

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14877

研究課題名(和文) 長期維持型卵胞形成の増強による雌性生殖寿命の延長

研究課題名(英文) Studies on the enhancement of reserved-type follicle formation for extension of the female reproductive lifespan

研究代表者

杉本 実紀 (Sugimoto, Miki)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：20243074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、雌性生殖寿命の延長を目的として、卵巣内で長期維持される卵胞の形成を顆粒層前駆細胞の追加ならびに成長因子等により増強する方法を検討した。顆粒層前駆細胞の追加による方法としては、細胞の分離法および卵巣への追加方法を検討し、細胞表面マーカーを指標として分離した細胞を卵巣に追加すると、卵巣内の卵胞様構造への寄与が生じることを観察した。また、卵胞形成増強因子については R-spondin-1 の器官培養系への添加およびマウス新生仔への投与による検討を行い、部分的ではあるが、卵胞形成期～原始卵胞が増加あるいは発育開始期の卵胞が減少する傾向が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果により、顆粒層前駆細胞に対する操作を介して卵巣内での卵胞形成に影響を与えられる可能性が示された。現時点で得られた処理効果は顕著ではないが、個体成熟後の卵子の供給源となりうる長期維持型卵胞の形成増強法の候補を得ることができた。これらを元に効果の高い処理方法を開発し、加齢に伴う卵子の枯渇の延期が可能になれば、家畜の繁殖寿命の延長による生産効率の上昇や、ヒトの加齢性不妊の抑制等により少子化対策にも貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed the development of a method enhancing formation of reserved-type ovarian follicles for extension of the female reproductive lifespan. Two approaches, addition of pre-granulosa cells and application of potentiation factors, were employed. In experiments on the addition of pre-granulosa cells, condition of cell fractionation and its supplementation to ovarian tissue were examined, and contribution of cells fractioned by cell surface marker to follicular structure in ovaries were observed. Besides, effects of R-spondin-1 as a potentiator for follicles formation were examined in vivo and in vitro. In treated ovaries, there were tendencies of an increase in follicles up to primordial stages or a decrease in activating follicles, although the effect was limited.

研究分野：動物解剖生理学

キーワード：哺乳類 卵巣 卵胞 雌 生殖 生殖寿命

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の雌の生殖寿命終了の原因の一つは卵母細胞の枯渇である。これは雌性哺乳類では基本的に生殖細胞が個体発育の早期に体細胞分裂を行わない卵母細胞となり、その後は増殖しないことによる。生殖寿命を延長する方法としては、卵子、卵母細胞および卵巣組織の保存が実用化しつつある。しかし、これらの方法だけでは若齢期の卵巣機能の先送りは可能となっても生涯を通じた機能向上は難しい。

卵母細胞枯渇までの期間は、基本的には卵母細胞数の初期値と減少速度が決定すると考えられる。卵母細胞の減少は、排卵の他に、排卵に至らずに死滅（退行変性）することによるものがあり、個体が性成熟期に達して排卵の開始する前にも顕著な減少が生じている。この未成熟期の減少を抑制することで、性成熟後に機能し得る卵母細胞が増加することが期待される。未成熟期の卵母細胞の減少は卵胞形成～発育開始前の細胞死、無排卵性発育の開始等によるが、本研究では発育開始の制御に着目した。

卵母細胞は胎生期から出生期に顆粒層細胞と複合して原始卵胞を形成するが、これらには未成熟期に発育を開始するもの（以下、早期発育型と記述）と、性成熟後まで休眠・維持されるもの（以下、長期維持型と記述）があることが知られている。この差異は顆粒層細胞の由来と関連し、マウスで長期維持型卵胞の顆粒層前駆細胞として出生期の卵巣の表層細胞（Mork L et al, Biol Reprod. 2012;86:37 他）および胎仔卵巣中の幹細胞マーカーLgr5 発現細胞（Rastetter RH et al, Dev Biol. 2014;394:242-52）が報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、雌性哺乳類の生殖寿命の延長を目的として、上記の顆粒層前駆細胞の補強により、長期維持型原始卵胞の形成を増強する方法について検討した。具体的には長期維持型卵胞の形成能を持つ顆粒層細胞前駆細胞を追加した卵巣の作製および長期維持型卵胞を増加させる顆粒層前駆細胞の増殖・機能制御因子の同定を試みた。

3. 研究の方法

1) 細胞標識法の検討および卵巣表層細胞の動態の解析

長期維持型卵胞の顆粒層前駆細胞として報告されている出生期卵巣の卵巣表層細胞の動態について、蛍光色素による標識、器官培養、および組織学的検討を行った。マウス新生仔から卵巣を採取し、生細胞用の蛍光標識試薬である PKH26（Sigma-Aldrich）または CM-DiI（Vybrant CM-DiI cell-labeling solution, Invitrogen）で表層細胞を標識した後、器官培養した。培養後、固定、パラフィン包埋、薄切し、脱パラフィン処理前の状態で、蛍光顕微鏡下で標識の分布を検討した。

2) 顆粒層前駆細胞の分離および卵巣への追加

卵巣表層細胞および細胞表面マーカーを指標として分離した細胞の採取および卵巣への追加方法と追加した細胞の動態について検討した。

卵巣表層細胞の採取については、マウス新生仔卵巣の酵素処理による分離を検討した。卵巣を採取し、CM-DiI で表層細胞を標識後、酵素処理を行った。処理後の卵巣および分散された細胞を固定後、蛍光顕微鏡で観察し、処理の効果を検討した。

細胞表面マーカーを指標とした細胞の分離については、胎仔～新生仔マウス卵巣細胞を酵素処理により分散後、抗 Lgr5 抗体結合ビーズと反応させ、ビーズに結合した細胞を分離、回収した。また、この過程で CM-DiI による細胞の蛍光標識を行った。分離・標識した細胞を卵巣に追加する方法としては、分散処理のみを行った卵巣と混合・凝集させる凝集法および卵巣の表面に付着させる付加法を検討した。それぞれ、器官培養後、固定、パラフィン包埋、薄切し、核染色または蛍光抗体法による卵母細胞の免疫染色（抗 DDX4/MVH 抗体）および核染色（DAPI）を施し、蛍光顕微鏡下で組織形態および標識の分布を観察した。

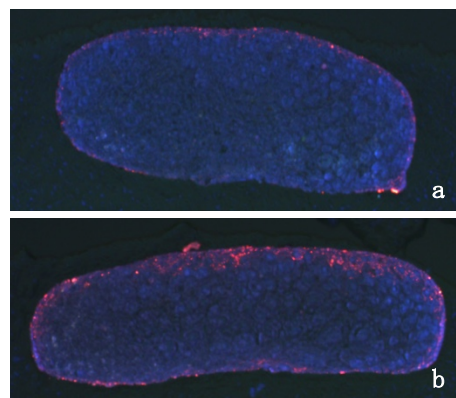


図1 CM-DiIにより表層細胞を標識後、器官培養したマウス新生仔卵巣における標識の分布（赤色）、青色は組織由来の自家蛍光
a:1日培養後、b:3日培養後

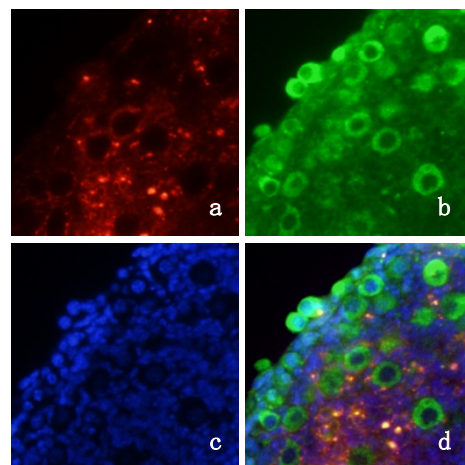


図2 抗 Lgr5 抗体標識ビーズを使用して分離・回収した細胞を凝集法により追加した再構成卵巣（4日間培養）
a: 分離・追加細胞（CM-DiI 標識）、b: 卵母細胞（抗 DDX4/MVH 抗体による免疫染色）、c: 核（DAPI 染色）、d: a-c の合成画像、信号強度は調整されている

3) 顆粒層前駆細胞増殖・機能制御因子の検討

長期維持型卵胞を増加させる顆粒層前駆細胞の増殖・機能制御因子の候補として、Lgr5 のリガンドである R-Spondin 1 の卵胞形成・発育に対する影響を器官培養およびマウス個体への投与により検討した。

器官培養ではマウス胎仔および新生仔から卵巣を採取してマウス R-Spondin 1 組換え体タンパク質を添加した培養液または無添加の培養液 (DMEM/HamF12 に lipid-rich bovine serum albumin, L-alanine-L-glutamine, ITS-X、アスコルビン酸誘導体、抗生物質を添加) で 3~6 日間、培養液液面に保持したメンブレンフィルター上において培養した。培養後の卵巣を固定、パラフィン包埋、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色または卵母細胞に対する免疫染色を施して、各卵胞の発育段階および損傷を組織学的に判定し (発育段階は顆粒層細胞の形態、層数を基準とした)、卵胞数を計測した。

投与による検討では、マウス新生仔に R-Spondin 1 溶液または対照としてリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を投与し、母体に保育させた後、卵巣を採取し、同様にパラフィン切片を作製して、卵母細胞に局在する DDX4/MVH に対する抗体および卵胞/卵母細胞の発育開始前後で細胞内局在が変化することが報告されている FOXO3a に対する抗体を使用して二重染色を行い、卵胞形成・発育について解析した。

各実験において、顕微鏡画像の解析には ImageJ (Rasband WS, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018) および MosaicJ Plugin (Thevenaz P, Unser M. Microsc Res Tech. 2007;70:135-46)、Stitching Plugin (Preibisch S et al., Bioinformatics. 2009;25:1463-5)、Cell counter Plugin を使用した。統計解析には R (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) の graphical user interface である EZR (自治医科大学附属さいたま医療センター、埼玉) を使用した。R-Spondin 1 投与実験の生後 21 日卵巣は標本数不足により解析を行わなかった。

4. 研究成果

1) 細胞標識法の検討および卵巣表層細胞の動態の解析

当初予定していた PKH26 ではパラフィン切片上で標識による蛍光が観察されず、組織学的手法による解析ができなかったが、CM-DiI に変更することで検出できるようになった。PKH26 標識で検出ができなかった理由としては、この色素の尾部が細胞膜に侵入することで色素が保持される様式であることから、パラフィン包埋過程での脂溶性溶剤処理により、色素が抽出された可能性が考えられる。

CM-DiI 標識後に培養した卵巣では、2 日間培養以降で卵巣内の表面近傍に蛍光標識が観察され (図 1)、表層細胞の卵巣内部への移動および卵胞形成への寄与が示唆された。この経時的変化は、別の標識法を用いた既報にあるものと類似していた。以上の結果から、次の実験では CM-DiI による標識を用いることにした。

2) 顆粒層前駆細胞の分離および卵巣への追加

卵巣表層細胞の分離では、酵素処理方法を変化させて検討したが、回収量と純度が共に高い条件

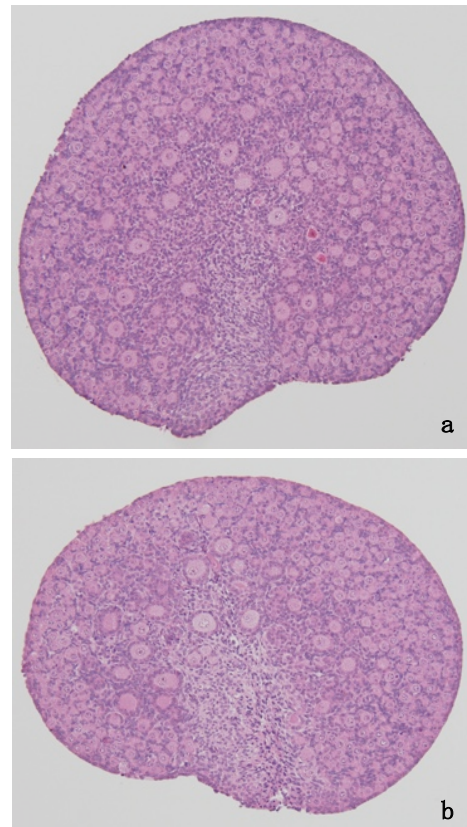


図 3 R-Spondin 1 添加または無添加で 3 日間器官培養したマウス新生仔卵巣の組織像 (ヘマトキシリン・エオジン染色)

a: 無添加、b: R-spondin 1 添加

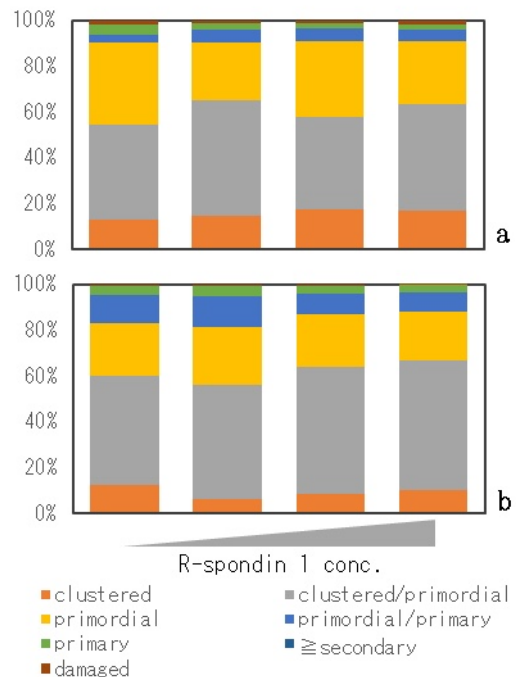


図 4 R-Spondin 1 添加または無添加で器官培養したマウス卵巣での各発育段階の卵胞の割合 (連続切片 1/10 または 1/5 計測、clustered は卵胞未形成、clustered/primordial、primordial は発育開始前、primordial/primary、primary、 \geq secondary は発育開始) a: 新生仔 (PND1) 卵巣 3 日間培養、b: 胎仔 (16.5dpc) 卵巣 6 日間培養

が決定できなかった。

抗 Lgr5 抗体結合ビーズによる分離については、回収した細胞を追加して培養した卵巣組織において蛍光標識された細胞が観察され、一部が卵胞様構造の顆粒層細胞にあたる位置に見られた (図 2) ことから、分離・回収された細胞が卵胞形成に寄与する可能性が示された。しかし、分画した細胞の純度を検討するため同様の手順により分画した細胞および非分画細胞を免疫染色して観察したが、いずれも反応が弱く Lgr5 陽性細胞が分画されたという明確な結果が得られなかったことと、器官培養後に観察された蛍光が標識細胞の変性後の二次的取り込みの混入である可能性が排除できないことから、再検討が必要である。

3) 顆粒層前駆細胞増殖・機能制御因子の検討

器官培養による R-Spondin 1 の作用の検討において、新生仔卵巣では明らかな効果が認められなかったが (図 3 および 4a)、胎仔期卵巣への添加培養では、一部の条件で卵胞形成期～原始卵胞の頻度が上昇する傾向が認められた (図 4a)。これは原始卵胞形成の促進の可能性を示唆すると考えられる。

