

目的別テーマ：天然繊維の高機能化と応用

17 年度研究テーマ

16-2-19：コラーゲン繊維と PVP を用いたほ乳類前胞状卵胞の体外培養系の開発

ABSTRACT

An important but poorly understood process in mammalian oogenesis is the selection and development of pre-antral follicles in the ovary. Interactions between the oocyte and granulosa cells of the follicle are critical for the development of the oocyte and its follicle. The TGF-beta-family growth factors (BMPs and activin) are known to stimulate the granulosa cells proliferation in vitro. The hypothesis tested in the current study is that BMP7 and activin acts as a factor to promote the pre-antral follicle growth in vitro. Rat pre-antral follicle culture system was used to investigate the role of BMP7 and activins. Two-layered secondary pre-antral follicles mechanically isolated from postnatal 21-day-old rat ovaries were cultured in vitro at 37 °C in 5% CO₂. Activins promoted the follicular growth of the pre-antral follicles but BMP7 did not promote. Activin treatment promoted 9% of oocytes to undergo GVBD, but no oocyte isolated from follicles before culture underwent GVBD. Observations suggest that the oocytes in pre-antral follicles can acquire the ability of GVBD during 6-day culture period.

研究目的

ほ乳類の卵巣内では卵胞の発育開始、選別、退化と成長が種に特有な周期で繰り返されている。これらの過程は、形態学的な推移として記載されているが、生理学的な部分は複数のホルモンと成長因子が関与する複雑な過程であるものとの理解に留まり、未解明な部分が多い。この卵胞発育の開始や選別の機構を解明する目的で、体外での卵胞培養系の開発が試みられてきたが、マウスを唯一の例外として、多くのほ乳類では未発育の卵胞を体外培養系で成長させ、個体を得ることに成功していない。

本研究は、ラット前胞状卵胞を効率的に体外で培養し発育させる系の開発を目的に行った。

一年間の研究内容と成果

生後3週齢のWister系ラットから前胞状卵胞を物理的方法を用いて分離し培養を行った。培養に用いた前胞状卵胞は外側を二層の顆粒膜細胞に取り囲まれた段階の卵胞 (type 4) で、96穴マイクロプレートを用いて、1つのウェルに1個の卵胞を入れて、湿潤気相下で培養した。培地には、単離したラット顆粒膜細胞の増殖を促進した Activin (100 ng/mL) と BMP7 (10 ng/mL) を添加することで TGF-βファミリーに属する成長因子の卵胞発育に及ぼす効果を検討した。

卵巣から分離した卵胞を単独で培養した時の卵胞直径の平均値の変化を図1に示した。

共に TGF-βファミリーに属する成長因子であり、顆粒膜細胞の培養系では、細胞増殖に効果を持つ Activin と BMP7 では逆の効果を示した。すなわち、Activin 添加は卵胞の直径増加させたが、卵胞の直径は BMP7 の添加により培養期間の増加とともに縮小する傾向が観察された。

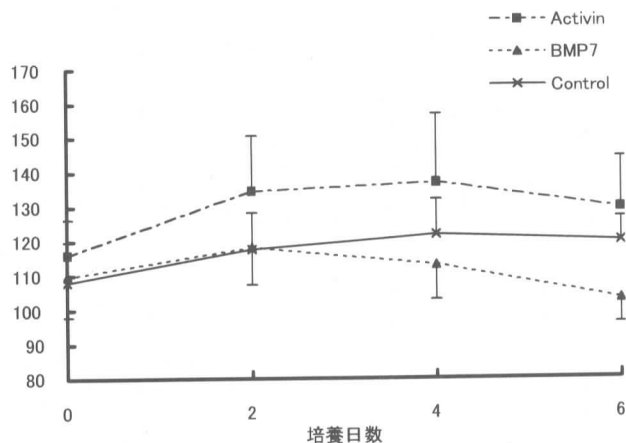


図1. 体外培養時の卵胞直径の変化

次に、培養した前胞状卵胞から取り出した卵母細胞の成熟培養を行い、卵母細胞が卵核胞崩壊能を

持つか否かにより、体外培養により卵母細胞が成長しているのかを確認した結果を表1に示した。

表1. 体外培養した卵胞由来の卵母細胞の卵核胞崩壊能

実験群	卵母細胞の直径		卵核胞	卵核胞崩壊	崩壊率 (%)
	採取時	培養終了時			
Activin	48.6±2.2	53.6±3.3	22	2	9
BMP7	48.7±1.8	50.8±4.7	12	1	8
Control	49.6±2.6	57.3±3.8	25	1	4
Type 4	48.8±3.0	-	22	0	0
Type 5b	60.6±3.7	-	18	8	44

採取直後の前胞状卵胞の卵核胞崩壊能を調べたところ、小さな卵胞 (type4) 由来の卵母細胞には卵核胞崩壊能は備わっていないが、2層以上の顆粒膜細胞に取り囲まれた、比較的大きな卵胞 (type 5b) の卵母細胞の44%が卵核胞崩壊能を持っていた。卵核胞崩壊能を持っていない時期の卵胞を6日間培養し、卵核胞崩壊能を調べたところ各培養群に少数の卵核胞崩壊能を持った卵母細胞が出現したが、実験群間に統計学的な差は認められなかった。これらの結果から、前胞状卵胞の体外培養により卵胞内の卵母細胞に卵核崩壊能を獲得させることが可能であるが、その率は低く、培養条件の再検討が必要であることが示された。

展望

発育の途上にある卵胞を取り出し、体外で培養することで、卵核胞崩壊能を持つ卵母細胞が得られることが明らかとなった。体外での卵胞の成長に伴って、卵母細胞も成長していることを確認できたが、卵核胞崩壊能の出現率は9%と低い値に留まった。卵胞は卵巣中で間質細胞に取り囲まれて発育しているが、現在採用している体外培養系では、卵胞の立体構造を保持して培養を続けることができないという欠点を持っている。今後は、コラーゲンゲル包埋等の、培養中も卵胞の立体構造を維持できる培養法を取り入れたものに変更し、効率的に培養可能な系の確立を試みることにしたい。