

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06374

研究課題名（和文）4種の原始卵胞数増加モデルの卵胞形成と維持の分子機構解明と体外卵子作出系の高度化

研究課題名（英文）The molecular mechanisms of follicle formation and maintenance in four models of increased primordial follicle number and advancement of in vitro oocyte production systems

研究代表者

木村 直子 (Kimura, Naoko)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：70361277

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、申請者らが開発あるいは見出した4種の原始卵胞数増加マウスモデルについて、新生仔卵巣の形態学的・分子学的な動態の解析と、性成熟後の生殖能との関連性を明らかにし、原始卵胞の形成促進と維持の制御に関わる主要な分子とその経路の特定を目指した。D11投与あるいはxCTKOマウスは、性成熟後も高い卵巣予備能と妊孕能を維持する一方、IFX投与およびDEX投与マウスは、性成熟後までには対照区と差がなくなることが明らかとなった。D11投与による原始卵胞数の増加は、シスト内優勢卵母細胞数の増加、卵母細胞の生存性の向上が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、詳細不明な原始卵胞の形成過程と維持の分子機構について、周産期の仔体内の生理的变化に注目した4種の原始卵胞増加モデル動物の解析により解明し、その制御技術の開発を目指している。新生仔期の短期間の薬剤投与による原始卵胞プールの上昇制御は、成長過程で薬剤毒性評価が可能で、ゲノム編集や発生工学技術を用いないため、産業動物への応用では倫理面や安全性のハードルが低いものと考えられる。また発生工学技術適用外の希少動物種雌の生殖能の改善や、卵子の安定確保が期待できる。生体投与で薬剤スクリーニング後、in vitro卵子形成の培養系でそれを検証し、培養系の高度化に効率的に繋がられる点も有益と考えられる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the morphological and molecular dynamics of neonatal ovaries in four mouse models of increased number of primordial follicles and their relationship to fertility after sexual maturity, aiming to identify the key molecules and pathways involved in regulating the promotion and maintenance of primordial follicle formation. D11-treated or xCTKO mice maintained high ovarian reserve and fertility after sexual maturity, while IFX- and DEX-treated mice were no longer different from controls by the end of sexual maturity. The increase in the number of primordial follicles with D11 administration suggested to involve an increase in the number of predominant oocytes in the cyst and an increase in oocyte viability.

研究分野：動物生殖学、動物生殖工学

キーワード：原始卵胞 卵巣 生殖能 新生仔 マウス 生殖寿命 オートファジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類雌個体に備わる生殖能や生殖寿命は、1)卵巣内の備蓄原始卵胞数、2)環境や加齢で変化する卵胞内卵子の品質、に依存することが知られており、これらの分子制御機構の解明と制御法の開発は、雌生殖能の根本的改善に繋がる課題と考えられる。胎生後期～新生仔初期の卵巣では、卵母細胞シストの形成と崩壊、体細胞との相互作用を伴い卵母細胞とそれを取り囲む(前)顆粒層細胞がユニットを構成し、原始卵胞が形成され備蓄される。一連の過程で、約 2/3 の卵母細胞が細胞死により失われる(Pepling ら, Dev Biol., 2001 年)。一定期間に刻々と形態的变化を遂げる原始卵胞形成過程の分子機構は、解析手法や動物モデルが十分になく、生体内現象を緻密に反映する卵巣培養法が発達していない等の理由で、全容解明には至っていない。

我々は、原始卵胞形成期にある新生仔初期マウスに、出生後 54 時間までに、オートファジー誘導剤 Tat-beclin1 D11 を投与した場合、原始卵胞数が 1.2~1.5 倍に増加し、12 ヶ月齢までの累計産仔数が約 1.4 倍まで向上することを見出した(Watanabe ら, Biol Reprod., 2020)。これは、1)出生後に原始卵胞プールの拡張が可能であること、2)原始卵胞プールの大きさは雌生涯の生殖能を決定づける、ことを明示していた。これらを踏まえ、周産期の仔の生理的变化に注目し、細胞死制御に関与する腫瘍壊死因子 α (TNF- α)リガンド阻害剤 Infliximab を投与(以降 IFX 投与)、あるいは合成グルココルチコイド様物質 Dexamethasone を投与(以降 DEX 投与)したところ、原始卵胞数はそれぞれ約 1.5 倍、約 2.8 倍に増加することを見出している。このほか当研究室保有のシスチン・グルタミン酸トランスポーター遺伝子欠損(以降 xCTKO)マウスでは、原始卵胞数および生涯の累計産仔数が野生型の 1.2 倍以上に増加することも見出している。

