

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15052

研究課題名(和文) 分泌小胞エクソソームを介した臓器間コミュニケーションによる卵巣制御

研究課題名(英文) Regulation of ovarian functions through exosome-mediated inter-organ communications

研究代表者

杉浦 幸二 (Sugiura, Koji)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：20595623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：分泌小胞エクソソームは、様々な因子を内包し、細胞間の情報伝達を担う新規因子として注目されている。本研究では、卵巣以外の臓器から分泌されたエクソソームが卵巣内に到達し、卵巣機能を制御する可能性を検討することを目的とした。具体的には下記の研究成果が得られた。
ブタの卵巣卵胞内に存在するエクソソーム内のmRNAを、RNAシーケンス法により網羅的に解析し、卵胞エクソソームの少なくとも一部が卵巣外の臓器由来である可能性を明らかとした。
卵胞エクソソームが卵巣体細胞において、FSH下流のシグナル伝達を補助する役割を持つ可能性を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Extra-cellular vesicles, called exosomes, contain several bioactive materials, and are now considered as novel mediators of cell-to-cell communications. This study aimed to test a possibility that exosomes produced in organs other than ovaries regulate ovarian function. The results were as follows.

1. RNA-sequencing of transcripts in porcine follicular exosomes revealed a possibility that some of follicular exosomes were originated from organs other than ovaries.
2. Follicular exosomes promoted FSH signaling in ovarian somatic cells in culture.

研究分野：繁殖遺伝学

キーワード：卵巣卵胞

1. 研究開始当初の背景

動物の卵巢は、女性ホルモン生産などの内分泌機能と、配偶子である卵母細胞の生産を担う重要な臓器である。これらの卵巢の機能は、個体の栄養状態、周囲の環境やストレスなど多くの要因に影響を受けることが知られているが、具体的なメカニズムは理解されていない。

近年、エクソソームと呼ばれる 100 nm 程度の分泌小胞が細胞間コミュニケーションの新たな担い手として注目されている。エクソソームは多様な細胞から分泌され、mRNA やマイクロ RNA、タンパク質などを内包し、標的細胞に取り込まれてその細胞機能に影響を及ぼす。しかし、これらの知見の多くはがん細胞や培養細胞を用いた研究によるものであり、正常な組織の機能制御メカニズムにおけるエクソソームの役割については十分な知見は得られていない。

申請者はこれまで、卵巢の機能制御メカニズムを研究し、ブタの卵胞液（卵巢卵胞を満たす組織液）にエクソソームが存在すること（以下、「卵胞エクソソーム」）、また、この卵胞エクソソームは、卵巢卵胞を構成する体細胞を標的とすることを見出してきた。卵胞液の大部分は血清由来の成分であることから、この卵胞エクソソームは卵巢以外の臓器より血流を介して卵胞へ供給され、卵巢機能を制御している可能性がある。しかし、卵胞エクソソームが具体的にどの臓器（細胞）由来なのか、さらに卵胞においてどのような役割を果たすのか、その作用機序などは不明である。

2. 研究の目的

本申請では、エクソソームを介した他臓器による卵巢機能制御メカニズムの存在を検討することを目的とし、以下の研究項目を設定した。

- 卵胞エクソソームの由来臓器・組織を明らかにする。
- 卵胞エクソソームが卵巢体細胞に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

卵胞エクソソームの由来臓器の同定

エクソソームには、それを分泌した細胞のもつ mRNA が少なからず内包され、それらの中にはエクソソームを分泌した細胞種特異的な mRNA も含まれる。すなわち、エクソソームに内包された mRNA を調べることで、それを分泌した細胞を同定することが可能である。そこで、卵胞エクソソームに内包され

る mRNA を RNA シークエンス法により網羅的に解析し、組織特異的な mRNA 発現を探索した。

卵胞エクソソームの卵巢体細胞への影響の解析

前述した卵巢の 2 つの重要な機能、すなわち内分泌機能と卵母細胞生産機能は、それぞれ卵巢を構成する壁顆粒層細胞と卵丘細胞によって担われている。そこで、卵胞エクソソームがこれらの細胞に与える影響を、当該研究室保有のこれらの細胞の初代培養系をモデルとして解析した。

卵胞エクソソームに内包されるマイクロ RNA の網羅的解析

卵胞エクソソームが卵巢の発達やその機能を制御するメカニズムの一端を明らかにするために、卵胞エクソソームに内包されるマイクロ RNA を RNA シークエンス法により網羅的に解析した。

これらの解析により、卵胞エクソソームはどの臓器由来のものなのか、そして、それぞれの臓器由来のエクソソームが卵巢機能に与える影響とそのメカニズムを理解することが出来る。

4. 研究成果

卵胞エクソソームの由来臓器の同定

ブタ卵胞液より卵胞エクソソームを採取し、内包される mRNA について RNA シークエンス法により網羅的に解析を行った。またその際、卵胞を構成する体細胞の大部分を占める壁顆粒層細胞についても同様に解析を行った。

RNA シークエンスの結果、エクソソームでは約 14000 種、壁顆粒層細胞では約 13500 種の mRNA が検出された。

得られたシークエンス結果より、主成分分析を行ったところ、壁顆粒層細胞とエクソソーム内包の RNA 群は非常に近くに位置しており、卵胞エクソソームの多くは壁顆粒層細胞由来である可能性が考えられた。実際、*Fst*、*Inhba*、*Cyp19a1* (アロマターゼ) など顆粒層細胞特異的な mRNA が卵胞エクソソームにおいて確認された。

一方、エクソソームで検出された mRNA のうち約 10% は壁顆粒層細胞では検出されない、または顕著に発現が低いものであった。これらの中には卵胞を構成する莢膜細胞由来と考えられるものも含まれており、卵胞エクソソームの一部は莢膜細胞からも分泌されていると考えられた。

さらにこれらの壁顆粒層細胞では顕著に

発現が低い、または発現の検出されない mRNA の中には、卵巣以外の組織で特異的な高発現をすることの知られる mRNA も多く含まれており、卵巣エクソソームの一部はこれらの組織由来である可能性が示唆された。この結果は、卵巣以外の臓器から卵巣へのエクソソームを介した情報伝達が存在する可能性を示唆している。

卵巣エクソソームの卵巣体細胞への影響の解析

まず、卵丘細胞・卵子複合体において、卵巣刺激ホルモン (FSH) 誘導性の卵丘膨化現象に対するエクソソームの影響を調べた。卵丘膨化とは、排卵時に卵丘細胞がヒアルロン酸などを分泌して、文字通り卵丘細胞層が膨化する現象であり、正常な排卵に必須な重要な現象である。また、正常な卵丘膨化には、HAS2、PTGS2、TNFAIP6 などの遺伝子発現が必要である。

その結果、培養液への卵巣エクソソームの添加は卵丘膨化の程度に顕著な影響は及ばさなかったが、それに関連した HAS2 および TNFAIP6 の遺伝子発現に対して促進的に働くことが示唆された。

また、卵巣エクソソームは、FSH 刺激なしでは卵丘膨化に促進的な影響を示さなかったことから、卵巣エクソソームは卵丘細胞における FSH シグナルに何らかの影響を持つと考えられた。そこで、FSH の細胞内シグナル伝達を担う MAPK のリン酸化 (活性化) に対する卵巣エクソソームの影響を解析したところ、エクソソームの存在は卵丘細胞における MAPK のリン酸化を長期間維持することが明らかとなった。

さらに、ブタの卵巣エクソソームはマウスの卵丘細胞・卵子複合体に対して卵丘細胞の膨化促進能を持たず、エクソソーム機能に種差の存在が示唆された。

次に、壁顆粒層細胞においては、その機能制御に重要である TGF スーパーファミリー因子に関連する遺伝子発現に対する卵巣エクソソームの影響を解析した。その結果、TGF スーパーファミリー因子の受容体発現をエクソソームが抑制する可能性が明らかとなった。

卵巣エクソソームに内包されるマイクロ RNA の網羅的解析

卵巣エクソソームが卵巣体細胞に対して前述のような影響を持つメカニズムを理解するために、エクソソームに内包されるマイクロ RNA を RNA シークエンス法により網羅的に解析した。

その結果、ブタ卵巣エクソソームにこれまでにブタで報告のないものを多く含む 300 種

以上のマイクロ RNA が検出され、ブタ卵巣エクソソームも、他の動物種や組織のエクソソームと同様に小分子 RNA を多く含む特徴を有していることが明らかとなった。

ブタのマイクロ RNA の標的 mRNA については十分な知見の蓄積がないことから、ヒトのマイクロ RNA の標的 mRNA データを参考に、次に、これらのブタ卵巣エクソソームに検出されたマイクロ RNA についてその標的となる mRNA を解析した。

その結果、ブタ卵巣エクソソームには SPRY2 など、上記の MAPK 活性化に関連するタンパク質を標的とするマイクロ RNA が含まれていた。SPRY2 は我々の研究から、排卵期の卵丘膨化シグナルを促進することが示唆されており、前述のブタ卵巣エクソソームによる卵丘膨化促進のメカニズムを説明できる可能性がある。また、卵巣エクソソームには TGF スーパーファミリー因子受容体などを標的とするマイクロ RNA も多く含まれていた。卵巣エクソソームはこれらのマイクロ RNA を運ぶことで卵丘細胞、壁顆粒層細胞の機能を制御している可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Matsuno Y, Onuma A, Fujioka YA, Yasuhara K, Fujii F, Kunihiro N, Sugiura K
Effects of exosome-like vesicles on cumulus expansion in pigs in vitro
J Reprod Dev. 2017; 63: 51-58.
doi: 10.1262/jrd.2016-124.
査読有

[学会発表](計3件)

松野雄太、Dang Quoc Thuyet、藤井渉、大下誠一、内藤邦彦、杉浦幸二
Mouse granulosa cells secrete exosomes independently of oocyte regulation in vitro
第123回日本畜産学会(信州大学), 2017
(口頭発表) IIYS-03

Matsuno Y, Fujii W, Natio K, Sugiura K.
Mouse granulosa cells secrete functional extracellular vesicles in vitro
4th World Congress of Reproductive Biology (WCRB2017)
Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan
September 27-29, 2017
(oral and poster presentation; P1-62)

Ito H, Emori C, Fujii W, Naito K,

Sugiura K.

Possibility of transdifferentiating mouse granulosa cells into Sertoli-like cells in vitro.

4th World Congress of Reproductive Biology (WCRB2017)

Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan
September 27-29, 2017

(Poster presentation; P1-64)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 幸二 (SUGIURA, Koji)

東京大学・大学院農学生命科学研究科

・准教授

研究者番号：20595623

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし