

## 第9回麻布大学 生殖・発生工学セミナー

## 卵母細胞と顆粒膜細胞がつくる微小環境：in vitro モデル

平尾 雄二

東北農業研究センター 高度繁殖技術研究東北サブチーム

## 【はじめに】

卵母細胞は卵巣の中で育つが、実際にその様子を追って観察することは難しいため、発育や死滅のプロセスについては不明な点がまだ多く残されている。最近、私たちは、ウシとブタの卵巣から卵母細胞を取り出し、高分子化合物を高濃度で加えた培養液で発育させるシステムを開発した。卵母細胞と顆粒膜細胞に種々の培養環境を与え、それに対する卵母細胞からのレスポンスを調べる実験系が出来上がりつつある。

## 【背景】

生殖における雌の役割は多岐にわたり、複雑で精緻な仕組みでできあがっている。例えば、子宮で一頭の胎子を育てるといった動物種の場合、その前提として卵子を一個だけ排卵するシステムがある。しかし、卵巣内の卵母細胞のストックから、一個だけが発育するわけではない。排卵される数よりもはるかに多い卵母細胞の集団が一定の周期をもって発育 (growth) を始め、発育とともにほとんど全てが退行し、ごく一部のみが排卵される。つまり、卵巣は卵母細胞を育てる器官であると同時に、膨大な数の卵母細胞を計画的に死なせていく器官でもある。排卵に至らず退行する卵母細胞を体外培養によって育てることができれば、潜在的な卵子資源の活用につながるのと同時に、卵子形成のメカニズムの解明に役立つ。つい最近までその夢はほぼマウスだけの話だったが、ようやく他の動物種でもマウスの実験系に近づき始めた。

## 【卵母細胞をとりまく環境：卵胞の内側と外側】

卵胞は、外側から順に卵胞膜細胞層、基底膜、顆粒膜細胞層が重なり、その最内層に卵母細胞が位置する (図1)。卵母細胞周囲の細胞は、顆粒膜細胞のなかでも卵丘細胞として区別されている。

生体内の卵巣では、血管網が基底膜の外側に張り巡らされる構造となっており、内部の顆粒膜細胞層と卵母細胞では、栄養素や老廃物などは細胞同士による交換と液中の拡散によって動く。従って、基底膜の内側部分が、卵母細胞をとりまく一個の世界といえる。

最近では、卵母細胞は顆粒膜細胞から栄養を受けとる一方で、周囲の細胞の増殖・分化を積極的に制御していることが明らかにされている<sup>1)</sup>。その状況は「周囲の細胞が物質を供給することで卵母細胞を助け、健康な卵母細胞は自らの発育に有利に働く周囲の細胞をつくる」というループ構造となる。どちらかの条件が損なわれた場合、ループ構造は壊れ、卵母細胞の発達には悪影響となるものと考えられる。

では、本来何層にも重なる構造の中にある卵母細胞

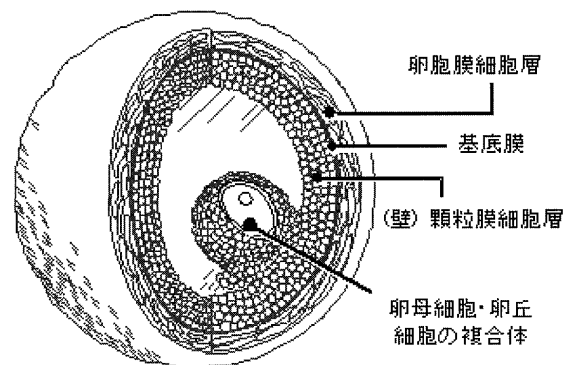


図1 卵胞

胞を体外で発育させるためには、どの程度まで忠実にその構成を再現する必要があるのだろうか。マウスを使った実験から、意外にも少ない構成要素で卵母細胞が発育しうることが明らかにされた。

### 【マウスにおける基本培養システム】

マウスの卵母細胞を体外発育させる培養システムを開拓したといえる実験は、米国ジャクソン研究所のEppigによって1977年に報告されたものである<sup>2)</sup>。その後、1989年、12日齢のマウス卵巣から採取して10日間の培養で発育させた卵母細胞に由来する初の産子が得られ<sup>3)</sup>、1996年には彼らは出生直後のマウス卵巣の器官培養と卵胞培養を組み合わせ、計20日間の培養で原始卵胞からの卵母細胞の発育に成功して産子を得た<sup>4)</sup>。彼らの培養システムでは、卵母細胞と顆粒膜細胞からなる複合体を培養皿（基質）にのせて培養する。細胞群は基質上に広がって増殖するが、卵母細胞を中心とする部分は盛り上がり、その中で卵母細胞は発育を続け、最後には成熟能力を獲得する（図2）。一方、途中で裸化した卵母細胞の発育は止まる。一連の結果から、卵母細胞が成熟卵子となるための最小限の構成は、卵母細胞とそれを包む顆粒膜細胞であることが明らかとなった。

この培養システムは、卵胞の構造そのままを維持するものではなく、卵胞の内側を体外で再現するものといえる。卵母細胞の発育のプロセスが「見える」ようになり、また雌性生殖細胞をより高度に活用するための道筋がつけられた。培養装置内で用いるのは、ほぼ空気と培養液（水と栄養素）のみなので、ウシ胎児血清など生体由来材料を使う場合があるにしても、基本的に実験系に何かを足すのも引くのも自由自在である。これらの条件をうまく利用すれば、どのような微小環境で卵母細胞は良好な発育を進め

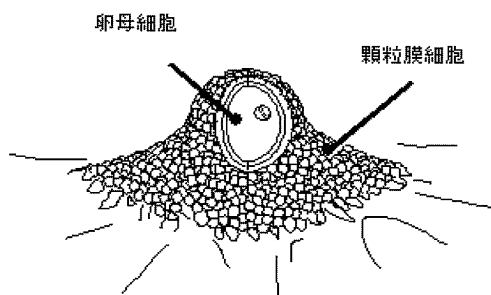


図2 Eppig チームの培養システム

るか、あるいは逆に発育不良となる培養条件は何かを探ることができる。

### 【中型・大型動物への応用】

Eppig 研の培養システムを応用すれば、ウシやブタの卵母細胞も同じように発育するものと当初思われた。もっとも、最終的な卵母細胞のサイズがマウスと家畜では大きく異なる。発育達成の目安となる卵母細胞の直径は、マウスでは約75  $\mu\text{m}$ 、ブタやウシでは120～130  $\mu\text{m}$ であり、体積比となると4～5倍にもなる。実際、すぐには期待されたような発育は得られなかった。卵母細胞の裸化や、不規則な顆粒膜細胞の増殖による凝集塊の形成、その内部での卵母細胞の退行が起り、長期培養することができなかった。いずれの場合にも、サイズの問題というよりも、卵母細胞を中心とする機能的な3次元構造が維持されないことが失敗の原因と考えられた。

培養液の組成を様々に変えてその効果を検討した結果、高濃度の高分子化合物を添加した場合に、卵母細胞を包む顆粒膜細胞の形態が劇的に変わり、マウスの場合と類似の組織形態となることを見出した。この方法の改良を進め、発育の後期から発育させたウシ卵母細胞の一部は、正常に成熟、受精、胚発生するところまでできている<sup>5)</sup>。図3に培養システムの概略を示す。

### 【ウシ卵母細胞・顆粒膜細胞の場合】

基本的な操作は以下の通りである。卵母細胞と顆

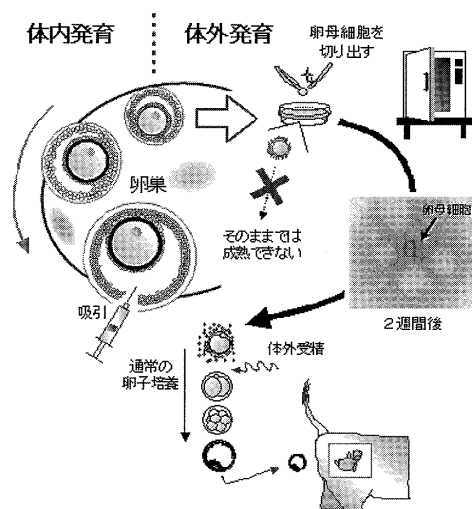


図3 培養システムの全体の流れ

粒膜細胞の複合体を直径0.4～0.7 mmの初期胞状卵胞から切り出し、卵母細胞・顆粒膜細胞の複合体を採取した。基本培養液には、TCM-199に5%ウシ胎児血清、0.1  $\mu\text{g/ml}$  17 $\beta$ -エストラジオール、100  $\mu\text{g/ml}$  ビルビン酸ナトリウムおよび4 mM ヒポキサンチン等を加えたものを使用し、高分子化合物としてポリビニルピロリドン (PVP, 平均分子量36万) を0～4% (w/v) の濃度で添加した。

