

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18580284
 研究課題名 (和文) 潜在的胚発生能力を決定する卵母細胞育成中の環境要因に関する研究
 研究課題名 (英文) Studies on the effect of oocyte microenvironment during growth on the acquisition of developmental potential of the oocytes
 研究代表者 平尾 雄二 (HIRAO YUJI)
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 東北農業研究センター
 高度繁殖技術研究東北サブチーム・サブチーム長
 研究者番号：10355349

研究成果の概要：家畜の卵巣内にある発育途上の卵母細胞を効率的に発育（完成）させるための培養環境を追求した。その結果、卵母細胞の発育に合わせて酸素濃度を調節すれば胚発生能力の獲得が促進されること、培養液への糖質コルチコイドの添加も同様の促進効果をもつこと、添加する高分子化合物の種類によって潜在的胚発生能力が異なること、卵母細胞は周囲の顆粒膜細胞を増殖させるとともに黄体化を抑制していること、などを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2006 年度 | 1,100,000 | 0 | 1,100,000 |
| 2007 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2008 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 660,000 | 3,960,000 |

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：発生工学・卵母細胞・発育・成熟・組織培養・高分子化合物

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類の卵巣では、のちに卵子となる卵母細胞が多く蓄えられている。卵母細胞は発育期を経て成熟卵子となるが、卵子にまで至るものはごく少数で、ほとんどは発育前あるいは発育途上で退行・死滅する。生体内で卵母細胞が発育する様子を実際に継続して見ることは難しく、その発育、選択、退行過程には不明な点がまだ多く残っている。

(2) 研究開始に先立つ2年前、研究代表者はウシ卵巣から卵母細胞を取り出し、高分子化合物を高濃度で加えた培養液で発育さ

せるシステムを開発した。その方法で発育させた卵母細胞の一部は正常に卵子へと成熟し、受精も可能であった。つまり、卵巣の複雑な働きのうち、卵母細胞を発育させて卵子を作るという機能を抽出し、培養液内で再現できるようになった。

(3) 卵母細胞を体外で発育させた場合、その直径で発育の程度を判断することは容易である。しかし、卵子としての潜在能力についてはわからない。種々の培養環境で卵母細胞を発育させると同時に、その潜在能力を見極めることを可能にする実験体系が

求められていた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、どのような条件下で卵母細胞は潜在能力を高めるのか、あるいは逆に潜在能力が養われない培養条件は何かを明らかにする。

(2) また、個々の細胞の健康レベルを底上げする技術開発をあわせて行い、将来的な胚発生能力にどの程度影響するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 研究全体の基盤となる事項：

ウシおよびブタを用いる。それらの卵母細胞は直径約30 μm から約125 μm へと発育する。本研究では、90 μm ～100 μm の卵母細胞を対象とする。卵母細胞を周囲の顆粒膜細胞とともに複合体として切り出し、12～19日間培養して発育・成熟させる。卵子の成熟率あるいは胚発生率を主たる指標とし、最も高い能力を卵母細胞に付与する培養環境を見出す。

(2) 体外発育させた卵母細胞のサイズと潜在的な能力との関係を明らかにするため、培養後の直径別に卵母細胞の成熟能力および胚発生能力を調べる。

(3) 培養のストレスが培養組織の健康レベルと卵母細胞の潜在的な能力に及ぼす影響を調べる。

① 酸素分圧を下げることで卵母細胞の潜在的な発生能力に現れる影響を明らかにする。

② 抗酸化物質の添加が卵母細胞に及ぼす影響を調べる。

③ 卵巣採取から培養開始までに生じる活性酸素種由来のストレスは移植用臓器の保存において生じるストレスと同種のものである可能性が高い。そこで臓器保存の分野で蓄積されている知見を応用し、卵母細胞の保存に有効であるか否かを検討し、障害を軽減するための保存液の組成を決定する。

(4) 卵母細胞の相互作用の存在の有無を明らかにする。生体内では卵母細胞の厳しい選択が起こることから、集団培養では一部の卵母細胞が他を押しつけて有利に胚発生能力を獲得する可能性がある。

