

博士論文 (要約)

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

松野 雄太

---

---

# 目次

目次	1
序論	8
図表	14
Figure 0-1 卵胞の発達過程について	15
Figure 0-2 エクソソームの分泌過程について	16
<b>第 1 章 ブタ卵胞エクソソームの存在確認と卵胞細胞への影響解析</b>	<b>17</b>
<b>第 1 節 エクソソームの存在確認</b>	<b>18</b>
緒言	19
材料と方法	20
ブタ卵巣の採取	
ブタ卵胞液の採取	
ブタ卵胞液からのエクソソーム分画の単離	
エクソソーム分画の透過型電子顕微鏡観察	
ブタ卵巣からの細胞の採取	
Western Blotting 法によるタンパク質検出	
エクソソームの蛍光標識	
蛍光標識卵胞エクソソームのブタ壁顆粒膜細胞への添加培養	
蛍光標識卵胞エクソソームのブタ卵丘-卵母細胞複合体 (COC) への添加培養	
small RNA を含む Total RNA 抽出	
Bioanalyzer を用いた RNA の解析	
統計処理	
結果	21
透過型電子顕微鏡による観察	

---

ウエスタンブロット法によるタンパク質解析	
Bioanalyzer による RNA の分析	
蛍光標識を用いた細胞への取り込み検出	
考察	22
図表	23
Figure 1-1 透過型電子顕微鏡によるブタ卵胞液のエクソソーム分画の観察	
Figure 1-2 ウエスタンブロット法によるタンパク質解析	
Figure 1-3 Bioanalyzer による RNA の解析	
Figure 1-4 蛍光標識卵胞エクソソームの壁顆粒膜細胞と卵丘-卵母細胞複合体 (COC) への取り込み	
<b>第 2 節 エクソソームが卵胞細胞に及ぼす影響の解析</b>	<b>25</b>
緒言	26
材料と方法	28
ブタ卵巢と卵胞液, 卵胞液からのエクソソーム分画の単離	
ブタ卵巢からの細胞の採取	
ブタ卵丘-卵母細胞複合体 (COC) へのエクソソーム添加培養	
マウス	
マウス卵丘-卵母細胞複合体 (COC) の採取	
マウス COC へのエクソソーム添加培養	
Total RNA 抽出	
逆転写反応による cDNA 合成	
リアルタイム PCR 法による遺伝子発現量比較	
Western Blotting 法によるタンパク質検出	
統計処理	
結果	29
ブタ卵丘-卵母細胞複合体 (COC) の卵丘膨化に与える影響の解析	
マウス COC の卵丘膨化に与える影響の解析	
ERK1/2 のリン酸化に与える影響の解析	
考察	30

---

図表	31
Table 1-1 本節で用いたプライマーセットの配列	
Figure 1-5 ブタ卵胞エクソソームがブタ COC の卵丘膨化に与える影響の解析	
Figure 1-6 ブタ卵胞エクソソームがマウス COC の卵丘膨化に与える影響の解析	
Figure 1-7 ブタ卵胞エクソソームが ERK1/2 のリン酸化に与える影響の解析	
<b>第 2 章 エクソソーム分泌/取り込み制御の解析</b>	<b>33</b>
<b>第 1 節 卵胞内エクソソームの分泌由来細胞の探索</b>	<b>34</b>
緒言	35
材料と方法	36
マウス	
マウス壁顆粒膜細胞の採取	
マウス壁顆粒膜細胞の培養	
培養上清の回収	
培養上清からのエクソソーム分画の採取	
Western Blotting 法によるタンパク質検出	
ナノ粒子トラッキング法を用いたエクソソーム分画の粒子径と粒子数の解析	
蛍光標識卵胞エクソソームのマウス壁顆粒膜細胞への添加培養	
ブタ卵胞液からのエクソソーム分画の単離	
ブタ卵巢からの壁顆粒膜細胞の採取	
Total RNA 抽出	
RNA シークエンス法を用いた mRNA の網羅的解析	
統計処理	
結果	37
透過型電子顕微鏡による観察	
Western Blotting 法によるタンパク質解析	
ナノ粒子トラッキング法による粒子サイズと粒子数の解析	
蛍光標識を用いたマウス壁顆粒膜細胞への取り込みの観察	
ブタ卵胞エクソソームにおける mRNA の解析	
考察	38

図表	39
Table 2-1 RNA シークエンス解析によって検出された壁顆粒膜細胞特異的転写産物とその発現量	
Table 2-2 RNA シークエンス解析によって検出されたエクソソームにおいてのみ検出された転写産物とその発現量	
Figure 2-1 透過型電子顕微鏡によるマウス壁顆粒膜細胞培養上清のエクソソーム分画の観察	
Figure 2-2 ウエスタンブロット法によるタンパク質解析	
Figure 2-3 ナノ粒子トラッキング法による粒子のサイズと粒子数の解析	
Figure 2-4 蛍光標識エクソソームの壁顆粒膜細胞と卵丘細胞への取り込み	
<b>第 2 節 壁顆粒膜細胞におけるエクソソームの分泌と取り込みの解析</b>	<b>41</b>
緒言	42
材料と方法	44
マウス	
マウス壁顆粒膜細胞の採取と培養	
Total RNA 抽出	
リアルタイム PCR 法による遺伝子発現量比較	
ナノ粒子トラッキング法を用いたエクソソーム分画の粒子型と粒子数の解析	
EGFP トラマウス胚性線維芽細胞 (EGFP 性線維芽) の樹立	
EGFP 性線維芽の培養	
EGFP 性線維芽培養上清の回収	
培養上清からのエクソソーム分画の単離	
蛍光標識エクソソームのマウス壁顆粒膜細胞への添加培養	
統計処理	
結果	45
エクソソーム分泌関連遺伝子の発現量に対する卵由来増殖因子の影響の解析	
エクソソームの分泌数に対する卵由来増殖因子の影響の解析	
エクソソームの取り込みに対する卵由来増殖因子の影響の解析	
エクソソームの取り込み関連遺伝子の発現量に対する卵由来増殖因子の影響の解析	
考察	46

図表	47
Table 2-3 本節で用いたプライマーセットの配列	
Figure 2-5 エクソソーム分泌経路に関連する遺伝子発現量に対する 卵由来増殖因子の影響の解析	
Figure 2-6 エクソソーム分泌数に対する卵由来増殖因子の影響の解析	
Figure 2-7 エクソソーム取り込みに対する卵由来増殖因子の影響の解析	
Figure 2-8 エンドサイトーシスに関連する遺伝子発現量に対する 卵分泌因子の影響の解析	
Figure 2-9 卵胞発達とエクソソームの取り込み制御モデル	
<b>第3章 エクソソーム分泌阻害が卵胞発達に及ぼす影響の解析</b>	<b>49</b>
<b>第1節 壁顆粒膜細胞のエクソソーム分泌に対する 中性スフィンゴミエリナーゼ阻害の解析</b>	<b>50</b>
緒言	51
材料と方法	53
マウス	
壁顆粒膜細胞の採取と培養	
培養上清の回収とエクソソーム分画の単離	
Western Blotting 法によるタンパク質解析	
Total RNA 抽出	
RT-PCR	
卵巣の器官培養	
リアルタイム PCR 法による遺伝子発現量解析	
統計処理	
結果	54
壁顆粒膜細胞のエクソソーム分泌に対する N 顆粒膜細胞の阻害剤の影響の解析	
壁顆粒膜細胞における N 顆粒膜細胞にのアイソフォームの発現解析	
卵巣の器官培養系を用いた N 巣の器官培養阻害が卵巣に及ぼす影響の解析	
考察	55

図表	56
Table 3-1 本節で用いたプライマーセットの配列	
Figure 3-1 壁顆粒膜細胞のエクソソーム分泌に対する N 壁顆粒膜細胞阻害の影響の解析	
Figure 3-2 Nigure のアイソフォームの発現解析	
Figure 3-3 卵巣器官培養における卵胞発達の遺伝子発現量の解析	
<b>第 2 節 N-SMASE 欠損マウスの作製と卵巣の表現型の解析</b>	<b>58</b>
緒言	59
材料と方法	61
マウス	
Total RNA 抽出	
マウス尾部からのゲノム DNA 抽出	
ゲノム PCR	
ゲノム PCR 産物の抽出	
ゲノム PCR 産物精製物の塩基配列の確認	
CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子改変マウスの作製	
卵巣組織切片の作成	
PAS 染色	
卵巣の組織形態の判定	
リアルタイム PCR 法による遺伝子発現量解析	
統計処理	
結果	62
CRISPR/Cas9 システムを用いた N システムを用いた遺伝子改変マウスの作製	
遺伝子改変マウスの卵巣の組織観察	
遺伝子改変マウスの卵巣における遺伝子発現の解析	
壁顆粒膜細胞の培養系を用いたエクソソームのレスキュー実験	
考察	63
図表	64
Table 3-2 ファウンダーマウス (F0 マウス) で検出された変異導入アレルの配列	
Figure 3-4 gRNA の配列及び得られた産仔における変異導入アレルの配列から	

---

---

予測されるアミノ酸配列	
Figure 3-5	ミュータントマウスの卵巣切片像と胞状卵胞数
Figure 3-6	ミュータントマウスの卵巣における遺伝子発現量の解析
Figure 3-7	エクソソーム分泌阻害時における壁顆粒膜細胞の エクソソーム添加培養の影響の解析
<b>総括</b>	<b>66</b>
<b>図表</b>	<b>70</b>
Figure 4-1	本研究が提唱する卵由来増殖因子による エクソソームの取り込み制御機構のモデル
<b>参考文献</b>	<b>72</b>
<b>謝辞</b>	<b>80</b>

