

論文内容の要旨

応用動物科学専攻
平成 27 年度博士課程進学
氏名 松野雄太
指導教員名 杉浦幸二

論文題目 哺乳類卵巣における細胞外分泌小胞エクソソームの役割に関する研究

哺乳類において、卵巣の卵胞は機能的な卵母細胞の生産と内分泌機能を担う重要な組織である。近年、細胞外分泌小胞の一種であるエクソソームが着目されている。エクソソームは細胞から分泌され、標的細胞に多様な影響を及ぼすことで様々な生理機能を果たすことが示唆されている。種々の哺乳類の卵胞内においてもエクソソームが存在することが報告されつつあるが、卵胞発達におけるエクソソームの機能については十分に理解されておらず、その詳細な解析は卵胞発達の理解に貢献することが期待される。そこで本研究では、ブタとマウスをモデルとして用い、エクソソームが卵胞発達に果たす役割を明らかとすることを目的とし、以下の3点について解析を行った。

第1章 ブタの卵胞におけるエクソソームの存在確認と卵胞細胞に及ぼす機能の解析

まず初めに、卵胞内にエクソソームが存在するかどうかを、卵胞が大きく卵胞内の組織液（卵胞液）を十分に採取することが可能なブタをモデルとして解析した。電子顕微鏡観察、エクソソームのマーカータンパク質の発現、さらに含有する RNA プロファイル解析などを行い、ブタの卵胞液内にエクソソームが存在することを明らかにした。

次に卵胞エクソソームの持つ機能について、卵丘膨化をモデルとして解析した。卵丘膨化とは、排卵期に卵母細胞の近傍に存在する卵丘細胞層が膨潤化する現象であり、正常な排卵に必須である。回収した卵胞エクソソームを卵丘細胞-卵母細胞複合体に添加培養したところ、卵丘膨化関連遺伝子 (*HAS2*, *TNFAIP6*) の

発現上昇と、細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) のリン酸化の増強が観察された。これらの結果から、ブタ卵胞におけるエクソソームは、卵丘細胞の膨潤化を補助する機能をもつことが示唆された。

第 2 章 卵胞内エクソソームの分泌由来細胞の探索とエクソソーム分泌/取り込み制御の解析

卵胞内のエクソソームの役割を理解するにあたって、卵胞内に存在するエクソソームがどの細胞から分泌されているのかを理解することが重要である。卵胞内の体細胞の大部分は、卵胞の基底膜を裏打ちしている壁顆粒膜細胞によって占められる。そこで、壁顆粒膜細胞がエクソソームを分泌する可能性を検討した。その結果、マウス壁顆粒膜細胞の培養上清において、電子顕微鏡観察、マーカートンパク質の発現解析などによってエクソソームの存在が確認された。さらに、ブタ卵胞液由来のエクソソームを用いて、RNA シークエンス解析を行ったところ、壁顆粒膜細胞特異的な転写産物が多く検出された。これらの結果は、卵胞内のエクソソームの、少なくとも一部は、壁顆粒膜細胞から分泌されていることを強く示唆している。一方、ブタ卵胞エクソソームの RNA シークエンス解析では、壁顆粒膜細胞からは検出されなかった転写産物も多く検出されたことから、卵胞内には壁顆粒膜細胞以外の細胞由来のエクソソームが存在することも示唆された。

一般に、卵胞の正常な発達と壁顆粒膜細胞の機能制御には卵母細胞の分泌する増殖因子（卵由来増殖因子）が重要である。そこで、卵胞内のエクソソーム制御に卵由来増殖因子が関わる可能性を検討するために、壁顆粒膜細胞におけるエクソソームの分泌とその取り込みに対する卵由来増殖因子の影響を解析した。その結果、壁顆粒膜細胞における中性スフィンゴミエリナーゼやエンドソーム輸送選別複合体など、エクソソームの分泌に関わるタンパク質をコードする転写産物の発現量に卵由来増殖因子の影響は観察されなかった。さらに、壁顆粒膜細胞の培養上清に存在するエクソソームの粒子数をナノ粒子解析で計数したところ、卵由来増殖因子の有意な影響は観察されなかった。一方、壁顆粒膜細胞への緑色蛍光タンパク質（GFP）標識エクソソームの取り込み量を、GFP 蛍光を指標に解析したところ、エクソソームの取り込みは卵由来増殖因子によって抑制されることが示唆された。一般にエクソソームの取り込みには様々なエンドサイトーシス経路が関わってい

るが、カベオラ依存性エンドサイトーシス経路に必須のカベオリン (*Cav1*) 発現が卵由来増殖因子によって壁顆粒膜細胞において抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、壁顆粒膜細胞におけるエクソソームの取り込みはカベオラ依存性エンドサイトーシスの抑制を介して卵由来増殖因子によって制御されることが示唆された。卵由来増殖因子が壁顆粒膜細胞に及ぼす影響は、卵胞発達に伴って壁顆粒膜細胞と卵母細胞の距離が遠くなることによって低下することが知られる。よって、卵胞発達に伴って卵由来増殖因子によるカベオラ依存性エンドサイトーシスの抑制制御が低下することで、壁顆粒膜細胞におけるエクソソームの取り込み量が増加し、エクソソームが壁顆粒膜細胞に及ぼす影響は増加していく可能性が考えられる。

第3章 卵巣器官培養とノックアウト動物を用いたエクソソーム分泌阻害が卵胞発達に及ぼす影響の解析

上記の結果から、少なくとも卵胞内のエクソソームの一部は壁顆粒膜細胞由来であることが示唆された。この壁顆粒膜細胞によるエクソソーム分泌を抑制することが卵胞発達に与える影響を解析することを目的に、まず、壁顆粒膜細胞のエクソソーム分泌に必要な因子の探索を行った。そこで、中性スフィンゴミエリナーゼ (N-SMase) の阻害剤 (GW4869) をマウス壁顆粒膜細胞の初代培養に添加したところ、エクソソーム分泌量の有意な低下が観察された。すなわち、マウス壁顆粒膜細胞におけるエクソソーム分泌には N-SMase 活性が必須であると考えられた。

そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いて N-SMase をコードする遺伝子をターゲットとした遺伝子改変マウスを作製した。その結果、N-SMase の一つである *Smpd2* 遺伝子欠損マウスでは、後期胞状卵胞の発達不全、及び閉鎖卵胞数の有意な増加が観察された。さらに、マウス卵巣の器官培養において、上記 N-SMase 阻害剤添加の影響を観察したところ、胞状卵胞形成の指標である、LH 受容体 (*Lhcgr*) 及びアロマターゼ (*Cyp19a1*) 遺伝子発現の有意な低下が観察された。これらの結果から、後期胞状卵胞の正常な発達には N-SMase が重要な役割を果たしていることが強く示唆された。N-SMase は壁顆粒膜細胞におけるエクソソーム分泌に必須であることから、このメカニズムにエクソソームが関わっている可能性が考えられる。

総括

以上、本研究により、卵胞内にはエクソソームが存在し、その少なくとも一部は壁顆粒膜細胞由来であることを明らかとなった。また、壁顆粒膜細胞におけるエクソソームの取り込みは卵母細胞由来の増殖因子により抑制されるという、卵由来増殖因子による卵胞内エクソソームシグナルの制御メカニズムを見出した。さらに、壁顆粒膜細胞におけるエクソソーム分泌には N-SMase 活性が必要であることを示唆した。N-SMase をコードする *Smpd2* 遺伝子欠損マウスでは、後期胞状卵胞形成に異常をきたすことから、エクソソームがこの過程に必要である可能性が考えられる。