

ヌードマウス体内におけるブタ原始卵胞の発育と卵の発生能

Developmental competence of porcine primordial oocytes grafted into nude mice

金子 浩之[†], 中井 美智子, 菊地 和弘

Hiroyuki KANEKO[†], Michiko NAKAI and Kazuhiro KIKUHCHI

独立行政法人農業生物資源研究所 動物科学研究領域, 〒305-8602 茨城県つくば市

[†]責任著者: kaneko@affrc.go.jp

要旨

卵巣に多数存在する原始卵胞卵は、獣医・畜産および医学領域において胚生産のための重要な資源となりえる。しかしながら、原始卵胞卵は未成熟で胚・個体への発生能を持たないため、何らかの方法によって発生能を付与する必要がある。免疫不全マウスに異種動物の組織を移植し機能を保持する異種間移植は、原始卵胞卵を成熟させ発生能を与える有力な手法の一つと考えられている。私達は、これまで、ブタの原始卵胞卵をヌードマウスに移植し卵を発育・成熟させ、卵の発生能を解析してきた。本ミニレビューでは、ヌードマウス体内でのブタ卵の発育と卵の発生能について、ブタ体内での卵胞・卵の発育と比較しながら、紹介させて頂く。

キーワード: 異種間移植, ブタ原始卵胞卵, 卵胞発育, 発生能

序論

ブタの品種は全世界で400種以上あり、年間1億トン以上の肉が生産される主要な家畜である。一方で、ブタの生産はランドレース等の数種類の欧米の大型品種に集中し、各国の在来品種は消滅しつつある。遺伝子の多様性(遺伝的多様性)の減少は、近交退化等による種の衰退、あるいは選抜による品種改良の可能性の減少を招くため、多様性保全は農業分野においても重要な課題である。哺乳動物の遺伝的多様性の保全には雄と雌の遺伝情報(生殖細胞)の保存と個体再生が必須である。これまで凍結保存が行われてきた卵および精子は家畜体内で成熟を完了した段階にあり、それらの採取は個体が発育し性成熟に達した後の生殖活動期に限られる。しかし、最も未成熟な生殖細胞、たとえば原始卵胞に含まれる卵(原始卵胞卵)あるいは精祖細胞は、個体のライフサイクルのいかなる時期の性腺にも存在している。このような未成熟な生殖細胞から個体を再生するシステムが確立できれば、従来は子孫を残せなかった胎子・幼若家畜の生殖細胞からも個体群の再生が可能となるため、未成熟生殖細胞の潜在的な有用性は高いと考えられる。

しかしながら、原始卵胞卵は発生能を獲得していないため何らかの方法で発生能を付与する必要がある。異種の動物の卵巣を免疫不全マウスに移植しマウス体内で卵胞・卵を発育させる手法(卵巣の異種間移植)は、Gosdenら[4](1994)によって初めて報告された。それ以降、異種間移植が未成熟な卵を人為的に成熟させる有力な手法と期待され、ヒト[10, 17-20]、ウシ[18]、ブタ[6-8]および野生動物[12]等の種々の動物の卵巣が免疫不全動物に移植されてきた。しかしながら、遺伝的な距離に近いマウスからヌードラットへの卵巣の移植例において、移植卵巣由来の卵から産子が得られたのみ[19]で、その他の動物の移植例の多くは卵胞の発育の形態的な確認に止まっているのが現状である。

ブタ体内での卵胞発育と卵の発生能

卵胞発育

生後30日までのブタ卵巣に存在する卵胞の構成は、95%以上が直径30 μm前後の原始卵胞(primordial follicle)、残りの数%が一次卵胞(primary follicle)であり(図1)[2, 7]、胎生期で胞状卵胞の発育が見られるヒトおよびウシとは大きく異なる。生後60日前後で胞状卵胞(直径0.5 mm以上)が出現し[2]、生後5月齢前後(初回

投稿日: 2010年11月29日

掲載決定日: 2010年12月14日

ウェブサイト事前公開日: 2010年12月21日

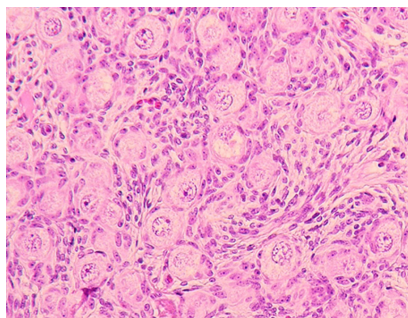


図1. 生後20日齢のブタ卵巢組織像。
多数の原始卵胞が見られる〔7〕より改変。

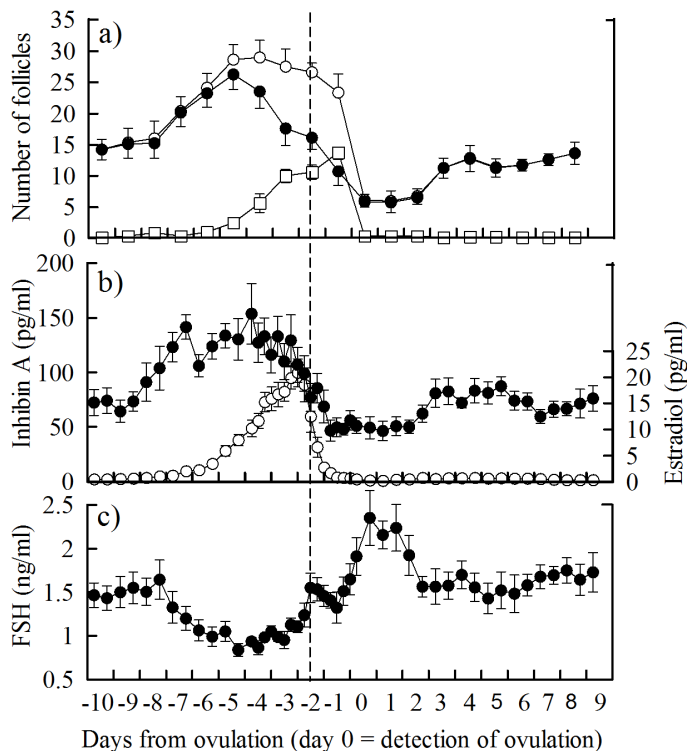


図2. ブタ発情周期中の卵胞発育と末梢血中各種ホルモン濃度の変化。
a) 卵胞数(直径 $\geq 3 < 6$ mm: ●、直径 ≥ 6 mm: □、および直径 ≥ 3 mm: ○)、b) インヒビンA(●)およびエストラジオール濃度(○)、およびc) FSH濃度(●)。データは排卵確認日を0日として配列し、卵胞期は-6から0日に相当する。点線はLHサージの開始時を示す〔16〕より改変。

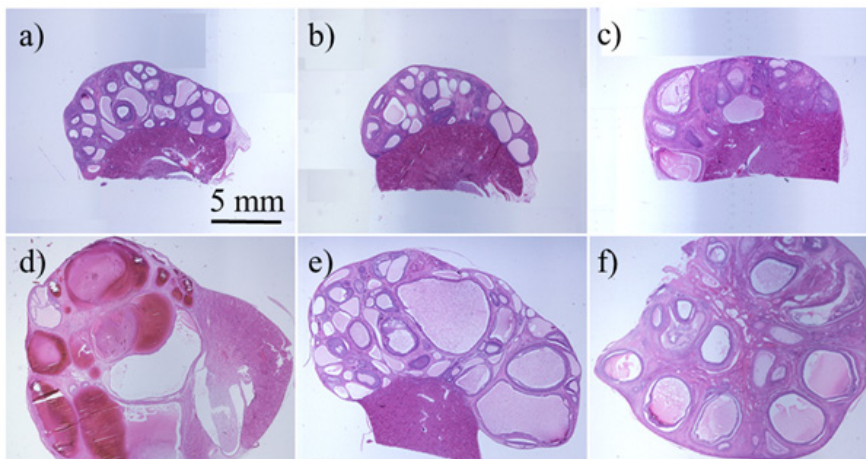


図3. 種々のホルモン処理後の移植ブタ卵巢像。
a) CONT群(ホルモン無処理群)、b) eCG-2群、c) FSH-7群、d) FSH-14群、およびe) FSH14-EA群。比較のため、f) ブタ体内で発育した卵巢像を示す。FSH-14群では卵胞が血腫化している。性腺刺激ホルモン(eCGまたはFSH)はブタ卵巢移植後120日前後でヌードマウスに投与した〔8〕より改変。

排卵前)の卵巢には既に0.5から6 mmの胞状卵胞が多数存在している [1]。卵胞の発育速度は、0.5 mmの胞状卵胞が3 mmにまで発育するのに約2週間要するとされている[13]。

ブタは生後6から7ヶ月齢で初回排卵が起こり、その後21日間隔で発情周期を繰り返す。ブタの発情周期中の胞状卵胞の発育をエコーカメラで観察すると、卵胞発育のwaveが黄体期末期から卵胞期にかけての期間と

黄体期初期に見られた(図2a)[16]。黄体期末期から卵胞期にかけてのwaveは、当初直径3から6 mmの卵胞数の増加としてエコーカメラで認められた。その後3から6 mmの卵胞数の低下と6 mm以上の卵胞数の増加が平行して起こり(卵胞の選抜)、発情開始後LHサージによって10から15個の6 mm以上の卵胞が排卵した。黄体期初期では3から6 mmの卵胞数の増加が観察された。いずれのwaveにおいても、顆粒層細胞を分泌源とするイ

ンヒビンの末梢血中濃度が胞状卵胞数(3 mm以上)の増加に一致して上昇したこと(図2b)、一方FSH濃度はwaveの出現に先立ち高値を示しwave出現後は低値で推移したこと(図2c)、FSHとインヒビンの相互の関連によって胞状卵胞の発育が調節されると考えられる。一方、エストラジオール濃度は6 mm以上の卵胞が出現する卵胞期のみ上昇したこと、インヒビンとは異なり、FSH分泌の抑制因子としての役割よりも、発情、LHサージの発現および排卵を同期化する重要性が高いものと考えられる。

卵の発生能

卵のサイズは卵胞の発育にともない増大し、卵の発生能の獲得と密接に関連している。たとえば、0.2から0.4 mmのpreantralな卵胞は直径80 μm前後の卵を含んでいるが、0.5から1.5 mmの胞状卵胞では卵は105 μm、3.0から4.0 mmの胞状卵胞では115 μm、排卵可能な5.0から6.0 mmの胞状卵胞では119 μmに、それぞれ発育する[5]。3.0から4.0 mmの卵胞に含まれる卵(直径115μm)は、体外培養によってgerminal vesicle (GV)期からmetaphase-II (MII)期に成熟する能力を獲得し、さらに5.0から6.0 mmの卵胞から採取した卵(直径119 μm)はより高い体外成熟率を示すことが報告されている[5]。この結果から、ブタ卵は直径が115から120 μmでfull sizeに達し成熟能を獲得するものと考えられる[5, 14]。また、直径3から5 mmの卵胞から採取した卵は、体外培養系で初期胚への発生能を持ち[1, 9]、さらに成雌ブタの卵管に移植することによって産子へ発生することが証明されている[9]。

このようなブタ生体内で観察される卵胞発育と卵の発生能の関係がヌードマウスに移植したブタ卵巣組織内においても再現されるか、さらには移植卵巣内の卵胞の人為的な発育促進は可能か、について以下の項において紹介する。

ヌードマウス体内での ブタ卵胞の発育と卵の発生能

移植卵巣内の卵胞発育と卵の発生能

前項で述べたように卵胞のほとんどが原始卵胞で占められる生後20歳前後のブタ卵巣(図1)を細切して、卵巣を摘出したヌードマウスの腎皮膜下に移植すると、約60日後に直径が1 mm程度の胞状卵胞が少数出現し、マウスの血中エストラジオール濃度が上昇する結果、マウスの膣が開く。この時期の卵巣移植片から卵の回収を試みても、ブタ体内の卵胞と卵の発育の関係から予想されるように、直径が115 μmを越えるfull sizeの卵

はほとんど回収できなかった[7]。さらに60日間(移植後120日)ブタ卵巣をマウス体内に留置しておく、移植組織内に3 mmを越える胞状卵胞はほとんど存在しないが、直径1-2 mmの卵胞が多数出現することが明らかとなった(図3a)[7, 8]。この結果は、ブタ胞状卵胞の発育はマウスの内因性のFSHによって支持されるものの、卵胞数の増加にともないブタ卵胞から分泌されるインヒビンが増加すると、マウスのFSH分泌が抑制され卵胞がさらなる発育を達成できないものと考えられる。このような移植卵巣(移植後120日)からのfull size卵の回収数は、移植後60日後に比較して増加を示し、少数の卵は体外成熟能を有していた[8]。しかしながら、マウス体内のブタ胞状卵胞の発育状況はブタ体内のものに比較すると著しく不十分であり、またそれらの胞状卵胞から回収した卵の発生能は極めて低いものであった。そこで、ブタ卵巣移植後120日のマウスに外生的に性腺刺激ホルモンを投与し卵胞の発育を促進することで卵の発育・発生能の改善を試みた。

卵胞発育促進処理と卵の発生能

ブタ卵巣を移植したヌードマウスに、膣開口後60日前後(卵巣移植後120日前後)で、eCGの腹腔内投与、またはブタFSHを充填した浸透圧ポンプの皮下留置を行った。移植卵巣を、eCG投与2日後(eCG-2群、図3b)、FSHポンプ留置7日(FSH-7群、図3c)または14日後(FSH-14群、図3d)に採取した。また卵胞の排卵様の血腫化を抑制する目的で、FSH処理開始7日後に抗エストラジオール血清を投与し、その7日後に移植卵巣を採取した(FSH-14EA群、図3e)。その結果、FSH処理群、特にFSH-14EA群(図3e)では、性腺刺激ホルモン無処理群(CONT群、図3a)に比較して胞状卵胞の発育が顕著で、ブタ体内で発育した卵胞(図3f)とほぼ同等の大きさに達した[8]。

ホルモン処理後の回収可能なfull sizeの卵、および体外培養系で成熟能を持った卵の数は、FSH-7およびFSH-14EA群において、性腺刺激ホルモンを投与しなかった対照群に比較して明らかな増加を示した(図4および5)。次いで、各群100個前後の成熟卵を体外受精し7日間体外培養した結果、FSH-7およびFSH-14EA群においてそれぞれ1卵ずつ胚盤胞への発生が観察された(胚盤胞の細胞数: 16および30)(図6)。

以上の結果から、マウスにFSH処理を施し移植ブタ卵巣内の卵胞発育を長期にわたり促進することによって、ブタ原始卵胞卵に体外成熟能、さらには低率ながらも胚発生能を付与することが可能となった[8]。

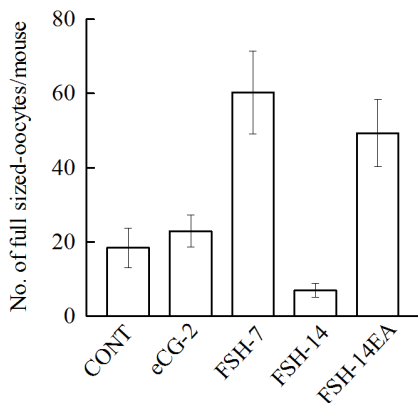


図4. 種々のホルモン処理後にマウスから回収されたfull size(直径 $\geq 115 \mu\text{m}$)に達したブタ卵の数
 数値はマウス一匹あたりの回収卵数で表示 ([8]より改変)。

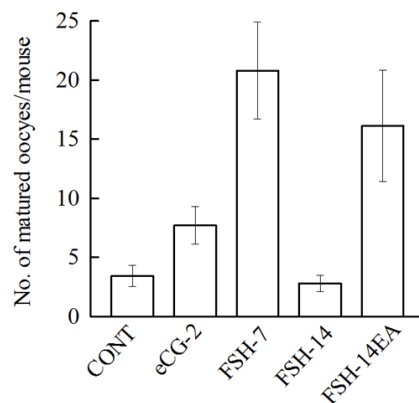


図5. 種々のホルモン処理後にマウスから回収されたブタ卵(直径 $\geq 115 \mu\text{m}$)の成熟能
 数値はマウス一匹あたりの回収卵数で表示 ([8]より改変)。



図6. FSH-14EA処理によって得られたブタ初期胚
 細胞数: 30 ([8]より改変)。

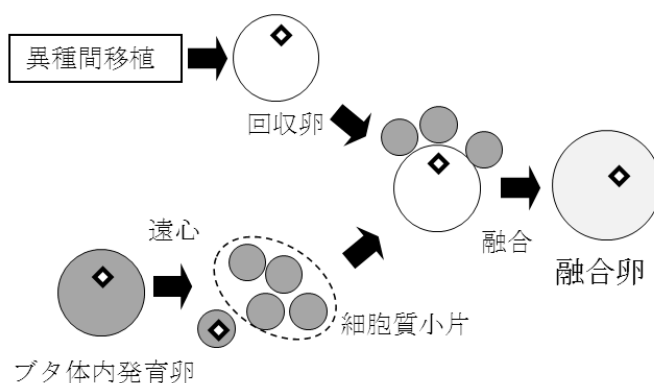


図7. 融合卵作製の方法

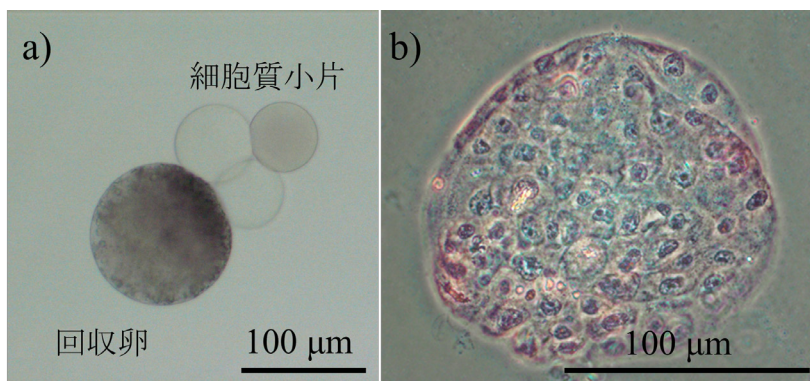


図8. 融合卵の作製と発生能。
 a) ノードマウスから回収した原始卵胞由来のブタ卵とブタ体内で発育した卵から作製した細胞質小片、およびb) 融合卵からの胚発生(細胞数: 120)

融合卵の作製

ブタ卵巣を移植したマウスにFSH処理を加えることによって、移植卵巣内の卵胞の発育および卵の成熟能は改善された。しかしながら、依然としてノードマウス体内で発育させたブタ卵の胚発生率は1%と低く、おそらく卵

の細胞質成熟が完全でないため、受精に成功しても胚発生率が低いと考えられる。そこでFSH処理を施したマウスから回収したブタ原始卵胞由来の成熟卵に、ブタ体内で発育した卵(屠場卵巣から採取し細胞質の成熟度が高く個体発生能を有する)から遠心操作によって調整した細胞質小片[3, 11]を融合させること(融合卵の作

製)で、回収卵の胚発生能の改善を試みた(図7および図8a)。

作製した融合卵を体外受精した後、体外発生系において初期胚への発生率および胚の質(細胞数)を解析した結果、142個の融合卵のうち21個が胚盤胞へと発生した(胚発生率: 14.8%)。また胚盤胞の細胞数は10から128であった(平均細胞数: 29.7 ± 6.0 個)(図8b)。無操作のブタ原始卵胞由来の卵が体外受精・発生系では1%しか胚盤胞に到達し得なかった結果[8]に比べて、屠場由来の成熟卵の細胞質を付与することによって、ブタ原始卵胞卵からの胚の発生率および細胞数は、著しく改善された。細胞質の融合は、原始卵胞卵の発生能、すなわちそこに含まれる核の情報の利用性を格段に向上させうるものと期待される。

終わりに

私たちの研究グループでは異種間移植、顕微操作および体外培養を組み合わせたシステムによって、ブタの原始卵胞卵から初期胚を作り出すことが可能になった。しかしながら、卵管あるいは子宮内移植によって産子を得るためには、いまだ胚の発生率および細胞数ともに不十分である。一方、幼若ブタ精巢をヌードマウスに移植しマウス体内でブタ精祖細胞を精子にまで成熟させ、さらに精子を用いた顕微授精によって産子を得ることには成功している[15]。精子とは異なり、卵では細胞質の成熟状況がその後の発生を左右していると考えられ、融合卵の作製等何らかの方法によって卵の細胞質の成熟度を改善することが産子発生へのキーとなると考えられる。

謝辞

本研究は、麻布大学、柏崎直己教授および伊藤潤哉准教授との共同研究によるものである。本研究は科学研究費補助金No. 17380170(金子)およびNo. 21380175(金子)の補助を受けた。

参考文献

1. **Bagg MA, Nottle MB, Armstrong DT, Gruppen CG.** Relationship between follicular size and oocyte developmental competence in prepubertal and adult gilts. *Reprod. Fertil. Dev.* 2007; 19: 797–803.
2. **Christenson RK, Ford JJ, Redmer DA.** Maturation of ovarian follicles in the prepubertal gilts. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1985; 33: 21–36.
3. **Fahrudin M, Kikuchi K, Kurniani Karja NW, Ozawa M, Maedomari N, Somfai T, Ohnuma, Noguchi J, Kaneko H, Nagai T.** Development to the blastocyst stage of porcine somatic cell nuclear transfer embryos reconstructed by the fusion of cumulus cells and cytoplasm

