体については、dbcAMPあるいはイソブチルメチルキサンチン(IBMx)を添加した培養液中で5~7日間培養した。

(7) ウシ卵母細胞の成熟培養

体外で発育させたウシ卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞複合体を、性腺刺激ホルモンを含む培養液中で22時間培養し、卵母細胞に成熟を誘起した。

(8) ウシ卵母細胞の体外受精および発生培養

E₂およびA₄を添加した培養液中で14日間発育培養したウシ卵母細胞を成熟培養後、6または12時間媒精した。媒精16時間後に卵母細胞を固定して精子の侵入を調べるとともに、7日間培養して胚盤胞へと発生させた。

(9) 顆粒膜細胞のマイクロアレイ解析

マウスおよびウシの発育途上卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞-顆粒膜細胞複合体をPVP添加培養液(高分子クラウディング様態)と無添加の培養液(対照)中で体外発育培養し、体外発育した卵母細胞周囲の顆粒膜細胞層を採取してマイクロアレイ解析に供した。発現の変動が認められた遺伝子を調べるとともに遺伝子オントロジー解析を行

った。

4. 研究成果

(1) ブタ卵母細胞（直径 90~100 μm ）の発育および成熟に及ぼす PVP, FSH および E_2 の影響

ウシでは培養液中に 4% の濃度で PVP を添加すると、複合体はドーム様構造を形成し、その内部で卵母細胞が発育したが、ブタでは PVP 濃度が 2% の場合、複合体は高率にドーム様構造を形成し、卵母細胞は高い生存性を保った状態で発育した。また、ブタの複合体では FSH を添加すると卵母細胞の生存性が高く維持された。体外で発育した卵母細胞は、その後の成熟培養によって成熟した。

卵母細胞-卵丘細胞複合体を培養した場合にも、卵母細胞-卵丘細胞-顆粒膜細胞複合体を用いた場合と同様に、複合体はドーム様構造を形成し、卵母細胞は最終の大きさへと発育した。また、卵母細胞はその後の成熟培養によって成熟した。

(2) ブタ卵母細胞（直径 90~100 μm ）周囲の卵丘細胞の増殖に及ぼす FSH の影響

卵母細胞-卵丘細胞複合体を 0.01 IU/ml の FSH 添加した培養液中で培養すると、卵丘細胞の増殖性は、FSH 無添加および 0.1 IU/ml の FSH を添加した場合に比べて高かった。複合体を FSH 添加培養液中で 10 日間発育培養し、形成されたドーム様構造内の卵母細胞-卵丘細胞様構造を調べたところ、卵丘細胞の増殖性は低下していた。

卵母細胞-卵丘細胞複合体を異なる濃度の PVP を添加した発育培養液中で 2 日間培養した。PVP 無添加区および 4% PVP 添加区に比べて 2% PVP で卵丘細胞の増殖性は高かった。これらの結果から、適切な濃度の FSH および PVP はブタ卵母細胞-卵丘細胞複合体における卵丘細胞の増殖を促進し、ドーム様構造の形成を促進すること、また、ドーム様構造形成後の卵母細胞周囲の卵丘細胞では、増殖性が低下することが示唆された。

(3) ブタ卵母細胞（直径約 110 μm ）の発育および成熟に及ぼす FSH および E_2 の影響

直径約 110 μm のブタ卵母細胞を dbcAMP と FSH を添加した培養液中で 5 日間培養すると、卵母細胞は減数分裂を休止した状態で最終の大きさへと発育した。発育培養液に、さらに E_2 を添加すると、発育培養後の成熟培養において卵丘の膨潤化を伴う卵母細胞

の成熟が誘起された。一方、 E_2 無添では卵丘の膨潤化は起こらなかった。

E_2 添加培養液中で発育し、その後の成熟培養によって成熟した卵母細胞は、活性化刺激によって胚盤胞へと発生した。

(4) ウシ卵母細胞（直径 90~100 μm ）の発育および成熟に及ぼすステロイドホルモンの影響

直径約 95 μm の成熟能力をもたないウシ卵母細胞の体外発育培養液に E_2 と A_4 を同時に添加すると、卵母細胞の生存性は高く保たれ、卵母細胞は発育して成熟能力を獲得した。複合体を E_2 と A_4 以外のアンドロジェン(テストステロンまたはジヒドロテストステロン)を含む培養液中で 2 週間体外培養した場合も、卵母細胞の生存性は高く保たれ、卵母細胞は発育して成熟能力を獲得した。卵母細胞の成熟能力の獲得は、 E_2 単独添加の場合より、アンドロジェンを併用した場合に促進され、この作用はアンドロジェンレセプター阻害薬によって抑制された。

