

目的別テーマ：天然繊維の高機能化と応用

16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

Satisfactory development of mammalian preantral follicles in vitro remains complicated. This study was designed to evaluate the effects of extracellular matrix collagen on rat preantral follicles in culture. Rat preantral follicles isolated from 5-week-old rat ovary were cultured individually in 96-well plates for 10 days with McCoys'5a medium containing pepsinized soluble collagen or cross-linked collagen (1.5 or 0.75 ug/ml). No difference was observed in follicular growth, survival rate, granulosa cell proliferation, or oocyte growth between collagen-treated follicles and controls. However, collagen supplementation stimulated few follicles to grow vigorously in follicle diameter and granulosa cell proliferation.

研究目的

ほ乳類の卵巣内には発育途上にある卵母細胞が多く存在し、周期的に選抜を受けながら成長している。選抜を受けた卵母細胞の多くは、発育途上で退化し、最終的に排卵に到達するのは卵巣に存在する卵母細胞のなかの極少数にすぎない。未発育の卵母細胞を体外に取り出して発育させることができれば研究や個体生産への卵母細胞の供給が飛躍的に増大するが、この試みはマウスで成功例が報告されているだけである。細胞外マトリックスであるコラーゲンは細胞への親和性が高く、細胞培養、人工臓器、臓器再生の分野でシート状あるいはゲル状に加工して利用されている。コラーゲンに対する応答は細胞により異なるが、成長因子の分泌増、アポトーシスの抑制、3次元構造を維持した細胞の分化に有効であることが示されている。この研究では、ラットの卵巣から単離した前胞状卵胞の体外培養系に、ペプシン消化により可溶化したコラーゲン繊維またはグルタルアルデヒドで架橋したコラーゲン繊維を添加し、これらが卵胞の成長と生存に及ぼす影響を調査した。

一年間の研究内容と成果

ウイスター系ラットの5週齢雌卵巣から単離した前胞状卵胞を McCoy' 5a 培地に3% PVPと抗生物質を添加したものを基本にした無血清培地で培養し、ペプシンで可溶化したコラーゲン繊維 (1.5 ug/ml (P15), 0.75 ug/ml (P07)) またはこのコラーゲン繊維をグルタルアルデヒドで架橋したコラーゲン (1.5 ug/ml (C15), 0.75 ug/ml (C07)) を添加して10日間培養し、コラーゲン無添加の対照群 (Con) と比較した。培養期間中の卵胞の成長を直径を測定することで評価した。測定した直径をもとにして、培養開始時の体積に対する培養後の体積の体積増加率を体積増加指数として求め図1に示した。右の箱ヒゲ図の縦軸が10日間の培養による卵胞の体積増加指数を示しているが、コラーゲン繊維を1.5 ug/ml 加えたP15群で大きくなる卵胞が増えており、突出して成長した卵胞の存在が○印で示されている。

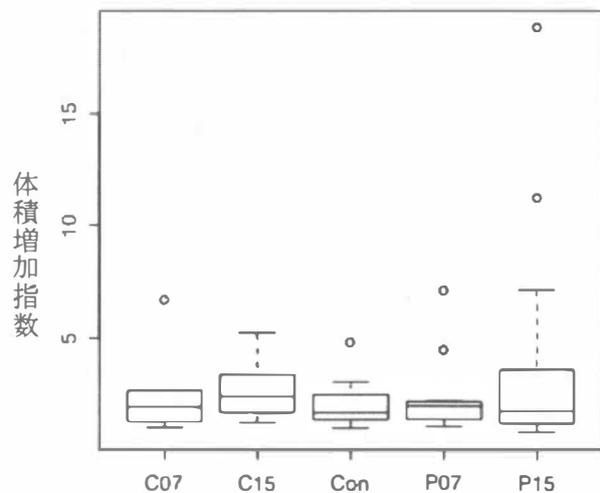


図1. 卵胞の堆積増加率

加えたP15群で大きくなる卵胞が増えており、突出して成長した卵胞の存在が○印で示されている。

前胞状卵胞の成長は、卵母細胞の体積増加と顆粒膜細胞の増殖に依存する。培養後の卵胞で顆粒膜細胞数を測定した結果を図2に示した。体積増加指数の高い卵胞が存在したP15群で飛び抜けてたくさんの顆粒膜細胞を持つ卵胞が存在することが示された。また、コラーゲン繊維を0.75 ug/ml 加えたP07群でも顆粒膜細胞の数が多いた卵胞が出現した。

これらの卵胞中の卵母細胞について、培養による堆積増加指数を右下の図3に示した。コラーゲン繊維を添加して培養した、P15群とP07群の卵胞に含まれる卵母細胞の体積増加指数が高いほうに分布することが示されている。

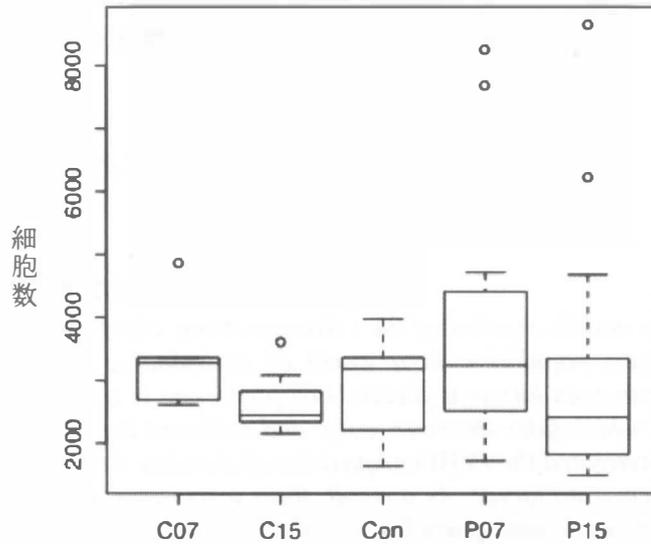


図2. 卵胞の顆粒膜細胞数

展望

コラーゲンは生体への適合性が高いため再生医療や人工臓器などの広い分野で注目されている。細胞のコラーゲンへの反応は細胞種により異なるが、一般に接着性が高く細胞増殖を促進することが知られている。このため、培養基剤として培養皿に塗布したり、シート状に加工して用いられている。細胞のin vitroでの3次元構造の維持を目的とする場合はゲルで用いられている。この実験ではゲルで用いられる場合の1/200の濃度で培養液に添加し、効果を検証した。これは培養した卵胞から卵母細胞を回収するためにはゲル化しないほうが有利である点を考慮し、可溶化したコラーゲン繊維をそのまま用いた。この実験によりコラーゲン繊維を培養液に添加することで卵胞の成長を促進する可能性が示された。コラーゲン繊維を卵胞の培養液に添加することの有効性は、更に高濃度のコラーゲンを添加することにより確認可能である。また、添加するコラーゲンにコンドロイチン硫酸等を架橋して用いることが考えられる。

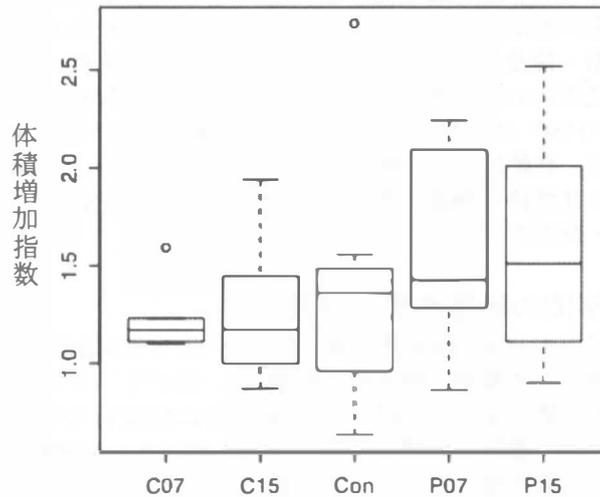


図3. 卵母細胞の堆積増加