

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19183

研究課題名（和文）個体の運動が卵巣機能を制御するメカニズムの解明

研究課題名（英文）The study of the mechanism how the exercise affects ovarian functions.

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マウスを用いた検討により、血中に存在するエクソソームが実際に卵巣に取り込まれる様子を観察することができた。また、その取り込み量はエクソソームの性状に依存して変化することが明らかとなった。また、ブタとマウスの卵巣細胞においてエクソソーム取り込みに関連する遺伝子発現には顕著な差がないことが分かった。さらに、今後、血中エクソソームの卵巣制御への影響を解析するためのモデルとして、体外マウス卵発達培養系において、従来用いられるウシ胎子血清に変えてマウス血清を用いる培養系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ブタの卵巣の組織液（卵胞液）に卵巣以外の臓器由来のエクソソームが存在する可能性が、応募者らの研究により明らかとなっていた。しかし、本当に取り込まれるのか、また、取り込まれることの生理的意義については不明であった。本研究では、卵巣外エクソソームが実際に卵巣に取り込まれることを確認した。また細胞レベルでのエクソソーム取り込み機構が、ブタとマウスの卵巣細胞で共通している可能性を見出したことも意義が大きい。さらに、今回確立した培養系を用いることで、血清由来のエクソソームが卵巣の発達や機能制御に与える影響を解析できるようになり、今後さらなる研究の進展が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we observed that exosomes present in the serum are indeed taken up by the ovaries in mice. The amount of exosome uptake by the ovaries varied depending on the origin of the exosomes. Furthermore, we found that there is no obvious difference in the gene expression related to exosome uptake between porcine and murine ovarian somatic cells. Moreover, as a model for analyzing the effects of serum-derived exosomes on ovarian regulation, we established an in vitro oocyte growth culture system that uses mouse serum instead of the traditionally used fetal bovine serum.

研究分野：繁殖遺伝学

キーワード：エクソソーム 卵巣

## 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、個体の運動、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。これらの要因が卵巢機能に影響を及ぼすメカニズムとしては、従来、脳下垂体から分泌される性腺刺激ホルモンのバランス変動によるものとして説明されてきたが、それだけでは説明しきれない現象が多く存在する。これは、上記の要因に敏感に反応する組織・臓器が、卵巢へ何らかの影響を及ぼしているためと考えられるが、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直径 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。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し、卵巢の機能制御に深く関与することを明らかとしてきた。さらに最近、ブタ卵胞エクソソームには、骨格筋などの卵巢以外の組織・臓器由来のエクソソームが含まれていることを報告した [PLoS One, 2019; 14: e0217760]。これはすなわち、卵巢以外の臓器が、エクソソームを介して卵巢機能に何らかの影響を及ぼしている可能性を示している。しかし、卵巢外のエクソソームが卵胞においてどのような役割を果たすのか、また、その作用機序などは不明である。

## 2. 研究の目的

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存在検証のための萌芽的研究として、まずは細胞・組織の単離培養が容易であり、かつ各種培養系の確立されている骨格筋に着目し、卵巢内に存在する骨格筋由来のエクソソームが卵巢機能に及ぼす影響の解明を目的とした。これは、個体の運動が卵巢機能に及ぼす影響とそのメカニズムの理解につながる。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス個体をモデルとした、卵巢への卵巢外エクソソームの取り込み動態の解析

培養細胞 (NIH 3T3 細胞、C2C12 細胞)、マウス血清などからエクソソームを単離し、蛍光試薬にて染色後、マウスへ尾静脈内投与を行った。マウスへ投与する際には、マウスの月齢、卵巢発達を促進するホルモン投与の有無およびタイミング、さらにエクソソーム投与量や回数などを検討した。投与後、卵巢、肝臓、脳などを採材し、凍結切片を作製後、共焦点顕微鏡を用いて蛍光の有無を観察した。投与後の採材までの時間、凍結切片作製条件などについても検討した。

### (2) マウス顆粒層細胞におけるエクソソーム取り込み機構の解析

クラスリンおよびカベオラ介在性エンドサイトーシスのそれぞれ代表的な基質であるトランスフェリンおよびコレラトキシン B の蛍光標識体、また、蛍光標識したエクソソームの顆粒膜細胞への取り込み動態を共焦点顕微鏡で観察した。また、それらエンドサイトーシス経路の阻害剤である Pitstop 2 および genistein 添加の影響を観察した。さらに、卵胞発達や顆粒層細胞の分化・機能制御に重要である卵の分泌する増殖因子(卵分泌因子)添加の影響を観察した。

### (3) ブタおよびマウス顆粒層細胞におけるエクソソーム取り込み関連遺伝子発現の解析

ブタおよびマウス顆粒層細胞において、上記エンドサイトーシスに関連した遺伝子発現を逆転写 PCR 法で解析した。

### (4) マウスをモデルとしたエクソソーム機能解析のための体外卵発達培養系の確立

#### エクソソーム分泌阻害培養系

卵胞または卵-顆粒層細胞複合体培養において、中性スフィンゴミエリナーゼ阻害剤 (GW4869) を添加培養する影響を解析した。培養後、卵胞の発達動態を観察し、各種細胞での遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で解析した。

#### マウス血清添加卵発達培養系

通常、卵発達培養系で用いられるウシ胎児血清に変えて、マウス血清の添加の影響を解析した。添加する血清の濃度、用いる血清の性状などを検討した。培養後は、卵の成熟能、卵丘細胞の膨化能などを解析した。

## 4. 研究成果

### (1) マウス個体をモデルとした、卵巢への卵巢外エクソソームの取り込み動態の解析

応募者らのこれまでの研究により、ブタの卵巢の組織液(卵胞液)に卵巢以外の臓器由来のエクソソームが存在する可能性が明らかとなっていた。しかし、本当に取り込まれるのか、また、取り込まれることの生理的意義については不明であった。そこで、生体内で実際に卵巢外のエクソソームが卵巢へ取り込まれることを確認するため、個体を扱うことが容易なマウスをモデルとして検討した。まず、

大量のエクソソームを容易に得られることから培養細胞 (NIH3T3 細胞) 由来のエクソソームを蛍光染色し、マウスへ尾静脈内投与後、各臓器への取り込み動態を共焦点顕微鏡で観察した。

エクソソーム投与時の卵巣発達ホルモン刺激の有無、投与量、回数、投与後の採材までの時間、凍結切片作製時の組織固定方法の検討などを行ったところ、卵巣切片内で蛍光が観察されたことから、血中に存在するエクソソーム (卵巣外エクソソーム) が実際に卵巣へ取り込まれることが分かった。一方で、肝臓などと比較すると、卵巣への取り込みは顕著に低く、臓器外エクソソームの取り込み量は臓器ごとに異なる可能性が考えられた。

次に、筋細胞由来のエクソソームの卵巣への取り込み動態を検討するために、入手が容易なマウス筋芽細胞株 (C2C12 細胞) を用いて解析を行った。C2C12 細胞は、培養下で筋管細胞への分化誘導が可能であり、容易に培養上清を回収できる。C2C12 細胞を分化誘導後、培養上清よりエクソソームを単離・染色し、上記で検討した方法でマウスへ投与して各臓器への取り込み動態を確認した。その結果、興味深いことに、肝臓などへの取り込みは確認できた一方で、卵巣 (特に卵胞内) への取り込みはほとんど見られなかった。一方、マウス血清より単離したエクソソームは卵巣への取り込みが確認できることから、C2C12 細胞 (筋細胞) 由来エクソソームは選択的に卵巣へ取り込まれにくい可能性があるが、この点についてはさらなる検討を要する。

## (2) マウス顆粒層細胞におけるエクソソーム取り込み機構の解析

一般にエクソソームはエンドサイトーシス経路により細胞へ取り込まれる。しかし、卵巣の顆粒層細胞において、どのエンドサイトーシス経路を介してエクソソームが取り込まれるのかについては、まったく知見がない。そこで、代表的なエンドサイトーシス経路であるクラスリンおよびカベオラ介在性エンドサイトーシスに着目し、顆粒層細胞へのエクソソーム取り込み動態を解析した。

顆粒層細胞を単離培養し、クラスリンおよびカベオラ介在性エンドサイトーシスの基質であるトランスフェリンおよびコレラトキシン B の蛍光標識体を添加したところ、両基質とも顕著な取り込みが観察された。すなわち、顆粒層細胞では両エンドサイトーシス経路ともに活性を持っていることがわかる。次に、蛍光標識したエクソソームを培養顆粒層細胞へ取り込ませ、その際、クラスリンおよびカベオラ介在性エンドサイトーシス経路の阻害剤である Pitstop 2 および genistein 添加の影響を観察したところ、どちらの阻害剤の添加においても、エクソソームの取り込みが有意に阻害された。したがって、顆粒層細胞は両エンドサイトーシス経路を用いて、エクソソームを取り込んでいると考えられる。

顆粒層細胞の発達は機能制御には卵の分泌する BMP15 や GDF9、FGF8 などの増殖因子 (卵分泌因子) が重要な役割を果たす。そこで、顆粒層細胞におけるエクソソーム取り込み動態をより詳細に検討するため、卵分泌因子添加の影響を解析した。その結果、卵分泌因子は顆粒層細胞におけるカベオラ介在性エンドサイトーシスおよびエクソソーム取り込みを促進した一方で、クラスリン介在性エンドサイトーシスには影響を及ぼさなかった。すなわち、卵はカベオラ介在性エンドサイトーシスを促進することで、顆粒層細胞でのエクソソーム取り込みを促進している可能性がある。

## (3) ブタおよびマウス顆粒層細胞におけるエクソソーム取り込み関連遺伝子発現の解析

上記のエンドサイトーシス経路に関連した遺伝子について、顆粒層細胞における発現動態は不明である。そこでマウスおよびブタ顆粒層細胞におけるこれらの遺伝子発現を解析した。マウスでは、卵巣の発達に伴う発現変化についてもリアルタイム PCR を用いて詳細に解析を行った。その結果、ブタおよびマウス顆粒層細胞において、これらの遺伝子発現に顕著な違いは見られなかった。またマウス顆粒層細胞において、卵巣の発達に伴い遺伝子発現の変化の様子を明らかにすることができた。

## (4) マウスをモデルとしたエクソソーム機能解析のための体外卵発達培養系の確立

### エクソソーム分泌阻害培養系

一般に、エクソソームの分泌には中性スフィンゴミエリナーゼ活性が必要とされ、その阻害剤 (GW4869) 添加により、エクソソーム分泌を阻害できることが知られる。顆粒層細胞においても、ブタおよびマウス顆粒層細胞において、GW4869 添加培養によりエクソソーム分泌が阻害できる。卵巣の器官培養や、卵-顆粒層細胞発達培養において GW4869 添加によるエクソソーム分泌阻害が可能になれば、内因性のエクソソーム (卵巣内で生産されるエクソソーム) の存在しない培養系となり、卵巣外エクソソームの機能解析に有用と考えられる。そこで、これらの培養系に GW4869 を添加する培養系の確立を試みた。その結果、卵巣器官培養系において、GW4869 添加を行う培養系を確立することができた。本培養系では卵巣の発達不全がみられ、これは正常な卵巣発達における卵巣内で生産されるエクソソームの重要性を示唆するものである。しかし、中性スフィンゴミエリナーゼのエクソソーム分泌以外の機能を阻害している可能性もあり、今後の検討が必要である。

### マウス血清添加卵発達培養系

上記 (1) の解析において、血清由来エクソソームの卵巣への取り込みを観察することができた。そこで、血清由来エクソソームの卵巣発達や機能制御への影響を解析するための実験系の確立を試みた。一般に卵を体外で発達させる体外卵発達培養系では、卵-顆粒層細胞複合体をウシ胎子血清を添加した培地を用いて培養する。本研究では、ウシ胎子血清に変えてマウスの血清を用いる培養系の確立を行った。用いるマウス血清の性状 (血清採取時にホルモン投与による性周期の統一を行うかどうか)、血清添加濃度、培養期間などを検討したところ、ウシ胎子血清添加時と同程度に

卵が発達し、成熟能を持つ培養系を確立することができた。このとき、顆粒層細胞の発達はウシ胎子血清使用よりも良いように観察された。今後、この培養系において、エクソソーム除去マウス血清の添加や、それに加えて病態モデル動物の血清由来エクソソームを添加するなどにより、卵巣外エクソソームが卵巣の発達や機能制御に与える影響の詳細な解析が可能になると期待している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

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 -
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 Sugiura Koji, Maruyama Natsumi, Akimoto Yuki, Matsushita Kodai, Endo Tsutomu	4. 巻 22
2. 論文標題 Paracrine regulation of granulosa cell development in the antral follicles in mammals	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 e12538
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12538	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 AKIMOTO Yuki、FUJII Wataru、NAITO Kunihiko、SUGIURA Koji	4. 巻 69
2. 論文標題 The effect of ACVR1B/TGFBR1/ACVR1C signaling inhibition on oocyte and granulosa cell development during <i>in vitro</i> growth culture	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 270 ~ 278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2023-041	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 MARUYAMA Natsumi、FUKUNAGA Isuzu、KOGO Tomoaki、ENDO Tsutomu、FUJII Wataru、KANAI-AZUMA Masami、NAITO Kunihiko、SUGIURA Koji	4. 巻 69
2. 論文標題 Accumulation of senescent cells in the stroma of aged mouse ovary	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 328 ~ 336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2023-021	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 Edure Taichi、Matsuno Yuta、Matsushita Kodai、Maruyama Natsumi、Fujii Wataru、Naito Kunihiko、Sugiura Koji	4. 巻 91
2. 論文標題 Dynamics of extracellular vesicle uptake by mural granulosa cells in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 e23737
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mrd.23737	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5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

1. 発表者名 杉浦幸二、江連泰知、松野雄太、藤井涉、内藤邦彦
2. 発表標題 卵巣顆粒層細胞による細胞外小胞の取り込み機構の研究
3. 学会等名 第131回日本畜産学会大会 (帯広畜産大学)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丸山夏海、福長一鈴、藤井涉、内藤邦彦、杉浦幸二
2. 発表標題 個体加齢が受精時の卵管機能に与える影響の解析
3. 学会等名 第131回日本畜産学会大会 (帯広畜産大学)
4. 発表年 2023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
---------	---------