- prepared by gradient centrifugation. *Cloning Stem Cells.* 2007; 9: 216–228.
4. **Gosden RG, Boulton MI, Grant K, Webb R.** Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. *J. Reprod. Fertil.* 1994; 101: 619–623.
5. **Hirao Y, Tsuji Y, Miyano T, Okano A, Miyake M, Kato S, Moor RM.** Association between p34cdc2 levels and meiotic arrest in pig oocytes during early growth. *Zygote* 1995; 3: 325–332.
6. **Kagawa N, Sakurai Y, Miyano T, Manabe N.** Effects of long-term grafting on follicular growth in porcine ovarian cortical grafts xenoplated to severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J. Reprod. Dev.* 2005; 51: 77–85.
7. **Kaneko H, Kikuchi K, Noguchi J, Hosoe M, Akita T.** Maturation and fertilization of porcine oocytes from primordial follicles by a combination of xenografting and *in vitro* culture. *Biol. Reprod.* 2003; 69: 1488–1493.
8. **Kaneko H, Kikuchi K, Noguchi J, Ozawa M, Ohnuma K, Maedomari N, Kashiwazaki N.** Effects of gonadotrophin treatments on meiotic and developmental competence of oocytes in porcine primordial follicles following xenografting to nude mice. *Reproduction* 2006; 131: 279–288.
9. **Kikuchi K, Onishi A, Kashiwazaki N, Iwamoto M, Noguchi J, Kaneko H, Akita T, Nagai T.** Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified *in vitro* system. *Biol. Reprod.* 2002; 66: 1033–1041.
10. **Kim SS, Soules MR, Battaglia DE.** Follicular development, ovulation, and corpus luteum formation in cryopreserved human ovarian tissue after xenotransplantation. *Fertil. Steril.* 2002; 78: 77–82.
11. **Maedomari N, Kikuchi K, Nagai T, Fahrudin M, Kaneko H, Noguchi J, Nakai M, Ozawa M, Somfai T, Nguyen LV, Ito J, Kashiwazaki N.** Nuclear replacement of *in vitro*-matured porcine oocytes by a serial centrifugation and fusion method. *Reprod. Domest. Anim.* 2010; 45: 659–665.
12. **Mattiske D, Shaw G, Shaw JM.** Influence of donor age on development of gonadal tissue from pouch young of the tamar wallaby, *Macropus eugenii*, after cryopreservation and xenografting into mice. *Reproduction* 2002; 123: 143–153.
13. **Morbeck DE, Esbenshade KL, Flowers WL, Britt JH.** Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilts. *Biol. Reprod.* 1992; 47: 485–491.
14. **Motlik J, Crozet N, Fulka J.** Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fertil.* 1984; 72: 323–328.
15. **Nakai M, Kaneko H, Somfai T, Maedomari N, Ozawa M, Noguchi J, Ito J, Kashiwazaki N, Kikuchi K.** Production of viable piglets for the first time using sperm derived from ectopic testicular xenografts. *Reproduction* 2010; 139: 331–335.
16. **Noguchi M, Yoshioka K, Itoh S, Suzuki C, Arai S, Wada Y, Hasegawa Y, Kaneko H.** Peripheral concentrations of inhibin A, ovarian steroids, and gonadotropins associated with follicular development throughout the estrous cycle of the sow. *Reproduction* 2010; 139: 153–161.
17. **Oktay K, Newton H, Mullan J, Gosden RG.** Development of human primordial follicles to antral stages

- in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. Hum. Reprod. 1998; 13: 1133–1138.
18. **Senbon S, Ishii K, Fukumi Y, Miyano T.** Fertilization and development of bovine oocytes grown in female SCID mice. Zygote 2005; 13: 309–315.
19. **Snow M, Cox S-L, Jenkin G, Trounson A, Shaw J.** Generation of live young from xenografted mouse ovaries. Science 2002; 297: 2227.
20. **Weissman A, Gotlieb L, Colgan T, Juricova A, Greenblatt EM, Casper RF.** Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse. Biol. Reprod. 1999; 60: 1462–1467.



Japan Society for Reproduction Engineering