複合体を E_2 と A_4 を含む培養液中で 2 週間培養して発育させた卵母細胞は、その後の体外成熟・体外受精によって精子の侵入を受けて正常に受精し、胚盤胞へと発生した。

(5) ウシ卵母細胞（直径 90~100 μm ）の卵丘細胞との結合に及ぼすステロイドホルモンの影響

卵丘細胞から透明帯を貫通して卵母細胞へと伸びる Transzonal Projection の数は 2 週間の培養の間に減少したが、 E_2 添加によって減少が抑制された。また、 A_4 にも弱いながら同様な作用があった。

(6) ウシ卵母細胞（直径約 110 μm ）の発育と減数分裂再開に及ぼすホスフォジエステラーゼ阻害薬の影響

減数分裂再開能力を一部有する直径約 110 μm のウシ卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞複合体を 5~7 日間培養した。培養液に dbcAMP を添加しても卵母細胞の減数分裂の再開は抑制されなかったが、IBMX を添加すると、卵母細胞は減数分裂を休止した状態で最終の大きさへと発育した。また、IBMX 添加培養液中で複合体は高率にドーム様構造を形成し、内部で発育した卵母細胞は、その後の成熟培養によって成熟した。

(7) ウシおよびブタ顆粒膜細胞の遺伝子発現に及ぼす PVP の影響

高濃度の PVP が作り出す高分子クラウド

イング様の状態において、卵母細胞-顆粒膜細胞複合体と培養基質（セルカルチャーインサート）との接着の強さは、ウシで強くブタで弱いことが分かった。

ウシおよびマウスの卵母細胞を体外発育培養し、ドーム様構造を形成した顆粒膜細胞層を採取してマイクロアレイ解析に供した。すべての解析に共通して発現の変動が認められた遺伝子は少数であったが、遺伝子オントロジー解析の結果、細胞外マトリックスや細胞分化に関わる遺伝子の発現に高分子化合物である PVP の添加が影響を及ぼしていた。この結果は、PVP によって誘起される組織形態の変化を裏付けるものであった。

2% PVP を添加した培養液中で培養したブタ顆粒膜細胞においても、無添加の場合よりも細胞外マトリックスに関連する遺伝子の発現が低下しており、マウスおよびウシで得られた結果と同様であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Makita M, Ueda M, Miyano T. The fertilization ability and developmental competence of bovine oocytes grown *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development*, 査読有, 62 (4), 2016, 掲載予定

DOI: 10.1262/jrd.2016-001

Makita M, Miyano T. Androgens promote the acquisition of maturation competence in bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, 査読有, 61 (3), 2015, 211–217.

DOI: 10.1262/jrd.2014-161.

Kubo N, Cayo-Colca IS, Miyano T. Effect of estradiol-17 β during *in vitro* growth culture on the growth, maturation, cumulus expansion and development of porcine oocytes from early antral follicles. *Animal Science Journal*, 査読有, 86 (3), 2015, 251–259.

DOI: 10.1111/asj.12283

Hirao Y, Miyano T. *In vitro* oocyte development in large animals. *Journal of Mammalian Ova Research*, 査読有, 31 (3), 2014, 79–85.

DOI: 10.1274/jmor.31.79

Makita M, Miyano T. Steroid hormones promote bovine oocyte growth and connection with granulosa cells. *Theriogenology*, 査読有, 82 (4), 2014, 605–612.

DOI: 10.1016/j.theriogenology.

Hirao Y, Somfai T, Naruse K. *In vitro* growth and maturation of vitrified-

warmed bovine oocytes collected from early antral follicles. *Journal of Reproduction and Development*, 査読有, 60 (1), 2014, 68–72.

DOI: 10.1262/jrd.2013-089

Hirao Y, Naruse K, Kaneda M, Somfai T, Iga K, Shimizu M, Akagi S, Cao F, Kono T, Nagai T, Takenouchi N. Production of fertile offspring from oocytes grown *in vitro* by nuclear transfer in cattle. *Biology of Reproduction*, 査読有, 89 (3), 2013, 57.

