

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：2009～2011

課題番号：21200018

研究課題名（和文） 卵子大量調製系で探る、哺乳動物卵子のなりたちと新しい利用法

研究課題名（英文） Development of the mechanism of mammalian oocyte generation and novel utilization using large scale oocyte production.

研究代表者

本多 新 (HONDA ARATA)

独立行政法人理化学研究所・遺伝工学基盤技術室・客員研究員 研究者番号：10373367

研究成果の概要（和文）：

生命の源でもある生殖細胞では、非常に緻密で複雑な機構を経て発育・成熟することにより、種存続の安全性が確保されている。本研究により卵子を1匹の雌産仔から1000個以上の質の高い卵子を回収する方法を見いだしただけでなく、それらの卵子と卵巣体細胞による再構築卵巣法を駆使し、MII卵子にまで成熟させることにも成功した。また、今まで明らかにされてなかった卵子のアポトーシスの新機構にも迫ることができると実験系の開発にも成功した。

研究成果の概要（英文）：

Although neonatal mammalian ovaries contain many nongrowing primordial oocytes, most degenerate and only a few contribute to the oocyte pool in the mature ovary. If these arrested neonatal primordial oocytes could be rescued effectively, they would form a potentially valuable source for research, clinical, and zoological purposes. In this research, we developed a follicle-free culture system that enables a large number of arrested oocytes to develop in vitro. By selective culture of ovarian cells from newborn (2–4 days old) mice, spherical colonies consisting exclusively of primordial oocytes and putative thecal stem cells were obtained. Upon treatment with a stem cell factor (c-kit ligand), these embedded oocytes were released from the colonies. The released oocytes—more than 800 per animal—continued to develop without any supporting cells, formed a zona pellucida, and were able to fuse with spermatozoa. This culture system provides a unique experimental model for studying the mechanisms of oogenesis, as it can supply many granulosa cell-free oocytes at specific stages. We successfully generated MII oocytes using ectopic transplantation method that was constructed by in vitro cultured oocytes and neonatal ovarian somatic cells. Furthermore, we noticed a novel oocyte apoptosis mechanism which is controlled by oocyte autonomously.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2010年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2011年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
総計	22,300,000	6,690,000	28,990,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：卵子、発生工学、培養、生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞の体外培養系は古くから挑戦されているが、大量かつ再現性良く成功している例はほとんどない。最近になって精子幹細胞である Germline stem cell (GS 細胞)の体外培養法が見いだされたものの、体外での精子形成までには至っていない。一方、精子と異なり、卵子はその幹細胞さえ見いだされていないだけでなく、量的・質的な制限があり、多量に調製するには非常に多くの困難がある。そのため、多量の卵子を用いた研究はカエルなどの両生類による研究が先行してきた。哺乳動物一匹の雌から発育・成熟が完了して排卵される卵子は微少である。また、卵巣内卵子は比較的多く存在しているが、卵胞に包まれた状態であり、この卵胞構成体細胞と Gap junction で強固に密着しているため、卵子だけを良好な状態で調製するのは難しい。

また、生後間もなくアポトーシスによって多くの卵子が失われてしまうことも、卵子研究の難しさを助長している。さらに、哺乳動物卵子の体外培養系では顆粒膜細胞が必要不

可欠とされており、体細胞との相互作用によって発育・成熟が促進されると考えられてきたことなどからも、卵子の体外大量培養系に明確な道はまったくと言っていいほど見えていなかった。

2. 研究の目的

これまで哺乳動物の生殖研究において、卵子の持つ神秘的な能力にメスをいれるにはあまりにも量が少なく、大規模な解析が非常に困難であった。一方、精細胞や精子は大量調製が可能であることから、精子形成や受精等の分子メカニズムなどに関してもプロテオーム解析やDNAマイクロアレイ解析などが容易で、様々な知見が蓄積されてきた。卵子を大量に調製することができれば、精子と同様の研究展開を期待できるだけでなく、卵子に備わっているリプログラミング能などの優れた能力を利用する道も開ける。本申請課題は、代表者が考案した莢膜幹細胞樹立系を応用することにより、体外でマウス新生仔卵巣から効率よく発育期卵子を取り出し、