---

---



---

---

## 序論

哺乳類の卵巣は機能的な卵母細胞の生産や内分泌機能を担う重要な組織であり、卵胞と呼ばれる小胞構造によって構成される。卵巣内には様々な発達段階の卵胞が存在し、原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、三次卵胞に大別される (Figure 0-1)。原始卵胞は、未発達な一次卵母細胞が、単層の前顆粒膜細胞 (pregranulosa cell) (卵胞上皮細胞, 前顆粒層細胞とも呼ばれる) に1細胞ずつ包まれることによって形成される。卵母細胞が成長を開始し、扁平な形態であった前顆粒膜細胞が立方状の形態の顆粒膜細胞 (granulosa cell) (顆粒層細胞とも呼ばれる) へと発達すると、一次卵胞と呼ばれるようになる。次に、単層であった顆粒膜細胞の層が増殖に伴って多層化し、一次卵胞は二次卵胞へと発達する。その後も顆粒膜細胞は引き続き増殖し、卵胞内に卵胞液と呼ばれる組織液で満たされた腔構造 (卵胞腔) が形成される。この卵胞腔が形成された卵胞を三次卵胞 (または胞状卵胞) と呼び、顆粒膜細胞は卵母細胞を取り囲む卵丘細胞 (cumulus cell) と、卵胞壁を裏打ちする壁顆粒膜細胞 (mural granulosa cell) とへ分化して異なった性質を示すようになる。胞状卵胞のうち、卵胞腔がまだ小さく、初期の発達時期のものは初期胞状卵胞と呼ばれ、卵胞刺激ホルモン (Follicle stimulating hormone, FSH) の影響を受けて十分に発達したものは後期胞状卵胞と呼ばれる。卵胞の発達がさらに進むと、最終的には黄体形成ホルモン (Luteinizing hormone, LH) の刺激を受けて卵母細胞を放出、すなわち排卵する。

この一連の卵胞発達過程において卵母細胞や周囲の体細胞同士が密接に関わり合うことの重要性が明らかとなっている。例えば、マウスの卵母細胞は多種の細胞増殖因子 (以降、卵由来増殖因子と称する) を分泌し、周囲の体細胞の増殖 (Lanuza et al. 1998; Li et al. 2000) や分化 (Eppig 1997)、さらに、細胞機能などを制御している (Su et

---

al. 2007; Su et al. 2008; Su et al. 2009). また、卵丘細胞の正常な発達には卵由来増殖因子と壁顆粒膜細胞で産生される女性ホルモン（エストロゲン）が重要であるが(Emori et al. 2013; Sugiura et al. 2010), 壁顆粒膜細胞におけるエストロゲンなどのステロイドホルモン生産は、卵由来増殖因子によって制御されている(Elvin et al. 1999). さらに卵母細胞は、卵丘細胞や壁顆粒膜細胞でのFSH受容体(Otsuka et al. 2001)や、LH受容体(Eppig et al. 1997)の発現を制御し、卵胞の性腺刺激ホルモンへの応答性を制御している。一方で、正常に発達した卵丘細胞は、卵母細胞の成長や受精・発生能の獲得などに必要である(Vanderhyden et al. 1990). また、排卵に必須の現象である卵丘細胞層の膨潤化（卵丘膨化）には、卵母細胞に加えて、壁顆粒細胞由来の増殖因子が重要な役割を果たす(Buccione, Vanderhyden, et al. 1990; White et al. 2000; Leonardsson et al. 2002; Tullet et al. 2005). このように、卵胞を構成する細胞同士が複雑かつ密接に関わりあうコミュニケーションが、卵胞の正常な発達や、それを構成する細胞自身の分化や機能制御に重要である。

この卵胞発達過程での細胞同士のコミュニケーションについて、これまで増殖因子に着目した研究が多くなされてきた。例えば、卵母細胞はTGF- $\beta$ スーパーファミリーに属するBone morphogenetic protein 15 (BMP15) やGrowth differentiation factor 9 (GDF9)などを分泌しており、これらをコードする遺伝子に変異を持つ動物は、卵胞が正常に発達せず、妊孕性が低下する(Dong et al. 1996). また、卵母細胞はFibroblast growth factor 8 (FGF8)も分泌しており、FGF8はBMP15と協調的に働いて卵丘細胞における代謝制御に関わることが報告されている(Sugiura et al. 2008). 同様に壁顆粒膜細胞も多くの増殖因子を分泌しており、例えば壁顆粒膜細胞が分泌するNatriuretic peptide type C (NPPC)は卵母細胞の減数分裂停止を維持すること(M. Zhang et al. 2010), さらにEpidermal Growth Factor (EGF)-like factorは卵丘膨化を誘起すること(Park 2004)が報告されている。興味深いことに、これらの増殖因子の受容体である

---

---

EGF 受容体や NPR2 受容体の発現は、卵由来増殖因子によって制御されている(Lee et al. 2013; M. Zhang et al. 2010; Sugimura et al. 2015)。この様に、卵胞発達過程における、増殖因子を介した密接な細胞間のコミュニケーションについては、これまでに多くの研究が行われ、特に卵由来増殖因子の重要性が明らかとなってきた。

近年、細胞間コミュニケーションの新たな担い手として、細胞外分泌小胞のエクソソーム (exosome) が着目されている。エクソソームは細胞から分泌される大きさが直径 40-200 nm 程度の脂質二重膜の小胞である。エクソソームという名称は 1980 年代にヒツジの網状赤血球から分泌された小胞がエクソソームと命名されたことに始まった(Pan & Johnstone 1983)。当初、エクソソームの分泌は、細胞が単なるゴミを排出する手段と考えられてきた。しかし、エクソソームには mRNA や miRNA などが含まれており、エクソソームを取り込んだ細胞でエクソソーム由来の mRNA がタンパク質に翻訳されて機能すること、またエクソソーム由来の miRNA がそれを取り込んだ細胞での mRNA 発現を制御することなどが報告された(Valadi et al. 2007)。この報告は、エクソソームによる新たな細胞間の情報伝達機構の存在を示唆しており、これをきっかけにエクソソームは広く着目されるようになった。

エクソソームの分泌にはエンドソームが密接に関わっている(Trajkovic et al. 2008; Ostrowski et al. 2010; Thompson et al. 2013) (Figure 0-2)。エクソソームの分泌は、まず始めに、細胞内の多小胞体 (Multiple Vesicular Bodies: MVB) において、内側に出芽するように腔内小胞 (intraluminal vesicle: ILV) が形成されることに始まる。この腔内小胞形成の際には、細胞質中の mRNA, miRNA 及びタンパク質が取り込まれる。多小胞体が入ソームに輸送されると腔内小胞は分解されるが、細胞膜へと輸送されて多小胞体が細胞膜と融合すると腔内小胞が細胞外へと分泌される。この細胞外へと分泌された腔内小胞がエクソソームと呼ばれる(Mathivanan et al. 2010)。この腔内小胞

---

---

に物質が取り込まれる際、遊離のミトコンドリアタンパク質は取り込まれないため、エクソソームにはミトコンドリアタンパク質が内包されないことが知られる。このようにエクソソームの形成と分泌にはエンドソームが大きく関わっていると考えられている。

これまで、エクソソームに関しては癌との関連に着目した研究が多くされてきた(Kucharzewska et al. 2013)。例えば、エクソソームに内包される miRNA の種類が、正常な細胞と癌細胞において異なっていることから、癌患者の血清から単離されるエクソソームが、新たな癌の病理診断マーカーとして活用されることが期待されている(Taylor & Gercel-Taylor 2008; Escrevente et al. 2011; Sinha et al. 2014; Beach et al. 2014)。さらに癌細胞から分泌されるエクソソームが、正常な線維芽細胞を筋線維芽細胞へ分化誘導することや(Webber et al. 2010)、血管新生を誘導すること(Grange et al. 2011)、さらに癌細胞の増殖を高めること(Nabet et al. 2017)が知られている。これらの機能を通して、癌細胞の分泌するエクソソームは癌自身の悪性化に関わっていると考えられている。

一方、癌以外におけるエクソソームの役割についてはこれまで不明な点が多かったが、最近の研究により正常な組織発達やホメオスタシスの維持においてその役割が少しずつ明らかにされつつある。例えば、神経系において、シュワン細胞由来のエクソソームが軸索タンパク質合成を促進して神経細胞の保護作用を示すこと(Lopez-verrilli et al. 2013)、熱ショックタンパク質を内包するエクソソームが神経細胞に取り込まれてタンパク質の凝集を防ぎ、神経細胞の変性を防ぐこと(Takeuchi et al. 2015)、脳内の神経細胞から分泌されるエクソソームは $\beta$ アミロイドのクリアランスの一部を担い、アルツハイマー発症に関わること(Yuyama et al. 2012)、また、膵臓から分泌されるエクソソームがアミロイドーシスと糖尿病発症に関わること(Ribeiro et al. 2017) などが

---

---

報告されている。このように、エクソソームは多くの組織において広範な役割を果たすことが明らかとなりつつある。

生殖器官においてもエクソソームについての研究報告がされつつある。例えば、精巣上体から分泌されるエクソソームは精子の Wnt シグナルを促進し、精子成熟を促進すること(Koch et al. 2015)や、子宮内膜から分泌されるエクソソームが胚-子宮内膜間の相互作用を促進することで着床を促進することが報告されている(Nakamura et al. 2016; Burns et al. 2016)。このように、エクソソームは個体の生殖能や繁殖の制御にも関わることが明らかとなってきた。

哺乳類の卵巣卵胞においては、ウマの卵胞を用いた研究によってエクソソームの存在が初めて明らかにされた(da Silveira et al. 2012)。この研究では卵胞液にエクソソームが存在すること、さらに卵胞液のエクソソームは壁顆粒膜細胞に取り込まれることを明らかにし、卵胞内においてもエクソソームを介した細胞間のコミュニケーションが存在する可能性を示した(da Silveira et al. 2012)。しかしながら、哺乳類卵胞内のエクソソームの機能や役割について、未だ十分な研究は行われていない。

上記のような背景のもと、本研究では、哺乳類の卵胞内に存在する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最終的な目的として研究に着手した。

卵胞内エクソソームの研究に着手するにあたり、これまで卵胞発達研究において広く用いられてきたマウスでは、その三次卵胞の直径が 1 mm 以下と非常に小さく、解析に十分量の卵胞液を採取することが困難であった。一方、ブタは、卵巣の三次卵胞が 2-5 mm と大きく、容易に卵胞液を採取可能である。さらに食肉処理場より安価に十分な数を安定して入手することが可能である。これらのことから本研究では、まずブタをモデルに卵胞におけるエクソソームについての研究を行うことにし

---

た。しかし、ブタの卵胞にエクソソームが存在するかについては報告がない。そこで、第1章では、まずブタの卵胞液にエクソソームが存在するかどうかを確認することから研究を開始した。

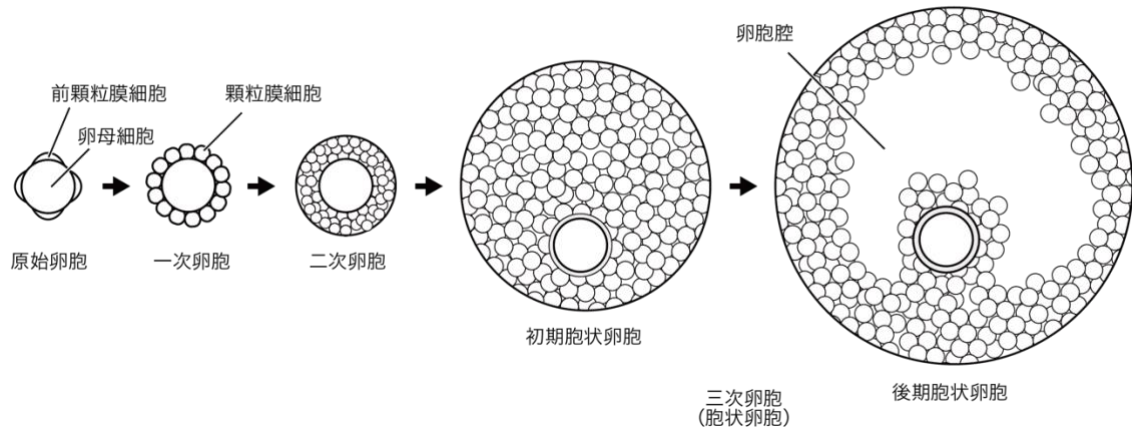
---

---

## 図表

Figure 0-1 卵胞の発達過程について

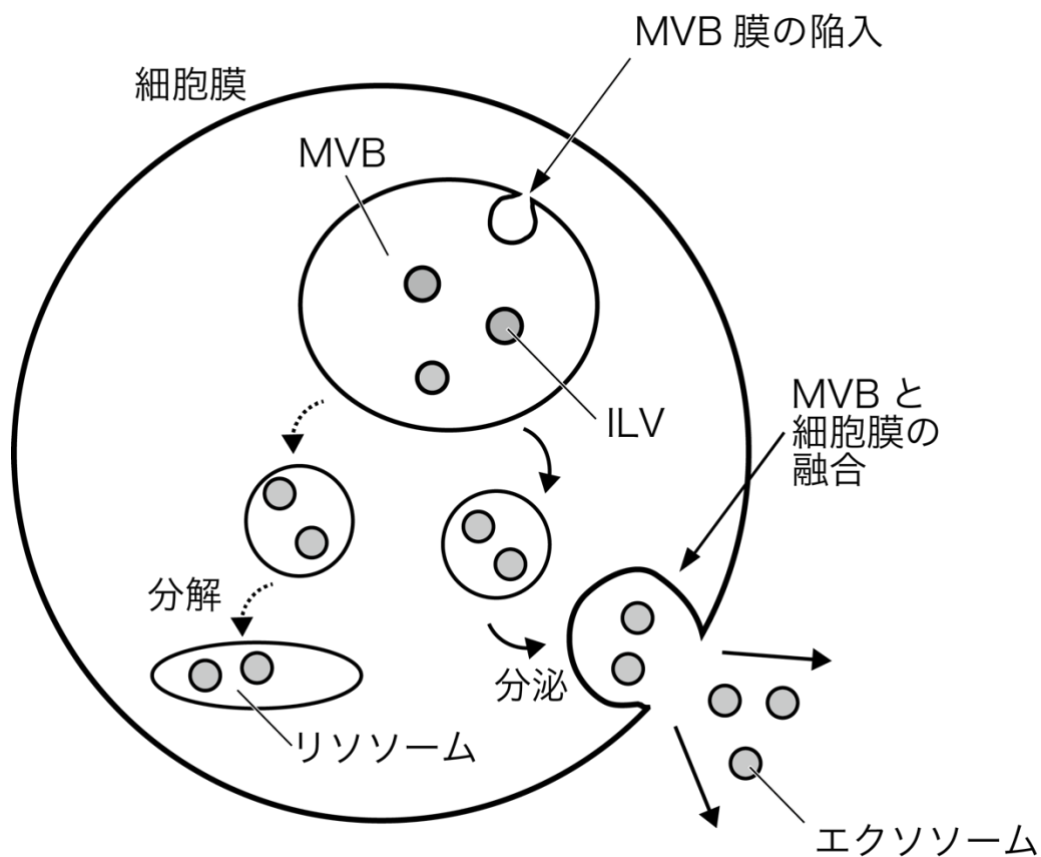
Figure 0-2 エクソソームの分泌過程について



**Figure 0-1 卵胞の発達過程について**

卵胞は、原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、三次卵胞に大別される。原始卵胞は、未発達な卵母細胞が、単層の前顆粒膜細胞に1細胞ずつ包まれることによって形成される。卵母細胞が成長を開始し、扁平な形態であった前顆粒膜細胞が立方状の形態の顆粒膜細胞へと発達すると、一次卵胞と呼ばれるようになる。次に、単層であった顆粒膜細胞の層が増殖に伴って多層化し、一次卵胞は二次卵胞へと発達する。その後も顆粒膜細胞は引き続き増殖し、卵胞内に卵胞液と呼ばれる組織液で満たされた腔構造（卵胞腔）が形成され、これを三次卵胞（胞状卵胞）と呼ぶ。胞状卵胞のうち、卵胞腔がまだ小さく、初期の発達時期のものは初期胞状卵胞と呼ばれ、FSHの影響を受けて十分に発達したものは後期胞状卵胞と呼ばれる。





**Figure 0-2 エクソソームの分泌過程について**

エクソソームの分泌は、細胞内の多小胞体 (Multiple Vesicular Bodies: MVB) において、内側に出芽するように腔内小胞 (intraluminal vesicle: ILV) が形成されることに始まる。多小胞体がリソソームに輸送されると腔内小胞は分解されるが (破線で表記)、細胞膜へと輸送されて多小胞体が細胞膜と融合すると腔内小胞が細胞外へと分泌される (実線で表記)。この細胞外へと分泌された腔内小胞がエクソソームと呼ばれる。

---

## 第 1 章

### ブタ卵胞エクソソームの存在確認と 卵胞細胞への影響解析

---

## 第 1 章

### 第 1 節

#### エクソソームの存在確認

---

---

## 緒言

本研究では卵胞内のエクソソームについて研究をする上で、解析に十分な量の卵胞液を採取できるブタをモデルに研究に着手した。しかし、ブタの卵胞液にエクソソームが存在するかについては未知であったため、本節では、まずブタの卵胞液におけるエクソソームの存在確認を行った。

一般にエクソソームには熱ショックタンパク質、細胞骨格タンパク質やエンドソームタンパク質等の様々なタンパク質が含まれている(Mathivanan et al. 2010)。70 kDa Heat-Shock Cognate Protein (HSC70) と Beta-actin (ACTB) が、多種の体液や細胞培養上清のエクソソームにおいて検出されることから(エクソソームデータベース (ExoCarta; <http://www.exocarta.org/>) より)、エクソソームのマーカータンパク質(以降、エクソソームマーカータンパク質と称した)として今回使用した。

また、エクソソームは、以下のような特徴を持つ(Lässer et al. 2012)。まず、エクソソームは、大きさが 40 nm から 200 nm 程度の小胞である。また、細胞残屑やアポトーシス小胞(詳しくは考察で後述する)とは異なり、ミトコンドリアのタンパク質が含まれない。さらに、内包される RNA の組成が一般的な細胞の RNA の組成とは異なっており、リボソーム RNA を含まず、小分子 RNA (small RNA) を多く含む。最後に、標的細胞に取り込まれるという点である。

そこで本節では、ブタ卵胞液よりエクソソーム様の小胞を単離し、単離した小胞が上記のエクソソームの特徴を持つかどうかを検討した。

---

---

## 材料と方法

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由3. 博士論文の全部または一部が共同著作物（共著）であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていない」に該当するため、全文を公表することができません。

---

---

## 結果

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由3. 博士論文の全部または一部が共同著作物（共著）であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていない」に該当するため、全文を公表することができません。

---

---

## 考察

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由3. 博士論文の全部または一部が共同著作物（共著）であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていない」に該当するため、全文を公表することができません。

---

---

## 図表

Figure 1-1 透過型電子顕微鏡によるブタ卵胞液のエクソソーム分画の観察

Figure 1-2 ウェスタンブロット法によるタンパク質解析

Figure 1-3 Bioanalyzer による RNA の解析

Figure 1-4 蛍光標識卵胞エクソソームの壁顆粒膜細胞と卵丘-卵母細胞複合体  
(COC) への取り込み



---

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由3. 博士論文の全部または一部が共同著作物（共著）であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていない」に該当するため、全文を公表することができません。

---

## 第 1 章

### 第 2 節

#### エクソソームが卵胞細胞に及ぼす影響の解析

---

---

## 緒言

第1節において、ブタの卵胞液内にエクソソームが存在することが明らかになった。最近の研究において(Hung et al. 2015), ウシの卵胞液から単離したエクソソームが卵丘膨化を促進することが報告されていることから、本節ではブタ卵胞液中のエクソソームが同様の機能を持つかどうかについて検討した。

卵丘膨化とは、排卵刺激を受けた卵丘細胞がヒアルロン酸などの細胞外基質を大量に分泌し文字通り膨潤化する形態的な変化である。この卵丘膨化は、卵丘-卵母細胞複合体(COC)の壁顆粒膜細胞からの遊離(Chen et al. 1993), 排卵後のCOCと卵管上皮細胞との相互作用における卵管内移動の促進(Sato et al. 1995), 卵母細胞の透明帯の構造の安定化(De Felici et al. 1985)などに関与することが知られている。また、卵丘膨化には、HAS2 (hyaluronan synthase 2), PTGS2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2), PTX3 (pentraxin 3, long), TNFIP6 (tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6)などの発現が必須であり(Davis et al. 1999; Fülöp et al. 2003; Ochsner et al. 2003; Sugiura et al. 2009; Varani et al. 2002), これらをコードする遺伝子をノックアウトした雌マウスでは排卵異常により不妊になる。したがって、卵丘膨化は排卵に大きな生理的意義を果たしていると考えられている。

前述のように、最近の研究によりウシの卵胞液中のエクソソームが卵丘膨化を促進することが報告された(Hung et al. 2015)。この報告では、ウシの卵胞液中から単離したエクソソーム分画をウシのCOC及びマウスのCOCに添加培養すると、EGFやFSHといったリガンドとなる増殖因子を必要とせずに卵丘膨化を誘導することが報告された。すなわち、卵胞液エクソソームによる新たな卵丘膨化制御機構が存在すると考えられる。

---

---

卵丘膨化が起こる機構には動物種ごとに違いが知られている(Vanderhyden et al. 1990). 例えば, マウスの卵丘膨化には EGF 様ペプチドシグナルに加えて, 卵母細胞由来の因子が必須である(Buccione, Schroeder, et al. 1990). 一方, ウシの卵丘膨化には卵由来増殖因子は必要ない(Ralph et al. 1995). ブタにおいては, ブタ卵母細胞が卵丘膨化を促進できる因子を分泌してはいるが, この因子はブタ卵丘膨化に必ずしも必須ではないことが報告されている(Prochazka et al. 2004). しかしブタにおいても, 完全な卵丘膨化には卵母由来増殖因子が必要である(Nakayama et al. 1996). このように, 卵丘膨化機構には種差が存在することから, 前述のウシ卵胞液のエクソソームによる卵丘膨化の促進についても, この知見を他の哺乳類にも当てはめることが可能かどうかについては検討する必要がある.