以上から、本研究では申請者らが開発あるいは見出した 4 種の原始卵胞数増加マウスについて、新生仔卵巣の形態学的・分子学的な動態の解析と、性成熟後の生殖能との関連性を明らかにし、原始卵胞の形成促進と維持の制御に関わる主要な分子とその経路の特定を目指した。さらに特定した候補分子や経路について、生体と培養系の双方での制御による検証を行い、雌個体の潜在的生殖能と生殖寿命の向上に繋がる生体制御法の開発、in vitro 卵子形成の高度化に繋がる技術開発を最終目標とした。

2. 研究の目的

4 種の原始卵胞数増加モデルのうち D11 投与マウス以外は、性成熟後の生殖能と、卵巣予備能を経時的に調査中であるが、少なくとも IFX 投与あるいは DEX 投与マウスは、原始卵胞数が一時的に増加した後、性成熟までに野生型と差がなくなることが明らかになりつつある。本研究では、「なぜ D11 投与や xCTKO マウスでは、原始卵胞数が増加し、それらは性成熟後も維持されるのか?」について、原始卵胞の形成促進と形成後の維持の機構に焦点を当て、1)シスト内優勢卵(生存卵)の増加、2)原始卵胞内卵サイズの小型化、3)卵胞形成直後の第一波卵胞発育の抑制の推察を立て、それらを検証する。その過程で、原始卵胞数の増加に寄与する形態学的特徴を見出し、形態学的差異に関連する候補分子や経路を明らかにする。さらに生体と培養系でそれらを制御し、表現型を検証する。

3. 研究の方法

1) 4 種の原始卵胞数増加モデル卵巣の形態学的解析

4 種(D11 投与, xCTKO, IFX 投与, DEX 投与)のモデルマウスの新生仔卵巣(出生後 60 時間を中心)について、卵巣サイズを測定後、蛍光免疫染色法と画像解析、ウェスタンブロッティング法などにより、1) シスト内の優勢卵母細胞数の評価、2) 卵母細胞で発現する MVH をマーカーとした

原始卵胞内卵サイズの測定、3) 卵巣内構成細胞の細胞死の評価、4) 卵巣内の体細胞(前顆粒層細胞)の増殖能、5) 原始卵胞の第一波卵胞発育抑制の評価などを行う。

2) D11 投与マウス以外の 3 種の原始卵胞数増加モデルの性成熟後の生殖能、卵巣予備能の経時的な評価を行う。

3) 新生仔マウス卵巣サンプルを用いた RNA シーケンス解析

4 種の卵巣モデル間で、形態学的評価により差異がみられた実験区あるいは性成熟後の生殖能に差異がみられた実験区の新生仔期の卵巣サンプル(生後 60 時間)を RNA シーケンス解析し、発現量に差異のある候補分子を絞り込む。

4) 新生仔期卵巣の器官培養系による検証

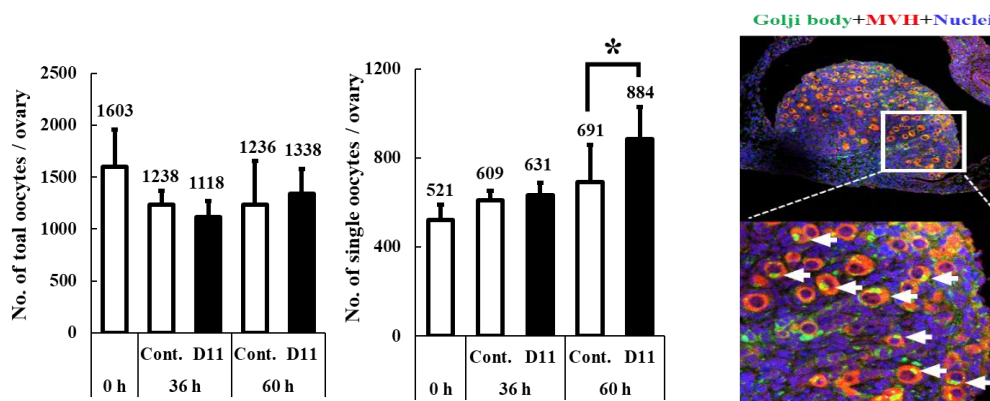
卵巣器官培養系を構築し、D11、IFX、DEX の添加による効果を検証する。出生後 60 時間相当の培養時点の卵胞数を原始卵胞形成能、出生後 10 日間相当の培養時点の卵胞数を原始卵胞の維持能の指標とする。

