

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 19 日現在

機関番号：33920

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2015

課題番号：15H06275

研究課題名(和文) 卵巣内における卵胞発育動態のライブイメージング解析

研究課題名(英文) Live imaging analysis of the follicle development in the ovary

研究代表者

小松 紘司 (Komatsu, Kouji)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：40456893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：周期的におこる排卵活動を維持するために、卵巣内で起こる卵胞発育制御メカニズムを明らかにするための実験系を構築した。卵母細胞と細胞核を可視化できる遺伝子改変マウスの卵巣組織を培養し、タイムラプス撮影する事によって卵巣内における卵胞発育過程をリアルタイムに観察する事ができる実験系を構築することができた。今後、この実験系を用いて卵巣組織内における卵胞発育制御メカニズムを明らかにしていく。

研究成果の概要(英文)：I invented new experimental methods to figure out the mechanism that regulates the follicle development to ensure the periodical ovulation in the ovary. I have constructed the culture and time-lapse methods to observe the dynamics of follicle development in the mouse ovary with transgenic mice containing the genes to visualize oocytes and nuclear of all cells. Hereafter, I will try to reveal the regulatory mechanism of the follicle development in the ovary with these new experimental methods.

研究分野：生殖生理

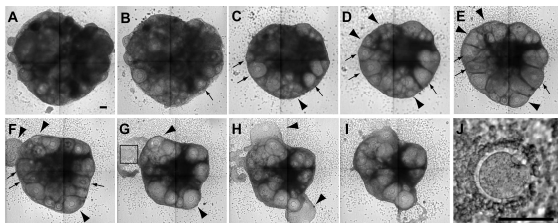
キーワード：卵巣 卵胞 ライブイメージング

### 1. 研究開始当初の背景

卵巣内には多くの卵胞が存在し、周期的な排卵に備え、卵母細胞を内包する一定数の卵胞が周期的に発育するように制御されている。動物種によって排卵数、性周期の期間は異なるが、一定数の卵子を周期毎に排卵する点は哺乳類で共通した特徴である。卵胞の発育制御メカニズムに関しては、卵胞を構成する卵母細胞、顆粒層細胞、莢膜細胞の3者間での発育制御における相互作用が分子レベルで明らかにされてきているが、卵巣組織単位の制御に関しては不明な点が多く残されている。卵胞発育、排卵は視床下部、下垂体の中枢系と卵巣組織間のホルモン等の分泌を介した相互作用によって制御されており、多くの研究報告がされている。中枢系 - 卵巣間、卵胞内の制御メカニズムに関する研究は進んでいる一方で、卵巣組織内における卵胞 - 卵胞間や卵胞 - 間質組織間の相互作用に関しては十分な研究が行われていない。この理由としては卵巣組織が周期的な排卵活動に伴い、大きく変動することや原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞といった様々な発育段階の卵胞が卵巣内に混在しており、その分布等に明確な規則性が見いだせない複雑な組織構造であることが挙げられる。しかし、卵巣組織内において一定数の卵子を排卵し続けるには、規則的な卵胞発育を維持するための組織レベルでの制御メカニズムが存在しているはずである。これを明らかにするためには、性周期毎にダイナミックに変化する卵巣組織内の動態と卵胞発育を同時に観察、解析する必要があるが、その手法は確立されていない。

### 2. 研究の目的

性周期毎に一定数の卵子を排卵し続けるためには組織レベルで秩序だった卵胞発育制御が行われている必要があるため、申請者は卵巣形成過程、性周期毎の卵巣内における卵胞発育動態を観察、解析することによってその制御メカニズムを明らかにしたいと考えている。そのためにはタイムラプス撮影によるライブイメージング解析が可能な新しい卵巣組織の培養法と解析手法の構築が必要となる。



申請者は上図(4週齢 ICR マウス卵巣を3週間培養、タイムラプス撮影した画像。A: 培養0時間 B: 培養48時間 C: 培養96時間 D: 培養144時間 E: 培養192時間 F: 培養240時間 G: 培養288時間 H: 培養336時間 I: 培養384時間 J: G の内の排卵された卵子 (M 期)

矢頭: 排卵が起こる卵胞、矢印: 閉鎖卵胞 (scale bar: 100  $\mu$ m) のように、過去の研究においてカルチャーインサート上で卵巣組織を培養することによって、卵胞発育、排卵、卵胞閉鎖といった卵巣内の生理現象を培養下で再現し、タイムラプス撮影できる実験系を構築し、論文として発表している (ref.1)。この論文では明視野画像のタイムラプス撮影を行い、卵胞面積を測定する事によって、その画像解析を行ったが、明視野画像では原始卵胞~一次卵胞の識別が難しく、詳細な解析が困難であることが分かった。そこで本研究では、この培養方法を用いて、卵母細胞、細胞核を可視化できる遺伝子改変マウスの卵巣を用いることによって原始卵胞~排卵または卵胞閉鎖までの過程をリアルタイムで観察できる実験系を構築する事を第一の目的としている。このタイムラプス撮影によって得られた画像を解析する事によって、卵胞発育過程における異なる発育ステージの卵胞間の運動性、発育促進・抑制等の相互作用というような組織レベルでの卵胞発育制御メカニズムの理解に必要なデータを取得することが可能となる。最終的な目的としては、この解析方法をもちいることによって、組織レベルでの卵胞発育制御メカニズムを明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

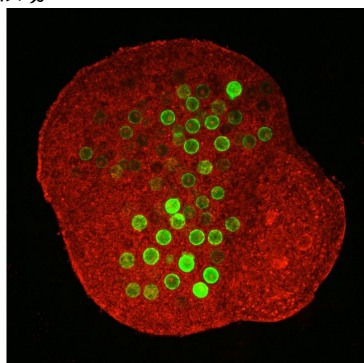
京都大学大学院農学研究科 南直治郎准教授らのグループによって作成された卵母細胞特異的に発現する遺伝子 *oog1* のプロモーターと蛍光タンパク質 AcGFP を結合させた遺伝子改変マウス (ref.2) と、理化学研究所多細胞システム形成研究センターにおいて作成されたヒストンタンパク質 histone H2B に蛍光タンパク質 mCherry を結合した遺伝子を持つ遺伝子改変マウス (ref.3) を分与して頂き、両系統のマウスを交配することによって卵母細胞と細胞核を同時に可視化できるマウスを作成した。このマウスでは卵巣内に存在する原始卵胞以上の全ての卵胞内の卵母細胞が可視化できると同時に組織中の全ての細胞核が可視化できることから、発育過程をタイムラプス撮影し、画像を元にリアルタイムでその変化を解析する事ができる。本研究では生後0日目の卵巣から性成熟後のマウス卵巣を用いて解析を行うことによって卵胞形成のスタート段階から性周期毎の卵胞発育動態の撮影に取り組んだ。

また、培養下で得られたデータが実際に *in vivo* でも見られるかどうかを検証するために ICR マウスの卵巣を生後1日目から12ヶ月齢まで経時的にサンプリング、卵巣全体の連続組織切片を作成、H.E.染色したものを3次元構築する事によって生体内の卵巣における卵胞発育動態の解析も合わせて行った。この解析では卵巣内に存在する全ての卵胞を同定し、各発育ステージの卵胞数の推移、分布の変化を経時的に調べることができる。

ただし、この結果は同一卵胞の発育過程をトレースできない欠点があるため、この点を卵巣組織培養下におけるタイムラプス撮影画像の解析によって補うことによって、卵巣内の卵胞発育動態を解析した。

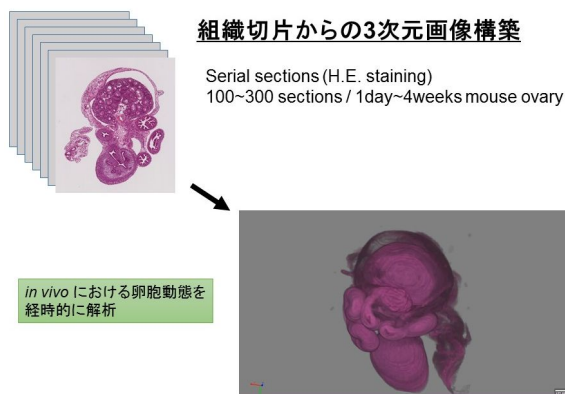
#### 4. 研究成果

上記2系統のマウスを導入、交配し、卵母細胞、細胞核を可視化できるマウスの作成を行った(下図: 生後4日目の卵巣を1週間培養した卵巣の画像。緑: 卵母細胞、赤: 細胞核)



また、組織にダメージを与えず、長期間タイムラプス撮影できる条件を検討し、撮影条件を確立した。現在

は生後から性成熟までの卵巣を用いてタイムラプス撮影を行い、卵巣形成過程における卵胞発育動態の解析を進めている。その後、性成熟以降のマウス卵巣を用いて性周期毎の卵胞発育動態の解析に取り組む予定である。また、下図のように経時的にサンプリングしたマウス卵巣の連続切片を作成し、H.E.染色した各切片の位置調整をしながら重ね合わせて3次元画像の構築を行った。



この3次元画像の構築に関しては、自然科学研究機構 基礎生物学研究所の藤森俊彦教授らのグループにおいて開発されている実験システムと画像処理プログラムを共同研究として利用させて頂いている。これによって卵巣組織内における卵胞数と各々の位置情報の経時的な変動を解析できる。このデータは時間軸上では特定の“点”におけるデータであるため、タイムラプス撮影によって得られたデータでこの点を繋ぐ事によって生後から性成熟までの卵巣形成過程と性周期毎の卵胞発育動態を明らかにできると考えている。

本研究において構築された実験系は卵巣内の動態をリアルタイムに観察できる新しい手法であることから、ここで得られる成果はこれまで観察されることがない卵巣内の組織動態を明らかにできることから、今後さらに研究を推進することによって新しい知見が多く得られる事が期待できる。

#### References

1. Komatsu K., et al. Biol Reprod 93(1): 1-18 (2015)
2. Ishida M., et al. Plos One 8(7): e68686 (2013)
3. Shioi G., et al. Genesis 49(7): 570-578 (2011)

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

- 「progesteroneの卵胞発育に対する効果」  
小松紘司、増淵悟  
第108回日本繁殖生物学会大会(宮崎大学)  
卵巣組織培養による卵胞発育動態のタイムラプス解析  
小松紘司、増淵悟  
第93回日本生理学会大会(札幌コンベンションセンター)

〔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:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松 紘司 (KOMATSU, Kouji)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：40456893

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：