

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18400

研究課題名(和文) アデノ随伴ウイルスによる精巣および精子幹細胞への遺伝子導入法の確立

研究課題名(英文) Establishment of gene transduction by adeno-associated virus in spermatogonial stem cells and testes

研究代表者

渡邊 哲史 (Watanabe, Satoshi)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80769018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アデノ随伴ウイルス(Adeno-associated virus: AAV)の生体精巣における標的細胞種は知られていなかった。本研究においてAAV1,9-CAG-mCherryがセルトリ細胞及び精子幹細胞を含む生殖細胞に効率よく遺伝子導入できることが分かった。また、不妊症モデルマウスの遺伝子治療実験を行うと、3か月後精子形成の回復し、顕微授精により正常な子孫が得られた。同様の結果が技術的習練の不要な精細管外導入法でも得られた。AAVによる生体内の生殖細胞への遺伝子導入法を、様々な動物種での遺伝子改変技術への応用及び遺伝性不妊症の遺伝子治療への応用にされうる技術として確立した。

研究成果の概要(英文)：Adeno-associated virus (AAV) penetrates the blood-brain barrier but it is unknown whether AAV penetrates other tight junction. Genetic manipulation of testis has been hampered by the basement membrane of seminiferous tubules and the blood-testis barrier (BTB) Here we demonstrate in vivo genetic manipulation of spermatogonial stem cells (SSCs) and their microenvironment via AAV1/9. AAV1/9 microinjected into the seminiferous tubules penetrated both the basement membrane and BTB, thereby transducing not only Sertoli and SSCs but also peritubular cells and Leydig cells. Moreover, when congenitally infertile Kit1SI/Kit1SI-d mouse testes with defective Sertoli cells received Kit1-expressing AAVs, spermatogenesis regenerated and offspring were produced. Thus AAV1/9 allows efficient germline and niche manipulation by penetrating the BTB and basement membrane, providing a promising strategy for the development of gene therapies for reproductive defects.

研究分野：生殖生物学

キーワード：精巣 精子幹細胞 GS細胞 アデノ随伴ウイルス 遺伝子治療 不妊症 遺伝子改変 遺伝子導入

1. 研究開始当初の背景

精子幹細胞は、生涯にわたって自己複製することで増殖し、分化することにより精子を産生する。次世代に遺伝情報を伝達する重要な役割を担う細胞であるが、精子幹細胞を取り扱うことが困難であったため、その性質や機能に関する研究は他の幹細胞と比べ立ち遅れていた。しかし、精子幹細胞の移植法および、当研究室の先行研究において開発された精子幹細胞の長期培養法により (Kanatsu-Shinohara et al., *Biology of Reproduction* 69, 612-616, 2003)、精子幹細胞の *in vivo* と *in vitro* 解析を双方向に行うことが可能となった。これらの技術は、精子幹細胞における遺伝子機能解析のための基盤的技術となっている。

遺伝子機能解析を行う上で、高効率な遺伝子導入技術が必須となるが、精子幹細胞への遺伝子導入法として、レンチウイルス、アデノウイルス、リポフェクション、エレクトロポレーションが用いられてきた。しかし、レンチウイルスやアデノウイルスの培養精子幹細胞への感染は、時間経過に伴い細胞毒性が現れる。特にレンチウイルスの導入遺伝子は宿主ゲノムへのランダムに挿入されることも解析を行う上での障壁となる。また、これらのウイルスは P2 レベルの実験となり取り扱いが煩雑となる。リポフェクションやエレクトロポレーションは遺伝子導入効率が低く、安定発現細胞株の樹立などの用途に限られる。さらに、これらの方法は標的細胞特異性がないので、ヒトに応用した場合に生体内での使用が危険である。以上の問題点から、比較的簡便に取り扱うことができ、細胞毒性や挿入変異をもたらさず、汎用性の高い、精子幹細胞への遺伝子導入法の開発が望まれる。

2. 研究の目的

本研究において、アデノ随伴ウイルス (AAV:Adeno-associated virus) による遺伝子導入法に着目した。AAV は、中枢神経系、肝臓、筋肉など様々な細胞種への遺伝子導入が可能でウイルスベクターである。非病原性ウイルス由来であることから細胞毒性および免疫原性が低く、P1 レベルで取り扱うことができる。ウイルスベクターとしての AAV は、染色体への遺伝子挿入の機能が失われている。AAV は 100 種類以上の血清型が存在し、AAV1-AAV12 の 12 種類がよく用いられている。血清型により標的細胞の特異性が異なることが知られている。初代培養精子幹細胞への AAV2 による遺伝子導入が報告されているが (*The FASEB Journal* 22, 374-382, 2008) 相反する報告も存在する (*Molecular Therapy* 4, 586-592, 2001)。また、現在までに、精巣や培養精子幹細胞において複数の血清型の AAV について遺伝子導入特性を並行比較した報告はない。したがって、AAV の精巣および培養精子幹細胞における標的細胞

特異性や遺伝子機能解析への応用可能性は不明である。そこで、申請者がいくつかの血清型についてレポーター遺伝子を発現する AAV を培養精子幹細胞へ感染させる予備実験を行ったところ、AAV1 と AAV8 が培養精子幹細胞に感染することが明らかとなった。本研究において、精子幹細胞および精巣への遺伝子導入に最適な AAV 血清型の同定と *in vitro* および *in vivo* 遺伝子機能解析への応用を目指した方法論を確立する。

3. 研究の方法

1) 精巣及び精子幹細胞への遺伝子導入に適した AAV の血清型の同定

a) レポーター遺伝子発現 AAV の作製

予備実験において AAV1 および AAV8 が培養精子幹細胞への感染が観察されたが、さらに多くの血清型で同じ導入遺伝子を持つ AAV を作製し、感染効率を並行比較する。6 種類の血清型の AAV-CAG-mCherry を作製した。

b) 培養精子幹細胞における AAV 感染効率の定量的比較

各血清型の AAV-CAG-mCherry を同じ力価でマウス培養精子幹細胞に感染させた後、FACS により培養精子幹細胞に対する感染効率を定量的に調べた。

c) 精細管における AAV 感染効率の定量的比較

上記の AAV を野生型マウスの精細管内及び精細管外に導入し、精巣の各細胞種 (精子幹細胞、精母細胞やセルトリ細胞など) への遺伝子導入効率を、精巣細胞種マーカーを用い、免疫染色により感染効率を定量的に調べた。また、AAV による遺伝子発現レベルの持続性を調べるために、導入後 3 か月の精巣を同様の方法で調べた。

2) 精子幹細胞および精巣における遺伝子機能解析への AAV の応用

a) Cre 発現 AAV を用いた Cre-loxP 部位特異的組み換えへの応用

1) の実験において培養精子幹細胞に効率良く感染する血清型について Cre リコンビナーゼを発現する AAV (AAV-CAG-Cre) を作製した。Cre-loxP 部位特異的組み換えを簡便に評価するため、Cre 依存的に蛍光蛋白質 EYFP を発現するマウス R26R-EYFP マウス (*BMC Dev. Biol.* 1, 4, 2001) 由来の培養精子幹細胞を用いた。R26R-EYFP 培養精子幹細胞に Cre 発現 AAV を感染させた後、EYFP の蛍光を利用し FACS により Cre-loxP 部位特異的組み換えの効率を定量した。

b) AAV による遺伝子導入を利用した精子幹細胞の幹細胞活性評価

AAV により遺伝子導入した精子幹細胞が幹細胞活性評価に応用できるかどうかを調べるために、新生児 R26R-EYFP マウスの初代培養精子幹細胞に Cre 発現 AAV を感染させ、精細管へ移植する実験を行う。同様の実験を CAG プロモーター制御下で Cre を発現するアデノウイルスを用いて行い、組み換え効率および

精子幹細胞の生着の程度を AAV の場合と比較することにより、AAV の幹細胞活性評価への応用可能性と細胞毒性をそれぞれ評価した。c) AAV を用いたセルトリ細胞機能異常に起因する不妊モデルマウスの表現型回復実験
セルトリ細胞に遺伝子導入可能な血清型を同定できたため、セルトリ細胞由来の分泌因子 c-Kit ligand をコードする遺伝子の変異により不妊を呈するマウス WBB6F1-S1/S1d の表現型回復実験を行った。セルトリ細胞への *in vivo* での遺伝子導入に適した血清型について AAV-CAG-c-Kit ligand を作製した。WBB6F1-S1/S1d マウス精細管にこの AAV を導入したのち、精子形成が回復するかどうかを組織学的解析により評価した。

4. 研究成果

AAV1,2,5,7,8,9-CAG-mCherry をそれぞれ作製した。この内、AAV1 と AAV9 が培養精子幹細胞に感染し、AAV1 が最も効率よく遺伝子導入できることが分かった。MOI=10⁵ で培養精子幹細胞に感染させると約 50% が mCherry 陽性を示した。AAV 感染後の培養精子幹細胞において、精子幹細胞マーカーの発現、アポトーシス細胞数及び増殖速度を調べたがいずれも感染していない培養精子幹細胞と同様のレベルであり、AAV の感染は培養精子幹細胞に対して顕著な毒性は示さなかった。AAV による培養精子幹細胞における遺伝子発現は一過性で、感染後 5 日目が入導遺伝子の発現レベルのピークであり、その後は細胞分裂とともに徐々に発現が減弱していった。AAV1-CAG-Cre を R262R-EYFP の培養精子幹細胞に感染させると、約 70% が EYFP 陽性を示した。同様に CAG-Cre を持つアデノウイルスを感染させた場合と同等のレベルであった。しかし、アデノウイルスの感染は培養精子幹細胞の細胞死を誘導する毒性を示したことから、細胞毒性の点において AAV1 の優位性が示された。両ウイルスをそれぞれ R26R-EYFP 培養精子幹細胞に感染させた後、マウス精巣に移植し、幹細胞活性を評価した。AAV1 感染細胞とアデノウイルス感染細胞は同様のレベルでコロニーを形成し、精子形成も見られた。この精子を顕微授精すると正常な子孫が得られたことから、幹細胞活性評価実験において、AAV1 が従来用いていたアデノウイルスと互換可能であることが示された。以上の結果を論文として報告した (Watanabe et al., 2017 *Biology of Reproduction*)。

生体精巣に AAV を直接導入した場合の精巣細胞への感染パターンを調べた。AAV1,2,5,6,6.2,7,8,9,10,11,hu11,Ac80L65, DJ8 の 13 種類の AAV-CAG-mCherry を作製した。力価は 1.0x10¹²/mL に合わせた。それぞれの AAV を精巣の精細管内または精細管外に導入した。1 週間後と 3 か月後に精巣を回収したところ、AAV1,8,9 において mCherry の強い発現が見られた。精巣細胞マーカーによる免疫染色の結果、AAV8 は精細管内導入により

セルトリ細胞のみに感染していた。一方、AAV1 と AAV9 は精子幹細胞を含む生殖細胞とセルトリ細胞に感染することが分かった。R26R-EYFP 精巣に AAV1/9-CAG-Cre を導入しその後、精巣細胞を別のマウス精巣に移植する実験を行った。その結果、EYFP 陽性のコロニーが観察されたことから、AAV1/9 が精子幹細胞に感染することが、機能的に明らかとなった。また、コロニーの部分から EYFP 陽性精子を採取し、顕微授精により EYFP 陽性の正常子孫を得ることが出来た。WBB6F1-S1/S1d マウスに野生型 *Kit1* 遺伝子を AAV9 により導入したところ、精子形成の回復が見られた。その精子から顕微授精により正常な子孫が得られた。以上の実験はより簡便な導入方法である精細管外導入でも同じ結果が得られたことから、AAV は精細管の基底膜や血液精巣閉門を双方向に通過する唯一のウイルスベクターであることが明らかとなった。ウサギ、ブタ、サルなど高等な動物では精細管内導入が技術的に困難であるため、これらの動物においては AAV の精細管外導入により生殖細胞やセルトリ細胞に遺伝子導入が可能となる可能性があり、今後検討していく必要がある。また、セルトリ細胞に起因する遺伝性の不妊症については、宿主細胞に遺伝子挿入が起きず、炎症反応も起こさない AAV による治療可能性が示唆された。以上の結果を論文として報告した (Watanabe et al., 2018, *Stem Cell Reports*)。今後、ヒトにおいて同様な症状を呈する不妊症の原因遺伝子が特定されれば、さらにヒトでの応用を見据えた実験を行っていくことができる。生殖細胞に起因する不妊症の遺伝子治療実験は現在までに行われた例はないため、AAV による治療可能性を検討する必要がある。AAV が生体精子幹細胞に感染する性質と CRISPR/Cas9 などのゲノム編集因子を組み合わせることで、新たな遺伝子改変技術の創出が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1. Watanabe S, Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Matoba S, Ogura A, Shinohara T. (2017). Adeno-associated virus-mediated delivery of genes to mouse spermatogonial stem cells. *Biology of Reproduction* 96, 1, 221-231.
2. Watanabe S, Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Matoba S, Ogura A, Shinohara T. (2018). *In vivo* genetic manipulation of spermatogonial stem cells and their microenvironment by adeno-associated viruses. *Stem Cell Reports* 10, 1-14.
3. Ueno A, Omori Y, Sugita Y, Watanabe S,

Chaya T, Kozuka T, Kon T, Yoshida S, Matsushita K, Kuwahara R, Kajimura N, Okada Y, Furukawa T. (2018). Lrit1, a Retinal Transmembrane Protein, Regulates Selective Synapse Formation in Cone Photoreceptor Cells and Visual Acuity. Cell Reports 22, 13, 3548-3561.

4. Chaya T, Matsumoto A, Sugita Y, Watanabe S, Kuwahara R, Tachibana M, Furukawa T. (2017). Versatile functional roles of horizontal cells in the retinal circuit. Scientific Reports 7, 5540.

〔学会発表〕(計3件)

Adeno-associated virus-mediated gene delivery into the mouse testis and spermatogonial stem cells, Satoshi Watanabe, P66, International Symposium on Epigenome Dynamics and Regulation in Germ cells、京都大学百周年時計台記念館、2016年2月18日

AAV-mediated gene delivery into the mouse testis and spermatogonial stem cells, アデノ随伴ウイルスを用いたマウス精巣および精子幹細胞への遺伝子導入、渡邊哲史、発生・細胞生物学・システム生物学コースミーティング、京都大学医学部、2016年6月24日

オス生殖細胞を用いた遺伝子改変霊長類作製技術の開発、渡邊哲史、AMED 脳と心の研究課研究交流会、ベルサール高田馬場、平成29年11月30日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

特許

名称：雄性生殖細胞またはセルトリ細胞にポリヌクレオチドを導入する方法

発明者：渡邊哲史、篠原隆司

権利者：渡邊哲史、篠原隆司

番号：S2017-0708-N0

出願年月日：2017年5月8日

国内外の別：国内

名称：雄性生殖細胞またはセルトリ細胞にポリヌクレオチドを導入する方法

発明者：渡邊哲史、篠原隆司

権利者：渡邊哲史、篠原隆司

番号：PCT/JP2018/017650

出願年月日：2018年5月7日

国内外の別：国際

〔その他〕

ホームページ等：
http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/~mogen/research_summary.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊哲史 (Satoshi Watanabe)

京都大学大学院医学系研究科遺伝医学講座

分子遺伝学分野・助教

研究者番号：80769018

(4) 研究協力者

篠原隆司 (Takashi Shinohara)

京都大学大学院医学系研究科遺伝医学講座

分子遺伝学分野・教授

小倉淳郎 (Atsuo Ogura)

理化学研究所バイオリソースセンター・遺伝

工学基盤技術室・室長