

平成 22 年 4 月 15 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2007~2009

課題番号： 19580331

研究課題名 (和文) 成熟卵子を生産可能なウサギ未成熟卵胞培養系の検討

研究課題名 (英文) Trials of production system of rabbit full mature oocytes derived from immature follicles cultured in vitro

研究代表者

細井美彦 (HOSOI YOSHIHIKO)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号： 70192739

研究成果の概要 (和文)：

卵巣内には多数の未成熟卵胞が存在する。しかし年齢、ホルモン環境、栄養状態など個体の状況によって発育ステージが進むにつれて選抜され、成熟するものは限られている。もし、卵巣内に存在する未成熟な卵胞を直接利用できれば、効率よく次世代を生産することが出来ると考えられる。しかし未成熟な卵胞内の卵子は、正常な受精が起きる準備が出来ておらず、体外で適切に培養して、発生能を付与する必要がある。本研究では、ウサギ未成熟卵胞を培養して、正常な成熟卵子が生産できるシステムを研究した。

研究成果の概要 (英文)：

There are a lot of immature follicles in the ovary. However, advances of a follicular development depend on the age, hormonal status and nourishment state of individuals. Therefore a number of full mature follicles is usually limited without superovulation. It is thought that we can produce the next generations efficiently if immature follicles in the ovary can be available.

As for the rabbit oocyte in an immature follicle, it is not ready to be fertilized normally. It should be matured in appropriate culture systems to acquire an ability of the normal fertilization and development. In this proposal, we tried to develop a system which make it possible to produce full mature rabbit oocytes in vitro.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野： 農学

科研費の分科・細目： 畜産学・獣医学、応用動物科学

キーワード： 未成熟卵胞、体外培養、グルタチオン、抗酸化作用、体外成熟卵子

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の卵巣には原始期を中心とした様々な発育期の卵胞が多数存在しているにも関わらず、これらの卵胞の多くは卵巣中で消失し、成熟する能力がある卵子を作る卵胞はごく限られている。本研究の課題は逆行する運命にある卵胞卵子を体外に取り出し、適切な培養環境を与えて、十分に発育させて、発生能力を卵子に賦与することである。

従来、卵子の体外発育に関する研究はマウス卵子を用いて行われてきている。マウスの前胞状卵胞の発育中期から発育末期までの卵胞卵子の発育を可能とする典型的な3種類の培養系が報告されている。1つ目は前胞状卵胞あるいは前胞状卵胞から得られた卵胞卵子顆粒膜細胞複合体(OGCs)を卵胞から取り出し、微孔性の挿入膜のような平坦な底の上、あるいは培養ディッシュ上で培養する方法である。2つ目は培養ディッシュの上で卵胞の三次元構造を維持する方法であり、3番目の方法は3次元の基質内に卵胞を埋め込み、卵胞の立体的構造を維持しながら、培養する方法である。1番目の方法は卵胞の内容物が培養液にさらされているという点で他の方法と異なっている。我々もウサギ初期卵胞を用いて、同様の方法で、卵胞の体外発育系を継続的に研究しており(日本受精着床学会大会2003, 2004, 2005)、未熟卵胞を体外発育させ、卵胞内の卵子の分裂再開能力の獲得にも成功している。2004年、平尾らはウシ未発育卵子を培養する場合に、卵子が栄養分や酸素への直接接触が可能であり、卵子を取り巻く微小な環境をより容易に操作できる培養系を構築した。この培養系では効率的に卵子が発育し、ウシ産子作出効率が劇的に改善されることを報告した。我々の培養系では、この系を参考にしてウサギ未発育卵胞卵子を体外で発育させて成熟卵子を回収することに成功した。この培養系の特徴は、培養液へ高分子化合物を添加していることであり、その結果、顆粒膜細胞の培養ディッシュ底への接着性、卵子への接着性、そしてお互いの接着性が変化していると考えられる。また、高分子を培養液に添加することにより、培養液中のオートクライン、パラクライン因子の拡散移動が大きく変化していると推定される。卵子ならびに顆粒膜細胞の両方が正常な卵子の発育に必要なパラクライン因子を分泌しており、オートクライン、パラクライン因