DOI: 10.1095/biolreprod.113.109439.

〔学会発表〕(計 13 件)

Makita M, Ueda M, Miyano T. *In vitro* fertilization of bovine oocytes grown *in vitro*, The 12th Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society, 2015.11.26–29, Hanoi (ベトナム)

牧田美穂, 竹本隆太郎, 宮野 隆. ブタ卵母細胞の体外発育および卵丘細胞の増殖性に及ぼす FSH の影響, 第 108 回日本繁殖生物学会大会, 2015.9.17–20, 宮崎大学 (宮崎県)

牧田美穂, 宮野 隆. ウシ卵母細胞 - 体細胞間の結合に及ぼすステロイドホルモンの影響, 神戸大学研究基盤センター若手フロンティア研究会 2014, 2014.12.25, 神戸大学 (兵庫県)

Hirao Y, Somfai T, Akagi S, Haraguchi S, Watanabe S. A high concentration of polyvinylpyrrolidone in culture medium affects the density of transzonal projections in bovine oocyte-granulosa cell complexes after growth *in vitro*, World Congress on Reproductive Biology 2014, 2014.9.2–4, Edinburgh (イギリス)

Makita M, Miyano T. Combinations of 17 β -estradiol and androgen support bovine oocyte growth *in vitro* by maintaining physical connections with granulosa cells, World Congress of Reproductive Biology 2014, 2014.9.2–4, Edinburgh (イギリス)

牧田美穂, 宮野 隆. ウシ卵母細胞の体外発育におけるアンドロジェンの役割, 第 107 回日本繁殖生物学会大会, 2014.8.21–24, 帯広畜産大学 (北海道)

松原佑里子, 牧田美穂, 宮野 隆. ウシ初期胞状卵母細胞由来卵母細胞の体外発育に及ぼすイソブチルメチルキサンチン (IBMX) の影響, 第 107 回日本繁殖生物学会大会, 2014.8.21–24, 帯広畜産大学 (北海道)

Hirao Y. *In vitro* growing immature porcine oocytes, International Symposium on Cutting-Edge Reproductive

Technologies and Perspectives for their Usage in Swine, 2014.6.2-7, Tainan (台湾)

久保直子, Ilse Silvia Cayo-Colca, 宮野隆. プタ卵母細胞の体外発育培養液へのエストラジオール17 の添加が体外成熟, 卵丘膨潤化および胚発生に及ぼす影響, 第106回日本繁殖生物学会大会, 2013.9.12-14, 東京農工大学(東京都)

牧田美穂, 宮野隆. 体外培養したウシ卵母細胞 - 顆粒膜細胞複合体の Transzonal Projection に及ぼすエストラジオール17 およびアンドロステンジオンの影響, 第106回日本繁殖生物学会大会, 2013.9.12-14, 東京農工大学(東京都)

竹本隆太郎, 牧田美穂, 宮野隆. プタ初期胞状卵胞内卵母細胞の体外発育および成熟に及ぼすFSHの影響, 関西畜産学会第63回大会, 2013.9.5-6, 滋賀県立大学(滋賀県)

Hirao Y, Cao, F, Somfai T, Akagi S, Nagai T. Comparison of transcript profiles of bovine oocytes grown *in vivo* and matured *in vitro* with oocytes grown *in vitro* and matured *in vitro*, 46th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction, 2013.7.22-26, Montreal (Canada)

Hirao Y. *In vitro* growth and maturation of mouse and cattle oocytes, 2013 Biomodulation Symposium 'From Germplasm to Cloning', 2013.6.5, Seoul National University (韓国)

[図書](計2件)

宮野隆, 平尾雄二, 朝倉書店(東京), 卵子のIVGMFC, 「哺乳動物の発生工学」佐藤英明・河野友宏・内藤邦彦・小倉淳郎編著, 2014, 200(27-40)

宮野隆, interzoo(東京), 生殖細胞の起源, 「繁殖生殖学」日本繁殖生物学会編, 2013, 313(18-29)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮野 隆 (MIYANO, Takashi)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 80200195

(2) 研究分担者

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・家畜胚生産ユニット長
研究者番号: 10355349