



体外におけるブタ卵母細胞の発育と卵胞の発達に及ぼす卵母細胞由来成長因子の影響

森川, 莉帆

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2022-03-25

(Date of Publication)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8367号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008367>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

体外におけるブタ卵母細胞の発育と卵胞の発達に及ぼす
卵母細胞由来成長因子の影響

令和4年1月

神戸大学大学院農学研究科

森川 莉帆

体外におけるブタ卵母細胞の発育と卵胞の発達に及ぼす卵母細胞由来成長因子
の影響

第1章 緒論・・1

第2章 卵母細胞－卵丘細胞複合体の体外発達に及ぼす GDF9 および BMP15 の影響・7

第1節 緒言

第2節 材料および方法

第3節 結果

第4節 考察

第5節 小括

第3章 GDF9 および BMP15 添加培養液中で発育した卵母細胞の体外成熟・・・・・・・・29

第1節 緒言

第2節 材料および方法

第3節 結果

第4節 考察

第5節 小括

第4章 卵母細胞－卵丘細胞複合体の卵胞腔様構造の形成に及ぼす GDF9 および BMP15
の影響・・49

第1節 緒言

第2節 材料および方法

第3節 結果

第4節 考察

第5節 小括

第5章 総括・・77

謝辞

引用文献

第1章 緒論

哺乳類の卵子形成は、胚発生の初期に始原生殖細胞が生じることから始まる。始原生殖細胞は生殖隆起へと入り込み、卵原細胞となって有糸分裂によって急激に増殖する。増殖した卵原細胞は減数分裂を開始し、一次卵母細胞となる。一次卵母細胞は、第一減数分裂前期のディプロテン期に達すると減数分裂を停止する。一次卵母細胞の周囲を1層の扁平な顆粒膜細胞が取り囲み、原始卵胞が形成される。動物が出生する頃には、卵巣内にはブタでは1頭当たり約50万個(Black & Erickson, 1968)、ウシでは約20万個(Erickson, 1966)の原始卵胞が存在すると考えられている。

卵巣内で、原始卵胞内の一次卵母細胞は卵胞の発達と同調して発育する(図1-1)。卵母細胞が発育を開始すると、扁平であった顆粒膜細胞は形態を立方状に変化させ、原始卵胞は一次卵胞へと発達する。続いて、顆粒膜細胞は増殖して重層化し、その周囲に基底膜が形成されて二次卵胞となる。さらに、顆粒膜細胞間に間隙が生じ、液で満たされた卵胞腔が形成され、卵胞は胞状卵胞へと発達する。胞状卵胞の発達が進むと、卵母細胞は卵胞の一方に押しやられ、周囲の顆粒膜細胞と共に卵胞腔に突出し、卵丘と呼ばれる構造を形成する。二次卵胞内の顆粒膜細胞は、卵胞腔の形成以降、卵丘を形成する卵丘細胞(卵丘顆粒膜細胞)と卵胞の内壁を覆う壁顆粒膜細胞へと分化する。卵丘細胞は卵母細胞との間のギャップ結合を介して代謝物や栄養分を卵母細胞に供給して卵母細胞の発育を支え、一方、壁顆粒膜細胞は主にステロイドホルモンを生成する機能を担うと考えられている(Eppig, 2001)。

発育を開始した卵母細胞は転写を活発化させ、クロマチンの形態を変化させるとともに、卵胞の発達に伴って、動物種によって決まった大きさへと発育する(図1-1)。ブタでは、原始卵胞内の直径約30 μm の一次卵母細胞は、卵胞の発達とともにその体積を徐々に増加させ、胞状卵胞内で最終的に約125 μm へと発育する。発育の過程で、卵母細胞は、減数分裂を再開する能力、次いで減数分裂を完了する能力を順次獲得する。動物が性周期を開始すると、下垂体から周期的に分泌される性腺刺激ホルモンのサーージに反応して、卵母細胞

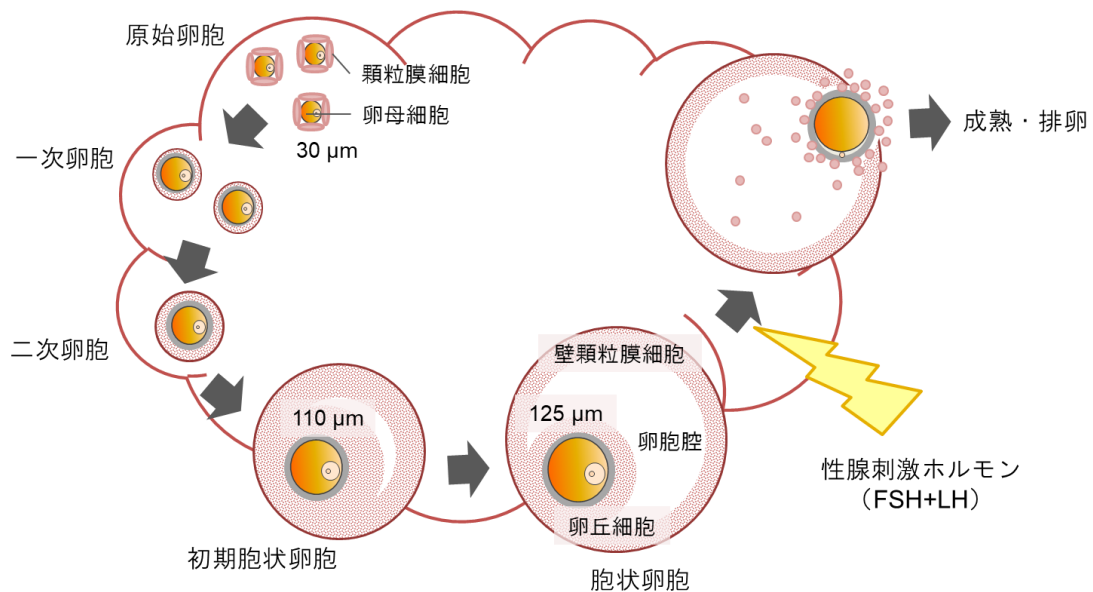


図 1-1. 卵母細胞の発育と卵胞の発達

卵巣内で、原始卵胞内の一次卵母細胞は卵胞の発達と同調して発育する。卵母細胞が発育を開始すると、扁平な顆粒膜細胞は形態を立方状に変化させ、原始卵胞は一次卵胞へと発達する。続いて、顆粒膜細胞は増殖して重層化し、二次卵胞となる。さらに、顆粒膜細胞間に間隙が生じ、液で満たされた卵胞腔を形成し、胞状卵胞へと発達する。胞状卵胞では、卵母細胞は卵胞の一方に押しやられ、周囲の顆粒膜細胞と共に卵胞腔に突出し、卵丘と呼ばれる構造を形成する。二次卵胞内の顆粒膜細胞は、卵胞腔の形成以降、卵丘を形成する卵丘細胞と卵胞の内壁を覆う壁顆粒膜細胞へと分化する。動物が性周期を開始すると、発達した胞状卵胞は下垂体から周期的に分泌される性腺刺激ホルモン（FSH+LH）のサージに反応し、卵母細胞は第二減数分裂中期へと成熟して排卵される。

は減数分裂を再開し、第二減数分裂中期へと成熟する。成熟した卵母細胞は、卵丘細胞と卵丘細胞が分泌したヒアルロン酸のマトリックスに取り囲まれた状態で、卵胞液とともに排卵される。卵巣内には多数の卵母細胞が存在するが、最終の大きさへと発育し、成熟して排卵される卵母細胞は、生涯を通して、多くともブタでは数千個、ウシでは 200 個以下と考えられている。他のほとんどの卵母細胞は、発育を開始しないか、あるいは発育の途中で退行する。

卵巣内に多数存在する発育途上や発育開始前の卵母細胞を体外で発育させることによって、受精可能な卵子を生産しようとする試みがなされている。この試みはマウスで進んでおり、これまでに発育開始前の卵母細胞を含む原始卵胞を卵巣ごと 8 日間器官培養し、その後、卵母細胞－顆粒膜細胞複合体を回収して 14 日間発育培養して卵母細胞の発育を完了させ、さらに、卵母細胞を体外で成熟、受精させることによって産仔が得られている (Eppig & O'Brien, 1996)。最近では、ES 細胞や iPS 細胞から作出した始原生殖細胞様細胞を、マウス胎仔卵巣の体細胞と凝集させて培養することによって、体外で完全に発育させた卵母細胞から産仔を得たとの報告もある (Hikabe *et al.*, 2016)。

一方、大動物では、卵母細胞の発育培養の成功例は、初期胞状卵胞以降の発育途上の卵母細胞の培養に限られている。ウシでは、初期胞状卵胞から採取した卵母細胞－卵丘細胞－壁顆粒膜細胞複合体をコラーゲンゲル中に包埋する方法 (Yamamoto *et al.*, 1999)、あるいは 96 ウェルプレートで 14 日間培養し (Hirao *et al.*, 2004)、体外で発育させた卵母細胞から産仔が得られている。ブタでは、直径 1.2~1.5 mm の初期胞状卵胞から採取した発育途上の卵母細胞を含む卵母細胞－卵丘細胞複合体を、FSH とジブチルサイクリック AMP を添加した培養液中で 5 日間発育培養すると、卵母細胞は発育し、成熟するとの報告や (Cayo-Colca *et al.*, 2011 ; Kubo *et al.*, 2015)、直径 0.5~0.7 mm の初期胞状卵胞から採取した卵母細胞－卵丘細胞－顆粒膜細胞複合体をポリアクリルアミドゲル上で 14 日間培養すると、卵母細胞は発育し、単為発生刺激によっていくつかは胚盤胞へと発生したとの報告などがあるが (Munakata *et al.*, 2017)、産仔を得たとの報告はまだない。また、体外で発育培養する過程で、ウシ (Hirao *et al.*, 2004 ; Alam *et al.*, 2018) やブタ (Tasaki *et al.*, 2013) の卵母細胞－卵丘細胞－壁顆粒膜細胞複合体の内部に間隙が形成され、卵胞腔様の

構造が形成されることが報告されている。しかし、この卵胞腔様構造が形成されるメカニズムや、卵母細胞の発育に及ぼす影響については未だ明らかでない。

卵母細胞の発育過程を通して、卵母細胞と顆粒膜細胞との相互作用は、卵母細胞の成熟能力や受精能力、その後の胚発生能力の獲得に必要と考えられている (Buccione *et al.*, 1990a ; Gilchrist *et al.*, 2008)。顆粒膜細胞からは、栄養分、転写産物が卵母細胞へと輸送され、卵母細胞の発育を支持するとともに (Buccione *et al.*, 1990a), 卵母細胞へと転送されるサイクリック AMP やサイクリック GMP が、卵母細胞の減数分裂の再開を阻害していると考えられている (Gilchrist *et al.*, 2016)。一方、卵母細胞からは、transforming growth factor (TGF) - β スーパーファミリーに属する成長因子の growth differentiation factor 9 (GDF9, McGrath *et al.*, 1995) と bone morphogenetic protein 15 (BMP15, Dube *et al.*, 1998 ; Laitinen *et al.*, 1998) が分泌されることが示唆された。また、いくつかの動物種で、GDF9 (マウス, McGrath *et al.*, 1995 ; Laitinen *et al.*, 1998 ; マウスとヒト, Fitzpatrick *et al.*, 1998 ; ウシ Bodensteiner *et al.*, 1999 ; ラット, Jaatinen *et al.*, 1999) と BMP15 (マウス, Dube *et al.*, 1998 ; ラット, Jaatinen *et al.*, 1999 ; ヒト, Aaltonen *et al.*, 1999) は、卵母細胞で特異的に発現することが報告された。さらに、GDF9 欠損マウスでは、顆粒膜細胞の増殖が抑制され、卵胞は一次卵胞以降へと発達せず不妊となることや (Dong *et al.*, 1996), BMP15 欠損マウス (Yan *et al.*, 2001) や BMP15 に変異がみられるヒツジ (Galloway *et al.*, 2000) では、妊孕性が低下することも報告されている。これらの研究から、卵母細胞から分泌される GDF9 と BMP15 は卵胞の発達、ひいては雌の妊孕性に不可欠であることが示唆されている (Gilchrist *et al.*, 2008)。

卵母細胞が卵丘細胞や顆粒膜細胞に影響を及ぼすことが、マウスで報告されている。卵母細胞の共培養実験では、卵母細胞から分泌される因子が、これらの細胞を標的にして、顆粒膜細胞の増殖 (Vanderhyden *et al.*, 1993), 解糖 (Sugiura *et al.*, 2005), 黄体化 (Vanderhyden *et al.*, 1993), 卵丘の膨潤化 (Buccione *et al.*, 1990b) などの機能を調節することが示唆されている。卵丘の膨潤化における卵母細胞の役割は、卵母細胞-卵丘細胞複合体から卵母細胞を物理的に除去することによって調べられており (Salustri *et al.*, 1990 ; Vanderhyden *et al.*, 1990), 卵母細胞由来の卵丘膨潤化は GDF9 と BMP15 に起因

するとされている (Pangas & Matzuk, 2005)。

GDF9 と BMP15 の直接的な影響は、培養顆粒膜細胞においても調べられている。GDF9 は、マウスの顆粒膜細胞の増殖を促進し (Gilchrist *et al.*, 2006)、ラットの顆粒膜細胞でプロジェステロンやエストラジオールの産生を抑制し (Vitt *et al.*, 2000a)、ラットの卵丘細胞のアポトーシスを抑制すると報告されている (Orisaka *et al.*, 2006)。同様に、BMP15 はラット顆粒膜細胞の増殖を促進し (Otsuka *et al.*, 2000)、ラット顆粒膜細胞でプロジェステロン産生を抑制し (Otsuka *et al.*, 2000)、ウシ卵丘細胞のアポトーシスを抑制することが報告されている (Hussein *et al.*, 2005)。また、組織培養したラットの卵巣や (Nilsson & Skinner, 2002) ヒトの卵巣表皮組織で (Hreinsson *et al.*, 2002)、GDF9 は卵胞の発達を促進することも報告されている。Alam ら (2018) は、近年、ウシの卵母細胞－顆粒膜細胞複合体において、GDF9 と BMP15 は卵胞腔様構造の形成を促進することを報告した。ブタの研究では、GDF9 が壁顆粒膜細胞の増殖を促進することや (Hickey *et al.*, 2005)、GDF9 と BMP15 は卵丘細胞のアポトーシスを抑制することが示唆されている (Wang *et al.*, 2013, Zhai *et al.*, 2013)。

これらの報告は、哺乳類の卵母細胞の発育から排卵までに至る過程が、卵母細胞を取り囲む顆粒膜細胞やその上位にある下垂体からの性腺刺激ホルモンによって制御されているとするこれまでの一方向的な概念を覆し、卵母細胞自体が GDF9 と BMP15 を介して、卵胞の発達や顆粒膜細胞の機能に対して重要な役割を果たすとの新たな概念を提示している (Matzuk *et al.*, 2002 ; Gilchrist *et al.*, 2008)。

ブタの胞状卵胞内で、卵母細胞は、発育の最終段階で成熟する能力を獲得し (Kanayama *et al.*, 2002)、卵丘は性腺刺激ホルモンに反応して膨潤化できるように変化する (Prochazka *et al.*, 2000)。この間も、卵母細胞は卵丘細胞と相互に作用し合っていると考えられ、卵母細胞から分泌されると考えられる GDF9 と BMP15 は、この双方向性のコミュニケーションに参加している可能性がある。体外培養系を用いれば、卵母細胞の発育と成熟能力の獲得、あるいは卵丘細胞に及ぼす GDF9 と BMP15 の影響を明らかにすることができると考えられるが、これまで、これらの影響については、ほとんど調べられていない。また、培養液中で卵母細胞－顆粒膜細胞複合体を発育培養すると、卵胞腔様構造が形成されること

は報告されているが、この卵胞腔様構造の形成に及ぼす GDF9 と BMP15 の影響については、ウシでの報告があるにすぎない (Alam *et al.*, 2018)。

本研究では、直径 1.2~1.5 mm のブタの初期胞状卵胞から採取した発育途上の卵母細胞の発育および卵母細胞-卵丘細胞複合体の発達に及ぼす卵母細胞由来成長因子、GDF9 と BMP15 の影響を明らかにすることを目的とする。第 2 章では、直径 1.2~1.5 mm の初期胞状卵胞と直径 4~6 mm の胞状卵胞から採取した卵母細胞における GDF9 と BMP15 の mRNA の発現を調べ、その後、初期胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体を種々の濃度の GDF9 または BMP15 を含む発育培養液中で培養し、卵母細胞の発育と複合体の発達に及ぼす GDF9 と BMP15 の影響を調べた。第 3 章では、第 2 章と同様の方法で培養した複合体を成熟培養し、卵母細胞の成熟能力の獲得に及ぼす GDF9 と BMP15 の影響を調べた。また、発育培養後の複合体から卵丘細胞を採取し、性腺刺激ホルモンに対する受容体、および性腺刺激ホルモン刺激から卵母細胞の成熟に至る過程を仲介する Epidermal Growth Factor (EGF) 受容体の mRNA の発現を比較した。第 4 章では、卵母細胞-卵丘細胞複合体を種々の濃度の GDF9 または BMP15 を含む培養液中で発育培養し、複合体による卵胞腔様構造の形成に及ぼす GDF9 と BMP15 の影響を調べた。

第2章 卵母細胞-卵丘細胞複合体の体外発達に及ぼす GDF9 および BMP15 の影響

第1節 緒言

卵巣内で卵母細胞は周囲の顆粒膜細胞と相互に作用し合いながら、卵胞の発達と同調して発育する。原始卵胞内の直径約 30 μm のブタ卵母細胞は、卵胞の発達に伴って最終的に直径約 125 μm へと発育する。発育を完了した卵母細胞は、下垂体からの性腺刺激ホルモンの刺激によって減数分裂を再開し、第二減数分裂中期へと成熟する。

卵胞の発達過程で卵母細胞は、GDF9 と BMP15 を分泌し、周囲の顆粒膜細胞や卵丘細胞を制御することが、多くの動物種で示唆されている (Gilchrist *et al.*, 2008)。Gdf9 ノックアウトマウスで一次卵胞以降の卵胞の発達が阻害されることや (Dong *et al.*, 1996)、未成熟雌ラットに GDF9 を投与すると、卵胞の発達が促進されることから (Vitt *et al.*, 2000b)、GDF9 は卵胞の発達に重要な役割を果たすと考えられている。BMP15 についても、BMP15 が突然変異したヒツジや (Galloway *et al.*, 2000)、Bmp15 をノックアウトした雌マウスでは妊孕性が低下するとの報告もある (Yan *et al.*, 2001)。BMP15 をノックダウンしたブタにおいても、卵胞の発達や排卵が抑制され、BMP15 は雌の妊孕性に重要であることが示唆されている (Qin *et al.*, 2019)。また、体外培養系を用いた実験では、GDF9 はブタ (Hickey *et al.*, 2005)、およびマウス (Gilchrist *et al.*, 2006)、BMP15 はラットの顆粒膜細胞の増殖を促進することが報告されている (Otsuka *et al.*, 2000)。これらの報告から、多くの哺乳類において、卵母細胞に由来する GDF9 と BMP15 は顆粒膜細胞の増殖を促し、卵胞の発達を促進すると考えられている (Gilchrist *et al.*, 2008)。

近年、家畜の卵母細胞を体外で発育させる培養系が開発されつつある (Hirao, 2011, 2017)。ブタにおける培養系は完全ではないが、FSH を添加した培養液中で卵母細胞-卵丘細胞複合体を 5 日間培養すると、卵母細胞は卵丘細胞との間の相互作用を維持したまま発育することが報告されている (Cayo-Colca *et al.*, 2011)。本研究では、直径 1.2~1.5 mm の初期胞状卵胞から採取した直径約 110 μm の発育途上のブタ卵母細胞を材料として用い

た。この直径の卵母細胞は、成熟培養しても減数分裂を再開しないか、減数分裂を再開しても第二減数分裂中期へと成熟しない (Kanayama *et al.*, 2002)。卵巣から採取した発育途上の卵母細胞を成熟させるには、体外で卵母細胞の発育を完了させる必要があることから、FSH を添加した培養系を用いて GDF9 と BMP15 の卵母細胞の発育に及ぼす影響を検討した。

本章では、直径の異なるブタの胞状卵胞から採取した発育途上および発育を完了した卵母細胞と、それぞれの卵胞の卵丘細胞および壁顆粒膜細胞を採取し、各細胞における GDF9 と BMP15 の mRNA の発現を調べた。次に、ブタ初期胞状卵胞から採取した発育途上の卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞複合体を用いて、複合体の発達および卵母細胞の発育に及ぼす GDF9 と BMP15 の影響を調べた。種々の濃度の GDF9 または BMP15 を添加した培養液中で、複合体を 5 日間発育培養し、培養期間中に、複合体の直径、形態的な正常性、および卵胞腔様構造の形成を調べ、培養後に卵母細胞の直径と核相の変化を調べた。

第2節 材料および方法

1. 卵母細胞－卵丘細胞複合体，卵母細胞，卵丘細胞，および壁顆粒膜細胞の採取

と畜場で採取した未成熟な雌ブタの卵巣を，室温で研究室に持ち返った。卵巣を 0.2% (w/v) cetyltrimethylammonium bromide (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) で 1 回洗浄し，その後 0.1% (w/v) ポリビニルアルコール (polyvinyl alcohol : PVA ; Sigma-Aldrich, MO, USA) 添加リン酸緩衝生理食塩水 (Dulbecco's phosphate buffered saline : PBS-PVA) で 3 回洗浄した。

ペトリディッシュ (No. 1007 ; Falcon, NJ, USA) 内でメス (No. 21 ; Keisei Medical Industrial, Niigata, Japan) を用いて卵巣表面を薄切し，皮質片を PBS-PVA で軽くゆすいだ後，ペトリディッシュ内の培養液中に移した。培養液としては，0.85 mg/mL 炭酸水素ナトリウム，0.1% (w/v) PVA，0.08 mg/mL 硫酸カナマイシン (Sigma-Aldrich)，25 mM HEPES (Sigma-Aldrich) を TCM199 (Earl's salt ; Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) に添加し，pH を 7.4 に調整したもの (HEPES-199) を用いた。

実体顕微鏡下でメスを用いて，皮質片から直径 1.2～1.5 mm の初期胞状卵胞を切り出した。その後，メスで卵胞を切り開き，卵胞内から発育途上の卵母細胞を含む卵母細胞－卵丘細胞－壁顆粒膜細胞複合体を採取した。内径の小さいパスツールピペットを用いて，複合体から壁顆粒膜細胞を取り除き，卵母細胞－卵丘細胞複合体を得た。卵母細胞の細胞質が均質で退行の兆候が認められず，さらに卵母細胞が卵丘細胞に完全に覆われた複合体のみを選抜した。この複合体を Polymerase Chain Reaction (PCR) や発育培養に，壁顆粒膜細胞を PCR に用いた。

対照として，卵巣内で発育を完了した卵母細胞を含む卵母細胞－卵丘細胞複合体を採取した。メス (No. 11 ; Feather Safety Razor, Osaka, Japan) を用いて，卵巣から直径 4.0～6.0 mm の胞状卵胞を切り出した。実体顕微鏡下でピンセットを用いて卵胞周囲の組織を引きはがした後，卵胞を裂き，卵胞内から卵母細胞－卵丘細胞－壁顆粒膜細胞複合体を採取した。内径の小さいパスツールピペットを用いて，複合体から壁顆粒膜細胞を取り除き，卵母細胞－卵丘細胞複合体を得た。卵母細胞の細胞質が均質で退行の兆候が認められず，

さらに卵母細胞が完全に卵丘細胞に覆われた複合体のみを選抜した。この複合体を PCR と発育培養後の対照として用い、壁顆粒膜細胞を PCR に用いた。

採取直後の一部の複合体から、内径の小さいパスツールピペットを用いて卵丘細胞を取り除き、裸化卵母細胞を得た。卵母細胞をパラフィンオイル下の HEPES-199 のマイクロドロップ中に移し、透明帯を除く卵母細胞の直径を、倒立顕微鏡 (OLYMPUS, Tokyo, Japan) に装着した接眼測微計 (OLYMPUS) を用いて、1 μm 単位で測定した。その後、卵母細胞をスライドガラス上にマウントし、カルノア液 (酢酸 : エタノール = 1 : 3) 中で 48 時間以上脱脂・固定後に 1% (w/v) アセトオルセイン液 (FUJIFILM Wako Pure Chemical) で染色し、核相を観察した。

60 個の卵母細胞-卵丘細胞複合体を PBS-PVA で 3 回洗浄した後、30 個を内径の小さいパスツールピペットを用いて裸化卵母細胞と卵丘細胞に分離した。卵母細胞-卵丘細胞複合体および裸化卵母細胞それぞれ 30 個ずつを 1.5 mL の遠心チューブに少量の PBS-PVA と共に移し、使用まで -80°C で保存した。卵母細胞から分離した卵丘細胞は、PBS-PVA と共に 1.5 mL の遠心チューブへ移し、10,000 rpm (9,100 $\times g$) で 5 分間、遠心分離した。上清を除去し、卵丘細胞を最小容量の PBS-PVA と共に使用まで -80°C で保存した。また、複合体 30 個分の壁顆粒膜細胞を HEPES-199 と共に 1.5 mL の遠心チューブへ移し、10,000 rpm (9,100 $\times g$) で 5 分間、遠心分離した。この操作を 3 回繰り返して洗浄し、壁顆粒膜細胞を最小容量の PBS-PVA と共に使用まで -80°C で保存した。

2. Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) および quantitative PCR (qPCR)

-80°C で保存した発育途上または発育を完了した卵母細胞-卵丘細胞複合体、卵母細胞、卵丘細胞、および壁顆粒膜細胞からそれぞれ、RNeasy Plus Micro Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用い、マニュアルに従って全 RNA を抽出した。抽出した RNA から、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) を用い、マニュアルに従って cDNA を合成した。この時、抽出した RNA の濃度が一定となるように調整した。

PCR 増幅には、PCR Master Mix (Promega, WI, USA) を用いた。12.5 μL の PCR Master Mix, 2.5 μL の 10 μM Forward プライマー, 2.5 μL の 10 μM Reverse プライマー, 1 μL

の cDNA サンプル, および 6.5 μ L の超純水を混合して PCR 反応液を作成した。 *GDF9*, *BMP15*, および内部標準として *GAPDH* のプライマーを, GenBank の既知の配列を基に Primer design tool を用いて設計し, Thermo Fisher Scientific (MA, USA) から購入した (表 2-1)。 PCR の設定を 95°C 2 分を 1 サイクル, 95°C 30 秒/60°C 1 分/72°C 1 分を 30 サイクル, 72°C 5 分を 1 サイクルとし, サーマルサイクラー (TAKARA BIO, Shiga, Japan) を用いて各サンプルの cDNA 断片を増幅させた。

続いて, PCR 産物を, 検出剤としてエチジウムブロマイド (FUJIFILM Wako Pure Chemical) を加えた 2% (w/v) アガロースゲル (FUJIFILM Wako Pure Chemical) で, 電気泳動装置 (ATTO, Tokyo, Japan) を用いて 120 V, 180 mA で 30 分間泳動後, ゲル撮影装置 (AMZ System Science, Osaka, Japan) を用いて画像を得た。

泳動後のアガロースゲルから, QIAquick gel extraction kit (QIAGEN) を用いて PCR 産物を精製した。その後, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA) と ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて PCR 産物をシーケンス解析した。 PCR 産物のヌクレオチド配列を, ブタ *GDF9*, *BMP15*, および *GAPDH* の DNA 配列と比較し, 目的の遺伝子が増幅されていることを確認した。

qPCR の反応には, THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用い, マニュアルに従って遂行した。 *GDF9*, *BMP15*, *GAPDH*, および *ACTB* のプライマーを, GenBank の既知の配列を基に Primer design tool を用いて設計し, Thermo Fisher Scientific から購入した (表 2-1)。 *GAPDH* および *ACTB* は, 内部標準として用いた。 PCR の設定を 95°C 1 分を 1 サイクル, 95°C 15 秒/63°C 30 秒を 40 サイクルとし, サーマルサイクラー (BIO RAD, CA, USA) を用いて各サンプルの cDNA 断片を増幅させた。すべての遺伝子に対して融解曲線を解析し, 単一のピークで PCR 産物の特異性を判定した。

3. 卵母細胞-卵丘細胞複合体の発育培養

直径 1.2~1.5 mm の初期胞状卵胞から採取した発育途上の卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞複合体を, 各ウェル 200 μ L の発育培養液を含むコラーゲンコートした 96 ウェルプレート (BioCort collagen I cellware 96 well plate, Corning, NY, USA) へと個別に移

表 2-1. RT-PCR および qPCR に用いたブタ *GDF9*, *BMP15*, *GAPDH*, および *ACTB* 遺伝子のプライマー配列と, 推定される PCR 産物の分子サイズ

	遺伝子		プライマー配列 (5'→3')	推定分子サイズ (bp)	アクセッション番号
RT-PCR	<i>GDF9</i>	Forward	GCTGTGTTGGAATCTGAGGCT	337	NM_001001909
		Reverse	CAGCAGTAACACGATCCAGGT		
	<i>BMP15</i>	Forward	AGTTGTACCAGCGTTCAGCC	406	NM_001005155
		Reverse	AAGCGGAGTCGTAGAACCCT		
	<i>GAPDH</i>	Forward	GTGAAGGTCGGAGTGAACGG	368	NM_001206359
		Reverse	GCAGAAGGGGCAGAGATGAT		
qPCR	<i>GDF9</i>	Forward	GCTTTGCGCTACATGAAGAGG	189	NM_001001909
		Reverse	AACACGATCCAGGTAAACCG		
	<i>BMP15</i>	Forward	ACCATGGTGAGGCTGGTGAG	178	NM_001005155
		Reverse	CATGGCAGGAGAGGTGGAAG		
	<i>GAPDH</i>	Forward	ATCCATGACCACTTCGGCATC	141	NM_001206359
		Reverse	AGAAGCAGGGATGATGTTCTGG		
	<i>ACTB</i>	Forward	ATCGTGCGGGACATCAAGGA	179	XM_003124280
		Reverse	AGGAAGGAGGGCTGGAAGAG		

した。その後、5% O₂–5% CO₂–90% N₂の気相下で、38.5°Cの湿潤条件で複合体を5日間発育培養した。培養開始前に発育培養液をインキュベーター内に静置し、培養液の気相を平衡させた。培養3日後に発育培養液の半量を交換した。ブタ卵母細胞の発育培養液は、Hiraoら(2004)が報告したウシ卵母細胞の体外発育培養液に基づいて調整した。2.2 mg/mL 炭酸水素ナトリウム、0.08 mg/mL 硫酸カナマイシン、2% (w/v) ポリビニルピロリドン (polyvinylpyrrolidone : PVP : 分子量 360,000 ; Sigma-Aldrich), 55 µg/mL L-システイン (Sigma-Aldrich), 0.05 µM デキサメタゾン (Sigma-Aldrich), 4.0 mM ヒポキサントシン (Sigma-Aldrich), 50 µg/mL アスコルビン酸-2-グルコシド (Hayashibara, Okayama, Japan), および5% (w/v) ウシ胎仔血清 (fetal calf serum : FCS ; ICN Biomedicals, OH, USA) を添加した Minimum Essential Medium alpha medium (α-MEM ; GIBCO, Invitrogen, Scotland, UK) に、さらに 10⁻⁵ µM エストラジオール-17β (β-estradiol water-soluble ; Sigma-Aldrich), および 0.01 IU/mL ヒト卵胞刺激ホルモン (recombinant human follicle stimulating hormone : rhFSH ; MSD, Tokyo, Japan) を添加した。実験区には、GDF9 (recombinant mouse GDF-9 protein : 739-G9 ; R&D Systems, MN, USA) または BMP15 (recombinant human BMP-15 protein : 5096-BM ; R&D Systems) を 0, 10, 50, または 100 ng/mL の濃度で添加した。使用したマウスの GDF9 (Gly307-Arg441) およびヒト BMP15 (Gln268-Arg392) は、ブタの GDF9 および BMP15 とそれぞれ 88% および 80% のアミノ酸配列が同一であり、生理活性を示す成熟型である。さらに、ブタを含む複数の動物種で、卵丘/顆粒膜細胞または卵母細胞–卵丘/顆粒膜細胞複合体に対して影響を及ぼすことが報告されている (Mottershead *et al.*, 2012 ; Lin *et al.*, 2014 ; Sudiman *et al.*, 2014 ; Nagyova *et al.*, 2017 ; Alam *et al.*, 2018 ; Li *et al.*, 2020)。

培養開始時、培養3日後、および5日後に、倒立顕微鏡下で卵母細胞–卵丘細胞複合体の形態を観察し、個々の複合体の画像を取得した。卵母細胞の細胞質が均質で退行の兆候がなく、周囲が卵丘細胞で完全に覆われた卵母細胞を含む複合体を形態的に正常と判断し、形態的に正常な複合体の直径を ImageJ software (NIH, MD, USA) を用いて測定した。培養後、一部の形態的に正常な複合体の内部に卵胞腔様の構造が形成されたため、腔の形成についても観察した。

培養終了後、内径の小さいパスツールピペットを用いて一部の形態的に正常な卵母細胞－卵丘細胞複合体から卵丘細胞を取り除き、裸化した卵母細胞の直径を前述の通りに測定した。その後、卵母細胞をスライドガラス上にマウントしてカルノア液で脱脂・固定後に染色し、核相を観察した。

4. 卵母細胞の核相観察

卵母細胞を微分干渉顕微鏡（OLYMPUS）下で観察し、これまでの報告に基づき卵母細胞の核相を分類した（Motlik & Fulka, 1976 ; Hirao *et al.*, 1995）。卵核胞をもつ卵母細胞の核相を filamentous chromatin-stringy chromatin（FC～SC）、および germinal vesicle I-IV（GVI～IV）に分類した。卵核胞が崩壊した後の卵母細胞の核相を、 diakinesis-metaphase I（D～MI）、anaphase I-telophase I（AI～TI）および metaphase II（MII）に分類した。卵母細胞の染色質が極端に凝縮あるいは細胞質に散在するもの、および卵母細胞の細胞質に異常が認められるものは、退行と判断した。

5. 統計処理

形態的に正常な複合体の割合および腔を形成した複合体数の統計的有意性は、 χ^2 検定を用いて判定した。卵母細胞－卵丘細胞複合体の直径の差は、二元配置分散分析し、交互作用に有意性がある場合は、Tukey-Kramer の多重比較検定を用いて群間比較した。さらに、培養 7 日目の複合体の直径については、体内で発育を完了した複合体と t 検定を用いて比較した。発育培養後の各核相を示す卵母細胞数の差の有意性は、 χ^2 検定を用いて判定した。また、卵母細胞の平均直径の差および mRNA 量については一元配置分散分析し、その後 Tukey-Kramer の多重比較検定を用いて比較した。 $P < 0.05$ を統計的に有意と判断した。

第3節 結果

1. *GDF9* と *BMP15* mRNA の発現

直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胞状卵胞と直径 4.0~6.0 mm の胞状卵胞から採取した卵母細胞, 卵丘細胞, および壁顆粒膜細胞における *GDF9* と *BMP15* mRNA の発現を調べた (図 2-1)。初期胞状卵胞の卵母細胞-卵丘細胞複合体 (図 2-1 A) と卵母細胞 (図 2-1 B) では, *GDF9* および *BMP15* の PCR 産物によるバンドが, 推定分子サイズの位置に検出された (図 2-1 E)。胞状卵胞の卵母細胞-卵丘細胞複合体と卵母細胞では, 初期胞状卵胞と同様に *GDF9* および *BMP15* のバンドがそれぞれ検出されたが, 卵母細胞で複合体より強く検出された。初期胞状卵胞と胞状卵胞の卵丘細胞 (図 2-1 C) と壁顆粒膜細胞 (図 2-1 D) では, *GDF9* mRNA の発現がわずかに認められたが, *BMP15* mRNA は検出されなかった (図 2-1 E)。

qPCR では, 卵胞が初期胞状卵胞から胞状卵胞へと発達する過程で, どちらの卵胞においても *GDF9* (図 2-1 F) と *BMP15* (図 2-1 G) mRNA は卵母細胞で強く発現していたが, 卵丘細胞や壁顆粒膜細胞においてもわずかに検出された。初期胞状卵胞由来の卵母細胞において, *GDF9* と *BMP15* mRNA の発現レベルは胞状卵胞より高い傾向があったが, 有意差は認められなかった。

2. 卵母細胞-卵丘細胞複合体の発達

直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体を, 種々の濃度の *GDF9* (図 2-2 A) または *BMP15* (図 2-2 B) を添加した発育培養液中で 5 日間培養した。培養開始時 (Day 0), 卵母細胞は周囲を 2~3 層の卵丘細胞に覆われていた。培養後, いずれの実験区においても, 卵丘細胞の一部はウェルの底面に付着し, 複合体から外に向かって遊走し, 残りは卵母細胞を覆うようにドーム状の構造を形成した。複合体の直径は, 培養の経過とともに徐々に増加した。培養終了時, いずれの区においても 85%以上の複合体では, 卵母細胞は卵丘細胞に完全に覆われた形態的に正常な状態であり, *GDF9* および *BMP15* 添加による影響は認められなかった (図 2-3)。卵母細胞の裸化が認められ

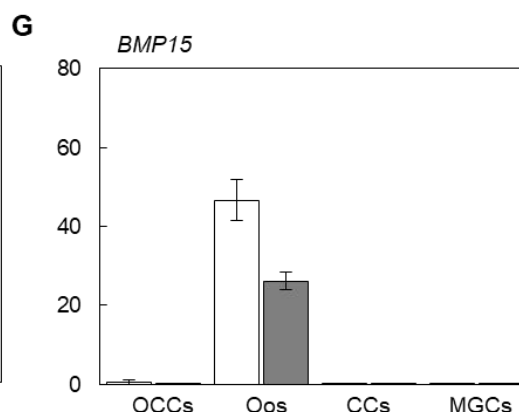
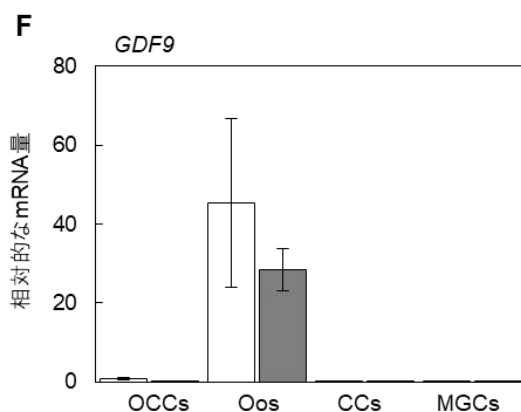
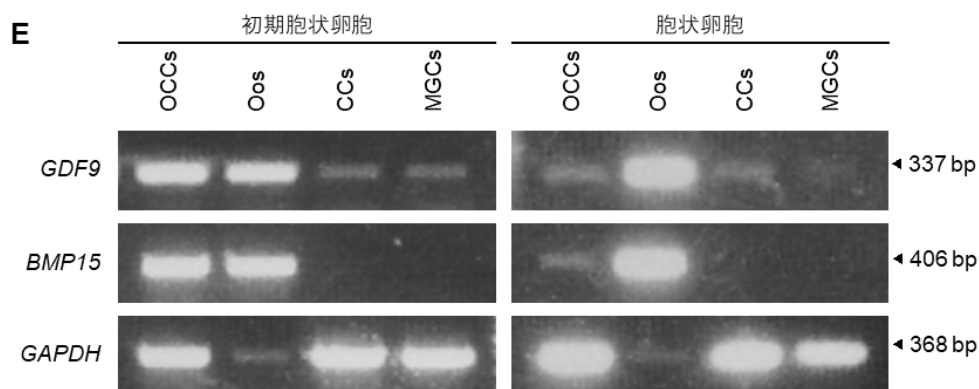
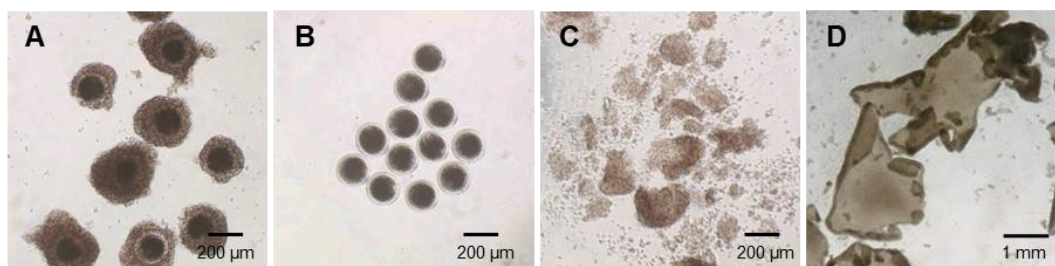


図 2-1. プタ卵母細胞，卵丘細胞，および壁顆粒膜細胞における *GDF9* および *BMP15* mRNA の発現
 直径 1.2~1.5 mm の初期胞状卵胞と直径 4.0~6.0 mm の胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体 (oocyte-cumulus cell complexes, OCCs ; A), 卵母細胞 (oocytes, Oos ; B), 卵丘細胞 (cumulus cells, CCs ; C), および壁顆粒膜細胞 (mural granulosa cells, MGCs ; D) からそれぞれ RNA を抽出し, *GDF9* および *BMP15* について RT-PCR (E) と qPCR (F, G) を行った。(E) *GAPDH* を内部標準として用いた。(F, G) □ は初期胞状卵胞および ■ は胞状卵胞を示す。*GAPDH* と *ACTB* を内部標準として用いたが, 結果は同様であったため, *GAPDH* の結果を示す。実験は 3 回以上繰り返し行った。

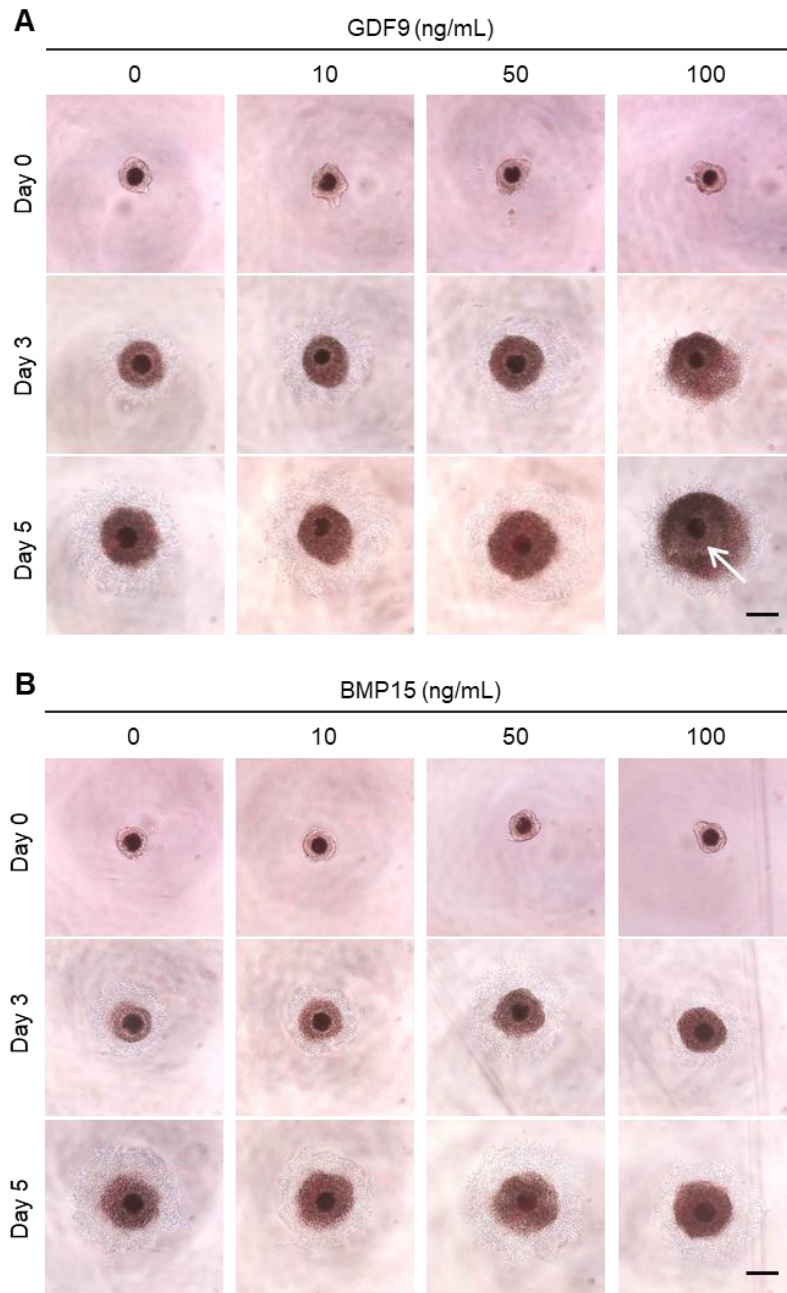


図 2-2. GDF9 または BMP15 添加培養液中におけるブタ卵母細胞-卵丘細胞複合体の発達

直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胎状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体を、0, 10, 50, および 100 ng/mL の GDF9 (A) または BMP15 (B) を添加した培養液中で 5 日間発育培養した。培養開始時 (Day 0), 3 日後 (Day 3), および 5 日後 (Day 5) に複合体の形態を観察した。図中の矢印は卵胞腔様構造, スケールバーは 200 μm を表す。

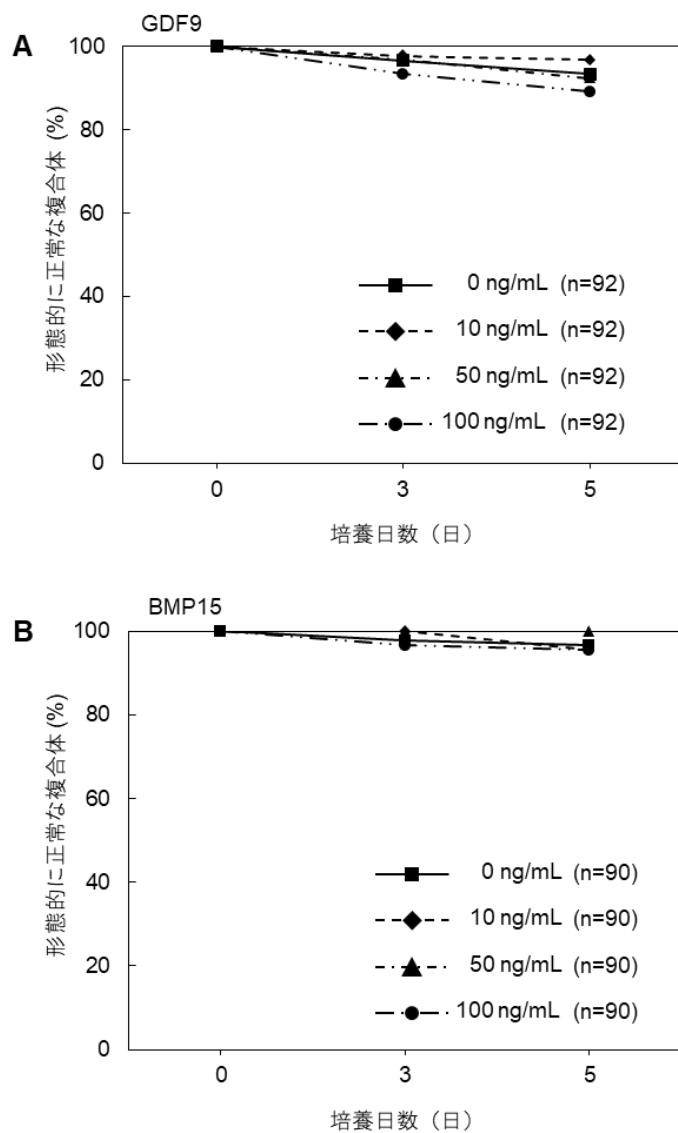


図 2-3. ブタ卵母細胞-卵丘細胞複合体の形態的な正常性に及ぼす GDF9 および BMP15 の影響

直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体を、0, 10, 50, および 100 ng/mL の GDF9 (A) または BMP15 (B) を添加した培養液中で 5 日間発育培養した。培養開始時、3 日後、および 5 日後に複合体を観察し、卵母細胞が卵丘細胞で完全に覆われた複合体を形態的に正常と判断した。実験は 3 回以上繰り返し行った。

た複合体では、ウェルの底面に付着した卵丘細胞は複合体から外に向かって広く遊走した。

卵母細胞-卵丘細胞複合体の直径を測定し、複合体の発達を調べた (図 2-4)。培養開始時、170~180 μm であった複合体の平均直径は、いずれの実験区においても培養の経過とともに増加し、培養 5 日後、無添加区において約 300 μm となった。GDF9 添加区では濃度依存的に複合体の平均直径は増加し、100 ng/mL 添加区では $349.9 \pm 9.0 \mu\text{m}$ (平均値 \pm 標準誤差) と、無添加区の 302.0 ± 7.5 と比較して有意に増大した (図 2-4 A)。また、GDF9 添加区の複合体の平均直径は、体内で発育を完了した卵母細胞-卵丘細胞複合体に比べて同等かそれ以上であった。一方、BMP15 添加区では、濃度依存的な直径の増加は認められなかった (図 2-4 B)。

培養の過程で、一部の複合体は内部に卵胞腔様の構造を形成したため (図 2-2 A; 矢印)、卵胞腔様の構造の形成についても調べた (図 2-5)。卵胞腔様構造の形成率は GDF9 と BMP15 を添加したいずれの区においても 10~30% であり、無添加区との間に差は認められなかった。

3. 卵母細胞の発育

発育培養後、卵母細胞に裸化や細胞質の異常などの退行の兆候が認められない卵母細胞-卵丘細胞複合体から卵母細胞を回収し、卵母細胞の直径を測定した (図 2-6)。発育培養前に約 110 μm であった卵母細胞の平均直径は、培養 5 日後にすべての区で約 125 μm となり、体内で発育を完了した卵母細胞とほぼ同等の大きさへと発育した。GDF9 または BMP15 添加区と無添加区との間に差は認められなかった。

培養前の発育途上の卵母細胞では、卵核胞内に細い糸状の染色質が散在し、ほぼすべての卵母細胞が FC 期もしくは SC 期であった (表 2-2)。5 日間の発育培養後、いずれの区においても 70% 以上の卵母細胞が GV 期へと移行しており、GDF9 または BMP15 による影響は認められなかった。卵母細胞の染色質が極端に凝縮あるいは細胞質に散在するもの、および卵母細胞の細胞質に異常が認められる退行と判断される卵母細胞も 5~21% 観察されたが、GDF9 または BMP15 添加区と無添加区との間に差はなかった。体内で発育を完了した卵母細胞はすべて GV 期であった。

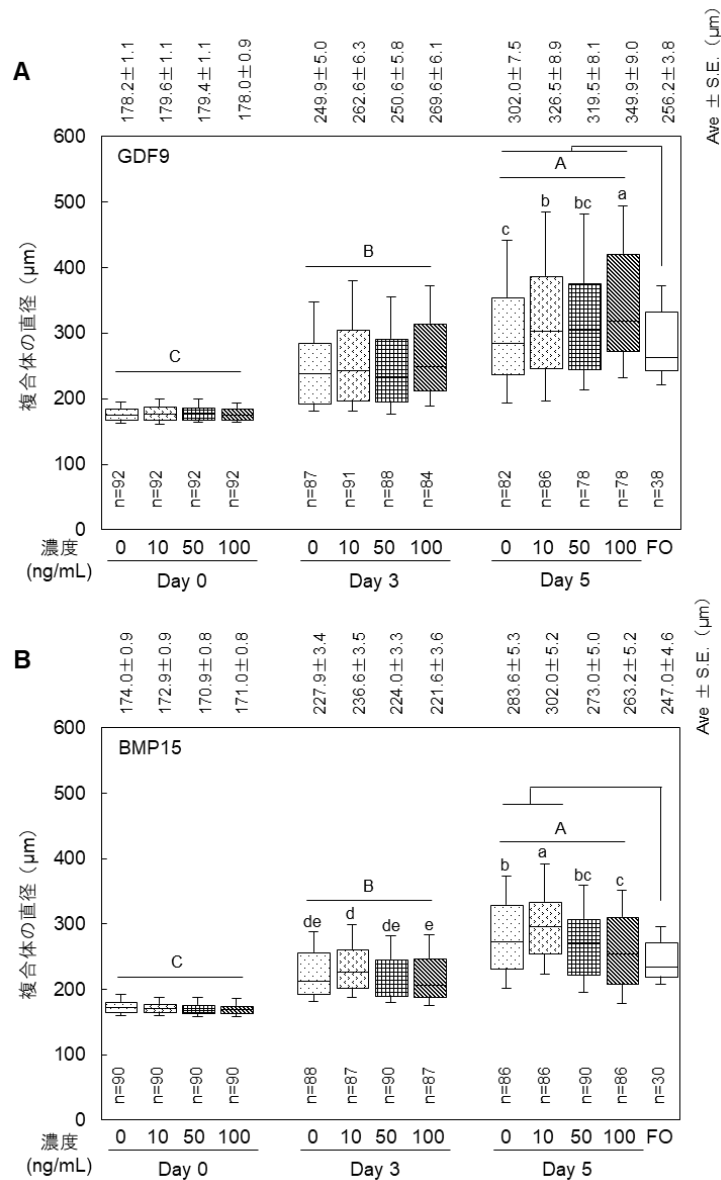


図 2-4. ブタ卵母細胞-卵丘細胞複合体の発達に及ぼす GDF9 および BMP15 の影響

直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胞状卵母細胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体を、0, 10, 50, および 100 ng/mL の GDF9 (A) または BMP15 (B) を添加した培養液中で 5 日間発育培養した。培養開始時 (Day 0)、3 日後 (Day 3)、および 5 日後 (Day 5) に複合体を観察し、卵母細胞が卵丘細胞に完全に覆われた正常な複合体のうち、卵母細胞に細胞質の異常などの退行の兆候が認められない卵母細胞-卵丘細胞複合体の直径を測定した。対照として、直径 4.0~6.0 mm の胞状卵母細胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体 (fully-grown oocyte, FO) の直径を測定した。図上段の数値は複合体の平均直径±標準誤差を示す。

(A) ^{A-C}, ^{a-c} , (B) ^{A-C}, ^{a-c}, ^{d, e} 異なる文字間の差は有意 ($P < 0.05$)。実験は 3 回以上繰り返し行った。

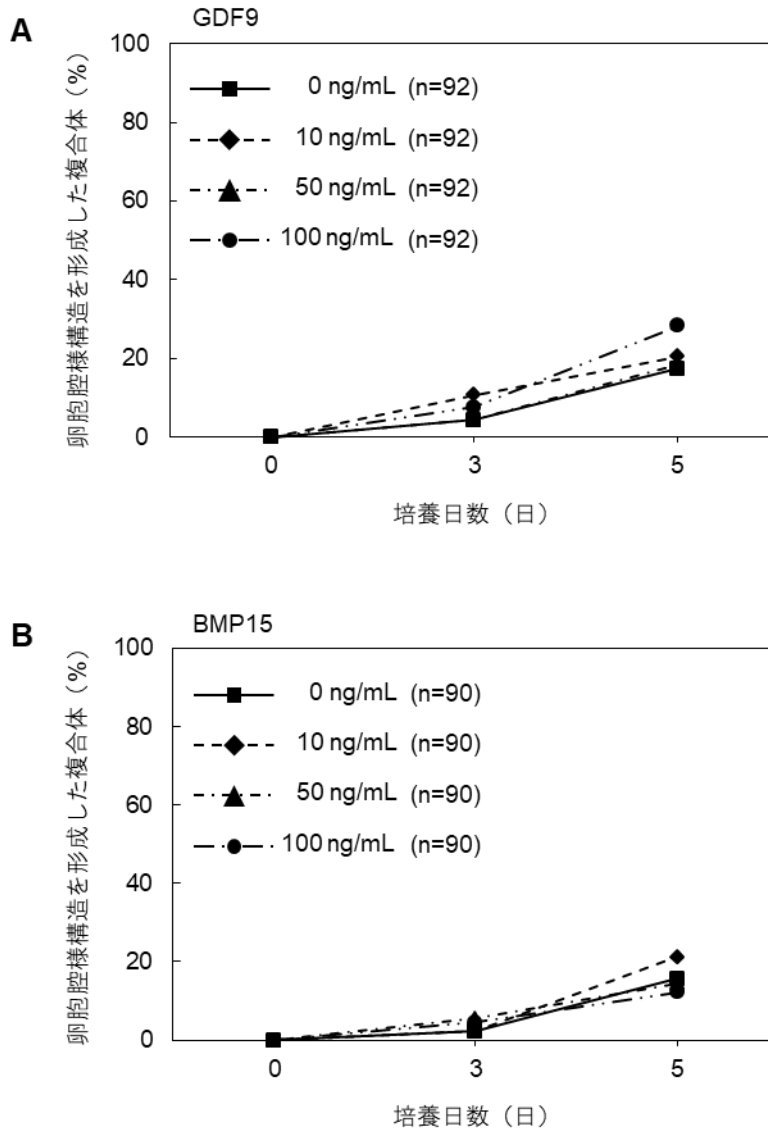


図 2-5. ブタ卵母細胞-卵丘細胞複合体の卵胞腔様構造の形成に及ぼす GDF9 および BMP15 の影響

直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胎状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体を、0, 10, 50, および 100 ng/mL の GDF9 (A) または BMP15 (B) を添加した培養液中で 5 日間発育培養した。培養開始時、3 日後、および 5 日後に複合体を観察し、複合体の内部に卵胞腔様構造を形成した複合体の割合を調べた。実験は 3 回以上繰り返した。

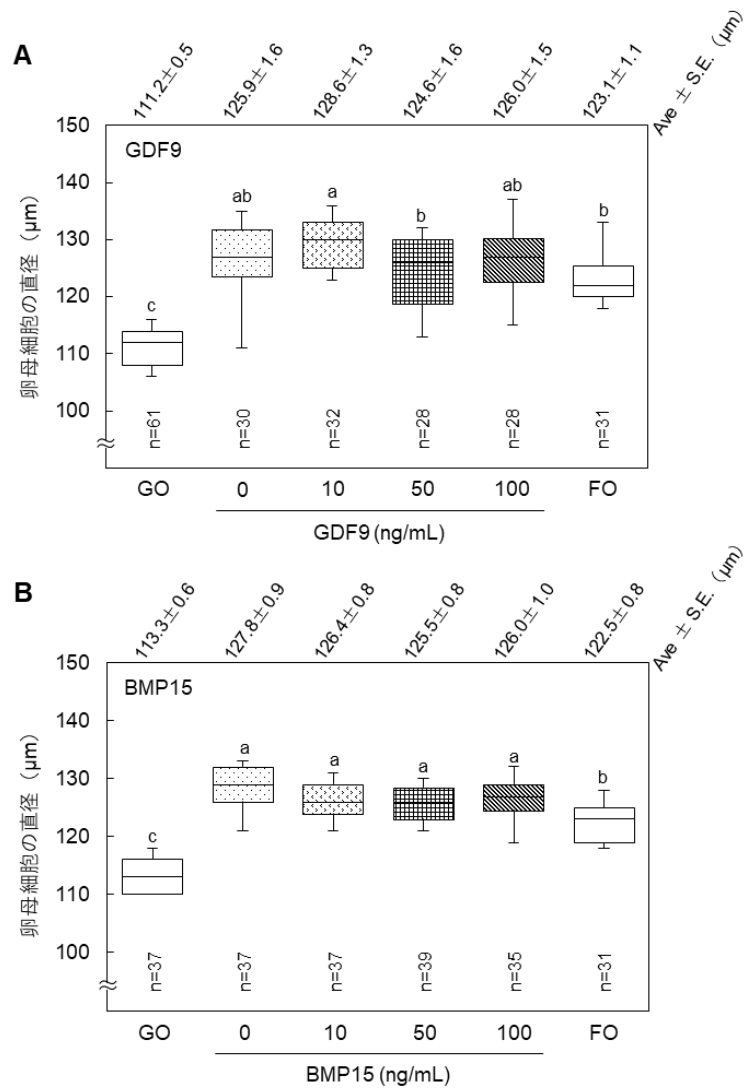


図 2-6. ブタ卵母細胞の発育に及ぼす GDF9 および BMP15 の影響

直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体を、0, 10, 50, および 100 ng/mL の GDF9 (A) または BMP15 (B) を添加した培養液中で 5 日間発育培養した。培養終了後、卵母細胞が卵丘細胞に完全に覆われた正常な複合体のうち、卵母細胞に細胞質の異常などの退行の兆候が認められない卵母細胞-卵丘細胞複合体から卵母細胞を回収し、直径を測定した。対照として、培養前の複合体から採取した卵母細胞と (growing oocyte, GO), 直径 4.0~6.0 mm の胞状卵胞から採取した卵母細胞 (fully-grown oocyte, FO) の直径を測定した。図上段の数値は複合体の平均直径±標準誤差を示す。

a-c) 異なる文字間の差は有意 ($P < 0.05$)。実験は 3 回以上繰り返し行った。

表 2-2. ブタ卵母細胞の発育培養後の核相に及ぼす GDF9 および BMP15 の影響

卵胞の 直径 (mm)	発育培養*			検査 卵母細胞数	GV期の卵母細胞数** (%)			GVBDを起こした卵母細胞数** (%)				退行
	培養日数 (日)	処理	添加濃度 (ng/mL)		全GV	FC~SC	GVI~IV	全GVBD	D~MI	AI~TI	MII	
1.2~1.5	-	-	-	61	61 (100)	60 (98) ^a	1 (2) ^a	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	5	GDF9	0	30	25 (83)	1 (3) ^b	24 (80) ^b	2 (7)	2 (7)	0 (0)	0 (0)	3 (10)
	5		10	32	27 (84)	0 (0)	27 (84) ^b	2 (6)	2 (6)	0 (0)	0 (0)	3 (9)
	5		50	28	20 (77)	1 (4) ^b	19 (73) ^b	2 (7)	1 (4)	0 (0)	1 (4)	6 (21)
	5		100	28	22 (79)	0 (0)	22 (79) ^b	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (21)
4.0~6.0	-	-	-	31	31 (100)	0 (0)	31 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1.2~1.5	-	-	-	37	37 (100)	37 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	5	BMP15	0	37	33 (89)	0 (0)	33 (89)	1 (3)	1 (3)	0 (0)	0 (0)	3 (8)
	5		10	37	34 (92)	0 (0)	34 (92)	1 (3)	1 (3)	0 (0)	0 (0)	2 (5)
	5		50	39	37 (95)	0 (0)	37 (95)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (5)
	5		100	35	31 (89)	0 (0)	31 (89)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (11)
4.0~6.0	-	-	-	31	31 (100)	0 (0)	31 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

* 直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胎状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体を、0, 10, 50 および 100 ng/mL の GDF9 または BMP15 を添加した培養液中で 5 日間発育培養した。培養終了後、卵母細胞が卵丘細胞に完全に覆われた正常な複合体のうち、卵母細胞に細胞質の異常などの退行の兆候が認められない卵母細胞-卵丘細胞複合体から卵母細胞を回収し、脱脂・固定した後、染色し、卵母細胞の核相を評価した。対照として、発育培養前の複合体と、直径 4.0~6.0 mm の胎状卵胞から採取した複体の卵母細胞を同様に採取し、固定、染色して、核相を評価した。

** FC~SC: filamentous chromatin stage-stringy chromatin stage, GVI~IV: germinal vesicle stages I-IV, GVBD: germinal vesicle breakdown, D~MI: diakinesis stage-metaphase I, AI~TI: anaphase I-telophase I, MII: metaphase II, 退行: 染色質が極端に凝縮あるいは細胞質に散在するもの、および卵母細胞の細胞質に異常が認められるもの (Motlik & Fulka, 1976; Hirao *et al.*, 1995)。

^{a,b)} GDF9 と BMP15 の各実験で、同じ列内の異なる文字間の差は有意 ($P < 0.05$)。実験は 3 回以上繰り返し行った。

第4節 考察

本研究の結果は、ブタの発育途上の卵母細胞、発育を完了した卵母細胞ともに *GDF9* と *BMP15* mRNA を発現していることを示しているが、*GDF9* mRNA は卵丘細胞と壁顆粒膜細胞にもわずかに発現がみられた。マウス、ラット、ヒト、およびウシを含む多くの動物種において *GDF9* は卵母細胞特異的に発現するとの報告がある (McGrath *et al.*, 1995 ; Fitzpatrick *et al.*, 1998 ; Laitinen *et al.*, 1998 ; Bodensteiner *et al.*, 1999 ; Jaatinen *et al.*, 1999)。ブタでは、胞状卵胞の卵母細胞に加えて卵丘細胞と壁顆粒膜細胞にも *GDF9* が発現しているとの報告があり (Prochazka *et al.*, 2004)、ヒトでも、卵母細胞周囲の卵丘細胞で *GDF9* が検出されている (Sidis *et al.*, 1998)。本実験結果は、これらの報告と一致し、ブタでは卵母細胞だけでなく、卵丘細胞においても *GDF9* が発現することを示している。卵丘細胞の転写産物が卵母細胞へ輸送されることが報告されており (Macaulay *et al.*, 2016)、卵母細胞の *GDF9* mRNA が卵丘細胞へと輸送される可能性も否定できないが、卵丘細胞より遠位にある壁顆粒膜細胞においても、卵丘細胞と同様に *GDF9* mRNA の発現が検出されたことから、卵母細胞から *GDF9* mRNA が輸送された可能性は低く、卵丘細胞と同様、壁顆粒膜細胞においても *GDF9* が比較的低レベルで発現していることが示された。

ブタ *BMP15* mRNA は、卵母細胞で強く発現し、卵丘細胞と壁顆粒膜細胞では検出されなかった。排卵直前の後期胞状卵胞内のブタ卵丘細胞で、*BMP15* がわずかに発現するとの報告もあるが (Paradis *et al.*, 2009)、その量は *GDF9* と比較して 1/30 程度であり、本実験の結果とは矛盾しない。

RT-PCR において、初期胞状卵胞では卵母細胞-卵丘細胞複合体と卵母細胞の *GDF9* と *BMP15* のバンドは同程度の強さで検出されたが、胞状卵胞では複合体の *GDF9* と *BMP15* が卵母細胞より弱く検出された。本実験では、初期胞状卵胞と胞状卵胞それぞれ 30 個の卵母細胞-卵丘細胞複合体から RNA を抽出し、その後、サンプル間で RNA 濃度を一定に揃えて cDNA を合成した。初期胞状卵胞から採取した複合体では、卵母細胞は周囲を 2~3 層の卵丘細胞に覆われていたが、胞状卵胞から採取した複合体では、卵母細胞は 5 層以上の卵丘細胞に覆われており、複合体を構成する卵丘細胞の数は胞状卵胞で多い。このため、

胞状卵胞の卵母細胞－卵丘細胞複合体から抽出した全 RNA 中で、卵母細胞由来の RNA が占める割合は、初期胞状卵胞の複合体から抽出した RNA 中で占める割合より低いと考えられ、これがバンドの強さに反映したと思われる。

本研究では、*GDF9* と *BMP15* mRNA の発現レベルは胞状卵胞の発達段階で有意な差を示さなかった。以前の研究では、*GDF9* の発現レベルは二次卵胞期の卵母細胞より胞状卵胞期の卵母細胞で高いことが示されている (Bezerra *et al.*, 2019)。また、*GDF9* と *BMP15* mRNA は、ブタの卵母細胞において、胞状卵胞期を通して恒常的に発現するとの報告もある (Caixeta *et al.*, 2009)。本研究結果は、ブタの卵母細胞において、胞状卵胞の発達期を通して *GDF9* と *BMP15* mRNA は発現し続けていることを示唆している。

直径 1.2～1.5 mm のブタ初期胞状卵胞から採取した発育途上の卵母細胞を含む卵母細胞－卵丘細胞複合体を、種々の濃度の *GDF9* と *BMP15* を添加した培養液中で 5 日間発育培養すると、いずれの区においても卵母細胞は体内で発育を完了した卵母細胞と同等か、それ以上へと発育した。また、いずれの区においても、70%以上の卵母細胞の核相は、体内で発育を完了した卵母細胞と同様な状態へと変化した。これらの結果は、*GDF9* と *BMP15* は卵母細胞の発育には直接影響を及ぼさないことを示唆している。

発育培養開始時に 170～180 μm であった卵母細胞－卵丘細胞複合体の直径は、発育培養の経過とともに増加し、培養 5 日後には 300 μm 以上に達した。これは、体内で発育を完了した卵母細胞を含む複合体の直径以上の大きさであった。特に、*GDF9* 添加区では、複合体の直径は添加濃度依存的に増加した。体外培養の実験で、*GDF9* は顆粒膜細胞の増殖を促進することが、ラット (Vitt *et al.*, 2000a), ウシとヒツジ (McNatty *et al.*, 2005a; 2005b), およびマウス (Gilchrist *et al.*, 2006) において報告されている。ブタの卵丘細胞も、*GDF9* の作用によって増殖し、複合体の直径が増加したと考えられる。一方、*BMP15* 添加区では、濃度依存的な複合体の直径の増加はみられなかった。体外培養系で、*BMP15* は *GDF9* と同様に顆粒膜細胞の増殖を促進することが、ラット (Otsuka *et al.*, 2000), ウシ, およびヒツジ (McNatty *et al.*, 2005a, 2005b) において報告されている。FSH もラット (Goldenberg *et al.*, 1972; Louvent & Vaitukaitis 1976; Rao *et al.*, 1978) やウシ (Gutiérrez *et al.*, 1997) において顆粒膜細胞の増殖を促進する。本実験で用いた培養液には FSH が添加されており、

複合体は培養日数の経過と共に直径を増加させたが、ブタでは BMP15 による細胞増殖作用は弱く、複合体の直径がそれほど増加しなかったと思われる。

本研究のいずれの区においても、5 日間発育培養した複合体の 10~30% に卵胞腔様構造が形成された。Alam ら (2018) は、ウシの初期胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体を、本実験と類似の培養液中で 5 日間培養すると、GDF9 と BMP15 をそれぞれ単独で添加した場合には 70% 以上の複合体が、また、GDF9 と BMP15 を同時に添加すると、ほぼすべての複合体が卵胞腔様構造を形成することを報告している。本実験では GDF9 または BMP15 をそれぞれ単独で発育培養液中に添加したが、卵胞腔様構造を形成した複合体の割合は低く、卵胞腔様構造の形成に及ぼす GDF9 と BMP15 の影響を検討するには至らなかった。予備実験として、ディッシュ底面での卵丘細胞の遊走を抑える目的で、細胞接着性の低い 96 ウェルプレート (Nunclon Sphera 174925 96F bottom plate; Corning, NY, USA) を用いて、GDF9 添加培養液中でブタ卵母細胞-卵丘細胞複合体を 7 日間培養したところ、約 70% の複合体で卵胞腔様構造の形成が認められた。この培養系を用いて、改めて卵胞腔様構造の形成に及ぼす GDF9 および BMP15 の影響を第 4 章において検討する。

以上のことから、直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胞状卵胞および直径 4.0~6.0 mm の胞状卵胞において、GDF9 と BMP15 は主に卵母細胞で発現することが示された。また、初期胞状卵胞から採取した発育途上の卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞複合体を、GDF9 または BMP15 を添加した培養液中で 5 日間発育培養すると、GDF9 と BMP15 は卵母細胞の発育に対しては直接影響を及ぼさないが、GDF9 は複合体の直径を増大させることが示された。

第5節 小括

卵巣内で卵母細胞は、周囲の顆粒膜細胞と相互に作用し合いながら、卵胞の発達と同調して発育する。卵母細胞は *GDF9* と *BMP15* を分泌し、周囲の顆粒膜細胞を制御すると考えられている。本章では、直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胞状卵胞から採取した、発育途上の卵母細胞における *GDF9* と *BMP15* の mRNA の発現を調べた。次に、発育途上の卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞複合体を種々の濃度の *GDF9* または *BMP15* を添加した培養液中で 5 日間発育培養し、複合体の発達と卵母細胞の発育に及ぼす *GDF9* と *BMP15* の影響を調べた。

直径 1.2~1.5 mm の初期胞状卵胞と直径 4.0~6.0 mm の胞状卵胞から採取した卵母細胞、卵丘細胞、および壁顆粒膜細胞における *GDF9* と *BMP15* mRNA の発現を RT-PCR および qPCR で調べたところ、どちらの卵胞においても、*GDF9* と *BMP15* は卵母細胞で強く発現していた。また、どちらの卵胞の卵丘細胞と壁顆粒膜細胞にも *GDF9* mRNA の発現がわずかに認められたが、*BMP15* mRNA は検出されなかった。

発育途上の卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞複合体を、0, 10, 50, および 100 ng/mL の濃度で *GDF9* または *BMP15* を添加した培養液中で 5 日間発育培養したところ、ほとんどの複合体は、卵母細胞が卵丘細胞に完全に覆われた正常な形態を維持した。*GDF9* 添加区では、複合体の平均直径は濃度依存的に増加し、発育培養後、100 ng/mL 添加区では $349.9 \pm 9.0 \mu\text{m}$ (平均値±標準誤差) と、無添加区の $302.0 \pm 7.5 \mu\text{m}$ と比較して有意に高い値となった。一方、*BMP15* 添加区では、複合体の平均直径の濃度依存的な増加は認められなかった。また、いずれの区においても、10~30%の複合体は内部に卵胞腔様の構造を形成したが、各区間でその割合に差はなかった。

発育培養前に約 110 μm であった卵母細胞の平均直径は、発育培養後、すべての区で約 125 μm となり、体内で発育を完了した卵母細胞と同等の大きさへと発育した。また、発育培養前に FC 期または SC 期であった卵母細胞の核相は、発育培養後には GV 期へと移行し、体内で発育を完了した卵母細胞と同様な核相となった。卵母細胞の発育および核相の変化

のいずれにおいても, *GDF9* または *BMP15* 添加区と無添加区との間に差は認められなかった。

以上のことから, 直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胞状卵胞および直径 4.0~6.0 mm の胞状卵胞において, *GDF9* と *BMP15* は主に卵母細胞で発現することが示された。また, 初期胞状卵胞から採取した発育途上の卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞複合体を, *GDF9* または *BMP15* を添加した培養液中で 5 日間発育培養すると, *GDF9* と *BMP15* は卵母細胞の発育に対しては直接影響を及ぼさないが, *GDF9* は複合体の直径を増大させることが示された。

第3章 GDF9 および BMP15 添加培養液中で発育した卵母細胞の体外成熟

第1節 緒言

卵巣内で発育を完了した卵母細胞は、性周期ごとに下垂体から分泌される性腺刺激ホルモン (FSH と LH) のサージを受けると、休止していた減数分裂を再開し、第一減数分裂前期から第二減数分裂中期へと成熟し、排卵される。発育を完了した卵母細胞を含む胞状卵胞内で、FSH と LH は卵丘細胞や壁顆粒膜細胞に発現する受容体に結合し、上皮成長因子 (epidermal growth factor : EGF) 様ペプチドを介して EGF 受容体を活性化させる。次いで、EGF 受容体は、いくつかのシグナル伝達カスケードを活性化し、その下流で卵丘膨潤化因子の発現を誘起すると共に、卵母細胞の減数分裂再開を抑制する因子の卵母細胞への移行を抑制すると考えられている (Prochazka *et al.*, 2017 ; Richani & Gilchrist, 2018 ; 図 3-1)。卵丘細胞からのヒアルロン酸の分泌により卵丘は膨潤化し、卵丘細胞と卵母細胞との間の結合は解離する。卵丘細胞から供給される減数分裂再開抑制因子の供給が停止すると、卵母細胞は減数分裂を再開して第二減数分裂中期へと成熟する。第2章で用いた直径 1.2~1.5 mm の初期胞状卵胞から採取した直径約 110 μm の発育途上のブタ卵母細胞は、成熟培養しても減数分裂を再開しないか、再開しても第二減数分裂中期へと成熟しない (Kanayama *et al.*, 2002)。一方、直径 4.0~6.0 mm の胞状卵胞から採取した直径約 125 μm の発育を完了したブタ卵母細胞は、成熟培養すると高率に第二減数分裂中期へと成熟する。すなわち、卵母細胞は、発育を完了するこの最終の過程で成熟する能力を獲得する。

第2章において、ブタの初期胞状卵胞と胞状卵胞から採取した卵母細胞、卵丘細胞、および壁顆粒膜細胞における *GDF9* と *BMP15* mRNA の発現を調べたところ、*GDF9* と *BMP15* はともに卵母細胞で発現していることが示された。また、ブタ初期胞状卵胞から採取した発育途上の卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞複合体を5日間、種々の濃度で *GDF9* または *BMP15* を添加した培養液中で培養すると、卵母細胞はいずれの区においても直径約 125 μm へと発育した。ブタの卵母細胞のから分泌されると考えられる *GDF9* と *BMP15* は、

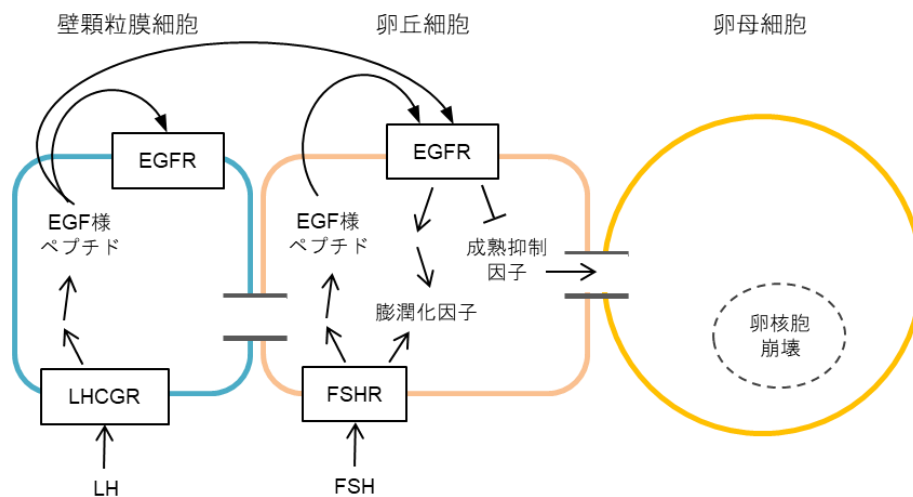


図 3-1. 卵母細胞の減数分裂再開に影響を及ぼす卵胞内のシグナル伝達

発育を完了した卵母細胞は、卵丘細胞から供給される成熟抑制因子によって、第一減数分裂前期で休止している。下垂体から分泌される性腺刺激ホルモン（FSH と LH）が卵丘細胞または壁顆粒膜細胞に存在する受容体（FSHR と LHCGR）に結合すると、EGF 様ペプチドが生産される。次いで、EGF 様ペプチドが卵丘細胞または壁顆粒膜細胞に存在する EGF 受容体（EGFR）に結合すると、卵丘膨潤化因子を介して卵丘を膨潤化させると共に、卵丘細胞と卵母細胞との間の結合が解離し、成熟抑制因子の卵母細胞への移行が抑制される。成熟抑制因子の供給が低下した卵母細胞は減数分裂を再開し、卵核胞を崩壊させる。

（Prochazka *et al.*, 2017 および Richani & Gilchrist, 2018 より引用改変）

卵母細胞の発育の最終段階において、卵丘細胞を介して卵母細胞の成熟能力の獲得に何らかの影響を及ぼしている可能性がある。

本章では、GDF9 または BMP15 を添加した培養液中で発育したブタ卵母細胞－卵丘細胞複合体を成熟培養し、卵母細胞の減数分裂の再開と成熟に対する GDF9 および BMP15 の影響を検討した。種々の濃度の GDF9 または BMP15 を添加した培養液中で、卵母細胞－卵丘細胞複合体を 5 日間発育培養し、その後、FSH と LH の作用をあわせ持つヒト閉経期性腺刺激ホルモン (human menopausal gonadotrophin : hMG ; Lunenfeld, 2004) または EGF を添加した培養液中で成熟を誘起し、卵母細胞の成熟能力を調べた。また、発育培養後の卵母細胞を裸化し、自発的な成熟を誘起した。さらに、発育培養後の複合体から卵丘細胞を採取し、*Follicle Stimulating Hormone Receptor (FSHR)*、*Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin Receptor (LHCGR)*、および *Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)* mRNA の発現を比較した。

第2節 材料および方法

1. 卵母細胞－卵丘細胞複合体の採取

と畜場で採取した未成熟な雌ブタの卵巣から、前章と同様な方法で直径 1.2～1.5 mm の初期胞状卵胞を切り出し、発育途上の卵母細胞を含む卵母細胞－卵丘細胞複合体を得た。対照として、直径 4.0～6.0 mm の胞状卵胞を切り出し、発育を完了した卵母細胞を含む卵母細胞－卵丘細胞複合体を得た。卵母細胞の細胞質が均質で退行の兆候が認められず、さらに卵母細胞が卵丘細胞に完全に覆われた複合体のみを選抜した。この複合体を発育培養、成熟培養、および qPCR に用いた。

2. 卵母細胞－卵丘細胞複合体の発育培養

直径 1.2～1.5 mm の初期胞状卵胞から採取した発育途上の卵母細胞を含む卵母細胞－卵丘細胞複合体を、前章と同様な方法で 5 日間発育培養した。実験区には、GDF9 (739-G9 ; R&D Systems) または BMP15 (5096-BM ; R&D Systems) を、0, 10, 50, または 100 ng/mL の濃度で添加した。培養後の複合体を、その後の成熟培養または qPCR に用いた。

3. 卵母細胞の成熟培養

5 日間発育培養した卵母細胞を成熟培養し、卵母細胞の成熟能力を調べた。発育培養終了後に形態的に正常な卵母細胞－卵丘細胞複合体をそのまま、または内径の小さいパスツールピペットを用いて卵丘細胞を取り除き、裸化した卵母細胞を、4 ウェルマルチディッシュ (Thermo Fisher Scientific) 内の 38.5°C に加温した 0.5 mL の成熟培養液中に移した。38.5°C、湿潤環境、5% CO₂－95%空気の気相下で、複合体を 44～48 時間成熟培養した。成熟培養液には、2.2 mg/mL 炭酸水素ナトリウム、0.08 mg/mL 硫酸カナマイシン、0.1 mg/mL ピルビン酸ナトリウム (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)、10% (v/v) FCS、および 0.1 IU/mL hMG (ASKA Pharmaceutical, Tokyo, Japan) または 10 ng/mL EGF (recombinant human EGF : 236-EG ; R&D Systems) を添加した TCM199 を用いた。卵母細胞－卵丘細胞複合体を用いた場合は、成熟培養後、卵丘の膨潤化を観察し、0.1% (w/v)

ヒアルロニダーゼ (Sigma-Aldrich) 中で内径の小さいパスツールピペットを用いて卵丘細胞を取り除き、卵母細胞を裸化した。細胞質が均質で退行の兆候がない卵母細胞を正常と判断してスライドガラス上にマウントし、カルノア液 (酢酸: エタノール=1:3) 中で48時間以上脱脂・固定後に1% (w/v) アセトオルセインで染色し、核相を判定した。

対照として、発育培養前の発育途上の卵母細胞を含む複合体および体内で発育を完了した卵母細胞を含む複合体を同様に成熟培養し、培養後の卵母細胞を脱脂・固定後に染色し、核相を観察した。

4. 卵母細胞の核相観察

染色した卵母細胞を前章と同様な方法で観察し、卵母細胞の核相を分類した。卵核胞を持つ卵母細胞の核相を filamentous chromatin-stringy chromatin (FC~SC) および germinal vesicle I-IV (GVI~IV) に分類した。卵核胞が崩壊した後の卵母細胞の核相を、diakinesis-metaphase I (D~MI), anaphase I-telophase I (AI~TI), および metaphase II (MII) に分類した。卵母細胞の染色質が極端に凝縮あるいは細胞質に散在するもの、および卵母細胞の細胞質に異常が認められるものは、退行と判断した。

5. qPCR

発育培養後の複合体から卵丘細胞を採取し、*FSHR*, *LHCGR*, および *EGFR* mRNA の発現を調べた。それぞれの培養液中で5日間発育培養した1群30個の複合体をPBS-PVAで3回洗浄した後、内径の小さいパスツールピペットを用いて卵丘細胞を得た。PBS-PVAと共に卵丘細胞を1.5 mLの遠心チューブへ移し、10,000 rpm (9,100×g) で5分間、遠心分離し、上清を除去した。この操作を3回繰り返して洗浄し、卵丘細胞を最小容量のPBS-PVAと共に使用まで-80°Cで保存した。対照として、初期胞状卵胞および胞状卵胞から1群30個の卵母細胞-卵丘細胞複合体を採取し、同様な方法で卵丘細胞を採取し、使用まで-80°Cで保存した。

-80°Cで保存した卵丘細胞からそれぞれ、前章と同様な方法で全RNAを抽出し、cDNAを合成した。この時、抽出したRNAの濃度が一定となるように調整した。qPCRの反応に

は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用い、マニュアルに従って遂行した。*FSHR* および *EGFR* のプライマーは GenBank の既知の配列を基に、*LHCGR* のプライマーは既報を基に (Loosfelt *et al.*, 1989), Primer design tool を用いて設計し、Thermo Fisher Scientific から購入した (表 3-1)。前章と同様に、*GAPDH* および *ACTB* を内部標準として用いた。PCR の設定を 95°C 1 分を 1 サイクル、95°C 15 秒/61.4°C (*FSHR* と *LHCGR*) または 63.3°C (*EGFR*) 30 秒を 40 サイクルとし、サーマルサイクラー (BIO RAD) を用いて各サンプルの cDNA 断片を増幅させた。すべての遺伝子に対して融解曲線を解析し、単一のピークで PCR 産物の特異性を判定した。

6. 統計処理

成熟培養後の各核相を示す卵母細胞数の差の有意性は、 χ^2 検定を用いて判定した。mRNA 量については一元配置分散分析し、その後 Tukey-Kramer の多重比較検定を用いて比較した。 $P < 0.05$ を統計的に有意と判断した。

表 3-1. qPCR に用いたブタ *FSHR*, *LHCGR*, *EGFR*, *GAPDH*, および *ACTB* 遺伝子のプライマー配列と、推定される PCR 産物の分子サイズ