子は通常、高分子化合物であると推定されており、その流動性は体内では細胞外マトリックス中のプロテオグリカンのような他の高分子化合物との相互作用に影響されると考えられる。それ故、高分子物質を豊富に加えたパラクライン因子の流動性を低下させ、その結果、これらの因子が細胞表面のレセプターに出会う頻度が増えて、卵子の発育が促されたと考えられている。現在、この系においても、得られる卵子の受精後の発生能力は排卵卵子や成熟卵胞から得られた卵子を体外成熟した体外成熟卵子に比べて低く、卵胞発育時に卵細胞質等の劣化がすることは否めない。

以前、我々はウサギ卵巣還流法によって、卵子が排卵直前の減数分裂時の成熟環境が受精後の卵子の発育能力に影響することを証明した(Ovarian perfusion systemを用いたステロイドホルモンの影響他: Y. Yoshimura, E. E. Wallach., らとの共著による論文など)。しかし、この卵胞の体外発育系については、現時点では環境を決定している個々の因子の卵子への影響が不明であり、ウサギ卵胞培養系の改良による卵胞内卵子の発育能力を改良することも困難であることも判明している。

2. 研究の目的

体外培養の環境要因を評価するために、ウサギの未発育卵胞卵子の体外発育能力を指標として、ウサギ卵胞培養の酸化環境因子がミトコンドリアに与える影響を検討する。まず着目したのは、体内環境から取り出された組織は、酸素ラジカルの影響を受け致命的な影響を受けることが多いので、直接的に遺伝子発現を検討することである。そこで本実験で扱う卵胞は、切り離された時点からラジカルの影響を受け始めており、その影響は卵子にも及ぶ可能性は高い。また、卵子の成長、発育と老化は、細胞質内のミトコンドリアと緊密に関連しているという報告は多く、ラジカルも影響する可能性は高い。そこで本実験では、卵胞の体外培養におけるミトコンドリアの発達と酸素ラジカルの関連たんぱく質との相関を検討し、それらが卵胞発育に関連する遺伝子の発現プロファイルに与える影響を調べるとともに、抗ラジカル因子(スカベンジャー等)の培養液への添加が及ぼす影響を調べることを目標とした。

3. 研究の方法

多くの動物種では、未熟卵胞（直径の小さな卵胞）を体外で培養し、安定してMII卵子を得る系は確立されていない。ここでは、この原因として *in vivo* にくらべ、*in vitro* では過度の酸化状態に暴露される機会が多い事が一因であると設定し、仮定の検証とその解決を図ることとした。まず、① 最初の実験で、IVM 卵子、IVG 卵子をサンプルに酸化還元物質と、その影響が活性状態に顕著に現れるミトコンドリアの機能を観察し、*in vivo* 卵子と比較することで、培養系の改良に有用な情報を得ることとした。② growth システムを用いた場合、卵母細胞にはどの程度の酸化ストレスが蓄積するのかを検討する。各区間で卵母細胞、顆粒層細胞をサンプリングする。尚、コントロールには同種のメスウサギから回収したGV、MII 卵子及び卵丘細胞を使用する。実験1,2ともにRT-PCR、Western blot、免疫染色を行い、抗酸化物質、酸化還元酵素、ミトコンドリア機能を分子生物学的手法を用いて観察する。ターゲット遺伝子 Tfam; ミトコンドリアの複製活性を評価する。Cytochrome C; ミトコンドリア膜機能を評価する。Cytochrome B; ミトコンドリアの量を定量する。Real time PCR を行い、細かい差を信用度の高いものにする。ターゲットタンパク質グルタチオン; 抗酸化物質 Cytochrome C; ミトコンドリア膜機能を評価する。細胞質内でのミトコンドリアの局在、広がりを観察する。グルタチオンレダクターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ; 過酸化状態に対する還元能力を視覚的に評価する。MnSOD; 還元状態を評価する指標。アクチン; 細胞骨格を視覚化する。以上で、データが集積された後に、これを改善すると推測される物質の各段階の培養液への添加で、卵の成熟と受精後の発育を観察し、実用化に適したシステム開発研究を行った。

4. 研究成果

①ウサギ卵胞の体外培養法について、スポット培養法とハンギングドロップ培養法を比較したところ、スポット培養法では、卵細胞質の直径が成熟卵子サイズまで増加したが、透明帯が薄いことが判った。またハンギングドロップ法では、細胞質の直径が十分に増加しないことも示された。そこでこのスポット法で培養された卵子の生理学的特性を調べるために、卵胞の発育因子のうち特異性の少ないEGFについて検討した。

体外培養に用いるウサギ卵巣内の前胞状卵胞では、上皮性成長因子(EGF)レセプターの発現を確認できなかったが、排卵前のグループ卵胞では、卵母細胞、卵丘細胞、顆粒膜細胞でレセプターが確認できた。このことから、EGFレセプターは、未成熟卵胞が体外

培養の指標として利用できる可能性が示唆された。また、未成熟(GV)期卵子の体外成熟において、EGFの添加の有効性が議論されるところではあるが、本実験では、ウサギ体外成熟系において、体外成熟培養液に10~100ngEGFの添加が、受精後の発生率を向上させることを示した。この事実は成熟卵胞から回収された卵子にEGFレセプターが発現していることから、そのEGFの有効性について強く示唆することができる。また、エストロゲンも相乗作用があることが示された。しかし、この作用機序は推定することができなかった。

②次段階の実験では、これまでおこなってきた培養方法の予備実験をおこない手法を改良したことで、排卵時に得られる受精可能な第二減数分裂中期(MII)の率が、体外発育-体外成熟培養後に今までの2倍以上と高率に得られるようになってきている。しかし、得られたMII期卵子の発生能は未だ低率である。この原因として、本実験で用いている培養系は無血清培地であり、さらに、体内で発育途中である前胞状卵胞(卵胞腔形成前)から卵子を取り出し体外発育培養をおこなっているため、体内環境の模倣が難しく、現在の培養系では不十分である事が考えられる。そのため、今後さらに培養系の改善が必要である。

しかし、前胞状卵胞よりも体内でやや発育が進んだ胞状卵胞内の卵子(自発的な減数分裂再開能は有しているがその率が非常に低率である)をこの改良した手法を用い、血清培地を用いた場合では、体外発育-体外成熟-顕微授精後に胚盤胞期胚を得ることに成功した。血清は多くの卵胞実験系で用いられているが、当研究室で過去に用いた場合、卵子が発育するために必要である、卵子-顆粒膜細胞複合体の立体構造を崩し、立体構造を維持したもので低い成熟率しか得られないという結果であった。そのため、今回の培養系の改良により血清の効果を得られたことも考えられた。

③これまでの成果では、ウサギ卵胞の体外培養には、3次元構造の重要性やミトコンドリア能力の活性化が必要な事などを示唆してきた。本年は、マグロコラーゲン等による高い体外培養成績を得る事が出来た事を報告した。また、低血清培地による3次元培養でも高い卵胞の発育率を得る事が出来る事も報告した。しかし、効率的かつ安全な絶滅危惧ウサギの再生手段の開発など実用化には、ウシやヒトに比べても低い体外成熟後の発生能力の改善が必要であることも判明した。この改善には、これまでEGF等の成長因子の検討も加えたが、抗酸化物質であるシステアミンの体外培養液への添加がウサギの卵子成熟には大きく有効である事が判明した。以上、低酸素下のミトコンドリアの能力

検討での成果は高くなかったが、安定した発生立を得られるウサギ卵母細胞培養システムができ、発生能力の検討が容易になった。

本研究の展開によって、配偶子へのエピジェネティカルな変化が環境によって影響されるという事実が証明できる。また卵子が卵胞の閉鎖によって斃死するメカニズムや老化や薬剤によって起こる異常卵子の出現機構の解明を初め、多くの卵子の病態に関する知見が体外培養系で証明されることになる。また成果には、老化やホルモン異常による配偶子生産が不可能になった個体の卵胞を体外培養系に持ち込むことによって克服し、新たな個体を作出すると言う絶滅危惧種の遺伝子を残す役割を果たすことになるだろう。本法の実用化により、1 個体から利用できる雌性生殖細胞（卵子）数を増加させるだけでなく、ホルモン剤の投与が不要となることから、経済的、時間的な負担が無くなる。また、その副作用による卵子の供給個体への悪影響からも逃れることも出来る。その結果、効率的かつ安全な絶滅危惧動物の再生手段となることが期待される。本研究の成果は、「不妊治療の経済的負担の軽減を図る」という目的に用いられる治療法の基礎的知見としても生殖医療にも重要な役割を果たすことが期待される。この様に体外培養法さえ確立すれば、卵巣内の卵胞は配偶子形成の研究に向けた試料として、また動物生産のための配偶子プールとして、さらに不妊治療の革新的方法としても利用できる。その体外発育系の確立とメカニズムの解明は重要なテーマとなる事が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

- ① ウサギ未成熟卵母細胞の対外培養法の検討 杉本浩伸、宮元有希、辻陽子、森本康一、谷口武、森本義晴、細井美彦、*J. Mammalian Ova. Res.* 26(4), 221-226 (2009, 10, 1) 査読あり
- ② 卵巣由来細胞の卵子形成能 細井美彦、福永直人、竹原俊幸、寺村岳士 産科と婦人科 Vol.76 No10 , 1245-1249 (2009, 10, 01) 査読無し
- ③ クローンと生殖医療 生殖医療のトライアル 細井美彦、矢持隆之、岸上哲士: *Hormone Frontier in Gynecology* Vol.16 No. 3, 191-196 (2009, 9, 1) 査読無し
- ④ カニクイザルES細胞の研究展開 細井美彦 (近畿大 生物理工), 寺村岳士, 小野寺勇太: *Labio* 21 No. 33, 20-26 (2008. 07. 01) 査読あり
- ⑤ Mitochondrial dysfunction of in vitro grown rabbit oocytes results in preimplantation embryo arrest after activation. Kanaya H, Hashimoto S, Teramura T, Morimoto Y,

Matsumoto K, Saeki K, Iritani A, Hosoi Y. *J Reprod Dev.* 2007 Jun;53(3): 631-7. 査読あり

- ⑥ ウサギ発育途上卵母細胞の体外培養条件の検討、金谷裕之、是兼真子、細井美彦、松本和也、佐伯和弘、入谷明、橋本周、森本義晴: *日本胚移植学雑誌* Vol. 29, No. 2, 70-75 (2007. 05. 29) 査読あり

[学会発表] (計4件)

- ① 杉本信洋、細井美彦 他 FBS添加によるウサギ発育途上卵母細胞の体外発育培養後の影響 第135回日本生殖医学会関西支部集談会 2010年3月13日 京都大学農学部 (京都市)
- ② 宮本有希、細井美彦 他 ウサギ体外成熟培養系へのシステアミン添加の影響 第27回日本受精着床学会 2009年8月6日 国立京都国際会館 (京都市)
- ③ Y.Miyamoto, Y.Hosoi et al., A study of culture system in in vitro growth from rabbit secondary follicles. 5th Annual Meeting of Asia Reproductive Biotechnology Society 2008年11月27~12月1日中国雲南省昆明
- ④ 宮本有希 細井美彦 他 ウサギ未成熟卵胞の体外培養系の検討 第3回日本生殖再生医学会 平成20年3月30日 東京

[図書] (計1件)

「組織幹細胞とES細胞・iPS細胞」寺村岳士、細井美彦。幹細胞の分化誘導と応用～ES細胞・iPS細胞・体性幹細胞研究最前線～、第5編第1章、NTS出版。「著書 (依頼原稿)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細井美彦 (HOSOI YOSHIHIKO)
近畿大学・生物理工学部・教授
研究者番号: 70192739

(2) 研究分担者

佐伯和弘 (SAEKI KAZUHIRO)
近畿大学・生物理工学部・教授
研究者番号: 10298937
松本和也 (MATSUMOTO KAZUYA)
近畿大学・生物理工学部・教授
研究者番号: 20298938