(5) 培養液中の高分子化合物は、本研究で用いる培養液の必須の要素であり、従来はポリビニルピロリドンを使用していた。他の高分子の有効性を検討する。

(6) 体外発育卵母細胞を包む顆粒膜細胞が接着する基質（ティッシュエンジニアリングでのスキャホールド）が発育に及ぼす影響を、現行のコラーゲンと他の細胞外マトリックス成分で比較検討し、発育促進効果が最も高い基質成分を選定する。

(7) ヒポキサンチンが卵母細胞の発育に及ぼす効果を調べるとともに、ヒポキサンチンの代謝で生じる活性酸素種の悪影響の程度と比較検討する。

(8) 体外発育卵母細胞周囲の顆粒膜細胞の分化（黄体化）程度を、プロジェステロンの発現を指標として調べ、卵母細胞を中心とした細胞分化制御が行われているか否かを検証する。特に卵母細胞が黄体化を抑制していることの確証を得る。

(9) 幹細胞の培養で使用されている培養液が、従来から卵母細胞の培養に使用されている培養液よりも高い発育増進効果を有するか否かを比較検討する。

4. 研究成果

(1) ウシ発育途上卵母細胞を19日間培養して発育させる際、糖質コルチコイド製剤のデキサメタゾンを添加することで、発育が促進され、胚発生能力が高まることを発見した。

(2) 卵母細胞のサイズと潜在的な能力との関係について調べた結果、平均直径が大きな集団は胚発生率も高い傾向が認められた。しかし、個々に見ると小さな卵母細胞から胚盤胞期へと発生した例も見出すことができる。したがって、より大きな卵母細胞を生み出す培養環境が有利ではあるものの、サイズが全てを決定するわけではないと考えられる。

(3) 活性酸素種に由来するストレスが卵母細胞に次のような影響を及ぼすことを明らかにした。

① 培養環境の酸素分圧が及ぼす影響を調べた試験では、培養開始から4日間を5%の低酸素濃度で培養し、その後は20%酸素濃度の環境で卵母細胞を発育させた場合に、卵母細胞の直径が最大となり、体外受精後の胚発生率が高いことを見出した。

② 還元剤 β -メルカプトエタノールにはウシ胚の体外発生を促進する効果がある。しかし、発育途上卵母細胞の長期培養においては、生存率、発育および成熟率のいずれに対しても明確な効果がなく、むしろ高濃度では悪影響

が顕著であった。①に記したとおり酸素濃度をシフトさせる現行の培養システムにおいては、活性酸素種への対処としての還元剤の利用は、効果がない、あるいはあっても弱いと考えられる。

③ 卵巢用保存液の開発：と畜から9時間程度の保存であれば、卵母細胞および顆粒膜細胞の生存性に悪影響を与えない保存液組成と保存条件を選定した。また、虚血・再酸素化で生じる障害に関する実験では、臓器保存液であるUW液やユーロコリンズ液の組成のうち、ホスホリパーゼの阻害薬に卵母細胞の生存性を向上させる効果を見出した。

(4) 卵母細胞の相互作用に関する実験では、集団での培養と個別培養とを比較した。培養後の卵母細胞の平均直径は、集団培養では113.1 μm 、個別培養では113.4 μm とほぼ同じであり、減数分裂の第2分裂中期への成熟率もそれぞれ43%と47%でほぼ同等であった。卵母細胞の相互干渉という現象の有無は不明であるが、培養方法としては集団あるいは個別のいずれを選択することも可能であることが明らかとなった。

(5) ポリビニルピロリドン以外の高分子の有効性を検討し、以下のことを明らかにした。

① 種々の高分子化合物に関する試験では、新たにフィコールを使った培養液と、ポリビニルピロリドンを使った現行の培養液を比較し、卵母細胞の生存性、発育、直径の増大のいずれにおいても同等であることを確認した。

② ブタ卵母細胞に及ぼす影響を調べた試験では、フィコールとポリビニルピロリドンの濃度が同じ4%の場合、卵母細胞の生存率や直径などの形態の上では同等となるものの、潜在的胚発生能力はポリビニルピロリドン添加培養液においてより高まることを明らかにした。

(6) 細胞接着に関与する因子を種々試した結果次のような結果を得た。

① コラーゲンなどの細胞外マトリックス成分は不可欠ではないものの、プラスチックの培養皿表面とウシ胎児血清の組み合わせだけでは、長期間の培養を維持することは難しいことが判明した。

② 接着成分のうち、フィブロネクチン、コラーゲンおよび基底膜成分を模したマトリゲルを選び、それらの上で複合体を14日間培養して卵母細胞の生存率を比較した。コラーゲンでコートされた培養皿とマトリゲルが塗布された培養皿での成績を比較すると、マトリゲル上では高い割合で卵母細胞が死滅した。その生存率は、対照区として使用したプラスチック表面上における場合よりも低く、本来、

顆粒膜細胞が接する基底膜に成分に近いはずのマトリゲルにおいて、最も悪い結果となった。このことから、生体成分由来の細胞接着基質は卵母細胞の生存率・発育および能力に悪影響を与える場合があることが明らかとなった。

(7) ヒポキサンチンの必要性については、ウシとブタで異なる結果を得た。ウシの卵母細胞の発育はヒポキサンチンあるいはそれと同等の作用を持つ薬剤の添加によって明らかに促進された。一方、ブタ卵母細胞はヒポキサンチンの添加を必要としなかった。

(8) ① 培養液中のプロゲステロン濃度は、培養の経過とともに上昇したが、卵母細胞の摘出後にその傾向が強まることから、顆粒膜細胞の分化を卵母細胞が抑制していることが示された。

② 卵母細胞の有無による影響をさらに調べた結果、卵母細胞を除去した場合、顆粒膜細胞の増殖は停止され、黄体化が著しく進行すること；それに対し、卵母細胞を残すことで黄体化は抑えられ、細胞増殖が促進されることが明らかとなった。これらのことから、卵母細胞が顆粒膜細胞の増殖・分化の方向を決定していることの確証を得た。

(9) 幹細胞用培養液を使った卵母細胞の体外発育：卵母細胞の生存率は向上したものの、成熟能力が損なわれることが判明した。

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3件)

① Yuji Hirao, Takashi Miyano. In vitro growth of mouse oocytes: oocyte size at the beginning of culture influences the appropriate length of culture period. *Journal of Mammalian Ova Research*, 25(1), 56-62, 2008. 査読有

② 平尾雄二, 志水学, 伊賀浩輔, 竹之内直樹. 卵胞腔形成期前後の異なる発育段階から培養したウシ卵母細胞の体外発育 *Journal of Mammalian Ova Research*, 25(4), 266-271, 2008. 査読有

③ Yuji Hirao, Manabu Shimizu, Kosuke Iga, Naoki Takenouchi. Growth of bovine oocyte-granulosa cell complexes cultured individually in microdrops of various sizes. *Journal of Reproduction and Development*, 55(1), 88-93, 2009. 査読有

〔学会発表〕（計3件）

- ①平尾雄二, 志水学, 伊賀浩輔, 竹之内直樹. ウシ卵母細胞の体外発育に及ぼすデキサメタゾンの影響. 日本畜産学会第107回大会 P75. 麻布大学(相模原市). 2007年3月29日.
- ②平尾雄二. ブタ卵母細胞の体外発育に及ぼす高分子化合物の影響. 日本哺乳動物卵子学会 第48回大会. 講演要旨集 S43. 甲府市. 2007年5月27日.
- ③平尾雄二. ブタ体外発育卵母細胞の潜在的胚発生能力の獲得に及ぼす高分子化合物の影響. 日本繁殖生物学会大会 第100回 講演要旨集 j132. 東京大学(文京区). 2007年10月22日.

〔産業財産権〕

○取得状況（計1件）

名称：卵母細胞の培養方法及び発育方法
発明者：平尾雄二
権利者：独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
種類：特許権
番号：第4122425号
取得年月日：2008年5月16日
国内・国外の別：国内

〔その他〕

ホームページ

http://tohoku.naro.affrc.go.jp/team/sub_hanshoku/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平尾 雄二 (HIRAO YUJI)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 東北農業研究センター・高度繁殖技術研究東北サブチーム・サブチーム長
研究者番号：10355349

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし