

東京農業大学
学位論文

体外発育培養系を用いた
卵母細胞の質を制御する要因の解明

Investigation of the factors underlying oocyte development
using in vitro oocyte growth systems

2020年

農学研究科 畜産学専攻

宗像 祥久

指導教員 教授 岩田 尚孝

論文題目

体外発育培養系を用いた卵母細胞の質を制御する要因の解明

博士学位論文 目次

第一章	緒論	1
第二章	培養基質の性質がブタ未発育卵母細胞の体外発育に及ぼす影響	
	第一節 緒言	4
	第二節 材料および方法	7
	第三節 結果	13
	第四節 考察	19
第三章	顆粒膜細胞の数と卵母細胞内エネルギー含量の関係性の検証	
	第一節 緒言	21
	第二節 材料および方法	23
	第三節 結果	27
	第四節 考察	34
第四章	顆粒膜細胞数を決定している因子および分子メカニズムの解明	
	第一節 緒言	37
	第二節 材料および方法	39
	第三節 結果	44
	第四節 考察	53
第五章	総括	58
	Summary	61
	謝辞	65
	引用文献	66

第一章 緒論

生殖細胞は遺伝情報を継承し次世代の個体を作る唯一の細胞系列である。哺乳動物の生殖細胞は始原生殖細胞に始まり、増殖しながら生殖巣へ移動する。メスではこれらの始原生殖細胞は体細胞分裂により増殖し卵原細胞となる。その後、卵原細胞は胎児の卵巣中で中腎から供給されるレチノイン酸に応答して減数分裂を開始し、卵母細胞へと分化を開始する。卵母細胞は1層の扁平な顆粒膜細胞および莢膜細胞に取り囲まれ原始卵胞を形成する。この原始卵胞の一部は活性化され卵胞発育を開始する。活性化された原始卵胞は一次卵胞、二次卵胞と成長を続けるが、この過程において殆どの卵母細胞が卵胞の選抜によって退行してしまうため、実際に排卵まで至る卵母細胞はごく一部である。そして個体の性成熟後に一定の性周期にて受精可能な能力を持つ卵母細胞が排卵される (Tilly et al., 2009)。

現在、畜産分野において育種改良や優秀な個体の増産のために、発育した胞状卵胞由来の卵母細胞を回収し体外成熟、体外受精を経て得られた胚が用いられている。これまでウシやブタにおいて直径 3 mm 以上の発育した胞状卵胞由来の卵母細胞を利用する方法が確立され、一般的に用いられている。しかし卵巣内の発育が進んだ胞状卵胞の数は限りがあり、利用できる胞状卵胞由来の卵母細胞の数には限界がある。より未発育な卵胞由来の卵母細胞を利用することが可能となれば、体外受精へ利用できる卵母細胞の数は著しく増加し、より多くの優良な産仔を得ることや家畜の増産につながる。しかしながら、直径 3 mm 未満の卵胞由来卵母細胞では体外成熟培養による核成熟能力やその後の発生能力が極めて低いことが知られている (Yoon et al., 2000; Marchal et al., 2002; Kohata et al., 2013)。その為、これらの発育途中の卵胞由来の卵母細胞を利用す

るためには体外で発育培養を行うことが必要となる。

卵巣内の未発育な生殖細胞を体外で発育させ、発生能力を持つ卵母細胞を得るための研究はマウスで数多く進められ (Eppig and O'Brien, 1996; Morohaku et al., 2016)、現在では体外にて iPS 細胞を分化誘導して得られた卵母細胞から産仔を得られた報告もある (Hikabe et al., 2016)。これまでマウスを含めた哺乳動物の未発育卵母細胞の体外培養法としては主に 2 種類の方法が用いられて来た。これらは球状の卵胞構造を維持するためにコラーゲンやアルギン酸マトリックスに包埋する方法もしくは、卵母細胞-顆粒膜細胞複合体 (Oocyte-Granulosa cell Complexes: OGCs) または卵胞膜細胞を含めた卵胞構造を培養基質上に接着させる方法である (Hirao, 2012)。一方、ウシやブタなどの大型哺乳動物ではマウスに比べ卵母細胞の発育に時間を要するため、マウスにて確立された体外培養系を大型哺乳動物へ用いることは難しい。ウシの未発育な卵母細胞を体外にて培養し産仔を得た報告はある (Yamamoto et al., 1999; Hirao et al., 2004) が、発育効率は著しく低い。この報告では、基質接着に加え、培養培地に高分子化合物のポリビニルピロリドン (PVP) を添加する方法を用いている。PVP の培地への添加は OGCs の卵母細胞と顆粒膜細胞間の結合の維持しドーム状の形態の維持に影響を及ぼす (Hirao et al., 2004)。ブタにおいても PVP を添加した培地を用いることで初期胞状卵胞由来の卵母細胞を体外で発育させることが可能となっている (Tasaki et al., 2013; Itami et al., 2015; Yamochi et al., 2017)。しかしながら、これら体外培養法にて得られた卵母細胞の核成熟能力や発生能力は体内で発育したものと比べて著しく低く、効率の良い体外培養方法は未だ確立されていない。

卵胞は発育に伴い卵胞内部に、血液成分由来と顆粒膜細胞由来の分泌物を含んだ卵胞液に満たされた腔を形成する。この卵胞液にはグルコースなどのエネ

ルギー基質やホルモン、成長因子など卵母細胞や顆粒膜細胞へ影響を及ぼす因子が多く含まれている (Rodgers and Irving-Rodgers, 2010)。体内では、腔を形成した初期胞状卵胞から 2 週間ほど発育した胞状卵胞では顆粒膜細胞が数千から数百万へと著しく増殖する (Oi et al., 2015)。筆者らは顆粒膜細胞において卵胞発育に伴い遺伝子発現プロファイルにどのような変化が見られるかを RNA-seq 法にて検討したところ、解糖系関連遺伝子の発現が増加し、HIF1a がこれらの遺伝子群を制御している上流因子として予測された (Munakata et al., 2016)。通常酸素濃度の環境において HIF1a はユビキチンプロテアソーム系による分解または転写抑制を受ける。つまり卵胞発育に伴う HIF1a の下流の解糖系関連遺伝子群の発現上昇は卵胞内が低酸素状態にあることが前提条件である事を示唆している。さらに筆者らは低酸素環境が VEGF 発現を亢進し AKT-mTOR-S6RP シグナル経路を活性化させ、顆粒膜細胞の増殖を促している可能性を示した (Shiratsuki et al., 2016)。一方、体内で発育した胞状卵胞に比べ体外にて発育した卵母細胞周囲の顆粒膜細胞数は著しく少ない (Oi et al., 2015)。顆粒膜細胞は卵母細胞と物質交換を行い、この相互作用は卵母細胞の発育に重要な因子の一つである。これまで顆粒膜細胞の数に着目し卵母細胞の能力を評価した研究は未だ無く、体外で発育した卵母細胞の発生能力が低い原因は卵母細胞周囲の顆粒膜細胞数が少ないことである可能性がある。

本研究ではブタの卵母細胞を用いて初期胞状卵胞由来卵母細胞の体外発育環境の構築を行った。これに併せて高い胚発生能力を持つ卵母細胞と関係性が高い因子について詳細に検討を行い、発育中の卵母細胞の能力を決定する因子の同定を試みた。さらにそれらの因子の中から卵母細胞を取り巻く顆粒膜細胞と卵胞液に着目し、RNA-seq 法を用いて顆粒膜細胞の網羅的トランスクリプトーム解析を行い、顆粒膜細胞の性状を決定している制御因子について検討した。

第二章 培養基質の性質がブタ未発育卵母細胞の体外発育に及ぼす影響

第一節 緒言

哺乳動物の卵巣内には様々な発育段階の卵胞が存在し、また数多くの未発育な卵母細胞が存在する。このような未発育な卵母細胞を利用するためには、体外において受精・発生能力を持つ成熟した卵母細胞まで発育させる必要がある。現在の大型哺乳動物の未発育な卵母細胞を体外で培養する方法としては、卵母細胞-顆粒膜細胞複合体 (oocyte-granulosa cell complexes; OGCs) の3次元構造の維持を助けるために PVP のようなポリマーを、ホルモンなどを含む培養培地と組み合わせて用いる方法が一般的となっている (Hirao, 2012)。しかし体外で発育させた卵母細胞の質は体内で発育したものと比べて未だ劣っている。

未発育卵母細胞の体外発育培養において顆粒膜細胞の増殖および OGCs の腔構造の形成を発育の指標として用いることができる (Tasaki et al. 2012)。また初期胞状卵胞由来 OGCs の顆粒膜細胞数は 14 日間の体外培養の後、およそ 20 倍増加する (約 8,000 個から約 160,000 個)。一方、体内で発育した直径 3-6 mm の胞状卵胞には約 100 万個の顆粒膜細胞が存在する (Oi et al., 2015)。この結果より、体外発育した卵母細胞が低質である原因として、顆粒膜細胞数が少ないことが可能性として考えられる。

卵母細胞の発育にはパラクラインおよびオートクライン因子やギャップ結合を介した物質の輸送など、顆粒膜細胞との間の複雑な相互作用が重要である (Gu et al., 2015)。さらに卵母細胞は解糖活性が低いため、ATP の効率的な産生には卵母細胞周囲の顆粒膜細胞のグルコースの取り込みや利用、それらの卵母細胞への供給が必要である (Leese and Barton, 1984)。さらに発育に伴い卵母

細胞には mRNA、タンパク質および脂質の蓄積が起こり、クロマチンの形態およびアセチル化やメチル化などのヒストン修飾も変化する。これらのいくつかは卵母細胞の発育段階や発生能力と関連していることが報告されている。ヒトの卵母細胞の ATP 含量はその後の胚発生および着床と密接に関係している (Van Blerkom et al., 1995)。また、発育に伴い蓄積した脂質は核成熟およびその後の胚発生にて重要なエネルギー源となる (Ferguson and Leese, 2006; Sturmey et al., 2006; Jeong et al., 2009; Niu et al., 2015)。さらに卵母細胞においてヒストンのアセチル化レベルは発育に伴い増加し (Kageyama et al., 2007)、発育が完了した卵核胞期のブタ卵母細胞では高レベルの H4K12 および H3K4 のアセチル化を示す (Endo et al., 2005)。発育した卵母細胞においてヒストンの高アセチル化の意義は不明であるが、ATP および脂質含量と共に卵母細胞の発育の指標として用いることができると考えられる。

現在の未発育卵母細胞の体外培養系の環境は、培養プレートのウェル内の限られたスペースや培養プレートに用いられている基質など、様々な要素が生体内の卵胞の環境と大きく異なっている。卵母細胞の体外培養では一般的にプラスチックのような硬い培養プレートが用いられているが、一方で生体内の OGCs の発育環境は細胞外マトリックスと接着した状態であり、生体内の環境と著しく異なっている。卵巣内のマトリックスに類似する環境を構築することで、体外発育培養系を改善することが可能となり体外発育で得られた卵母細胞の能力が向上する可能性がある。

基質の硬さを変化させることができる材料として、ポリアクリルアミドゲル (PAG) が細胞培養実験系において用いられてきた。PAG は体内の様々な組織の剛性に合わせて調整が可能で安価な基質である (Syed et al., 2015)。PAG を基質に用いた研究として、ラットの膀胱上皮細胞や腎臓上皮細胞、マウス 3T3 線

維芽細胞の増殖や機能の変化に影響を及ぼすという報告がある (Pelham and Wang, 1997; Naujok et al., 2014)。また、幹細胞においても柔らかいマトリックスがインテグリンを介したシグナル伝達をブロックし、遺伝子発現を変化させ分化を制御する (Lv et al., 2015)。そこで未発育卵母細胞の体外発育培養系において PAG を基質に用いる事で、周囲の顆粒膜細胞の増殖が促進され、さらに卵母細胞へのエネルギー供給が増加する事により体外発育培養で得られた卵母細胞の能力が向上するのではないかと仮説を立てた。

本章ではブタ卵巣の初期胞状卵胞より採取した OGCs を PAG 上で体外発育培養を行った。発育過程での OGCs の腔形成率、発育終了後に顆粒膜細胞の細胞数および生存率、卵母細胞の直径、ATP 含量、脂質含量、およびヒストンのアセチル化レベルを指標に、PAG がブタ未発育卵母細胞の体外発育培養に及ぼす影響について検討した。また体外発育培養で得られた卵母細胞の胚発生能力についても評価した。

第二節 材料および方法

1) 試薬

以下、特に記述のない試薬および培地はナカライテスク (Kyoto, Japan) の製品を用いた。

2) 供試卵巣

神奈川食肉センターにて入手した未経産ブタ卵巣を供試した。入手したブタ卵巣は抗抗生物質を添加した PBS (+) 中に 37 °C で保存し、1 時間以内に実験室に持ち帰った。持ち帰った卵巣は 37 °C に温めた PBS (-) にて数回洗浄後、滅菌ペーパータオルを用いて血液および PBS を除去した。

3) 初期胞状卵胞由来 OGCs の採取

卵子吸引採取後の卵巣表層をメス (替刃メス No11 ; ケイセイ科工業株式会社) とピンセットを用いて薄切後、卵巣切片は MEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に 26 mM NaHCO₃、5 mM タウリン、5 mM マンニトール、0.68 mM L-グルタミン、0.1 % BSA (Fraction-V) および抗生物質をそれぞれ添加した培地 (以下、切り出し培地) 中に集めた。実体顕微鏡下にて接眼マイクロメーターを用いて、直径 500~700 μm の初期胞状卵胞からそれぞれ注射針 (18 G×11/2; TERUMO) を取り付けた 1 ml シリンジ (TERUMO) と精密ピンセットを用いて OGCs を取り出し、パスツールピペットにて流動パラフィンオイルで覆った切り出し培地のドロップ (10 μl) 中に回収した。

4) OGCs の体外発育培養

発育培地は α -MEM (Sigma-Aldrich) を基礎培地とし、2 % PVP (分子量 36 万; Sigma-Aldrich)、26 mM NaHCO₃、10 mM タウリン、0.3 % BSA (Fraction-V)、1 μ g/ml 17 β -Estradiole、0.1 mAU/ml FSH (Kawasaki Mitaka, Tokyo, Japan)、2 mM ヒポキサンチン (Sigma-Aldrich)、Insulin-Transferrin-Selenium \times 100 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) および抗生物質をそれぞれ添加した (以下、発育培地)。96 ウェルプレート (Falcon; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) に発育培地をそれぞれのウェルに 200 μ l ずつ加え、採取した OGCs を中央に静置し、38.5 $^{\circ}$ C、5 % CO₂、95 % 空気の気相条件で 14 日間培養した。培養期間中は腔形成の観察を 2 日毎に行い、半量の培地交換を 4 日毎に行った。

5) 卵母細胞の体外成熟培養、活性化処理および体外発生培養

成熟培地には NCSU23 を用い、ブタ卵胞液 (pFF) を添加した (10 %、v/v)。体外発育培養後、腔を形成した OGCs のみを選別し、成熟培地にて 3 回洗浄した。成熟培地中にて注射針を取り付けた 1 ml シリンジおよび精密ピンセットを用いて、余分な顆粒膜細胞を取り除いた 卵子卵丘細胞複合体 (Cumulus cells-Oocyte Complexes; COCs) を取り出し 44 時間の体外成熟培養を行った。直径 60 mm のシャーレ (150288; NUNK, Roskilde, Denmark) 中に作成した流動パラフィンオイルで覆った成熟培地のドロップ内 (COCs / 10 μ l) で培養した。培養開始 20 時間は 1 mM dibutyryl-cAMP (dbcAMP; Sigma-Aldrich) およびホルモン (eCG 10IU; ASKA Pharma Co. Ltd, Tokyo, Japan, hCG 10IU; Fuji Pharma Co. Ltd, Tokyo, Japan) 添加修正 NCSU23 にて、38.5 $^{\circ}$ C、5 % CO₂、95 % 空気および湿度飽和状態の気相条件下で培養した。その後、COCs を修正 NCSU23 で 3 回洗浄し、dbcAMP およびホルモン非添加の修正 NCSU23 に移し、24 時間同

様の条件下で培養した。

pFF は直径 3 mm 以上の卵胞から吸引採取後、20 分間遠心分離 (10,000 ×g, 4 °C) し、上澄みを 0.2 μm 滅菌フィルターを用いてろ過後、実験直前まで 20 °C で保存した。

体外成熟後、活性化処理を行った。成熟培養後の卵母細胞を PZM-3 へ移し、ピペティング裸化した。裸化した卵母細胞をそれぞれ 10 μg/ml イオノマイシンを添加した PZM-3 中で 5 分間静置した。その後、PZM-3 で 3 回洗浄し、10 μg/ml サイトカラシン B および 10 μg/ml シクロヘキシミドを添加した PZM-3 に移し、38.5 °C、5 % CO₂、95 % 空気および湿度飽和状態の気相条件下で 6 時間培養した。活性化処理後の卵母細胞を PZM-3 で 3 回洗浄し、PZM-3 で作成した 15 μl ドロップに 10 個ずつ入れ、38.5 °C、5 % O₂、5 % CO₂、90 % N₂ および湿度飽和状態の気相条件下で 8 日間培養し胚盤胞期胚まで発生させた。

6) ポリアクリルアミドゲル (PAG) の作製

ポリアクリルアミドゲルは 0.3 % または 0.1 % N,N'-methylenebisacrylamide、10 % acrylamide に 10 % Ammonium Peroxodisulfate (APS; 1:167 volume)、N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED; Wako; 1:250 volume) を添加し SDS-PAGE 用ゲルと同様の方法で厚さ 1 mm のゲルを作製した (Morris SA et al., 2012)。作製した PAG は PBS (-) にて数回洗浄して PBS (-) 中で一晩置いた。その後 96 ウェルマイクロプレートに敷き、それぞれ発育培地で 3 回洗浄した後に実験に用いた。実験に用いる際は直前に培地の交換を行った。