マウス新生仔への投与では、明瞭な差は見られないものの、生後 14 日の卵巣 (図 5) で发育開始期の卵胞である一次卵胞が対照の PBS 投与個体に対して R-Spondin 1 投与個体で減少する傾向が見られたが、標本数が少ないことなどから再検討が必要と考えられる (図 6)。また、发育開始卵胞をより正確に判定する目的で、卵胞の发育段階の判定基準として顆粒層細胞の形態に加えて卵母細胞の FOXO3a の局在を追加したが、両基準による判定が一致しない卵胞も観察された。これらの卵胞の状態については再検討が必要と考えられる。

本研究の結果から、現時点で得られた効果は不十分ではあるが、顆粒層前駆細胞に対する操作を介して卵巣内での卵胞形成に影響を与えられる可能性が示された。

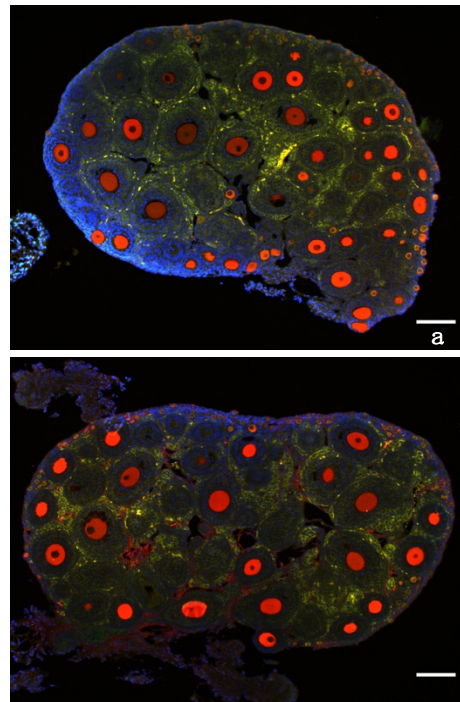


図 5 新生仔期に R-Spondin 1 または PBS を投与したマウス卵巣 (生後 14 日)、赤色は卵母細胞、青色は核、緑色は FOXO3a (发育開始前の卵胞の卵母細胞では卵核胞内に観察されるが、发育した卵母細胞では細胞質に局在)、bars=100 μm
a: PBS 投与、b: R-Spondin 1 投与

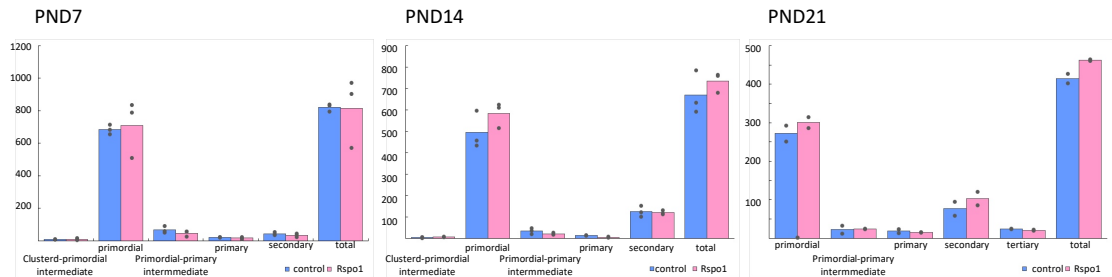


図 6 新生仔期に R-Spondin 1 または PBS を投与したマウス卵巣における卵胞数 (連続切片 1/10 計測)、左から生後 7、14、および 21 日、点は各個体の値、棒は平均値を示す
■: PBS 投与、■: R-Spondin 1 投与

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究分担者
なし

(2) 研究協力者
研究協力者氏名：池田 俊太郎
ローマ字氏名：(IKEDA, Shuntaro)

研究協力者氏名：久米 新一
ローマ字氏名：(KUME, Shinichi)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。