また, 正常な卵丘膨化, 及び卵丘膨化関連遺伝子の発現は卵丘細胞における ERK1/2 の活性化を必要とする(Park et al. 2004; Su et al. 2003). ヒト胃ガン細胞 (SGC7901) 由来のエクソソームがヒト臍帯間葉系幹細胞における ERK1/2 を活性化 (リン酸化) させることが知られている(Gu et al. 2012). 従って, 卵胞内のエクソソームが卵丘細胞における ERK1/2 を活性化させる可能性が考えられる.

そこで本節では, ブタ卵胞内のエクソソームが卵丘膨化を誘導できるかについて検討することを目的とした.

---

---

## 材料と方法

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由3. 博士論文の全部または一部が共同著作物（共著）であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていない」に該当するため、全文を公表することができません。 \_

---

---

## 結果

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由3. 博士論文の全部または一部が共同著作物（共著）であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていない」に該当するため、全文を公表することができません。 \_

---

---

## 考察

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由3. 博士論文の全部または一部が共同著作物（共著）であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていない」に該当するため、全文を公表することができません。

---

---

## 図表

Table 1-1 本節で用いたプライマーセットの配列

Figure 1-5 ブタ卵胞エクソソームがブタ COC の卵丘膨化に与える影響の解析

Figure 1-6 ブタ卵胞エクソソームがマウス COC の卵丘膨化に与える影響の解析

Figure 1-7 ブタ卵胞エクソソームが ERK1/2 のリン酸化に与える影響の解析



---

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由3. 博士論文の全部または一部が共同著作物（共著）であり、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていない」に該当するため、全文を公表することができません。

---

## 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

---

## 第2章

### 第1節

#### 卵胞内エクソソームの分泌由来細胞の探索

---

---

## 緒言

第1章の結果からブタの卵胞内にエクソソームが存在し、この卵胞内のエクソソームは卵巣機能に影響を与える因子であることが示唆された。しかしながら、実際に卵巣機能や卵胞発達に対するエクソソームの機能や役割は不明のままである。この問題を解決するため、本研究では、個体レベルでの解析をするために卵胞におけるエクソソームの分泌を欠損させることを目的とした遺伝子欠損動物を作製することにした。そのため、まず、卵胞内においてどの細胞がエクソソームを分泌しているのかを明らかにする必要がある。そこで、本節では卵胞内の体細胞の大部分の割合を占める壁顆粒膜細胞がエクソソームを分泌する可能性について検証を行うこととした。この検討では、遺伝子改変動物を作製する上で、ブタの遺伝子改変個体を作製することは困難であることから、ブタよりも比較的容易に遺伝子改変個体を作製することが可能であるマウスをモデルにして解析を行うこととした。

さらに、実際に卵胞内に存在するエクソソームの中に、壁顆粒膜細胞から分泌されたものが存在しているのかについての検討も行った。一般に、エクソソームに内包されるRNAはそのエクソソームを分泌した細胞のRNAを反映していることが知られている。そこで、卵胞内エクソソームに壁顆粒膜細胞を反映するようなRNAが含まれているかについて解析するために、RNAシーケンス法を用いて比較を行った。この際、マウスの卵胞内のエクソソームを回収することは困難であったことから、ブタをモデルに解析を行った。

---

---

## 材料と方法

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由 8. 博士論文の一部が、これから単行本もしくは雑誌掲載などの形で刊行される予定である。」に該当するため、全文を公表することができません。

---

---

## 結果

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由 8. 博士論文の一部が、これから単行本もしくは雑誌掲載などの形で刊行される予定である。」に該当するため、全文を公表することができません。

---

---

## 考察

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由 8. 博士論文の一部が、これから単行本もしくは雑誌掲載などの形で刊行される予定である。」に該当するため、全文を公表することができません。

---

---

## 図表

Table 2-1 RNA シークエンス解析によって検出された壁顆粒膜細胞特異的転写産物とその発現量

Table 2-2 RNA シークエンス解析によって検出されたエクソソームにおいてのみ検出された転写産物とその発現量

Figure 2-1 透過型電子顕微鏡によるマウス壁顆粒膜細胞培養上清のエクソソーム分画の観察

Figure 2-2 ウェスタンブロット法によるタンパク質解析

Figure 2-3 ナノ粒子トラッキング法による粒子のサイズと粒子数の解析

Figure 2-4 蛍光標識エクソソームの壁顆粒膜細胞と卵丘細胞への取り込み



---

---

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由 8. 博士論文の一部が、これから単行本もしくは雑誌掲載などの形で刊行される予定である。」に該当するため、全文を公表することができません。

---

## 第2章

### 第2節

# 壁顆粒膜細胞におけるエクソソームの分泌と 取り込みの解析

---

---

## 緒言

第2章第1節の結果から、マウス壁顆粒膜細胞がエクソソームを分泌すること、そして卵胞内のエクソソームの少なくともその一部は壁顆粒膜細胞由来であることが示唆された。現在までに、壁顆粒膜細胞における様々な機能が卵由来増殖因子によって制御されることが知られるが、壁顆粒膜細胞におけるエクソソーム機能が卵由来増殖因子によって制御されているのか、さらにはエクソソームに対する感受性が制御されているのは不明である。そこで本節では、卵由来増殖因子が壁顆粒膜細胞におけるエクソソーム分泌とエクソソームの取り込みに与える影響について解析を行った。

エクソソームの分泌や取り込みに関わる経路やタンパク質について、現在までに少しずつ明らかになりつつある。例えば、スフィンゴミエリナーゼ、small G タンパク質の Rab、さらには p53 によって誘導される TSAP6 (tumor suppressor activated pathway-6) などの分子を阻害した際にエクソソームの分泌量が低下することが報告されている(Trajkovic et al. 2008; Ostrowski et al. 2010; Yu et al. 2006; Yuyama et al. 2012)。また、エクソソームの取り込みが、クラスリン依存性エンドサイトーシスやマクロピノサイトーシスを阻害した際に抑制されることが報告されている(Svensson et al. 2013; Horibe et al. 2018)。これらの経路やタンパク質が壁顆粒膜細胞におけるエクソソーム分泌や取り込みに関わる可能性が考えられることから、実際のエクソソーム分泌数や取り込み量に加えて、これらをコードする遺伝子の発現に対する卵由来増殖因子の影響についても解析することにした。

卵由来増殖因子の影響を解析する際には、一般に卵母細胞を 2 個/ $\mu\text{L}$  の濃度で共培養する実験が行われる(Sugiura et al. 2005)。しかしながら、培養上清から解析に

---

十分な量のエクソソーム分画を単離するためには、ミリリットル (mL) スケールで培養を行う必要がある。そのため、共培養に数千個の卵母細胞が必要となり、一度の実験に百匹ほどのマウスを実験に供すこととなり現実的ではない。そこで、一部の実験では、卵母細胞を共添加する代わりに、卵母細胞が分泌する BMP15, GDF9, FGF8 のリコンビナントタンパク質を添加培養することで、壁顆粒膜細胞におけるエクソソーム分泌に対して卵由来増殖因子が及ぼす影響を解析することにした。

また、卵由来増殖因子のうち、TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する BMP15 と GDF9 は SMAD シグナル経路によって細胞内にシグナルを伝える。リガンドである BMP15 や GDF9 が細胞膜上の受容体と結合すると、受容体が活性化して細胞質中の特異的 SMAD をリン酸化する。このリン酸化した特異的 SMAD は共役型 SMAD に結合して核内に移行し、標的となる遺伝子の転写を誘導する。この際、GDF9 の受容体である ALK4 に対する阻害剤 (SB431542) を用いることによって、GDF9 下流のシグナルを抑制することが可能である。そこで、卵由来増殖因子の添加によって観察された表現型が非特異的な影響ではなく、卵由来増殖因子の影響に依るものであることを確かめるために、この阻害剤を用いた実験も行った。

エクソソームの細胞への取り込みを可視化するために、広く蛍光標識を利用した方法が使われている。本節の、エクソソームの取り込みを解析する実験には、大量の蛍光標識されたエクソソームが必要となることから、EGFP を内包するエクソソームを分泌する EGFP-MEF (詳しくは方法に後述する) を樹立し、この EGFP-MEF から分泌されるエクソソームを解析に用いることとした。

---

---

## 材料と方法

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由 8. 博士論文の一部が、これから単行本もしくは雑誌掲載などの形で刊行される予定である。」に該当するため、全文を公表することができません。 \_

---

---

## 結果

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由8. 博士論文の一部が、これから単行本もしくは雑誌掲載などの形で刊行される予定である。」に該当するため、全文を公表することができません。

---

---

## 考察

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由 8. 博士論文の一部が、これから単行本もしくは雑誌掲載などの形で刊行される予定である。」に該当するため、全文を公表することができません。

---

---

## 図表

Table 2-3 本節で用いたプライマーセットの配列

Figure 2-5 エクソソーム分泌経路に関連する遺伝子発現量に対する卵由来増殖因子の影響の解析

Figure 2-6 エクソソーム分泌数に対する卵由来増殖因子の影響の解析

Figure 2-7 エクソソーム取り込みに対する卵由来増殖因子の影響の解析

Figure 2-8 エンドサイトーシスに関連する遺伝子発現量に対する卵分泌因子の影響の解析

Figure 2-9 卵胞発達とエクソソームの取り込み制御モデル



---

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由 8. 博士論文の一部が、これから単行本もしくは雑誌掲載などの形で刊行される予定である。」に該当するため、全文を公表することができません。

---

第3章  
エクソソーム分泌阻害が  
卵胞発達に及ぼす影響の解析

---

## 第3章

### 第1節

壁顆粒膜細胞のエクソソーム分泌に対する  
中性スフィンゴミエリナーゼ阻害の解析

---

---

## 緒言

第2章において、壁顆粒膜細胞がエクソソームを分泌し、卵胞内のエクソソームの少なくともその一部は壁顆粒膜細胞由来であることを示唆した。そこで、本章では、卵胞内においてエクソソームの分泌が欠損する遺伝子改変マウス（エクソソーム分泌欠損マウスと称する）を作製してその卵胞の表現型を解析し、さらに観察された表現型がエクソソーム分泌の欠損に起因すること確かめることを目的とした。

現在までのエクソソームに関する研究の多くは、内包される miRNA について着目した網羅的な解析や、培養実験を用いた解析が主であった。エクソソーム分泌の欠損が組織発達に与える影響について、遺伝子改変動物を用いた個体レベルでの解析は、卵巣に関わらず、これまでどの組織においても行われていない。これまでエクソソームの機能や役割について、遺伝子改変動物を用いた個体レベルでの解析が行われてこなかった理由の一つには、その分泌経路の複雑さに有ると考えられる。前述したように、エクソソームの分泌にはエンドサイトーシス、中性スフィンゴミエリナーゼ (N-SMase)、small G プロテインの Rab などが関わっている。このエクソソームの分泌経路に必要なタンパク質は細胞種ごとに異なっており (Trajkovic et al. 2008; Ostrowski et al. 2010; Thompson et al. 2013)、卵胞では同定されていない。そのため、卵胞においてエクソソームの分泌が欠損するマウスを作製するためには、卵胞においてエクソソームの分泌に必要な遺伝子を同定する必要があると考えられる。

そこで、まず本節では、壁顆粒膜細胞におけるエクソソーム分泌に必要な遺伝子を同定することを目的とし、エクソソーム分泌に重要であることが他の細胞種で報告されている N-SMase が壁顆粒膜細胞のエクソソーム分泌に必要であるか解析した。また、N-SMase には N-SMase1 (遺伝子名: *Smpd2*)、N-SMase2 (遺伝子名:

---

*Smpd3*), 及び N-SMase3 (遺伝子名: *Smpd4*) の3つのアイソフォームが報告されている。そこで、これらのアイソフォームのうちどれが卵巣や壁顆粒膜細胞において発現しているか確認し、さらに N-SMase をノックアウトした際に卵巣において表現型が現れるのかについて、阻害剤と卵巣の器官培養系を用いることによってスクリーニングを行った。

---

---

## 材料と方法

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由 8. 博士論文の一部が、これから単行本もしくは雑誌掲載などの形で刊行される予定である。」に該当するため、全文を公表することができません。 \_

---

---

## 結果

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由 8. 博士論文の一部が、これから単行本もしくは雑誌掲載などの形で刊行される予定である。」に該当するため、全文を公表することができません..

---

---

## 考察

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由8. 博士論文の一部が、これから単行本もしくは雑誌掲載などの形で刊行される予定である。」に該当するため、全文を公表することができません。



---

---

## 図表

Table 3-1 本節で用いたプライマーセットの配列

Figure 3-1 壁顆粒膜細胞のエクソソーム分泌に対する N-SMase 阻害の影響の  
解析

Figure 3-2 N-SMase のアイソフォームの発現解析

Figure 3-3 卵巣器官培養における卵胞発達の遺伝子発現量の解析

---

---

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由 8. 博士論文の一部が、これから単行本もしくは雑誌掲載などの形で刊行される予定である。」に該当するため、全文を公表することができません。

---

## 第3章

### 第2節

#### N-SMase 欠損マウスの作製と卵巣の表現型の解析

---

---

## 緒言

第1節の結果より、壁顆粒膜細胞におけるエクソソーム分泌に N-SMase が必要であることが示唆された。そこで、本節では N-SMase の欠損マウスを作製することによって、卵胞におけるエクソソームの（少なくとも一部の）分泌が欠損するマウス（エクソソーム分泌欠損マウス）を作製し、その卵巣における表現型を解析することにした。

N-SMase には N-SMase1（遺伝子名：*Smpd2*）、N-SMase2（遺伝子名：*Smpd3*）、及び N-SMase3（遺伝子名：*Smpd4*）の3つのアイソフォームが報告されている。これらのアイソフォームのうち、*Smpd2*、*Smpd3* については、すでにノックアウトマウスが作製され、骨形成の異常や成長遅延といった表現型が報告されている (Zumbansen & Stoffel 2002; Li et al. 2016; Jingdong Qin 2012; Poirier et al. 2012; Khavandgar et al. 2011; Devillard et al. 2010; Aubin et al. 2005; Stoffel et al. 2007)。しかし、卵巣における表現型や妊孕性についての解析はなされておらず、論文において言及もない。また *Smpd4* についても、ノックアウトマウスの胎児が “Subviable” であるとの報告しかされていない (Wilson et al. 2016)。そのため、N-SMase 欠損によって卵巣においてどのような表現型が現れるか不明である。

遺伝子改変動物の作製に、現在 CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術が多く活用されている。CRISPR/Cas9 システムとは、標的とするゲノム DNA 配列に相補的に結合するガイド RNA (gRNA) と Cas9 タンパク質によって、標的配列が二重鎖切断され、その切断部位が修復される過程において、塩基の欠失や挿入が起こることによってゲノム配列を編集することで、目的とする遺伝子を改変させる手法である。この CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術によって、3 遺伝子以上の多

---

くの遺伝子の同時ノックアウトマウスの作製が可能となっている(FUJII et al. 2014; Wang et al. 2013; Li et al. 2013; Zhou et al. 2014).

そこで本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いて N-SMase のアイソフォームの 3 遺伝子の同時欠損マウスの作製を試みたが、産仔を得ることが出来なかった(仮親 4 匹に対して産仔 0 匹)。そこで 2 遺伝子に絞って欠損マウスの作製を試みたところ、*Smpd2* と *Smpd3* の 2 遺伝子の同時欠損(仮親 4 匹に対して産仔 0 匹)、および *Smpd3* と *Smpd4* の同時欠損においても産仔を得られなかった(仮親 3 匹に対して産仔 0 匹)。一方、*Smpd2* と *Smpd4* の 2 遺伝子同時欠損については産仔(ファウンダーマウス)が得られたため、本研究ではこのマウス系統をモデルに解析を行うこととした(結果にて詳述)。

また、すでに述べているように、エクソソームの分泌経路に関与するタンパク質の遺伝子改変動物を作製しても、観察される表現型がエクソソームの分泌の欠損に直接起因するものか判断することは困難である。そのため、N-SMase 欠損マウスの卵巣で観察される表現型がエクソソームの分泌の欠損に直接起因するものか判断するには、卵巣で観察される表現型が、野生型マウスの卵胞エクソソームを添加することで回復することを確認する必要がある。しかし、生体内の卵胞に注入することは困難である。そこで、壁顆粒膜細胞の培養系を用いて、N-SMase 欠損マウスの卵巣で観察される表現型の一部を再現し、この培養系に壁顆粒膜細胞由来のエクソソームを添加することで、表現型が回復するかについて解析を行うこととした。

---

---

## 材料と方法

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由 8. 博士論文の一部が、これから単行本もしくは雑誌掲載などの形で刊行される予定である。」に該当するため、全文を公表することができません。 \_

---

---

## 結果

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由 8. 博士論文の一部が、これから単行本もしくは雑誌掲載などの形で刊行される予定である。」に該当するため、全文を公表することができません。 \_

---

---

## 考察

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由8. 博士論文の一部が、これから単行本もしくは雑誌掲載などの形で刊行される予定である。」に該当するため、全文を公表することができません。



---

---

## 図表

Table 3-2 ファウンダーマウス (F0 マウス) で検出された変異導入アレルの配列

Figure 3-4 gRNA の配列及び得られた産仔における変異導入アレルの配列から予測されるアミノ酸配列

Figure 3-5 ミュータントマウスの卵巢切片像と胞状卵胞数

Figure 3-6 ミュータントマウスの卵巢における遺伝子発現量の解析

Figure 3-7 エクソソーム分泌阻害時における壁顆粒膜細胞のエクソソーム添加培養の影響の解析

---

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由 8. 博士論文の一部が、これから単行本もしくは雑誌掲載などの形で刊行される予定である。」に該当するため、全文を公表することができません。

---

---

## 総括

本研究では、卵巣の卵胞発達制御メカニズムを理解するために、細胞外分泌小胞のエクソソームに着目し、卵胞内のエクソソームが卵胞発達に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

第1章では、ブタの卵胞におけるエクソソームの存在確認を行い、卵丘膨化に与える影響を解析した。第1節では、電子顕微鏡観察などを用いてブタの卵胞にエクソソームが存在することを明らかとした。また、第2節では、ウシの卵胞エクソソームが卵丘膨化を促進するという報告(Hung et al. 2015)を受けて、ブタの卵胞エクソソームも同様に卵丘膨化を促進するかどうかについて解析した。その結果、ブタの卵胞エクソソームはそれ自身単独では卵丘膨化を促進しないが、卵丘膨化の補助をすることが示唆された。

第2章では、卵胞内のエクソソームがどの細胞から分泌されているかについて明らかにするために、壁顆粒膜細胞がエクソソームを分泌する可能性について検討を行い、さらに卵由来増殖因子の制御について解析を行った。

第2章第1節では、マウスの壁顆粒膜細胞の培養上清中のエクソソームの存在確認と、ブタの卵胞エクソソームのRNAシーケンス解析を行った。電子顕微鏡観察などの結果からマウスの壁顆粒膜細胞がエクソソームを分泌するが明らかとなった。さらにRNAシーケンス解析の結果から、卵胞内のエクソソームの少なくともその一部は壁顆粒膜細胞由来であること、また卵胞内のエクソソームにおいて肺や肝臓特異的な転写産物が検出されたことから、他の組織由来のエクソソームが血中を介して卵胞に到達することによって卵巣に情報伝達する可能性が示唆された。

