

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：14501
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22380151
 研究課題名（和文）卵巣機能の解体と卵子形成機能の抽出・再構築による卵母細胞発育培養系の開発
 研究課題名（英文）Dissection of various ovarian functions, and extraction and reconstruction of oogenesis-specific functions to develop oocyte growth culture systems for domestic animals
 研究代表者
 宮野 隆（MIYANO TAKASHI）
 神戸大学・大学院農学研究科・教授
 研究者番号：80200195

研究成果の概要（和文）：ウシおよびブタの原始卵胞は、体外培養によって一次卵胞を超えては発達しなかった。ウシの二次卵胞内の卵母細胞は、血漿を添加した培養液中で発育した。ウシの初期卵胞より採取した卵母細胞をポリビニルピロリドン、エストラジオール 17β およびアンドロステンジオンを含む培養液中で培養すると、卵母細胞は高率に発育し、成熟能力を獲得した。ブタの初期卵胞より採取した卵母細胞を FSH, dbcAMP およびエストラジオール 17β 添加した培養液中で培養すると、卵母細胞は高率に発育し、成熟する能力を獲得した。

研究成果の概要（英文）：Bovine and porcine primordial follicles did not develop beyond the primary stage in culture. Bovine secondary follicles develop in the bovine plasma-supplemented medium, and the oocytes (approximately 60 μm in diameter) grew to 90 μm or more after 4 weeks. The medium containing a high concentration of polyvinylpyrrolidone, estradiol-17β and androstenedione supported the growth and acquisition of meiotic competence of bovine growing oocytes (90-100 μm in diameter) isolated from early antral follicles. Porcine growing oocytes from early antral follicles grew to the final size and acquired the meiotic competence in the medium containing FSH, dbcAMP and estradiol-17β.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：動物生命科学・統合動物科学

キーワード：卵母細胞・卵巣・卵胞・体外培養

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞の登場によって、人工的な臓器・組織の作出や特定の細胞への分化誘導技術の開発がにわかに現実味を増している。卵子

や精子といった生殖細胞も例外ではない。しかし、卵子形成に不可欠な環境である「卵巣の機能」を踏まえた議論は未だに少ない。ES 細胞や体性幹細胞から「卵母細胞様の細胞」

が形作られることはこれまで Hubner K ら (Science, 2003; 300: 1251-1256) や Dyce PW ら (Nature Cell Biol, 2006; 8: 384-390) によって報告されているものの、いずれの卵母細胞様の細胞も完全に成熟する能力は持たず、受精、発生もしない。何らかの決定的な要因が欠けているのである。

マウスでは、1996年に卵巣内の最も小さな原始卵胞中の卵母細胞を完全に体外で発育させ、この卵母細胞に由来する産仔が得られているが (Eppig JJ, O'Brien MJ, Biol Reprod, 1996; 54: 197-207)、マウス以外の動物種では原始卵胞内の卵母細胞を人為的に発育させる培養技術は未だ開発されていない。マウス以外の動物種としては、1999年の申請者らの報告 (Yamamoto K ら, Theriogenology, 1999; 52: 81-89) と研究分担者の平尾らの報告 (Biol Reprod, 2004; 70: 83-91) が、ウシ卵巣内の卵母細胞から産仔作出した成功例としてあるが、いずれも初期胞状卵胞から採取した直径 90~99 μm の発育途上の卵母細胞を2週間にわたって体外培養して発育させたに過ぎず、より小さな二次卵胞や原始卵胞由来の卵母細胞から産仔は得られていない。

iPS細胞に限らず、優れた卵子形成システムを作り上げるには、必ず埋めなければならない大きな問題が存在する。卵巣の持つ「卵子形成機能」と「内分泌機能」は良く知られているが、哺乳類は進化の過程で胎生機構を確立し、その過程で卵巣は「卵母細胞/卵胞の選抜・淘汰機能 (一度に多数の卵子が成熟し排卵されることを抑制する機能)」と「妊娠維持機能」を備えたと考えられる。また、申請者らのこれまでの家畜の卵巣を用いた研究から、卵巣には一度に多くの卵母細胞が発育を開始することを抑え、長い生殖期間を可能とするための「卵母細胞の発育休止 (貯蔵) 機能」が存在することも明らかになりつつある。哺乳類の「卵巣機能」は、このような複数でおそらく相互作用し合う複雑な機能群によって構成されており、動物の繁殖のために受け持つこれらの卵巣の機能の中には「卵子形成機能」とは相反する機能も含まれていると考えられる。

2. 研究の目的

哺乳類の卵巣の機能は、胎生にまつわる複雑な機能群で構成されており、その中には「卵子形成機能」と相反する機能も含まれていると考えられる。本研究では、卵母細胞の体外培養技術を用いて、卵巣で絡み合う複雑な機能群を一旦解体し、卵子形成に必要な機能を抽出し、再構築する。これによって家畜の卵巣内に多数存在する卵母細胞の新規な体外培養系を作り上げる。

3. 研究の方法

ウシおよびブタの卵巣を用い、卵子形成にかかわる卵巣機能の解体、卵子形成機能の抽出および卵巣機能の再構築の順で研究を進める。卵巣機能の解体・抽出実験は、卵胞の発達段階によって、原始卵胞~二次卵胞、二次卵胞~初期胞状卵胞および初期胞状卵胞以降の3段階に分けて実施する。

原始卵胞 (卵母細胞の直径: ウシ, ブタともに 30 μm) の培養は、SCID (重症複合免疫不全症) マウスへの異種移植で発育することが確認されている新生仔のブタ卵巣より採取した原始卵胞 (Moniruzzaman M, Miyano T, J Reprod Dev, 2007; 53: 1273-1281) を含む卵巣組織片を用いる。また、と畜場より採取した成体のウシ卵巣より採取した原始卵胞を含む卵巣組織片も用いる。卵巣組織片を器官培養用ディッシュで培養し、培養後の卵胞の発達を組織学的に調べる。

二次卵胞については、成体のウシの卵巣より採取した二次卵胞、および二次卵胞より採取した卵母細胞-顆粒膜細胞複合体を体外で培養する。

発育後期の卵母細胞については、ウシおよびブタの卵巣より採取した初期胞状卵胞を用いる。初期胞状卵胞より卵母細胞-卵丘細胞複合体を採取し、体外で培養する。

4. 研究成果

(1) 原始卵胞

ブタおよびウシ原始卵胞内の卵母細胞 (直径 30 μm) の発育開始を制御する分子機構について調べた。ウシ原始卵胞内の卵母細胞の発育開始は、ブタの原始卵胞と同様に、転写因子 FOXO3 によって抑制的に制御されることが、ウシ FOXO3 の siRNA 干渉実験によって示された。また、テストステロン処理によって、ブタ原始卵胞が発達を開始することが SCID マウスへの異種移植実験によって示唆された。

成体のウシの卵巣から原始卵胞を多く含む卵巣組織片を採取し、ウシ原始卵胞の生存性を維持する組織培養系を構築した。この系を用いて、原始卵胞の発達に及ぼす受容体型チロシンキナーゼ KIT のリガンド (KIT ligand) および Growth differentiation factor 9 (GDF9) の影響を調べた。原始卵胞を含む組織片を KIT ligand を 50, 100 および 200 ng/ml 添加した培養液中で1週間培養したが、KIT ligand に原始卵胞の発達開始を促進する効果はみられなかった。GDF9 を 100 および 200 ng/ml の濃度で添加したところ、原始卵胞の割合の有意な低下と一次卵胞の割合のわずかな上昇を認めた。しかし、卵胞はそれ以上発達しなかった。

10, 15 および 20 日齢のブタ卵巣皮質片に含まれる卵胞形成前の卵母細胞の割合は、日

齢が進むにつれて 27%から 13%へと有意に低下した。一方、一次卵胞の割合は日齢が進むにつれて上昇したことから、この間卵巣内において、卵胞形成前の卵母細胞は原始卵胞へと移行し、原始卵胞は発達を開始して一次卵胞へと移行することが示唆された。

10~20 日齢のブタ新生仔の原始卵胞を含む卵巣組織片を 2 週間培養したところ、卵母細胞は生存し続けたが、培養の過程で皮質片の体積は減少し、卵母細胞の密度が上昇した (図 1)。このため、げっ歯類において原始卵胞の発達開始や顆粒膜細胞の分裂を促進すると報告されている Fibroblast growth factor 2 (FGF2) を 50 および 100 ng/ml の濃度で培養液に添加し、10 日齢のブタ卵巣皮質片を 14 日間培養した。しかし、原始卵胞は発達を開始せず、FGF2 は皮質片中の体細胞数の減少にも影響を及ぼさなかった。

図 1. 7 日間体外培養した 10 日齢のブタ卵巣組織

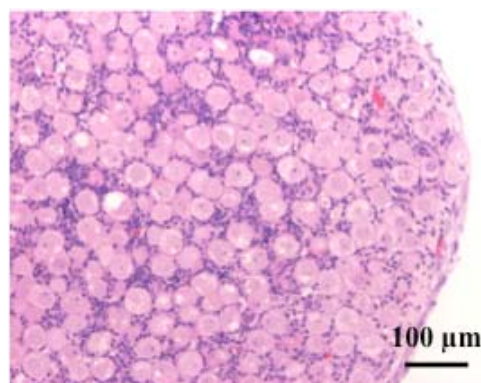
(2) 二次卵胞

ウシの二次卵胞内の卵母細胞 (直径 50~60 μm) を種々の方法で培養したところ、二次卵胞から取り出した卵母細胞-顆粒膜細胞複合体を培養する方法に比べて、二次卵胞を丸ごとコラーゼゲルに包埋し、血漿を添加した培養液中で培養すると、卵母細胞の生存率は高率に維持された。この培養系で 4 週間培養したところ、卵母細胞は直径 90~100 μm へと発育した。

(3) 初期胞状卵胞

高濃度のポリビニルピロリドンを含む培養液を用いた開放型培養系 (Hirao Y ら, Biol Reprod, 2004; 70: 83-91) を用いて、ウシの初期胞状卵胞より採取した卵母細胞-顆粒膜細胞複合体 (卵母細胞の直径: 90~100 μm) を 2 週間培養した。卵母細胞の発育培養には、複合体の下面からも培養液が到達するタイプの培養基質が有効であった。ポリビニルピロリドン添加培養液中で発育させたウシ卵母細胞では、卵丘細胞から卵母細胞へ伸びてその先端でギャップ結合を形成する transzonal projections の数が無添加の培養液におけるよりも多かった。

発育培養液にステロイドホルモンのエストラジオール 17 β を添加すると発育途上のウシ卵母細胞が高率に生存し、直径 120 μm へと発育した (図 2)。しかし、その後の成熟率は低かった。一方、アンドロステンジオンを添加すると生存率は低いものの卵母細胞は成熟能力を獲得した。これら両ホルモンを組み合わせると、卵母細胞が高率に発育し、成熟能力を獲得する (70~80%) ことが明らかとなった。また、2 週間培養したウシ体外



発育卵母細胞はリプログラミング能力を獲得しうること、レシピエント卵子として核移植に利用できることが明らかとなった。

平均直径約 100 μm と 105 μm のウシ卵母細胞を 2 週間培養したところ、いずれも平均直径 120 μm 以上へと発育したが、体外受精後の胚発生率は 105 μm の群がより高く (38% vs. 12%)、胚発生能力の獲得には直径増大後の卵母細胞の変化も重要であることが示唆された。

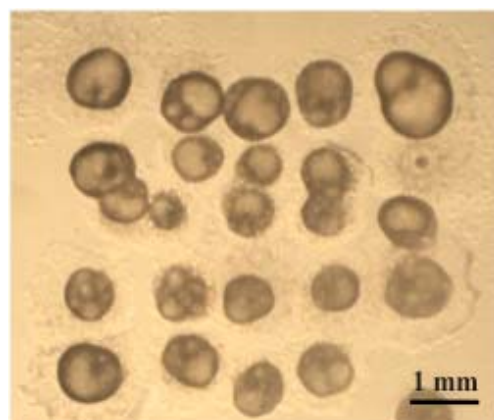


図 2. ウシ初期胞状卵胞の卵母細胞-顆粒膜細胞複合体を開放型培養系で培養すると、卵胞腔様の構造を発達させ、その内部で卵母細胞は発育した。

ブタの初期胞状卵胞中の成熟能力のない直径約 110 μm の卵母細胞を FSH を添加した培養液中で 5 日間培養すると、卵母細胞は顆粒膜細胞に包まれた状態で直径 120 μm へと発育したが、その後の成熟率は低かった (11%)。培養液にさらに dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP) を添加すると卵母細胞は発育し、その後の成熟培養によって高率に (68%) 第二減数分裂中期へと成熟した。しかし、成熟過程で卵丘は膨潤化しなかった。発育培養液にエストラジオール 17 β をさらに添加すると、卵母細胞の成熟に加えて卵丘の膨潤化が起こった。得られた成熟卵の一部は胚盤胞へと発生した。

本研究では、原始卵胞や二次卵胞内の卵母細胞を体外で培養して成熟能力を獲得させるには至らなかったが、初期胞状卵胞より採取した卵母細胞-顆粒膜細胞複合体については、卵母細胞を最終の直径へと発育させ、70~80%が成熟能力を獲得し得る培養系を構築することができた。このことは、適切な条件を整え、必要な因子を適宜培養液に補えば、卵母細胞の生存性を維持したまま発育させ、高率に成熟・発育能力を獲得させることが可能なことを示唆している。卵巣内では、卵胞の発育過程で選抜が起こり、多数の卵胞は閉鎖し、卵母細胞はその発育過程から脱落する。本研究結果は、この卵巣内で起こる「卵母細胞/卵胞選抜機構」は体外では存在しないかあるいは機能しないこと、また、卵胞選抜は卵母細胞-顆粒膜細胞以外の要因によって引き起こされることを示唆している。

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 18 件)

- ① Taketsuru H, Hirao Y, Takenouchi N, Iga K, Miyano T. Effect of androstenedione on the growth and meiotic competence of bovine oocytes from early antral follicles, Zygote, 査読有, 20 巻, 2012, 407-415
DOI: 10.1017/S0967199411000268
- ② Naruse K, Iga K, Shimizu M, Takenouchi N, Akagi S, Somfai T, Hirao Y. Milrinone treatment of bovine oocytes during in vitro maturation benefits production of nuclear transfer embryos by improving enucleation rate and developmental competence. Journal of Reproduction and Development, 査読有, 58 巻, 2012, 476-483
DOI: 10.1262/jrd.2012-010
- ③ Hirao Y, Shimizu M, Iga K, Takenouchi N. Optimization of oxygen concentration for growing bovine oocytes in vitro: constant low and high oxygen concentrations compromise the yield of fully grown oocytes. Journal of Reproduction and Development, 査読有, 58 巻, 2012, 204-211
DOI: 10.1262/jrd.11-132M
- ④ Hirao Y. Isolation of ovarian components essential for growth and development of mammalian oocytes in vitro. Journal of Reproduction and Development, 査読有, 58 巻, 2012, 167-174
DOI: 10.1262/jrd.2011-052
- ⑤ 宮野 隆. 卵母細胞の発育・成熟と減数分裂. Journal of Mammalian Ova Research, 日本哺乳動物卵子学会第 4 回生殖補助医療胚培養士セミナー要旨集, 査読無, 2012, 8-12
- ⑥ Kashiwagi Y, Moniruzzaman M, Miyano T. Foxo3 negatively regulates the activation of mouse primordial oocytes. Reproductive Medicine and Biology, 査読有, 11 巻, 2012, 193-199
DOI: 10.1007/s12522-012-0128-7
- ⑦ Hirao Y. Oocyte growth in vitro: potential model for studies of oocyte-granulosa cell interactions. Reproductive Medicine and Biology, 査読有, 11 巻, 2012, 1-9
DOI: 10.1007/s12522-011-0096-3
- ⑧ 宮野 隆, 平尾雄二. 卵母細胞の発育制御機構. Hormone Frontier in Gynecology, 査読無, 18 巻, 2011, 365-370
- ⑨ Hirao Y. Conditions affecting growth and developmental competence of mammalian oocytes in vitro. Animal Science Journal, 査読有, 82 巻, 2011, 187-197
DOI: 10.1111/j.1740-0929.2010.00870.x
- ⑩ Bao RM, Hayakawa K, Moniruzzaman M, Taketsuru H, Miyano T. FOXO3 knockdown accelerates development of bovine primordial follicles. Journal of Reproduction and Development, 査読有, 57 巻, 2011, 465-480
DOI: 10.1262/jrd.11-013H
- ⑪ Cayo-Colca IS, Yamagami Y, Phan TC, Miyano T. A combination of FSH and dibutyryl cyclic AMP promote growth and acquisition of meiotic competence of oocytes from early porcine antral follicles. Theriogenology, 査読有, 75 巻, 2011, 1602-1612
DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.12.023
- ⑫ Cayo-Colca IS, Harayama H, Miyano T. Effect of H89 on the meiotic resumption of pig oocytes. Reproductive Medicine and Biology, 査読有, 10 巻, 2011, 89-96
DOI: 10.1007/s12522-010-0073-2
- ⑬ Magamage MPS, Moniruzzaman M, Miyano T. Effect of KIT ligand on the viability of porcine primordial follicles in vitro. Journal of Mammalian Ova Research, 査読有, 28 巻, 2011, 61-67
DOI: 10.1274/jmor.28.61
- ⑭ Hirashima Y, Moniruzzaman M, Miyano T. p27^{Kip1} negatively regulates the

activation of murine primordial oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, 査読有, 57 巻, 2011, 217-222

DOI: 10.1262/jrd.10-119H

- ⑮ Magamage MPS, Zengyo M, Moniruzzaman M, Miyano T. Testosterone induces activation of porcine primordial follicles in vitro. *Reproductive Medicine and Biology*, 査読有, 10 巻, 2011, 21-30
DOI: 10.1007/s12522-010-0068-z
- ⑯ Taketsuru H, Takajo A, Bao RM, Hamawaki A, Yoshikawa M, Miyano T. Bovine oocytes in secondary follicles grow in medium containing bovine plasma after vitrification. *Journal of Reproduction and Development*, 査読有, 57 巻, 2011, 99-106
DOI: 10.1262/jrd.10-047H
- ⑰ Moniruzzaman M, Miyano T. Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals. *Journal of Reproduction and Development*, 査読有, 56 巻, 2010, 559-566
DOI: 10.1262/jrd.10-071H
- ⑱ Bao RM, Yamasaka E, Moniruzzaman M, Hamawaki A, Yoshikawa M, Miyano T. Development of vitrified bovine primordial follicles in xenografts. *Theriogenology*, 査読有, 74 巻, 2010, 817-827
DOI:10.1016/j.theriogenology.2010.04.006

[学会発表] (計 15 件)

- ① 宮野 隆. 卵母細胞の発育制御機構. 日本生殖再生医学会第 8 回学術集会, 2013 年 3 月 10 日, シェーンバッハ・サボー (東京)
- ② Mizumachi S, Sasaki K, Matsubara K, Hirao Y. Effect of polyvinylpyrrolidone supplementation in culture medium on the growth of mouse oocytes. 39th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (IETS), 2013 年 1 月 21 日, Hannover Congress Centrum (ハノーバー, ドイツ)
- ③ Miyano T, Hirao Y. Culture systems for growing oocytes. The 9th Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society, 2012 年 10 月 23 ~28 日, EDSA Shangri-La Hotel (マニラ, フィリピン)
- ④ 宮野 隆. 卵母細胞の発育・成熟と減数分裂. 日本哺乳動物卵子学会第 4 回生殖補助医療胚培養士セミナー, 2012 年 9 月 23 日, JA 共済ビル (東京)
- ⑤ 牧田美穂, 平尾雄二, 宮野 隆. ウシ卵母

細胞の体外での発育と成熟能力の獲得に及ぼすエストロジオール 17 β およびアンドロステジオンの影響, 第 105 回日本繁殖生物学会大会, 2012 年 9 月 5~8 日, 筑波大学 (つくば市)

- ⑥ 平尾雄二. 未熟卵, 卵胞の体外培養. 第 30 回日本受精着床学会学術講演会, 2012 年 8 月 30 日, リーガロイヤルホテル大阪 (大阪市)
- ⑦ 平尾雄二, 成瀬健司, 金田正弘, Somfai T, 伊賀浩輔, 志水 学, 赤木悟史, 永井 卓, 竹之内直樹. ウシ発育途上卵母細胞の体外発育からクローン牛の作成まで. 第 53 回日本哺乳動物卵子学会, 2012 年 5 月 26 日, 千里ライフサイエンスセンター (豊中市)
- ⑧ Miyano T, Ogushi S, Kyogoku H, Fulka JJr. Nuclei and nucleoli in pig oocytes. The 8th Annual Meeting of Asian Reproductive Biotechnology Society, 2011 年 10 月 26 日, Lijiang Waterfall Hotel (桂林, 中国)
- ⑨ 平尾雄二, 成瀬健司, 金田正弘, Somfai T, 伊賀浩輔, 志水 学, 赤木悟史, 永井 卓, 竹之内直樹. Production of a cloned calf using recipient cytoplasm derived from oocytes grown in vitro. The Second World Congress on Reproductive Biology, 2011 年 10 月 10 日, Cairns Convention Center (ケアンズ, オーストラリア)
- ⑩ Hirao Y. Isolation of ovarian components essential for oocyte growth in vitro. 日本繁殖生物学会第 104 回大会, 日本・ポーランド二国間交流事業共同セミナー, 2011 年 9 月 14 日, いわて県民情報交流センター・アイーナ (盛岡市)
- ⑪ 平尾雄二, 成瀬健司, 伊賀浩輔, 竹之内直樹. ガラス化保存後に体外発育させたウシ卵母細胞の成熟能力. 第 52 回日本哺乳動物卵子学会, 2011 年 5 月 21 日, 国際医療福祉大学 (大田原市)
- ⑫ Miyano T, Moniruzzaman M. Inactivation of primordial oocytes. The 7th Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society, 2010 年 11 月 8~12 日, Equatorial Hotel (クアラルンプール, マレーシア)
- ⑬ Miyano T, Moniruzzaman M. Activation and inactivation of primordial oocytes. Czech- Japan Joint Symposium for Animal Reproduction, 2010 年 9 月 20~21 日, Chateau Liblice (チェコ)
- ⑭ 平尾雄二, 伊賀浩輔, 成瀬健司, 竹之内直樹. ウシ発育途上卵母細胞による in vitro での顆粒膜細胞の増殖促進と黄体化抑制. 第 103 回日本繁殖生物学会大会, 2010 年 9 月 2 日, 北里大学 (十和田市)

- ⑮ Moniruzzaman M, Hirashima Y, Miyano T. Knockdown of p27^{Kip1} induces the growth of oocytes in mice. SRF Conference 2010, 2010年7月11~13日, University of Nottingham (ノッティンガム, UK)

[図書] (計4件)

- ① Somfai T, 平尾雄二. Humana Press (New York, USA), Chapter 14: Synchronization of in vitro maturation in porcine oocytes. In “Methods in Molecular Biology” (Banfalvi G, ed.), 2011, pp. 211-225, 295 ページ
- ② 宮野 隆. 朝倉書店 (東京), 卵子 (卵胞) 形成と雌の性周期, 「新動物生殖学」, 佐藤英明 編, 2011, pp. 84-94, 203 ページ
- ③ 宮野 隆. 近代出版 (東京), III-1 卵子の形成・成熟および排卵の機構 (動物), 「生命の誕生に向けて (第二版)」, 2011, pp. 35-41, 303 ページ
- ④ 平尾雄二. 近代出版 (東京), III-3 未成熟卵子の体外成熟法 (動物), 「生命の誕生に向けて (第二版)」, 2011, pp. 47-50, 303 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮野 隆 (MIYANO TAKASHI)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 80200195

(2) 研究分担者

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・畜産草地研究所・上席研究員
研究者番号: 10355349