

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462485

研究課題名(和文) 経時的連続観察を利用した卵巣体外培養系の確立と応用

研究課題名(英文) time-lapse observations for ovarian

研究代表者

後藤 真紀 (Goto, Maki)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：90378125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス卵巣切片を各種増殖因子添加下に培養し、経時的連続観察による卵胞発育や顆粒膜細胞増殖能について評価した。GDF-9およびbFGFは顆粒膜細胞増殖能を有意に亢進させた。TGF- β は有意差は認めないものの増殖能亢進傾向を示した。BMP-4およびmTOR activatorは増殖能に影響しなかった。いずれの投与群においても卵胞発育速度促進、成熟卵獲得数も増加した。発育卵胞中の卵母細胞径の測定は成熟度の推測に有用であった。経時的連続観察下の卵巣組織培養は卵胞発育と卵母細胞成熟度の比較評価に有用であり、GDF-9およびbFGFは卵巣組織体外培養系において卵胞発育促進効果を持つことを示した。

研究成果の概要(英文)：follicles and the development of early-stage follicles after cultivation in the presence of various growth factors, through the use of immunostained with BrdU. In the groups to which GDF-9 or bFGF had been added, the percentage of BrdU-positive granulosa cells was significantly higher than in the other groups. When comparing the groups to which these growth factors had been continuously added for one week with the groups to which these growth factors had only been added on Day 6 and 7, the same percentage of BrdU-positive granulosa cells was obtained. In the groups to which BMP-4 or mTOR activator had been added, no significant changes in the BrdU-positive rates were observed compared to the control groups. This study showed that the use of BrdU immunostaining in cultured murine ovarian tissues is useful for evaluating which growth factors play a role in the early stages of follicular development.

研究分野：生殖内分泌

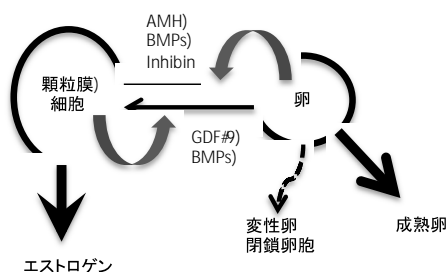
キーワード：卵巣組織培養 体外培養 顆粒膜細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の生殖医学の進歩により、多くの不妊症は治療可能となってきたが、代表的な医療技術である体外受精・顕微授精・胚移植の妊娠/生産率には限界点がある。原因の大部分は卵や胚の質的問題と考えられているが、卵巣における配偶子形成、すなわち卵胞発育と卵の成熟についてはその研究が困難なこともあり、いまだ未解明な点も多い。近年は、ゴナドトロピン以外にも卵巣自体で産生される局所因子が卵胞成熟を制御していると考えられ、卵の発育・成熟の過程においては卵とその周囲の顆粒膜細胞との相互作用が非常に重要であると言える。これまでに Growth differentiation factor-9 (GDF-9) や Bone morphogenetic proteins (BMPs) などが、この相互作用のシグナル伝達物質として報告されているが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない(図1)。

図1. 卵成熟機構の相互作用



また、卵巣皮質には出生時には数十万個の原始卵胞が存在するが、加齢による影響等を受け、多くは閉鎖卵胞に至るため、成熟卵胞に発育するものはごく一部である。早発卵巣機能不全 (premature ovarian failure: POF) 患者の多くでは、卵巣内での原始卵胞が極端に減少し、FSH 製剤による排卵誘発効果が乏しいことが知られているが、病因の詳細は明らかでなく、根本的治療法は確立されていない。また、近年は悪性腫瘍患者などにおける抗がん剤や放射線治療前の妊孕能温存が生命予後の改善とともに、注目されている。妊孕性温存対策として、胚および卵子凍結保

存、卵巣凍結などが実施されているが、胚および卵子凍結保存では、凍結可能数が少ない、現疾患の治療開始が遅れる場合があるなど、また卵巣凍結では凍結卵巣組織を再度移植することによる悪性腫瘍の再発の懸念など課題も多い。

2. 研究の目的

我々は卵と顆粒膜細胞の相互作用に着目することで、未熟な卵を成熟卵へと発育させるメカニズムを解明し、これを応用して卵巣組織から原始卵胞を体外培養し成熟卵胞まで発育させる技術を確認することを本研究の目的とした。これは、POF 症例に対しては残存する原始卵胞からの成熟卵獲得を、妊孕能温存を必要とする症例には、より効率的で安全な卵巣機能温存方法確立の可能性を示すものである。

3. 研究の方法

(1) 不死化ヒト非黄体化顆粒膜細胞株

/human nonluteinized granulosa cell line (HGrC) をもちいた検討:

HGrC を用いることで顆粒膜細胞の増殖を純粋に評価することが可能であり、細胞内のシグナル変化の評価や siRNA および cDNA 導入が可能である。卵由来もしくは顆粒膜細胞由来で、卵 顆粒膜細胞相互作用に関連し、オートクライン、パラクラインに作用する物質 (GDF-9, BMP4,6,7, AMH, FSH) 顆粒膜細胞内増殖制御シグナルに関する物質 (mTOR inhibitor/activator, PTEN inhibitor) 投与を投与し、増殖能を BrdU アッセイにて評価する

(2) 卵巣組織培養ならびに経時的観察 (マウス):

原始卵胞や 2 次卵胞の単離培養は困難であり、体外培養では、初期卵胞培養は組織培養が有利であり、二次卵胞以降は卵胞培養

を用いるのが有利であると考えられる。このため細切したマウス卵巣皮質の組織培養を行い、HGrCを用いた検討と同様の各種因子を添加し組織培養を行った。顆粒膜細胞増殖評価のBrdUパルスチェイスによる取り込み評価、卵胞発育評価（各発育段階の卵胞数のカウント）、タイムラプスによる卵胞発育（卵胞径や卵子径の計測）速度について検討した。

(3) 卵巣単離培養ならびに計時的観察（マウス）：

卵巣組織培養で得られた2次卵胞を単離し培養を行う。組織培養と同様に評価を行い、ヒト絨毛性ゴナドトロピンを投与し成熟卵を獲得する。

(4) 卵巣組織培養ならびに経時的観察（ヒト）：

マウス卵巣組織培養で得られた条件下にヒト卵巣組織培養を行い、成熟卵獲得を目指す。

4. 研究成果

(1) 不死化ヒト非黄体化顆粒膜細胞株

/human nonluteinized granulosa cell line

(HGrC)をもちいた検討：

GDF-9添加により、コレステロール合成経路に関与酵素のmRNA発現が増加し、FSH添加による相乗効果が得られた。これらの酵素には卵の減数分裂への関与がこれまでに報告されており、GDF-9/FSHがコレステロール合成経路を介して卵と卵胞発育の相互作用へ関連している可能性が示唆された。

(2) 卵巣組織培養ならびに経時的観察（マウス）：

8週齢マウス卵巣切片を経時的連続観察下に培養し、BrdUパルスチェイスにより卵胞内顆粒膜細胞への取り込みを確認した。

GDF-9, bFGF, IGF-1, TGF- β , BMP4/6/7, AMH, FSH, mTOR activator 添加による顆粒膜細胞増殖能を比較したところ、GDF-9, IGF-1 および bFGF は顆粒膜細胞増殖能を有意に亢進させた（図2）。

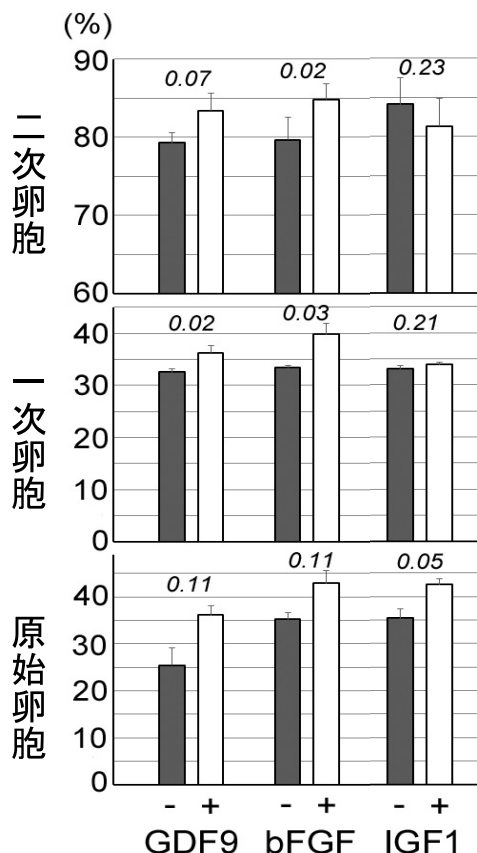


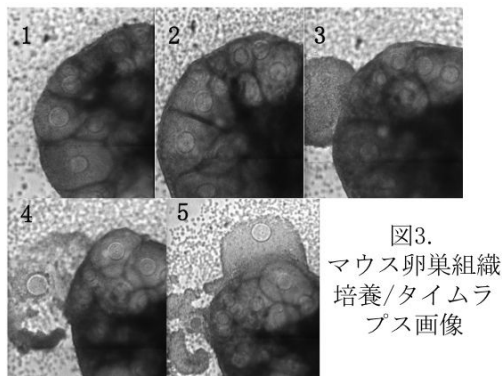
図2 各種因子刺激下における顆粒膜細胞増殖能の比較

BMP-4/6/7 および mTOR activator は増殖能に影響しなかった。

いずれの投与群においても卵胞発育速度や卵母細胞径の増加度は促進され、成熟卵獲得数も増加した。発育卵胞中の卵母細胞径の測定は成熟度の推測に有用であった。

経時的連続観察下の卵巣組織培養は卵胞発育と卵母細胞成熟度の比較評価に有用であり、GDF-9, IGF-1 および bFGF は卵巣組織体外培養系において卵胞発育促進効果を持つことを示した。

各種因子刺激下での培養ならびに連続観察によって、1次胞状卵胞から胞状卵胞、グラーフ卵胞への発育がみられ、ヒト絨毛性ゴナドトロピン投与によって、排卵に類似した卵子放出が確認された(図3)。



放出された卵子にはGV(germinal vesicle)卵から成熟卵までの各発育段階の卵が含まれていた。

(3) 卵巣組織培養ならびに経時的観察(ヒト):

手術検体より得られたヒト卵巣切片を用いて、組織培養ならびに経時的連続を行った。BrdUパルスチェイスによる卵胞内顆粒膜細胞への取り込みは、マウス卵巣と比較して弱いものであった。また、培養下での卵胞発育や成熟卵獲得にも至らなかった。このため、マウス卵巣組織培養にてBrdUパルスチェイスによる卵胞内顆粒膜細胞への取り込み亢進作用が認められた各種因子(GDF-9, IGF-1, TGF- および bFGF)の添加を行い組織培養を行ったが、培養条件により影響は弱く、有意な顆粒膜細胞増殖能亢進や卵胞発育亢進作用は認めなかった。今回のヒト卵巣組織体外培養で用いた卵巣切片については加齢による影響が大きいと考えられた。

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)

[学会発表](計 5件)

マウス卵巣組織培養による卵胞、卵母細胞の発育解析と顆粒膜細胞増殖の評価

邨瀬 智彦, 岩瀬 明, 仲西 菜月, 笠原 幸代, 永井 孝, 清水 顕, 石田 千晴, 加藤奈緒, 大須賀智子, 滝川 幸子, 後藤真紀, 吉川史隆

第69回日本産科婦人科学会学術講演会 2017.4.13-16 広島グリーンアリーナ(広島県広島市)

マウス卵巣組織培養における卵胞発育解析とBrdU免疫染色法による顆粒膜細胞増殖の評価

邨瀬 智彦, 岩瀬 明, 仲西 菜月, 笠原 幸代, 永井 孝, 清水 顕, 石田 千晴, 加藤奈緒, 大須賀智子, 滝川 幸子, 後藤真紀, 吉川史隆

第61回日本産科婦人科学会学術講演会 2016.11.3-4 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

マウス卵巣組織における初期卵胞発育因子の検討

邨瀬 智彦, 清水 顕, 石田 千晴, 笠原幸代, 加藤奈緒, 大須賀智子, 近藤美佳, 中村智子, 滝川幸子, 後藤真紀, 岩瀬 明, 吉川史隆

第68回日本産科婦人科学会学術講演会 2016.4.21-24 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

Analysis of the effect of growth factors on the early stage of follicular development in cultured murine ovarian tissue through the use of BrdU immunostaining
Murase T.

2016.3.16-19 63rd. Society for
Reproductive Investigation バンク
ーバー (カナダ)

mTOR アクチベーターはヒト顆粒膜細
胞の 4E-BP リン酸化と増殖を促す
邨瀬 智彦, 清水 顕, 石田 千
晴, 笠原幸代, 加藤奈緒, 大須賀智
子, 近藤美佳, 中村智子, 滝川幸子,
後藤真紀, 岩瀬 明, 吉川史隆
第 67 回日本産科婦人科学会学術講演
会 2015.4.9-12 パシフィコ横浜 (神
奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者 後藤真紀 (GOTO, Maki)
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師
研究者番号: 90378125

(2) 研究分担者
岩瀬明 (IWASE, Akira)
名古屋大学・医学部附属病院・病院教授
研究者番号: 20362246

研究分担者 中原辰夫 (NAKAHARA, Tatsuo)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 50534830

(3) 研究協力者
中村智子 (NAKAMURA, Tomoko)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 40732681

近藤美佳 (KONDO, Mika)
名古屋大学・大学院医学系研究科・大学
院生