

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03900

研究課題名(和文) 家畜繁殖障害の原因究明を目指した分泌小胞エクソソームによる卵巣制御機構の解明

研究課題名(英文) The study of the regulation of ovarian development and function by follicular exosome.

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) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、哺乳類卵巣に存在する分泌小胞エクソソームの多くは卵巣の壁顆粒層細胞由来であることが明らかとなった。この卵巣エクソソームは、卵巣の細胞に取り込まれ、卵母細胞の発達やホルモン産生に影響を及ぼす可能性が示唆された。また、卵巣の正常な発達には卵母細胞の分泌する因子(卵因子)が重要であるが、壁顆粒層細胞でのエクソソーム分泌は卵因子の影響を受けないことが明らかとなった。さらに、卵巣内のエクソソーム機能を研究するための遺伝子改変マウスモデルの作製を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣異常や疾患は動物のメスの繁殖障害の主要因の一つであるが、その発症メカニズムの多くは未だに不明である。本研究では、近年、新たな細胞間コミュニケーション因子として注目されるエクソソームに着目し、卵巣におけるその機能解析を行った。これは哺乳類卵巣の発達や機能制御メカニズムの理解という点で高い学術的意義を有している。さらに、本研究から得られた知見は、エクソソーム異常に起因する卵巣異常・疾患の同定につながることから、畜産など広い分野への応用可能なものである。

研究成果の概要(英文)：This study showed that ovarian follicular exosomes are mainly produced by ovarian mural granulosa cells (MGCs) in mammals. The follicular exosomes are taken-up by ovarian cells to regulate hormonal production and development of oocytes. Normal follicular development requires factors secreted from oocytes, but the oocyte factors show no effects on the exosome release by MGCs. Moreover, we have produced a mouse model for the study of exosome function in ovaries.

研究分野：繁殖遺伝学

キーワード：エクソソーム 卵巣

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣はメスの生殖システムの中核を担う重要な臓器であり、その異常はメスの成長異常や繁殖障害に直結する。卵巣の発達や制御メカニズムは盛んに研究され、家畜生産の向上や女性の不妊治療など、幅広い分野の発展に貢献してきた。それにもかかわらず、家畜や人において卵巣異常が起こるメカニズムの多くは未だ解明されていない。

エクソソームは、細胞が分泌する直径 100 nm 程度の膜小胞である。1980 年代には存在が報告され、当時はその分泌が細胞にとって不要な“ゴミ”を放出する手段であると考えられていた。しかし最近になって、エクソソームは 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、その細胞機能に影響を及ぼすことが明らかとなった。すなわち、エクソソームを介した細胞間の情報伝達では、非分泌性の分子さえも細胞間を移動して情報を伝達する。これは、革新的な概念として注目されている。

申請者は、これまで卵巣の発達や機能制御メカニズムを研究し、その過程で、ブタの卵胞液(卵巣卵胞を満たす組織液)には、エクソソーム(以下、「卵胞エクソソーム」)が存在することを報告した。さらに、マウス、ブタをモデルとした培養実験により、この卵胞エクソソームは卵巣の体細胞を標的とし、卵巣の発達や機能制御に関与していることを見出してきた。すなわち、未解明の卵巣異常や疾患の原因の一つとして、エクソソームに関連した制御異常の存在が疑われる。しかし、実際にエクソソーム制御異常が、個体レベルでどのような卵巣異常を呈するのかは不明である。また、複雑な卵胞成長・排卵制御におけるエクソソームの役割について、多くは未だわかっていない。

2. 研究の目的

以上の背景のもと、本研究では、卵胞エクソソームによる哺乳類卵巣制御を証明し、さらに、エクソソームの制御異常に起因する卵巣異常・疾患を同定するための遺伝子改変マウスモデルの作製およびその表現型解析を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、重要な家畜であるブタと、確立した実験モデルであるマウスを用いて研究を行った。ブタを用いる利点は、卵巣が大きく、実際に卵胞内に存在するエクソソームの単離が可能な点である。一方、マウスは卵巣が小さく卵胞エクソソームの単離は困難であるが、実験動物として確立しており、卵巣異常に起因する繁殖障害など、個体レベルでの生理機能の解析が容易である。また、CRISPR/Cas システムなどを用いた遺伝子改変が比較的容易であること、網羅的遺伝子発現解析データなどが十分蓄積していることなどの利点もある。

- (1) ブタをモデルとして、ブタ卵胞液のエクソソームを単離し、壁顆粒層細胞、卵丘細胞、卵母細胞の培養系への添加の影響を解析した。
- (2) ブタの卵胞エクソソームに内包される mRNA を単離し、RNA シークエンス法により網羅的に解析した。
- (3) マウス卵巣の器官培養系において、N-SMase 活性を試薬によって阻害し、卵胞の発達動態、さらにそれを構成する細胞の分化・機能に与える影響を解析した。
- (4) CRISPR/Cas システムを用いたゲノム編集により、N-SMase 遺伝子を欠損したマウスを作製した。
- (5) マウス壁顆粒層細胞におけるエクソソームの分泌および取り込みに対する卵母細胞由来の増殖因子影響を解析した。

4. 研究成果

(1) ブタ初代細胞培養を用いたエクソソームの機能評価

ブタ卵胞エクソソームは、壁顆粒層細胞および卵丘細胞における遺伝子発現に影響を与えること、さらに、卵母細胞の成熟(減数分裂)を促進することが示唆された。

(2) ブタ卵胞エクソソームに内包される mRNA の網羅的同定

ブタの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た。

卵巣内エクソソームの由来解明

卵胞内にエクソソーム持たないモデルマウスを作製するためには、卵胞エクソソームがどの細胞から分泌されているのかを同定する必要がある。そこで、ブタ卵胞エクソソーム内包の mRNA プロファイルを、主成分分析により、壁顆粒層細胞や各種臓器と比較した。その結果、卵胞エクソソーム内包 mRNA は壁顆粒層細胞と非常に似通っていた。また、マウス壁顆粒層細胞の培養上清においても、エクソソームが検出された。これらの結果より、卵胞エクソソームの多くは壁顆粒層細胞由来であると結論した。

ブタ卵胞エクソソーム内包 mRNA の機能解析

ブタ卵胞エクソソームに内包される mRNA について、遺伝子オントロジー解析を行った。その結果、卵胞エクソソーム内包 mRNA には、細胞代謝やガン化、PI3K-Akt シグナル経路などに関与するタンパク質をコードするものが有意に多く含まれていることが明らかとなった。卵胞エクソソームが、それを取り込んだ細胞にどのような影響を与えるのかを考察する上で重要な知見である。

(3) マウス卵巣器官培養用いたエクソソームの機能評価

卵巣器官培養系において、エクソソーム分泌に必要な N-SMase 活性を試薬によって阻害し、卵胞発達に与える影響を解析した。その結果、N-SMase 阻害により卵胞発達が抑制されること、さらに、ステロイド生産に関連する酵素やホルモン受容体の遺伝子発現が異常になることなどを明らかとした。同様の遺伝発現異常は、壁顆粒層細胞の培養系において N-SMase 阻害剤を添加した場合にも観察され、さらに、壁顆粒層細胞の培養上清より単離したエクソソームの添加培養により回復したことから、器官培養で見られた遺伝子発現異常は、エクソソーム分泌が抑制されたことに起因すると考えられた。

(4) 壁顆粒層細胞におけるエクソソーム分泌に必要な N-SMase 遺伝子の同定

卵巣の壁顆粒層細胞におけるエクソソーム分泌には N-SMase 活性が必須である。N-SMase 遺伝子には *Smpd2*, 3, 4 の 3 遺伝子が存在する。当初、初代培養細胞に RNA 干渉法を用いてどの *Smpd* 遺伝子が壁顆粒層細胞の置けるエクソソーム分泌に機能しているかを同定する予定であったが、CRISPR/Cas システムを用いたゲノム編集による N-SMase 遺伝子欠損マウスの作製が一部先に完了したことから、欠損マウスの表現型より、表記遺伝子の同定を行った。

Smpd2 欠損マウス

Smpd2 を欠損したマウスは 2 系統を作製したが、いずれも生存可能であった。1 系統について維持飼育し、詳細な表現型解析を行った結果、卵巣卵胞の発達異常が観察された。しかし、不妊などの顕著な繁殖能力低下は観察されなかった。また、*Smpd2* 欠損マウス顆粒層細胞の培養上清においてもエクソソームが検出されたことから、*Smpd2* 欠損のみでは、壁顆粒層細胞におけるエクソソーム分泌を完全には抑制できないと考えられた。

Smpd4 欠損マウス

Smpd4 欠損マウスは 1 系統を作製した。ヘテロ欠損マウスは生存可能であったが、ヘテロ同士の掛け合わせによるホモ欠損マウスは胎生致死となり、卵巣表現型の解析には至らなかった。

(5) エクソソームの作用メカニズムの解析

卵巣の発達には卵母細胞の分泌する増殖因子 (卵因子) が重要な役割を果たす。エクソソームが卵巣の発達や機能へ影響を及ぼすメカニズムを理解する目的で、壁顆粒層細胞におけるエクソソームの分泌および取り込みに対する卵因子の影響を解析した。その結果、卵因子はエクソソームの分泌に影響を及ぼさない一方で、取り込みを制御することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ueno M, Ito H, Kanke T, Matsuno Y, Fujii W, Naito K, Sugiura K.	4. 巻 35
2. 論文標題 Expression of genes involved in the non-neuronal cholinergic system and their possible functions during ovarian follicular development in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Mamm. Ova Res.	6. 最初と最後の頁 61-69
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 FUJIOKA Yoshie A., ONUMA Asuka, FUJII Wataru, SUGIURA Koji, NAITO Kunihiko	4. 巻 64
2. 論文標題 Contributions of UBE2C and UBE2S to meiotic progression of porcine oocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 253 ~ 259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2018-006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 ONUMA Asuka, FUJIOKA Yoshie A., FUJII Wataru, SUGIURA Koji, NAITO Kunihiko	4. 巻 65
2. 論文標題 Expression and function of exportin 6 in full-grown and growing porcine oocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 407 ~ 412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2019-040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fujii Wataru, Ito Haruka, Kanke Takuya, Ikeda Arisa, Sugiura Koji, Naito Kunihiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Generation of genetically modified mice using SpCas9-NG engineered nuclease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12878
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-49394-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Arisa, Fujii Wataru, Sugiura Koji, Naito Kunihiko	4. 巻 2
2. 論文標題 High-fidelity endonuclease variant HypaCas9 facilitates accurate allele-specific gene modification in mouse zygotes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-019-0627-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuno Yuta, Kanke Takuya, Maruyama Natsumi, Fujii Wataru, Naito Kunihiko, Sugiura Koji	4. 巻 14
2. 論文標題 Characterization of mRNA profiles of the exosome-like vesicles in porcine follicular fluid	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0217760
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0217760	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Ito H, Kishi K, Emori C, Fujii W, Kanai Y, Naito K, Sugiura K
2. 発表標題 A model for studying transdifferentiation of granulosa cells into Sertoli-like cells in mice.
3. 学会等名 51st Annual meeting of society for the study of reproduction (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sugiura K, Emori C, Kogo T, Kanke T, Ito H, Fujii W, Naito K.
2. 発表標題 Appropriate regulation of Noggin expression in follicles is critical for female fertility in mice.
3. 学会等名 51st Annual meeting of society for the study of reproduction
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ito H, Emori C, Fujii W, Naito K, Sugiura K
2. 発表標題 Possibility of transdifferentiating mouse granulosa cells into Sertoli-like cells in vitro.
3. 学会等名 4th World Congress of Reproductive Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Matsuno Y, Fujii W, Natio K, Sugiura K.
2. 発表標題 Mouse granulosa cells secrete functional extracellular vesicles in vitro
3. 学会等名 4th World Congress of Reproductive Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松野雄太、Dang Quoc Thuyet、藤井涉、大下誠一、内藤邦彦、杉浦幸二
2. 発表標題 Mouse granulosa cells secrete exosomes independently of oocyte regulation in vitro
3. 学会等名 第123回日本畜産学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福長一鈴、向後智明、藤井涉、内藤邦彦、杉浦幸二
2. 発表標題 Senescence in ovarian cells
3. 学会等名 第123回日本畜産学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	城口 克之 (Shiroguchi Katsuyuki) (00454059)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・ユニットリーダー (82401)	
研究 分担者	藤井 渉 (Fujii Wataru) (40708161)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教 (12601)	