さらにそれを発育させることに成功した研究を利用する。

本研究は

1. 卵子大量調製系をより改善し、卵子の発育・成熟効率を高める。
2. 大量調製した卵子から産仔を作出し、この卵子の個体発生能を評価する。
3. 体外培養過程の各段階で分けて回収し、mRNA やタンパク質を調製して卵子形成や卵子発育段階を分子生物学的・生化学的に比較評価する。
4. 卵子細胞質に備わっているリプログラミング能を調べるために、精子や体細胞へ卵子細胞質タンパク質を作用させて、その変化を解析する。

といった4つの柱を軸として展開する。本課題は大量に調製した卵子を解析に供し、これまで見えなかった“卵子の本質”を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

これまでに代表者が成功した卵子体外調製法は、非常に多くの数の発育期卵子を体外で調製でき、培地の組成や体細胞の影響などによってその生存率や発育状態をコントロールすることも可能である。このシステムを利用して研究目的を達成するために、

1. より質の高い卵子の発育・成熟法の開発
2. 体外調製（発育）卵子由来の胚もしくは産仔の作出
3. 発育段階における卵子内変化の解析
4. 卵子細胞質のリプログラミング能評価

の四つの研究計画を立案し実験を行った。代表者らが考案した方法で調整した卵子の有効な利用法を示すことができれば、生殖生物学、実験動物学、繁殖生物学など当該研究分

野に革新的な進展をもたらすさきがけ的な役割を果たすと確信している。

4. 研究成果

本研究解析から、体外で調製した卵子を1匹の雌産仔から1000個以上の質の高い状態で回収する方法を見いだすだけでなく、それらの卵子と卵巣体細胞による再構築卵巣法を駆使し、MII卵子にまで成熟させることにも成功した。現在は、この卵子を用いて顕微授精を行い、産仔への発生能を解析しているところである。問題点としては、MIIにまで成熟する卵子数が少ないことであるが、ホルモンの投与などにより改善される可能性が高いと考えられ、現在解析中である。

また、これら卵子を顆粒膜細胞に包まれない裸の状態でも長期間培養する技術の利点を最大限に発揮するために、いくつかの成長因子や化学物質を培地に添加し、卵子に直接作用させることにより、顆粒膜細胞や莖膜細胞の関与といったノイズを省いた状態で卵子の挙動を解析することも可能となり、実際に卵子の成熟に重要であると考えられている因子が、成熟だけでなく卵子のアポトーシスにも機能している可能性を見いだした。これは、本実験系を駆使したからこそ明らかになってきた知見であり、より詳細な解析により今まで明らかにされてなかった卵子のアポトーシスの新機構にも迫ることができると考えている。

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2件）

1 : Arata Honda, Michiko Hirose, Kimiko Inoue, Hitoshi Hiura, Hiromi Miki, Narumi Ogonuki, Michihiko Sugimoto, Kuniya Abe,

Mito Kanatsu-Shinohara, Tomohiro Kono,
Takashi Shinohara, Atsuo Ogura.

Large-scale production of growing oocytes *in vitro* from neonatal mouse ovaries.

International Journal of Developmental Biology (2009) 53: pp. 605-613. 査読有

2 : **本多 新**、小倉 淳郎
新生仔マウス卵巣から分離された莢膜幹細胞と卵子の特徴について
日本繁殖生物学会誌 (2010), vol. 15, 19-24
査読無

〔学会発表〕 (計 1 件)

本多 新. 実験動物の新規幹細胞樹立技術とその理用法の開発. 第 58 回日本実験動物学会総会. 東京、5 月 (2011)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 新 (HONDA ARATA)

独立行政法人理化学研究所・遺伝工学基盤技術室・客員研究員

研究者番号：1 0 3 7 3 3 6 7

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし