

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20629

研究課題名（和文）胎生期における卵母細胞の選択機構の解明

研究課題名（英文）Uncovering the mechanisms of oocyte selection in fetal development

研究代表者

内藤 優希（NAITOU, Yuki）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員（常勤）

研究者番号：20962723

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：哺乳類の卵細胞系列の発生過程では、胎生期の特定の時期に全体の約2/3の卵母細胞が細胞死により失われる。なぜ卵母細胞の大規模な細胞死が誘導されるのか？本研究は卵母細胞の生死の運命決定機構を明らかにし、その生理学的意義に迫る。本研究では、多能性幹細胞を起点とした体外誘導系を用いて、卵母細胞の細胞死が生じる一連の現象をライブイメージングにより観察する系を確立し、細胞死と、細胞内小器官の動態の関連を観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、卵子の発生過程において、どのような機構でその生死が選択されるのかを解明することを目的としている。卵子におけるダイナミックな細胞内小器官（細胞内で特定の機能を持つ構造体）の動態を追跡することで、卵子の運命決定機構の解明を目指した。本研究は、どのようにして細胞の運命が決まるのかという細胞生物学的な問いに答えるだけでなく、卵子の質をどのように維持しているのかという社会的に重要な問いに答えることにもつながる。

研究成果の概要（英文）：During the development of the mammalian oocytes, approximately two-thirds of all oocytes are lost through cell death at certain times during fetal development. Why is large-scale cell death of oocytes induced? This study aims to elucidate the mechanisms that determine the fate of life and death and to explore the physiological significance of this process. Using an in vitro induction system of female germ cells from pluripotent stem cells, we established a live-cell imaging system to observe the sequence of events leading to oocyte cell death, and observed the relationship between cell death and the dynamics of intracellular organelles.

研究分野：発生生物学

キーワード：生殖細胞 イメージング

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の卵細胞系列の発生過程では、胎生期の特定の時期に全体の約 2/3 の卵母細胞が細胞死により失われる。この時期の卵母細胞は、細胞同士が連結した「卵母細胞シスト」と呼ばれる合胞体が形成され、一定期間を経たのちに連結が崩壊することによって、卵母細胞の生死の運命決定が行われる。生き残った卵母細胞は、その後原始卵胞を形成して維持されることで、個体の生殖機能の維持に寄与する。卵母細胞シスト内で、細胞の生死がどのように運命決定されているのかを理解することは、哺乳類の雌性生殖細胞が、長期にわたる生殖機能の維持をどのようにして制御しているのか、という重要な問いにつながる。これまでの研究で、卵母細胞シスト内で、オルガネラが集積した卵母細胞が観察されていたが、オルガネラの輸送と卵母細胞の生死との因果関係は直接証明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、卵母細胞の体外誘導系を用いて、卵母細胞シストの形成から崩壊までの一連の現象をライブイメージングにより観察する系を確立することを目的としている。生体内では、経時的な卵母細胞シストの観察は困難であることから、本研究では多能性幹細胞を起点とした卵母細胞の体外誘導系を用いることにした。この体外誘導系を用いれば、イメージングに必要なレポーター細胞の樹立が容易であり、また培養系をイメージングに最適化することが可能である。卵母細胞の体外誘導系では、培養用メンブレンを用いると同時に、生殖細胞と胎児期生殖巣体細胞の凝集塊を形成する必要があり、組織に厚みが生じる。この培養用メンブレンと組織の厚みという2つの問題点が生細胞での観察時に光学的アクセスの律速となる。本研究では、特に連結した卵母細胞シスト構造内におけるオルガネラ動態に着目するため、高解像度でシスト構造およびオルガネラを可視化可能なシステムの構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) オルガネラレポーター多能性幹細胞の樹立

対象とする各オルガネラ（ゴルジ体、ミトコンドリア、リソソーム）への輸送シグナルを付加した蛍光タンパク質（tdTOMATO）を用いて、オルガネラ動態を可視化可能なレポーター多能性幹細胞を樹立した。

樹立に際して、卵母細胞および卵子マーカーである Stella-ECFP レポーター多能性幹細胞に、オルガネラレポーターコンストラクトを導入することで、卵母細胞マーカーおよびオルガネラマーカーのいずれの動態も可視化可能となった。

(2) ライブイメージングシステムの構築

多能性幹細胞を起点とした卵母細胞の体外誘導系を用いて、卵母細胞シストを連続的に観察可能なライブイメージングシステムを構築した。従来の卵母細胞の体外誘導系では、誘導した生殖細胞と胎生期の生殖巣体細胞を共培養し、凝集塊を形成させたのちに、酸素供給を担保するために培養メンブレン上で培養することが必要である。厚みのある組織を観察する上では、光学的アクセスの担保が問題となるが、卵母細胞の成熟に必要な酸素供給を担保しながら組織の厚みを制御することで、卵母細胞シスト構造が大きく変化して卵母細胞の生死の運命が分かれる2日間から4日間の連続的な観察を行なった。

4. 研究成果

(1) オルガネラレポーター多能性幹細胞の樹立

卵母細胞および卵子マーカーである Stella-ECFP レポーター多能性幹細胞に、各オルガネラへの輸送シグナルを付加した蛍光タンパク質 tdTOMATO を CAG プロモーターにより恒常的に発現させた。各オルガネラへの特異的な局在を、各オルガネラのマーカータンパク質の免疫染色および染色試薬により確認した。また、ライブイメージング可能な蛍光強度であるかを共焦点顕微鏡により観察した。

樹立したオルガネラレポーター多能性幹細胞から生殖細胞を誘導し、生殖巣体細胞と共培養して培養を継続することで、卵子まで成熟可能であることも確認した。

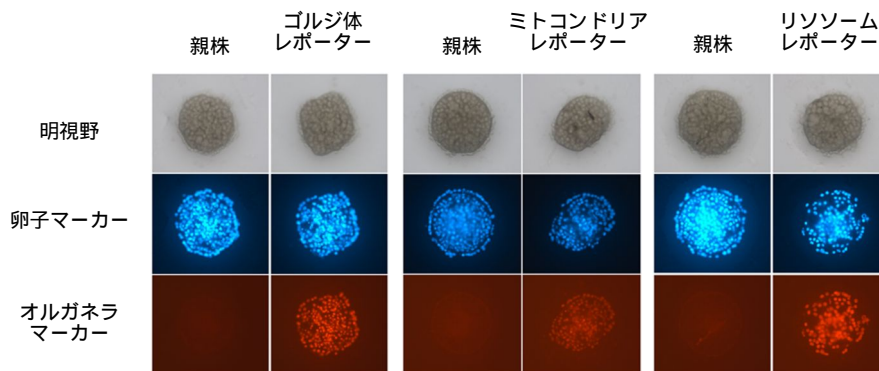


図 1. 各オルガネラレポーター多能性幹細胞から誘導した卵子。

(2) ライブイメージングシステムの構築

体外誘導系により卵母細胞を誘導するには、胎生期の生殖巣体細胞との共培養し凝集塊を形成させることが必須であるが、これにより組織の厚みが増し、ライブイメージング、特にオルガネラなどの微小構造を生細胞で観察することは困難であった。また、従来の体外誘導系では培養期間中に酸素供給を担保するために培養用メンブレン上で凝集塊を培養するが、培養用メンブレンの使用も顕微鏡観察の律速となる。

そこで、生殖細胞と体細胞の相互作用を障害することなく組織の厚みのみを制御し、酸素供給を担保可能な培養系を構築した。この培養系では、既存の卵母細胞体外誘導系と同様の効率で卵子誘導を行うことが可能であった。

確立した培養系と樹立したレポーター多能性幹細胞を組み合わせ、多光子顕微鏡(ニコンソリューションズ社、A1R MP+)、共焦点顕微鏡(カールツァイス社、LSM900)により卵母細胞マーカーおよびオルガネラマーカーの観察を行なった。卵母細胞シストの構造がダイナミックに変化し、卵母細胞の生死がおおよそ決定する 2 日間においてゴルジ体が細胞間移動する様子を観察することに成功した。また、観察期間を 4 日間まで延長することも可能であった。

今後は対象とする複数のオルガネラ動態を総合的に定量することが必要となると考えられる。

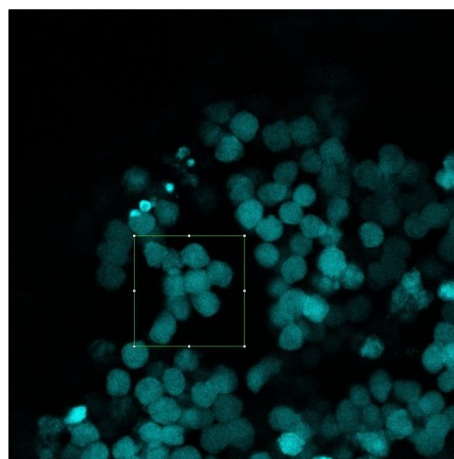


図 2. 多光子顕微鏡により卵子マーカーである Stella-ECFP の発現を観察した卵母細胞シストの一例。枠内に示すように細胞同士の連結が確認できる。

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 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 Yuki Naitou
2 . 発表標題 The establishment of live-cell imaging system using in vitro culture method of female germ cell in mice
3 . 学会等名 Totipotency and Germ Cell Development (国際学会)
4 . 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

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