7) 卵母細胞の直径測定

体外発育培養終了後、パスツールピペットを用いて卵丘細胞および顆粒膜細

胞を剥離して裸化卵母細胞を得た。上面を流動パラフィンオイルで覆った切り出し用培地のドロップ (10 μ l) に卵母細胞を 1 個ずつ移した後、デジタル顕微鏡 (BZ-8000; KEYENCE, Osaka, Japan) を用い、卵母細胞の直径を測定した。

8) 体外発育培養後の OGCs の顆粒膜細胞数の測定

14 日間培養後、顆粒膜細胞と卵母細胞をパスツールピペットを用いて分離した。分離した顆粒膜細胞は Accumax (Innovative Cell Technologies, Inc., San Diego, CA, USA) を用いて分散させ、細胞混濁液を作製した。顆粒膜細胞数は混濁液をトーマ氏血球計算盤上に展開し、細胞数をカウントして算出した。

9) 卵母細胞内 ATP 含量の測定

体外発育培養終了後、パスツールピペットを用いて卵丘細胞および顆粒層細胞を剥離して裸化卵母細胞を得た。その後、超純水 50 μ l を入れた PCR チューブ内に裸化卵母細胞を一つずつサンプリングし、測定まで -20°C で保存した。測定時に融解してタイプテストチューブに移し、ルシフェラーゼを 50 μ l 加えた。1 分間振盪後 10 分間静置し、ルミノメーターにて ATP 含量を測定した。得られた蛍光強度は 1×10^{-7} - 1×10^{-12} M の希釈配列を作成したスタンダードカーブを用いて pM に換算した。

10) 卵母細胞内脂質含量の測定

卵母細胞の脂質含量は既報と同様の方法で Nile red にて染色して測定した (Stuemey et al., 2006)。体外発育培養終了後、パスツールピペットを用いて卵丘細胞および顆粒層細胞を剥離して裸化卵母細胞を得た。その後、卵母細胞を Nile red (10 $\mu\text{g/ml}$) を含む 0.2 % ポリビニルアルコール-PBS (PVA-PBS) にて

10 分間処理した。PVA-PBS にて 3 回洗浄した後に卵母細胞をスライドガラスの上に ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と共にマウントした。蛍光デジタル顕微鏡 (BZ-8000) で観察し、蛍光写真を撮影した。その後、蛍光輝度は ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて測定した。

11) 体外成熟卵母細胞の固定および染色

成熟培養終了後、卵母細胞の核成熟率を測定した。パスツールピペットを用いて卵母細胞を裸化した後マウント標本を作製し、ドライゾール酢酸 (3:1, v/v) に 1 週間浸漬した。そして、2 %アセトオルセイン染色液で 1 時間染色し、アセトグリセロール (3:1:1, v/v) を用いて脱色し、マニキュアでカバーガラスを固定させて顕微鏡下で核相の観察を行った。

12) 胚盤胞期胚の観察

体外発生培養終了後、胚盤胞期胚への発生率および細胞数を測定した。得られた胚盤胞期胚は 4 % パラホルムアルデヒドで固定した。その後、0.2 % PVA-PBS にて 3 回洗浄した後、25 μ g/ml Hoechst33342 (Sigma-Aldrich) を含む PVA-PBS にて 30 分間染色した。染色後、PVA-PBS で 3 回洗浄しスライドガラス上にマウントした。マウントの際、ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen) と共にマウントした。観察は蛍光顕微鏡で行った。

13) 免疫染色を用いた H4K12 のアセチル化の検出

体外発育培養終了後、卵母細胞をパスツールで裸化し、4 % パラホルムアルデヒドに 4 °C 下で一晩浸漬し固定した。固定後、卵母細胞を 0.2 % PVA-PBS で

3 回洗浄し、0.25 % TritonX-100 (Sigma-Aldrich) を含む 0.2 % PVA-PBS で 30 分間透過処理した。その後、0.2 % PVA-PBS で 3 回洗浄し、ブロッキング処理 (5 % BSA, 1 % Tween20, 5 % ヤギ血清-0.2 % PVA-PBS) を 1 時間行った。ブロッキング処理後、一次抗体処理を遮光して一晩行った。一次抗体はウサギポリクローナル抗アセチル化ヒストン H4K12 抗体を用いた (1:200; Millipore, Milford, MA, USA)。一次抗体処理後、卵母細胞を 0.2 % PVA-PBS で 9 回洗浄し、二次抗体と遮光下で 1 時間処理した。二次抗体は Anti-rabbit IgG Fab2 Alexa Fluor(R) 555 Molecular Probes (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) を 1:500 の濃度で用いた。二次抗体処理後、卵母細胞を 0.2 % PVA-PBS で 9 回洗浄し、スライドガラス上にマウントした。マウントの際、ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen) と共にマウントした。蛍光デジタル顕微鏡 (BZ-8000) で観察し、蛍光写真を撮影した。その後、蛍光輝度は ImageJ (National Institutes of Health) を用いて測定した。

14) 統計解析

3 試験区間から得られたデータは分散分析後、Tukey's HSD test を行い比較した。2 群間のデータは Student's t-test を用いて比較した。腔形成率、成熟率および胚発生率についてはアークサイン変換後に検定に用いた。これらの比較では P 値が 0.05 未満を有意差ありとした。

第三節 結果

腔の形成は OGCs の発育の指標として用いることができる。体外発育培養最終日における腔形成率は PAG の有無に変わらず、有意な差は見られなかった (Figure 1A)。しかし培養 4、6、および 8 日目において without PAG 区 (PAG 無し) と比べ、0.1 % および 0.3 % PAG 区における腔形成率は有意に高い結果となった (Figure 1A)。また、OGCs の形態が PAG の有無によって異なり、PAG 上で発育した OGCs は球形を維持したのに対し、PAG 無しで発育した OGCs ではドーム状の形態を示した (Figure 1B-E)。

0.1 % および 0.3 % PAG 上で発育した OGCs の顆粒膜細胞数は、PAG 無しで発育した OGCs と比べて有意に多い結果となった (Table 1)。さらに 0.1% および 0.3 % PAG 上で発育した卵母細胞は PAG 無しで培養したものに比べて、直径が有意に増大した (Table 1)。一方で、体外成熟培養後に減数第二分裂中期まで達した卵母細胞の核成熟率については、試験区間で有意な差が見られなかった (Table 1)。

PAG 上で発育した卵母細胞の胚発生能力を評価するため、より卵母細胞の直径が大きく顆粒膜細胞数が多かった 0.3 % PAG 区と PAG 無しの 2 区間で、単為発生活性化処理の後得られた胚盤胞期胚への発生率を比較した。PAG 無しで発育した卵母細胞に比べ 0.3 % PAG 上で発育した卵母細胞では、発生した胚盤胞期胚の割合は高い値を示した (Table 2)。また 0.3 % PAG で発育した卵母細胞は PAG 無しで発育したものに比べて、ATP (Figure 2A) および脂質含量 (Figure 2B) が有意に高い値となった。さらに 0.3 % PAG 上で発育した卵母細胞では、H4K12 のアセチル化レベルが有意に高い結果となった (Figure 3A)。

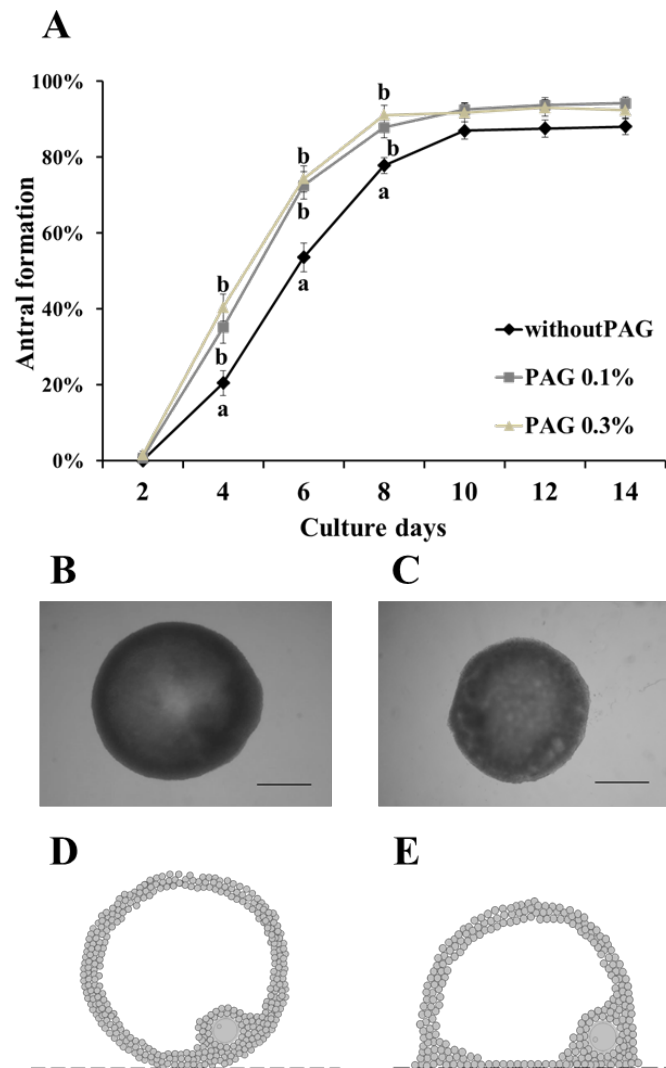


Figure 1. PAG 有りおよび無しで体外発育培養された OGCs の腔形成

培養基質として PAG の有無が体外発育培養された OGCs の腔形成に与える影響について検討した。A: 14 日間の培養期間中に腔が形成された OGCs の割合。B-E: 0.3 % PAG 上で培養された OGCs (B) および PAG 無しで培養された OGCs (C) の画像を示す。又、これらの OGCs 断面の概略図 (0.3 % PAG:D, PAG 無し:E) を示す。OGCs の形態は 0.1 % PAG と 0.3 % PAG では同様であった。スケールバーは 500 μm を示す。

Munakata et al., 2017. *Mol Reprod Dev.* **84**:44-54

Table 1. PAGが体外発育OGCsの顆粒膜細胞数、卵母細胞の直径および核成熟率に及ぼす影響

Group	No. of OGCs	No. of AF 1)	No. of GCs	Oocyte diameter (μm)	No. of AF 2)	Rate of MII (%)
Without PAG	170	81	162,813 \pm 7,142 a	111.8 \pm 0.9 a	63	41.1 \pm 6.0
PAG 0.1%	168	80	233,438 \pm 14,107 b	114.8 \pm 0.8 b	70	44.4 \pm 5.0
PAG 0.3%	155	70	246,000 \pm 15,475 b	116.1 \pm 0.8 b	71	45.8 \pm 3.5

卵母細胞-顆粒膜細胞複合体(OGCs)はPAG(0.1%および0.3%)上、又はPAG無しで14日間の体外発育培養を行った。1) 顆粒膜細胞(GCs)の数および卵母細胞の直径の評価には8回実験を繰り返した。2) 核成熟率の評価には7回実験を繰り返した。異符号間に有意差有り。a-b: $P < 0.01$ 。AF: 胞状卵胞

Munakata et al., 2017. *Mol Reprod Dev.* **84**:44-54

Table 2. PAGが体外発育卵母細胞の発生能力に及ぼす影響

Groups	No. of OGCs	No. of trials	No. of oocytes examined*	No. of blastocysts	Rate of blastulation (Day 8, %)	Total cells number
Without PAG	105	7	81	2	2.5 ± 1.6a	39.0 ± 0.0
PAG 0.3%	110	7	86	8	8.9 ± 1.8b	45.8 ± 5.0

卵母細胞-顆粒膜細胞複合体（OGCs）はPAG（0.1%および0.3%）上、又はPAG無しで14日間の体発育培養を行った。その後、卵母細胞は体外成熟培養、活性化処理、体外発生培養に供した。異符号間に有意差有り。a-b: P < 0.05。

*: 体外発育終了後、腔を形成したOGCsのみを体外成熟培養に供した。

Munakata et al., 2017. *Mol Reprod Dev.* **84**:44-54

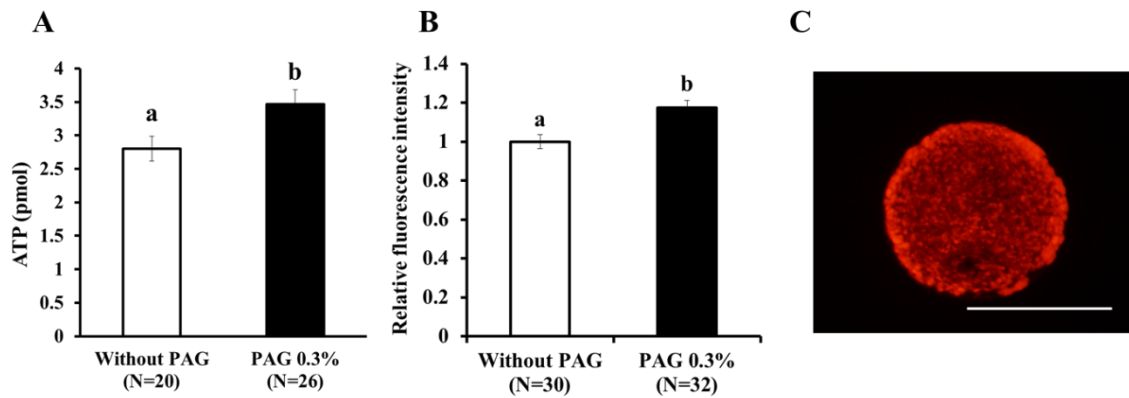


Figure 2. PAG が体外発育卵母細胞の ATP および脂質含量に与える影響

A-B: PAG の有無で体外発育させた卵母細胞の ATP (A) および脂質 (B) 含量を比較した。OGCs は 14 日間培養され、培養終了後 ATP および脂質含量を測定した。脂質含量は卵母細胞の Nile red の蛍光輝度を測定し、PAG 無し区に対する相対値を算出して比較した。 **C:** Nile red 染色された卵母細胞。スケールバーは 100 μm を示す。

Munakata et al., 2017. *Mol Reprod Dev.* **84**:44-54

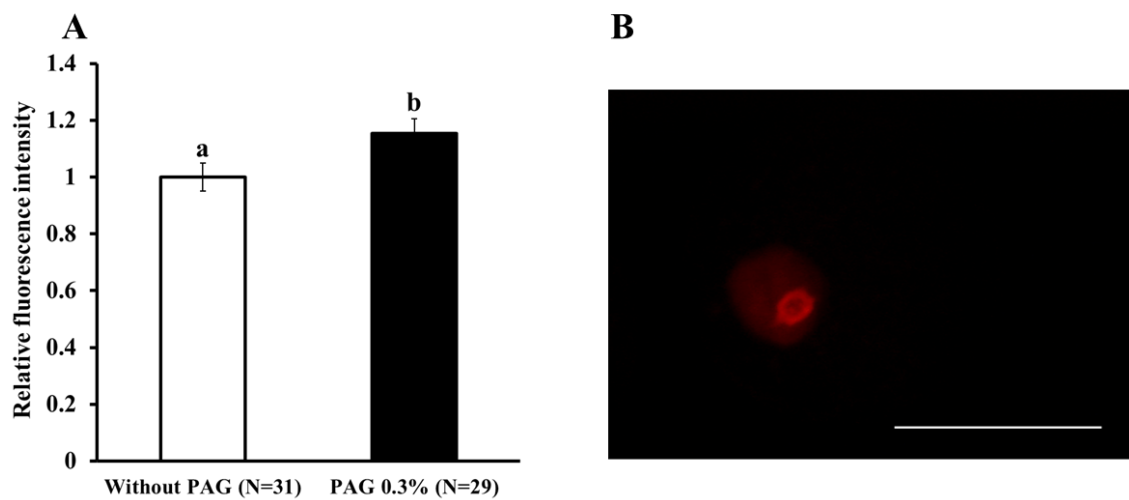


Figure 3. PAG が体外発育卵母細胞の H4K12 アセチル化レベルに与える影響

A: PAG の有無で体外発育させた卵母細胞の H4K12 アセチル化レベルを免疫蛍光染色により比較した。**B:** アセチル化 H4K12 は卵母細胞の卵核胞内に観察された。スケールバーは 100 μm を示す。

Munakata et al., 2017. *Mol Reprod Dev.* **84**:44-54

第四節 考察

本章では PAG を培養基質に用いた新規の体外発育培養系を開発し、この培養系が OGCs の発育に及ぼす影響について検討した。

これまで初期胞状卵胞由来の OGCs の体外培養においては、プラスチックのような硬い基質が一般的に用いられてきた (Hirao, 2004; Tasaki et al., 2013; Oi et al., 2015; Itami et al., 2016)。硬い基質上で発育した OGCs は顆粒膜細胞の増殖とともにドーム状の腔構造を形成する。この腔形成は卵母細胞の発育の指標として用いることができる (Tasaki et al. 2013)。PAG 上で発育した OGCs は球状の構造を形成し、培養 14 日目において卵母細胞周囲の顆粒膜細胞数がより多い結果となった。これは PAG の硬さを顆粒膜細胞が感知し、機械的シグナリングによって増殖能が向上した可能性がある。もしくは PAG が持つタンパク質の低吸着性により顆粒膜細胞の増殖を促した可能性も考えられる。