4. 研究成果 研究方法の項目に合わせて記述する。

1) D11 投与マウス卵巣の形態学的特徴

まず方法に示す各評価方法の確立が必要であったため、D11 投与区と対照区で、比較検討を進めた。卵母細胞特異的タンパク質 MVH、卵母細胞を囲うタンパク質 Laminin の抗体を用いた蛍光免疫染色により、単一卵母細胞数、シストサイズ(小:卵母細胞数 2~4 個、中:5~8 個、大:9 個以上) とシスト数を計測した。また Golgi 特異的タンパク質 GM130 の抗体を用いた蛍光免疫染色により、シスト内優勢卵母細胞数を計測した。卵巣サイズは、対照区と D11 区で差がなかった。一方、D11 区では総卵母細胞数に差がないものの、単一卵母細胞数は高く(下左図)、中サイズ以上の卵母細胞数とシスト数は低い傾向にあった。またシスト内優勢卵母細胞の比率は、小サイズで高い傾向にあった(下右図、検出像)。その他、Lgr5 と FoxL2 のタンパク質発現量は、両区に顕著な差はみられなかった。これまでの一連の結果から、新生仔雌マウスへのオートファジーの促進による原始卵胞数の増加は、シスト内優勢卵母細胞数の増加、卵母細胞の生存性の向上が関与していることが考えられた。

本研究から、原始卵胞数が増加する理由はある程度明らかにできたが、増加した原始卵胞数が、その後生涯にわたって維持される理由は、依然として不明であり、今後は、D11 投与マウスの原始卵胞の維持機構を中心に詳細な解析をする必要があるものと考えられた。原始卵胞内卵サイズの測定および卵巣内の体細胞(前顆粒層細胞)の増殖能については、現在、解析を進めている。



左図(グラフ)は、1 卵巣当たりの総卵母細胞数と単一卵母細胞数。

右図(写真)は、GM130 抗体を用いた蛍光免疫染色による優勢卵母細胞の評価。

本研究結果の一部は、Watanabe R, Sasaki S, Kimura N. Activation of autophagy in early neonatal mice increases primordial follicle number and improves lifelong fertility. *Biol Reprod.* 2020;102:399-411.で報告している。

2)-1 xCTKO マウスにおける卵巣卵胞予備能に依存した高い妊孕性の保持

我々は、xCT 欠損 (xCTKO) 高齢マウスが、野生型 (WT) マウスに比べて高い排卵率と卵巣重量を維持していることを発見した。そこで、xCTKO マウスにおける卵胞予備能と生殖能の加齢変化を調べ、PI3K/ACT/mTOR シグナル伝達経路がこれに寄与しているかどうかを明らかにした。10 ヶ月および 12 ヶ月齢の xCTKO マウスの産仔数は、WT マウスに比べて有意に多かった (下表)。xCTKO 新生仔マウスの原始卵胞数は、評価したすべての時期において WT マウスよりも高い傾向にあった。一方、xCTKO マウスでは生後 60 時間後の一次卵胞数は有意に少なかった。卵胞の発育を促進する p-AKT の発現は、xCTKO マウスでは WT マウスより有意に低かったが、LC3-II/LC3-I の発現比は有意に高かった。xCTKO マウスは、生後 2 ヶ月で WT マウスより有意に原始卵胞が多く、生後 13-15 ヶ月でも同様の傾向を示した。これらの結果から、高齢の xCTKO マウスにおける生殖能の維持は、新生児期の卵胞活性化の抑制による思春期以降の高い卵胞予備能に起因することが示唆された。

Table 1. Fertility of WT and xCTKO female mice aged 2-3, 4-6, 10 and 12 months.

