

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14611

研究課題名(和文)精子幹細胞への人工染色体導入による不妊症モデルマウスの遺伝子治療

研究課題名(英文)Development of gene therapy for male infertility using transduction of artificial chromosome into germline stem cells

研究代表者

渡邊 哲史(Watanabe, Satoshi)

大阪大学・蛋白質研究所・特任助教(常勤)

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):精子幹細胞は生殖細胞の中で唯一自己複製能力をもつ細胞であるため、発生工学の格好の標的である。申請者はこれまでプラスミドやウイルスベクターを用いて雄性不妊マウスの生殖細胞の遺伝子治療を試みたが、生理的な遺伝子発現を再現できず失敗してきた。そこで本研究では申請者が最近開発した精子幹細胞への人工染色体導入法を利用し、標的遺伝子の生理的な発現を再現することでKit変異マウスの精子幹細胞から精子形成の誘導を試みた。その結果、モデル実験に用いるKit変異精子幹細胞及びKit遺伝子座を組み込んだ人工染色体ベクターを作製することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精子幹細胞は生殖細胞の中で唯一自己複製能力をもつ細胞であるため、発生工学の格好の標的である。ゲノム編集技術の登場により、近年ヒト生殖細胞での遺伝子操作について興味が高まっているが、現段階では適当な手法がない。申請者はこれまでプラスミドやウイルスベクターを用いて雄性不妊マウスの生殖細胞の遺伝子治療を試みたが、生理的な遺伝子発現を再現できず失敗してきた。人工染色体は生理的な遺伝子発現を再現しながら、ホスト細胞の遺伝子に改変を加えない。また、次世代に伝わらない点でも他の手法よりも優れており、ヒト生殖細胞研究および遺伝子治療法開発に大きな影響を与える。

研究成果の概要(英文):Germline stem cells are an attractive target for treatment of male infertility. However, this type of treatment has never been successful in the practical way because it is difficult to reproduce the physiological regulation of expression of transgene. Here we tried to examine the feasibility of approaches using gene transduction into germline stem cells with artificial chromosome to realize endogenous gene control. We successfully prepared an infertility model germline stem cells and a mouse artificial chromosome introduced with a target gene locus.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：遺伝子治療 人工染色体 ベクター 遺伝子導入

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集技術の登場により、近年ヒト生殖細胞での遺伝子操作について興味が高まっているが、現段階では適当な手法がない。精子幹細胞は生殖細胞の中で唯一自己複製能力をもつ細胞であるため、発生工学の格好の標的である。申請者はこれまでプラスミドやウイルスベクターを用いて雄性不妊マウスの生殖細胞の遺伝子治療を試みたが、生理的な遺伝子発現を再現できず失敗してきた。そこで本研究では申請者が最近開発した精子幹細胞への人工染色体導入法を利用し、標的遺伝子の生理的な発現を再現することで Kit 変異マウスの精子幹細胞から精子形成の誘導を試みる。人工染色体は宿主細胞のゲノムに取り込まれず、精子形成を再開しても次世代に伝わらない点でも他の手法よりも優れており、ヒト生殖細胞研究および遺伝子治療法開発に大きな影響を与える。

生殖細胞は次世代に遺伝情報を伝えることができる唯一の細胞である。その中で自己複製能力を持っているのは雄の精巣にある精子幹細胞しかない。この細胞は精巣あたり 2-3 万個と非常に数が少ないが、一生にわたり精子を作り続けることができる。この特別な能力のために、精子幹細胞は遺伝子改変の格好の材料である。申請者らは 2003 年にマウス精子幹細胞の長期培養に成功し、これを germline stem (GS) 細胞と命名した。GS 細胞は Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) と fibroblast growth factor 2 (FGF2) の存在下で精原細胞として 2 年以上の長期にわたり増殖するが、精巣に移植すると精子へと分化し、移植 GS 細胞由来の子孫を得ることができる。また、GS 細胞において相同組換えを適用し、マウスとラットにおいて新たな遺伝子改変技術を提案した。GS 細胞を利用する最大の利点は、ES 細胞の場合と異なり遺伝子改変動物の作出効率を下げるキメラ形成を伴わないことにある。加えて、ES 細胞は培養の過程で染色体異常とゲノムインプリンティングパターンが変化するが、GS 細胞は 2 年間の長期培養後も 40 本の染色体を維持し、精子型のゲノムインプリンティングパターンを維持する点で ES 細胞よりも安定度が高い。遺伝子改変や遺伝子治療のための遺伝子操作に極めて適した細胞と言える。

本研究において申請者は GS 細胞における人工染色体を用いた遺伝子治療を試みる。申請者はこれまでに精子幹細胞の遺伝子導入にレトロ/レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス (AAV; Adeno-associated virus)、プラスミドベクターを用いて雄性不妊マウスの生殖細胞の遺伝子治療を試みている。この実験では Kit 遺伝子を先天的に欠損する不妊モデル WBB6F1-W/Wv(W) マウスの精巣細胞へ上記のウイルスにより野生型 Kit を発現させ、その精子形成への影響を解析した。Kit 遺伝子は精子形成細胞の場合、精原細胞から初期の精母細胞にかけて発現する遺伝子であり、この遺伝子が欠損すると最も未分化な精原細胞は生存するものの、分化型精原細胞以降の精子形成細胞が欠損しマウスは不妊になってしまう。しかしながら、上記の遺伝子導入のどの方法を用いても遺伝子導入された精子幹細胞は精子形成を再開することができず、最も成功した例でも減数分裂の初期段階で細胞分化が止まり、精子まで分化した細胞を得ることができなかった。失敗した理由は明らかではないが、幾つかの理由が考えられる。例えば、恒常的な強いプロモーター活性を持つニワトリ beta-actin (CAG) プロモーターを用いたために生理的な発現を再現できなかったことや特殊なアイソフォームを持つ Kit 遺伝子を導入していなかったなどの可能性が挙げられる。

2. 研究の目的

申請者らのグループは最近、Mouse artificial chromosome (MAC) ベクターという人工染色体ベクターを GS 細胞に導入し、Transchromosomal (Tc) マウスの作成に成功した。人工染色体は通常の遺伝子導入方法と異なり、宿主となる細胞のゲノムに挿入されない、内因性の遺伝子発現を再現できる、通常のベクターでは挿入できない大きなサイズの遺伝子を挿入できるため、発現調節領域を含む遺伝子や複数遺伝子・アイソフォームの導入が可能になるなどの特徴を持つ。この手法で染色体導入された GS 細胞は ES 細胞よりも安定に MAC ベクターを保持することができるのみならず、キメラ形成に依存しないために次世代で直接 Tc マウスを作成できるという更なる利点がある。人工染色体は減数分裂で半分の配偶子にしか伝達されないため、Kit 遺伝子の発現を再現できれば精子形成のみをレスキューし宿主のゲノムには傷を付けずに遺伝子治療を行うことが可能である。その点、従来の手法ではゲノム DNA に変異が入るといった問題があるために将来的にヒトの治療で用いることが出来ない。そこで、本研究では人工染色体による遺伝子操作技術を用いた W マウスの遺伝子治療実験を行う。

本研究は、GS 細胞の培養技術及び GS 細胞への人工染色体導入技術などの申請者のグループが積み上げてきた技術を基盤としている点で独自性が高い。これまで生殖細胞を支持する体細胞であるセルトリ細胞の異常を原因とした不妊症モデルマウスの遺伝子治療実験は有効であることが申請者らのグループを含め報告されているが、精子幹細胞を含む生殖細胞の異常を原因とする不妊症モデルマウスの遺伝子治療実験は未だ成功した例がない。このため、本研究手法の有効性を実証することにより生殖細胞異常に起因する不妊症の遺伝子治療への応用可能性を示すことが出来る。同時に、様々な遺伝病の治療への応用にも展開が期待され、将来のヒト生殖細胞における遺伝子操作技術の基盤となりうる。

3. 研究の方法

新生児(5-10 日齢)W マウスの精巣から定法に従い GS 細胞を樹立する。

Kit 遺伝子を含む BAC クローン(理研 BRC より入手する予定)に BAC recombineering 用 loxP-3' HPRT 挿入ベクターを加えてエレクトロポレーションを行う。これにより BAC に loxP サイトを導入する。

上記で準備した環状ベクター及び Cre 発現ベクターを MAC が保持された CHO 細胞に導入する。目的の遺伝子配列が CHO 細胞の MAC に導入できたかどうかを確認するため、MAC 特異的プローブと目的遺伝子特異的プローブを用いた FISH 解析により、目的遺伝子が内在 CHO 細胞内在の染色体に挿入されず MAC に組み込まれか及び、MAC が内在 CHO 細胞の染色体に転座していないかなどを確認し、MMCT に用いるためのクローンを選別する。

上記で作成された CHO 細胞をコルセミドが添加された培地で培養後、コルセミド処理 72 時間後にサイトカラシン B にて処理し微小核細胞の回収をする。MMCT には最近開発された retro-MMCT 法を用いる。この方法では染色体ドナー細胞として汎用されている CHO 細胞がマウス白血病細胞ウイルス(MLV)非許容細胞であることに着目し、MLV 由来のエンベロープタンパク質 Env を CHO 細胞に強制発現させる。同種指向性の Env を発現させた CHO 細胞はマウス由来細胞と細胞融合を起こすが、CHO 細胞同士の融合を誘起せず、この染色体ドナー細胞から微小核を調製し、遺伝子導入を行うことで従来法よりも 50 倍の効率で染色体導入ができる(PLoS ONE 2016, 11, e0157187)。準備した微小核を GS 細胞と混合させることで MAC を導入する。MAC ベクターには neomycin 耐性遺伝子が入っているので、7-14 日後にコロニーをピックアップし、スケールアップ後、ストックを作成し、PCR 解析により目的とした遺伝子が入っていることを確認する。さらに FISH 解析により MAC が独立した染色体として保持されていることについても確認する。

Kit 遺伝子座搭載 MAC を持つ GS 細胞を、W マウスの精細管へマイクロインジェクションする。移植マウスには精子形成が完全に失われている W マウスを用いる。移植後の精子幹細胞は、増殖して一定の長さのコロニーを形成し、約 1 ヶ月で分化を開始し、移植後 6 週間で半数体である精細胞を認める。3 ヶ月後には完全に成熟した精子までの分化が観察される。移植した Kit 遺伝子座搭載 MAC-GS 細胞について、この経過を観察する。さらに、その精子の妊性を確認するため、自然交配または顕微授精による子孫の作製を試みる。

自然交配による子孫作成の場合 MAC を伝達した子孫が生まれるが、顕微授精法を用いて子孫を作成した場合には MAC が伝達していない受精卵を選択することが可能である。本実験では、MAC ベクターに EGFP 遺伝子が搭載されているので、EGFP 陽性部分の精細管から精子を回収し顕微授精を行う。作製した受精卵において EGFP 陰性のものを選別する。これにより次世代に MAC が伝達されていない不妊マウス由来の子孫を得ることができる。

4. 研究成果

W マウスからの GS 細胞の樹立: 新生児(5-10 日齢)W マウスの精巣から定法に従い GS 細胞を樹立することに成功した。 Kit 遺伝子を持つ BAC の改変: Kit 遺伝子を含む BAC クローン(理研 BRC より入手)に BAC recombineering 用 loxP-3' HPRT 挿入ベクターを加えてエレクトロポレーションを行い、これにより BAC に loxP サイトを導入した。 CHO 細胞における Cre-loxP 組み替え: で準備した環状ベクター及び Cre 発現ベクターを MAC が保持された CHO 細胞に導入した。目的の遺伝子配列が CHO 細胞の MAC に導入できたかどうかを確認するため、MAC 特異的プローブと目的遺伝子特異的プローブを用いた FISH 解析により、目的遺伝子が内在 CHO 細胞内在の染色体に挿入されず MAC に組み込まれか及び、MAC が内在 CHO 細胞の染色体に転座していないかなどを確認し、MMCT に用いるためのクローンを選別し、染色体導入が可能なクローンを得ることに成功した。このクローンを共同研究者に送付し、retro-MMCT 方の準備まで行うことが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe S, Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T	4. 巻 100
2. 論文標題 Sendai virus-mediated transduction of mammalian spermatogonial stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 523-534
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/iory192	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 Kanatsu-Shinohara M, Morimoto H, Watanabe S, Shinohara T,	4. 巻 64
2. 論文標題 Reversible inhibition of the blood-testis barrier protein improves stem cell homing in mouse testes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of reproduction and development	6. 最初と最後の頁 511-522
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2018-093	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 Watanabe S, Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Matoba S, Ogura A, Shinohara T	4. 巻 10
2. 論文標題 In Vivo Genetic Manipulation of Spermatogonial Stem Cells and Their Microenvironment by Adeno-Associated Viruses.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem cell reports	6. 最初と最後の頁 1551-1564
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2018-093	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 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	4. 巻 22
2. 論文標題 Lrit1, a Retinal Transmembrane Protein, Regulates Selective Synapse Formation in Cone Photoreceptor Cells and Visual Acuity.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell reports	6. 最初と最後の頁 3548-3561
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2018.03.007	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 Kozuka T, Omori Y, Watanabe S, Tarusawa E, Yamamoto H, Chaya T, Furuhashi M, Morita M, Sato T, Hirose S, Ohkawa Y, Yoshimura Y, Hikida T, Furukawa T	4. 巻 9
2. 論文標題 miR-124 dosage regulates prefrontal cortex function by dopaminergic modulation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 3445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-38910-2	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 Hiroko Morimoto, Mito Kanatsu-Shinohara, Narumi Ogonuki, Satoshi Kamimura, Atsuo Ogura, Chihiro Yabe-Nishimura, Yoshifumi Mori, Takeshi Morimoto, Satoshi Watanabe, Kinya Otsu, and Takashi Shinohara	4. 巻 in press
2. 論文標題 ROS amplification drives mouse spermatogonial stem cell self-renewal	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) in press	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Satoshi Watanabe
2. 発表標題 Gene transduction into spermatogonial stem cells and testes by Adeno-associated virus
3. 学会等名 Gordon Research conference, Mammalian Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 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 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/017650	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----