PAG を用いた培養系ではプラスチック上で発育した卵母細胞に比べ、高い ATP および脂質含量を持つ卵母細胞を得ることができた。卵母細胞は発育中に活発な転写と翻訳を行うため、その為のエネルギーを必要とする。容易に利用できるエネルギー源は ATP である。卵母細胞の核成熟中においては脂質が β 酸化によって代謝され ATP を得る (Elis et al., 2015)。卵母細胞は核成熟中に脂質の利用を可能とするため、発育過程に脂質を脂肪滴という形で蓄積する (Silva et al., 2011)。さらに卵母細胞の脂質含量はその後の胚発生率を反映するマーカーであり (Jeong et al., 2009)、ブタ卵母細胞からの脂質の除去はその後の胚発生率を低下させる (Niu et al., 2015)。このように卵母細胞内のエネルギーは重要であるが、卵母細胞内における脂質蓄積の分子メカニズムは不明である。

さらに PAG 上で発育した卵母細胞の H4K12 アセチル化レベルは、プラスチックシャーレ上で発育した卵母細胞に比べて高い値を示した。卵母細胞のヒストン H4 のアセチル化は発育に伴い上昇することが知られている (Kageyama et al., 2007; Tasaki et al., 2015)。そのため、卵母細胞のヒストンアセチル化レベルは卵母細胞の発育レベルのマーカーとして用いることができる可能性がある。又、OGCs の培養開始時に顆粒膜細胞を人為的に追加することで総細胞数を増加させた培養系では、卵母細胞内の ATP および脂質含量、H4K12 のアセチル化レベルを増加させる (Sugiyama et al., 2016)。これは今回の PAG を用いた培養系で発育した OGCs の顆粒膜細胞数の増加や卵母細胞の能力が向上した事と同様の結果である。しかしながら顆粒膜細胞数と卵母細胞の能力に直接的な関係性があるのかどうかは、本実験から明らかにならなかった。そこで第三章では、より詳細な顆粒膜細胞数と卵母細胞の能力の関係性について検証した。

第三章 顆粒膜細胞の数と卵母細胞内エネルギー含量の関係性の検証

第一節 緒言

前章より、PAG を培養基質に用いた体外発育培養系は、発育した OGCs の顆粒膜細胞数を増加させ、卵母細胞内の ATP および脂質含量、H4K12 のアセチル化レベルを向上させること、その後の胚発生能力を改善できることが示された。一方で、顆粒膜細胞数の増加と卵母細胞の能力向上の詳細な関係性は不明であり、その検証を行うことは卵母細胞の質を制御している要因の同定のために必須である。

ブタ卵巣内に存在する初期胞状卵胞内の顆粒膜細胞数はおよそ 8,000 個であり、卵胞の発育に伴い細胞数が爆発的に増加する (Oi et al., 2015)。卵母細胞は解糖系に関与する酵素活性が低いため (Leese and Barton, 1984)、周囲の細胞がグルコースを取り込みその代謝物を卵母細胞へ供給することは卵母細胞のエネルギー確保に重要である。一方で、卵母細胞を取り囲む卵丘細胞および顆粒膜細胞の数は卵胞や個体間で大きくばらついていることが考えられるが、卵胞内の顆粒膜細胞の数や卵丘細胞の数が卵母細胞のエネルギー状態とどのような関係にあるのかについて詳細な解析を行っている研究は数少ない。

卵母細胞内のエネルギー状態について、卵母細胞の成熟やその後の胚発生に関連しているマーカーはいくつか報告されている。卵母細胞周囲の卵丘細胞の量で卵母細胞を分類すると、細胞の層が厚い卵母細胞は ATP 含量が高く、胚盤胞期胚への発生率も高い値を示すことが報告されている (Stojkovic et al., 2001)。またヒトにおいても卵母細胞内の ATP 含量はその後の胚発生および着

床と密接に関係しているという報告もある (Van Blerkom et al., 1995)。さらに卵母細胞内の脂質は核成熟および初期胚の発生におけるエネルギー源として重要であり (Ferguson and Leese 2006; Sturmey et al., 2006; Jeong et al., 2009; Niu et al., 2015)、脂質を ATP へ変換する為の β 酸化の抑制又は活性化は卵子の能力を低下もしくは向上させることが知られている (Ferguson and Leese 2006; Sturmey et al., 2006; Dunning et al., 2010; Dunning et al., 2014)。卵母細胞のヒストンのアセチル化レベルは卵胞の発育に伴って上昇することが知られており、(Kageyama et al., 2007) 発育したブタ卵母細胞では H4K12 および H3K4 のアセチル化レベルが高いことが報告されている (Endo et al., 2005)。そのため、卵母細胞のヒストンのアセチル化レベルは卵母細胞内のエネルギー充足度に影響を受ける可能性が考えられる。体細胞においてタンパク質のアセチル化は、グルコースおよび脂質代謝産物であるアセチル CoA の利用状態および細胞内のエネルギー状態と密接に関係することが報告されている (Morrish et al., 2010; Shi and Tu 2015)。また、培地中のグルコースが、細胞での脂質合成や H4K16 のアセチル化に用いられていることが報告されている (Morrish et al., 2010)。これらの報告から、卵母細胞のエネルギー状態は卵母細胞周囲の顆粒膜細胞の数に依存しており、卵母細胞内のエネルギー状態がヒストンのアセチル化レベルに反映しているのではないかと仮説を立てた。

本章では、ブタ卵巣内の発育した胞状卵胞における顆粒膜細胞の数、卵丘細胞の数、卵母細胞の脂質含量の関係性について検討を行い、体内発育卵母細胞を用いて仮説を検証した。さらに体外発育させた卵母細胞を用いて、卵母細胞を取り囲む顆粒膜細胞数、OGCs のグルコース消費量、卵母細胞の脂質含量、ATP 含量、H4K12 のアセチル化レベル間の関係性を検証した。

第二節 材料および方法

1) 試薬

以下、特に記述のない試薬および培地はナカライテスクの製品を用いた。

2) 供試卵巢

第二章第二節と同様の方法で供試した。

3) 初期胞状卵胞由来 OGCs の採取

第二章第二節と同様の方法で採取した。

4) OGCs の体外発育培養

第二章第二節と同様の方法で培養を行った。

5) 胞状卵胞由来の卵丘細胞-卵母細胞複合体 (COCs) の採取、卵胞あたりの顆粒膜細胞数および卵母細胞あたりの卵丘細胞数の測定

個体ごとに卵巢表面の胞状卵胞（直径 3-5 mm）の数を数えながら注射針（21 G×5/8）を取り付けたシリンジで吸引採取を行った。吸引採取した卵胞液内容物から COCs を回収し、残りの卵胞液を 7000 rpm で 1 分間遠心分離して顆粒膜細胞を得た。得られた顆粒膜細胞は Accumax（Innovative Cell Technologies, inc.）にて懸濁しピペッティングにて良く攪拌し PBS にて希釈した。顆粒膜細胞数はトーマ氏血球計算盤を用いて細胞数を測定し、卵胞あたりの顆粒膜細胞数を算出した。さらに回収した COCs は 0.1 %ヒアルロニダーゼを添加した 0.5 ml の PBS 内でボルテックスし、裸化卵母細胞と卵丘細胞混濁液を得た。そし

て卵母細胞あたりの卵丘細胞数を算出し、裸化卵母細胞は Nile red 染色へ供した (Figure 4)。

8) 体外発育培養後の OGCs の顆粒膜細胞数の測定

OGCs 個々の顆粒膜細胞数は第二章第二節と同様の方法で測定した。

9) 卵母細胞内 ATP 含量の測定

体外発育卵母細胞の ATP 含量は第二章第二節と同様の方法で測定した。得られたデータは個々の OGCs における顆粒膜細胞数との関係性について検討した。

10) 卵母細胞内脂質含量の測定

体内発育および体外発育卵母細胞の脂質含量は第二章第二節と同様に測定した。体内発育卵母細胞の脂質含量は個体ごとの平均脂質含量を算出し、卵胞あたりの顆粒膜細胞数および卵母細胞あたりの卵丘細胞数との関係性について検討した。体外発育卵母細胞は脂質含量を個々に算出し、周囲の顆粒膜細胞数と比較して関係性を検証した。

12) 免疫染色を用いた H4K12 のアセチル化の検出

第二章第二節と同様の方法で測定した。得られたデータは個々の OGCs の顆粒膜細胞数と対応させ関係性について検討した。

13) 培養培地中のグルコース濃度の測定

培地内のグルコース濃度は Glucose assay kit (LabAssay Glucose; Wako Pure

Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いて、説明書に従い測定した。

OGCs のグルコース消費量は培養 13 日目および 14 日目の培地中グルコース濃度から算出した。

14) 統計解析

各検討項目における相関係数は SPSS (Version 17.0, Chicago, IL, USA) を用いて求めた。2 グループ間の卵母細胞の脂質含量の比較は Student's t-test を用いて検定を行った。P 値は 0.05 未満を有意差ありとした。

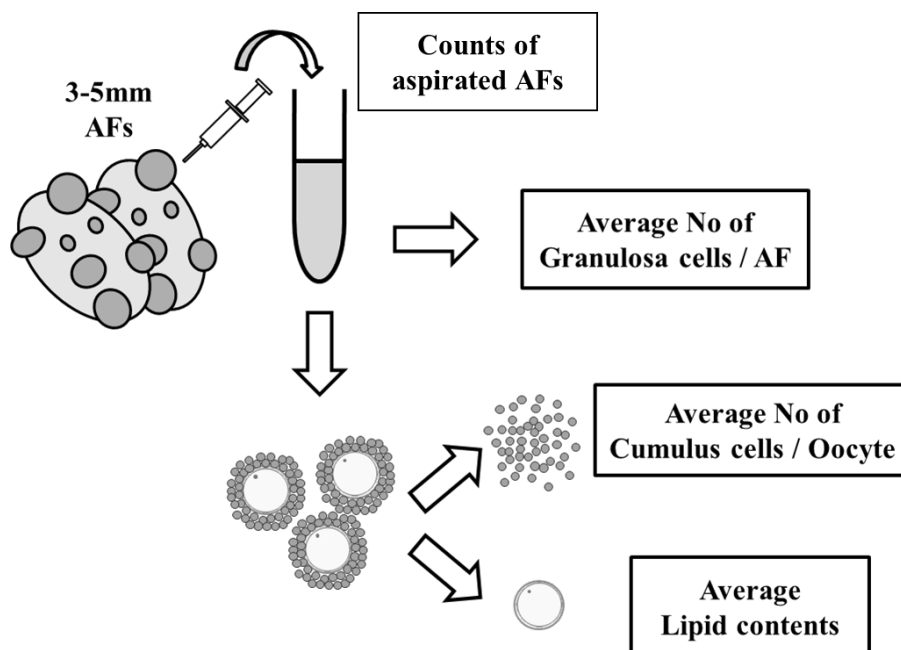


Figure 4. 個体ごとの卵母細胞の脂質含量と顆粒膜細胞数および卵丘細胞数の比較の概略図

COCs を卵巢表面の AFs (直径 3-5 mm) から、AFs の数を数えながら吸引採取した。卵母細胞は周囲の卵丘細胞から裸化处理した。そして、AF あたりの顆粒膜細胞数および卵母細胞あたりの卵丘細胞数を測定した。個体別に採取された卵母細胞を Nile red 染色に供し、個体ごとの平均脂質含量を求めた。

Munakata et al., 2016. *Theriogenology*. **86**:1789-1798.

doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.05.036.

第三節 結果

まず初めに個体ごとの平均脂質含量の評価を行うために、同一個体卵巣から回収した 20 個の COCs を無作為に選び 10 個ずつの 2 グループに分け平均脂質含量を比較したところ、同一個体間の 2 グループ間に有意な相関関係が見られた (Figure 5B; $N=13$, $R^2 = 0.38$, $P < 0.05$)。この結果より、10 個の卵母細胞を用いることで同一個体の卵母細胞内の平均脂質含量を反映できることを明らかにした。

次に 21 個体の卵巣を用いて、卵母細胞の平均脂質含量、卵胞あたりの平均顆粒膜細胞数および平均卵丘細胞数を測定し比較したところ、個体ごとの平均顆粒膜細胞数は平均卵丘細胞数と有意な正の相関が見られた (Figure 6A; $R^2=0.79$, $P<0.01$)。さらに卵母細胞の平均脂質含量は平均顆粒膜細胞数 (Figure 6B; $N=21$, $R^2 = 0.79$, $P < 0.01$) および平均卵丘細胞数 (Figure 6C; $N=21$, $R^2 = 0.29$, $P < 0.05$) の両方と有意な正の相関が見られた。

さらに体外発育した個々の OGCs において、卵母細胞の ATP 含量、脂質含量、H4K12 アセチル化レベルと周囲の顆粒膜細胞数および OGCs のグルコース消費量の関係性について検討した (Figure 7)。卵母細胞の脂質含量と周囲の顆粒膜細胞数 (Figure 8A; $N=32$, $R^2 = 0.28$, $P < 0.01$) およびグルコース消費量 (Figure 8B; $N=12$, $R^2 = 0.53$, $P < 0.01$) の間に有意な正の相関があった。また卵母細胞の ATP 含量と周囲の顆粒膜細胞数 (Figure 9A; $N=33$, $R^2 = 0.17$, $P < 0.05$) およびグルコース消費量 (Figure 9B; $N=33$, $R^2 = 0.13$, $P < 0.05$) の間に有意な正の相関が見られた。さらに卵母細胞の H4K12 アセチル化レベルと周囲の顆粒膜細胞数 (Figure 10A; $N=34$, $R^2 = 0.18$, $P < 0.05$) およびグルコース消費量 (Figure 10B; $N=34$, $R^2 = 0.34$, $P < 0.01$) の間に有意な正の相関が見られた。

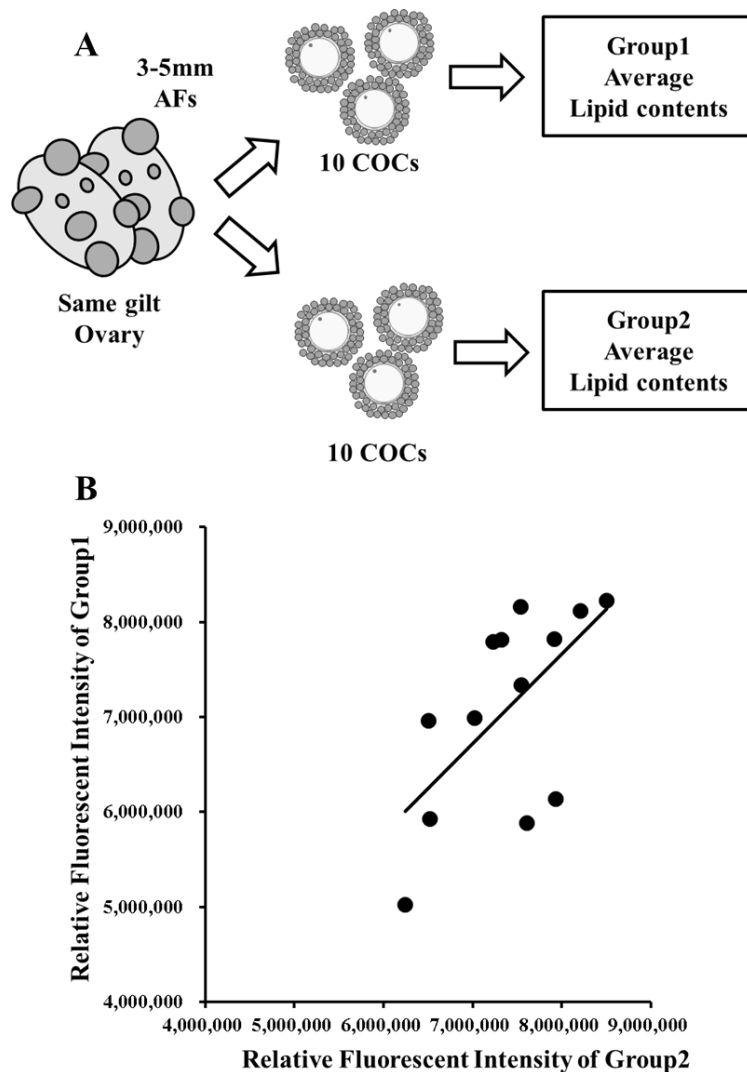


Figure 5. 同一個体内における卵母細胞の脂質含量の比較

A: COCs は個体ごとに卵巣表面の AFs（直径 3-5 mm）から採取した。採取された COCs から無作為に 20 個選び、裸化処理を行った。同一個体の卵母細胞を 10 個ずつの 2 グループに分け、Nile red 染色に供した。そしてそれぞれのグループの平均脂質含量を比較した。B: 同一個体から採取した 10 個の卵母細胞の平均脂質量はもう片方の 10 個の平均脂質量と有意に相関した (N=13, $R^2 = 0.38$, $P < 0.05$)。

Munakata et al., 2016. *Theriogenology*. **86**:1789-1798.

doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.05.036.

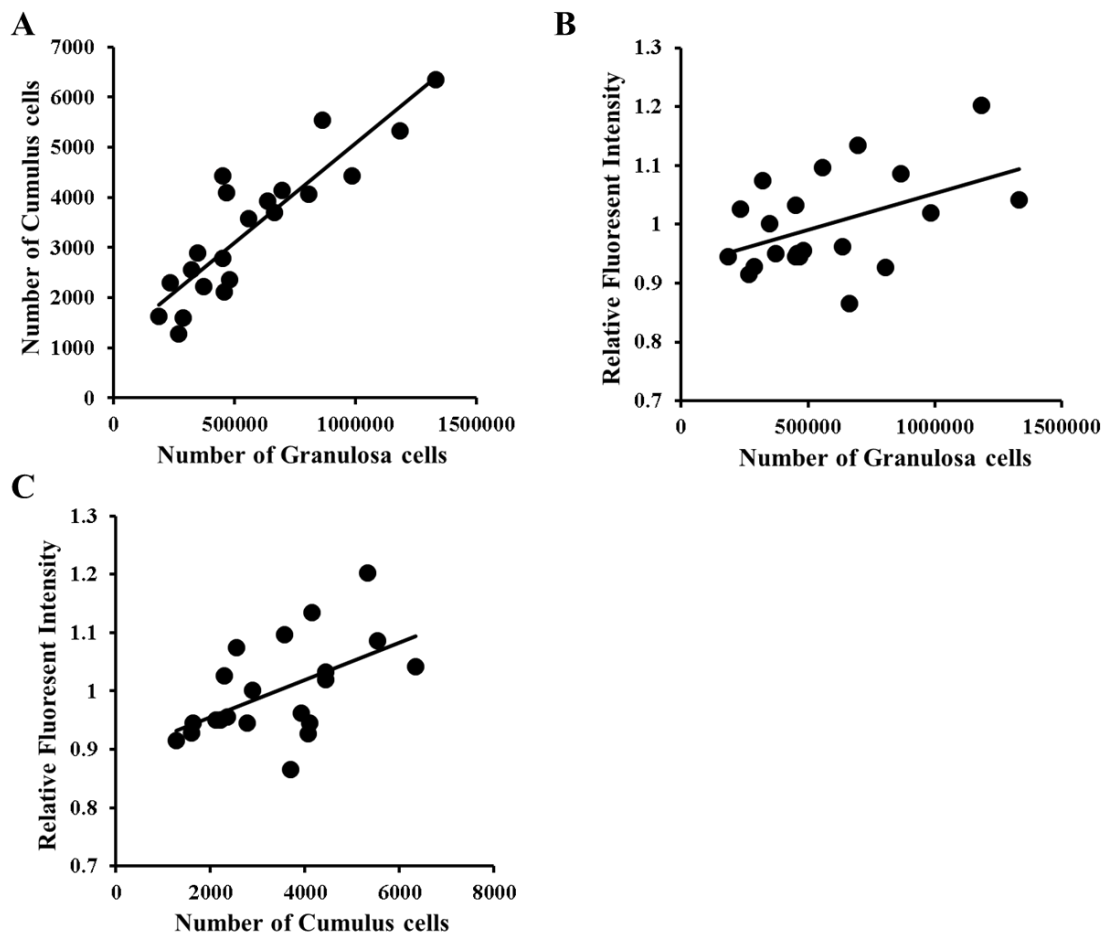


Figure 6. 顆粒膜細胞数、卵丘細胞数、および卵母細胞の脂質含量の関係性

A: AF あたりの平均顆粒膜細胞数と卵母細胞あたりの平均卵丘細胞数の相関 ($N=21$, $R^2 = 0.79$, $P < 0.01$)。 **B:** AF あたりの平均顆粒膜細胞数と卵母細胞の脂質含量の相関 ($N=21$, $R^2 = 0.21$, $P < 0.05$)。 **C:** 卵母細胞あたりの平均卵丘細胞数と卵母細胞の脂質含量の相関 ($N=21$, $R^2 = 0.29$, $P < 0.05$)。

Munakata et al., 2016. *Theriogenology*. **86**:1789-1798.

doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.05.036.

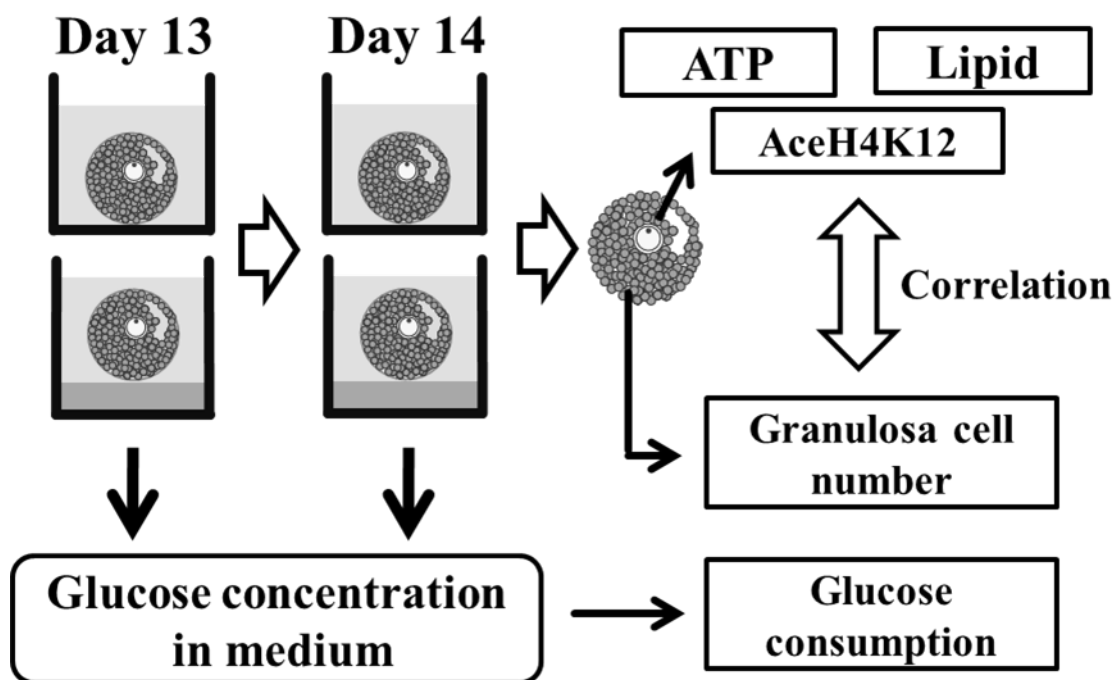


Figure 7. 卵母細胞のエネルギー状態と顆粒膜細胞数および OGCs のグルコース消費量との比較のための概略図

初期胞状卵胞由来の OGCs を 14 日間、個別培養した。培養終了後、卵母細胞を脂質および ATP 含量、H4K12 アセチル化レベルの測定に供した。またそれぞれの OGCs の顆粒層細胞数およびグルコース消費量を測定した。

Munakata et al., 2016. *Theriogenology*. **86**:1789-1798.

doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.05.036.

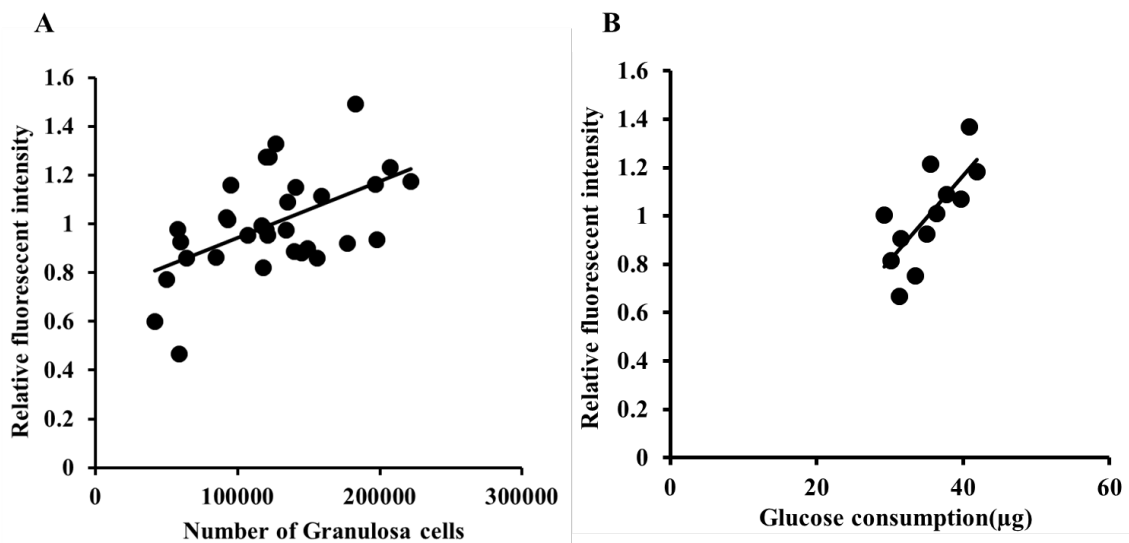


Figure 8. 体外発育した卵母細胞の脂質含量と顆粒膜細胞数およびグルコース消費量との関係性

A: 体外発育した卵母細胞の脂質含量と顆粒膜細胞数は有意に正に相関した ($N=32$, $R^2 = 0.28$, $P < 0.01$)。 **B:** 体外発育した卵母細胞の脂質含量と OGC のグルコース消費量は有意に正に相関した ($N=12$, $R^2 = 0.53$, $P < 0.01$)。脂質含量は卵母細胞の Nile red の蛍光輝度を測定し、平均値を 1.0 として相対値を算出した。

Munakata et al., 2016. *Theriogenology*. **86**:1789-1798.

doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.05.036.

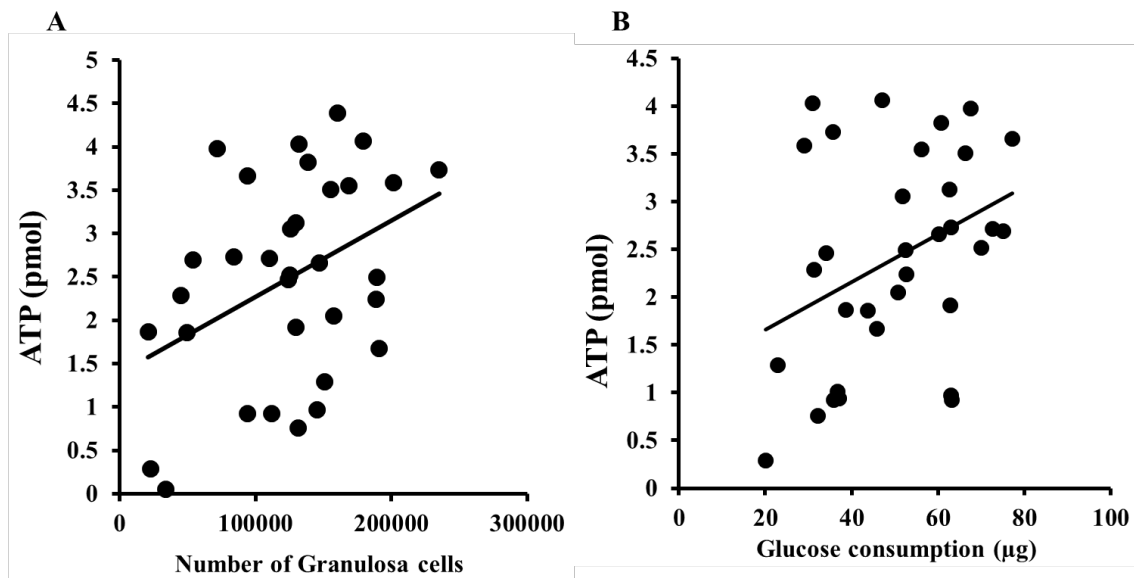


Figure 9. 体外発育した卵母細胞の ATP 含量と顆粒膜細胞数およびグルコース消費量との関係性

A: 体外発育した卵母細胞の ATP 含量と顆粒膜細胞数は有意に正に相関した (N=33, $R^2 = 0.17$, $P < 0.05$)。 **B:** 体外発育した卵母細胞の ATP 含量と OGC のグルコース消費量は有意に正に相関した (N=33, $R^2 = 0.13$, $P < 0.05$)。

Munakata et al., 2016. *Theriogenology*. **86**:1789-1798.

doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.05.036.

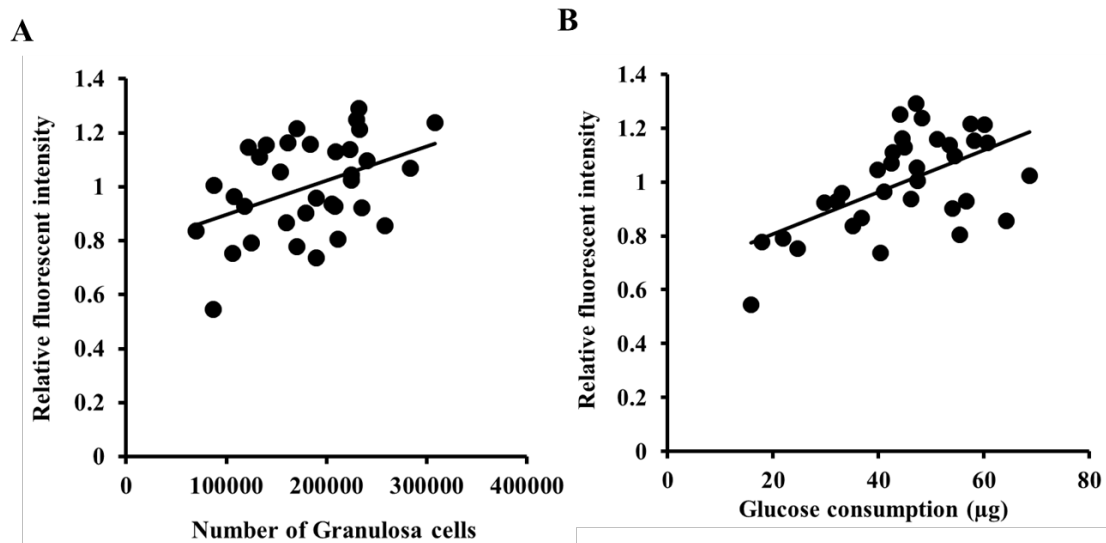


Figure 10. 体外発育した卵母細胞の H4K12 のアセチル化レベルと顆粒膜細胞数およびグルコース消費量との関係性

A: 体外発育した卵母細胞の H4K12 のアセチル化レベルと顆粒膜細胞数は有意に正に相関した ($N=34$, $R^2 = 0.18$, $P < 0.05$)。 **B:** 体外発育した卵母細胞の H4K12 のアセチル化レベルと OGCs のグルコース消費量は有意に正に相関した ($N=34$, $R^2 = 0.34$, $P < 0.01$)。 H4K12 アセチル化レベルは卵母細胞の蛍光輝度を測定し、平均値を 1.0 として相対値を算出した。

Munakata et al., 2016. *Theriogenology*. **86**:1789-1798.

doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.05.036.

第四節 考察

前章より、PAG を用いた体外培養系を用いて発育した OGCs の顆粒膜細胞数が増加した事で卵母細胞内のエネルギー状態が向上した可能性が示された。そこで本章では、より詳細に卵母細胞周囲の顆粒膜細胞数と卵母細胞内のエネルギー状態の関係性について検討した。その結果、体内発育した卵母細胞の脂質含量が卵母細胞周囲の顆粒膜細胞数および卵丘細胞数と相関している事が示された。さらに体外発育においても卵母細胞内の脂質および ATP 含量、また H4K12 アセチル化レベルと顆粒膜細胞数の間に正の相関がある事を明らかにした。

卵母細胞内の脂質は発育に伴い脂肪滴という形で蓄積され (Silva et al., 2011)、その後の核成熟や胚発生でのエネルギー源として重要であることが知られている (Elis et al., 2015; Jeong et al., 2009)。同一個体から回収した卵母細胞内脂質含量には大きなばらつきが見られたが、同一個体内での 10 個の卵母細胞内の平均脂質含量は 2 グループ間で同様であった。さらに卵胞あたりの顆粒膜細胞数および卵丘細胞数には密接な関係性があり、興味深いことに発育段階が同じ卵胞サイズであるにも関わらず個体間で違いが見られた。一般的に卵丘細胞の層が厚い卵母細胞は胚発生能力が高く、質が良いと考えられている。体内発育において、卵母細胞の平均脂質含量が多い個体では卵胞あたりの顆粒膜細胞数および卵丘細胞数が多く、密接な関係性があることが示された (Figure 6A-C)。顆粒膜細胞は解糖活性が高いことが知られており、主にグルコースを取り込み代謝する。また卵母細胞では解糖活性が低いため、主にピルビン酸などの代謝物を取り込み酸化的リン酸化によってエネルギーの産生を行う。顆粒膜細胞は代謝物を卵母細胞へ提供するため、卵母細胞周囲の細胞数が卵母細胞

内のエネルギー充足度を決定していると考えられる。しかし、その検証を行うには屠畜場由来の卵巣は不適切である。卵巣が保存されている間、卵胞内は酸素およびエネルギー源を欠く虚血条件下にあるため卵胞液中の代謝物に変化を及ぼす (Iwata et al., 2005; Sakamoto et al., 2006)。その結果、卵母細胞内の ATP 含量に負の影響を及ぼし、顆粒膜細胞数と卵母細胞のエネルギー含量の正確な関係性を測定できない可能性が考えられる。そこで体外発育培養系を用いて卵母細胞周囲の顆粒膜細胞数と卵母細胞内のエネルギー状態、さらにはグルコース消費量との関係性について検討した。

体外発育した卵母細胞周囲の顆粒膜細胞数および OGCs のグルコース消費量は卵母細胞内の ATP 含量、脂質含量、および H4K12 アセチル化レベルとの密接な相関が示された。卵母細胞では周囲の顆粒膜細胞から供給された代謝物を用いてミトコンドリアが ATP を産生していることが知られている (Gu et al., 2015)。従って、周囲の顆粒膜細胞数が多い卵母細胞は ATP 産生のために周囲の細胞からより多くのエネルギー基質を入手している可能性を示唆している。一方で卵母細胞内の脂質蓄積のための分子メカニズムは明らかになっていないが、貯蔵と利用の巧妙なバランスにより制御されていると考えられる。本章では体内発育および体外発育卵母細胞共に、卵母細胞周囲の顆粒膜細胞数と卵母細胞内の脂質含量に正の相関があることが示された。この結果は、卵母細胞自身の脂質新規合成によるものなのか、周囲の顆粒膜細胞からの脂肪酸の取り込みによるものなのかは不明である。ブタの卵母細胞および顆粒膜細胞の遺伝子発現解析において、脂質の合成および酸化に関する遺伝子のほとんどが卵母細胞および顆粒膜細胞の両方で発現が確認されている (Munakata et al., 2016: PRJDB4551)。このことから卵母細胞自身の脂質の合成、ならびに周囲の顆粒膜細胞からの脂肪酸の供給の両方の可能性が考えられるが、さらなる解析が必

要である。

卵母細胞においてヒストンのアセチル化はクロマチンの凝集に伴い増加することが知られている (Bui et al., 2007; Franciosi et al., 2012)。ヒト、ウシおよびブタ発育後期の卵核胞期の卵母細胞において H4K12 アセチル化レベルが高いことが観察されている (Kageyama et al., 2007; Racedo et al., 2009; Van den Berg et al., 2011)。また細胞内のエネルギーの充足は高い ATP 産生だけではなくタンパク質のアセチル化をもたらす (Morrish et al., 2010; Ghanta et al., 2013)。さらに培地中のグルコースがピルビン酸へ代謝され、ミトコンドリアによってアセチル CoA に変換された後、ヒストンを含めたタンパク質のアセチル化に用いられる報告もある (Morrish et al., 2010)。さらに HCT116 細胞において、タンパク質のアセチル化とアセチル CoA レベルはリンクしていると報告されている

(Wellen et al., 2009)。これらの結果は、卵母細胞内のエネルギー状態がクロマチン構造だけではなく卵母細胞のエピジェネティックなヒストン修飾に影響している可能性を示唆している。しかしながら卵母細胞の発育に伴う H4K12 アセチル化の生物学的な意義については未だ明らかになっておらず、検討する必要がある。

本章では卵胞内の顆粒膜細胞数が個体ごとに異なり、顆粒膜細胞の数が卵母細胞内のエネルギー状態と関係性がある事を明らかにした。次章では個体ごとに異なる顆粒膜細胞数を制御している因子として卵胞液に着目し、卵母細胞および顆粒膜細胞への支持能力について検討する。

第四章 顆粒膜細胞数を決定している因子および分子メカニズムの解明

第一節 緒言

前章において卵胞内の顆粒膜細胞数は個体ごとに異なる事、また卵母細胞周囲の顆粒膜細胞数と卵母細胞内のエネルギー含量は正に相関していることが示された。卵胞発育は顆粒膜細胞の爆発的な増殖を伴う。顆粒膜細胞はギャップ結合を介して卵母細胞へ代謝産物およびエネルギーを供給し、卵母細胞の発育を支えている (Clarke, 2017)。また、発育に伴い卵母細胞内に蓄積された ATP や脂質含量はその後の発生能力を反映している (Tamassia et al., 2004; De La Fuente, 2006; Nagano et al., 2006; Bui et al., 2007; Jeong et al., 2009; Manosalva and González, 2009; Niu et al., 2015)。また、ウシの初期胞状卵胞由来の OGCs を用いた研究において、人為的な顆粒膜細胞の追加による顆粒膜細胞数の増加は OGCs の発育、卵母細胞の直径、ATP 含量および H4K12 のアセチル化レベルを改善する (Sugiyama et al., 2016)。さらに前章では、卵母細胞内の ATP 含量、脂質含量、H4K12 のアセチル化レベルは卵母細胞周囲の顆粒膜細胞数と相関していた。これらの結果は顆粒膜細胞数が卵母細胞の発育能力と質の指標である事を示唆しているが、顆粒膜細胞が直接卵母細胞の質と関係しているのか、顆粒膜細胞の数を決定している因子は何なのかは不明である。

卵胞の発育に伴い卵胞内には腔が形成され、腔の内部はグルコースのようなエネルギー基質や卵胞の発育に関与するホルモンや成長因子が含まれている卵胞液に満たされる。この卵胞液に含まれるサイトカインや成長因子の量は卵母細胞の質と関係している事や (Dumesic et al., 2015)、卵胞液中に含まれるタンパク質である可溶性 Fas の増加は顆粒膜細胞や卵丘細胞のアポトーシスを抑制

し卵母細胞の高い成熟率と相関する (Malamitsi-Puchner et al., 2003) などの報告があり、卵胞液は顆粒膜細胞と共に卵母細胞の発育を支持する環境因子の一つである。さらに卵胞液の成熟培養培地への添加は卵母細胞の成熟および受精に影響を及ぼすことが知られている (Bijttebier et al., 2008)。卵胞液は顆粒膜細胞からの分泌物と体内を循環している血液成分から構成されており (Rodger and Irving-Rodgers, 2010)、加齢やエネルギーバランスの不良など母体の生理状態は卵胞液の成分に影響を及ぼし、卵母細胞の発育に悪影響を与えることが報告されている (Sutton-McDowall et al., 2016; Takeo et al., 2017)。しかし卵胞液中には様々な因子が含まれているため、卵胞発育に関与する詳細な分子メカニズムは未だ不明である。

本章では、卵胞液が持つ卵母細胞の成熟・胚発生支持能力および顆粒膜細胞増殖支持能力が、卵胞液を採取した卵巢の顆粒膜細胞の多寡と関連するのか検証した。さらに NGS を用いた遺伝子発現解析によって顆粒膜細胞数を決定しているメカニズムの同定を図った。

第二節 材料および方法

1) 試薬

以下、特に記述のない試薬および培地はナカライテスクの製品を用いた。

2) 供試卵巢

第二章第二節と同様の方法で供試した。

3) COCs の採取、体外成熟培養、活性化処理および体外発生培養

COCs は個体別に、卵巢表面の胞状卵胞（直径 3-5 mm）20 個から注射針（21 G×5/8）を取り付けたシリンジで吸引採取した。採取した卵胞内容物から COCs を回収し、残りの卵胞液を 7000 rpm で 10 分間遠心分離して顆粒膜細胞と卵胞液を分離した。個々の卵胞液は実験直前まで -20 °C で保存した。遠心分離後の顆粒膜細胞は、各個体における卵胞あたりの平均顆粒膜細胞数の測定に用いた。

4) リアルタイム PCR 法を用いた卵胞あたりの平均顆粒膜細胞数の測定

DNA 抽出液（20 mM Tris-HCl; 0.9 % Nonidet- 40; 0.9 % Tween 20; and 0.4 mg/mL proteinase K）を用いて吸引採取後の顆粒膜細胞から DNA を抽出した。卵胞 20 個から回収した各個体の顆粒膜細胞沈殿物に 1 mL の DNA 抽出液を加え 55 °C で 30 分間、98 °C で 5 分間加温し DNA を抽出した。抽出した DNA をテンプレートにシングルコピー遺伝子（GCG glucagon, NC_010457）のコピー数をリアルタイム PCR 法にて定量した。プライマーは Primer3Plus (<http://sourceforge.net/projects/primer3/>) および NCBI データベースを用いて設計した

(5'- agcagaatcaacaccatcggt-3' and 5'-tggtccaccatagaatgc-3' ;154 bp)。PCR 反応は 98°C で 1 分間の First denaturation の後、98 °C で 5 秒間の Denaturation ステップおよび 60 °C で 5 秒間の Annealing および Extension ステップを 1 サイクルとして 40 サイクル行った。スタンダード曲線は濃度既知である外部スタンダードの 10 倍希釈系列を用いて作成した。外部スタンダードは Zero Blunt TOPO PCR cloning kit (Invitrogen) を用いて対応遺伝子をベクターに組み込み、シーケンスによって PCR 産物の導入が確認されたものを用いた。また各々の増幅効率は 1.98 より高かった。卵胞あたりの顆粒膜細胞数はシングルコピー遺伝子のコピー数と吸引卵胞数を用いて算出した (卵胞あたりの顆粒膜細胞数 = (シングルコピー遺伝子のコピー数 / 2) / 20)。

5) GC-rich および GC-poor 卵胞液の調整

25 個体の卵巣から個体ごとに胞状卵胞 (直径 3-5 mm) 20 個をランダムに選び卵胞液および顆粒膜細胞を吸引採取し、各個体の平均顆粒膜細胞数を算出した。算出した平均顆粒膜細胞数に基づき、卵胞あたりの平均顆粒膜細胞数の上位 5 個体と下位 5 個体の卵胞液を選別した。選別した上位 5 個体および下位 5 個体の卵胞液を等量混合し、それぞれ GC-rich および GC-poor 卵胞液を作成した。さらに異なる卵巣グループから 5 つのロットを作成した (合計 125 個体)。

6) 卵母細胞の体外成熟培養、活性化処理および体外発生培養

成熟培地には POM (Yoshioka et al., 2008) を基礎培地とし、3 mg/mL polyvinyl alcohol、0.5 mM L-cysteine、10 ng/mL epidermal growth factor (Sigma-Aldrich)、ホルモン (eCG 10 IU; ASKA Pharma Co. Ltd、および hCG 10 IU; Fuji

Pharma Co. Ltd) およびそれぞれ作製した卵胞液を 10 % (v/v) 添加した。吸引採取した COCs を、直径 60 mm のシャーレ (150288; NUNK) 中に作成した流動パラフィンオイルで覆った成熟培地のドロップ内 (COC/10 μ l) にて 44 時間、38.5 °C、5 % CO₂、95 % 空気および湿度飽和状態の気相条件下で培養した。体外成熟後、NEPA21 (Nepa Gene Co., Ltd., Chiba, Japan) を用いて単一の電気パルス (0.1 ms、60 V) による卵母細胞の活性化処理を行った。その後 PZM-3 で 3 回洗浄し、10 μ g/ml サイトカラシン B および 10 μ g/ml シクロヘキシミドを添加した PZM-3 に移し、38.5°C、5% CO₂、95% 空気および湿度飽和状態の気相条件下で 6 時間培養した。活性化処理後の卵母細胞を PZM-3 で 3 回洗浄し、PZM-3 で作成した 15 μ l ドロップに 10 個ずつ入れ、38.5 °C、5 % O₂、5 % CO₂、90 % N₂および湿度飽和状態の気相条件下で 7 日間培養し胚盤胞期胚まで発生させた。

7) 細胞増殖活性の測定

吸引採取した顆粒膜細胞を洗浄後、5 %FCS を添加した TCM-199 (Gibco, Waltham, MA, USA) に懸濁し、96 ウェルプレート (Falcon) に 1.0×10^4 cell /well の濃度に調整し播種し、24 時間培養した。増殖活性は Cell Proliferation ELISA, BrdU kit (Roche, Mannheim, Germany) を用いて同梱の取り扱い説明書に従って解析した。

8) 卵丘細胞数の測定

体外成熟後、COCs はボルテックスにより卵母細胞と卵丘細胞を分離し、卵丘細胞を 7000 rpm で 3 分間遠心分離回収後 PBS に再懸濁した。顆粒膜細胞数は懸濁液をトーマ氏血球計算盤上に展開し、細胞数をカウントして算出した。

9) トランスクリプトーム解析

25 個体の卵巣から個体別に胞状卵胞 20 個をランダムに選び、採取した顆粒膜細胞を 2 グループに分け DNA および RNA 抽出を行った。DNA 抽出は前述した方法で行い、卵胞あたりの平均顆粒膜細胞数を測定した。RNA 抽出は RNA queous micro kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を使用した。リアルタイム PCR による平均顆粒膜細胞数の測定結果から、細胞数上位 5 個体および下位 5 個体の RNA サンプルを選択し、RNA 精製を行いライブラリー作成に用いた。精製後の RNA サンプルのクオリティは Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) を用いて確認した。RNA-seq ライブラリーは TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いて調整した。各ライブラリーの濃度とクオリティを、2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) および KAPA Library Quantification Kit (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA) により測定した。その後、各ライブラリー濃度を 10 nM に調整し Hiseq 2500 (Single-read, 100 bp; Illumina) に供試した。また画像解析、base-calling および quality-filtering を CASAVA software ver 1.8.3 (Illumina) を用いて行った。得られた結果からアダプター配列および精度の低い配列をフィルタリングし、ブタゲノム配列 (susScr3) にアライメントを行い、さらにアノテーション (Sscrofa10.2) を行った。フィルタリング、アライメントならびにそれに続く解析は CLC genomics workbench (Qiagen, Redwood City, CA, USA) を用いて行った。発現量は補正を行った後、RPKM 値を算出した (Mortazavi et al., 2008)。統計解析には edgeR を用いた (Robinson et al., 2010)。試験区間で発現量に差がある遺伝子群を 2.0-fold change および統計検定 (false-discovery-rate-adjusted $P < 0.05$, $q < 0.2$, Benjamini and Hochberg,

1995) にて同定し、その後の解析に用いた。同定した発現変動遺伝子群から Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen) の Upstream Regulator 解析を用いて上流発現調節因子の解析を行い、発現変動遺伝子の原因因子を予測した。上流因子のターゲットである発現変動遺伝子が、統計的に有意に既知のデータと重なっているか Fisher's exact test を用いて Overlapping p-value を算出し、P 値が 0.05 未満を有意差ありとした。さらに遺伝子発現変動から予測した上流発現調節因子の調節方向を予測し Z-scores を算出した。上流発現調節因子が活性化することで遺伝子発現が変動していると予測された場合 (Activated) には Z-scores が 0 より大きくなり、逆の場合 (Inhibited) には 0 より小さくなると定義した。

10) 統計解析

各データの相関係数は SPSS (Version 17.0, Chicago, IL, USA) を用いて求めた。GC-rich および poor 卵胞液の添加または非添加の結果は分散分析後、Tukey's post-hoc test を行い比較した。核成熟率および胚盤胞期胚率はアークサイン変換後に検定に用いた。これらの比較では P 値が 0.05 未満を有意差ありとした。

第三節 結果

まず個体ごとの卵胞あたりの顆粒膜細胞数の測定方法を決定するため、個体別にブタ卵巢よりランダムに 12 個の胞状卵胞から顆粒膜細胞を吸引採取した。引き続き同個体の卵巢より同様に 12 個の胞状卵胞から吸引採取し、各個体より 2 グループの平均顆粒膜細胞数を得た (Figure 11A)。個体内における 2 グループ間の卵胞あたりの平均顆粒膜細胞数を比較したところ、有意な正の相関が見られた (Figure 11B; $N = 17$, $R^2 = 0.35$, $P < 0.05$)。この結果より、少なくとも 12 個の胞状卵胞から採取した平均顆粒膜細胞数は、その個体の持つ平均顆粒膜細胞数を反映していることが示唆された。この結果に基づいて各個体 20 個の胞状卵胞を用いて平均顆粒膜細胞数を測定したところ、134,616 個から 1,251,068 個の範囲であった (Figure 11C, $N = 265$)。

次に同一個体内における卵母細胞の発生能力と周囲の顆粒膜細胞数の直接的な関係性を明らかにするため、個体ごとに胞状卵胞から COCs および顆粒膜細胞を採取し、胚盤胞期胚への発生率と平均顆粒膜細胞数の個体内相関について検討した。その結果、胚盤胞期胚への発生率が高い個体は平均顆粒膜細胞数が多くなるという有意な正の相関がみられた (Figure 12; $N = 41$, $R^2 = 0.26$, $P < 0.05$)。さらに個体の平均顆粒膜細胞数が、その個体の卵胞液が持つ卵母細胞の胚発生および顆粒膜細胞の増殖支持能力と関連するのか検証した。すると、個体ごとに採取した卵胞液を体外成熟培養へ添加し得られた胚盤胞期胚への発生率と、卵胞液を採取した個体の平均顆粒膜細胞数は、有意な正の相関が見られた (Figure 13A; $N = 10$, $R^2 = 0.49$, $P < 0.05$)。また、個体ごとに採取した卵胞液を添加し培養した顆粒膜細胞の増殖活性と卵胞液を採取した個体の平均顆粒膜細胞数は、有意な正の相関が見られた (Figure 13B; $N = 10$, $R^2 = 0.49$, $P <$

0.05)。

個体の顆粒膜細胞数の多寡が、卵胞液が持つ支持能力と関係するのか詳細な検討を行うため、ランダムな 25 個体のグループから GC-rich および GC-poor 個体の混合卵胞液を作成した。それぞれの卵胞液を体外成熟培養に添加することで、顆粒膜細胞数の多寡が卵胞液が持つ胚発生支持能力と関係するのか検証した。各混合卵胞液の体外成熟培養への添加の結果、卵母細胞の核成熟率に差は見られなかったが、GC-rich 卵胞液の添加により胚盤胞期胚へ発生した卵母細胞の割合は有意に高い値を示した (Table 3)。引き続き 3 区間で卵母細胞周囲の卵丘細胞数について比較したところ、卵胞液の添加によって有意に多かったが GC-rich および poor の間で差は見られなかった (Table 3)。しかし GC-rich および poor の 2 区間の結果について Student's t test を用いて検定を行ったところ、GC-rich で有意に卵丘細胞数が増える結果が示された ($P < 0.05$)。

続いて卵胞内の顆粒膜細胞数を決定している分子メカニズムを明らかにするため、GC-rich および GC-poor 個体群の顆粒膜細胞における遺伝子発現を比較した。それぞれのグループ間において 2,075 個の有意な発現変動遺伝子群が検出された。この遺伝子群を用いてこれらの発現を制御する上流因子を Upstream regulator 解析によって予測した。その結果、GC-rich において活性化している上流因子には GATA4、forskolin、RAF1、INHBA、EGF および estradiol が示され (Table 4)、抑制されている上流因子には PD98059 およびシクロヘキシミドが示された (Table 5)。さらに発現変動遺伝子群が持つ生物学的意義を明らかにするため Bio-function predicted 解析を行ったところ、「quantity of germ cells」、「development of ovary」、「folliculogenesis」および「quantity of oocytes」などの function に関連していることが示された (Table 6)。

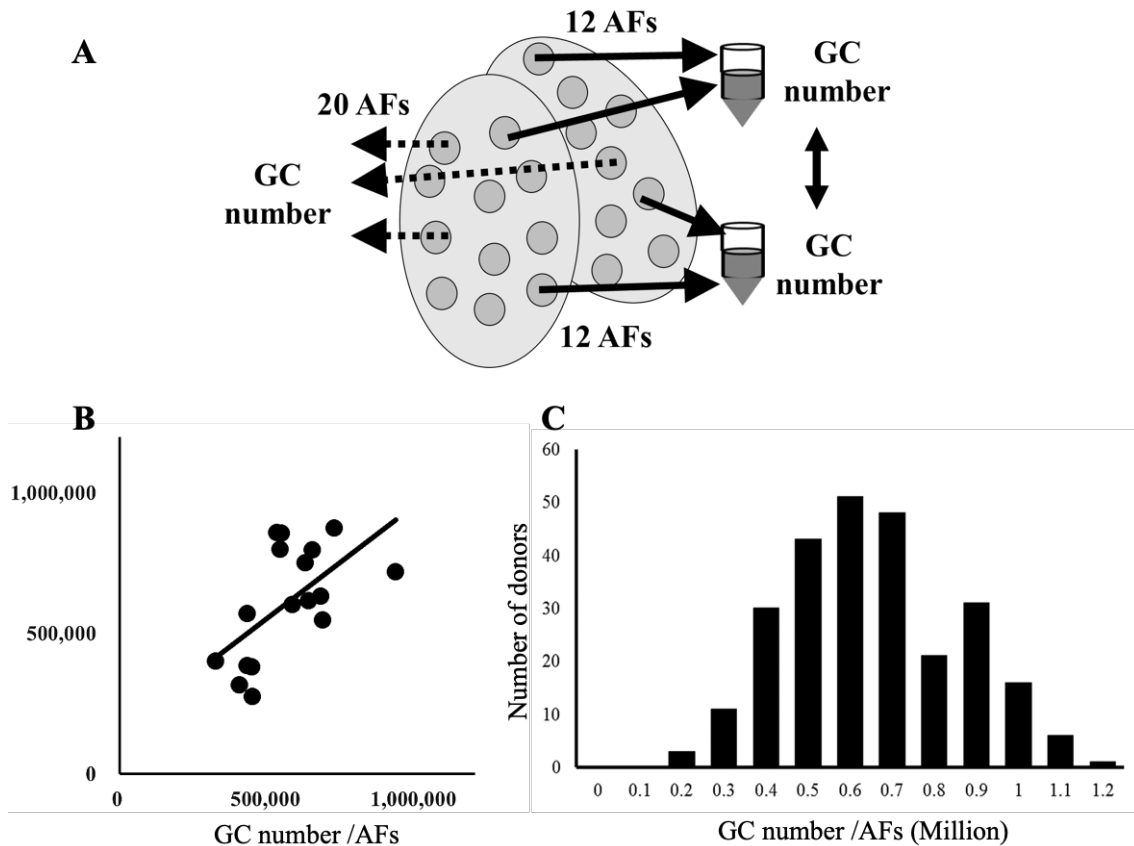


Figure 11. 個体から採取した卵胞あたりの顆粒膜細胞数の整合性の評価

A: 個体ごとの卵巣から 12 個の胞状卵胞 (AFs) をランダムに選択し、顆粒膜細胞を採取した。同一個体から AFs12 個分の 2 セットの顆粒膜細胞を採取した。その後リアルタイム PCR を用いて得た値から、卵胞あたりの顆粒膜細胞数を算出した。**B:** 同一個体から得られた 2 グループの平均顆粒膜細胞数は有意に正に相関した ($N = 17, R^2 = 0.35, P < 0.05$)。**C:** 各個体における卵胞あたりの平均顆粒膜細胞数。卵胞あたりの平均顆粒膜細胞数は各個体 20 個の AF から採取した顆粒膜細胞から算出した ($N = 265$)。

Munakata et al., 2018. *J Assist Reprod Genet.* **35**:1809-1819.

doi: 10.1007/s10815-018-1247-9.

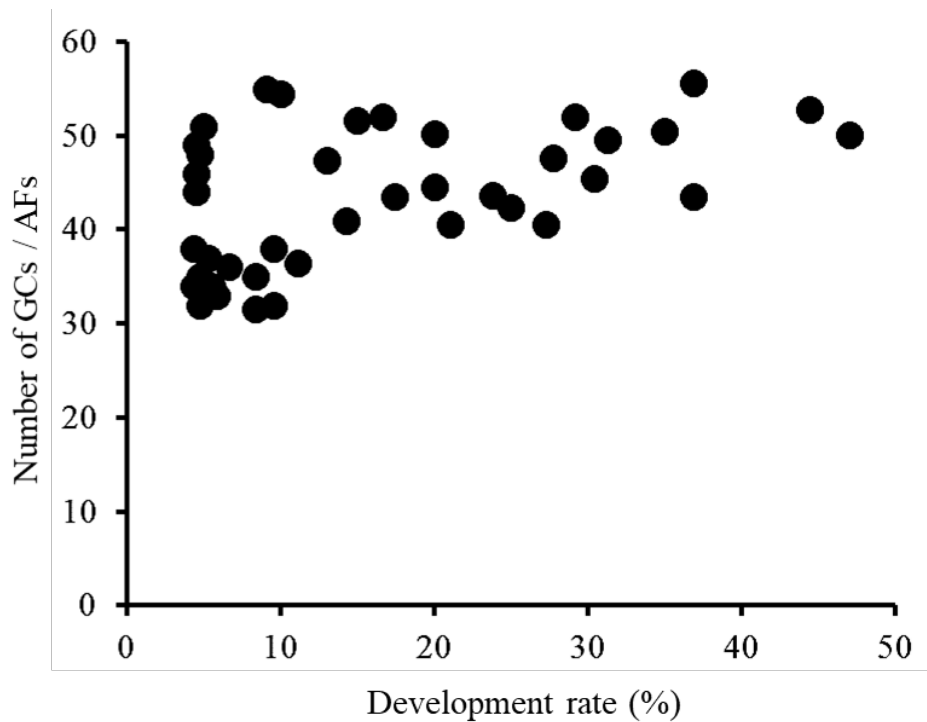


Figure 12. 卵胞あたりの平均顆粒膜細胞数と卵母細胞の胚盤胞期胚への発生率の個体内相関

各個体より卵母細胞および顆粒膜細胞を胞状卵胞（AFs: 直径 3-5 mm）から採取し、個体ごとの胚盤胞期胚への発生率および卵胞あたりの平均顆粒膜細胞数を測定し、比較した（ $N = 41$, $R^2 = 0.26$, $P < 0.05$ ）。

Munakata et al., 2018. *J Assist Reprod Genet.* **35**:1809-1819.

doi: 10.1007/s10815-018-1247-9.

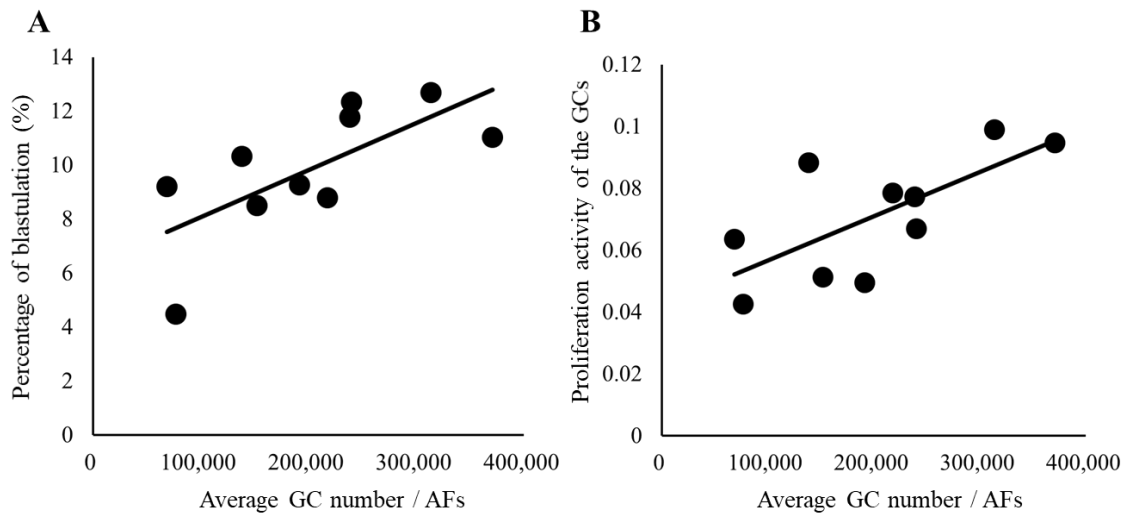


Figure 13. 卵胞液の由来個体の平均顆粒膜細胞数と胚盤胞期胚への発生率および顆粒膜細胞の増殖活性との関係性

A: 卵胞液の由来個体の平均顆粒膜細胞数と、対応する卵胞液添加培地で培養した卵母細胞の胚盤胞期胚への発生率との関係 ($N = 10$, $R^2 = 0.49$, $P < 0.05$)。 **B:** 卵胞液の由来個体の平均顆粒膜細胞数と、対応する卵胞液添加培地で培養した顆粒膜細胞の増殖活性との関係 ($N = 10$, $R^2 = 0.49$, $P < 0.05$)。

Munakata et al., 2018. *J Assist Reprod Genet.* **35**:1809-1819.

doi: 10.1007/s10815-018-1247-9.

Table 3. GC-richおよびGC-poor卵胞液の添加が卵母細胞の胚発生能および卵丘細胞数に及ぼす影響

Experimental Groups	No. of trials	No. of oocytes	Rate of MII (%)	Rate of blastulation (%)		No. of blastomere	No. of cumulus cells
Control	5	325	88.8 ± 4.8	7.0 ± 1.5	a	35.4 ± 3.4	1,310 ± 151
GC-Poor	5	325	87.8 ± 1.8	9.0 ± 1.5	a	45.7 ± 4.2	2,043 ± 73
GC-Rich	5	325	79.7 ± 2.9	15.3 ± 1.3	b	47.4 ± 3.3	2,321 ± 97

異符号間に有意差有り。 a-b: P < 0.05

Munakata et al., 2018. *J Assist Reprod Genet.* **35**:1809-1819.

doi: 10.1007/s10815-018-1247-9.

Table 4. GC-richおよびGC-poor個体由来顆粒膜細胞の発現変動遺伝子から予測された活性化上流因子

Upstream Regulator	Molecule Type	Predicted Activation State	Activation z-score	p-value of overlap	Target molecules in dataset	
					Activation State	Target molecules in dataset
GATA4	transcription regulator	Activated	2.23	2.2.E-03	ACTA1,COL1A2,COL3A1,CYP19A1,INHBA	
forskolin	chemical toxicant	Activated	2.22	1.2.E-02	ACTA1,CCND2,COL1A2,CYP19A1,GBP1,IGFBP5,INHBA,PTPRN,TUBA4A	
mifepristone	chemical drug	Activated	2.20	2.1.E-02	CHI3L1,CYBB,IL13RA2,MMP1,NOX4	
RAF1	kinase	Activated	2.20	6.5.E-03	ATP6V1B1,CTSL,MMP1,MT3,TUBA4A	
INHBA	growth factor	Activated	2.19	4.1.E-03	BAMBI,CCND2,CYP19A1,INHBA,PLLR	
MAPK1	kinase	Activated	2.00	1.2.E-01	GBP1,IGFBP7,MMP1,MX2	
5-O-mycoly-beta-araf-(1->2)-5-O-mycoly-alpha-araf-(1->1')-glycerol	chemical - endogenous non-mammalian	Activated	2.00	1.3.E-03	CD83,CX3CR1,CYP19A1,MMP1	
TCF3	transcription regulator		1.98	1.0.E-02	ACACB,CCND2,CR2,ZP2,ZP3,ZP4	
ITGB1	transmembrane receptor		1.97	1.4.E-03	ACTA1,COL1A2,MMP1,TCF4	
IGF1R	transmembrane receptor		1.94	3.2.E-03	ACTA1,CD5L,CD93,COL3A1,IGFBP4,IGFBP5	
RELA	transcription regulator		1.91	1.8.E-03	A2M,CHI3L1,COL1A2,CR2,CYBB,CYP19A1,GBP1,MMP1	
AHR	ligand-dependent nuclear receptor		1.86	1.2.E-01	A2M,COL1A2,COL3A1,CYP19A1	
EGF	growth factor		1.85	4.8.E-04	CCND2,COL1A2,COL3A1,FLT1,IGFBP4,IGFBP5,MMP1,MT3,PTPRN,SYP	
NFKB (complex)	complex		1.84	1.5.E-04	A2M,BAMBI,CCND2,CD83,COL1A2,CYBB,FGF1,GFPT2,GPR34,IL13RA2,MMP1,MT3	
FGF2	growth factor		1.82	3.1.E-05	CCND2,COL1A2,COL3A1,CTSL,DLI4,FLT1,GBP1,IGFBP4,IGFBP5,MMP1	
TCFB3	growth factor		1.68	3.2.E-04	ACTA1,COL1A2,COL3A1,CYP19A1,MMP1	
HRAS	enzyme		1.66	4.0.E-04	A2M,ACTA1,ATP1A3,CCND2,COL1A2,COL3A1,IGFBP4,IGFBP5,LYZ,MMP1,SORBS1	
TLR4	transmembrane receptor		1.62	9.9.E-04	ACTA1,BAMBI,CCND2,DLI4,GPR34,MARCO,MMP1,TCF4	
budesonide	chemical toxicant		1.60	7.6.E-03	ASS1,CR2,CYP19A1,IGFBP5,MMP1,SYP	
beta-estradiol	chemical - endogenous mammalian		1.57	2.9.E-04	A2M,ACTA1,CCND2,CHI3L1,COL1A2,COL3A1,CTSL,CYBB,CYP19A1,FGF1,IGFBP4,IGFBP5,INHBA,LPCAT2,LRP8,LYZ,MMP1,PPP2R2C,PLLR,PTPRN,SLC02B1,SYP	
estrogen	chemical drug		1.57	9.6.E-04	COL3A1,CYBB,CYP19A1,FLT1,IGFBP4,IGFBP5,PLLR	

Munakata et al., 2018. *J Assist Reprod Genet.* **35**:1809-1819.

doi: 10.1007/s10815-018-1247-9.

Table 5. GC-richおよびGC-poor個体由来顆粒膜細胞の発現変動遺伝子から予測された抑制上流因子

Upstream Regulator	Molecule Type	Predicted Activation State	Activation z-score	p-value of overlap	Target molecules in dataset
PD98059	chemical - kinase inhibitor	Inhibited	-2.63	3.4.E-03	ATP6V1B1,CCND2,CD83,COL1A2,COL3A1,CTSL,MMP1,MT3,TUBA4A
cycloheximide	chemical reagent	Inhibited	-2.49	4.1.E-03	ASS1,CYP19A1,ERG,GBP1,IGFBP4,IGFBP5,MMP1
cholesterol	chemical - endogenous group	Inhibited	-2.43	1.1.E-03	CD5L,COL3A1,CYBB,FLT1,LYZ,MMP1
Tgf beta	chemical drug	Inhibited	-2.41	2.1.E-03	BAMBI,CCND2,COL1A2,IGFBP5,MMP1,NOX4
doxorubicin	chemical drug	Inhibited	-2.22	6.9.E-02	A2M,COL3A1,CYBB,IGFBP7,NOX4
actinomycin D	chemical drug	Inhibited	-2.12	9.7.E-03	ASS1,COL1A2,IGFBP4,IGFBP5,MAT1A
H89	chemical - kinase inhibitor	Inhibited	-1.98	7.0.E-03	CD83,CYP19A1,IGFBP5,MMP1
cisplatin	chemical drug		-1.96	3.2.E-01	A2M,FLT1,LYZ,MAT1A,NOX4
N-nitro-L-arginine methyl ester	chemical drug		-1.95	1.3.E-04	ACTA1,CD83,COL1A2,COL3A1,CYBB
NFKBIA	transcription regulator		-1.94	1.1.E-02	A2M,ATP6V1B1,CCND2,CHI3L1,COL1A2,COL3A1,MMP

Munakata et al., 2018. *J Assist Reprod Genet.* **35**:1809-1819.

doi: 10.1007/s10815-018-1247-9.

Table 6. IPA解析によって予測されたBio-function

Functions	Diseases or Functions Annotation	P-value	Predicted Activation State	Activation z-score	Molecules
quantity development	quantity of germ cells	1.0.E-04	Increased	2.41	ZP3,CYP19A1,PABPC1L,ZP2,BMP15,INHA,CHD5
folliculogenesis	development of ovary	5.0.E-06		1.99	ZP3,CYP19A1,AMHR2,CCND2,PTPRN,ZP2,BMP15,INHA
quantity	folliculogenesis	1.1.E-05		1.99	ZP3,CYP19A1,CCND2,PTPRN,ZP2,BMP15,INHA
growth	quantity of oocytes	9.2.E-05		1.97	ZP3,PABPC1L,ZP2,BMP15
	growth of genital organ	9.7.E-05		1.92	CYP19A1,PRLR,IGFBP7,CCND2,BMP15,INHA

Munakata et al., 2018. *J Assist Reprod Genet.* **35**:1809-1819.

doi: 10.1007/s10815-018-1247-9.

第四節 考察

本章では個体ごとに異なる顆粒膜細胞の多寡と、由来個体の卵胞液が持つ胚発生支持および顆粒膜細胞増殖支持能力が関連しているのか検証した。さらに顆粒膜細胞数および卵母細胞の発生能を決定している因子の同定とその上流因子の予測を行った。

12 個の胞状卵胞から採取した平均顆粒膜細胞数について検証したところ、個体内相関があること、個体内でもばらつきが見られることが示された。また 265 個体を用いた個体の平均細胞数のプロット結果より、同程度の発育段階にも関わらず個体ごとの平均顆粒膜細胞数は大きなばらつきを持つことを示した。これらの結果は、卵胞内の顆粒膜細胞数は個体ごとの特徴であることを示唆している。

続いて卵胞内の平均顆粒膜細胞数はその個体が持つ卵母細胞の胚発生能と関係することを示した (Figure 12)。さらに卵胞液の添加実験により、個々の平均顆粒膜細胞数は、その個体の卵胞液が持つ卵母細胞の胚発生および顆粒膜細胞増殖支持能力と深い関係があることが示された (Figure 13)。体外成熟培地への卵胞液の添加は、卵母細胞の核成熟、受精およびその後の胚発生を改善することがブタおよびヒトにおいて知られている (Ducolomb et al., 2013; Tan et al., 2017)。本章において、体外成熟培地への卵胞液の添加は卵丘細胞数の増加および生存率を向上する結果を示した。卵胞液は卵母細胞の周辺環境において顆粒膜細胞を除けば唯一の環境であり、本章の結果は卵胞液が卵母細胞の能力および顆粒膜細胞数を決定することを示唆している。さらに、この仮説は個体ごとの平均顆粒膜細胞数で選別された GC-rich および poor 卵胞液を用いた実験でさらに検証した。体外成熟培地への GC-rich 卵胞液添加は卵母細胞の胚発生能

力を向上させ、周囲の卵丘細胞数を増加させた。未発育卵母細胞の体外発育培養においても同様な報告がある (Shibahara et al., 2019)。これらの結果は、胞状卵胞においてサイズおよび形態が類似している場合でも卵胞の持つ発育能力がすでに決定されていること、さらに卵胞液には卵母細胞の発育能力および顆粒膜細胞の増殖を決定している因子が含まれていると結論づけた。

卵胞液中には複雑な相互作用を持つ数多くの因子が含まれており、卵胞の発育および卵母細胞への因子の影響を明らかにすることは重要である。しかしながら、最も重要であると考えられる因子の同定や、因子同士の統合的な効果を完全に明らかにすることは困難を極める。そこで本章では、個体ごとの顆粒膜細胞数が異なる分子背景について検討した。そして GC-rich および poor な個体の顆粒膜細胞の遺伝子発現を明らかにし、その上流因子の予測を行った。2 グループ間の発現変動遺伝子群において、興味深いことに解糖系に関連する遺伝子群が GC-rich 区において発現が高かった (Figure 14)。顆粒膜細胞における解糖系の亢進はブタ卵胞の発育に伴う重要な現象の一つであり (Munakata et al., 2016)、この結果が卵母細胞の質の向上の背景にある可能性がある。発現変動遺伝子群から予測された上流因子は、卵胞の性状および発育に関連すると以前に報告された重要な因子がいくつか含まれていた。Forskolin は cAMP を介した PKA の活性化剤である。PKA は IGF1 および FSH の下流で制御される因子であり、ステロイド産生に重要な調節因子である (KEGG PATHWAY: ssc04913)。本章における Upstream regulator 解析の結果、IGF1R が GC-rich において活性化している上流因子として示されていた (Table 4)。またインヒビンは FSH に対する応答因子である。本研究の結果、インヒビンを構成する *INHA* および *INHBA* の遺伝子発現は GC-rich 区において有意に高い値であった (2.0 倍、 $P < 0.001$ および 1.9 倍、 $P < 0.01$)。さらに *INHBA* は GC-rich 区において活性化し

ていると考えられる上流因子であることが示された (Table 4)。さらに GC-rich 区で活性化している上流因子として GATA4 が示された (Table 4)。GATA4 は生殖腺細胞において cAMP/PKA のエフェクターであることが知られている

(Tremblay and Voger, 2003)。また GATA4 はリン酸化を介して *CYP19A1* のプロモーターに結合すること、siRNA を用いた GATA4 のノックダウン実験の結果ウシ顆粒膜細胞において *CYP19A1* の発現低下およびエストラジオール分泌低下を示すことが報告されている (Monga et al., 2012)。GC-rich 区では poor 区と比較して *CYP19A1* 発現量は高い値を示した (2.5 倍、 $P < 0.01$)。エストラジオールはブタおよびウシの体外発育を促進する重要な因子である (Endo et al., 2013; Tasaki et al., 2013)。以上の結果より、GC-rich 卵胞内の顆粒膜細胞は IGF/FSH に応答した cAMP/PKA、GATA4 の活性化に伴うエストラジオール合成の促進によって、適切な卵胞発育に重要である性状である可能性が考えられる。

EGF は卵母細胞の発育に重要な因子の一つであり、卵丘細胞における EGF 応答性の獲得は卵胞発育に重要なイベントである (Ritter et al., 2015)。本章では EGF およびその受容体である EGFR は、GC-rich における活性化上流因子であることが示された (Table 4)。さらに RAF1 および MAPK1 も同様に GC-rich にて活性化されている上流因子であることが予測された (Table 4)。EGF-RAF1-MAPK1 経路は細胞増殖促進につながるシグナル伝達経路であることが知られている。また MEK 阻害剤の PD98059 およびタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドが、GC-rich 区で逆の作用を持つ上流因子として示された

(Table 5)。これは GC-rich 区では MEK 経路およびタンパク質合成経路が活性化している事を示唆している。これらの結果は GC-rich 区の顆粒膜細胞において高いタンパク質合成および細胞増殖の亢進を反映しており、卵胞および卵母

細胞の発育能力に大きな影響を与えていると考えられる。

以上の結果より、顆粒膜細胞数は卵胞の発育を評価できる有用なマーカーであり、この顆粒膜細胞数および卵母細胞の発育能力は周辺環境の卵胞液が決定していることが示唆された。さらに顆粒膜細胞数が多い特徴を持つ個体の顆粒膜細胞ではエストロゲン合成経路および細胞増殖の促進を促すシグナル経路が亢進している可能性が考えられた。

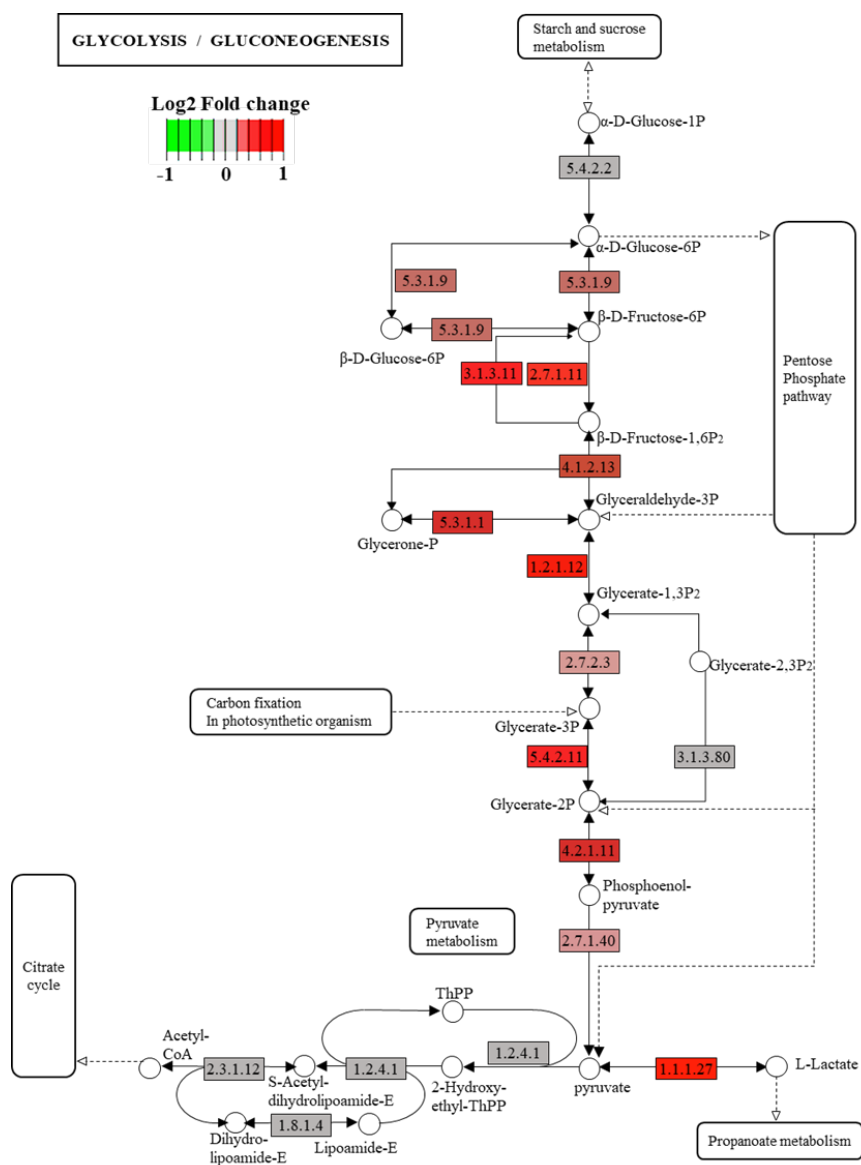


Figure 14. 解糖系関連遺伝子の遺伝子発現ヒートマップ

GC-rich および GC-poor 個体の顆粒膜細胞における遺伝子発現変動値 (Log₂ fold change) のヒートマップを KEGG Pathway の解糖系パスウェイ (ssc00010) と重ねて示した。解糖系関連遺伝子は GC-rich 個体の顆粒膜細胞で高い発現量を示した。

Munakata et al., 2018. *J Assist Reprod Genet.* **35**:1809-1819.

doi: 10.1007/s10815-018-1247-9.

第五章 総括

顆粒膜細胞および卵胞液は卵母細胞の発育に重要な環境要因である。大型哺乳動物の未発育卵母細胞を効率よく発育させるための体外発育培養系は、未だ確立されていない。これまで一般的に用いられてきた培養系では、卵胞発育に伴う顆粒膜細胞の増殖が悪く卵母細胞周囲の顆粒膜細胞数が少ない。本研究では、ブタの未発育卵母細胞を用いて、1) 高い発生能力を持つ体外発育卵母細胞を得るための新規の体外発育培養系の構築、2) 卵母細胞の能力を決定する要因の同定と 3) その要因の分子背景の解明にとり組んだ。

1) 培養基質の性質がブタ未発育卵母細胞の体外発育に及ぼす影響

既存の未発育卵母細胞の体外発育培養系ではプラスチックシャーレのような硬い基質が用いられている。その結果、得られる卵母細胞の質は低く周囲の顆粒膜細胞の数も体内発育卵胞に比べて著しく少ない。そこで基質の硬さを調整するため、ポリアクリルアミドゲル (PAG) を培養基質に用いた培養系を構築し、初期胞状卵胞由来の卵母細胞-顆粒膜細胞複合体 (OGCs) の体外培養に用いた。すると PAG 上で培養した OGCs の顆粒膜細胞数が有意に増加した。また PAG 上で発育した卵母細胞は直径が大きく、含有する ATP および脂質量が有意に多くなった。さらに H4K12 のアセチル化レベルも有意に高い結果となった。これらの卵母細胞を単為発生処理すると、胚盤胞期胚への発生率は PAG 上で発育させた卵母細胞において高い値を示した。PAG を用いた培養系における卵母細胞の質の向上は顆粒膜細胞数が増加した結果であると考え、次に卵母細胞の発育指標であるエネルギー含量およびヒストンのアセチル化レベルと周囲の顆粒膜細胞数の関係性について検討した。

2) 顆粒膜細胞の数と卵母細胞内エネルギー含量の関係性の検証

卵母細胞内のエネルギー含量は卵母細胞の発生能力の指標として多くの研究で用いられている。卵母細胞では解糖系の活性が低く、グルコースをエネルギー基質として利用するためには周囲の顆粒膜細胞でグルコースを代謝し、その代謝物を卵母細胞へ供給する必要がある。この供給元である顆粒膜細胞の数と卵母細胞の質との関係性についてこれまで明らかにした研究は無い。そこで卵母細胞内のエネルギー含量と周囲の顆粒膜細胞数の相関について精査した。まず卵子の脂質量が個体ごとの特徴であるのかどうか、同一個体から回収した 10 個の卵母細胞を 2 グループ用意し比較したところ高い相関が得られたため、10 個の卵子で個体の卵母細胞内平均脂質量を推定できることが示された。そして同一個体の卵母細胞内の平均脂質量と、卵胞内の平均顆粒膜細胞数および卵丘細胞数の間の関係性について検討した。その結果、同一個体において平均顆粒膜細胞、平均卵丘細胞数、卵母細胞内の平均脂質量それぞれの間に関連が見られた。次に体外発育培養で得られた OGCs を用いて卵母細胞内の ATP および脂質量、H4K12 アセチル化レベルと卵母細胞周囲の顆粒膜細胞数およびグルコース消費量それぞれの関係性を調べた。すると顆粒膜細胞数およびグルコース消費量はその卵母細胞の ATP 含量、脂質量および H4K12 アセチル化レベルと有意な正の相関を示した。この結果より、個体ごとに顆粒膜細胞数が大きく異なり、卵母細胞内のエネルギー状態は周囲の顆粒膜細胞数が決定している可能性が示唆された。

3) 顆粒膜細胞数を決定している因子および分子メカニズムの解明

卵胞液は顆粒膜細胞と共に、卵母細胞の発育を支える周辺環境の一つである。

そこで卵胞内の顆粒膜細胞数を決定している因子として卵胞液に着目し、個体の卵胞あたりの平均顆粒膜細胞の数と、その個体由来の卵胞液の卵母細胞および顆粒膜細胞支持能力との関係性を検証した。まず平均顆粒膜細胞数とその個体の卵母細胞の胚盤胞期胚への発生率には有意な正の相関が示された。さらに各個体から卵胞液を採取し、卵母細胞の体外成熟培養および顆粒膜細胞の培養へ添加したところ、卵胞液を採取した個体の平均顆粒膜細胞数と卵胞液が持つ卵母細胞への発生支持能力、顆粒膜細胞の増殖支持能力の間に有意な正の相関が見られた。さらに詳細な検証を行うため 25 個体の平均顆粒膜細胞数を測定し、上位 5 個体を GC-rich 区、下位 5 個体を GC-poor 区とし卵胞液を採取し混合した。得られた GC-rich 卵胞液の体外成熟培地への添加は、poor 卵胞液の添加に比べて、卵母細胞の胚盤胞期胚への発生を促進した。続いて卵胞内の顆粒膜細胞数を決定している分子メカニズムを明らかにするため、GC-rich 区および poor 区の顆粒膜細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、発現変動遺伝子を制御している上流因子を予測した。すると GC-rich 区の顆粒膜細胞では解糖系が亢進し、エストラジオール合成経路である cAMP/PKA-GATA4-CYP19A1 経路および細胞増殖促進につながる EGF-RAF1-MAPK1 経路が活性化している可能性が示唆された。

以上の研究より 1) PAG を培養基質に用いることで、エネルギー含量が高く発生能力の高い卵母細胞を作成できる培養系を確立できた。2) 卵母細胞内のエネルギー含量は卵母細胞周囲の顆粒膜細胞数と密接な関係性があることが示された。3) 同一の発育段階の卵胞であっても各個体の平均顆粒膜細胞数は大きく異なり、この顆粒膜細胞数および卵母細胞の発生能力は卵胞液が決定している可能性が示唆された。

Summary

Investigation of the factors underlying oocyte development using in vitro oocyte growth systems

Granulosa cells and follicular fluid are important for oocyte development. There is an urgent need to establish an in vitro culture system capable of studying the efficient development of immature oocyte in large mammals. It has been reported that the in vitro culture systems commonly used result in poor follicular development and proliferation of granulosa cells around the oocyte. In this study, I have addressed three objectives to demonstrate an improved method for culturing oocytes in vitro and identified factors that govern the development of porcine oocytes. Our main objectives were: 1) To establish a new in vitro culturing system for oocytes with high potential for development; 2) To identify the factors that determine the development of oocytes; and 3) To elucidate the molecular mechanism involved in the above-mentioned phenomena.

I investigated the effects of various culture substrates on the growth of immature oocytes in vitro. Existing in vitro culturing systems for immature oocytes use a hard substrate, such as a plastic plate. As a result, oocytes are of low quality and the number of granulosa cells around the oocyte are remarkably lower than those observed in vivo. Therefore, I devised a culture system using polyacrylamide gel (PAG) to adjust the rigidity of a substrate and used it to culture oocyte-granulosa cell complexes derived from porcine early antral follicles. Using this system, I observed a significant increase in the number of granulosa cells. Moreover, oocytes grown on PAG were larger in diameter and contained significantly more ATP and lipid. Furthermore, H4K12

acetylation in these oocytes was significantly higher. The rate of development to blastocyst stage was higher in oocytes grown on PAG. Thus, the improvement in oocyte quality using PAG may be attributed to the increase in the number of granulosa cells. Subsequently, I investigated the correlation between the energy content and histone acetylation level in the oocytes and number of surrounding granulosa cells.