---

第2章第2節では、壁顆粒膜細胞におけるエクソソーム機能を、卵由来増殖因子が制御するかについて解析を行った。エクソソームの分泌と取り込みに着目して解析を行った結果、卵由来増殖因子は壁顆粒膜細胞のエクソソーム分泌には影響を及ぼさないが、エクソソームの取り込みを抑制し、壁顆粒膜細胞のエクソソームに対する感受性を制御することが示唆された。この結果は、卵胞内のエクソソームは卵母細胞による制御の下、卵胞発達の初期では顆粒膜細胞に取り込まれないため影響を及ぼさないが、卵胞が発達するにつれて卵母細胞の遠くに位置する壁顆粒膜細胞に影響を及ぼし機能するという新たなモデルが考えられる。卵胞発達過程において卵由来増殖因子の制御とエクソソームが密接に関わり合う可能性が示唆された。

第3章では、個体レベルで卵胞発達におけるエクソソームの役割を解析するために、エクソソーム分泌欠損動物として *Smpd2* 欠損マウスを作製し、その表現型を解析した。さらに、エクソソームのレスキュー実験を行うことで、*Smpd2* 欠損マウスで観察された表現型がエクソソーム分泌の欠損に起因するか解析した。

第3章第1節では、壁顆粒膜細胞のエクソソームに分泌に必要な遺伝子の同定を試みた。エクソソームの分泌には様々なタンパク質が関わっているが、少なくとも N-SMase 阻害によってエクソソームの分泌が抑制されること、つまり壁顆粒膜細胞におけるエクソソームの分泌に N-SMase が必要であることが明らかとなった。

第3章第2節では、N-SMase 欠損マウスの作製を試みた。N-SMase には *Smpd2*, *Smpd3*, *Smpd4* の三つのアイソフォームが存在し、壁顆粒膜細胞において全ての発現が確認された。そこで上記3遺伝子のトリプルノックアウトマウスの作製を試みたが、胎生致死になったためか、産仔を得るには至らなかった。そこで、2遺伝子に着目した際に、産仔を得るに至った2遺伝子のダブルノックアウトマウスの系統をモデルに解析を行った。その結果、2遺伝子について変異導入配列を両アレルに持つ産仔は得られなかったため、*Smpd2* 欠損マウスについて解析した。*Smpd2* 欠損マウスで

---

は矮小性が観測され、卵巣での表現型が矮小に起因する可能性は否定できないが、後期胞状卵胞数の有意な低下、及び閉鎖卵胞数の有意な増加が認められた。また、テストステロンからエストロゲンを合成する酵素であるアロマターゼ (*CYP19A1*) や黄体形成ホルモン受容体 (*LHCGR*) の発現について解析すると、*Smpd2* 欠損マウスにおいて *Cyp19a1* の発現量に有意な低下が認められた。さらに、壁顆粒膜細胞の培養上清由来のエクソソームによって *Cyp19a1* 遺伝子の発現がレスキュー可能かどうかについて検討を行った結果、エクソソームの添加によってレスキューできることが明らかとなった。以上の結果から、*Smpd2* は卵巣において初期胞状卵胞から後期胞状卵胞への発達に必要であり、さらに壁顆粒膜細胞における *Cyp19a1* の発現誘導には壁顆粒膜細胞自身が分泌するエクソソームが必要であることが示唆された。

ここで、本研究結果から示唆された卵由来増殖因子による壁顆粒膜細胞のエクソソーム取り込みの制御機構と、壁顆粒膜細胞由来のエクソソームが壁顆粒膜細胞自身の *Cyp19a1* 発現を補助する機構が、実際の卵胞発達過程においてどのように寄与しているのかについて考察する (Figure 4-1)。前述したように、卵由来増殖因子の顆粒膜細胞に対する作用は卵胞発達の経過に伴った物理的な距離の増加によって低下する。そのため、卵胞発達初期の段階では取り込みが抑制されているために卵胞腔内にエクソソームは蓄積していくと考えられる。また、FSH 刺激によって卵胞はその物理的な大きさを急激に増大させることから、すなわち、卵母細胞から距離が遠い FSH 刺激後の壁顆粒膜細胞に最も卵胞内のエクソソームは取り込まれ、作用を及ぼすと考えられる。*Cyp19a1* はエストロゲンを産生するアロマターゼであるが、このエストロゲンは主に卵丘細胞の発達を促進して、卵母細胞の発達を促進する。エストロゲン濃度と卵母細胞や胚発生の発生能と大きく関わる事が知られる (Sugiura et al. 2010; Aardema et al. 2018; Zheng et al. 2003)。このようにエストロゲンは卵母細胞の発達に非常に重要な因子であるが、壁顆粒膜細胞はエクソソームを卵胞内に蓄積させ、FSH 刺

---

激後にそのエクソソームを受け取ることによってエストロゲンの産生を促進させているのではないだろうか。すなわち、卵胞内（壁顆粒膜細胞由来）のエクソソームは卵胞発達過程において、FSH 刺激を受けた卵胞のエストロゲン産生を急増させる作用を果たしているのではないだろうか。この点については、今回の遺伝子改変マウスやエクソソーム添加培養実験において、血中及び培養上清エストロゲン濃度については解析を行っていないため、今後の検討課題であると考えられる。

本研究結果が卵胞内のエクソソームの卵胞発達に対する機能や役割の一端を明らかにしたといえども、その全貌を明らかにしたとはいえない。つい最近、卵巣以外の組織であるが、脳脊髄液に視床下部神経幹細胞から分泌されるエクソソームが脳機能制御を介して個体の老化スピードを制御することが個体レベルの実験を用いて報告された(Zhang et al. 2017)。この研究では、老化個体では視床下部神経幹細胞が自然消滅することを利用し、老化個体のマウスの脳脊髄液に視床下部神経幹細胞由来のエクソソームを注入するレスキュー実験を実施している。今後、卵胞内において顆粒膜細胞などのある細胞種を特異的に除去することや、個体の卵胞にエクソソームを注入するレスキュー実験が技術的に可能となれば、卵胞におけるエクソソームの機能や役割のさらなる理解が得られると考えられる。

以上、本研究により卵胞内におけるエクソソームのうち、壁顆粒膜細胞から分泌されるエクソソームは *Cyp19a1* の発現誘導を補助し、初期胞状卵胞から後期胞状卵胞への発達時期に重要な働きをすることが示唆された。これらの知見は、卵胞の発達制御の新たな知見を提供し、卵巣の機能制御の理解に貢献するものである。

---

---

## 図表

Figure 4-1 本研究が提唱する卵由来増殖因子によるエクソソームの取り込み制御機構のモデル

---

---

本節は、論文をインターネット公表できない「やむを得ない事由 8. 博士論文の一部が、これから単行本もしくは雑誌掲載などの形で刊行される予定である。」に該当するため、全文を公表することができません。



---

---

## 参考文献

- Aardema, H. et al., 2018. Follicular 17 $\beta$ -estradiol and progesterone concentrations and degree of cumulus cell expansion as predictors of in vivo-matured oocyte developmental competence in superstimulated heifers. *Theriogenology*, 80(6), pp.576–583.
- Airola, M. V. & Hannun, Y.A., 2013. Sphingolipid metabolism and neutral sphingomyelinases. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 215(215), pp.57–76.
- Akers, J.C. et al., 2013. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology*, 113(1), pp.1–11.
- Arslan, F. et al., 2013. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Research*, 10(3), pp.301–312.
- Aubin, I. et al., 2005. A deletion in the gene encoding sphingomyelin phosphodiesterase 3 (Smpd3) results in osteogenesis and dentinogenesis imperfecta in the mouse. *Nature Genetics*, 37(8), pp.803–805.
- Beach, A. et al., 2014. Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, 7(1), p.14.
- Bose, R. et al., 1995. Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: An alternative mechanism for generating death signals. *Cell*, 82(3), pp.405–414.
- Buccione, R., Vanderhyden, B.C., et al., 1990. FSH-Induced Expansion of the Mouse Cumulus Oophorus in Vitro Is Dependent upon a Specific Factor ( s ) Secreted by the Oocyte. *Developmental Biology*, 138(1), pp.16–25.
- Buccione, R., Schroeder, A.C. & John J. Eppig., 1990. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of reproduction*, 43(4), pp.543–547.
- Burns, G.W., Brooks, K.E. & Spencer, T.E., 2016. Extracellular Vesicles Originate from the Conceptus and Uterus During Early Pregnancy in Sheep. *Biology of reproduction*, 94(3), p.56.
- Chen, I.-H. et al., 2017. Phosphoproteins in extracellular vesicles as candidate markers for breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(12), pp.3175–3180.
- Chen, L., Mao, S.J.T. & Larsen, W.J., 1992. Identification of a Factor in Fetal Bovine Serum That Stabilizes the Cumulus Extracellular Matrix. *The Journal of biological chemistry*, 267(17), pp.12380–12386.
- Chen, L., Russell, P.T. & Larsen, W.J., 1993. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: Roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Molecular Reproduction and Development*, 34(1), pp.87–93.

- 
- Cheng, G. et al., 2002. A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor beta knockout mouse ovary. *Biology of reproduction*, 66(1), pp.77–84.
- Cocucci, E. & Meldolesi, J., 2015. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology*, 25(6), pp.364–372.
- Costa Verdera, H. et al., 2017. Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *Journal of Controlled Release*, 266, pp.100–108.
- Davis, B.J. et al., 1999. Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1 $\beta$ . *Endocrinology*, 140(6), pp.2685–2695.
- Devillard, R. et al., 2010. Stress-induced sphingolipid signaling: Role of type-2 neutral sphingomyelinase in murine cell apoptosis and proliferation. *PLoS ONE*, 5(3), pp.1–11.
- Dong, J. et al., 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383(6600), pp.531–535.
- Dragovic, R. a et al., 2007. Oocyte-secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse cumulus cell expansion. *Biology of reproduction*, 76(5), pp.848–857.
- Elvin, J.A. et al., 1999. Paracrine Actions Of Growth Differentiation Factor-9 in the Mammalian Ovary. *Molecular Endocrinology*, 13(6), pp.1035–1048.
- Emori, C. et al., 2013. Cooperative effects of 17 $\beta$ -estradiol and oocyte-derived paracrine factors on the transcriptome of mouse cumulus cells. *Endocrinology*, 154(12), pp.4859–4872.
- Emori, C. & Sugiura, K., 2014. Role of oocyte-derived paracrine factors in follicular development. *Animal Science Journal*, 85(6), pp.627–633.
- Eppig, J.J., 1997. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 56(4), pp.976–984.
- Eppig, J.J. et al., 1997. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 56(4), pp.976–984.
- Escrevente, C. et al., 2011. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC cancer*, 11(1), p.108.
- De Felici, M., Salustri, A. & Siracusa, G., 1985. “Spontaneous” hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during in vitro culture. II. The effect of follicular fluid and glycosaminoglycans. *Gamete Research*, 12(3), pp.227–235.
- Feng, D. et al., 2010. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*, 11(5), pp.675–687.
- Fisher, C.R. et al., 1998. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Medical Sciences*, 95(12), pp.6965–6970.
- Frohlich, D. et al., 2014. Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons: impact on neuronal firing rate, signal transduction and gene regulation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1652), pp.20130510–20130510.
- FUJII, W. et al., 2014. One-step Generation of Phenotype-expressing Triple-knockout Mice with Heritable Mutated Alleles by the CRISPR/Cas9 System. *Journal of Reproduction and Development*, 60(4), pp.324–327.
-

- 
- Fülöp, C. et al., 2003. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. *Development*, 130(10), pp.2253–2261.
- Funahashi, H., 2002. Induction of capacitation and the acrosome reaction of boar spermatozoa by L-arginine and nitric oxide synthesis associated with the anion transport system. *Reproduction*, 124(4), pp.857–864.
- Grange, C. et al., 2011. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Research*, 71(15), pp.5346–5356.
- Gu, J. et al., 2012. Gastric Cancer Exosomes Trigger Differentiation of Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stem Cells to Carcinoma-Associated Fibroblasts through TGF- $\beta$ /Smad Pathway. *PLoS ONE*, 7(12), pp.1–8.
- Higuchi, C.M. et al., 2015. A Simplified Method for Three-Dimensional (3-D) Ovarian Tissue Culture Yielding Oocytes Competent to Produce Full-Term Offspring in Mice. *PLoS ONE*, 10(11), p.e0143114.
- Horibe, S. et al., 2018. Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake. *BMC Cancer*, 18(1), p.47.
- Hung, W.-T. et al., 2015. Extracellular Vesicles from Bovine Follicular Fluid Support Cumulus Expansion1. *Biology of Reproduction*, 93(5), pp.1–9.
- Hunzicker-Dunn, M.E. et al., 2012. PKA and GAB2 play central roles in the FSH signaling pathway to PI3K and AKT in ovarian granulosa cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(44), E2979–E2988.
- Iguchi, Y. et al., 2016. Exosome secretion is a key pathway for clearance of pathological TDP-43. *Brain*, 139, pp.3187–3201.
- Islam, A. et al., 2008. cAMP-dependent protein kinase A (PKA) signaling induces TNFR1 exosome-like vesicle release via anchoring of PKA regulatory subunit RII $\beta$  to BIG2. *Journal of Biological Chemistry*, 283(37), pp.25364–25371.
- Jingdong Qin, G.D., 2012. Evidence for coordination of lysosomal (ASMase) and plasma membrane (NSMase2) forms of sphingomyelinase from mutant mice. *FEBS Letters*, 586(22), pp.4002–4009.
- Kalra, H., Drummen, G.P.C. & Mathivanan, S., 2016. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), p.170.
- Kato, M. et al., 1999. Efficient selection of transgenic mouse embryos using EGFP as a marker gene. *Molecular Reproduction and Development*, 54(1), pp.43–48.
- Khavandgar, Z. et al., 2011. A cell-autonomous requirement for neutral sphingomyelinase 2 in bone mineralization. *Journal of Cell Biology*, 194(2), pp.277–289.
- Kikuchi, J. & Yasuhara, K., 2012. Transmission Electron Microscopy (TEM). In *Supramolecular Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Koch, S. et al., 2015. Post-transcriptional Wnt Signaling Governs Epididymal Sperm Maturation. *Cell*, 163(5), pp.1225–1236.
- Kosaka, N. et al., 2010. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *The Journal of biological chemistry*, 285(23), pp.17442–52.
- Kucharzewska, P. et al., 2013. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(18), pp.7312–7.
- Labun, K. et al., 2016. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic acids research*, 44(W1), W272–W276.
-

- 
- 
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–685.
- Lanuza, G.M., Fischman, M.L. & Baraño, J.L., 1998. Growth promoting activity of oocytes on granulosa cells is decreased upon meiotic maturation. *Developmental biology*, 197(1), pp.129–39.
- Lässer, C., Eldh, M. & Lötvall, J., 2012. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *Journal of Visualized Experiments*, (59), p.e3037.
- Lee, K.B. et al., 2013. Hormonal coordination of natriuretic peptide type C and natriuretic peptide receptor 3 expression in mouse granulosa cells. *Biology of reproduction*, 88(2), p.42.
- Lengner, C.J. et al., 2004. Primary mouse embryonic fibroblasts: A model of mesenchymal cartilage formation. *Journal of Cellular Physiology*, 200(3), pp.327–333.
- Leonardsson, G. et al., 2002. Embryo transfer experiments and ovarian transplantation identify the ovary as the only site in which nuclear receptor interacting protein 1/RIP140 action is crucial for female fertility. *Endocrinology*, 143(2), pp.700–707.
- Li, J. et al., 2016. Smpd3 Expression in both Chondrocytes and Osteoblasts Is Required for Normal Endochondral Bone Development. *Molecular and cellular biology*, 36(17), pp.2282–99.
- Li, R. et al., 2000. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biology of reproduction*, 63(3), pp.839–845.
- Li, W. et al., 2013. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, 31(8), pp.684–686.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25(4), pp.402–408.
- Lopez-verrilli, A., Picou, F. & Court, F.A., 2013. Schwann Cell-Derived Exosomes Enhance Axonal Regeneration in the Peripheral Nervous System. *Glia*, 61(11), pp.1795–1806.
- Luberto, C. et al., 2002. Inhibition of tumor necrosis factor-induced cell death in MCF7 by a novel inhibitor of neutral sphingomyelinase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(43), pp.41128–41139.
- Mathivanan, S., Ji, H. & Simpson, R.J., 2010. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics*, 73(10), pp.1907–1920.
- Matsuno, Y. et al., 2016. Effects of porcine oocytes on the expression levels of transcripts encoding glycolytic enzymes in granulosa cells. *Animal Science Journal*, 87(9), pp.1114–1121.
- Mendelson, C.R. et al., 2005. Transcriptional regulation of aromatase in placenta and ovary. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 95(1–5), pp.25–33.
- Mendelson, C.R. & Kamat, A., 2007. Mechanisms in the regulation of aromatase in developing ovary and placenta. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 106(1–5), pp.62–70.
- Morelli, A.E. et al., 2004. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*, 104(10), pp.3257–3266.
- Mulcahy, L.A., Pink, R.C. & Carter, D.R.F., 2014. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1), pp.1–14.
- 
-

- 
- Myers, M. et al., 2004. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction*, 127(5), pp.569–580.
- Nabet, B.Y. et al., 2017. Exosome RNA Unshielding Couples Stromal Activation to Pattern Recognition Receptor Signaling in Cancer. *Cell*, 170(2), p.352–366.e13.
- Nagyova, E. et al., 2011. Activation of cumulus cell SMAD2/3 and epidermal growth factor receptor pathways are involved in porcine oocyte-cumulus cell expansion and steroidogenesis. *Molecular Reproduction and Development*, 78(6), pp.391–402.
- Nakamura, K. et al., 2016. Induction of IFNT-stimulated genes by conceptus-derived exosomes during the attachment period. *PLoS ONE*, 11(6), pp.1–16.
- Nakayama, T., Inoue, M. & Sato, E., 1996. Effect of oocyectomy on glycosaminoglycan composition during cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro. *Biology of reproduction*, 55(6), pp.1299–1304.
- Ochsner, S.A. et al., 2003. Disrupted function of tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated gene 6 blocks cumulus cell-oocyte complex expansion. *Endocrinology*, 144(10), pp.4376–4384.
- Ostrowski, M. et al., 2010. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature cell biology*, 12(1), pp.19–30–13.
- Otsuka, F. et al., 2001. Bone Morphogenetic Protein-15 Inhibits Follicle-stimulating Hormone (FSH) Action by Suppressing FSH Receptor Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14), pp.11387–11392.
- Pan, B. & Johnstone, R.M., 1983. Fate of the Transferrin Receptor during Maturation of Sheep Reticulocytes In Vitro : Selective Externalization of the Receptor. *Cell*, 33(3), pp.967–977.
- Pangas, S.A., Jorgez, C.J. & Matzuk, M.M., 2004. Growth differentiation factor 9 regulates expression of the bone morphogenetic protein antagonist gremlin. *The Journal of biological chemistry*, 279(31), pp.32281–32286.
- Park, J. et al., 2004. EGF-Like Growth Factors As Mediators of LH Action in the Ovulatory Follicle. *Science*, 303(5658), pp.682–684.
- Park, J.-Y., 2004. EGF-Like Growth Factors As Mediators of LH Action in the Ovulatory Follicle. *Science*, 303(5658), pp.682–684.
- Di Pietro, C., 2016. Exosome-mediated communication in the ovarian follicle. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(3), pp.303–311.
- Poirier, C. et al., 2012. Neutral sphingomyelinase 2 deficiency is associated with lung anomalies similar to emphysema. *Mammalian Genome*, 23(11–12), pp.758–763.
- Prochazka, R. et al., 2004. Expression of Growth Differentiation Factor 9 Messenger RNA in Porcine Growing and Preovulatory Ovarian Follicles1. *Biology of Reproduction*, 71(4), pp.1290–1295.
- Procházka, R. et al., 2000. Developmental regulation of effect of epidermal growth factor on porcine oocyte-cumulus cell complexes: Nuclear maturation, expansion, and F-actin remodeling. *Molecular Reproduction and Development*, 56(1), pp.63–73.
- Prochazka, R., Blaha, M. & Nemcova, L., 2012. Signaling pathways regulating FSH-and amphiregulin-induced meiotic resumption and cumulus cell expansion in the pig. *Reproduction*, 144(5), pp.535–546.
- Qin, J. et al., 2012. Neutral sphingomyelinase 2 deficiency increases hyaluronan synthesis by up-regulation of hyaluronan synthase 2 through decreased ceramide production and activation of Akt. *Journal of Biological Chemistry*, 287(17), pp.13620–13632.
-

- 
- Ralph, J.H., Telfer, E.E. & Wilmut, I., 1995. Bovine Cumulus Cell Expansion Does Not Depend on the Presence of an Oocyte Secreted Factor. *Molecular reproduction and development*, 42(2), pp.248–253.
- Reizel, Y., Elbaz, J. & Dekel, N., 2010. Sustained Activity of the EGF Receptor Is an Absolute Requisite for LH-Induced Oocyte Maturation and Cumulus Expansion. *Molecular Endocrinology*, 24(2), pp.402–411.
- Ribeiro, D. et al., 2017. Extracellular vesicles from human pancreatic islets suppress human islet amyloid polypeptide amyloid formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (26), p.201711389.
- Rodgers, R.J. & Irving-Rodgers, H.F., 2010. Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid1. *Biology of Reproduction*, 82(6), pp.1021–1029.
- Santonocito, M. et al., 2014. Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid : bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation. *Fertility and Sterility*, 102(6), p.1751–1761.e1.
- Sato, E. et al., 1995. Structural changes in the oviductal wall during passage of unfertilized cumulus-Oocyte complexes in mice. *The Anatomical Record*, 241(2), pp.205–210.
- Shamseddine, A.A., Airola, M. V & Hannun, Y.A., 2015. Roles and regulation of neutral sphingomyelinase-2 in cellular and pathological processes. *Advances in Biological Regulation*, 57(631), pp.24–41.
- da Silveira, J.C. et al., 2012. Cell-Secreted Vesicles in Equine Ovarian Follicular Fluid Contain miRNAs and Proteins: A Possible New Form of Cell Communication Within the Ovarian Follicle1. *Biology of Reproduction*, 86(3), pp.1–10.
- Sinha, A. et al., 2014. In-depth proteomic analyses of ovarian cancer cell line exosomes reveals differential enrichment of functional categories compared to the NCI 60 proteome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 445(4), pp.694–701.
- Sohel, M.M.H. et al., 2013. Exosomal and Non-Exosomal Transport of Extra-Cellular microRNAs in Follicular Fluid: Implications for Bovine Oocyte Developmental Competence. *PLoS one*, 8(11), p.e78505.
- Stocco, C., 2008. Aromatase expression in the ovary: Hormonal and molecular regulation. *Steroids*, 73(5), pp.473–487.
- Stoffel, W. et al., 2007. Neutral Sphingomyelinase (SMPD3) Deficiency Causes a Novel Form of Chondrodysplasia and Dwarfism That Is Rescued by Col2A1-Driven smpd3 Transgene Expression. *The American Journal of Pathology*, 171(1), pp.153–161.
- Stoffel, W. et al., 2005. Neutral sphingomyelinase 2 (smpd3) in the control of postnatal growth and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(12), pp.4554–9.
- Su, Y. et al., 2002. Mitogen-activated protein kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. *Endocrinology*, 143(6), pp.2221–2232.
- Su, Y. et al., 2003. Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase ( ERK1 / 2 ) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte – cumulus cell complex. *Developmental Biology*, 263(1), pp.126–138.
- Su, Y. et al., 2008. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes : BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*, 135(1), pp.111–121.
- Su, Y., Sugiura, K. & Eppig, J.J., 2009. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: Paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Seminars in Reproductive Medicine*, 27(1), pp.32–42.
- Sugimura, S. et al., 2015. Promotion of EGF receptor signaling improves the quality of low developmental competence oocytes. *Developmental Biology*, 403(2), pp.139–149.
-

- 
- Sugiura, K. et al., 2010. Estrogen Promotes the Development of Mouse Cumulus Cells in Coordination with Oocyte-Derived GDF9 and BMP15. *Molecular Endocrinology*, 24(12), pp.2303–2314.
- Sugiura, K. et al., 2009. Fibroblast growth factors and epidermal growth factor cooperate with oocyte-derived members of the TGFbeta superfamily to regulate Spry2 mRNA levels in mouse cumulus cells. *Biology of reproduction* *Reprod.*, 81(5), pp.833–841.
- Sugiura, K. et al., 2008. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development*, 135(4), pp.786–786.
- Sugiura, K., Pendola, F.L. & Eppig, J.J., 2005. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Developmental Biology*, 279(1), pp.20–30.
- Svensson, K.J. et al., 2013. Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *The Journal of biological chemistry*, 288(24), pp.17713–24.
- Takeuchi, T. et al., 2015. Intercellular chaperone transmission via exosomes contributes to maintenance of protein homeostasis at the organismal level. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(19), E2497–E2506.
- Taylor, D.D. & Gerzel-Taylor, C., 2008. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 110(1), pp.13–21.
- Thompson, C. a et al., 2013. Heparanase regulates secretion, composition, and function of tumor cell-derived exosomes. *The Journal of biological chemistry*, 288(14), pp.10093–9.
- Tian, T. et al., 2013. Dynamics of exosome internalization and trafficking. *Journal of cellular physiology*, 228(7), pp.1487–95.
- Tian, T. et al., 2014. Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *Journal of Biological Chemistry*, 289(32), pp.22258–22267.
- Tomiuk, S. et al., 1998. Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13), pp.3638–3643.
- Tomiuk, S., Zumbansen, M. & Stoffel, W., 2000. Characterization and subcellular localization of murine and human magnesium-dependent neutral sphingomyelinase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(8), pp.5710–5717.
- Trajkovic, K. et al., 2008. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 319(5867), pp.1244–7.
- Tullet, J.M.A. et al., 2005. Multiple signalling defects in the absence of RIP140 impair both cumulus expansion and follicle rupture. *Endocrinology*, 146(9), pp.4127–4137.
- Valadi, H. et al., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 9(6), pp.654–9.
- Vanderhyden, B.C. et al., 1990. Developmental pattern of the secretion of cumulus expansion-enabling factor by mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation. *Developmental Biology*, 140(2), pp.307–317.
- Varani, S. et al., 2002. Knockout of Pentraxin 3, a Downstream Target of Growth Differentiation Factor-9, Causes Female Subfertility. *Molecular Endocrinology*, 16(6), pp.1154–1167.
- Wang, H. et al., 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153(4), pp.910–918.
-

- 
- 
- Webber, J. et al., 2010. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Research*, 70(23), pp.9621–9630.
- White, R. et al., 2000. The nuclear receptor co-repressor Nrip1 (RIP140) is essential for female fertility. *Nature Medicine*, 6(12), pp.1368–1374.
- Wilson, R. et al., 2016. Highly variable penetrance of abnormal phenotypes in embryonic lethal knockout mice. *Wellcome Open Research*, 1(0), p.1.
- Ying, W. et al., 2017. Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate In Vivo and In Vitro Insulin Sensitivity. *Cell*, 171(2), p.372–378.e12.
- Young, J.M. & Mcneilly, A.S., 2009. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*, 140(1993), pp.489–504.
- Yu, X., Harris, S.L. & Levine, A.J., 2006. The regulation of exosome secretion: A novel function of the p53 protein. *Cancer Research*, 66(9), pp.4795–4801.
- Yuyama, K. et al., 2012. Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid- $\beta$  by microglia. *Journal of Biological Chemistry*, 287(14), pp.10977–10989.
- Zhang, K., Hansen, P.J. & Ealy, A.D., 2010. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. *Reproduction*, 140(6), pp.815–826.
- Zhang, M. et al., 2010. Granulosa Cell Ligand NPPC and Its Receptor NPR2 Maintain Meiotic Arrest in Mouse Oocytes. *Science*, 330(6002), pp.366–369.
- Zhang, Y. et al., 2017. Hypothalamic stem cells control ageing speed partly through exosomal miRNAs. *Nature*, 548(7665), pp.52–57.
- Zheng, P. et al., 2003. 17 $\beta$ -Estradiol and progesterone improve in-vitro cytoplasmic maturation of oocytes from unstimulated prepubertal and adult rhesus monkeys. *Human Reproduction*, 18(10), pp.2137–2144.
- Zhou, J. et al., 2014. One-step generation of different immunodeficient mice with multiple gene modifications by CRISPR/Cas9 mediated genome engineering. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 46(1), pp.49–55.
- Zumbansen, M. & Stoffel, W., 2002. Neutral sphingomyelinase 1 deficiency in the mouse causes no lipid storage disease. *Molecular and cellular biology*, 22(11), pp.3633–3638.



---

---

## 謝辞

本研究を行うにあたり、指導教員である東京大学大学院農学生命科学研究科応用遺伝学研究室の杉浦幸二准教授に多大なご指導を頂きました。深く感謝致します。杉浦先生には、研究の進め方、実験手法、実験結果の考察、学会発表、本論文の構成や推敲、そして研究とは何であるか、あらゆる面において常に熱く情熱を持って辛抱強くご指導賜りました。重ねて深く感謝を致します。また、内藤邦彦教授には、本研究について常に鋭い指摘や意見、助言を頂きましたことを感謝致します。さらに藤井渉助教には、日頃から研究の議論を通じて多くの知識や示唆の教示を頂いたことに加え、遺伝子改変マウスの作製を手助け頂いたことを感謝致します。

電子顕微鏡による観察を一から指導して頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科技術基盤センターマイクロ観察系技術室の富田憲司博士、石綱史子氏に感謝致します。また、クライオ電子顕微鏡による観察についてご協力頂きました先端技術大学大学院物質創成科学研究科の安原一主博士、藤田咲子氏に感謝致します。また、NanoSight によるナノ粒子解析についてご協力頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科生物プロセス工学研究室の大下誠一博士、DANG Quoc Thuyet 博士に感謝致します。さらに、ブタの卵胞器官培養についてご指導頂きました農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門の平尾雄二博士に感謝致します。

一ヶ月間の留学を受け入れて頂き、大変貴重な経験をさせて頂きました University of Hawai'i, Institute for Biogenesis Research の山崎由紀子博士に深く感謝致します。留学期間中にラボワークから生活に至るまでサポートして頂きました Kim Sung-Min 博士に感謝致します。また、柳町隆造博士には、留学期間中に研究の面白みは何であるかを熱く教えて頂き、東京大学でのセミナー依頼を快諾して頂き、研究生生活 50 年について説いて頂いたことを深謝致します。

応用遺伝学研究室の修了された先輩方、同期、後輩の皆様には研究室での 5 年間の長い期間に渡り、研究についてだけでなく公私共に大変お世話になりました。感謝致します。

また資金面において、日本学生支援機構、並びに日本学術振興会のサポートを頂き、研究に専念することが出来ました。深く御礼申し上げます。

最後に、いつも支えとなってくれた家族に格別の謝意と敬意を表し、心から感謝致します。

平成 30 年 3 月  
松野雄太