

審査の結果の要旨

氏名 松野 雄太

近年、エクソソームと呼ばれる分泌膜小胞の一種が、新たな細胞間の情報伝達因子として着目されている。哺乳類において卵巣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が、最近、一部の哺乳類において卵巣の卵胞組織内にもエクソソームが存在することが報告された。しかし、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は理解されていない。本博士論文研究では、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の解明を目的とした研究を報告している。

第1章第1節では、卵巣卵胞が大きく卵胞内の組織液（卵胞液）を十分量採取可能なブタをモデルとし、ブタ卵胞液内にエクソソームが存在することを、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により明らかにしている。続いて第2節では、この卵胞エクソソームの持つ機能について、排卵に必須の卵丘膨化現象をモデルとして解析し、ブタ卵胞におけるエクソソームは、この卵丘膨化を補助する機能をもつことを示唆している。

第2章第1節では卵胞内に存在するエクソソームが卵胞を構成する壁顆粒膜細胞に由来する可能性を検討している。その結果、マウス壁顆粒膜細胞の培養上清においてエクソソームの存在が確認され、さらに、RNAシーケンス解析によりブタ卵胞液から単離したエクソソームは壁顆粒膜細胞特異的な転写産物を多く含有していることを明らかとした。これらの結果より、卵胞内に存在するエクソソームの少なくとも一部は壁顆粒膜細胞が分泌していると結論している。顆粒膜細胞の発達には卵母細胞の分泌する増殖因子（卵由来増殖因子）が

重要であることから、第 2 節ではマウス顆粒膜細胞をモデルに、エクソソームの分泌と取り込みに対する卵由来増殖因子の影響を解析している。その結果、壁顆粒膜細胞によるエクソソームの分泌に卵由来増殖因子の有意な影響はないこと、一方で、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を明らかとしている。さらに、カベオリン (CAV1) はカベオラ依存性エンドサイトーシス経路に必須のタンパク質であるが *Cav1* mRNA 発現が卵由来増殖因子によって抑制されることから、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と考察している。

第 3 章では、壁顆粒膜細胞からのエクソソーム分泌の抑制が卵胞発達に与える影響をマウスをモデルに解析している。第 1 節では、壁顆粒膜細胞の初代培養系を用い、エクソソーム分泌に中性スフィンゴミエリナーゼ (N-SMase) 活性が必要であることを示し、さらに、マウス卵巣器官培養において N-SMase 阻害剤 (GW4869) を添加すると、卵胞発達の抑制およびアロマターゼ (*Cyp19a1*) 遺伝子発現の低下がみられることを報告している。そこで続く第 2 節では、CRISPR/Cas9 システムを用いて N-SMase をコードする遺伝子を改変したマウスを作製し、その卵巣表現型を解析している。その結果、N-SMase の一つである *Smpd2* 遺伝子を欠損したマウスでは、後期胞状卵胞の発達不全および閉鎖卵胞数の有意な増加、さらに、*Cyp19a1* 遺伝子発現の有意な低下を観察している。さらに、壁顆粒膜細胞の初代培養系において、GW4869 添加による *Cyp19a1* 発現低下がエクソソームの添加によりレスキューされることを明らかとしている。これらの結果から、卵胞内のエクソソームは壁顆粒膜細胞における *Cyp19a1* の発現上昇などを介して、後期胞状卵胞の発達を促進する機能をもつと考察している。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。