

— 総説 —

特集：日本受精着床学会／日本卵子学会合同シンポジウム 2020

卵分泌因子による卵巣顆粒膜細胞の分化制御機構

Control of granulosa cell development by oocyte-derived paracrine factors

伊藤 遥・杉浦 幸二*

Haruka Ito and Koji Sugiura*

東京大学大学院農学生命科学研究科 〒113-8657 文京区

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

要旨：卵巣卵胞は、卵母細胞とその周囲を取り囲む顆粒膜細胞などの体細胞で構成される。発達した胞状卵胞では、顆粒膜細胞は、卵母細胞を取り囲む卵丘細胞と、卵胞壁を裏打ちする壁顆粒膜細胞とに区別される。卵丘細胞は卵母細胞の発達支持に特化した細胞であり、壁顆粒膜細胞は、女性ホルモン産生など卵胞の内分泌機能を担う。卵母細胞は、多種の増殖因子を分泌することで、これらの細胞の分化や機能制御に重要な役割を果たす。本稿では、この卵分泌因子による顆粒膜細胞分化制御について、最近の知見を筆者らの研究を交えて紹介する。

キーワード：卵母細胞、壁顆粒膜細胞、卵丘細胞、FOXL2

Abstract: Ovarian follicles consist of oocytes and somatic cells such as granulosa cells. In well-developed antral follicles, granulosa cells are sub-divided into cumulus cells associated with oocytes, and mural granulosa cells lining the follicular wall. Cumulus cells are specialized to support oocyte development, whereas mural granulosa cells carry out endocrine functions such as estrogen production. Oocytes produce several growth factors to regulate the development and function of these granulosa cell populations. This review introduces current knowledge regarding the mechanisms of how oocyte-derived paracrine factors regulate granulosa cell development.

Key words: Oocytes, Mural granulosa cells, Cumulus cells, FOXL2

はじめに

卵巣は、女性ホルモンの生産などの内分泌機能と、配偶子である卵母細胞の生産機能を担う重要な臓器である。卵巣がこれらの機能を正常に果たすには、卵巣の卵胞組織が正常に発達して機能することが必要だが、これには卵母細胞が中心的な役割を果たす。実際、マウスにおいて、発達段階の異なる卵胞から卵母細胞と体細胞をそれぞれ回収し、実験的に卵胞を再構築すると、卵胞の発達段階は体細胞ではなく卵母細胞の発達段階と同調するようになる¹⁾。すなわち、卵胞の発達段階は、卵母細胞が決定しているのであり、これ

は、卵母細胞の発達段階に応じた卵胞環境を構築するための重要なメカニズムである。

卵母細胞がどのように卵胞の発達を制御しているのかについて、これまでに多くの研究が行われてきた。それらにより、卵母細胞は多種の増殖因子を分泌し、周囲の体細胞(顆粒膜細胞)の分化や機能に影響を及ぼすことで、卵胞の発達制御を行うことが明らかとなってきた。本稿では、この「卵分泌因子」による顆粒膜細胞の分化制御について、筆者らの研究成果を交えて紹介する。

卵胞発育と顆粒膜細胞の分化

卵巣卵胞の発達は、原始卵胞の形成から始まる(図1)。原始卵胞は、未発達な卵母細胞を一層の扁平な卵胞上皮細胞が取り囲む構造をしている。動物種により具体的な数は異なるが、卵巣には数万から数百万の原始卵胞が静止状態で存在しており、これは動物が生涯にわたって生産(排卵)する卵母細胞のプールであると考えられている。静止状態に

(受付 2020年11月30日／受理 2020年12月7日)

別刷請求先：〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

東京大学大学院農学生命科学研究科

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: aks@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

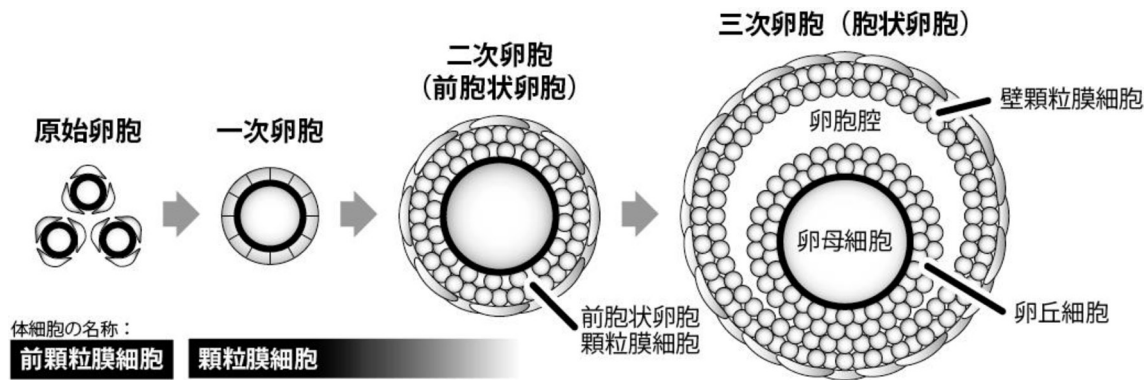


図1 卵胞発育と顆粒膜細胞分化

あった原始卵胞の一部が発育を開始し(「活性化」という)、一次卵胞へと発達すると、卵母細胞は成長をはじめ、周囲の卵胞上皮細胞は立方状の形態へと変化する。この時期から、卵母細胞周囲の体細胞は「顆粒膜細胞 (granulosa cells)」と呼ばれるようになる。これに対して、原始卵胞を構成する卵胞上皮細胞は「前顆粒膜細胞 (pre-granulosa cells)」とも呼ばれる。一次卵胞の顆粒膜細胞が増殖を続け、複数の細胞層が形成された卵胞は二次卵胞と呼ばれ、この時期から顆粒膜細胞は球状の形態を取るようになる。その後、二次卵胞が三次卵胞へ発育すると、卵胞内部に液体で満たされた卵胞腔と呼ばれる空洞が形成される。このため三次卵胞は「胞状卵胞 (antral follicles)」とも呼ばれ、これに対応して二次卵胞は「前胞状卵胞 (pre-antral follicles)」と呼ばれる。胞状卵胞がさらに発育し、適切な時期に黄体形成ホルモン (LH) の刺激があると排卵が誘起される。

胞状卵胞では卵胞腔の形成にともない、顆粒膜細胞が「卵丘細胞 (cumulus cells)」と「壁顆粒膜細胞 (mural granulosa cells)」という2種のサブポピュレーションに区別できるようになる。卵丘細胞は卵母細胞の近傍に存在し、主に卵母細胞の発達支持に特化した機能を担う。一方、壁顆粒膜細胞は卵胞壁を裏打ちし、女性ホルモンの産生など、主に卵胞の内分泌機能を担う細胞である。これら胞状卵胞の顆粒膜細胞に対して、二次卵胞 (前胞状卵胞) の顆粒膜細胞は「前胞状卵胞顆粒膜細胞 (pre-antral granulosa cells)」とも呼ばれる。卵丘細胞と壁顆粒膜細胞は、個体において卵巣が担う卵母細胞生産機能と内分泌機能をそれぞれ担う細胞であり、これらの細胞が適切に分化して機能することが、卵巣が正常に機能するために必須である。

卵母細胞と卵丘細胞間の双方向な コミュニケーション

前述したように、卵丘細胞は卵母細胞の発達支持に特化した細胞である。卵丘細胞は、卵母細胞とギャップジャンクションと呼ばれる特殊な膜構造を介してつながっており、代謝産物などの小分子物質を供給することで卵母細胞の発

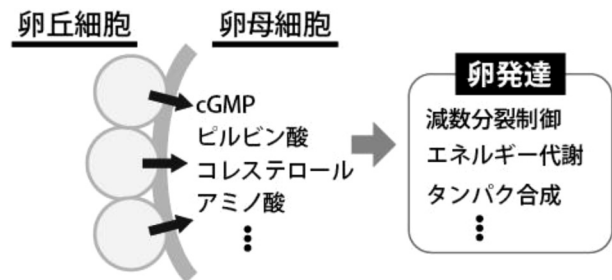


図2 卵丘細胞による卵発達支持

達をサポートする (図2)。例えば、卵母細胞は解糖系の酵素を発現しておらず、このため、エネルギー基質としてグルコースを効率的に利用できない²⁾。一方、卵丘細胞は高い解糖活性を持っており、グルコースを積極的に代謝してその代謝産物 (ビルビン酸など) を卵母細胞へ供給することで、卵母細胞のエネルギー代謝をサポートしている^{3, 4)}。同様に卵丘細胞は、ある種のアミノ酸やコレステロールなど卵母細胞が自身で取り込むことができない、または産生することができない物質を卵母細胞へ供給して、卵母細胞の発達を助ける⁵⁻⁷⁾。加えて卵丘細胞は、卵母細胞での転写制御⁸⁾、pHの調整⁹⁾、さらに減数分裂制御¹⁰⁾などにも重要な役割を果たしている。

一方、卵母細胞も卵丘細胞から供給される物質を一方的に享受するわけではなく、多種の増殖因子を分泌することで周囲の卵丘細胞の分化や機能に影響を与えている。例えば、卵母細胞は顆粒膜細胞の増殖^{11, 12)}、ステロイド産生^{13, 14)}、さらに少なくともマウスでは、正常な排卵に必須の現象である卵丘膨化を制御している^{15, 16)}。また、前述の卵丘細胞での解糖やアミノ酸取り込み、コレステロール産生も、卵母細胞による制御を受ける^{7, 17, 18)}。さらに卵母細胞の減数分裂制御には、卵丘細胞から供給されるcGMPが必須であり、卵丘細胞におけるcGMP産生は卵母細胞由来の因子によって制御されている¹⁹⁾。

このように、卵母細胞は分泌因子を介して卵丘細胞の分化や機能を制御する一方で、卵丘細胞は卵母細胞の正常な発達をサポートする。これは「卵母細胞-卵丘細胞間の双方向コミュニケーション」と呼ばれ、卵母細胞と卵丘細胞が正常に発達するための必須のメカニズムである。

卵分泌因子

以下では、卵母細胞-卵丘細胞間の双方向コミュニケーションに関与する卵分泌因子について、マウスでの知見を中心に概説する。

TGF (Transforming growth factor) βスーパーファミリー

卵分泌因子の中で最も広く研究されているのが、GDF9 (Growth differentiation factor 9) や BMP15 (Bone morphogenetic protein 15) などに代表される TGFβ スーパーファミリーに属する増殖因子である。

マウスやラットにおいて、原始卵胞の卵母細胞で GDF9 の発現が報告されており²⁰⁻²²⁾、*Gdf9* 遺伝子を欠損したマウスでは、卵胞発育が一次卵胞で停止してしまい不妊となる^{23, 24)}。ラットに GDF9 合成タンパク質を投与した研究において、一次卵胞形成が促進されること^{25, 26)}、また、ヒトの卵巣組織培養においても、GDF9 合成タンパク質の添加により、二次卵胞数が増加することが報告されている²⁷⁾。したがって、GDF9 は、卵胞発育の初期段階において、卵胞発育を促進する機能を持っていると考えられる。ちなみに、*Gdf9* 欠損マウスにおける一次卵胞での卵胞発育停止は、顆粒膜細胞の増殖を抑制するインヒビンの過剰生産のためである。実際、*Gdf9* 欠損に加えてインヒビンα遺伝子を欠損したマウス卵巣では、卵胞発育停止は観察されず、二次卵胞以降へ発育するようになる。しかし、このマウスは、最終的には顆粒膜細胞腫を形成して不妊となってしまう²⁸⁾。

Gdf9 欠損マウスで卵胞発育が初期段階で停止してしまうことから、発育途上の卵胞における GDF9 の機能は、主に合成タンパク質を用いて行われてきた。それらの研究により、GDF9 は顆粒膜細胞の増殖を促進し^{29, 30)}、卵丘細胞での黄体形成ホルモン受容体 (LHCGR) の発現を抑制³¹⁾、さらに卵丘膨化を促進するなど³¹⁾、マウス顆粒膜細胞の分化・機能制御に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。また、GDF9 合成タンパク質の添加により卵母細胞の発育能が向上することが、ウシをモデルとした研究で報告されている³²⁾。

卵母細胞由来の TGFβ スーパーファミリー因子は、GDF9 の他にも BMP15 や BMP6 が知られる。*Bmp15* 遺伝子を欠損したマウスでは、卵胞の発育動態に顕著な異常は観察されないものの、排卵数や受精率が低下し、メスの低妊孕性を示す³³⁾。また、*Bmp6* 欠損や、*Bmp15* と *Bmp6* 両遺伝子を欠損したマウスにおいても、妊孕性の低下はみられるものの、卵胞発育動態などに顕著な異常はない³⁴⁾。一方、BMP の細胞内シグナル伝達を担う SMAD1/5/8 の遺伝子を欠損したマ

ウス卵巣は、顆粒膜細胞腫を形成し、最終的にメス不妊を示す^{35, 36)}。また、顆粒膜細胞での BMP 受容体遺伝子 (*Bmpr1b*) を欠損したマウスでは、卵丘細胞の機能異常により不妊となる³⁷⁾。これらのことから、マウスにおいては卵母細胞由来の BMP15 や BMP6 に加えて、卵胞内の他の細胞で産生される BMP が総合して卵胞内 BMP シグナルを形成しており、この総合的な卵胞内 BMP シグナルが正常なメス妊孕性に必須であると考えられる。一方、興味深いことに、*BMP15* 遺伝子のホモ接合型変異を持つヒツジは不妊となるが、ヘテロ接合型の変異では排卵数が増加して妊孕性が向上する³⁸⁾。同様に、*BMP15* の受容体遺伝子に変異を持つヒツジは妊孕性が向上する³⁹⁻⁴¹⁾。このように、卵巣の発達やメス妊孕性に対する BMP シグナルの重要性は哺乳類種間で大きな違いがある。

ヒトにおいても、*BMP15* や *GDF9* のある種の遺伝子変異が、早発性卵巣不全や多嚢胞性卵巣症候群の女性において有意に多いことが報告されている⁴¹⁻⁴³⁾。さらに、*GDF9* の変異が二卵性の双子をもつ母親に有意に多いなど、*BMP15* と *GDF9* がヒトにおいても妊孕性に関連していることが示唆されている^{44, 45)}。

卵丘細胞の発達制御において、*BMP15* と *GDF9* が相乗的に機能する例が多く報告されている。例えば、前述のように *Bmp15* 欠損マウスでは、比較的軽度な卵巣表現型を示すのみであるが、*Bmp15* 欠損に加えて *Gdf9* をヘテロで欠損したマウス (*Bmp15*^{-/-}/*Gdf9*^{+/-}) では、より重度の卵巣異常を示し不妊となる³³⁾。また最近の研究では、胞状卵胞における卵胞腔の形成にも *BMP15* と *GDF9* が必要であることがウシの卵巣器官培養において報告されている^{46, 47)}。*BMP15* と *GDF9* がこのように相乗的に働くメカニズムは不明な点が多いが、最近の研究により、*BMP15* と *GDF9* はそれぞれ単体で機能するのではなく、それらが結合したヘテロ二量体として機能することが明らかとなりつつある^{48, 49)}。この *BMP15*/*GDF9* ヘテロ二量体はキュムリンと呼ばれ、*BMP15* や *GDF9* のホモ二量体と比較して高い活性を有している。このキュムリンは、マウス卵母細胞の成熟培養に添加することで、卵母細胞の発育能を向上させられることが報告されており⁵⁰⁾、家畜の卵母細胞の発育能向上や、ヒト不妊治療への応用が期待されている。

線維芽細胞増殖因子

哺乳類の卵母細胞が分泌するもう一つの増殖因子ファミリーは、線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor : FGF) ファミリーである。

マウス、ウシ、ヒトの卵母細胞が FGF8 を発現しており^{17, 51, 52)}、また、マウス、ラット、ウシ、ヒトを含む多くの哺乳類の顆粒膜細胞において FGF 受容体の発現が報告されている⁵³⁻⁵⁷⁾。FGF 受容体に変異を持つマウスでは、メスの妊孕性低下がみられ⁵⁸⁻⁶¹⁾、FGF シグナルが正常な妊孕性に必要であることが示唆されている。

マウスの卵母細胞が卵丘細胞での解糖系を促進し、その

代謝産物を自身のエネルギー代謝基質として利用していることは前述したが、この卵丘細胞での解糖系を制御する卵分泌因子の一つがFGF8である¹⁷⁾。FGF8は、BMP15と協力して卵丘細胞における解糖酵素発現を促進することで、卵丘細胞での解糖活性を高める。このFGF8とBMP15の協調的な作用には、FGFシグナル阻害タンパク質であるSPRY2の関与が示唆されている⁶²⁾。

FGF8とBMPシグナルとの協調的な作用は、ラットにおいても報告されている。ラット顆粒膜細胞においてFGF8は、BMPシグナル下流の遺伝子発現を促進し、さらにBMPシグナルがFSHの作用へ与える影響を増強させるなど、顆粒膜細胞でのBMPシグナル増強に働くことが報告されている⁶³⁾。

このように、卵由来FGFシグナルの顆粒膜細胞機能制御への重要性が示唆されている。しかし、卵母細胞でのFGF8発現や、顆粒膜細胞でのFGF受容体の発現を特異的に欠損させたモデル動物の解析はこれまで行われていないため、卵由来FGFシグナルの異常が具体的にどのような卵巣異常を呈するのかなど未解明な点も多い。

卵丘細胞と壁顆粒膜細胞の分化制御メカニズム

前胞状卵胞から胞状卵胞の移行期において、卵母細胞は卵分泌因子を介して近傍の前胞状卵胞顆粒膜細胞を卵丘細胞へと分化させる。一方、前胞状卵胞顆粒膜細胞のうち卵母細胞から比較的遠くに存在するものは、卵母細胞の影響を受けず壁顆粒膜細胞へと分化していく。このとき、壁顆粒膜細胞の分化には下垂体からの卵胞刺激ホルモン (FSH) が重要である。卵胞の外側からのFSHのシグナルと卵胞の内側からの卵分泌因子シグナルという、二つの逆方向からの分泌シグナルのグラデーションによって壁顆粒膜細胞と卵丘細胞の分化運命が決定され、さらに、その機能が制御されていると考えられている (図3)⁶⁴⁾。このように、卵丘細胞と壁顆粒膜細胞の分化運命を決定付ける細胞外環境は明らかになりつつある一方で、これらの細胞内でどのように細胞分化の運命付けが決定され制御されているのか、また、分化した細胞の機能は細胞内でどのように維持・制御されているのかについては多くは理解されていない。

細胞内に存在するmRNAなどの転写産物の全体 (トランスクリプトーム) を網羅的に解析するトランスクリプトーム解析は、細胞内でどのような現象が起こって細胞の分化や機能などが制御されるのかを理解するうえで有用な方法である。我々はこれまでに、トランスクリプトーム解析によって卵丘細胞と壁顆粒膜細胞の分化過程や、それらの細胞の機能制御メカニズムの解明を試みてきた^{7, 65-67)}。それによると、卵丘細胞と壁顆粒膜細胞では3,000以上の遺伝子発現に有意な差が存在する⁶⁶⁾。卵丘細胞で発現の高い遺伝子群には、細胞増殖や、解糖系やコレステロール産生などの代謝に関連したものが多く一方、壁顆粒膜細胞ではステロイド産生関連の遺伝子群の発現が高い。また、このトランスクリプトーム解析結果を、前述した*Bmp15*^{-/-}/*Gdf9*^{+/-}マウスと

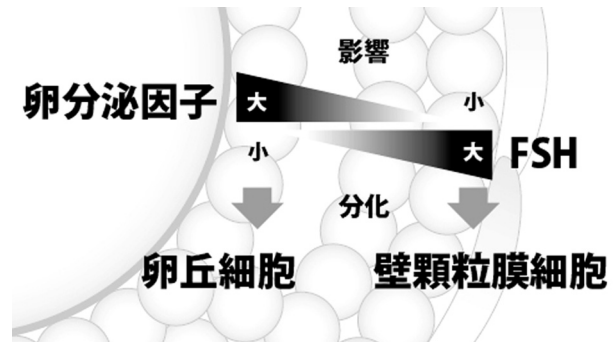


図3 卵丘細胞・壁顆粒膜細胞分化機構

野生型マウスの卵丘細胞における遺伝子発現の違いや⁷⁾、卵丘細胞を卵分泌因子で刺激した際の遺伝子発現の変化を解析したトランスクリプトーム解析結果と比較したところ⁶⁵⁾、卵丘細胞で壁顆粒膜細胞と比較して有意に発現が高い遺伝子の約半数は、卵母細胞による制御を直接受けていると考えられた⁶⁶⁾。このことも、卵丘細胞の分化に対する卵分泌因子の重要性を強く支持するものである。

卵丘細胞と壁顆粒膜細胞の分化を決定づける

転写レギュレーター：FOXL2

では、上記のような卵丘細胞と壁顆粒膜細胞間でのトランスクリプトームの違いはどのように構築されているのだろうか？我々は、上記のトランスクリプトーム解析をもとに、卵丘細胞と壁顆粒膜細胞での遺伝子発現の違いを決定付ける「転写レギュレーター」の探索を行った⁶⁷⁾。ここでいう「転写レギュレーター」とは、転写制御因子やそのコファクター、転写制御にかかわるエピジェネティック制御因子などである。その結果、FOXL2 (Forkhead box L2) と呼ばれる転写制御因子が、壁顆粒膜細胞の分化運命の決定づけに非常に重要であることを見出した。

FOXL2は、卵巣の正常な発達や機能に必須の転写因子として知られている。*Foxl2*欠損マウス卵巣では、原始卵胞から一次卵胞への移行時期での顆粒膜細胞の発達が正常に起こらずに不妊となる^{68, 69)}。また、性成熟に達したマウス個体卵巣で*Foxl2*遺伝子を欠損させると、顆粒膜細胞が「性的」に分化転換し、精巣のセルトリ細胞様の細胞へと変化してしまう⁷⁰⁾。ヒトにおいてFOXL2遺伝子変異は眼瞼裂狭小・眼瞼下垂・逆内眼角贅皮症候群の原因として知られるが、この症候群では早発卵巣不全を伴う場合がある⁷¹⁾。さらに、成人型の顆粒膜細胞腫の約97%において、FOXL2遺伝子の変異がみられる^{72, 73)}。これらのことから、FOXL2は前胞状卵胞顆粒膜細胞、卵丘細胞、壁顆粒膜細胞など、一次卵胞以降のすべての顆粒膜細胞サブポピュレーションの発達や機能維持に必須の転写因子と考えられてきた。

我々の解析により、このFOXL2は壁顆粒膜細胞の発達にともなって発現が上昇する一方で、卵丘細胞では卵分泌因

子の作用により発現が低く維持されることが明らかとなった。実際、FOXL2による発現制御の標的遺伝子は、壁顆粒膜細胞で軒並み発現が高く、卵丘細胞では低く抑えられていた。この壁顆粒膜細胞と卵丘細胞間でのFOXL2発現の差が、これら2種の細胞におけるトランスクリプトームの違いを生み出す(すなわち、別の細胞へと分化させる)一因であると考えられる。この解析では、FOXL2などの転写因子の以外にも、ポリコーム群タンパク質などのエピジェネティック制御因子の発現も、卵丘細胞と壁顆粒膜細胞間で差があることが明らかとなり、このようなエピジェネティック制御もこれらの細胞の分化運命の決定に関与することが示唆される。今後これらの因子に注目し、より詳細な解析を行っていくことで、卵丘細胞と壁顆粒膜細胞の分化運命を決定付ける細胞内メカニズムの解明が期待される。

おわりに

卵母細胞の発達に、周囲の顆粒膜細胞からの栄養供給が重要である可能性は100年以上前にはすでに言及されていた⁷⁴⁾。その後の多くの研究により、現在では、顆粒膜細胞の果たす役割やその分化制御の多くが明らかとなりつつある。これらの研究成果は、女性の不妊治療技術などの発展に多大なる貢献をしてきた。一方で、未解明の問題は山積しているが、昨今の次世代シーケンス技術やゲノム編集技術の発展など、研究技術の発展は目覚ましく、研究の流れは大きく加速している。顆粒膜細胞の分化制御研究においても、こういった新たな技術を取り込んだ研究成果が多く発表されており、今後さらなる理解と発展が期待される。

文 献

- 1) Eppig, J.J., Wigglesworth, K. and Pendola, F.L. (2002): The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 99, 2890–2894.
- 2) Biggers, J.D., Whittingham, D.G. and Donahue, R.P. (1967): The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 58, 560–567.
- 3) Donahue, R.P. and Stern, S. (1968): Follicular cell support of oocyte maturation: production of pyruvate in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 17, 395–398.
- 4) Leese, H.J. and Barton, A.M. (1985): Production of pyruvate by isolated mouse cumulus cells. *J. Exp. Zool.*, 234, 231–236.
- 5) Colonna, R. and Mangia, F. (1983): Mechanisms of amino acid uptake in cumulus-enclosed mouse oocytes. *Biol. Reprod.*, 28, 797–803.
- 6) Haghighat, N. and Van Winkle, L.J. (1990): Developmental change in follicular cell-enhanced amino acid uptake into mouse oocytes that depends on intact gap junctions and transport system Gly. *J. Exp. Zool.*, 253, 71–82.
- 7) Su, Y.Q., Sugiura, K., Wigglesworth, K., O'Brien, M.J., Affourtit, J.P., Pangas, S.A., Matzuk, M.M. and Eppig, J.J. (2008): Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*, 135, 111–121.
- 8) De La Fuente, R. and Eppig, J.J. (2001): Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. *Dev. Biol.*, 229, 224–236.
- 9) Fitzharris, G. and Baltz, J.M. (2006): Granulosa cells regulate intracellular pH of the murine growing oocyte via gap junctions: development of independent homeostasis during oocyte growth. *Development*, 133, 591–599.
- 10) Norris, R.P., Ratzan, W.J., Freudzon, M., Mehlmann, L.M., Krall, J., Movsesian, M.A., Wang, H., Ke, H., Nikolaev, V.O. and Jaffe, L.A. (2009): Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*, 136, 1869–1878.
- 11) Vanderhyden, B.C., Telfer, E.E. and Eppig, J.J. (1992): Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles in vitro. *Biol. Reprod.*, 46, 1196–1204.
- 12) Lanuza, G.M., Fischman, M.L. and Baranao, J.L. (1998): Growth promoting activity of oocytes on granulosa cells is decreased upon meiotic maturation. *Dev. Biol.*, 197, 129–139.
- 13) Vanderhyden, B.C., Cohen, J.N. and Morley, P. (1993): Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology*, 133, 423–436.
- 14) Vanderhyden, B.C. and Tonary, A.M. (1995): Differential regulation of progesterone and estradiol production by mouse cumulus and mural granulosa cells by A factor(s) secreted by the oocyte. *Biol. Reprod.*, 53, 1243–1250.
- 15) Buccione, R., Vanderhyden, B.C., Caron, P.J. and Eppig, J.J. (1990): 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.
- 16) Salustri, A., Ulisse, S., Yanagishita, M. and Hascall, V.C. (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.
- 17) Sugiura, K., Su, Y.Q., Diaz, F.J., Pangas, S.A., Sharma, S., Wigglesworth, K., O'Brien, M.J., Matzuk, M.M., Shimasaki, S. and Eppig, J.J. (2007): Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development*, 134, 2593–2603.
- 18) Eppig, J.J., Pendola, F.L., Wigglesworth, K. and Pendola, J.K. (2005): Mouse oocytes regulate metabolic cooperativity between granulosa cells and oocytes: amino acid transport. *Biol. Reprod.*, 73, 351–357.
- 19) Zhang, M., Su, Y.Q., Sugiura, K. and Eppig, J.J.

- (2010): Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science*, 330, 366–369.
- 20) McGrath, S.A., Esquela, A.F. and Lee, S.J. (1995): Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol. Endocrinol.*, 9, 131–136.
 - 21) Laitinen, M., Vuojolainen, K., Jaatinen, R., Ketola, I., Aaltonen, J., Lehtonen, E., Heikinheimo, M. and 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.
 - 22) Jaatinen, R., Laitinen, M.P., Vuojolainen, K., Aaltonen, J., Louhio, H., Heikinheimo, K., Lehtonen, E. and 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.
 - 23) Dong, J., Albertini, D.F., Nishimori, K., Kumar, T.R., Lu, N. and Matzuk, M.M. (1996): Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383, 531–535.
 - 24) Carabatsos, M.J., Elvin, J., Matzuk, M.M. and Albertini, D.F. (1998): Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Dev. Biol.*, 204, 373–384.
 - 25) Vitt, U.A., McGee, E.A., Hayashi, M. and Hsueh, A.J. (2000): 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.
 - 26) Nilsson, E.E. and Skinner, M.K. (2002): Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biol. Reprod.*, 67, 1018–1024.
 - 27) Hreinsson, J.G., Scott, J.E., Rasmussen, C., Swahn, M.L., Hsueh, A.J. and 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.
 - 28) Wu, X., Chen, L., Brown, C.A., Yan, C. and Matzuk, M.M. (2004): Interrelationship of growth differentiation factor 9 and inhibin in early folliculogenesis and ovarian tumorigenesis in mice. *Mol. Endocrinol.*, 18, 1509–1519.
 - 29) Vitt, U.A., Hayashi, M., Klein, C. and Hsueh, A.J. (2000): 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.
 - 30) Gilchrist, R.B., Ritter, L.J., Myllymaa, S., Kaivo-Oja, N., Dragovic, R.A., Hickey, T.E., Ritvos, O. and Mottershead, D.G. (2006): Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. *J. Cell Sci.*, 119, 3811–3821.
 - 31) Elvin, J.A., Clark, A.T., Wang, P., Wolfman, N.M. and Matzuk, M.M. (1999): Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol. Endocrinol.*, 13, 1035–1048.
 - 32) Hussein, T.S., Thompson, J.G. and Gilchrist, R.B. (2006): Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev. Biol.*, 296, 514–521.
 - 33) Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F.J., Elvin, J.A., Carino, C., Prasad, S.V., Skinner, S.S., Dunbar, B.S., Dube, J.L., Celeste, A.J. and Matzuk, M.M. (2001): Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol. Endocrinol.*, 15, 854–866.
 - 34) Sugiura, K., Su, Y.Q. and Eppig, J.J. (2010): Does bone morphogenetic protein 6 (BMP6) affect female fertility in the mouse? *Biol. Reprod.*, 83, 997–1004.
 - 35) Pangas, S.A., Li, X., Umans, L., Zwijsen, A., Huylebroeck, D., Gutierrez, C., Wang, D., Martin, J.F., Jamin, S.P., Behringer, R.R., Robertson, E.J. and Matzuk, M.M. (2008): Conditional deletion of Smad1 and Smad5 in somatic cells of male and female gonads leads to metastatic tumor development in mice. *Mol. Cell. Biol.*, 28, 248–257.
 - 36) Middlebrook, B.S., Eldin, K., Li, X., Shivasankaran, S. and Pangas, S.A. (2009): Smad1-Smad5 ovarian conditional knockout mice develop a disease profile similar to the juvenile form of human granulosa cell tumors. *Endocrinology*, 150, 5208–5217.
 - 37) Yi, S.E., LaPolt, P.S., Yoon, B.S., Chen, J.Y., Lu, J.K. and Lyons, K.M. (2001): The type I BMP receptor Bmpr1B is essential for female reproductive function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 98, 7994–7999.
 - 38) Galloway, S.M., McNatty, K.P., Cambridge, L.M., Laitinen, M.P., Juengel, J.L., Jokiranta, T.S., McLaren, R.J., Luoro, K., Dodds, K.G., Montgomery, G.W., Beattie, A.E., Davis, G.H. and 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.
 - 39) Wilson, T., Wu, X.Y., Juengel, J.L., Ross, I.K., Lumsden, J.M., Lord, E.A., Dodds, K.G., Walling, G.A., McEwan, J.C., O'Connell, A.R., McNatty, K.P. and Montgomery, G.W. (2001): Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein 1B receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 64, 1225–1235.
 - 40) Souza, C.J., MacDougall, C., Campbell, B.K., McNeilly, A.S. and Baird, D.T. (2001): The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. *J. Endocrinol.*, 169, R1–6.
 - 41) Mulsant, P., Lecerf, F., Fabre, S., Schibler, L., Monget, P., Lanneluc, I., Pisselet, C., Riquet, J., Monniaux, D., Callebaut, I., Cribeu, E., Thimonier, J., Teyssier, J., Bodin, L., Cognie, Y., Chitour, N. and Elsen, J.M. (2001): Mutation in bone morphogenetic protein receptor-1B is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. U S A, 98, 5104–5109.
- 42) Teixeira, Filho, F.L., Baracat, E.C., Lee, T.H., Suh, C.S., Matsui, M., Chang, R.J., Shimasaki, S. and Erickson, G.F. (2002): Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87, 1337–1344.
 - 43) Di Pasquale, E., Beck-Peccoz, P. and Persani, L. (2004): Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 75, 106–111.
 - 44) Montgomery, G.W., Zhao, Z.Z., Marsh, A.J., Mayne, R., Treloar, S.A., James, M., Martin, N.G., Boomsma, D.I. and Duffy, D.L. (2004): A deletion mutation in GDF9 in sisters with spontaneous DZ twins. *Twin Res.*, 7, 548–555.
 - 45) Palmer, J.S., Zhao, Z.Z., Hoekstra, C., Hayward, N.K., Webb, P.M., Whiteman, D.C., Martin, N.G., Boomsma, D.I., Duffy, D.L. and Montgomery, G.W. (2006): Novel variants in growth differentiation factor 9 in mothers of dizygotic twins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 91, 4713–4716.
 - 46) Alam, M.H. and Miyano, T. (2020): Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro. *Reprod. Med. Biol.*, 19, 13–23.
 - 47) Alam, M.H., Lee, J. and Miyano, T. (2018): GDF9 and BMP15 induce development of antrum-like structures by bovine granulosa cells without oocytes. *J. Reprod. Dev.*, 64, 423–431.
 - 48) Peng, J., Li, Q., Wigglesworth, K., Rangarajan, A., Kattamuri, C., Peterson, R.T., Eppig, J.J., Thompson, T.B. and Matzuk, M.M. (2012): Growth differentiation factor 9: bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 110, E776–785.
 - 49) Richani, D., Constance, K., Lien, S., Agapiou, D., Stocker, W.A., Hedger, M.P., Ledger, W.L., Thompson, J.G., Robertson, D.M., Mottershead, D.G., Walton, K.L., Harrison, C.A. and Gilchrist, R.B. (2019): Cumulin and FSH Cooperate to Regulate Inhibin B and Activin B Production by Human Granulosa-Lutein Cells In Vitro. *Endocrinology*, 160, 853–862.
 - 50) Stocker, W.A., Walton, K.L., Richani, D., Chan, K.L., Beilby, K.H., Finger, B.J., Green, M.P., Gilchrist, R.B. and Harrison, C.A. (2020): A variant of human growth differentiation factor-9 that improves oocyte developmental competence. *J. Biol. Chem.*, 295, 7981–7991.
 - 51) Valve, E., Penttila, T.L., Paranko, J. and Harkonen, P. (1997): FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 232, 173–177.
 - 52) Buratini, J. Jr., Teixeira, A.B., Costa, I.B., Glapinski, V.F., Pinto, M.G., Giometti, I.C., Barros, C.M., Cao, M., Nicola, E.S. and Price, C.A. (2005): Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction*, 130, 343–350.
 - 53) Asakai, R., Song, S.Y., Itoh, N., Yamakuni, T., Tamura, K. and Okamoto, R. (1994): Differential gene expression of fibroblast growth factor receptor isoforms in rat ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 104, 75–80.
 - 54) Ben-Haroush, A., Abir, R., Ao, A., Jin, S., Kessler-Icekson, G., Feldberg, D. and Fisch, B. (2005): Expression of basic fibroblast growth factor and its receptors in human ovarian follicles from adults and fetuses. *Fertil. Steril.*, 84(Suppl. 2), 1257–1268.
 - 55) Berisha, B., Sinowatz, F. and Schams, D. (2004): Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, 67, 162–171.
 - 56) Puscheck, E.E., Patel, Y. and Rappolee, D.A. (1997): Fibroblast growth factor receptor (FGFR)-4, but not FGFR-3 is expressed in the pregnant ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 132, 169–176.
 - 57) Furukawa, S., Matsuno, Y., Emori, C., Fujii, W., Naito, K. and Sugiura, K. (2014): Expression and regulation of FGF receptors in mouse granulosa cells. *J. Mamm. Ova Res.*, 31, 86–92.
 - 58) Chen, L., Li, D., Li, C., Engel, A. and Deng, C.X. (2003): A Ser252Trp [corrected] substitution in mouse fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) results in craniosynostosis. *Bone*, 33, 169–178.
 - 59) Amsterdam, A., Kannan, K., Givol, D., Yoshida, Y., Tajima, K. and Dantes, A. (2001): Apoptosis of granulosa cells and female infertility in achondroplastic mice expressing mutant fibroblast growth factor receptor 3G374R. *Mol. Endocrinol.*, 15, 1610–1623.
 - 60) Wang, Y., Spatz, M.K., Kannan, K., Hayk, H., Avivi, A., Gorivodsky, M., Pines, M., Yayon, A., Lonai, P. and Givol, D. (1999): A mouse model for achondroplasia produced by targeting fibroblast growth factor receptor 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 96, 4455–4460.
 - 61) Weinstein, M., Xu, X., Ohyama, K. and Deng, C.X. (1998): FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Development*, 125, 3615–3623.
 - 62) Sugiura, K., Su, Y.Q., Li, Q., Wigglesworth K., Matzuk, M.M. and Eppig, J.J. (2009): Fibroblast growth factors and epidermal growth factor cooperate with oocyte-derived members of the TGFbeta superfamily to regulate Spry2 mRNA levels in mouse cumulus cells. *Biol. Reprod.*, 81, 833–841.
 - 63) Miyoshi, T., Otsuka, F., Yamashita, M., Inagaki, K., Nakamura, E., Tsukamoto, N., Takeda, M., Suzuki, J. and Makino, H. (2010): Functional relationship between fibroblast growth factor-8 and bone morphogenetic proteins in regulating steroidogenesis by rat granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 325, 84–92.
 - 64) Diaz, F.J., Wigglesworth, K. and Eppig, J.J. (2007): Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *J. Cell Sci.*, 120, 1330–1340.

