

自己評価報告書

平成 23 年 3 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (S)

研究期間：2008～2012

課題番号：20670006

研究課題名 (和文) レンチウイルスベクターを用いた新しい遺伝子機能解析システムの構築とその応用

研究課題名 (英文) In vivo gene function analysis using lentiviral vector

研究代表者

伊川 正人 (IKAWA MASAHIITO)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：20304066

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：発生工学・バイオリソース・疾患モデル・生殖・胎盤・妊娠高血圧症候群

1. 研究計画の概要

ヒトやマウスの全ゲノム配列が明らかにされた 21 世紀はポストゲノム時代と言われるが、ゲノムに秘められた無数の遺伝情報を生理機能と結びつけるには、個体レベルで遺伝子機能を解析する手法や、遺伝子組換え動物そのものが不可欠となる。申請者は遺伝子治療用に開発されたレンチウイルス (LV) ベクターに着目し、個体レベルでの遺伝子操作法の開発を進めてきた。

本研究では、LV ベクターの特徴を生かして in vivo ランダム遺伝子破壊法や遺伝子置換システムを開発し、遺伝子組換えマウスライブラリーを作製する。これらの遺伝子組換え動物はバイオリソースとして公開し広く生命科学研究者に提供する。

ところで我々の経験から遺伝子破壊したマウスの約 1 割で生殖不全が認められる。これらのマウスについて重点的に解析を進めることで、社会問題にもなっている不妊・不育のメカニズムを明らかにする。

2. 研究の進捗状況

LV ベクターを生殖系列に寄与できる Embryonic Stem (ES) や Germ line Stem (GS) 細胞、もしくは受精卵に感染させることで、遺伝子破壊したマウスを効率良く作製することを試みた。これまでに ES 細胞では薬剤選択により LV ベクター挿入株を 1000 近く樹立し、内 292 株について、LAM-PCR 法によりベクター挿入位置を同定した。また受精卵への感染では GFP 蛍光選別により LV ベクターが挿入されたマウスを 200 系統近く作製した。内 82 系統について挿入位置を同定するとともに、57 系統を公的バイオリソースセンターに寄託・公開し、譲渡可能とした。

次にインテグレース欠損型の LV ベクターを用いて遺伝子置換システムの開発を目指した。ES 細胞での実験では、標的遺伝子組み換えに成功したものの、絶対的な相同組み換え率の改善は認められなかった。

ところで我々は、LV ベクターを胚盤胞に感染させることで胎盤特異的な遺伝子操作が可能であることを報告している。本研究では、この技術を応用して、血管新生阻害因子である可溶性の VEGF 受容体 (sFLT1) を胎盤特異的に発現させることを試みた。その結果、妊娠マウスの血圧が上昇すると共にタンパク尿を発症し、妊娠高血圧症候群のモデルとなることを見出した。さらにこのモデルマウスを用いて sFLT1 が胎盤の血管新生不全や子宮内胎児発育不全を引き起こすことを明らかにすると共に、プラバスタチンによる Placental Growth Factor (PGF) の誘導が治療効果を示すことを論文報告した。

さらに本研究では、遺伝子破壊したマウスで見られる生殖不全について解析を進めている。3 年の間に 9 系統について生殖に関する表現型を解析し、6 系統について雄性不妊を認めた。例えば精細胞に特異的に発現する Calsperin (Calr3) を欠損すると精子の形態や運動性は正常であるにも関わらず、精子が子宮から卵管に移行できないために雄性不妊となった。その後の解析から、CALR3 は精子膜タンパク質である ADAM3 の品質管理に関与するシャペロンであることを明らかにした。これらを含めて 18 系統の遺伝子破壊マウスの表現型について論文発表した。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

当初目的通り、LV ベクターを用いたランダム遺伝子挿入により、遺伝子破壊したマウスを効率良く作製するシステムを開発した。LV ベクターを用いた遺伝子置換システムの開発には成功したものの、効率の改善が必要である。LV ベクターを用いた胎盤特異的遺伝子操作の応用では、発表論文が多数の新聞でも紹介されるなど研究成果の情報発信と社会還元繋がった。生殖不全マウスの解析についても予想以上の成果が得られており、複数論文にまとめることができた。

4. 今後の研究の推進方策

遺伝子破壊マウスライブラリーの構築については、特段の予定を変更することなく進めることで目的を達成できると考えている。

効率的な遺伝子置換システムの開発については、インテグラーゼ欠損型 LV ベクターを用いても、エレクトロポレーションなどの他方法による遺伝子導入と大差ないものであったことから、Zinc Finger Nuclease (ZFN) を用いた標的部位 2 重鎖 DNA 切断による効率化などを予定している。

自ら開発して特許化した胎盤特異的な遺伝子操作法や妊娠高血圧症候群モデルマウスについては、その応用研究を進めることで診断・治療法の開発などを通して社会還元を目指す。

生殖不全マウスの解析については、これまで作製の容易なストレートノックアウトマウスを中心に解析を進めてきた。今後は作製に時間のかかるコンディショナルノックアウトマウスに重点を置いて解析を始める。

5. 代表的な研究成果

(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 3 2 件)

- ① ⌈ Kumasawa K*, Ikawa M*#, Kidoya H, Hasuwa H, Saito-Fujita T, Morioka Y, Takakura N, Kimura T, Okabe M. From the Cover: Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model. Proc Natl Acad Sci USA 108: 1451-1455 (2011) 査読有
- ② ⌈ Ikawa M*#, Tokuhiro K*, Yamaguchi R, Benham AM, Tamura T, Wada I, Satouh Y, Inoue N, Okabe M. Calsperin Is a Testis-specific Chaperone Required for Sperm Fertility. J Biol Chem 286: 5639-5646 (2011) 査読有
- ③ ⌈ Ikawa M, Inoue N, Benham AM, Okabe M#. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. J Clin Invest 120: 984-994 (2010) 査読有

④ ⌈ Morioka Y, Isotani A, Oshima RG, Okabe M, Ikawa M#. Placenta-specific gene activation and inactivation using integrase-defective lentiviral vectors with the Cre/LoxP system. Genesis 47: 793-798 (2009) 査読有

⑤ ⌈ Okada Y, Ueshin Y, Hasuwa H, Takumi K, Okabe M, Ikawa M#. Targeted gene modification in mouse ES cells using integrase-defective lentiviral vectors. Genesis 47: 217-223 (2009) 査読有

* equal contribution

corresponding author

[学会発表] (計 1 2 件)

- ① Masahito Ikawa, Lentiviral vector mediated gene transfer and its application in mouse genetics. The 4th AFLAS Congress meeting. Nov 11, 2010, Taipei
- ② Masahito ikawa, Placenta specific gene manipulation using lentiviral vectors. 4th AMMRA meeting, Dec 17, 2009, Kumamoto
- ③ Masahito Ikawa, ER Chaperones and Sperm Fertility. Keystone Symposia (Frontiers in Reproductive Biology and Regulation of Fertility), Feb 1, 2009, Santa Fe

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 妊娠高血圧症候群モデル動物とその治療方法

発明者: 岡部勝、伊川正人、木村正、熊澤恵一

権利者: 発明者および扶桑薬品

種類: 特許

番号: 特願 2010-048237

出願年月日: 2010 年 3 月 4 日