遺伝子		プライマー配列 (5'→3')	推定分子サイズ (bp)	アクセッション番号 参考文献
<i>FSHR</i>	Forward	TGTGTTCTCCAATCTGCCCA	91	XM_021085881.1
	Reverse	GGGAAGGTTCTGGAAGGCAT		
<i>LHCGR</i>	Forward	CTGTGCTTTTAGAAACCTGCC	129	Loosfelt <i>et al.</i> , 1989
	Reverse	GCAAAGATGGCAGAATAAAGTG		
<i>EGFR</i>	Forward	TCGCCCAAAGTTCCGTGAGC	100	NM_214007.1
	Reverse	TGGCAAGTGCATTCGCTCGT		
<i>GAPDH</i>	Forward	ATCCATGACCACTTCGGCATC	141	NM_001206359
	Reverse	AGAAGCAGGGATGATGTTCTGG		
<i>ACTB</i>	Forward	ATCGTGCGGGACATCAAGGA	179	XM_003124280
	Reverse	AGGAAGGAGGGCTGGAAGAG		

第3節 結果

1. 性腺刺激ホルモンによる卵母細胞の成熟

発育培養終了後、hMGを含む成熟培養液中で形態的に正常な卵母細胞-卵丘細胞複合体を培養した(図3-2)。発育培養前の発育途上の卵母細胞を含む複合体を成熟培養すると、複合体の卵丘は膨潤化することなく、卵丘細胞はウェルの底面に付着し、複合体から外に向かって遊走した(図3-2A, GO)。一方、体内で発育を完了した卵母細胞を含む複合体を成熟培養すると、最外層から透明帯付近に至る卵丘細胞のほとんどすべてが分散して卵丘は膨潤化し、複合体は培養液中に浮遊した状態となった(図3-2A, FO)。成長因子無添加で発育培養した複合体を成熟培養すると、卵丘細胞間の結合は緩くなり、卵丘細胞はウェルの底面に付着した状態となった(図3-2BおよびC, 0 ng/mL)。GDF9添加培養液中で発育培養した複合体ではいずれの濃度でも、またBMP15を10 ng/mL添加した培養液中で発育した複合体では、成熟培養後、無添加区と同様に卵丘細胞間の結合は緩くなり、卵丘細胞がウェルの底面に付着した状態で観察された(図3-2B, 10~100 ng/mLおよび図3-2C, 10 ng/mL)。これに対して、BMP15を50または100 ng/mL添加した培養液中で発育培養した複合体では卵丘は膨潤化し、複合体が培養液中に浮遊し、体内で発育を完了した卵母細胞を含む複合体と類似した状態となった(図3-2C, 50および100 ng/mL)。

GDF9またはBMP15を添加した培養液中で発育培養した卵母細胞の成熟能力を調べた(表3-2)。対照の、発育培養前の卵母細胞を含む複合体を成熟培養すると、約20%の卵母細胞は卵核胞を崩壊させたが、第二減数分裂中期へと成熟しなかった。一方、体内で発育を完了した卵母細胞を含む複合体を成熟培養すると、ほとんどの卵母細胞は第二減数分裂中期へと成熟した。成長因子無添加で発育培養した複合体を成熟培養すると、15~16%の卵母細胞が成熟した。GDF9を添加した培養液中で発育培養した複合体を成熟培養すると、約70%の卵母細胞はGV期のままであり、成熟した卵母細胞の割合はいずれの濃度においても10%以下であった。50 ng/mLのGDF9を添加した培養液中で発育培養した卵母細胞では、第二減数分裂中期へと成熟した卵母細胞の割合が2%と、GDF9無添加で発育培養した卵母細胞(15%)と比較して、有意に低下した。一方、BMP15を50 ng/mLまたは100

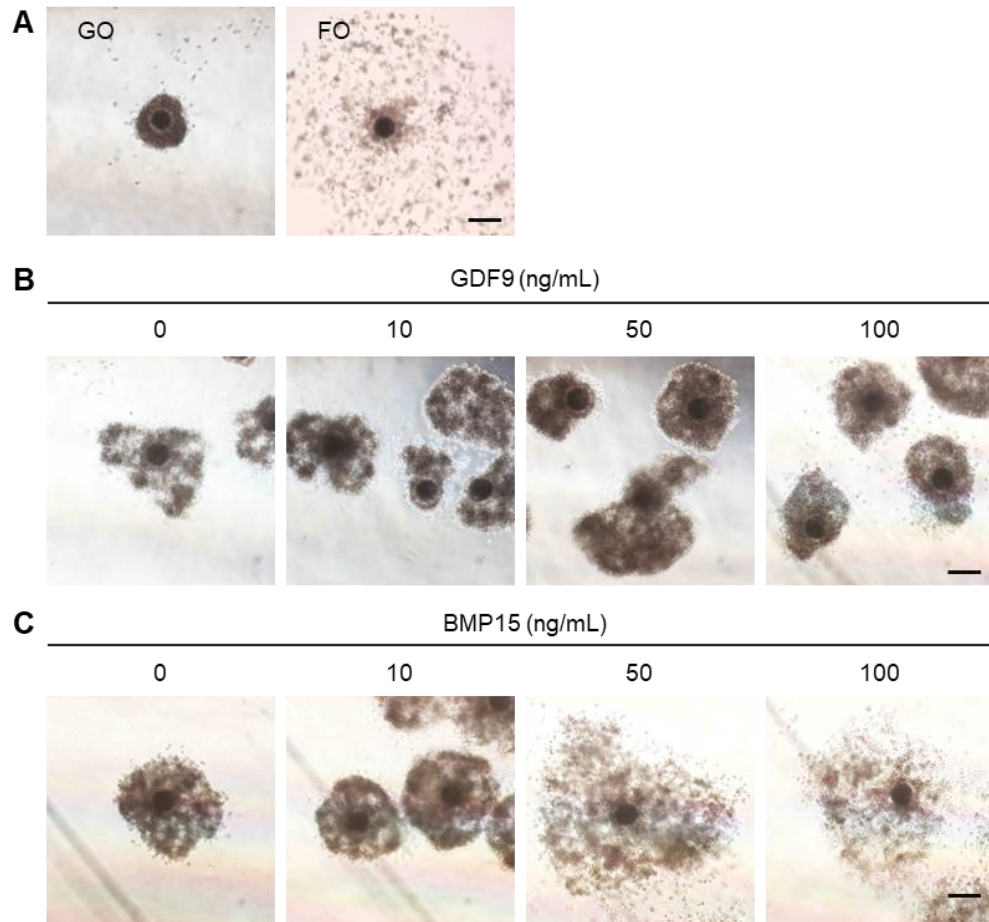


図 3-2. GDF9 および BMP15 添加培養液中で発育培養したブタ卵母細胞－卵丘細胞複合体の成熟培養後の卵丘の膨潤化

直径 1.2～1.5 mm のブタ初期胞状卵胞から採取した卵母細胞－卵丘細胞複合体を、0, 10, 50, および 100 ng/mL の GDF9 (B) または BMP15 (C) を添加した培養液中で 5 日間発育培養した。培養終了後、卵母細胞が卵丘細胞に完全に覆われた正常な複合体のうち、卵母細胞に細胞質の異常などの退行の兆候が認められない卵母細胞－卵丘細胞複合体を回収し、44～48時間 hMG を添加した培養液中で成熟培養した。(A) 対照として、発育培養前の複合体と (growing oocyte, GO)、直径 4.0～6.0 mm の胞状卵胞から採取した複合体 (fully-grown oocyte, FO) を同様に成熟培養して卵丘の膨潤化を観察した。スケールバーは 200 μm を表す。

表 3-2. GDF9 および BMP15 添加培養液中で発育培養後、成熟培養したブタ卵母細胞の核相

卵胞の直径 (mm)	発育培養*			検査卵母細胞数	GV期の卵母細胞数** (%)			GVBDを起こした卵母細胞数** (%)				退行
	日数 (日)	処理	添加濃度 (ng/mL)		全GV	FC~SC	GVI~IV	全GVBD	D~MI	AI~TI	MII	
1.2~1.5	-	-	-	30	21 (70) ^{ab}	16 (50) ^a	5 (17) ^a	7 (23) ^a	7 (23) ^a	0 (0)	0 (0)	2 (7)
	5	GDF9	0	52	27 (52) ^a	1 (2) ^b	26 (50) ^b	11 (21) ^a	3 (6) ^b	0 (0)	8 (15) ^a	14 (27)
	5		10	54	33 (61) ^{ab}	0 (0)	33 (61) ^{bc}	12 (22) ^a	6 (11) ^{ab}	2 (4)	4 (7) ^{ab}	9 (17)
	5		50	50	37 (74) ^b	0 (0)	37 (74) ^c	4 (8) ^a	3 (6) ^{ab}	0 (0)	1 (2) ^b	9 (18)
	5		100	50	37 (74) ^b	2 (4) ^b	35 (70) ^c	4 (8) ^a	1 (2) ^b	0 (0)	3 (6) ^{ab}	9 (18)
4.0~6.0	-	-	-	30	0 (0)	0 (0)	0 (0)	28 (93) ^b	0 (0)	0 (0)	28 (93) ^c	2 (7)
1.2~1.5	-	-	-	29	18 (62) ^A	7 (24) ^A	11 (38) ^A	6 (21) ^A	6 (21) ^{AB}	0 (0)	0 (0)	5 (17) ^{AB}
	5	BMP15	0	49	34 (69) ^A	0 (0)	34 (71) ^B	10 (20) ^A	2 (4) ^{AB}	0 (0)	8 (16) ^A	5 (10) ^{AB}
	5		10	49	34 (69) ^A	1 (2) ^B	33 (67) ^B	12 (24) ^A	7 (14) ^{AB}	0 (0)	5 (10) ^A	3 (6) ^A
	5		50	51	13 (25) ^B	0 (0)	13 (25) ^A	32 (63) ^B	7 (14) ^{AB}	0 (0)	25 (49) ^B	6 (12) ^{AB}
	5		100	51	6 (12) ^B	2 (4) ^B	4 (8) ^C	32 (63) ^B	1 (2) ^B	0 (0)	31 (61) ^B	13 (25) ^B
4.0~6.0	-	-	-	30	0 (0)	0 (0)	0 (0)	29 (97) ^C	0 (0)	0 (0)	29 (97) ^C	1 (3) ^A

* 直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胎卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体を、0, 10, 50, および 100 ng/mL の GDF9 または BMP15 を添加した培養液中で 5 日間発育培養した。培養終了後、卵母細胞が卵丘細胞に完全に覆われた正常な複合体のうち、卵母細胞に細胞質の異常などの退行の兆候が認められない卵母細胞-卵丘細胞複合体を回収し、44~48 時間 hMG を添加した培養液中で成熟培養した。成熟培養後、細胞質の異常などの退行の兆候がみられない卵母細胞を脱脂・固定した後、染色し、卵母細胞の核相を評価した。対照として、発育培養前の複合体と、直径 4.0~6.0 mm の胎卵胞から採取した複合体を同様に成熟培養して卵母細胞の核相を評価した。

** FC~SC : filamentous chromatin stage-stringy chromatin stage, GVI~IV : germinal vesicle stages I-IV, GVBD: germinal vesicle breakdown, D~MI : diakinesis stage-metaphase I, AI~TI : anaphase I-telophase I, MII : metaphase II, 退行 : 染色質が極端に凝縮あるいは細胞質に散在するもの、および卵母細胞の細胞質に異常が認められるもの (Motlik & Fulka, 1976 ; Hirao *et al.*, 1995)。

^{a-c), A-C)} GDF9 と BMP15 の各実験で、同じ列内の異なる文字間の差は有意 ($P < 0.05$)。実験は 3 回以上行った。

ng/mL 添加した培養液中で発育培養した複合体を成熟培養すると、49%および61%の卵母細胞が第二減数分裂中期へと成熟した。これらの値は、無添加区の16%と比較して有意に高かった。

2. EGF と裸化による卵母細胞の成熟

hMG による成熟誘起実験の結果から、発育培養期間中に高濃度の BMP15 が存在すると、その後の性腺刺激ホルモン刺激後の卵丘の膨潤化が促進され、卵母細胞が成熟したと考えられた。性腺刺激ホルモンである FSH や LH の下流には、EGF 受容体が存在し、卵丘の膨潤化や卵母細胞の成熟が起こると考えられている (図 3-1)。また、卵丘細胞からは卵母細胞の減数分裂の再開を抑制する因子が卵母細胞に送り込まれていると考えられている。そこで、EGF による成熟誘起と、卵丘細胞を取り除いて、卵母細胞に自発的な成熟を誘起する実験を行った (表 3-3)。前章で 100 ng/mL GDF9 は複合体の直径の増加を最も促進し、本章で 100 ng/mL BMP15 は卵母細胞の成熟を最も促進したため、本実験には 100 ng/mL の GDF9 と BMP15 を使用した。

EGF によって卵母細胞の成熟を誘起すると、発育培養前の卵母細胞の 27%は卵核胞を崩壊させたが、第二減数分裂中期へとほとんど移行しなかった (表 3-3 上段)。体内で発育を完了した卵母細胞を成熟培養すると、50%の卵母細胞は第二減数分裂中期へと成熟した。成長因子無添加区、GDF9 添加培養液、および BMP15 添加培養液中で発育培養した卵母細胞を成熟培養すると、いずれにおいても約 50%の卵母細胞は卵核胞を崩壊させ、39~54%の卵母細胞は第二減数分裂中期へと成熟し、各区間で有意な差はなかった。

卵丘細胞を取り除き、卵母細胞に自発的な成熟を誘起すると、発育培養前の卵母細胞の 57%は卵核胞を崩壊させたが、第二減数分裂中期へと成熟しなかった (表 3-3 下段)。一方、体内で発育を完了した卵母細胞を成熟培養すると、90%の卵母細胞は第二減数分裂中期へと成熟した。成長因子無添加および GDF9 を添加して発育培養した卵母細胞を成熟培養すると、卵母細胞の約半数が卵核胞を崩壊させ、卵母細胞の 40%以上が第二減数分裂中期へと成熟した (表 3-3 下; 無添加区 41%, GDF9 添加区 45%)。これらの割合は、BMP15 添加区の割合 (70%) と有意な差はなかった。また、EGF 添加および裸化卵母細胞の無添加区

表 3-3. GDF9 および BMP15 添加培養液中で発育培養後、EGF 添加または卵丘細胞の除去により成熟を誘起したブタ卵母細胞の核相

卵胞の直径 (mm)	発育培養*			成熟培養	検査 卵母細胞数	GV期の卵母細胞数** (%)			GVBDを起こした卵母細胞数** (%)				退行
	日数 (日)	処理	添加濃度 (ng/mL)			全GV	FC~SC	GVI~IV	全GVBD	D~MI	A~TI	MII	
1.2-1.5	0	-	-	EGF	30	20 (67) ^A	0 (0)	20 (67) ^A	8 (27) ^A	7 (23)	0 (0)	1 (3) ^A	2 (7) ^A
	5	-	0	EGF	26	3 (12) ^B	0 (0)	3 (12) ^B	15 (58) ^B	0 (0)	1 (4)	14 (54) ^B	8 (31) ^B
	5	GDF9	100	EGF	26	8 (31) ^B	0 (0)	8 (31) ^B	12 (46) ^{AB}	1 (4)	1 (4)	10 (39) ^B	6 (23) ^{AB}
	5	BMP15	100	EGF	24	7 (29) ^B	0 (0)	7 (29) ^B	12 (50) ^{AB}	1 (4)	0 (0)	11 (46) ^B	5 (20) ^{AB}
4.0-6.0	0	-	-	EGF	30	7 (23) ^B	0 (0)	7 (23) ^B	21 (70) ^B	5 (17)	1 (3)	15 (50) ^B	2 (7) ^A
1.2-1.5	0	-	-	裸化	30	6 (20)	5 (17)	1 (3)	17 (57) ^a	14 (47) ^a	3 (10)	0 (0)	7 (23) ^{ab}
	5	-	0	裸化	22	5 (23)	0 (0)	5 (23)	12 (55) ^a	3 (14) ^b	0 (0)	9 (41) ^a	5 (23) ^{ab}
	5	GDF9	100	裸化	22	5 (22)	0 (0)	5 (23)	11 (50) ^a	1 (5) ^b	0 (0)	10 (45) ^a	6 (27) ^a
	5	BMP15	100	裸化	23	4 (17)	0 (0)	4 (17)	17 (74) ^{ab}	1 (4) ^b	0 (0)	16 (70) ^{ab}	2 (9) ^{ab}
4.0-6.0	0	-	-	裸化	30	2 (7)	0 (0)	2 (7)	27 (90) ^b	0 (0)	0 (0)	27 (90) ^b	1 (3) ^b

* 直径 1.2~1.5 mm のブタ初期卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体を、0 および 100 ng/mL の GDF9 または BMP15 を添加した培養液中で 5 日間発育培養した。培養終了後、卵母細胞が卵丘細胞に完全に覆われた正常な複合体のうち、卵母細胞に細胞質の異常などの退行の兆候が認められない卵母細胞-卵丘細胞複合体を回収し、EGF を添加した培養液中で（上段）、または卵丘細胞を取り除いて裸化し（下段）、44~48 時間培養することによって卵母細胞に成熟を誘起した。成熟培養後、細胞質の異常などの退行の兆候がみられない卵母細胞を脱脂・固定した後、染色し、卵母細胞の核相を評価した。対照として、発育培養前の複合体と、直径 4.0~6.0 mm の卵胞から採取した複合体、またはそれぞれの複合体から準備した裸化卵母細胞を成熟培養して卵母細胞の核相を評価した。

** FC~SC : filamentous chromatin stage-stringy chromatin stage, GVI~IV : germinal vesicle stages I-IV, GVBD: germinal vesicle breakdown, D~MI : diakinesis stage-metaphase I, AI~TI : anaphase I-telophase I, MII : metaphase II, 退行 : 染色質が極端に凝縮あるいは細胞質に散在するもの、および卵母細胞の細胞質に異常が認められるもの (Motlik & Fulka, 1976 ; Hirao *et al.*, 1995)。

A, B, a, b) 上段と下段の各実験で、同じ列内の異なる文字間の差は有意 (χ^2 ; $P < 0.05$)。実験は 3 回以上行った。

(54%および 41%) と GDF9 添加区 (39%および 45%) の卵母細胞の成熟率は、hMG 添加による成熟率 (表 3-2, 無添加区 15%, GDF9 100 ng/mL 添加区 6%) と比較して高かった。

3. *FSHR*, *LHCGR*, および *EGFR* mRNA の発現に及ぼす GDF9 と BMP15 の影響

性腺刺激ホルモンによる成熟培養では、発育培養中の BMP15 は卵母細胞の卵核胞崩壊率および成熟率を上昇させたが、EGF と裸化による成熟培養では、GDF9 と BMP15 による影響はみられなかったことから、GDF9 と BMP15 は EGF 受容体より上流の性腺刺激ホルモンの受容体に影響を及ぼす可能性が考えられた。このため、発育培養後の複合体から卵丘細胞を採取し、性腺刺激ホルモンである FSH と LH の受容体、および FSH と LH の刺激を仲介する EGF 受容体の mRNA 発現を比較した (図 3-3)。

FSHR および *EGFR* mRNA は初期胞状卵胞と胞状卵胞の卵丘細胞とともに発現し、その発現レベルは卵胞の発達とともに有意に低下した (図 3-3 A および C)。*LHCGR* mRNA は、初期胞状卵胞から採取した卵丘細胞では検出されなかったが、胞状卵胞から採取した卵丘細胞では検出され、卵胞の発達とともに *LHCGR* mRNA レベルは上昇した (図 3-3 B)。

5 日間発育培養した卵母細胞-卵丘細胞複合体から採取した卵丘細胞では、GDF9 添加区の卵丘細胞での *FSHR* mRNA 発現レベルは、無添加区および BMP15 添加区の卵丘細胞よりも高い傾向がみられたが、いずれの区も胞状卵胞の卵丘細胞との間に有意な差は認められなかった。*LHCGR* mRNA 発現レベルは、無添加区、GDF9 添加区、および BMP15 添加区のいずれにおいても、胞状卵胞の卵丘細胞よりも高く、BMP15 添加区では最高レベルの発現を示した。また、*EGFR* mRNA の発現レベルは、無添加区、GDF9 添加区、および BMP15 添加区の間で有意な差は認められず、いずれの区も胞状卵胞の卵丘細胞と同等であった。

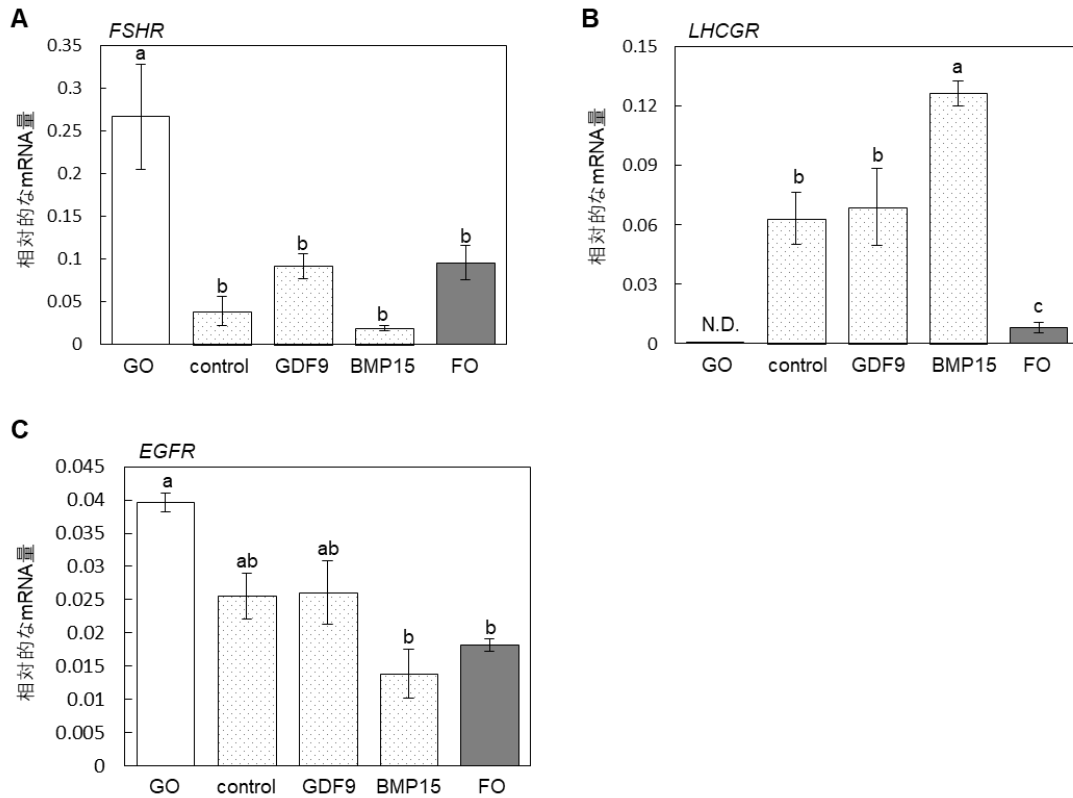


図 3-3. 卵丘細胞の *FSHR*, *LHCGR*, および *EGFR* mRNA の発現に及ぼす GDF9 および BMP15 の影響

直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体を、100 ng/mL の GDF9 または BMP15 を添加した培養液中で 5 日間発育培養した。培養終了後、卵母細胞が卵丘細胞に完全に覆われた正常な複合体のうち、卵母細胞に細胞質の異常などの退行の兆候が認められない卵母細胞-卵丘細胞複合体を回収した。それぞれの複合体の卵丘細胞から RNA を抽出し、*FSHR* (A)、*LHCGR* (B)、および *EGFR* (C) について qPCR を行った。対照として、培養前の複合体 (growing oocyte, GO) と、直径 4.0~6.0 mm の胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体 (fully-grown oocyte, FO) から採取した卵丘細胞の mRNA 量を測定した。*GAPDH* と *ACTB* を内部標準として用いたが、結果は同様であったため、*GAPDH* の結果を示す。

(A) a, b), (B) a, c), (C) a, b) 異なる文字間の差は有意 ($P < 0.05$)。実験は 3 回以上繰り返し行った。

第4節 考察

対照の成長因子無添加培養液および GDF9 添加培養液の中で発育培養した卵母細胞-卵丘細胞複合体を hMG 添加培養液中で成熟培養すると、卵丘細胞間の結合は緩んだが、体内で発育を完了した卵母細胞を含む複合体を成熟培養した場合にみられるような卵丘の膨潤化は起こらなかった。一方、高濃度の BMP15 を添加した培養液中で発育培養した複合体を成熟培養すると、体内で発育を完了した卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞複合体と同様な卵丘の膨潤化が観察された。これまで、GDF9 はマウス卵母細胞由来の卵丘膨潤化因子として同定されている (Pangas & Matzuk, 2005)。マウスの卵母細胞-卵丘細胞複合体から卵母細胞を除去した複合体を成熟培養しても、卵丘の膨潤化は起こらないが、この複合体を、GDF9 を添加した培養液中で成熟培養すると、卵丘の膨潤化が起こることが報告されている (Dragovic *et al.*, 2005)。マウスでは、BMP15 も GDF9 と同様に卵丘膨潤化促進因子とされ、BMP15 の存在下で卵母細胞-卵丘細胞複合体を成熟培養した実験において、卵丘の膨潤化が促進されることが報告されている (Yoshino *et al.*, 2006)。これらは、発育を完了した卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞複合体が、性腺刺激ホルモンの刺激を受けた際における GDF9 や BMP15 の役割に関するものであるが、卵母細胞の発育期間における卵母細胞由来の成長因子の作用に関してはこれまで知られていなかった。本研究で使用した初期胞状卵胞から採取したブタ卵母細胞-卵丘細胞複合体では、発育培養前に性腺刺激ホルモンの刺激を受けても、卵丘の膨潤化はまったく起こらなかった。GDF9 添加培養液中で卵母細胞-卵丘細胞複合体を発育培養すると、卵母細胞は発育し、卵丘細胞は増殖したものの、体内で起こるような性腺刺激ホルモンの反応で卵丘を膨潤化させる能力の獲得は十分には起こらなかったと考えられる。これに対して、高濃度の BMP15 添加培養液中で発育した卵母細胞-卵丘細胞複合体では、性腺刺激ホルモンの反応で卵丘を膨潤化させる能力を獲得したと考えられる。

GDF9 を添加した培養液中で発育培養した複合体を hMG 添加培養液中で成熟培養すると、いずれの濃度でも卵母細胞は第二減数分裂中期へとほとんど成熟せず、高濃度の GDF9 を添加した培養液中で発育培養した複合体では、性腺刺激ホルモンによる刺激後も GVI~IV

期に留まる卵母細胞の割合が増加した。一方、高濃度の BMP15 を添加した培養液中で発育培養した複合体を成熟培養した場合には、卵丘は膨潤化し、卵母細胞は高率に減数分裂を再開し、第二減数分裂中期へと成熟した。卵母細胞が発育する間、卵丘細胞からは卵母細胞の減数分裂を休止させる因子が卵母細胞と卵丘細胞との間のギャップ結合を通して供給され、卵母細胞の自発的な減数分裂の再開を抑制している (Buccione *et al.*, 1990a)。卵丘の膨潤化に伴ってこの結合が解離し、卵丘細胞からの減数分裂休止因子の供給が途絶えると考えられている (Buccione *et al.*, 1990a ; Sutton *et al.*, 2003)。最近、GDF9 は、卵母細胞と卵丘細胞間を繋ぐ transzonal projection (TZP) の形成を促進することがマウスで報告された (El-Hayek *et al.*, 2018)。GDF9 添加培養液中で発育培養したブタ卵母細胞-卵丘細胞複合体では、TZP の形成が促進され、卵母細胞と卵丘細胞間の結合が強まり、さらに卵丘の膨潤化が促進されなかったため、性腺刺激ホルモンによる刺激後も卵母細胞と卵丘細胞が解離せず、卵丘細胞からの減数分裂休止因子が卵母細胞に供給され続けた結果、卵母細胞は減数分裂を再開できなかった可能性がある。

hMG による成熟誘起実験の結果から、発育培養期間中に高濃度の BMP15 が存在すると、その後の性腺刺激ホルモン刺激による卵丘の膨潤化が促進され、卵母細胞が成熟したと考えられた。FSH や LH は、EGF 様ペプチドを介して EGF 受容体を活性化し、EGF 受容体は、いくつかのシグナル伝達カスケードを活性化し、その下流で卵丘膨潤化を誘起すると共に、卵母細胞の減数分裂を抑制する因子を抑制すると考えられている (Prochazka *et al.*, 2017 ; Richani & Gilchrist, 2018 ; 図 3-1)。そこで EGF 添加による卵母細胞の成熟と、卵丘細胞を取り除き、卵母細胞に自発的な成熟を誘起した。EGF 添加または裸化によって卵母細胞の成熟を誘起すると、無添加区、GDF9 添加区、および BMP15 添加区との間で、卵母細胞の卵核崩壊率と第二減数分裂中期への成熟率に有意な差はなかった。

これらの結果は、GDF9 および BMP15 添加の有無にかかわらず、体外で 5 日間発育培養した卵母細胞は成熟する能力を獲得しており、また、卵母細胞-卵丘細胞複合体では、EGF 受容体以降の卵母細胞の成熟経路は完成していることを示唆している。性腺刺激ホルモンで刺激した場合、無添加区と GDF9 添加区では、卵母細胞は成熟能力を獲得していたものの、卵丘細胞が性腺刺激ホルモン刺激に対して十分に応答できる能力を獲得しておら

ず、卵母細胞の成熟が誘起されなかった可能性が考えられる。このため、GDF9 と BMP15 は EGF 受容体より上流の性腺刺激ホルモンの受容体に影響を及ぼすと考え、発育培養後の卵丘細胞における FSH と LH の受容体の mRNA の発現を調べた。また、性腺刺激ホルモンの刺激の伝達を仲介する EGF の受容体 mRNA の発現も調べた。その結果、発育培養期間に添加した GDF9 と BMP15 は、卵丘細胞の FSH 受容体および EGF 受容体の mRNA 発現レベルに対しては、有意な影響を及ぼさなかった。このことは、発育培養後の卵丘細胞では、卵母細胞の成熟に関わると考えられる FSH 受容体および EGF 受容体には差がないことを示唆している。一方、BMP15 は LH 受容体の mRNA の発現を促進した。

発育培養したすべての区で *LHCGR* mRNA の発現レベルが上昇したが、ブタを含むいくつかの種では、*LHCGR* mRNA あるいは LHCGR は卵丘細胞には存在しないか、または壁顆粒膜細胞よりはるかに低いレベルで存在することが報告されている (Amsterdam *et al.*, 1975; Channing *et al.*, 1981; Peng *et al.*, 1991; Meduri *et al.*, 1992; Eppig *et al.*, 1997)。体外培養系を用いた研究で、FSH はマウス (Eppig *et al.*, 1997; Sánchez *et al.*, 2010) およびブタ (Okazaki *et al.*, 2003; Prochazka *et al.*, 2009) の卵母細胞-卵丘細胞複合体において、顆粒膜細胞の分化を促進し、*LHCGR* mRNA の発現を促進することが報告されている。ブタ卵母細胞の体外発育培養では、FSH の添加が必要であることから (Cayo-Colca *et al.*, 2011)、本研究では発育培養液に FSH を添加した。この培養液中の FSH が、培養したすべての区の卵丘細胞における *LHCGR* mRNA の発現レベルを上昇させたと考えられる。

培養液に BMP15 を添加すると、卵丘細胞における *LHCGR* mRNA の発現レベルがさらに上昇した。マウスの卵胞では、*LHCGR* mRNA は主に壁顆粒膜細胞で発現することが報告されており (Eppig *et al.*, 1997)、本実験において、BMP15 を添加して発育培養したブタ卵母細胞-卵丘細胞複合体において、複合体の外層が壁顆粒膜細胞様の細胞に分化した可能性がある。また、GDF9 添加区と無添加区の複合体では BMP15 添加区より *LHCGR* mRNA の発現レベルが低かったことから、体外で培養された卵母細胞-卵丘細胞複合体は、LH に応答して卵丘の膨潤化を誘導するために、より高レベルの LHCGR を必要とする可能性が考えられる。

以上より、ブタの初期胞状卵胞から採取した発育途上の卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘

細胞複合体を、GDF9 または BMP15 を添加した培養液中で 5 日間発育培養すると、卵母細胞が発育する間、BMP15 は卵丘細胞の *LHCGR* mRNA レベルを上昇させ、性腺刺激ホルモンの刺激による卵丘細胞の反応性を高めることによって、卵丘の膨潤化を促進し、その結果、卵母細胞の減数分裂の再開と成熟が引き起こされた可能性が考えられる。

第5節 小括

本章では、GDF9 (growth differentiation factor 9) または BMP15 (bone morphogenetic protein 15) を添加した培養液中で発育したブタ卵母細胞-卵丘細胞複合体を成熟培養し、卵母細胞の減数分裂の再開と成熟に対する GDF9 および BMP15 の影響を検討した。

GDF9 または BMP15 を、0, 10, 50, および 100 ng/mL の濃度で添加した培養液中で、卵母細胞-卵丘細胞複合体を 5 日間発育培養し、その後、性腺刺激ホルモン (FSH と LH) の作用をあわせ持つヒト閉経期性腺刺激ホルモン (human menopausal gonadotrophin : hMG) を添加した培養液中で複合体を 44~48 時間成熟培養し、卵丘の膨潤化と卵母細胞の成熟能力を調べた。成長因子無添加または GDF9 を添加した培養液中で発育培養した複合体では、成熟培養後、卵丘細胞間の結合が緩んだが、卵丘の膨潤化は起こらなかった。これに対して、高濃度の BMP15 (50 および 100 ng/mL) を添加した培養液中で発育培養した複合体では、体内で発育を完了した卵母細胞を含む複合体と同様な卵丘の膨潤化が誘起された。

成熟培養後の卵母細胞の核相を観察したところ、発育培養前の複合体では、卵母細胞は減数分裂を再開しないか、減数分裂を再開しても第二減数分裂中期へと成熟しなかった。これに対して、体内で発育を完了したほぼすべての卵母細胞は、第二減数分裂中期へと成熟した。GDF9 を添加した培養液中で発育培養した複合体では、いずれの濃度でも卵母細胞は第二減数分裂中期へとほとんど成熟せず (2~7%)、高濃度の GDF9 を添加した培養液中で発育培養した複合体では、GV 期に留まる卵母細胞の割合が増加した (50 ng/mL および 100 ng/mL とともに 74%)。一方、BMP15 を 50 および 100 ng/mL 添加した培養液中で発育培養した複合体では、それぞれ 49% および 61% の卵母細胞が第二減数分裂中期へと成熟した。これらの値は、成長因子無添加で発育培養した複合体における 16% と比較して有意に高かった。これらの結果から、発育培養期間中に高濃度の BMP15 が存在すると、その後の性腺刺激ホルモン刺激後の卵丘の膨潤化が促進され、卵母細胞が成熟したと考えられた。

次に、発育培養後の複合体を、上皮成長因子 (epidermal growth factor : EGF) を添加

した培養液中で、または卵丘細胞を取り除いて裸化した卵母細胞を、44～48時間培養して卵母細胞の減数分裂の再開と成熟に対するGDF9とBMP15の影響を調べた。EGFによる成熟誘起では、無添加区、GDF9添加区、およびBMP15添加区で、約50%の卵母細胞は卵核胞を崩壊させ、39～54%の卵母細胞は第二減数分裂中期へと成熟し、各区間で有意な差はなかった。また、卵丘細胞を取り除き、卵母細胞に自発的な成熟を誘起すると、無添加区およびGDF9添加区において、卵母細胞の40%以上が第二減数分裂中期へと成熟した。これらの割合は、BMP15添加区と有意な差はなかった(70%)。これらの結果は、GDF9およびBMP15添加の有無にかかわらず、体外で発育した卵母細胞は成熟する能力を獲得しており、また、卵母細胞-卵丘細胞複合体では、EGF受容体以降の卵母細胞の成熟経路は完成していることを示唆している。

発育培養後の複合体から卵丘細胞を採取し、性腺刺激ホルモンの受容体であるFollicle Stimulating Hormone Receptor (FSHR)とLuteinizing Hormone/Choriogonadotropin Receptor (LHCGR)、およびEpidermal Growth Factor Receptor (EGFR)のmRNAの発現レベルをqPCRで調べた。*FSHR*および*EGFR* mRNAレベルは、無添加区、GDF9添加区、およびBMP15添加区の間で差が認められなかった。一方、*LHCGR* mRNAレベルは、BMP15添加区で有意に上昇した。

以上より、ブタの初期胞状卵胞から採取した発育途上の卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞複合体を、GDF9またはBMP15を添加した培養液中で5日間発育培養すると、卵母細胞が発育する間、BMP15は卵丘細胞の*LHCGR* mRNAレベルを上昇させ、性腺刺激ホルモンの刺激による卵丘細胞の反応性を高めることによって、卵丘の膨潤化を促進し、その結果、卵母細胞の減数分裂の再開と成熟が引き起こされた可能性が考えられる。

第 4 章 卵母細胞－卵丘細胞複合体の卵胞腔様構造の形成に及ぼす GDF9 および BMP15 の影響

第 1 節 緒言

卵巣内で、卵胞は卵母細胞の発育と同調して発達する。原始卵胞が発達を開始すると、顆粒膜細胞は立方状へと変形し、その後、増殖して重層化する。さらに、顆粒膜細胞間に液で満たされた卵胞腔が形成され、卵胞は胞状卵胞へと発達する。胞状卵胞では、卵母細胞は周囲の顆粒膜細胞と共に卵胞の一方に押しやられて卵胞腔に突出し、卵丘と呼ばれる構造が形成される。卵胞腔の形成に伴って、二次卵胞内の顆粒膜細胞は、卵丘を形成する卵丘細胞と、卵胞の内壁を覆う壁顆粒膜細胞へと分化する。卵丘細胞は代謝物や栄養分を卵母細胞に供給して卵母細胞の発育を支え、一方、壁顆粒膜細胞は主にステロイドホルモンを生成する機能を担う (Eppig, 2001)。このため、この 2 種の顆粒膜細胞では発現する遺伝子が異なり、マウスでは、卵丘細胞と比較して壁顆粒膜細胞で *Lhcgr* mRNA の発現が高いことが示唆されている (Eppig *et al.*, 1997)。

卵胞の発達は、視床下部－下垂体－卵巣軸の様々なレベルで合成されるホルモンによって調節されている。視床下部は性腺刺激ホルモン放出ホルモンを分泌し、その刺激を受けて、下垂体前葉は性腺刺激ホルモンの FSH と LH を分泌する。また、卵巣は性腺刺激ホルモンの刺激を受けて、ステロイドホルモンを産生する (Baird & Fraser, 1973)。卵胞では、FSH は顆粒膜細胞の増殖と、アンドロゲンからエストロゲンへの芳香化を刺激し、エストロゲンもまた、顆粒膜細胞の増殖を刺激する (Richards, 1994)。 *Fshr* ノックアウトマウスを用いた研究から、FSH は卵胞腔の形成に関与することも示唆されている (Kumar *et al.*, 1997)。

第 2 章において、ブタの初期胞状卵胞と胞状卵胞から採取した卵母細胞、卵丘細胞、および壁顆粒膜細胞における *GDF9* と *BMP15* mRNA の発現を調べたところ、*GDF9* と *BMP15* はともに卵母細胞で発現していることが示された。また、ブタ初期胞状卵胞から採

取した発育途上の卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞複合体を 5 日間, 種々の濃度で GDF9 または BMP15 を添加した培養液中で発育培養すると, GDF9 は濃度依存的に複合体の発達を促進した。培養実験では, いずれの区においても 10~30%の複合体において卵胞腔様構造が形成された。卵母細胞が卵胞腔の形成に関与することは, これまでいくつかの種において示唆されており (Shen *et al.*, 1998 ; Alam *et al.*, 2018), ブタの卵母細胞から分泌されると考えられる GDF9 と BMP15 は, 卵胞の発達過程において, 卵胞腔の形成に影響を及ぼす可能性がある。

本章では, GDF9 または BMP15 を添加した培養液中でブタ卵母細胞-卵丘細胞複合体と卵母細胞除去-卵丘細胞複合体を発育培養し, 複合体による卵胞腔様構造の形成に及ぼす GDF9 と BMP15 の影響を検討した。第 2 章で用いた実験系では, 卵胞腔様構造を形成する複合体の割合が低く, GDF9 と BMP15 の卵胞腔様構造の形成に及ぼす影響を十分に検討することが困難と考え, コラーゲンコートした 96 ウェルプレートを用いた 5 日間の培養から, 細胞低接着性の 96 ウェルプレートを用いた 7 日間の培養に条件を変更した。この条件下では, 100 ng/mL GDF9 添加区で約 70%の複合体が卵胞腔様構造を形成した。本章では, この条件で, 種々の濃度の GDF9 または BMP15 を添加した培養液を用い, ブタ卵母細胞-卵丘細胞複合体および卵母細胞除去-卵丘細胞複合体を 7 日間発育培養し, 卵胞腔様構造の形成に及ぼす GDF9 と BMP15 の影響を検討した。さらに, 発育培養後の複合体から卵丘細胞を採取し, *LHCGR* mRNA の発現を調べた。

第2節 材料および方法

1. 卵母細胞－卵丘細胞複合体および卵母細胞除去－卵丘細胞複合体の採取

と畜場で採取した未成熟な雌ブタの卵巣から、第2章と同様な方法で直径1.2～1.5 mmの初期胞状卵胞を切り出し、発育途上の卵母細胞を含む卵母細胞－卵丘細胞複合体を得た。卵母細胞の細胞質が均質で退行の兆候が認められず、さらに卵母細胞が卵丘細胞に完全に覆われた複合体のみを選抜した。卵母細胞の直径と同等の内径に引いたパスツールピペットを用いて、一部の卵母細胞－卵丘細胞複合体の卵母細胞を吸引して、卵母細胞の細胞質を取り除き、卵母細胞除去－卵丘細胞複合体を得た。この卵母細胞－卵丘細胞複合体または卵母細胞除去－卵丘細胞複合体を発育培養とqPCRに用いた。

対照として、直径4.0～6.0 mmの胞状卵胞を切り出し、発育を完了した卵母細胞を含む卵母細胞－卵丘細胞複合体を得た。卵母細胞の細胞質が均質で退行の兆候が認められず、さらに卵母細胞が卵丘細胞に完全に覆われた複合体のみを選抜した。卵母細胞－卵丘細胞複合体を発育培養とqPCRの対照として用いた。

2. 卵母細胞－卵丘細胞複合体および卵母細胞除去－卵丘細胞複合体の発育培養

直径1.2～1.5 mmの初期胞状卵胞から採取した卵母細胞－卵丘細胞複合体または卵母細胞除去－卵丘細胞複合体を、細胞低接着性の96ウェルプレート（発育培養用, Nunclon Sphera 174927 96F bottom plate ; qPCR用, Nunclon Sphera 174925 96U bottom plate ; Corning）を用いて、前章と同様な方法で7日間、個別に発育培養した。実験区には、GDF9（739-G9 ; R&D Systems）またはBMP15（5096-BM ; R&D Systems）を、0, 10, 50, または100 ng/mLの濃度で、または、100 ng/mLのGDF9に加えてBMP15を、0, 10, 50, または100 ng/mLの濃度で添加した。培養3日後および5日後に発育培養液の半量を交換した。

培養開始時、3日後、5日後、および7日後に、倒立顕微鏡下で複合体の形態を観察し、個々の複合体の画像を取得した。卵母細胞－卵丘細胞複合体では、卵母細胞の細胞質が均質で退行の兆候がなく、周囲が卵丘細胞で完全に覆われた卵母細胞を含む複合体を、また、

卵母細胞除去一卵丘細胞複合体では、透明帯が卵丘細胞で完全に覆われた複合体を形態的に正常と判断し、形態的に正常な複合体の直径を ImageJ software (NIH) を用いて測定した。複合体内部に卵胞腔様の構造が形成された場合は、腔の形成についても観察した。培養後の複合体は、その後の組織染色または qPCR に用いた。

3. 組織染色

発育培養後、形態的に正常な複合体を PBS-PVA で 3 回洗浄した。洗浄後に、4% (w/v) パラホルムアルデヒド (FUJIFILM Wako Pure Chemical) を含む PBS を用いて、室温で 1 時間複合体を固定した。PBS-PVA でさらに 3 回洗浄した後、50% (1 時間)、70、80、90、100、再度 100% (各 30 分間) のエタノール上昇系列に複合体を浸して完全に脱水した。脱水した複合体をメタクリレート系樹脂モノマー (JB-4; Polysciences, Warrington, PA, USA) の catalyzed solution に 4°C で一晩浸漬し、モノマーを十分に浸透させた。翌日、catalyzed solution に solution B を添加してモノマーを重合させ、複合体を樹脂と共に固めて組織ブロックを作成した。マイクロトーム (HM 335 E; MICROM International GmbH, Walldorf, Germany) を用いて組織ブロックから 5~8 μm の連続切片を作成し、切片を Hematoxylin-Eosin 染色した後、EUKITT mounting medium (O. Kindler, Freiburg, Germany) で封入した。光学顕微鏡下で複合体の組織染色標本を観察した。対照として、卵母細胞一卵丘細胞複合体を成長因子無添加で 7 日間培養した複合体の組織染色標本も同様に作成した。

4. qPCR

発育培養後の卵母細胞除去一卵丘細胞複合体における、*LHCGR* mRNA の発現を調べた。それぞれの培養液中で 7 日間発育培養した 1 群 15 個の複合体 (透明帯を含む卵丘細胞) を PBS-PVA と共に 1.5 mL の遠心チューブへ移し、3,000 rpm (800 $\times g$) で 3 分間、遠心分離し、上清を除去した。この操作を 3 回繰り返して洗浄し、卵丘細胞を最小容量の PBS-PVA と共に使用まで -80°C で保存した。対照として、初期胞状卵胞および胞状卵胞から 1 群 15 個の卵母細胞一卵丘細胞複合体を採取し、PBS-PVA で 3 回洗浄した後、内径の小さいパス

ツールピペットを用いて卵丘細胞を採取し、PBS-PVA と共に 1.5 mL の遠心チューブへ移し、3,000 rpm (800×*g*) で 3 分間、遠心分離した。上清を除去し、卵丘細胞を最小容量の PBS-PVA と共に使用まで-80°C で保存した。また、胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体 15 個分の壁顆粒膜細胞を HEPES-199 と共に 1.5 mL の遠心チューブへ移し、3,000 rpm (800×*g*) で 3 分間、遠心分離した。この操作を 3 回繰り返して洗浄し、壁顆粒膜細胞を最小容量の PBS-PVA と共に使用まで-80°C で保存した。

-80°C で保存した卵丘細胞および壁顆粒膜細胞からそれぞれ、第 2 章と同様な方法で全 RNA を抽出し、cDNA を合成した。この時、抽出した RNA の濃度が一定となるように調整した。qPCR の反応には、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用い、マニュアルに従って遂行した。*LHCGR* と内部標準として用いた *GAPDH* および *ACTB* のプライマーは、前章と同様なものを用いた (表 3-1)。PCR の設定を 95°C 1 分を 1 サイクル、95°C 15 秒/63.3°C 30 秒を 40 サイクルとし、サーマルサイクラー (BIO RAD) を用いて各サンプルの cDNA 断片を増幅させた。すべての遺伝子に対して融解曲線を解析し、単一のピークで PCR 産物の特異性を判定した。

5. 統計処理

形態的に正常な複合体の割合および卵胞腔様構造を形成した複合体数の統計的有意性は、 χ^2 検定を用いて判定した。複合体の直径の差は、二元配置分散分析し、交互作用に有効性がある場合は、Tukey-Kramer の多重比較検定を用いて群間比較した。さらに、培養 7 日後の複合体の直径については、体内で発育を完了した複合体と *t* 検定を用いて比較した。mRNA 量については一元配置分散分析し、その後 Tukey-Kramer の多重比較検定を用いて比較した。 $P < 0.05$ を統計的に有意と判断した。

第3節 結果

1. 卵母細胞－卵丘細胞複合体の発達

直径 1.2～1.5 mm のブタ初期胞状卵胞から採取した卵母細胞－卵丘細胞複合体を種々の濃度の GDF9 または BMP15 を添加した培養液中で 7 日間発育培養した (図 4-1)。培養開始時 (Day 0), 卵母細胞は周囲を 2～3 層の卵丘細胞に覆われていた。培養後, いずれの実験区においても, ほとんどの卵丘細胞はディッシュの底面に遊走することなく卵母細胞を覆い, 球状あるいはドーム状の複合体を構成し, 複合体の直径は, 培養の経過とともに徐々に増加した。培養終了時, いずれの区においても 80%以上の複合体では, 卵母細胞は卵丘細胞に完全に覆われた形態的に正常な状態であり, GDF9 および BMP15 添加による影響は認められなかった (図 4-2)。

卵母細胞－卵丘細胞複合体の直径を測定し, 複合体の発達を調べた (図 4-3)。培養開始時, 約 180 μm であった複合体の平均直径は, いずれの実験区においても培養の経過とともに増加し, 培養 7 日後, 無添加区において約 350 μm となった。GDF9 添加区では濃度依存的に複合体の平均直径は増加し, 100 ng/mL 添加区では $453.4 \pm 10.4 \mu\text{m}$ (平均値 \pm 標準誤差) と, 無添加区の $342.5 \pm 10.3 \mu\text{m}$ と比較して有意に増大した。また, GDF9 添加区の複合体の平均直径は, 体内で発育を完了した卵母細胞－卵丘細胞複合体の直径 ($238.2 \pm 4.4 \mu\text{m}$) に比べて有意に大きかった。一方, BMP15 添加区では, 濃度依存的な複合体の直径の増加は認められなかった。培養 7 日後, 100 ng/mL 添加区では $336.3 \pm 7.0 \mu\text{m}$ と, 無添加区の $358.4 \pm 8.4 \mu\text{m}$ より直径は小さく, 体内で発育を完了した卵母細胞を含む複合体の直径 ($230.0 \pm 4.3 \mu\text{m}$) より大きかった。

卵胞腔様構造の形成について調べたところ, 培養 3 日目以降に複合体は卵胞腔様構造を形成し, 7 日後, その割合は無添加区において約 30%となった (図 4-4)。GDF9 添加区では, 卵胞腔様構造を形成した複合体の割合は濃度依存的に増加し, 100 ng/mL 添加区では 80%と, 無添加区の 26%と比較して有意に増加した。一方, BMP15 添加区では, 卵胞腔様構造の形成率に濃度依存的な増加は認められなかった。

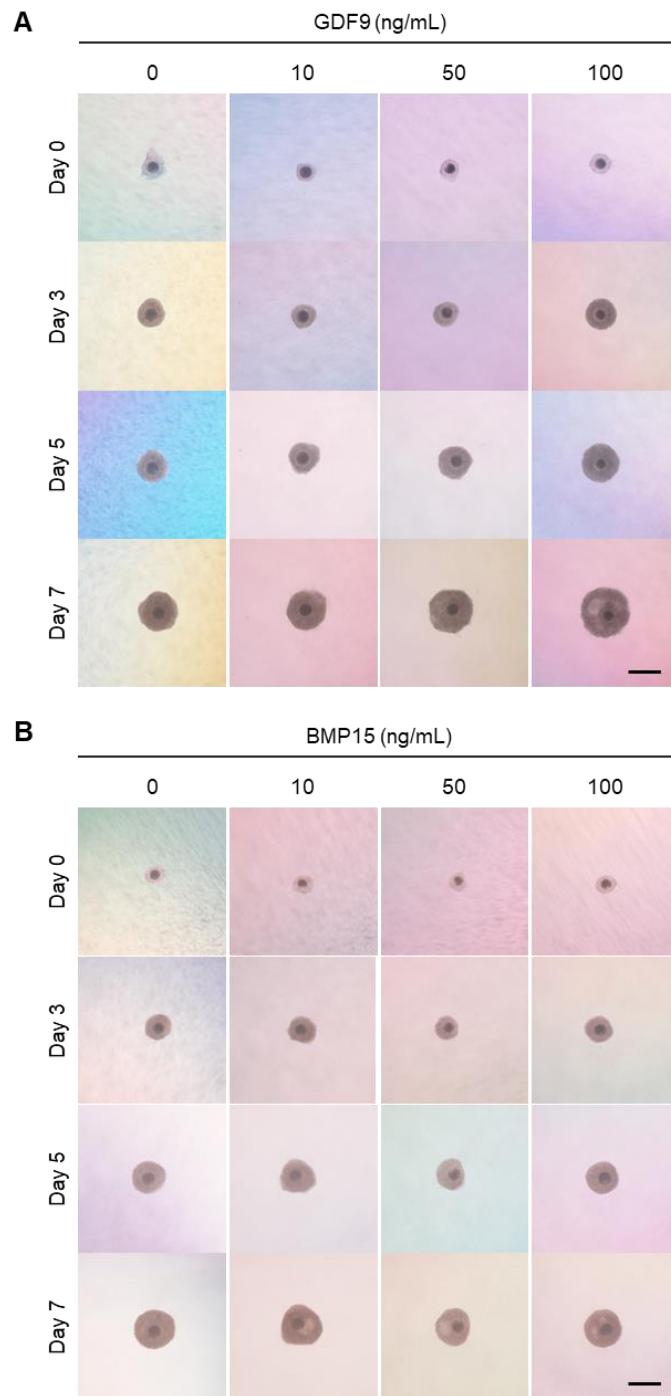


図 4-1. GDF9 または BMP15 添加培養液中におけるブタ卵母細胞-卵丘細胞複合体の発達

直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体を、0, 10, 50, および 100 ng/mL の GDF9 (A) または BMP15 (B) を添加した培養液中で 7 日間培養した。培養開始時 (Day 0), 3 日後 (Day 3), 5 日後 (Day 5), および 7 日後 (Day 7) に複合体の形態を観察した。スケールバーは 300 μ m を示す。

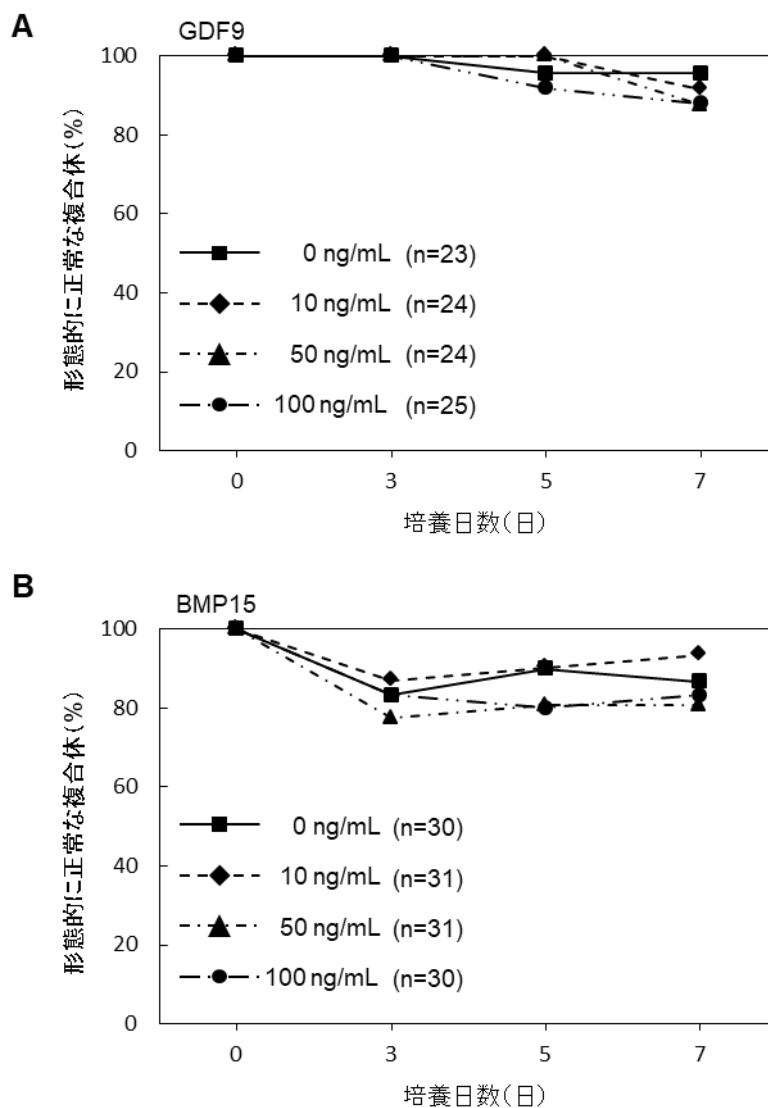


図 4-2. プタ卵母細胞-卵丘細胞複合体の形態的な正常性に及ぼす GDF9 および BMP15 の影響

直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体を、0, 10, 50, および 100 ng/mL の GDF9 (A) または BMP15 (B) を添加した培養液中で 7 日間発育培養した。培養開始時、3 日後、5 日後、および 7 日後に複合体を観察し、卵母細胞が卵丘細胞で完全に覆われた複合体を形態的に正常と判断した。実験は 3 回以上繰り返し行った。

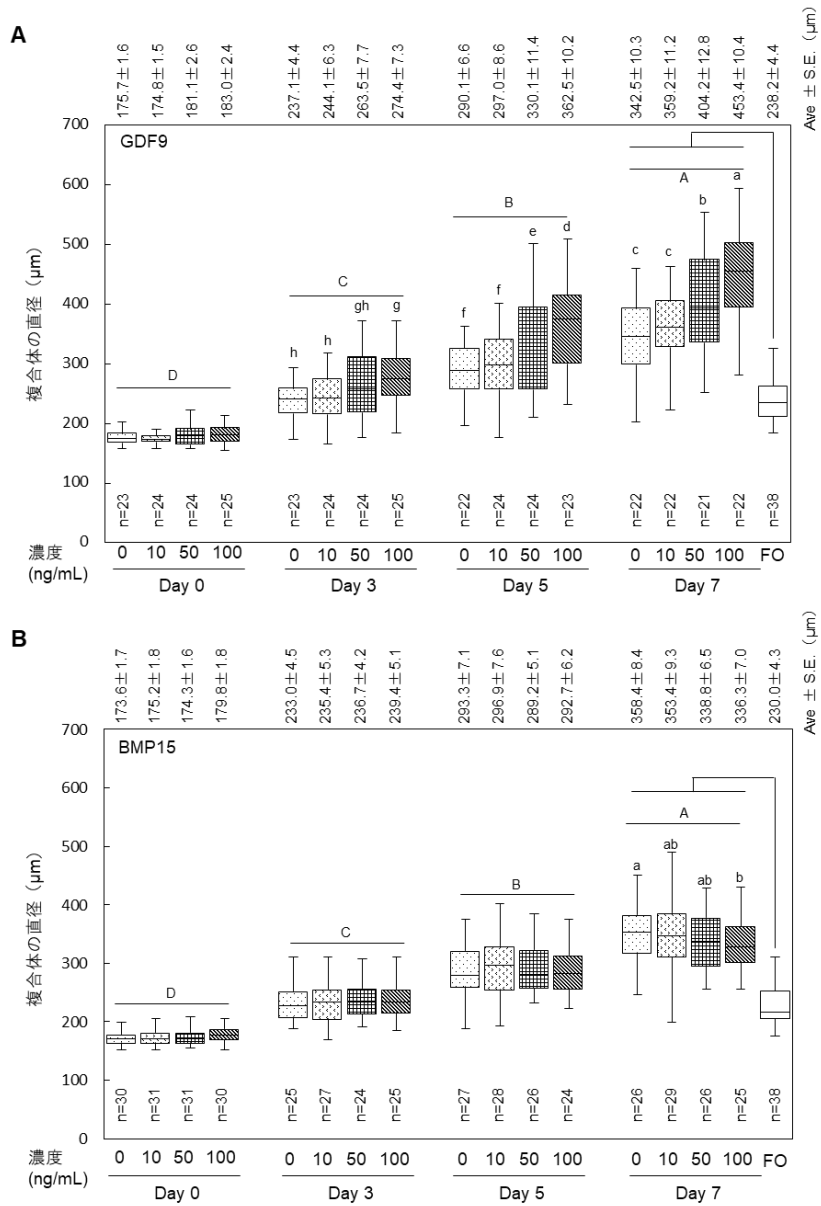


図 4-3. ブタ卵母細胞-卵丘細胞複合体の発達に及ぼす GDF9 および BMP15 の影響

直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体を、0, 10, 50, および 100 ng/mL の GDF9 (A) または BMP15 (B) を添加した培養液中で 7 日間発育培養した。培養開始時 (Day 0)、3 日後 (Day 3)、5 日後 (Day 5)、および 7 日後 (Day 7) に複合体を観察し、卵母細胞が卵丘細胞に完全に覆われた正常な複合体のうち、卵母細胞に細胞質の異常などの退行の兆候が認められない卵母細胞-卵丘細胞複合体の直径を測定した。対照として、直径 4.0~6.0 mm の胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体 (fully-grown oocyte, FO) の直径を測定した。図上段の数値は複合体の平均直径 ± 標準誤差を示す。

(A) A-D), a-c), d-f), g, h), (B) A-D), a, b) 異なる文字間の差は有意 ($P < 0.05$)。実験は 3 回以上繰り返した。

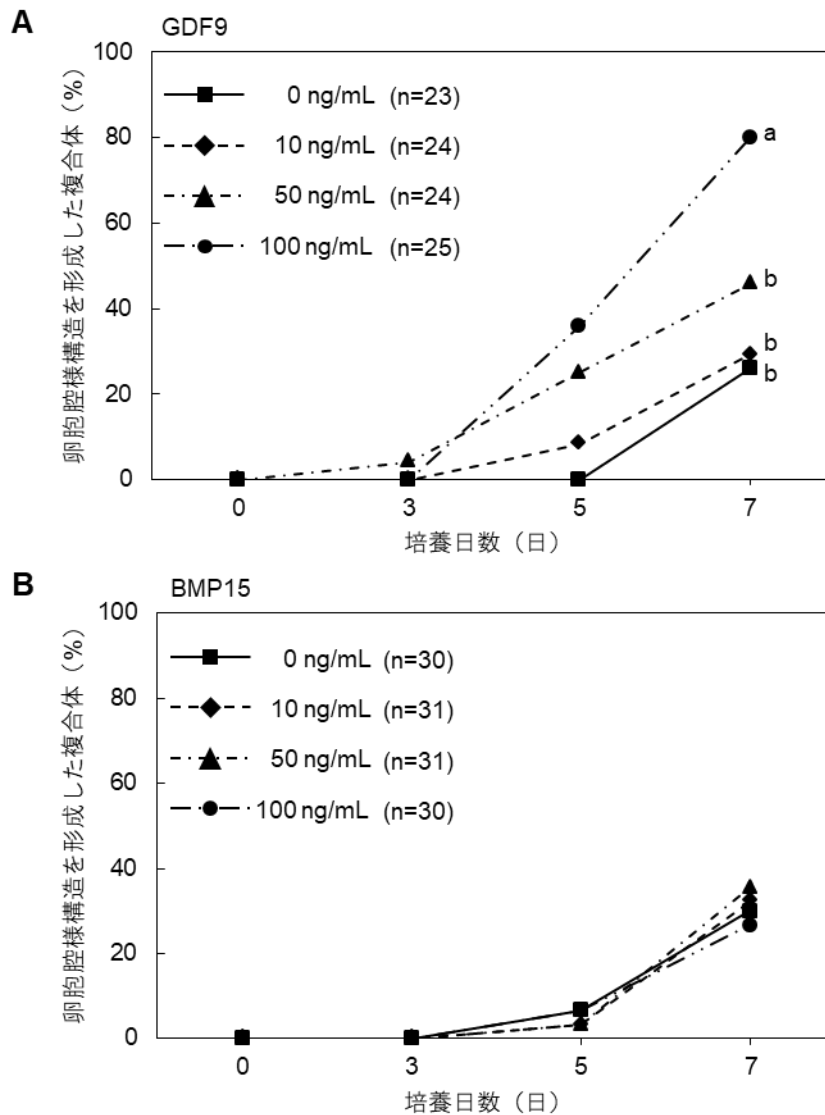


図 4-4. ブタ卵母細胞-卵丘細胞複合体の卵胞腔様構造の形成に及ぼす GDF9 および BMP15 の影響

直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胎状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体を、0, 10, 50, および 100 ng/mL の GDF9 (A) または BMP15 (B) を添加した培養液中で 7 日間発育培養した。培養開始時, 3 日後, 5 日後, および 7 日後に複合体を観察し, 複合体内部の卵胞腔様構造の有無を調べた。

a, b) 異なる文字間の差は有意 ($P < 0.05$)。実験は 3 回以上繰り返し行った。

2. 卵母細胞を除去した卵丘細胞複合体の発達

初期胞状卵胞から採取した卵母細胞－卵丘細胞複合体から、卵母細胞を取り除いた複合体を種々の濃度の GDF9 または BMP15 を添加した発育培養液中で 7 日間培養した (図 4-5)。対照として、卵母細胞－卵丘細胞複合体を成長因子無添加の培養液中で実験区と同様に培養した。培養開始時 (Day 0)、透明帯は周囲を 2~3 層の卵丘細胞に覆われていた。卵母細胞－卵丘細胞複合体では、培養日数の経過に伴って複合体の直径は増加した。培養後、底面に遊走する卵丘細胞はほとんど観察されず、複合体は卵母細胞を内包した状態で球状またはドーム状に発達した。一方、卵母細胞除去－卵丘細胞複合体において、無添加区および BMP15 添加区では、培養後も複合体にはほとんど変化はみられなかった。GDF9 添加区では、培養日数の経過に伴って濃度依存的に複合体の直径は増加した。培養後、底面に遊走する卵丘細胞はほとんど観察されず、ほとんどの複合体は球状に発達した。培養終了時、いずれの区においても 70%以上の複合体は、卵丘細胞が透明帯を完全に内包した正常な形態を示しており、GDF9 および BMP15 添加による影響は認められなかった (図 4-6)。

卵母細胞を除去した卵丘細胞複合体の直径を測定し、複合体の発達を調べた (図 4-7)。培養開始時、170~180 μm であった複合体の平均直径は、対照の卵母細胞－卵丘細胞複合体では、培養日数の経過に伴って増加し、培養 7 日後には 300 μm 以上に達したが、無添加区の卵母細胞除去－卵丘細胞複合体では増加はみられず、培養 7 日後の平均直径は約 200 μm であった。GDF9 添加区では、濃度依存的に複合体の平均直径は増加し、培養 7 日後、100 ng/mL 添加区では $318.5 \pm 11.9 \mu\text{m}$ と、無添加区の $206.0 \pm 3.4 \mu\text{m}$ と比較して有意に増大した。しかし、GDF9 添加区の卵母細胞除去－卵丘細胞複合体の平均直径は、対照の卵母細胞－卵丘細胞複合体 ($377.8 \pm 9.8 \mu\text{m}$) より小さかった。BMP15 添加区でも、濃度依存的な直径の増加はわずかに認められた。培養 7 日後、BMP15 100 ng/mL 添加区では $231.7 \pm 7.3 \mu\text{m}$ と、無添加区の $204.1 \pm 4.1 \mu\text{m}$ より直径は大きく、体内で発育を完了した卵母細胞を含む複合体の平均直径 ($241.9 \pm 27.5 \mu\text{m}$) と同等であった。

卵胞腔様構造の形成について調べた結果、対照の卵母細胞－卵丘細胞複合体では、約 40% の複合体で卵胞腔様構造が形成されたが、無添加区と BMP15 添加区では培養期間を通して、卵胞腔様構造を形成した複合体はなかった (図 4-8)。一方、GDF9 50 および 100 ng/mL

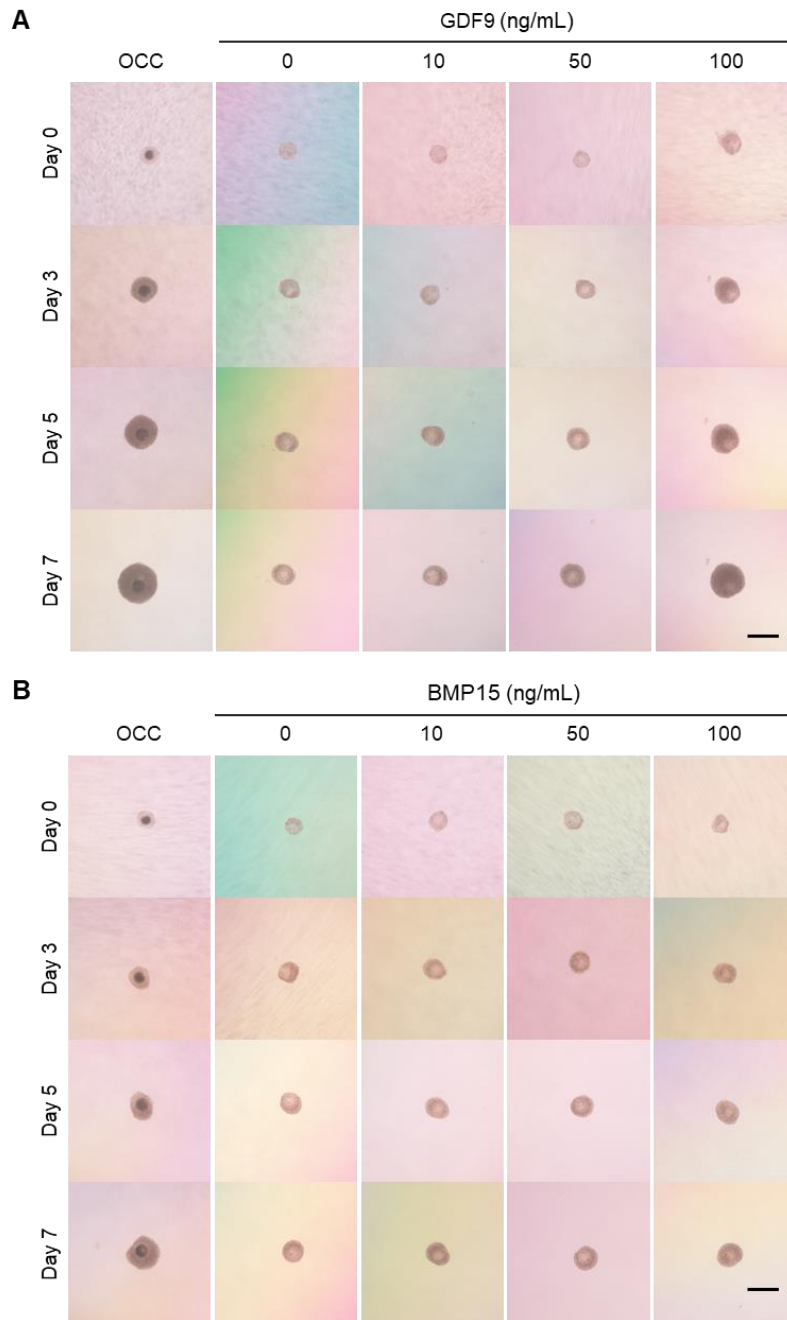


図 4-5. GDF9 または BMP15 添加培養液中におけるブタ卵母細胞除去-卵丘細胞複合体の発達

直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胎状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体の卵母細胞を、内径の小さいパスツールピペットを用いて除去し、卵母細胞除去-卵丘細胞複合体を得た。この複合体を、0, 10, 50, および 100 ng/mL の GDF9 (A) または BMP15 (B) を添加した培養液中で 7 日間培養した。培養開始時 (Day 0)、3 日後 (Day 3)、5 日後 (Day 5)、および 7 日後 (Day 7) に複合体の形態を観察した。対照として、初期胎状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体 (oocyte-cumulus cell complex ; OCC) を同様な方法で培養した。スケールバーは 300 μm を示す。

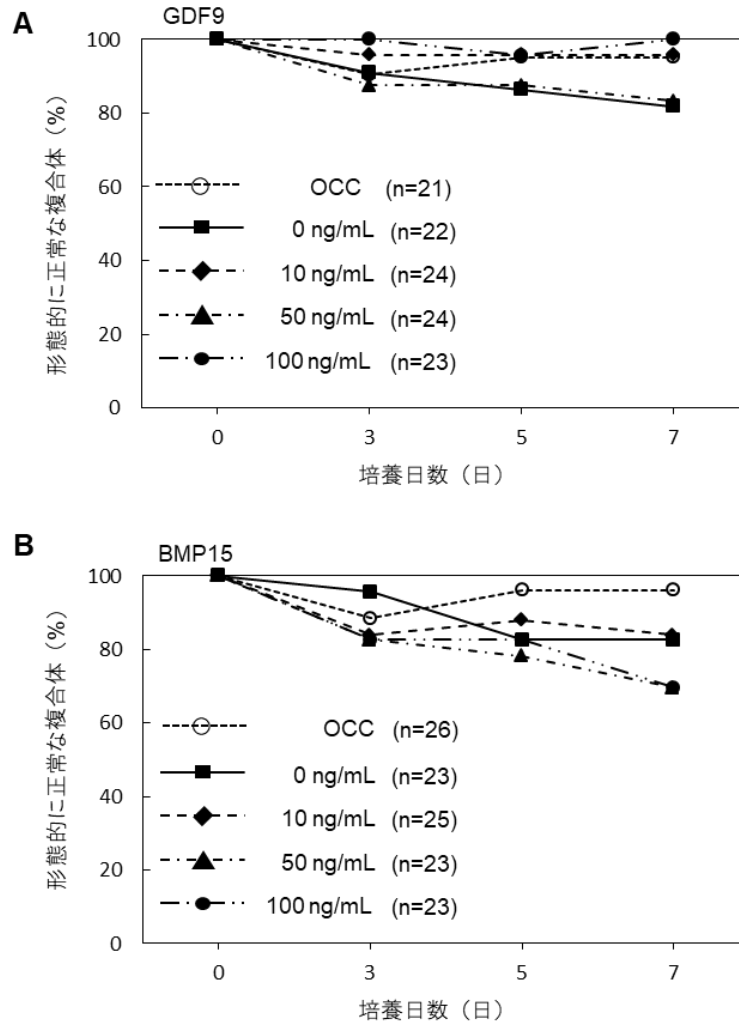


図 4-6. ブタ卵母細胞除去-卵丘細胞複合体の形態的な正常性に及ぼす GDF9 および BMP15 の影響

直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胎状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体の卵母細胞を、内径の小さいパスツールピペットを用いて除去し、卵母細胞除去-卵丘細胞複合体を得た。この複合体を、0, 10, 50, および 100 ng/mL の GDF9 (A) または BMP15 (B) を添加した発育培養液中で 7 日間培養した。培養開始時、3 日後、5 日後、および 7 日後に複合体を観察し、透明帯が卵丘細胞に完全に覆われた複合体を形態的に正常と判断した。対照として、初期胎状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体 (oocyte-cumulus cell complex ; OCC) を同様な方法で培養した。実験は 3 回以上繰り返し行った。

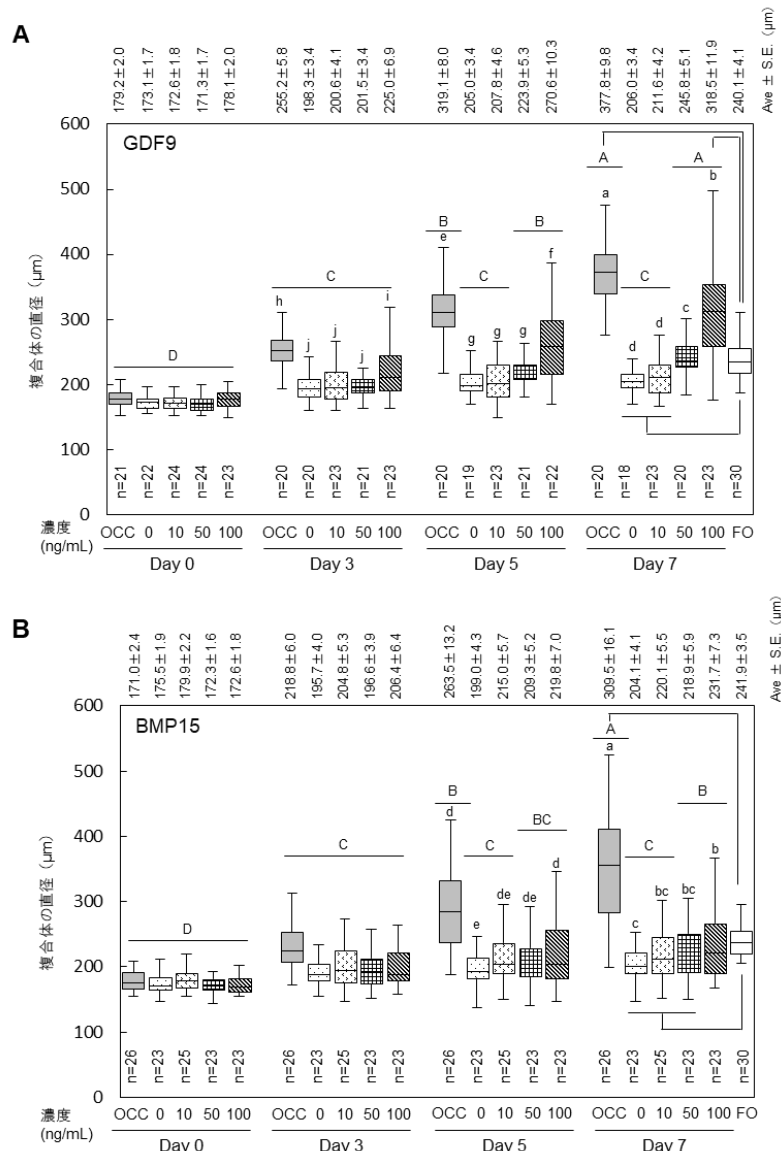


図 4-7. ブタ卵母細胞除去-卵丘細胞複合体の発達に及ぼす GDF9 および BMP15 の影響

直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体の卵母細胞を、内径の小さいパスツールピペットを用いて除去し、卵母細胞除去-卵丘細胞複合体を得た。この複合体を、0, 10, 50, および 100 ng/mL の GDF9 (A) または BMP15 (B) を添加した発育培養液中で 7 日間培養した。培養開始時 (Day 0), 3 日後 (Day 3), 5 日後 (Day 5), および 7 日後 (Day 7) に複合体を観察し、透明帯が卵丘細胞に完全に覆われた正常な卵母細胞除去-卵丘細胞複合体の直径を測定した。対照として、初期胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体 (OCC) を同様な方法で培養した。また、直径 4.0~6.0 mm の胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体 (fully-grown oocyte, FO) の直径を測定した。図上段の数値は複合体の平均直径±標準誤差を示す。

(A) A-D, a-d, e-g, h-j, (B) A-D, a-c, d, e) 異なる文字間の差は有意 ($P < 0.05$)。実験は 3 回以上繰り返し行った。

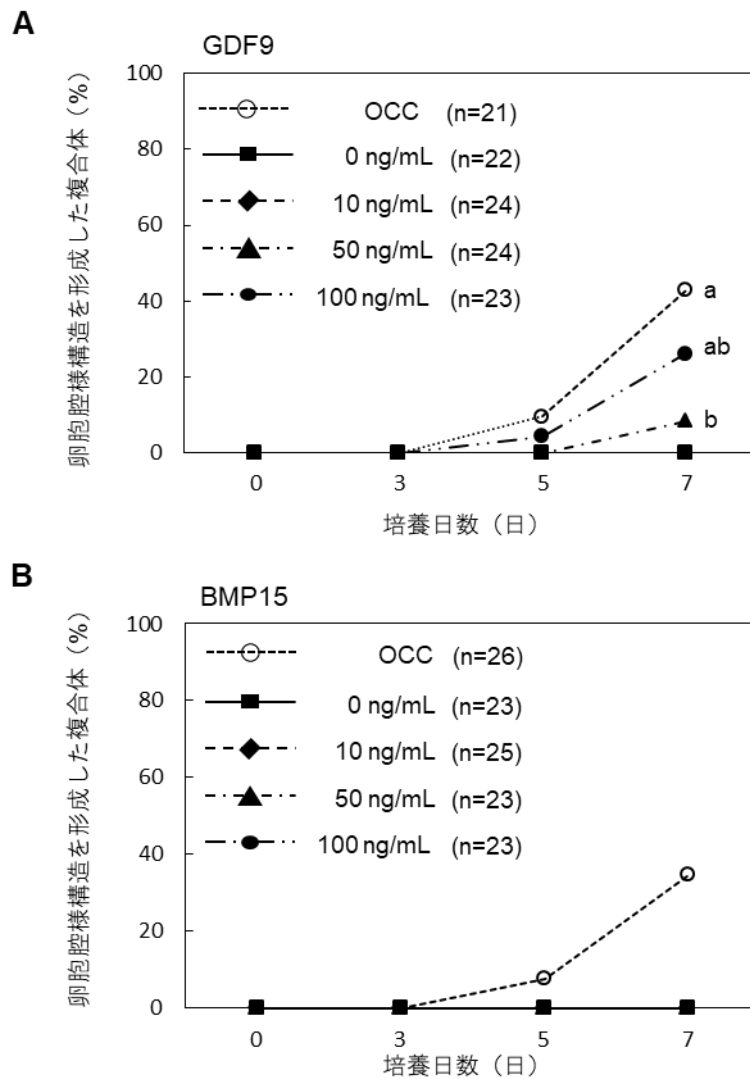


図 4-8. ブタ卵母細胞除去-卵丘細胞複合体の卵胞腔様構造の形成に及ぼす GDF9 および BMP15 の影響
 直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胎状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体の卵母細胞を、内径の小さいパスツールピペットを用いて除去し、卵母細胞除去-卵丘細胞複合体を得た。この複合体を、0, 10, 50, および 100 ng/mL の GDF9 (A) または BMP15 (B) を添加した発育培養液中で 7 日間培養した。培養開始時、3 日後、5 日後、および 7 日後に複合体を観察し、複合体の内部に卵胞腔様構造を形成した複合体を調べた。対照として、初期胎状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体 (oocyte-cumulus cell complex; OCC) を同様な方法で培養した。BMP15 添加区の卵母細胞除去-卵丘細胞複合体では、卵胞腔様構造は形成されなかった (B)。

a, b) 異なる文字間の差は有意 ($P < 0.05$)。実験は 3 回以上繰り返し行った。

添加区ではそれぞれ 8%および 26%の複合体は卵胞腔様構造を形成した。

3. 卵母細胞除去一卵丘細胞複合体による卵胞腔様構造の形成に及ぼす GDF9 と BMP15 併用の影響

初期胞状卵胞から採取した卵母細胞一卵丘細胞複合体から、卵母細胞を取り除いた複合体を、GDF9 100 ng/mL と、種々の濃度の BMP15 を添加した発育培養液中で 7 日間培養した (図 4-9)。培養開始時 (Day 0)、透明帯は周囲を 2~3 層の卵丘細胞に覆われていたが、いずれの区においても、培養の経過とともに複合体の直径は徐々に増加した。複合体は球状またはドーム状の形態を示したが、高濃度の BMP15 添加区では、複合体の表面には凸凹が観察された。培養終了時、いずれの区においても 75%以上の複合体では、卵丘細胞が透明帯を完全に内包した形態的に正常な状態であり、GDF9 と BMP15 の併用による影響は認められなかった (図 4-10)。

卵母細胞を除去した卵丘細胞複合体の直径を測定し、複合体の発達を調べた (図 4-11)。培養開始時、約 180 μm であった複合体の平均直径は、いずれの実験区においても培養の経過とともに増加し、培養 7 日後、GDF9 100 ng/mL + BMP15 0 ng/mL 添加区において $362.9 \pm 10.8 \mu\text{m}$ となった。この直径の増加は卵母細胞一卵丘細胞複合体とほぼ同等であったが、BMP15 添加区では、濃度依存的にさらに複合体の平均直径は増加し、GDF9 100 ng/mL + BMP15 100 ng/mL 添加区では $444.1 \pm 16.9 \mu\text{m}$ と、GDF9 を単独で添加した区と比較して有意に増大した。また、この直径は体内で発育を完了した卵母細胞一卵丘細胞複合体 ($247.3 \pm 4.4 \mu\text{m}$) に比べて有意に大きかった。

卵胞腔様構造の形成について調べた結果、いずれの実験区においても培養 3 日目以降に複合体は卵胞腔様構造を形成しはじめ、7 日後、その形成率は卵母細胞一卵丘細胞複合体において 14%となった (図 4-12)。卵胞腔様構造を形成した複合体の割合は BMP15 濃度依存的に増加し、GDF9 100 ng/mL + BMP15 100 ng/mL 添加区では 58%と、GDF9 を単独で添加した区の 16%と比較して有意に増加した。

培養 7 日後の複合体から組織切片を作成し、染色した (図 4-13)。卵母細胞除去一卵丘細胞複合体では、卵母細胞の細胞質は観察されず、卵丘細胞から成る複合体の中心に透明帯

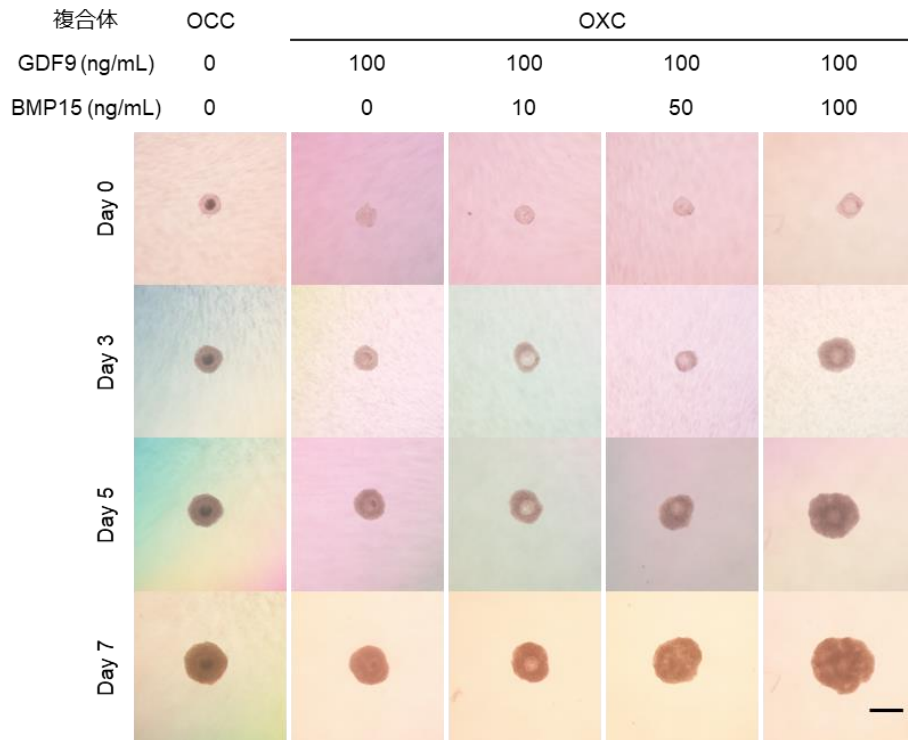


図 4-9. GDF9 と BMP15 を併用した培養液中におけるブタ卵母細胞除去-卵丘細胞複合体の発達

直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体の卵母細胞を、内径の小さいパスツールピペットを用いて除去し、卵母細胞除去-卵丘細胞複合体 (oocytectomized complex ; OXC) を得た。この複合体を 100 ng/mL の GDF9 に加えて、0, 10, 50, または 100 ng/mL の BMP15 を添加した培養液中で 7 日間培養した。培養開始時 (Day 0), 3 日後 (Day 3), 5 日後 (Day 5), および 7 日後 (Day 7) に複合体の形態を観察した。対照として、初期胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体 (oocyte-cumulus cell complex ; OCC) を同様な方法で培養した。スケールバーは 300 μ m を示す。

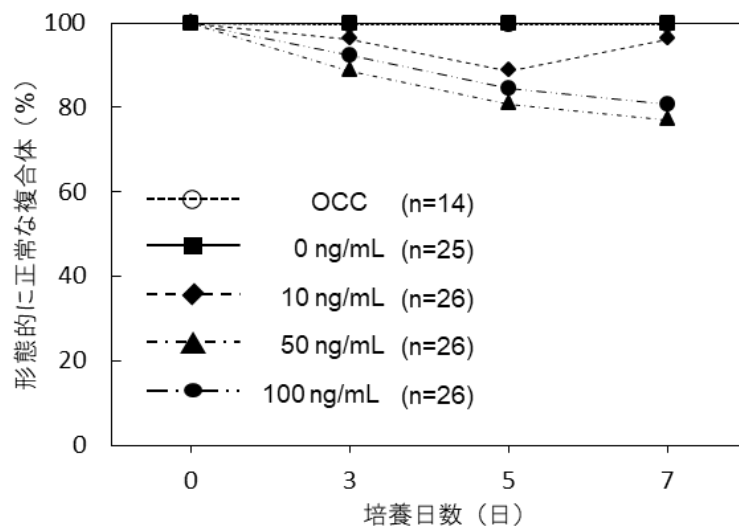


図 4-10. GDF9 と BMP15 を併用した培養液中におけるブタ卵母細胞除去-卵丘細胞複合体の形態的な正常性

直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胎状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体の卵母細胞を、内径の小さいパスツールピペットを用いて除去し、卵母細胞除去-卵丘細胞複合体を得た。この複合体を 100 ng/mL の GDF9 に加えて、0, 10, 50, または 100 ng/mL の BMP15 を添加した発育培養液中で 7 日間培養した。培養開始時、3 日後、5 日後、および 7 日後に複合体を観察し、透明帯が卵丘細胞に完全に覆われた複合体を形態的に正常と判断した。対照として、初期胎状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体 (oocyte-cumulus cell complex ; OCC) を同様な方法で培養した。実験は 3 回以上繰り返し行った。

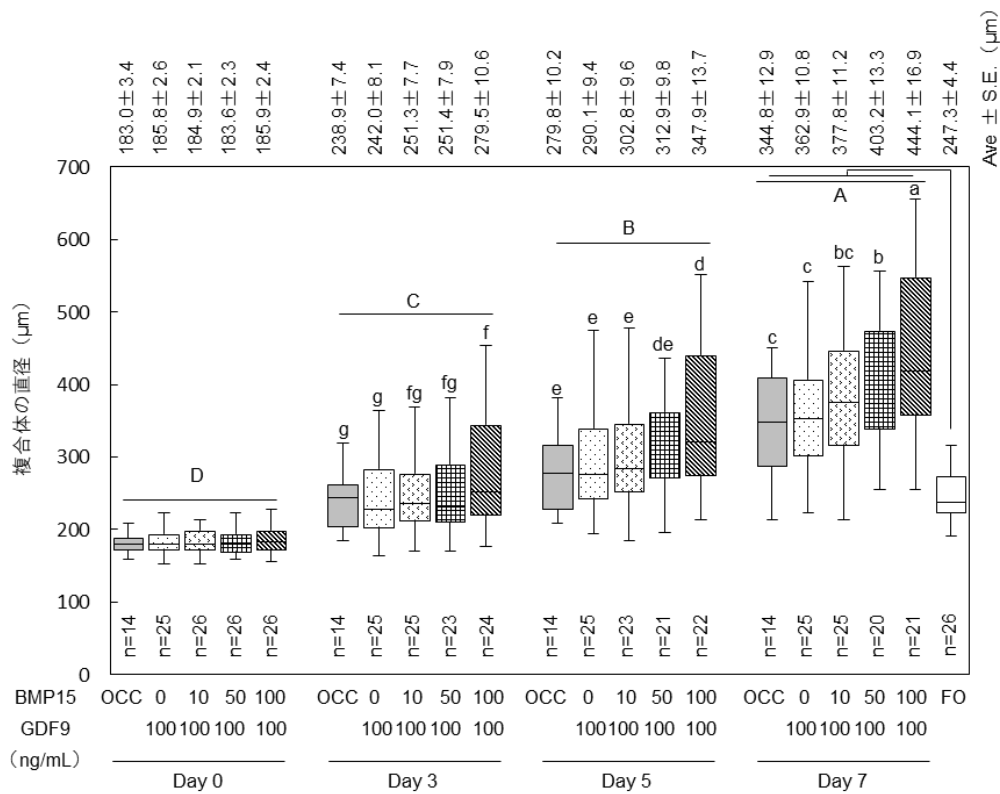


図 4-11. ブタ卵母細胞除去-卵丘細胞複合体の発達に及ぼす GDF9 および BMP15 の併用による影響

直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胎状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体の卵母細胞を、内径の小さいパスツールピペットを用いて除去し、卵母細胞除去-卵丘細胞複合体を得た。この複合体を 100 ng/mL の GDF9 に加えて、0, 10, 50, または 100 ng/mL の BMP15 を添加した発育培養液中で 7 日間培養した。培養開始時 (Day 0), 3 日後 (Day 3), 5 日後 (Day 5), および 7 日後 (Day 7) に複合体を観察し、透明帯が卵丘細胞に完全に覆われた正常な卵母細胞除去-卵丘細胞複合体の直径を測定した。対照として、初期胎状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体 (oocyte-cumulus cell complex ; OCC) を同様な方法で培養した。また、直径 4.0~6.0 mm の胎状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体 (fully-grown oocyte, FO) の直径を測定した。図上段の数値は複合体の平均直径±標準誤差を示す。

A~D), a~d), d, e), f, g) 異なる文字間の差は有意 ($P < 0.05$)。実験は 3 回以上繰り返し行った。

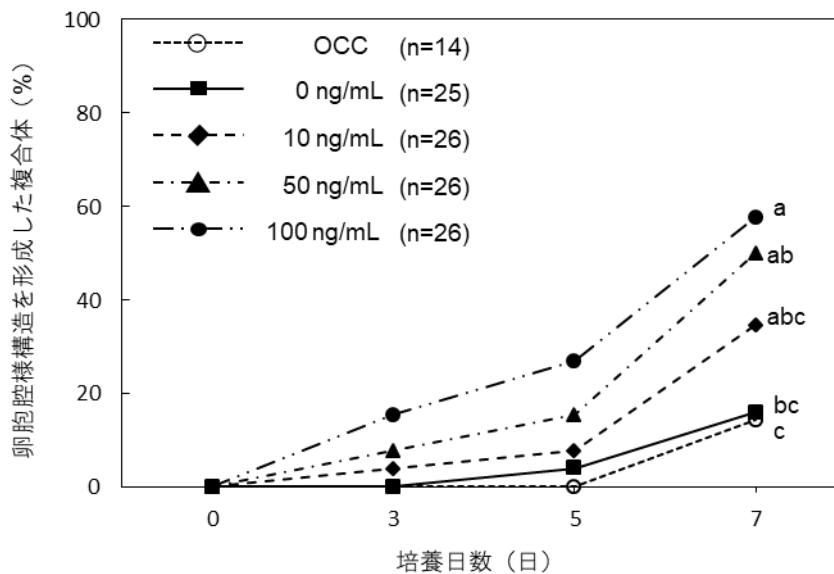


図 4-12. ブタ卵母細胞除去-卵丘細胞複合体の卵胞腔様構造の形成に及ぼす GDF9 および BMP15 の併用による影響

直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胎状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体の卵母細胞を、内径の小さいパスツールピペットを用いて除去し、卵母細胞除去-卵丘細胞複合体を得た。この複合体を 100 ng/mL の GDF9 に加えて、0, 10, 50, または 100 ng/mL の BMP15 を添加した発育培養液中で 7 日間培養した。培養開始時、3 日後、5 日後、および 7 日後に複合体を観察し、複合体の内部に卵胞腔様構造を形成した複合体を調べた。対照として、初期胎状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体 (oocyte-cumulus cell complex ; OCC) を同様な方法で培養した。

a-c) 異なる文字間の差は有意 ($P < 0.05$)。実験は 3 回以上繰り返し行った。

が観察された。一部の複合体の内部に、卵丘細胞間に卵胞腔様の構造が形成されていた。**GDF9** を単独で添加した区の複合体では、卵丘細胞は小石状の形態を示し、細胞間の距離が近かった。一方、**GDF9** と **BMP15** の併用区では、卵丘細胞間の距離が離れ、糸状仮足と思われる細い突起を伸長する卵丘細胞が多数観察された。また、**BMP15** 添加濃度依存的に卵丘細胞間の距離は広がり、より大きな腔構造が観察された。

培養 7 日後の複合体から卵丘細胞を採取し、qPCR で *LHCGR* mRNA の発現レベルを比較した (図 4-14)。初期胞状卵胞と胞状卵胞から採取した卵丘細胞では、*LHCGR* mRNA の発現レベルは低かった。胞状卵胞から採取した壁顆粒膜細胞では、卵丘細胞より発現レベルは高かったが、有意な差はみられなかった。培養後の複合体では、成長因子無添加区および **BMP15** 添加区において、*LHCGR* mRNA レベルは増加した。一方、卵母細胞-卵母細胞複合体および **GDF9** 添加区では、*LHCGR* mRNA レベルは低く抑えられた。

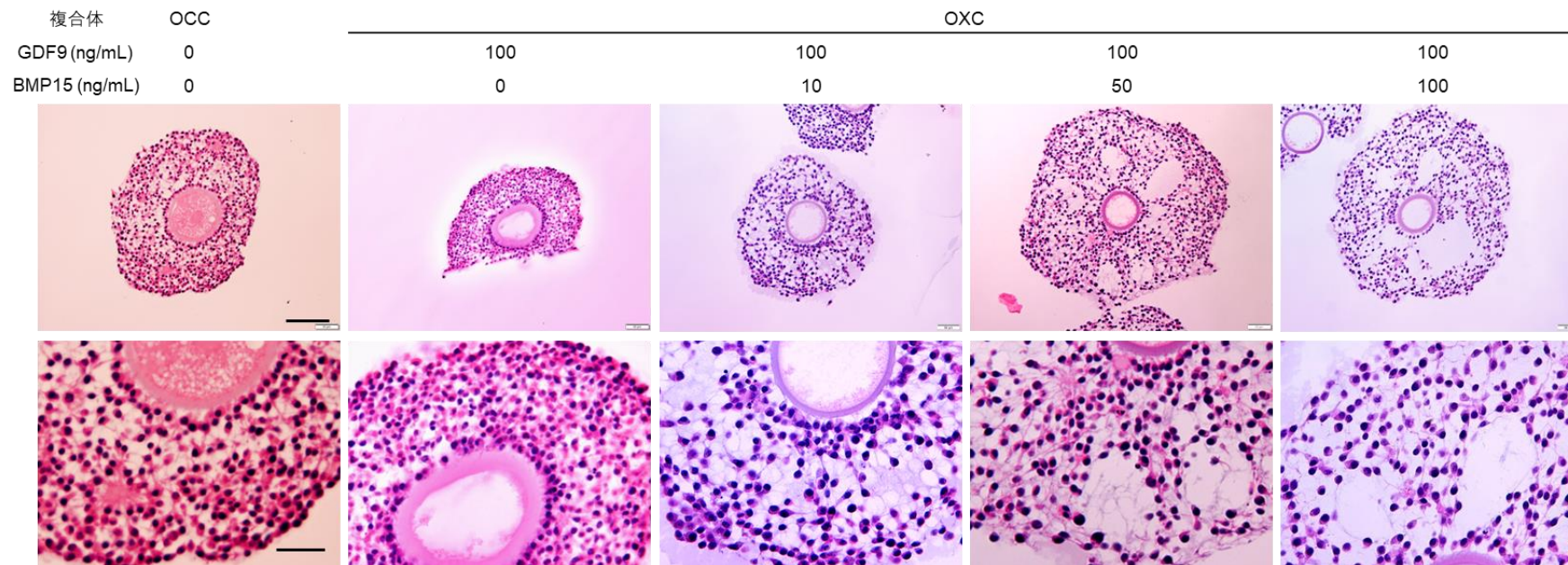


図 4-13. GDF9 と BMP15 を併用した培養液中におけるブタ卵母細胞除去-卵丘細胞複合体の形態

直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体の卵母細胞を、内径の小さいパスツールピペットを用いて除去し、卵母細胞除去-卵丘細胞複合体 (oocyctomized complex ; OXC) を得た。この複合体を 100 ng/mL の GDF9 に加えて、0, 10, 50, または 100 ng/mL の BMP15 を添加した培養液中で 7 日間培養した。対照として、初期胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体 (oocyte-cumulus cell complex ; OCC) を同様な方法で培養した。培養終了後、複合体を組織染色し、形態を観察した。スケールバーは上段 100 μ m, 下段 40 μ m を示す。

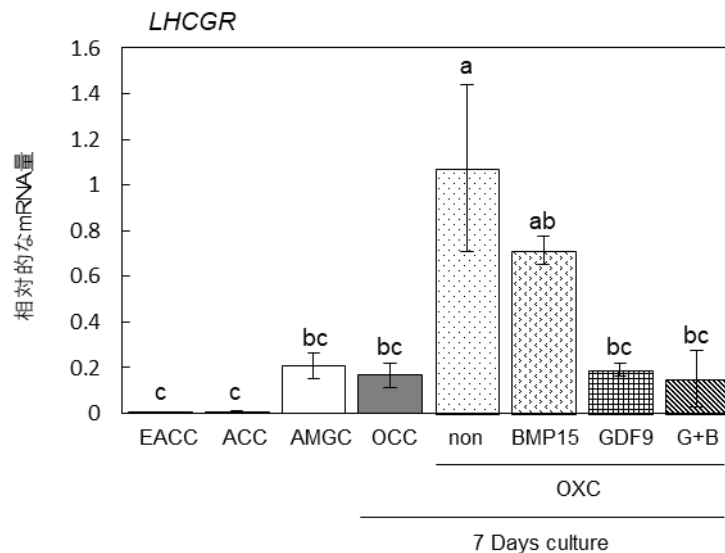


図 4-14. 卵丘細胞の *LHCGR* mRNA の発現に及ぼす GDF9 および BMP15 の影響

直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胞状卵胞から採取した卵母細胞除去-卵丘細胞複合体 (oocytectomized complex; OXC) を、成長因子無添加 (non), 100 ng/mL の BMP15 (BMP15), 100 ng/mL の GDF9 (GDF9), または 100 ng/mL GDF9 + 100 ng/mL BMP15 (G+B) を添加した発育培養液中で 7 日間培養した。培養終了後、透明帯が卵丘細胞に完全に覆われた正常な複合体を回収した。それぞれの複合体の卵丘細胞から RNA を抽出し、*LHCGR* について qPCR を行った。対照として、初期胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体 (oocyte-cumulus cell complex; OCC) を同様な方法で培養した。培養前の複合体の卵丘細胞 (early antral follicle's cumulus cells, EACC), 直径 4.0~6.0 mm の胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体から採取した卵丘細胞 (antral follicle's cumulus cells, ACC) および壁顆粒膜細胞 (antral follicle's mural granulosa cells, AMGC) の *LHCGR* mRNA 量を測定した。*GAPDH* と *ACTB* を内部標準として用いたが、結果は同様であったため、*GAPDH* の結果を示す。

a~d) 異なる文字間の差は有意 ($P < 0.05$)。実験は 3 回以上繰り返し行った。

第4節 考察

初期胞状卵胞から採取した卵母細胞－卵丘細胞複合体を種々の濃度の GDF9 または BMP15 を添加した培養液中で発育培養したところ、GDF9 は濃度依存的に卵母細胞－卵丘細胞複合体を発達させ、卵胞腔様構造の形成を促進するが、BMP15 にはその作用がないことが示された。複合体の発達に及ぼすこの影響は第2章の結果と同様であり、卵丘細胞は GDF9 の作用によって増殖し、複合体の直径が増加したものの、BMP15 にはその作用はなかった、あるいは弱かったと考えられる。また、この複合体の直径の増加に同調して、卵胞腔様構造を形成した複合体が増加したことから、GDF9 は複合体の直径を増加させた結果、卵胞腔様構造の形成率が増加したと考えられる。

卵母細胞－卵丘細胞複合体の発育培養では、培養中のブタの卵母細胞から GDF9 と BMP15 が分泌されている可能性があり、GDF9 と BMP15 の作用をより明確にするため、卵母細胞除去－卵丘細胞複合体を用いた同様の培養実験を行った。その結果、成長因子無添加培養液中の卵母細胞－卵丘細胞複合体では、複合体の発達や卵胞腔様構造の形成が起こるのに対して、卵母細胞除去－卵丘細胞複合体では、複合体の発達も卵胞腔様構造の形成も起こらないことから、複合体の発達と卵胞腔様構造の形成には卵母細胞が必要なことが示唆された。さらに、BMP15 単独では、複合体はやや発達するものの、卵胞腔様構造の形成は起こらないこと、一方、GDF9 には、複合体を発達させ、卵胞腔様構造を形成させる作用はあるが、その作用は、卵母細胞が存在する場合に比べて弱いことが示された。この結果は、複合体による卵胞腔様構造の形成には、GDF9 に加えて、それ以外の卵母細胞由来の因子が関与する可能性を示唆している。

Alam ら (2018) は、ウシの卵母細胞－卵丘細胞複合体を体外で 5 日間培養すると、卵胞腔様構造が高率に形成されるが、卵母細胞を除去した複合体では卵胞腔様構造が形成されないこと、また、卵母細胞除去－卵丘細胞複合体を GDF9 または BMP15 を添加した培養液中で培養すると、それぞれ約 50% または 20% の複合体が卵胞腔様構造を形成することを報告している。この報告は、BMP15 の結果を除いて本研究結果と一致しており、種が異なっても卵母細胞や卵母細胞由来の GDF9 が、卵胞腔様構造の形成を促進することを示唆

している。一方、ブタでは BMP15 単独添加によって、卵母細胞－卵丘細胞複合体は卵胞腔様構造を形成しなかったが、これは BMP15 単独添加区では、培養期間を通して複合体の発達はわずかで、卵胞腔様構造を形成することができる大きさにまで複合体が発達できなかったことによると考えられる。これらのことから、GDF9 は濃度依存的にブタの複合体による卵胞腔様構造の形成を促進するが、BMP15 にはその作用がないと考えられる。一方、GDF9 添加培養液中での卵母細胞除去－卵丘細胞複合体による卵胞腔様構造の形成率は、卵母細胞を含む複合体を用いた実験での卵胞腔様構造の形成率より低く、卵母細胞に由来すると考えられる BMP15 が GDF9 と協働して卵胞腔様構造の形成に影響を及ぼしている可能性は否定できない。したがって次の実験を計画した。

GDF9 と BMP15 併用による卵胞腔様構造の形成に影響を及ぼす作用を検討するために、卵母細胞除去－卵丘細胞複合体を GDF9 100 ng/mL と種々の濃度の BMP15 を添加した発育培養液中で培養した。その結果、GDF9 存在下では、BMP15 濃度依存的に卵胞腔様構造の形成率が増加した。このことは、卵母細胞から分泌されると考えられる BMP15 と GDF9 は、協働して複合体の発達を促進し、卵胞腔様構造の形成を促進することを示唆している。Mottershead ら (2015) は、マウスの GDF9 と BMP15 は cumulin と呼ばれるヘテロ二量体を形成し、GDF9 または BMP15 単独のホモ二量体よりも細胞増殖を強く促進することを報告している。本研究では、マウスのリコンビナント GDF9 とヒトのリコンビナント BMP15 を用いたが、培養中にヘテロ二量体を形成するかは明らかではない。しかし、実験結果からは、GDF9 と BMP15 は協働してブタ卵母細胞除去－卵丘細胞複合体の発達を促進したと考えられる。また、Alam ら (2018) によるウシ卵母細胞除去－卵丘細胞を用いた実験では、GDF9 と BMP15 を同時に添加すると、ほぼすべての複合体が卵胞腔様構造を形成することが報告されている。本研究では、GDF9 100 ng/mL + BMP15 100 ng/mL を添加した場合に約 60%の複合体が卵胞腔様構造を形成しており、少なくともウシとブタにおいて、GDF9 と BMP15 は協働して卵胞腔様構造の形成を促進すると考えられる。

本研究では、初期胞状卵胞から採取した卵母細胞と周囲の卵丘細胞から成る複合体を使用した。7日間の培養の過程で、卵丘細胞が卵胞腔様の構造を形成した。体内で卵胞腔を形成した胞状卵胞では、顆粒膜細胞は卵丘細胞と壁顆粒膜細胞に分化している。本研究で

培養した卵丘細胞は増殖して、その一部が分化あるいは脱分化し、壁顆粒膜細胞様の細胞へと変化した可能性がある。培養後の複合体の組織染色標本では、GDF9 を単独で添加した区の複合体は、卵丘細胞は小石状の形態を示したのに対し、GDF9 と BMP15 併用区では、糸状仮足と思われる突起を伸長した卵丘細胞が多数観察された。マウスとウシでは、GDF9 が顆粒膜細胞を誘導して糸状仮足の形成を促進することが報告されているが (Alam *et al.*, 2018 ; El-Hayek *et al.*, 2018), ブタでは GDF9 と BMP15 が協働して糸状仮足の形成を促進すると考えられる。さらに、糸状仮足の形成が促進され、卵丘細胞間の距離が離れたことで、卵胞腔様構造の形成が促進されたと思われる。また、壁顆粒膜細胞に高レベルに発現していると考えられる *LHCGR* mRNA の発現を調べた。培養前の卵丘細胞では、*LHCGR* mRNA の発現レベルが低かったが、培養後、成長因子無添加区および BMP15 単独添加区では、発現レベルは増加した。一方、卵母細胞-卵丘細胞複合体および GDF9 添加培養液中で培養した卵母細胞除去-卵丘細胞複合体の卵丘細胞では、*LHCGR* mRNA の発現レベルは抑制された。これらの結果は、卵母細胞由来の GDF9 が、卵丘細胞の *LHCGR* mRNA の発現を抑制することを示唆しており、卵胞腔の形成には、*LHCGR* mRNA の発現レベルが抑制されることが必要である可能性がある。

以上より、ブタの卵母細胞除去-卵丘細胞複合体による卵胞腔様構造の形成には、卵母細胞由来の GDF9 が必須であり、さらに、GDF9 は BMP15 と協働して、卵胞腔様構造の形成を促進すると考えられる。

第5節 小括

本章では、GDF9 (growth differentiation factor 9) または BMP15 (bone morphogenetic protein 15) を添加した発育培養液中で、直径 1.2~1.5 mm の初期胞状卵胞から採取した発育途上のブタ卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞複合体、または複合体から卵母細胞を除去した卵母細胞除去-卵丘細胞複合体を 7 日間培養し、卵胞腔様構造の形成に対する GDF9 と BMP15 の影響を検討した。

GDF9 または BMP15 を添加した培養液中で、卵母細胞-卵丘細胞複合体を 7 日間培養したところ、GDF9 添加区では、複合体の平均直径と卵胞腔様構造の形成率は濃度依存的に増加した。一方、BMP15 添加区では、複合体の平均直径の濃度依存的な増加は認められず、卵胞腔様構造の形成率は無添加区と同等であった。

卵母細胞-卵丘細胞複合体の発育培養では、培養中のブタの卵母細胞から GDF9 と BMP15 が分泌されている可能性があり、GDF9 と BMP15 の作用をより明確にするため、卵母細胞除去-卵丘細胞複合体を用いて同様な培養実験を行なった。卵母細胞除去-卵丘細胞複合体を成長因子無添加で 7 日間培養すると、複合体はほとんど発達せず、卵胞腔様構造は形成されなかったことから、複合体の発達と卵胞腔様構造の形成には卵母細胞が必要であることが示唆された。また、BMP15 添加区では、複合体はわずかに発達したが、卵胞腔様構造の形成は起こらなかった。一方、GDF9 添加区では、濃度依存的に複合体の平均直径は増加し、卵胞腔様構造を形成する複合体の割合が増加したことから、卵胞腔様構造の形成には GDF9 が必要であることが示唆された。しかし、その作用は、卵母細胞が存在する場合に比べて弱いことが示され、GDF9 以外の卵母細胞由来の因子が関与している可能性が考えられた。

卵母細胞除去-卵丘細胞複合体を GDF9 100 ng/mL と種々の濃度の BMP15 を添加した発育培養液中で培養し、GDF9 と BMP15 併用による作用を検討した。GDF9 存在下では、BMP15 濃度依存的に複合体の平均直径は増加し、卵胞腔様構造の形成率も増加した。また、GDF9 と BMP15 併用区では、卵丘細胞間の距離が離れることが示された。壁顆粒膜細胞に

高レベルに発現していると考えられる *LHCGR* mRNA の発現を調べた。培養前の卵丘細胞では、*LHCGR* mRNA の発現レベルは低かったが、培養後、成長因子無添加区では発現レベルは上昇した。卵母細胞-卵丘細胞複合体および GDF9 添加培養液中で培養した卵母細胞除去-卵丘細胞複合体の卵丘細胞では、*LHCGR* mRNA の発現レベルは抑制された。これらの結果は、卵母細胞由来の GDF9 が、卵丘細胞の *LHCGR* mRNA の発現を抑制することを示唆している。

以上より、ブタの卵母細胞除去-卵丘細胞複合体による卵胞腔様構造の形成には、卵母細胞由来の GDF9 が必須であり、さらに、GDF9 は BMP15 と協働して、卵胞腔様構造の形成を促進すると考えられる。

第5章 総括

卵巣内で卵胞は、卵母細胞と、その周囲の顆粒膜細胞から構成される。卵胞の発達の過程で、卵母細胞は周囲の顆粒膜細胞と相互に作用し合い、同調して発育する。発達を開始した卵胞では顆粒膜細胞は増殖し、その後、顆粒膜細胞間に液で満たされた卵胞腔が形成される。胞状卵胞以降では、顆粒膜細胞は卵母細胞を取り囲む卵丘細胞と、卵胞の内壁を覆う壁顆粒膜細胞へと分化する。発育の過程で、卵母細胞は、減数分裂を再開する能力、次いで減数分裂を完了する能力を順次獲得する。動物が性周期を開始すると、下垂体から周期的に分泌される性腺刺激ホルモンのサージに反応して、卵丘は膨潤化し、卵母細胞は減数分裂を再開して第二減数分裂中期へと成熟する。

卵母細胞の発育過程を通して、卵母細胞と顆粒膜細胞／卵丘細胞との相互作用は、卵母細胞の成熟能力や受精能力、その後の胚発生能力の獲得に必要と考えられている。顆粒膜細胞／卵丘細胞からは、卵母細胞の発育を支持する物質や、減数分裂の再開を抑制する因子が卵母細胞へと輸送されると考えられる。一方、卵母細胞からは、transforming growth factor (TGF) - β スーパーファミリーに属する成長因子の growth differentiation factor 9 (GDF9) と bone morphogenetic protein 15 (BMP15) が分泌されることが、近年、示された。いくつかの哺乳類において、GDF9 と BMP15 は卵胞発達の初期から排卵に至るまで、卵母細胞で特異的に発現することが報告されている。また、体外培養系を用いて、GDF9 と BMP15 の影響も調べられつつある。

ブタの胞状卵胞内で、卵母細胞は、発育の最終段階で成熟する能力を獲得し、卵丘は性腺刺激ホルモンの反応して膨潤化できるように変化する。この間も、卵母細胞は周囲の卵丘細胞と相互に作用し合っていると考えられ、卵母細胞から分泌されると考えられる GDF9 と BMP15 は、この双方向性のコミュニケーションに参加している可能性がある。体外培養系を用いれば、卵母細胞の発育と成熟能力の獲得、あるいは卵丘細胞に及ぼす GDF9 と BMP15 の影響を明らかにすることができると考えられるが、これまで、これらの影響については、ほとんど調べられていない。また、発育培養液中で卵母細胞－顆粒膜細胞複合体

を培養すると、卵胞腔様構造が形成されることは報告されているが、この卵胞腔様構造の形成に及ぼす GDF9 と BMP15 の作用については、ウシでの報告があるにすぎない。

本研究では、直径 1.2~1.5 mm のブタの初期胞状卵胞から採取した発育途上の卵母細胞の発育および卵母細胞-卵丘細胞複合体の発達に及ぼす卵母細胞由来成長因子、GDF9 と BMP15 の影響を明らかにすることを目的とする。第 2 章では、直径 1.2~1.5 mm の初期胞状卵胞と直径 4.0~6.0 mm の胞状卵胞から採取した卵母細胞における GDF9 と BMP15 の mRNA の発現を調べ、その後、初期胞状卵胞から採取した卵母細胞-卵丘細胞複合体を種々の濃度の GDF9 または BMP15 を含む発育培養液中で培養し、卵母細胞の発育と複合体の発達に及ぼす GDF9 と BMP15 の影響を調べた。第 3 章では、第 2 章と同様の方法で培養した複合体を成熟培養し、卵母細胞の成熟能力の獲得に及ぼす GDF9 と BMP15 の影響を調べた。また、発育培養後の複合体から卵丘細胞を採取し、性腺刺激ホルモンに対する受容体、および性腺刺激ホルモン刺激から卵母細胞の成熟に至る過程を仲介する Epidermal Growth Factor (EGF) 受容体の mRNA の発現を比較した。第 4 章では、卵母細胞-卵丘細胞複合体を種々の濃度の GDF9 または BMP15 を含む発育培養液中で培養し、複合体による卵胞腔様構造の形成に及ぼす GDF9 と BMP15 の影響を調べた。

第 2 章では、まず、ブタ初期胞状卵胞から採取した、発育途上の卵母細胞における GDF9 と BMP15 の mRNA の発現を調べた。直径 1.2~1.5 mm の初期胞状卵胞と直径 4.0~6.0 mm の胞状卵胞から採取した卵母細胞、卵丘細胞、および壁顆粒膜細胞における *GDF9* と *BMP15* mRNA の発現を RT-PCR および qPCR で調べたところ、どちらの卵胞においても、*GDF9* と *BMP15* は卵母細胞で強く発現していた。また、どちらの卵胞の卵丘細胞と壁顆粒膜細胞にも *GDF9* mRNA の発現がわずかに認められたが、*BMP15* mRNA は検出されなかった。

次に、発育途上の卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞複合体を、0, 10, 50, および 100 ng/mL の濃度で GDF9 または BMP15 を添加した培養液中で 5 日間発育培養し、複合体の発達と卵母細胞の発育に及ぼす GDF9 と BMP15 の影響を調べた。培養期間を通して、ほ

とんどの複合体は、卵母細胞が卵丘細胞に完全に覆われた正常な形態を維持した。GDF9 添加区では、複合体の平均直径は濃度依存的に増加し、発育培養後、100 ng/mL 添加区では $349.9 \pm 9.0 \mu\text{m}$ (平均値±標準誤差) と、無添加区の $302.0 \pm 7.5 \mu\text{m}$ と比較して有意に高い値となった。一方、BMP15 添加区では、複合体の平均直径の濃度依存的な増加は認められなかった。また、いずれの区においても、10~30%の複合体は内部に卵胞腔様の構造を形成したが、各区間でその割合に差はなかった。

発育培養前に約 110 μm であった卵母細胞の平均直径は、発育培養後、すべての区で約 125 μm となり、体内で発育を完了した卵母細胞 (約 120 μm) と同等の大きさへと発育した。また、発育培養前に FC 期または SC 期であった卵母細胞の核相は、発育培養後には GV 期へと移行し、体内で発育を完了した卵母細胞と同様な核相となった。卵母細胞の発育および核相の変化のいずれにおいても、GDF9 または BMP15 添加区と無添加区との間に差は認められなかった。

これらの結果より、直径 1.2~1.5 mm のブタ初期胞状卵胞および直径 4.0~6.0 mm の胞状卵胞において、GDF9 と BMP15 は主に卵母細胞で発現することが示された。また、初期胞状卵胞から採取した発育途上の卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞複合体を、GDF9 または BMP15 を添加した培養液中で 5 日間発育培養すると、GDF9 と BMP15 は卵母細胞の発育に対しては直接影響を及ぼさないが、GDF9 は複合体の直径を増大させることが示された。

卵胞の発達過程で、卵母細胞由来の成長因子は、卵丘細胞を介して発育培養後の複合体中の卵母細胞の成熟能力の獲得に影響を及ぼす可能性がある。第 3 章では、GDF9 または BMP15 を添加した培養液中で発育したブタ卵母細胞-卵丘細胞複合体を成熟培養し、卵母細胞の減数分裂の再開と成熟に対する GDF9 および BMP15 の影響を検討した。

GDF9 または BMP15 を、0, 10, 50, および 100 ng/mL の濃度で添加した培養液中で、卵母細胞-卵丘細胞複合体を 5 日間発育培養し、その後、性腺刺激ホルモン (FSH と LH) の作用をあわせ持つヒト閉経期性腺刺激ホルモン (human menopausal gonadotrophin : hMG) を添加した培養液中で複合体を 44~48 時間成熟培養し、卵丘の膨潤化と卵母細胞

の成熟能力を調べた。成長因子無添加または GDF9 を添加した培養液中で発育培養した複合体では、成熟培養後、卵丘細胞間の結合が緩んだが、卵丘の膨潤化は起こらなかった。これに対して、高濃度の BMP15 (50 および 100 ng/mL) を添加した培養液中で発育培養した複合体では、体内で発育を完了した卵母細胞を含む複合体と同様な卵丘の膨潤化が誘起された。

成熟培養後の卵母細胞の核相を観察したところ、発育培養前の複合体では、卵母細胞は減数分裂を再開しないか、減数分裂を再開しても第二減数分裂中期へと成熟しなかった。これに対して、体内で発育を完了したほぼすべての卵母細胞は、第二減数分裂中期へと成熟した。GDF9 を添加した培養液中で発育培養した複合体では、いずれの濃度でも卵母細胞は第二減数分裂中期へとほとんど成熟せず (2~7%)、高濃度の GDF9 を添加した培養液中で発育培養した複合体では、GV 期に留まる卵母細胞の割合が増加した (50 ng/mL および 100 ng/mL とともに 74%)。一方、BMP15 を 50 および 100 ng/mL 添加した培養液中で発育培養した複合体では、49% および 61% の卵母細胞が第二減数分裂中期へと成熟した。これらの値は、成長因子無添加で発育培養した複合体における 16% と比較して有意に高かった。これらの結果から、発育培養期間中に高濃度の BMP15 が存在すると、その後の性腺刺激ホルモン刺激後の卵丘の膨潤化が促進され、卵母細胞が成熟したと考えられた。

次に、発育培養後の複合体を、上皮成長因子 (epidermal growth factor : EGF) を添加した培養液中で、または卵丘細胞を取り除いて裸化した卵母細胞を、44~48 時間培養して卵母細胞の減数分裂の再開と成熟に対する GDF9 と BMP15 の影響を調べた。EGF 添加による成熟誘起では、無添加区、GDF9 添加区、および BMP15 添加区で、約 50% の卵母細胞は卵核胞を崩壊させ、39~54% の卵母細胞は第二減数分裂中期へと成熟し、各区間で有意な差はなかった。また、卵丘細胞を取り除き、卵母細胞に自発的な成熟を誘起すると、無添加区および GDF9 添加区において、卵母細胞の 40% 以上が第二減数分裂中期へと成熟した。これらの割合は、BMP15 添加区と有意な差はなかった (70%)。これらの結果は、GDF9 および BMP15 添加の有無にかかわらず、体外で発育した卵母細胞は成熟する能力を獲得しており、また、卵母細胞-卵丘細胞複合体では、EGF 受容体以降の卵母細胞の成熟経路は完成していることを示唆している。

発育培養後の複合体から卵丘細胞を採取し、性腺刺激ホルモンの受容体である Follicle Stimulating Hormone Receptor (FSHR) と Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin Receptor (LHCGR), および Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) の mRNA の発現レベルを qPCR で調べた。FSHR および EGFR mRNA レベルは、無添加区、GDF9 添加区、および BMP15 添加区の間で差が認められなかった。一方、LHCGR mRNA レベルは、BMP15 添加区で有意に上昇した。

これらの結果より、ブタの初期胞状卵胞から採取した発育途上の卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞複合体を、GDF9 または BMP15 を添加した培養液中で 5 日間発育培養すると、卵母細胞が発育する間、BMP15 は卵丘細胞の LHCGR mRNA レベルを上昇させ、性腺刺激ホルモンの刺激による卵丘細胞の反応性を高めることによって、卵丘の膨潤化を促進し、その結果、卵母細胞の減数分裂の再開と成熟が引き起こされた可能性が考えられる。

第 2 章において、発育培養後の 10~30%の複合体において卵胞腔様構造が形成された。卵母細胞が卵胞腔の形成に関与することは、これまでいくつかの種において示唆されており、ブタの卵母細胞から分泌されると考えられる GDF9 と BMP15 は、卵胞の発達過程において、卵胞腔の形成に影響を及ぼす可能性がある。第 4 章では、GDF9 または BMP15 を添加した発育培養液中で、直径 1.2~1.5 mm の初期胞状卵胞から採取した発育途上のブタ卵母細胞を含む卵母細胞-卵丘細胞複合体、または複合体から卵母細胞を除去した卵母細胞除去-卵丘細胞複合体を 7 日間培養し、卵胞腔様構造の形成に対する GDF9 と BMP15 の影響を検討した。

GDF9 または BMP15 を添加した培養液中で、卵母細胞-卵丘細胞複合体を 7 日間培養したところ、GDF9 添加区では、複合体の平均直径と卵胞腔様構造の形成率は濃度依存的に増加した。一方、BMP15 添加区では、複合体の平均直径の濃度依存的な増加は認められず、卵胞腔様構造の形成率はいずれの区も無添加区と同等であった。

卵母細胞-卵丘細胞複合体の発育培養では、培養中のブタの卵母細胞から GDF9 と BMP15 が分泌されている可能性があり、GDF9 と BMP15 の作用をより明確にするため、卵母細胞除去-卵丘細胞複合体を用いて同様な培養実験を行った。卵母細胞除去-卵丘細胞

卵母細胞除去-卵丘細胞複合体を成長因子無添加で 7 日間培養すると、複合体はほとんど発達せず、卵胞腔様構造は形成されなかったことから、複合体の発達と卵胞腔様構造の形成には卵母細胞が必要であることが示唆された。また、BMP15 添加区では、複合体はわずかに発達したが、卵胞腔様構造の形成は起こらなかった。一方、GDF9 添加区では、濃度依存的に複合体の平均直径は増加し、卵胞腔様構造を形成する複合体の割合が増加したことから、卵胞腔様構造の形成には GDF9 が必要であることが示唆された。しかし、その作用は、卵母細胞が存在する場合に比べて弱いことが示され、GDF9 以外の卵母細胞由来の因子が関与している可能性が考えられた。

卵母細胞除去-卵丘細胞複合体を GDF9 100 ng/mL と種々の濃度の BMP15 を添加した発育培養液中で培養し、GDF9 と BMP15 併用による作用を検討した。GDF9 存在下では、BMP15 濃度依存的に複合体の平均直径は増加し、卵胞腔様構造の形成率も増加した。また、GDF9 と BMP15 併用区では、卵丘細胞間の距離が離れることが示された。壁顆粒膜細胞に高レベルに発現していると考えられる *LHCGR* mRNA の発現を調べた。培養前の卵丘細胞では、*LHCGR* mRNA の発現レベルは低かったが、培養後、成長因子無添加区では発現レベルは上昇した。卵母細胞-卵丘細胞複合体および GDF9 添加培養液中で培養した卵母細胞除去-卵丘細胞複合体の卵丘細胞では、*LHCGR* mRNA の発現レベルは抑制された。これらの結果は、卵母細胞由来の GDF9 が、卵丘細胞の *LHCGR* mRNA の発現を抑制することを示唆している。

これらの結果より、ブタの卵母細胞除去-卵丘細胞複合体による卵胞腔様構造の形成には、卵母細胞由来の GDF9 が必須であり、さらに、GDF9 は BMP15 と協働して、卵胞腔様構造の形成を促進すると考えられる。

初期胞状卵胞以降の発達段階の卵胞において、ブタの卵母細胞は GDF9 と BMP15 を合成、分泌し、GDF9 は卵丘細胞に作用して卵丘を発達させるとともに BMP15 と協働して卵胞腔の形成を促進し、一方、BMP15 は卵丘細胞に作用して性腺刺激ホルモンの刺激に反応して卵丘が膨潤化するよう変化させ、卵母細胞の成熟を促すと考えられる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、あたたかいご指導、ご助言ならびに本論文のご高閲をいただいた、神戸大学名誉教授 宮野 隆 博士に深甚なる謝意を表するとともに、終始ご指導、ご教示を賜った神戸大学農学研究科教授 原山 洋 博士、神戸大学農学研究科教授 万年 英之 博士、および神戸大学農学研究科 准教授 李 智博 博士に深く感謝致します。

実験材料を快く提供いただいた、神戸市食肉衛生検査所ならびに大阪食肉臓器の職員の方々に感謝の意を表する。

最後に、研究室におけるあらゆる面で多くのご協力をいただいた当研究室の各位に感謝するとともに、研究に理解を示し、専念できるよう協力してくれた家族に心から感謝する。

引用文献

- Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppä L, Louhio H, Tuuri T, Sjöberg J, Bützow R, Hovata O, Dale L, Ritvos O.** (1999) Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 2744–2750.
- Alam MH, Lee J, Miyano T.** (2018) GDF9 and BMP15 induce development of antrum-like structures by bovine granulosa cells without oocytes. *J Reprod Dev*, 64: 423–431.
- Amsterdam A, Koch Y, Lieberman ME, Lindner HR.** (1975) Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *J Cell Biol*, 67: 894–900.
- Baird DT, Fraser IS.** (1973) Disorders of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis. *Clin Endocrinol Metab*, 2: 469–488.
- Bezerra FTG, Lima FEO, Paulino LRFM, Silva BR, Silva AWB, Souza ALP, van den Hurk R, Silva JRV.** (2019) In vitro culture of secondary follicles and prematuration of cumulus–oocyte complexes from antral follicles increase the levels of maturation-related transcripts in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, 86: 1874–1886.
- Black JL, Erickson BH.** (1968) Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *Anat Rec*, 161: 45–55.
- Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL, Sawyer HR.** (1999) Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol Reprod*, 60: 381–386.
- Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ.** (1990a) Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod*, 43: 543–547.
- Buccione R, Vanderhyden BC, Caron PJ, Eppig JJ.** (1990b) FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Dev Biol*, 138: 16–25.
- Caixeta ES, Ripamonte P, Franco MM, Junior JB, Dode MAN.** (2009) Effect of follicle size on

mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reprod Fertil Dev*, 21: 655–664.

Cayo-Colca IS, Yamagami Y, Phan TC, Miyano T. (2011) A combination of FSH and dibutyryl cyclic AMP promote growth and acquisition of meiotic competence of oocytes from early porcine antral follicles. *Theriogenology*, 75: 1602–1612.

Channing CP, Bae IH, Stone SL, Anderson LD, Edelson S, Fowler SC. (1981) Porcine granulosa and cumulus cell properties. LH/hCG receptors, ability to secrete progesterone and ability to respond to LH. *Mol Cell Endocrinol*, 22: 359–370.

Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Matzuk MM. (1996) Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383: 531–535.

Dragovic RA, Ritter LJ, Schulz SJ, Amato F, Armstrong DT, Gilchrist RB. (2005) Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology*, 146: 2798–2806.

Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM. (1998) The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol*, 12: 1809–1817.

El-Hayek S, Yang Q, Abbassi L, FitzHarris G, Clarke HJ. (2018) Mammalian oocytes locally remodel follicular architecture to provide the foundation for germline-soma communication. *Curr Biol*, 28: 1124–1131.

Eppig JJ. (2001) Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122: 829–838.

Eppig JJ, O'Brien MJ. (1996) Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod*, 54: 197–207.

Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola F, Hirao Y. (1997) Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biol Reprod*, 56: 976–984.

Erickson BH. (1966) Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci*, 25:

800–805.

Fitzpatrick SL, Sindoni DM, Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler IJ, Frail DE. (1998) Expression of growth differentiation factor-9 messenger ribonucleic acid in ovarian and nonovarian rodent and human tissues. *Endocrinology*, 139: 2571–2578.

Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O. (2000) Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet*, 25: 279–283.

Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. (2008) Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*, 14: 159–177.

Gilchrist RB, Luciano AM, Richani D, Zeng HT, Wang X, De Vos M, Sugimura S, Smitz J, Richard FJ, Thompson JG. (2016) Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. *Reproduction*, 152: R143–157.

Gilchrist RB, Ritter LJ, Myllymaa S, Kaivo-Oja N, Dragovic RA, Hickey TE, Ritvos O, Mottershead DG. (2006) Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. *J Cell Sci*, 119: 3811–3821.

Goldenberg RL, Reiter EO, Vaitukaitis JL, Ross GT. (1972) Interaction of FSH and hCG on follicle development in the ovarian augmentation reaction. *Endocrinology*, 91: 533–536.

Gutiérrez CG, Campbell BK, Webb R. (1997) Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol Reprod*, 56: 608–616.

Hickey TE, Marrocco DL, Amato F, Ritter LJ, Norman RJ, Gilchrist RB, Armstrong DT. (2005) Androgens augment the mitogenic effects of oocyte-secreted factors and growth differentiation factor 9 on porcine granulosa cells. *Biol Reprod*, 73: 825–832.

Hikabe O, Hamazaki N, Nagamatsu G, Obata Y, Hirao Y, Hamada N, Shimamoto S, Imamura T, Nakashima K, Saitou M, Hayashi K. (2016) Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature*, 539: 299–303.

- Hirao Y.** (2011) Conditions affecting growth and developmental competence of mammalian oocytes in vitro. *Anim Sci J*, 82: 187–197.
- Hirao Y.** (2017) Recent advances in understanding the regulation of oogenesis and its recapitulation in vitro: mouse and bovine models. *J Mamm Ova Res*, 34: 23–29.
- 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.
- Hirao Y, Tsuji Y, Miyano T, Okano A, Miyake M, Kato S, Moor RM.** (1995) Association between p34^{cdc2} levels and meiotic arrest in pig oocytes during early growth. *Zygote*, 3: 325–332.
- Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh AJ, Hovatta O.** (2002) Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 316–321.
- Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB.** (2005) Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci*, 118: 5257–5268.
- Jaatinen R, Laitinen MP, Vuojolainen K, Aaltonen J, Louhio H, Heikinheimo K, Lehtonen E, Ritvos O.** (1999) Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B. *Mol Cell Endocrinol*, 156: 189–193.
- Kanayama N, Miyano T, Lee J.** (2002) Acquisition of meiotic competence in growing pig oocytes correlates with their ability to activate Cdc2 kinase and MAP kinase. *Zygote*, 10: 261–270.
- Kubo N, Cayo-Colca IS, Miyano T.** (2015) Effect of estradiol-17 β during in vitro growth culture on the growth, maturation, cumulus expansion and development of porcine oocytes from early antral follicles. *Anim Sci J*, 86: 251–259.
- Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM.** (1997) Follicle stimulating hormone is required for

ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet*, 15: 201–204.

Laitinen M, Vuojolainen K, Jaatinen R, Ketola I, Aaltonen J, Lehtonen E, Heikinheimo M, Ritvos O. (1998) A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mech Dev*, 78: 135–140.

Li C, Meng X, Liu S, Li W, Zhang X, Zhou J, Yao W, Dong C, Liu Z, Zhou J, Li J, Tao J, Wu W, Shen M, Liu H. (2020) Oocytes and hypoxanthine orchestrate the G2-M switch mechanism in ovarian granulosa cells. *Development*, 147: dev184838.

Lin ZL, Li YH, Xu YN, Wang QL, Namgoong S, Cui XS, Kim NH. (2014) Effects of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 on the in vitro maturation of porcine oocytes. *Reprod Domest Anim*, 49: 219–227.

Loosfelt H, Misrahi M, Atger M, Salesse R, Vu Hai-Luu Thi MT, Jolivet A, Guiochon-Mantel A, Sar S, Jallal B, Garnier J, Milgrom E. (1989) Cloning and Sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: variants lacking transmembrane domain. *Science*, 245: 525–528.

Louvet JP, Vaitukaitis JL. (1976) Induction of follicle-stimulating hormone (FSH) receptors in rat ovaries by estrogen priming. *Endocrinology*, 99: 758–764.

Lunenfeld B. (2004) Historical perspectives in gonadotrophin therapy. *Hum Reprod Update*, 10: 453–467.

Macaulay AD, Gilbert I, Scantland S, Fournier E, Ashkar F, Bastien A, Saadi HA, Gagné D, Sirard MA, Khandjian ÉW, Richard FJ, Hyttel P, Robert C. (2016) Cumulus cell transcripts transit to the bovine oocyte in preparation for maturation. *Biol Reprod*, 94: 1–11.

Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. (2002) Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science*, 296: 2178–2180.

McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ. (1995) Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol*, 9: 131–136.

McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome NP, Ritvos O, Laitinen MPE. (2005a) Bone

morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function. *Reproduction*, 129: 473–480.

McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome NP, Ritvos O, Laitinen MPE. (2005b) Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. *Reproduction*, 129: 481–487.

Meduri G, Vuhai-Luuthi MT, Jolivet A, Milgrom E. (1992) New functional zonation in the ovary as shown by immunohistochemistry of luteinizing hormone receptor. *Endocrinology*, 131: 366–373.

Motlik J, Fulka J. (1976) Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *J Exp Zool*, 198: 155–162.

Mottershead DG, Ritter LJ, Gilchrist RB. (2012) Signalling pathways mediating specific synergistic interactions between GDF9 and BMP15. *Mol Hum Reprod*, 18: 121–128.

Mottershead DG, Sugimura S, Al-Musawi SL, Li JJ, Richani D, White MA, Martin GA, Trotta AP, Ritter LJ, Shi J, Mueller TD, Harrison CA, Gilchrist RB. (2015) Cumulin, an oocyte-secreted heterodimer of the transforming growth factor- β family, is a potent activator of granulosa cells and improves oocyte quality. *J Biol Chem*, 290: 24007–24020.

Munakata Y, Kawahara-Miki R, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. (2017) Polyacrylamide gel as a culture substrate improves in vitro oocyte growth from porcine early antral follicles. *Mol Reprod Dev*, 84: 44–54.

Nagyova E, Nemcova L, Bujnakova Mlynarcikova A, Blaha M, Prochazka R, Scsukova S. (2017) Effect of bone morphogenetic protein-15 on gonadotropin-stimulated synthesis of hyaluronan and progesterone in porcine ovarian follicle. *J Physiol Pharmacol*, 68: 683–691.

Nilsson EE, Skinner MK. (2002) Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biol Reprod*, 67: 1018–1024.

Okazaki T, Nishibori M, Yamashita Y, Shimada M. (2003) LH reduces proliferative activity of cumulus cells and accelerates GVBD of porcine oocytes. *Mol Cell Endocrinol*, 209: 43–50.

- Orisaka M, Orisaka S, Jiang JY, Craig J, Wang Y, Kotsuji F, Tsang BK.** (2006) Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Mol Endocrinol*, 20: 2456–2468.
- Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S.** (2000) Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem*, 275: 39523–39528.
- Pangas SA, Matzuk MM.** (2005) The art and artifact of GDF9 activity: cumulus expansion and the cumulus expansion-enabling factor. *Biol Reprod*, 73: 582–585.
- Paradis F, Novak S, Murdoch GK, Dyck MK, Dixon WT, Foxcroft GR.** (2009) Temporal regulation of *BMP2*, *BMP6*, *BMP15*, *GDF9*, *BMPRIA*, *BMPR1B*, *BMPR2* and *TGFBR1* mRNA expression in the oocyte, granulosa and theca cells of developing preovulatory follicles in the pig. *Reproduction*, 138: 115–129.
- Peng XR, Hsueh AJ, LaPolt PS, Bjersing L, Ny T.** (1991) Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology*, 129: 3200–3207.
- Prochazka R, Blaha M, Nemcová L.** (2017) Significance of epidermal growth factor receptor signaling for acquisition of meiotic and developmental competence in mammalian oocytes. *Biol Reprod*, 97: 537–549.
- Prochazka R, Nemcova L, Nagyova E, Kanka J.** (2004) Expression of growth differentiation factor 9 messenger RNA in porcine growing and preovulatory ovarian follicles. *Biol Reprod*, 71: 1290–1295.
- Procházka R, Nemcová L, Scsuková S, Mlynarcíková A.** (2009) Development of functional LH receptors on pig cumulus-oocyte complexes cultured in vitro by a novel two-step culture system. *Mol Reprod Dev*, 76: 751–761.
- Procházka R, Srsen V, Nagyová E, Miyano T, Flechon JE.** (2000) Developmental regulation of effect of epidermal growth factor on porcine oocyte–cumulus cell complexes: nuclear maturation, expansion, and F-actin remodeling. *Mol Reprod Dev*, 56: 63–73.

- Qin Y, Tang T, Li W, Liu Z, Yang X, Shi X, Sun G, Liu X, Wang M, Liang X, Cong P, Mo D, Liu X, Chen Y, He Z.** (2019) Bone morphogenetic protein 15 knockdown inhibits porcine ovarian follicular development and ovulation. *Front Cell Dev Biol*, 7: 286.
- Rao MC, Midgley AR Jr, Richards JS.** (1978) Hormonal regulation of ovarian cellular proliferation. *Cell*, 14: 71–78.
- Richani D, Gilchrist RB.** (2018) The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Hum Reprod Update*, 24: 1–14.
- Richards JS.** (1994) Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev*, 15: 725–751.
- Salustri A, Ulisse S, Yanagishita M, Hascall VC.** (1990) Hyaluronic acid synthesis by mural granulosa cells and cumulus cells in vitro is selectively stimulated by a factor produced by oocytes and by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*, 265: 19517–19523.
- Sánchez F, Adriaenssens T, Romero S, Smitz J.** (2010) Different follicle-stimulating hormone exposure regimens during antral follicle growth alter gene expression in the cumulus–oocyte complex in mice. *Biol Reprod*, 83: 514–524.
- Shen X, Miyano T, Kato S.** (1998) Promotion of follicular antrum formation by pig oocytes in vitro. *Zygote*, 6: 47–54.
- Sidis Y, Fujiwara T, Leykin L, Isaacson K, Toth T, Schneyer AL.** (1998) Characterization of inhibin/activin subunit, activin receptor, and follistatin messenger ribonucleic acid in human and mouse oocytes: evidence for activin's paracrine signaling from granulosa cells to oocytes. *Biol Reprod*, 59: 807–812.
- Sudiman J, Sutton-McDowall ML, Ritter LJ, White MA, Mottershead DG, Thompson JG, Gilchrist RB.** (2014) Bone morphogenetic protein 15 in the pro-mature complex form enhances bovine oocyte developmental competence. *PLoS One*, 9: e103563.
- Sugiura K, Pendola FL, Eppig JJ.** (2005) Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Dev Biol*, 279: 20–30.

- Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG.** (2003) Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update*, 9: 35–48.
- Tasaki H, Iwata H, Sato D, Monji Y, Kuwayama T.** (2013) Estradiol has a major role in antrum formation of porcine preantral follicles cultured in vitro. *Theriogenology*, 79: 809–814.
- Vanderhyden BC, Caron PJ, Buccione R, Eppig JJ.** (1990) Developmental pattern of the secretion of cumulus expansion-enabling factor by mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation. *Dev Biol*, 140: 307–317.
- Vanderhyden BC, Cohen JN, Morley P.** (1993) Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology*, 133: 423–426.
- Vitt UA, Hayashi M, Klein C, Hsueh AJ.** (2000a) Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod*, 62: 370–377.
- Vitt UA, McGee EA, Hayashi M, Hsueh AJ.** (2000b) In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology*, 141: 3814–3820.
- Wang XL, Wang K, Zhao S, Wu Y, Gao H, Zeng SM.** (2013) Oocyte-secreted growth differentiation factor 9 inhibits BCL-2-interacting mediator of cell death-extra long expression in porcine cumulus cell. *Biol Reprod*, 89: 1–9.
- Yamamoto K, Otoi T, Koyama N, Horikita N, Tachikawa S, Miyano T.** (1999) Development to live young from bovine small oocytes after growth, maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology*, 52: 81–89.
- Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Parasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, Celeste AJ, Matzuk MM.** (2001) Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol*, 15: 854–866.
- Yoshino O, McMahon HE, Sharma S, Shimasaki S.** (2006) A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *Proc Natl Acad*

Sci USA, 103: 10678–10683.

Zhai B, Liu H, Li X, Dai L, Gao Y, Li C, Zhang L, Ding Y, Yu X, Zhang J. (2013) BMP15 prevents cumulus cell apoptosis through CCL2 and FBN1 in porcine ovaries. *Cell Physiol Biochem*, 32: 264–278.