- 65) Emori, C., Wigglesworth, K., Fujii, W., Naito, K., Eppig, J.J. and Sugiura, K. (2013): Cooperative effects of 17beta-estradiol and oocyte-derived paracrine factors on the transcriptome of mouse cumulus cells. *Endocrinology*, 154, 4859–4872.
- 66) Wigglesworth, K., Lee, K.B., Emori, C., Sugiura, K. and Eppig, J.J. (2015): Transcriptomic diversification of developing cumulus and mural granulosa cells in mouse ovarian follicles. *Biol. Reprod.*, 92, 23.
- 67) Emori, C., Ito, H., Fujii, W., Naito, K. and Sugiura, K. (2020): Oocytes suppress FOXL2 expression in cumulus cells in micedagger. *Biol. Reprod.*, 103, 85–93.
- 68) Schmidt, D., Ovitt, C.E., Anlag, K., Fehsenfeld, S., Gredsted, L., Treier, A.C. and Treier, M. (2004): The murine winged-helix transcription factor *Foxl2* is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development*, 131, 933–942.
- 69) Uda, M., Ottolenghi, C., Crisponi, L., Garcia, J.E., Deiana, M., Kimber, W., Forabosco, A., Cao, A., Schlessinger, D. and Pilia, G. (2004): *Foxl2* disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum. Mol. Genet.*, 13, 1171–1181.
- 70) Uhlenhaut, N.H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., Treier, A.C., Klugmann, C., Klasen, C., Holter, N.I., Riethmacher, D., Schutz, G., Cooney, A.J., Lovell-Badge, R. and Treier, M. (2009): Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*, 139, 1130–1142.
- 71) Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., Bisceglia, L., Zelante, L., Nagaraja, R., Porcu, S., Ristaldi, M.S., Marzella, R., Rocchi, M., Nicolino, M., Lienhardt-Roussie, A., Nivelon, A., Verloes, A., Schlessinger, D., Gasparini, P., Bonneau, D., Cao, A. and Pilia, G. (2001): The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat. Genet.*, 27, 159–166.
- 72) Jamieson, S. and Fuller, P.J. (2012): Molecular pathogenesis of granulosa cell tumors of the ovary. *Endocr. Rev.*, 33, 109–144.
- 73) Shah, S.P., Kobel, M., Senz, J., Morin, R.D., Clarke, B.A., Wiegand, K.C., Leung, G., Zayed, A., Mehl, E., Kalloger, S.E., Sun, M., Giuliany, R., Yorida, E., Jones, S., Varhol, R., Swenerton, K.D., Miller, D., Clement, P.B., Crane, C., Madore, J., Provencher, D., Leung, P., DeFazio, A., Khattra, J., Turashvili, G., Zhao, Y., Zeng, T., Glover, J.N., Vanderhyden, B., Zhao, C., Parkinson, C.A., Jimenez-Linan, M., Bowtell, D.D., Mes-Masson, A.M., Brenton, J.D., Aparicio, S.A., Boyd, N., Hirst, M., Gilks, C.B., Marra, M. and Huntsman, D.G. (2009): Mutation of FOXL2 in granulosa-cell tumors of the ovary. *N. Engl. J. Med.*, 360, 2719–2729.
- 74) Paladino, G. (1890): I ponti intercellulari fra l'uovo ovarico e le cellule follicolari, et la formazione della zona pellucida. *Anat. Anz.*, 15, 254–259.