Many studies have used the energy content in oocytes as an indicator of oocyte development. Glycolysis is low in oocytes. When using glucose as an energy substrate, it is necessary to metabolize glucose in the surrounding granulosa cells and supply oocyte with the metabolize end-products. There are currently no reports on the correlation between the number of granulosa cells and oocyte quality. Thus, I examined the correlation between the amount of energy content in the oocyte and number of surrounding granulosa cells. First, I compared two groups of 10 oocytes collected from the ovary of one individual and observed a high level of correlation. This suggests that the average lipid content can also be estimated using 10 oocytes from the ovary of one individual. Thus, I subsequently determined the correlation between the average lipid content in oocytes and average number of granulosa and cumulus cells in the follicle using the same individual. There was a significant positive correlation between the average number of granulosa and cumulus cells and average lipid contents from the same individual. Thereafter, I determined the correlation between the ATP, lipid, and H4K12 acetylation level in the oocyte, number of granulosa cells around the oocyte, and glucose consumption using in vitro cultured oocyte-granulosa cell complexes. The number of granulosa cells and glucose consumption were positively correlated with the ATP, lipid and H4K12 acetylation levels in the oocyte. These findings suggest that the

numbers of granulosa cells vary significantly between individuals and the energy state of the oocyte may be determined by the number of surrounding granulosa cells.

Finally, I investigated the factors and molecular mechanism involved in governing the number of granulosa cells present around the oocyte. Along with granulosa cells, follicular fluid is another important component of the surrounding microenvironment that supports the growth of oocytes. Therefore, I focused on studying the follicular fluid as a factor involved in determining the number of granulosa cells in a follicle. I examined the function of the follicular fluid in supporting the proliferation of granulosa cells and the development of oocytes and found a positive correlation between the average number of granulosa cells per follicle and development of individual oocytes to form blastocysts. Follicular fluid was collected from each individual and supplemented into the medium used the in vitro cultures of oocytes and that of granulosa cells derived from the same individual. I observed a positive correlation between the average number of granulosa cells and ability of the follicular fluid to support the development of oocytes and proliferation of granulosa cells. To further verify these findings, I measured the number of granulosa cells in 25 individuals and collected the follicular fluid from the top 5 individuals in the GC-rich group and bottom 5 individuals in the GC-poor group. Compared to the addition of GC-poor follicular fluid, addition of GC-rich follicular fluid to the in vitro maturation medium improved the rate of development of oocytes to the blastocyst stage. Next, I wanted to elucidate the molecular mechanism involved in determining the number of granulosa cells in the follicle; thus, I performed a comprehensive gene expression analysis of granulosa cells in the GC-rich and poor groups, and predicted the upstream factors responsible for regulating differentially expressed genes. I observed enhanced

glycolysis in granulosa cells from the GC-rich group and predicted that activated the cAMP/PKA-GATA4-CYP19A1 (estradiol synthesis) and EGF-RAF1-MAPK1 pathways that are important for cell proliferation.

Taken together, I conclude that the amount of energy and histone acetylation in oocytes positively correlates with the number of granulosa cells surrounding the oocyte. Moreover, the average number of follicular granulosa cells each individual varies significantly and the composition of the follicular fluid may govern the number of granulosa cells present and development of oocytes.

謝辞

本稿を終わるに臨み、終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜り、また本研究の遂行ならびに本論文の御高閲をいただきました東京農業大学動物生殖学研究室教授 岩田尚孝博士に深甚の謝意を表します。また本研究の遂行にあたり、暖かい御指導と適切なお助言をいただきました同教授 桑山岳人博士、同准教授 白砂孔明博士に深甚の謝意を表します。さらに研究活動に臨むにあたり、学術的および技術面において御指導と御鞭撻を賜りました岡山大学大学院動物生殖生理学研究室教授 木村康二博士、大阪市立大学大学院リプロダクティブサイエンス研究所准教授 橋本周博士に心から感謝申し上げます。

さらに本実験の遂行にあたり、御指導および御協力をいただきました東京農業大学生物資源ゲノム解析センター研究員 川原玲香博士に深謝いたします。また研究材料を快く御提供いただいた神奈川食肉センターの職員の方々に感謝の意を述べるとともに、本研究において多大なる御協力をいただいた東京農業大学動物生殖学研究室員、ならびに卒業後も支えてくださった東京農業大学家畜繁殖学研究室卒業生の皆様に感謝いたします。

最後に、私をこれまで支えてくださった家族に感謝いたします。

引用文献

Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Stat Methodol.* **57**:289–300.

Bijttebier J, Van Soom A, Meyer E, Mateusen B, Maes D. 2008. Preovulatory follicular fluid during in vitro maturation decreases polyspermic fertilization of cumulus-intact porcine oocytes in vitro maturation of porcine oocytes. *Theriogenology.* **70**:715-724.

Bui HT, Van Thuan N, Kishigami S, Wakayama S, Hikichi T, Ohta H, Mizutani E, Yamaoka E, Wakayama T, Miyano T. 2007. Regulation of chromatin and chromosome morphology by histone H3 modifications in pig oocytes. *Reproduction.* **133**:371-382.

Clarke HJ. 2018. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* **7**.

De La Fuente R. Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Dev Biol.* **292**:1-12.

Ducolomb Y, González-Márquez H, Fierro R, Jiménez I, Casas E, Flores D, Bonilla E, Salazar Z, Betancourt M. 2013. Effect of porcine follicular fluid proteins and peptides on oocyte maturation and their subsequent effect on in vitro fertilization. *Theriogenology.* **79**:896-904.

Dumesic DA, Meldrum DR, Katz-Jaffe MG, Krisher RL, Schoolcraft WB. 2015. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril*. **103**:303-316.

Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL. 2010. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biol Reprod*. **83**:909-918.

Dunning KR, Anastasi MR, Zhang VJ, Russell DL, Robker RL. 2014. Regulation of fatty acid oxidation in mouse cumulus-oocyte complexes during maturation and modulation by PPAR agonists. *PLoS One*. **9**:e87327.

Elis S, Desmarchais A, Maillard V, Uzbekova S, Monget P, Dupont J. 2015. Cell proliferation and progesterone synthesis depend on lipid metabolism in bovine granulosa cells. *Theriogenology*. **83**:840-853.

Endo M, Kawahara-Miki R, Cao F, Kimura K, Kuwayama T, Monji Y, Iwata H. 2013. Estradiol supports in vitro development of bovine early antral follicles. *Reproduction*. **145**:85-96.

Endo T, Naito K, Aoki F, Kume S, Tojo H. 2005. Changes in histone modifications during in vitro maturation of porcine oocytes. *Mol Reprod Dev*. **71**:123-128.

Eppig JJ, O'Brien MJ. 1996. Development in vitro of mouse oocytes from primordial

follicles. *Biol Reprod.* **54**:197-207.

Ferguson EM, Leese HJ. 2006. A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Mol Reprod Dev.* **73**:1195-1201.

Franciosi F, Lodde V, Goudet G, Duchamp G, Deleuze S, Douet C, Tessaro I, Luciano AM. 2012. Changes in histone H4 acetylation during in vivo versus in vitro maturation of equine oocytes. *Mol Hum Reprod.* **18**:243-252.

Ghanta S, Grossmann RE, Brenner C. 2013. Mitochondrial protein acetylation as a cell-intrinsic, evolutionary driver of fat storage: chemical and metabolic logic of acetyl-lysine modifications. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **48**:561-574.

Gu L, Liu H, Gu X, Boots C, Moley KH, Wang Q. 2015. Metabolic control of oocyte development: linking maternal nutrition and reproductive outcomes. *Cell Mol Life Sci.* **72**:251-271.

Hikabe O, Hamazaki N, Nagamatsu G, Obata Y, Hirao Y, Hamada N, Shimamoto S, Imamura T, Nakashima K, Saitou M, Hayashi K. 2016. *Nature.* **539**:299-303.

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. 2012. Isolation of ovarian components essential for growth and development of mammalian oocytes in vitro. *J Reprod Dev.* **58**:167-174.

Itami N, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. 2015. Resveratrol improves the quality of pig oocytes derived from early antral follicles through sirtuin 1 activation. *Theriogenology.* **83**:1360-1367.

Itami N, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. 2016. Promotion of glucose utilization by insulin enhances granulosa cell proliferation and developmental competence of porcine oocyte grown in vitro. *Zygote.* **25**:65-74.

Iwata H, Hayashi T, Sato H, Kimura K, Kuwayama T, Monji Y. 2005. Modification of ovary stock solution with magnesium and raffinose improves the developmental competence of oocytes after long preservation. *Zygote.* **13**:303-308.

Jeong WJ, Cho SJ, Lee HS, Deb GK, Lee YS, Kwon TH, Kong IK. 2009. Effect of cytoplasmic lipid content on in vitro developmental efficiency of bovine IVP embryos. *Theriogenology.* **72**:584-589.

Kageyama S, Liu H, Kaneko N, Ooga M, Nagata M, Aoki F. 2007. Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. *Reproduction.* **133**:85-94.

Kohata C, Izquierdo-Rico MJ, Romar R, Funahashi H. 2013. Development competence

and relative transcript abundance of oocytes derived from small and medium follicles of prepubertal gilts. *Theriogenology*. **80**:970-978.

Leese HJ, Barton AM. 1984. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil*. **72**:9-13.

Lv H, Li L, Sun M, Zhang Y, Chen L, Rong Y, Li Y. 2015. Mechanism of regulation of stem cell differentiation by matrix stiffness. *Stem Cell Res Ther*. **6**:103.

Malamitsi-Puchner A, Sarandakou A, Baka S, Hasiakos D, Kouskouni E, Creatsas G. 2003. In vitro fertilization: angiogenic, proliferative, and apoptotic factors in the follicular fluid. *Ann N Y Acad Sci*. **997**:124-128.

Manosalva I, González A. 2009. ginc alters histone H4 acetylation and CDC2A in mouse germinal vesicle stage oocytes. *Biol Reprod*. **81**:1164-1171.

Marchal R, Vigneron C, Perreau C, Bali-Papp A, Mermillod P. 2002. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology*. **2002** 57:1523-1532.

Monga R, Ghai S, Datta TK, Singh D. 2012. Involvement of transcription factor GATA-4 in regulation of CYP19 gene during folliculogenesis and luteinization in buffalo ovary. *J Steroid Biochem Mol Biol*. **130**:45-56.

Morohaku K, Tanimoto R, Sasaki K, Kawahara-Miki R, Kono T, Hayashi K, Hirao Y, Obata Y. 2016. Complete in vitro generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **113**:9021-9026.

Morris SA, Grewal S, Barrios F, Patankar SN, Strauss B, Buttery L, Alexander M, Shakesheff KM, Zernicka-Goetz M. 2012. Dynamics of anterior-posterior axis formation in the developing mouse embryo. *Nat Commun*. **3**:673

Morrish F, Noonan J, Perez-Olsen C, Gafken PR, Fitzgibbon M, Kelleher J, VanGilst M, Hockenbery D. 2010. Myc-dependent mitochondrial generation of acetyl-CoA contributes to fatty acid biosynthesis and histone acetylation during cell cycle entry. *J Biol Chem*. **285**:36267-36274.

Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*. **5**:621-628.

Munakata Y, Kawahara-Miki R, Shiratsuki S, Tasaki H, Itami N, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. 2016. Gene expression patterns in granulosa cells and oocytes at various stages of follicle development as well as in in vitro grown oocyte-and-granulosa cell complexes. *J Reprod Dev*. **62**:359-366.

Nagano M, Katagiri S, Takahashi Y. 2006. Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential. *Zygote*. **14**:53-61.

Naujok O, Bandou Y, Shikama Y, Funaki M, Lenzen S. 2014. Effect of substrate rigidity in tissue culture on the function of insulin-secreting INS-1E cells. *J Tissue Eng Regen Med.* **11**:58-65.

Niu Y, Wang C, Xiong Q, Yang X, Chi D, Li P, Liu H, Li J, Huang R. 2015. Distribution and content of lipid droplets and mitochondria in pig parthenogenetically activated embryos after delipitation. *Theriogenology.* **83**:131-138.

Oi A, Tasaki H, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. 2015. Effects of reaggregated granulosa cells and oocytes derived from early antral follicles on the properties of oocytes grown in vitro. *J Reprod Dev.* **61**:191-197.

Pelham RJ Jr, Wang Y. 1997. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:13661-13665.

Racedo SE, Wrenzycki C, Lepikhov K, Salamone D, Walter J, Niemann H. Epigenetic modifications and related mRNA expression during bovine oocyte in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev.* **21**:738-748.

Ritter LJ, Sugimura S, Gilchrist RB. 2015. Oocyte induction of EGF responsiveness in somatic cells is associated with the acquisition of porcine oocyte developmental competence. *Endocrinology.* **156**:2299-2312.

Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010. edgeR: a Bioconductor package for

differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. **26**:139-140.

Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. 2010. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biol Reprod*. **82**:1021-1029.

Sakamoto A, Iwata H, Sato H, Hayashi T, Kuwayama T, Monji Y. 2006. Effect of modification of ovary preservation solution by adding glucose on the maturation and development of pig oocytes after prolonged storage. *J Reprod Dev*. **52**:669-674.

Shi L, Tu BP. 2015. Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. *Curr Opin Cell Biol*. **33**:125-131.

Shibahara H, Ishiguro A, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. 2019. Follicular factors determining the developmental competence of porcine oocyte. *Reprod Med Biol*. **18**:256-262.

Shiratsuki S, Hara T, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. 2016. Low oxygen level increases proliferation and metabolic changes in bovine granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*. **437**:75-85.

Silva RC, Bao SN, Jivago JL, Lucci CM. 2011. Ultrastructural characterization of porcine oocytes and adjacent follicular cells during follicle development: lipid component evolution. *Theriogenology*. **76**:1647-1657.

Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçaves PB, Wolf E. 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod.* **64**:904-909.

Sturmey RG, O'Toole PJ, Leese HJ. 2006. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial: lipid association in the porcine oocyte. *Reproduction.* **132**:829-837.

Sugiyama M, Sumiya M, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. 2016. Addition of granulosa cell mass to the culture medium of oocytes derived from early antral follicles increases oocyte growth, ATP content, and acetylation of H4K12. *Zygote.* **24**:848-856.

Sutton-McDowall ML, Wu LL, Purdey M, Abell AD, Goldys EM, MacMillan KL, Thompson JG, Robker RL. 2016. Nonesterified Fatty Acid-Induced Endoplasmic Reticulum Stress in Cattle Cumulus Oocyte Complexes Alters Cell Metabolism and Developmental Competence. *Biol Reprod.* **94**:23.

Syed S, Karadaghy A, Zustiak S. 2015. Simple polyacrylamide-based multiwell stiffness assay for the study of stiffness-dependent cell responses. *J Vis Exp.* **97**.

Takeo S, Kimura K, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. 2017. Age-associated deterioration in follicular fluid induces a decline in bovine oocyte quality. *Reprod Fertil*

Dev. **29**:759-767.

Tamassia M, Nuttinck F, May-Panloup P, Reynier P, Heyman Y, Charpigny G, Stojkovic M, Hiendleder S, Renard JP, Chastant-Maillard S. 2004. In vitro embryo production efficiency in cattle and its association with oocyte adenosine triphosphate content, quantity of mitochondrial DNA, and mitochondrial DNA haplogroup. *Biol Reprod.* **71**:697-704.

Tan J, Zou Y, Wu XW, Tian LF, Su Q, He JX, Huang ZH, Zhao Y, Wu LP, Wu QF. 2017. Increased SCF in follicular fluid and granulosa cells positively correlates with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in Humans. *Reprod Sci.* **24**:1544-1550.

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.

Tasaki H, Munakata H, Arai S, Murakami S, Kuwayama T, Iwata H. 2015. The effect of high glucose concentration on the quality of oocytes derived from different growth stages of follicles. *J Mamm Ova Res.* **32**:41-49.

Tilly JL, Niikura Y, Rueda BR. 2009. The current status of evidence for and against postnatal oogenesis in mammals: a case of ovarian optimism versus pessimism? *Biol Reprod.* **80**:2-12.

Tremblay JJ, Viger RS. 2003. Transcription factor GATA-4 is activated by phosphorylation of serine 261 via the cAMP/protein kinase a signaling pathway in gonadal cells. *J Biol Chem.* **278**:22128-22135.

Van Blerkom J, Davis PW, Lee J. 1995. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod.* **10**:415-424.

van den Berg IM, Eleveld C, van der Hoeven M, Birnie E, Steegers EA, Galjaard RJ, Laven JS, van Doorninck JH. 2011. Defective deacetylation of histone 4 K12 in human oocytes is associated with advanced maternal age and chromosome misalignment. *Hum Reprod.* **26**:1181-1190.

Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. 2009. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science.* **324**:1076-1080.

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.

Yamochi T, Hashimoto S, Yamanaka M, Nakaoka Y, Morimoto Y. 2017. Optimum culture duration for growing oocytes to attain meiotic and fertilization competence. *J Reprod Dev.* **63**:591-595.

Yoon KW, Shin TY, Park JI, Roh S, Lim JM, Lee BC, Hwang WS, Lee ES. 2000. Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids. *Reprod Fertil Dev.* **12**:133-139.

Yoshioka K, Suzuki C, Onishi A. 2008. Defined system for in vitro production of porcine embryos using a single basic medium. *J Reprod Dev.* **54**:208-213.