

令和 5 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：2020～2022

課題番号：20H03124

研究課題名(和文) 家畜繁殖障害の原因究明：エクソソーム欠損に起因する卵巣疾患の解明

研究課題名(英文) Ovarian dysfunction related to exosomal deficiency

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) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：分泌小胞エクソソームは、核酸やたんぱく質などを内包し、細胞間を移動することで情報を伝達する。卵巣の卵胞組織内にもエクソソームが存在するが、その生理的な役割や作用メカニズムの多くは理解されていない。本研究により、エクソソームの卵胞内の標的細胞への取り込みは、複数のエンドサイトーシスによって行われること、その一部は卵母細胞が分泌する増殖因子の影響を受けることを明らかとした。さらに、エクソソームの卵巣生理機能を研究するためのモデル動物を新たに作製し表現型解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣異常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いまだに理解されていない。本研究では、近年、新たな細胞間情報伝達因子として注目されているエクソソームに着目し、その作用機序の解明や、さらなる解析のためのモデル動物の作製を行った。これは哺乳類卵巣の発達・機能制御メカニズムの理解という学術的意義の高さだけでなく、エクソソーム異常に起因する卵巣異常の同定、診断・治療方法の開発などにつながる社会的意義の高いものである。

研究成果の概要(英文)：Exosomes contain nucleic acids, proteins, and other substances, and transmit information to target cells. They are also present in ovarian follicles; however, the physiological roles and mechanisms of action of follicular exosomes are not well understood. This study demonstrated that exosomes are taken up by follicular somatic granulosa cells through multiple endocytic pathways, and some of these pathways are influenced by factors secreted by oocytes. Additionally, a novel mouse model was generated, and phenotypic analysis was performed to investigate the physiological functions of follicular exosomes.

研究分野：繁殖遺伝学

キーワード：エクソソーム 卵巣 卵

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。そのため卵巣の発達や機能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。しかし、卵巣異常を伴う家畜繁殖障害や女性不妊症などは、未だに当該分野における大きな問題となっている。これは、卵巣異常・疾患に至る原因や発症機序の多くが未だ解明できていないためである。

細胞間の情報伝達を担う新規因子:エクソソーム

エクソソームとは、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ていたが、当時は細胞が不要な“ゴミ”を放出する手段であると考えられていた。しかし 10 年ほど前になって、エクソソームが mRNA やマイクロ RNA、タンパク質などを内包しており、取り込んだ細胞の状態や機能に影響を及ぼすことが報告されると、エクソソームは細胞間で情報を伝達する新規因子として注目を集めるようになった。

卵巣の発達・機能制御におけるエクソソーム

卵巣は、女性ホルモン生産などの内分泌機能と、卵母細胞の生産機能(卵生産機能)を担う重要な臓器である。これらの卵巣機能は、卵巣卵胞の壁顆粒層細胞と卵丘細胞がそれぞれ担っている。応募者は、ブタの卵胞液(卵胞を満たす組織液)には、卵巣発達や機能制御に重要な何らかの機能性因子が存在すること、さらにその因子は増殖因子やホルモンではなく、エクソソーム(以下、「卵胞エクソソーム」)であることを報告した。さらに、卵胞エクソソームは排卵に必須の卵丘細胞の膨化現象を促進することや、卵胞エクソソームが卵胞における代謝や MAP キナーゼ活性制御に関与する可能性を報告してきた。

このように、エクソソームは卵巣発達や排卵などの制御に深く関与しており、その制御異常は、卵巣発達異常や排卵障害などを呈すると予測される。これまでエクソソームを欠損(除去)したモデル動物の解析が行われておらず、エクソソームに関連した卵巣機能制御に異常が生じた場合、実際に個体レベルでどのような卵巣異常・疾患を呈するのか解っていない。

卵胞エクソソーム欠損モデルマウスの作製の試み

そこで我々はこれまで、卵胞エクソソームを持たないモデルマウスの作製を試みてきた。現在までに、卵胞エクソソームの大部分が壁顆粒層細胞由来であることや、さらに壁顆粒層細胞によるエクソソーム分泌にはセラミド合成経路の中性スフィンゴミエリナーゼ(N-SMase)活性が必須であることを見出し、CRISPR/Cas9 システムを用いて、壁顆粒層細胞の主要な N-SMase 遺伝子(*Smpd2* と *Smpd4*)をそれぞれ欠損したマウスを作製した。しかし、*Smpd2* 欠損マウスでは、卵巣発達異常が観察されるものの、壁顆粒層細胞の培養上清においてエクソソームが検出されることから、完全なエクソソーム欠損には至っていないと考えられる。一方、*Smpd4* の欠損は、胎生致死であったため、その卵巣制御における必要性は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、卵胞エクソソームを持たないモデルマウスの作製および表現型の詳細な解析を通して、卵胞エクソソーム欠損に起因する卵巢異常・疾患の同定を目的とした。さらに、この解析を通して、エクソソームが哺乳類卵巢の発達や機能制御に果たす役割を包括的に説明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、卵胞でのエクソソーム分泌を抑制したモデルマウスを作製し、その表現型を行った(実験A、B)。また、卵胞エクソソームの主な分泌細胞である壁顆粒膜細胞におけるエクソソーム分泌制御メカニズムの解明(実験C)、および、壁顆粒層細胞によるエクソソーム取り込みメカニズムの解析を行った(実験D)。

実験A . *Smpd2* 欠損マウスの表現型解析

すでに作製済みの *Smpd2* を全身性に欠損したマウスの表現型をより詳細に解析した。具体的には、野生型オスマウスとの交配による繁殖能力テスト、卵巢および壁顆粒層細胞における遺伝子発現解析、卵巢切片観察による卵胞発育動態の解析を行った。

実験B . *Smpd4* 欠損マウスの作製と表現型解析

予備実験により、*Smpd4* を全身性に欠損したマウスは胎生致死であることがわかっている。そこで、Cre-loxP システムによる顆粒層細胞特異的 *Smpd4* 欠損マウスの作製を行った。*Smpd4* 遺伝子中に loxP 配列を組み込んだマウス系統 (*Smpd4*^{tm2a(KOMP)Wtsj}) は、Mutant Mouse Resource & Research Centers (MMRRC)より凍結精液として入手した。本系統を個体化後、当該研究室において飼育保有している顆粒層細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス系統 (*Amhr2-cre* 系統) と交配させ、顆粒層細胞特異的 *Smpd4* 欠損マウスを作製した。本マウスにおいて、卵巢切片解析および野生型マウスとの交配による繁殖能力テストを行った。

実験C . マウス壁顆粒膜細胞によるエクソソーム分泌制御解析

マウス壁顆粒層細胞を単層培養し、培養上清中のエクソソームを NanoSight システムによる粒径の分布と濃度の測定を行った。さらに、一般に細胞によるエクソソーム分泌に必要と考えられている遺伝子について、壁顆粒層細胞での発現への卵母細胞との共培養の影響をリアルタイム PCR によって解析した。また、壁顆粒層細胞によるエクソソーム分泌に対する卵由来因子の影響を NanoSight システムにより解析した。

実験D . マウス壁顆粒膜細胞によるエクソソーム取り込みメカニズムの解析

マウス壁顆粒膜細胞を単層培養し、蛍光標識エクソソームの取り込み動態を、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。さらに、エクソソーム取り込みに対する各種エンドサイトーシス

阻害剤添加の影響を解析した。また、壁顆粒膜細胞が各種エンドサイトーシス活性を有すること、さらにそれらの阻害剤の特異性を、それぞれのエンドサイトーシス経路特異的基質の取り込みに対する阻害剤添加の影響によって評価した。

4. 研究成果

実験A. *Smpd2* 欠損マウスの表現型解析

Smpd2 欠損マウスの顆粒層細胞において、*Smpd2* 遺伝子の発現低下が認められた。卵巣切片観察では、胞状卵胞数の顕著な低下および閉鎖卵胞数の増加が認められた。一方、野生型マウスとの交配させたところ、産子が得られた。そこで、壁顆粒膜細胞を培養し、培養上清中のエクソソームの存在を確認したところ、本欠損マウスにおいてもエクソソームが検出された。これらのことから、*Smpd2* 欠損のみでは、壁顆粒膜細胞での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。

実験B. *Smpd4* 欠損マウスの作製と表現型解析

Smpd4 遺伝子中に loxP 配列を組み込んだマウス系統と顆粒層細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス系統を交配させて、顆粒層細胞特異的 *Smpd4* 欠損マウスを作製した。作製した顆粒層細胞特異的 *Smpd4* 欠損マウスは生存可能であった。また、このマウスの壁顆粒膜細胞では *Smpd4* 発現の低下が確認された。3 週齢マウスの卵巣を用いて、切片を作製・観察したところ、この *Smpd4* 欠損マウスでは卵胞発育に異常が見られた。現在、野生型オスマウスとの交配による繁殖能力テストを行っている。

実験C. マウス壁顆粒膜細胞によるエクソソーム分泌制御解析

卵巣の正常な発達には、卵母細胞の分泌する増殖因子が重要である。そこで、壁顆粒層細胞におけるエクソソーム分泌に対する卵由来増殖因子の影響を解析した。その結果、卵母細胞との共培養や卵由来増殖因子の添加は、壁顆粒層細胞におけるエクソソーム分泌関連遺伝子発現や、実際のエクソソーム分泌量に影響を及ぼさなかった。したがって、壁顆粒層細胞におけるエクソソーム分泌は卵母細胞とは独立に制御されていると考えられる。

実験D. マウス壁顆粒膜細胞によるエクソソーム取り込みメカニズムの解析

次に、エクソソームが卵巣に影響を与えるメカニズムの解析として、まず、卵巣細胞におけるエクソソームの取り込み制御について壁顆粒層細胞をモデルとして解析した。一般にエクソソームはエンドサイトーシス経路を介して細胞に取り込まれることが知られる。そこで壁顆粒層細胞において機能しているエンドサイトーシス経路を、各種エンドサイトーシス経路特異的な基質の壁顆粒層細胞への添加培養によって探索したところ、マウス壁顆粒層細胞では複数のエンドサイトーシス経路が機能していることが分かった。さらに、蛍光標識したエクソソームを単層培養した壁顆粒層細胞へ添加培養し、各種エンドサイトーシス経路の阻害剤の影響

を解析した。その結果、壁顆粒層細胞は複数のエンドサイトーシス経路を介して、エクソソームを取り込んでいることが明らかとなった。さらに、これらエンドサイトーシスやエクソソームの取り込みは、卵由来増殖因子の添加により促進された。したがって、卵母細胞は壁顆粒層細胞でのエクソソーム取り込みを促進することで、卵巢機能に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 EMORI Chihiro, KANKE Takuya, ITO Haruka, AKIMOTO Yuki, FUJII Wataru, NAITO Kunihiko, SUGIURA Koji	4. 巻 68
2. 論文標題 Expression and regulation of estrogen receptor 2 and its coregulators in mouse granulosa cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 137 ~ 143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2021-114	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 伊藤遥, 杉浦幸二	4. 巻 38
2. 論文標題 卵分泌因子による卵巣顆粒膜細胞の分化制御機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Mammalian Ova Research	6. 最初と最後の頁 31-38
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 Matsuno Yuta, Maruyama Natsumi, Fujii Wataru, Naito Kunihiko, Sugiura Koji	4. 巻 91
2. 論文標題 Effects of oocyte derived paracrine factors on release of extracellular vesicles by murine mural granulosa cells in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13385
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13385	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 Emori Chihiro, Ito Haruka, Fujii Wataru, Naito Kunihiko, Sugiura Koji	4. 巻 103
2. 論文標題 Oocytes suppress FOXL2 expression in cumulus cells in mice†	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 85 ~ 93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/iaaa054	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 Ito Haruka, Emori Chihiro, Kobayashi Mei, Maruyama Natsumi, Fujii Wataru, Naito Kunihiko, Sugiura Koji	4. 巻 12
2. 論文標題 Cooperative effects of oocytes and estrogen on the forkhead box L2 expression in mural granulosa cells in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-24680-x	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Akimoto Y, Fujii W, Naito K, Sugiura K.
2. 発表標題 ALK5-SMAD2/3 signaling in granulosa cells is required for the acquisition of the oocyte developmental competence
3. 学会等名 54th Annual meeting of society for the study of reproduction (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kanke T, Fujii W, Naito K, Sugiura K.
2. 発表標題 Effect of fibroblast growth factor signaling on cumulus expansion in mice in vitro.
3. 学会等名 54th Annual meeting of society for the study of reproduction (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maruyama N, Fukunaga I, Kogo T, Fujii W, Naito K, Sugiura K.
2. 発表標題 Senescent cells accumulate in ovarian stromal region of aged mice.
3. 学会等名 54th Annual meeting of society for the study of reproduction (国際学会)
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------