原始卵胞の維持・発育のための体外微小環境の構築
In vitro culture of ovarian tissues for primordial follicle development

Smithsonian Conservation Biology Institute　　藤原　摩耶子
派遣期間　　2011 年 4 月 1 日～2013 年 3 月 31 日
研究機関　　Center for Species Survival, Smithsonian Conservation Biology Institute
Front Royal, VA 22630, United States
研究指導者　　Dr. David E. Wildt

The ability to grow immature follicles into mature counterparts containing oocytes capable of being fertilized and developing into healthy embryos have enormous benefit for rescuing and protecting genetic diversity. Before this practical goal can be achieved, it is necessary to improve our understanding of folliculogenesis and oogenesis. Using cat and dog models, I found that there are distinct species variations in basic nutrient requirement supporting the survival of primordial follicles, with the main difference being the amount of non-essential amino acids present in the culture medium. A key factor to enhancing survival of these follicles in culture appears to be the use of agarose gel, which enhances follicle viability, perhaps by promoting oxygen exchange. I next found that EGF plays a significant role in maintaining primordial follicle viability in the prepubertal cat. The mechanism of EGF action is via stimulation of MAPK and PI3K signaling pathways that, in turn, promote ovarian cell proliferation. This ability of cat ovarian cells to proliferate in reaction to EGF is age-dependent and highly responsive in prepubertal females. The findings will lay the foundations for establishing protocols to consistently grow follicles and produce oocytes in large mammals including endangered animals as well as human.

研究目的

近年生息地の破壊や密猟などで哺乳類の約 20%が絶滅の危機に瀕しており、野生イヌ科動物では 36 種中 6 種、野生ネコ科動物では 37 種中 16 種が国際自然保護連合 (IUCN) によって絶滅危惧種に指定されている[1]。オスの生殖能力を保存する精液凍結技術は様々な動物種で実用化されている。一方、卵子の凍結保存は、体外授精及び胚移植などの生殖介助技術と組み合わせることで、産仔作出可能なメスの生殖能力保全技術として多数の動物種で試みられてきた。しかし、マウスやヒト以外の動物種では凍結保存卵子を用いた産仔作出率は未だ低い。また、卵巣から一度に凍結可能な卵子を多く回収することも困難であり、精液の凍結保存技術のように幅広い動物種での実用化には至っていない。さらに、成熟卵子を持たない性成熟以前の女性や幼弱期の希少動物の生殖能力を保全することは不可能である。

出生時のメスの卵巣には一次卵母細胞が原始卵胞として数千～数万個保存されているが、そのほとんどは分化の過程で死滅する[2]。原始卵胞の体外発育が可能になれば、一個体から得られる受精可能な卵子の数は飛躍的に増加し、性成熟段階を問わずメスの生殖能力を保存する画期的な生殖介助技術になる。マウスでは原始卵胞由来の体外での発育卵子を用いた産仔作出が報告されているが[3]、大型動物は卵胞形成に有する期間や卵胞の大きさなど、卵胞発育過程においてマウスと異なる点が多く、マウスで確立した手法をそのまま適用することはできない。そのため、大型動物で原始卵胞の体外発育法を構築するためには、それぞれの動物種における卵胞発育過程の理解を深め、培養条件に反映させることが必要である。そこで私は、野生肉食動物のメスの生殖介助技術の開発を目指し、モデル動物としてイヌとネコを用いて原始卵胞が貯蔵されている卵巣皮質の体外培養法の検討を行った。

また、原始卵胞の維持・発育を体外で誘導するためには、原始卵胞の維持機構を明らかにし、体外での生存率を高めることが重要となる。しかし、大型

動物における原始卵胞の維持機構はほとんど解明されていない。そこで、幼弱期と性成熟後のネコの卵巣を用いて、原始卵胞の維持機構の解析を行った。

研究経過

1. イヌ及びネコの原始卵胞を維持する体外培養法及び培養条件に見られる種差の検討

まず初めに、異なる基礎培地(α-minimum essential medium (α-MEM) vs. minimum essential medium (MEM))、血清等の添加物 (10% fetal bovine serum (FBS) vs. 10% knock-out serum replacement (KSR) vs. 0.1% polyvinyl alcohol (PVA, protein free)) を用いてイヌ及びネコの卵巣皮質片を培養し、原始卵胞の生存性に与える影響をCalcein AM/Etidium staining によって調べた。その結果、イヌではα-MEMを用いることで、MEMよりも高い原始卵胞の生存率が得られた (培養15日目 ; 32.7% vs 8.1%, $p < 0.05$)。一方、ネコはα-MEMを用いた培地中では9日以上原始卵胞を維持できなかったのに対し、MEM中では培養15日目に37.5％の原始卵胞が維持されていることを観察した。α-MEMはMEMと比較し非必須アミノ酸含量が高いため、原始卵胞の栄養素要求量は動物種によって異なることが明らかになった。また、両種ともFBSおよびKSRの添加は原始卵胞の維持には必要とせず、FBSは原始卵胞の維持にむしろ悪影響を与える可能性が示唆された。

卵母細胞の生存と発育には卵胞内及びその周辺細胞との細胞間相互作用が必要であり、卵胞の体外維持には周辺細胞を含めて維持することが重要と考えられる。そこで、培養組織の足場としてセルカルチャーインサート及びアガロースゲルを用いることで、培養下での組織構造及び原始卵胞の維持を試みた。その結果、ネコでは、アガロースゲルおよびセルインサートを用いることで同程度、培養１５日目の原始卵胞の生存率が向上した。次にHematoxylin/Eosin (HE)染色による形態観察を行った結果、培養15日目には、どの手技を用いた場合も同程度に原始卵胞が形態的に維持されていた一方で、培養3日目の卵巣組織においてはアガロースゲルを用いることで他の手技に比べ優位に高い割合で原始卵胞を維持することが示された (agarose gel; 81.6% vs cell culture insert; 36.6%, $p < 0.05$)。次にイヌの卵巣を用いて検討を行った結果、アガロースゲルを用いることで培養３日目 (77.5%) 及び９日目 (59.3%) ともセルカルチャーインサートよりも優位に高い原始卵胞の生存率を得ることができた (Day 3, 60.0%; Day 15, 24.0%, $p < 0.05$) 。さらに培養条件に関わらず培養15日目までは、イヌの卵巣組織中に原始卵胞が生存することを確認したが、形態観察を行った結果、培養3日目移行には卵巣組織の劣化に伴い原始卵胞も萎縮していることがわかった。しかしながら、アガロースゲルを用いることで、形態的に正常な卵胞の数の割合がセルカルチャーインサートを利用した場合に比べ3倍以上向上することを示した (40.4% vs 7.8%、$p < 0.05$)。こうしたアガロースゲルの効果は、卵巣組織が組織構造を維持しながらアガロースゲルを介して培地中の養分を得る一方で、常に大気中に晒されることで卵子形成に必要な酸素の獲得も容易になったため、原始卵胞の維持に有効であったと考えられる。また、基礎培地の検討結果に加えて、イヌの原始卵胞の体外培養下での生存性および形態的な維持率はネコと比較し著しく低かったことから、動物種によって異なる原始卵胞の体外発育法の確立が必要であることが示された。

2. ネコ原始卵胞の維持機構の解析

次に、異なる性成熟段階（性成熟前 ; $\leq$ 6 mo、成体 $\geq$ 8mo）のネコの卵巣皮質を用いて、培養中の成長因子及びその下流因子がネコ原始卵胞へ与える影響を検討した。まず、上皮成長因子(EGF) または増殖分化因子(GDF9)を異なる濃度 (0, 50, 100, 200 ng/ml) で添加した培地中で卵巣皮質片を14日培養し、Calcein AM/Ethidium homodimer staining によって培養組織中の原始卵胞の生存性維持を調べた。その結果、幼弱期の卵巣において、100 ng/ml のEGFの培地中への添加により原始卵胞の生存率が著しく向上し、培養14日目の生存率はコントロール条件に比べ優位に高い78%以上であった ($p < 0.05$)。一方、より高い濃度のEGF (200ng/ml)、および全ての濃度のGDF9の添加では、幼弱卵巣中の原始卵胞の生存性維持に効果は見られなかった。また、成体の卵巣中で

は、EGFおよびGDF9のどちらも濃度に関わらず原始卵胞の生存性維持に効果は見られなかった。次に、HE染色による培養組織の形態観察を行ったところ、どの培養条件下でも卵胞および組織全体の維持が確認された。しかし、原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞の割合はEGFおよびGDF9の有無に関わらず培養前後で変化が見られなかったことから、これらの成長因子は原始卵胞の発育促進には関わっていないことがわかった。

次に、幼弱期のネコ卵巣中でEGFがどのように原始卵胞の維持に関与しているのかについて、EGF receptor、MAPK、PI3Kそれぞれの阻害剤 (AG1478S、U0126、LY294002) を用いて調べた。まずウェスタンブロッティングにより、EGFを添加した培養組織では、EGFの下流因子と考えられるmitogen-activated protein kinase (MAPK) 及び phosphoinositide 3-kinase (PI3K) のリン酸化が促進されたことを確認した。さらにEdU およびPCNA stainingを用いた細胞増殖の解析により、EGFは培養卵巣組織内の体細胞の増殖を促進し、培養14日目の組織内でも細胞分裂中の顆粒層細胞を持つ卵胞が観察された。次に、EGFに加えていずれかの阻害剤 (AG1478S、U0126、LY294002) を添加した培地中で幼弱期ネコの卵巣組織を培養した結果、どの阻害剤もEGFの卵胞の生存性維持、培養組織中の細胞増殖、MAPKおよびPI3Kのリン酸化を著しく抑制した ($p < 0.05$)。

また、EGFの効果が成体と幼弱期個体で異なる原因を探るため、EdU stainingによって細胞増殖について調べた。培養前の卵巣組織では成体および幼弱期個体のいずれも増殖細胞は少数しか見られなかった。しかし培養3日目になると、幼弱期の卵巣ではEGFの添加に関わらず増殖細胞が飛躍的に増加した一方、成体の卵巣組織では増殖細胞の増加は観察されなかった。

以上の結果より、幼弱期ネコの卵巣において EGF が原始卵胞の生存性維持に重要な役割を果たしており、さらにそのメカニズムはEGFがPI3K及びMAPKシグナルを介して原始卵胞を支える周辺の体細胞の増殖を誘導することに起因することを見出した。一方、成体の卵巣では EGF 添加による原始卵胞の生存性への影響が見られず、その一因として体外培養下での卵巣内体細胞の増殖能が幼弱期と比較し顕著に低いことがわかった。

考察

本研究により、イヌとネコで初めて原始卵胞の生存性を維持する卵巣組織の体外培養に成功するとともに、動物種ごとに異なる培養条件が必要なことを示した。さらに、幼弱期ネコの原始卵胞の維持には EGF シグナルの活性化が重要であり、さらに、個体の性成熟段階で異なる調節機構が働くことを初めて明らかにした。一方で、本研究で見出したアガロースゲルを用いた培養系および幼弱期ネコにおける EGF の培地への添加は、短期間の原始卵胞の体外維持には有効であったが一次卵胞・二次卵胞への発育に効果は見られなかった。また、長期の培養を行うと原始卵胞だけではなく組織全体の劣化が観察された。原始卵胞をメスの遺伝資源として利用するためには、長期間組織を維持し、卵胞発育を促す新たな培養系の構築が必要である。今後、動物種および性成熟段階に応じた原始卵胞の体外発育法の確立が求められる。

参考文献

1. IUCN, Red List of Threatened Species 2010
2. Gougeon A. Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation. *Ann Endocrinol* (Paris) 2010; 71:132–143.
3. Eppig JJ, O'Brien MJ. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology of Reproduction* 1996; 54:197–207.

研究の発表

誌上発表

1. Fujihara M, Comizzoli P, Wildt DE, Songsasen N. Cat and dog primordial follicles enclosed in ovarian cortex sustain viability after in vitro culture on an agarose gel in a protein-free medium. *Reproduction in Domestic Animals*; 47: 102–108,

2012.

2. Songsasen N, Comizzoli P, Nagashima J, Fujihara M, Wildt DE. The domestic dog and cat as models for understanding the regulation of ovarian follicle development in vitro. *Reproduction in Domestic Animal*; 47: 13–18, 2012.

3. Fujihara M, Comizzoli P, Keefer CL, Wildt DE, Songsasen N. Epidermal Growth Factor (EGF) Sustains In Vitro Primordial Follicle Viability by Enhancing Stromal Cell Proliferation via MAPK and PI3K Pathways in the Prepubertal, but Not Adult Cat Ovary. *Biology of Reproduction*, Academic Press; 90 (4) 86:1-10, 2014.

口頭発表

1. Fujihara M, Comizzoli P, Wildt DE, Songsasen N. Cat and dog primordial follicles enclosed in the ovarian cortex sustain viability after in vitro culture on an agarose gel in a protein-free medium. The 7th International Symposium on Canine and Feline Reproduction, Whistler, B.C., Canada, July 2012.

ポスター発表

1. Fujihara M, Comizzoli P, Wildt DE, Songsasen N. Retinoic acid enhances primordial follicle activation and matrix metalloproteinase 9 expression in the adult, domestic cat ovary. The 47th Annual Meeting of the Study of the Society for Reproduction, Michigan, USA, July 2014.