Experimental groups		n=	Delivering rate (%)	No. of offspring (mean±SD)
2-3 months	WT	45	97.8(44/45)	5.9 ± 2.3
	xCTKO	34	100(34/34)	6.2 ± 2.2
4-6 months	WT	48	97.9(47/48)	8.2 ± 2.7
	xCTKO	47	100(47/47)	8.1 ± 2.4
10 months	WT	28	71.4(20/28)	5.6 ± 2.4 ^a
	xCTKO	18	83.3(15/18)	7.2 ± 1.9 ^b
12 months	WT	14	35.7(5/14)	4.0 ± 0.6 ^a
	xCTKO	14	57.1(8/14)	6.1 ± 1.6 ^b

^{a,b} : Values with difference superscript letters are significantly different at the same age (P < 0.05).

本研究結果は、Watanabe R, Takano T, Sasaki S, Obara M, Umeno K, Sato H, Kimura N. Retention of higher fertility depending on ovarian follicle reserve in cystine-glutamate transporter gene-deficient mice. *Histochem Cell Biol.* 2022;157:347-357.で報告している。

2)-2 IFX 投与マウスにおける卵巣卵胞予備能と妊孕性の評価

新生仔マウスに、出生後 54 時間までに IFX (2 μg/g 体重) を投与した場合 原始卵胞数は、出生後 60 時間では、対照区と比較して 1.6 倍高くなった。しかし生後 3-4 週齢における IFX 群の各発育卵胞数は、対照区と比較して有意差がなくなった。さらに 2 ヶ月齢および 6 ヶ月齢の分娩率および産仔数についても対照区と差がなかった。興味深いことに、アポトーシスマーカーである Cleaved PARP の発現量および BAX/BCL2 タンパク質の発現比は、IFX 区で高い傾向にあった。

本研究結果の一部は、Umeno K, Sasaki A, Kimura N. The impact of oocyte death on mouse primordial follicle formation and ovarian reserve. *Reprod Med Biol.* 2022;21:e12489.で報告している。

3) 新生仔マウス卵巣サンプルを用いた RNA シーケンス解析

まず D11 投与マウスと対照区で解析を行った。D11 区では 26,715 遺伝子が発現しており、628 個の差次的遺伝子のうち発現量が 2 倍以上に増加したものが 37 個、発現量が 1/2 以下に低下したものが 17 個みられた。それらの中で、DNA 二本鎖切断修復をおこなう MRN 複合体構成因子である RAD50 の発現量が D11 区では 8 倍以上高かった。現在、RNA シーケンス解析から得られた興味深い分子について、解析を進めているが、いくつか興味深い分子が見出されている。

4) 新生仔期卵巣の器官培養系による検証

新生仔期マウス卵巣の器官培養系の構築を行うとともに、原始卵胞形成能および卵胞発育に及ぼす D11 添加の効果について検討した。C57BL/6J 卵巣の 3 日間培養後の原始卵胞数は、10 μ M の D11 添加区で、無添加区に比べ顕著に高かった(10 μ M vs 無添加:1934 vs 1083)。10 日間培養後の原始卵胞数も、D11 区で高い傾向がみられた。現在、培養条件などを合わせて検討中であるが、生体でみられた D11 投与の影響と同様な効果が、培養系でも確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 名古満, 久保埜花乃, 木村直子	4. 巻 38
2. 論文標題 母体加齢による卵子の減数分裂の異常とIVMによる卵質の改善に有効な抗酸化剤, 抗老化剤	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Mamm. Ova Res.	6. 最初と最後の頁 81-91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umeno K, Sasaki A, Kimura N.	4. 巻 21
2. 論文標題 The impact of oocyte death on mouse primordial follicle formation and ovarian reserve.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reprod Med Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12489.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe R, Takano T, Sasaki S, Obara M, Umeno K, Sato H, Kimura N	4. 巻 157
2. 論文標題 Retention of higher fertility depending on ovarian follicle reserve in cystine-glutamate transporter gene-deficient mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histochem Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 347-357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-022-02077-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 久保埜花乃, 柳井真澄, 木村直子.
2. 発表標題 老齢マウス由来卵子の染色体異数性を低減する成熟培地への抗酸化剤の検討.
3. 学会等名 第40回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久保埜花乃、柳井真澄、中村洸瑛、木村直子.
2. 発表標題 マウス成熟培地への抗酸化剤添加による老齡卵子の染色体異数性の低減と産仔生産の向上.
3. 学会等名 第71回東北畜産学会.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川口菜摘、藤井 順逸、木村 直子.
2. 発表標題 体外成熟-体外受精させたSOD1遺伝子欠損マウス卵でみられる極体放出不全.
3. 学会等名 第115日本繁殖生物学会大会.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富岡千夏、尾池緩子、佐々木 郁奈、木村直子.
2. 発表標題 マウス原始卵胞形成期におけるオートファジーの促進が卵巢内体細胞の増殖能に及ぼす影響.
3. 学会等名 日本畜産学会第130回大会.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川口菜摘、佐藤康子、木村直子.
2. 発表標題 体外成熟-受精(IVF)により卵割阻害されるSOD1遺伝子欠損マウス卵の減数分裂進行の評価.
3. 学会等名 第59回東北生殖医学会総会・学術講演会.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sasaki Ayana, Tomioka Chinatsu and Kimura Naoko.
2. 発表標題 Effects of oxidative stress on primordial follicle formation and follicle development in SOD1 deficient mice.
3. 学会等名 The 19th Asian-Australasian Association of Animal Production Animal Science Congress (AAAP 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sato Fuka, Tatehana Misako, Fujii Junichi and Kimura Naoko.
2. 発表標題 Two-cell development arrest by DNA damage-induced cell cycle checkpoint in SOD1-deficient mouse embryos.
3. 学会等名 The 19th Asian-Australasian Association of Animal Production Animal Science Congress (AAAP 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤風花、館花美沙子、藤井順逸、木村直子
2. 発表標題 SOD1遺伝子欠損マウス培養卵でみられる2細胞期発生停止時期の解析
3. 学会等名 第58回東北生殖医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅野拳、佐々木郁奈、尾池緩子、木村直子
2. 発表標題 マウス新生仔期の卵胞発育に及ぼすTNF リガンド阻害剤の影響
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾池緩子、佐々木将、梅野拳、佐々木郁奈、木村直子
2. 発表標題 新生仔雌マウスへのオートファジー促進による原始卵胞数の増加と維持機構の解明
3. 学会等名 日本畜産学会第129回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木郁奈、梅野拳、尾池緩子、木村直子
2. 発表標題 マウス新生仔期の卵胞形成における酸化ストレスの影響
3. 学会等名 第70回東北畜産学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村直子、小原瑞歩、梅野拳、尾池緩子
2. 発表標題 新生仔期雌マウスの原始卵胞形成に及ぼすグルコルチコイドの影響
3. 学会等名 第62回日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小原瑞歩、梅野拳、木村直子
2. 発表標題 マウスの原始卵胞形成過程におけるグルコルチコイド経路の関与
3. 学会等名 第36回日本生殖免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梅野拳、八木橋美里、小原瑞歩、佐々木将、木村直子
2. 発表標題 新生仔雌マウスの卵巣培養におけるオートファジー誘導剤添加の効果
3. 学会等名 第61回日本卵子学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村直子、中村洸瑛、新井緋里、梅野拳
2. 発表標題 成熟培地へのN-Acetyl L-Cysteineの添加は老齢個体マウス由来卵の産仔数を向上させる
3. 学会等名 第38回受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梅野拳、小原瑞歩、木村直子
2. 発表標題 新生仔マウスへのTNF- α リガンド阻害剤の投与が原始卵胞形成と生殖能に及ぼす影響
3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 木村直子（分担執筆）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 5
3. 書名 スキルアップARTラボ-生殖補助医療の必須知識とテクニック、柴原浩章（編著）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究成果に関するHP

山形大学・農学部・食料生命環境学科・動物機能調節学分野HP内のトピックス

- 1 . <https://www.tr.yamagata-u.ac.jp/~animal-reprod./sub3.html>
- 2 . <https://www.tr.yamagata-u.ac.jp/~animal-reprod./sub9.html>

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
---------	---------