培養基質としては、6-well プレートに装着したインサートメンブレンや、96ウェル組織培養プレートの中のウェルの底にコラーゲンゲルの層を敷いたものを用いた。38.5℃, 5% CO<sub>2</sub>のインキュベータに入れ、培養期間は実験に応じて14～19日とした。培養1日後に卵母細胞の直径を測定し、90～101  $\mu\text{m}$  のものを以降の実験対象とした。培養後の卵母細胞の生存率は80～90%であった。

#### 1) ドームの形成について

複合体は決まったパターンで大きくなる。まず底面に張り付いて顆粒膜細胞が盛んに増殖し、その後、顆粒膜細胞と卵丘細胞の区別が明瞭となり、やがてドームが形成される (写真1)。つまり、胞状卵胞様の構造が平面の基質上に再構築される。ドーム内に卵母細胞が位置することを考えると、卵胞内部の環境を再現するつもりで培養を始めても、途中からは外部を含めた卵胞培養のような状態なのかも知れない。そのことは、次の酸素濃度の実験結果も示唆している。

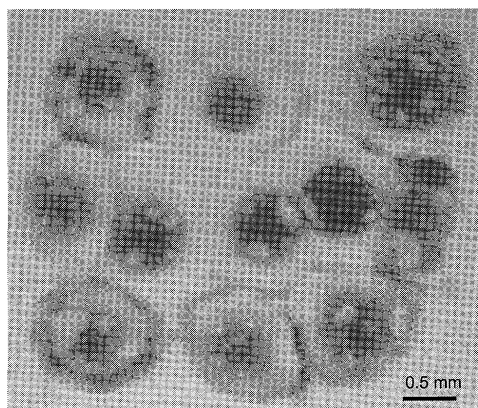


写真1 培養11日後のウシ卵母細胞・顆粒膜細胞複合体。4% PVP添加培地。ドームが形成されている。

#### 2) インキュベータの酸素濃度について

胚の培養では、酸素濃度が成績に大きく影響することが知られており、卵子や胚の培養で用いられる代表的な酸素濃度は5%と20%である。マウス卵母細胞の体外発育培養では、5%酸素が適当とする論文と、20%酸素が必須であるとする、鋭く対立する二つの報告<sup>6,7)</sup>がある。そこで、ウシの卵母細胞について、発育・成熟までを2種類の濃度で行い、生存率、直径の増大および胚発生能力について比較した。その結果、生存率は5%酸素の環境下で高く、直径の増大では20%酸素の条件が好ましいという結果となった。5%酸素の条件下では、直径の増大が培養5日後から緩慢になることも分かった。その観察結果をもとに、培養4日後に、5%から20%酸素へと切り替えたところ、生存率はやや改善され、最終的な発育は最も良いという結果となった。さらに、胚発生率も良い傾向にあった。現段階で順位をつけると、最も好ましいのは低酸素で培養環境に導入し、細胞の増殖とともに通常の酸素濃度に切り替えることと考えられる。そうなる原因をもっともうまく説明できるのが、「培養開始時は卵胞の内部の状況を反映し、次第に卵胞培養に近い状況になってしまう」というものではないだろうか。先述のマウスの論文でも、5%酸素を主張するのは「卵胞内部方式」のEppigらであり、20%酸素を主張するグループの培養系には、性腺刺激ホルモン、ITSや血清が添加されており、培養組織の特徴はドームの形成である。酸素は細胞活動によって消費されるため、卵母細胞周囲ではインキュベータの設定値がそのまま反映されていない可能性が強く、実際の局所的な酸素濃度は双方の論文の結論ほど鋭く対立するものではないのかも知れない。

#### 3) 卵母細胞と顆粒膜細胞の相互作用について

最初は基質に張り付いた一塊の顆粒膜細胞集団が、やがて卵母細胞周辺の卵丘細胞と壁顆粒膜細胞とが明確に分かれていく。卵母細胞はいつも中心近くに位置しており、おそらく卵母細胞で生産・放出された因子がそのような構造を形成させるものと考えられる。高分子を多く含む培養液においては、放出された因子が拡散しにくく、ターゲット細胞へ届きやすい可能性が考えられる。

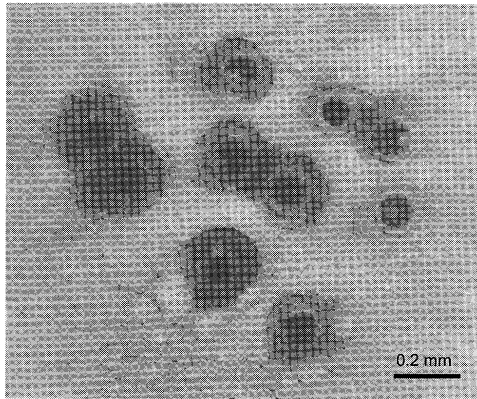


写真2 培養12日後のブタ卵母細胞・顆粒膜細胞複合体。4% PVP 添加培地。卵丘部分が露出している。

#### 【ブタ卵母細胞・顆粒膜細胞の場合】

直径0.7～1.0 mmのブタ卵胞から、直径90～110  $\mu\text{m}$ の卵母細胞と卵丘細胞層の複合体を切り出し、基質中央に寄せて集団で培養した。培養液として、5%ウシ胎子血清、10 ng/ml FSH、4 mMヒポキサンチン等を添加したWaymouth培養液を用い、高分子としてPVPを0～4%の濃度で添加した。

PVP0%区では、規則性のない細胞増殖が顕著で、卵母細胞の多くは裸化、退行するか、大きく発達した顆粒膜細胞の塊の中で退行した。PVP2%区では、ウシ卵母細胞の実験で観察されたようなドームの形成があり、卵母細胞の生存率や直径の増大はPVP0%区よりも良かった。PVP4%区において卵母細胞周囲に整然とした細胞増殖が見られ、培養12日後の卵母細胞は、体細胞との付着の程度や形態が充実していた。PVP4%区で最も特徴的な点は、ドームはほとんど形成されることなく、卵母細胞・卵丘細胞の複合体が基質上に並ぶ形態となることである(写真2)。単に細胞増殖が物理的に抑制されているだけなのかも知れないが、それにしては卵母細胞周囲の卵丘部分ではしっかりと細胞が付着している。しかも、細胞層の厚さはある程度以上には厚くならない。顆粒膜細胞の増殖に何らかの制御が働いているものと思われるが、さらに条件を整理していけば卵胞の内部の環境を再現するための実験モデルになるものと考えられる。

4%のPVPを添加した場合には、12日間の発育培養後の生存率はおおよそ50%程度であった。培養開

始時の卵母細胞の平均直径は約105  $\mu\text{m}$ であったが、培養後の直径は123～125  $\mu\text{m}$ であり、生体内において発育を完了した卵母細胞とほぼ同等になった。また、生存していた卵母細胞の70～80%は第二減数分裂中期へと成熟する能力を獲得していた。

#### 【おわりに】

生体内での卵母細胞の正常な発育には、卵母細胞の方から周囲の体細胞に影響を及ぼし、双方に理想的な環境を作り出しているようである。卵母細胞が作り出す因子が培養系のなかでどのように作用しているのか興味深い。ここで紹介した培養法を使って、培養空間における細胞情報の伝達という研究トピックを掘り下げていきたいと考えている。

#### 引用文献

- 1) Matzuk, M.M., Burns, K.H., Viveiros, M.M., Eppig, J.J. (2002) Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science*, 296: 2178-2180.
- 2) Eppig, J.J. (1977) Mouse oocyte development in vitro with various culture systems. *Dev Biol*, 60: 371-388.
- 3) Eppig, J.J., Schroeder, A.C. (1989) Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. *Biol Reprod*, 41: 268-276.
- 4) Eppig, J.J., O'Brien, M.J. (1996) Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod*, 54: 197-207.
- 5) Hirao, Y., Itoh, T., Shimizu, M., Iga, K., Aoyagi, K., Kobayashi, M., Kacchi, M., Hoshi, H., Takenouchi, N. (2004) In vitro growth and development of bovine oocyte-granulosa cell complexes on the flat substratum: effects of high polyvinylpyrrolidone concentration in culture medium. *Biol Reprod*, 70: 83-91.
- 6) Eppig, J.J., Wigglesworth, K. (1995) Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown in vitro: oxygen concentration. *Mol Reprod Dev*, 42: 447-456.
- 7) Smits, J., Cortvrindt, R., Van Steirteghem, A.C. (1996) Normal oxygen atmosphere is essential for the solitary long-term culture of early preantral mouse follicles. *Mol Reprod Dev*, 45: 466-475.