

平成 21年 5月 15日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791121

研究課題名（和文） エレクトロポレーション法を用いた男子配偶子に対する遺伝子治療の基礎的研究

研究課題名（英文） A pilot study of possible gene therapy to male germ cells using electroporation in future.

研究代表者

窪田 裕樹（ KUBOTA HIROKI ）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：10347403

研究成果の概要：

今回の研究結果からエレクトロポレーション法による精巣内遺伝子導入は効率に優れ安全性の高い方法であることが確認できた。精巣内のセルトリ細胞および精細胞への長期間の安定した遺伝子導入が可能であり、精巣上体精子にまで遺伝子の発現が認められた。これらの遺伝子導入された精子を用いたマウス卵との体外受精は、生存精子の回収が難しく成功にはいたらなかったが、本法を用いることで精巣特異的な遺伝子の機能解析が容易になるものと思われる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：遺伝子導入、エレクトロポレーション、精巣

1. 研究開始当初の背景

特発性男子不妊症の原因は依然として不明であるが、その多くは複数の遺伝子の発現異常による結果であると考えられている。卵細胞質内精子注入法（ICSI）をはじめとする補助生殖技術（ART）の急激な発展は、現在

では円形精子細胞を用いて受精・着床・出産にまで至ることが可能となったが、これにより精子形成に関する遺伝子異常やその他の疾病に関する遺伝子異常など、本来伝達されないような遺伝子の異常が次世代へと継承される可能性が危惧される。この問題への対

策として、現在は倫理的な問題により行うことはできないが、将来的には他の遺伝子病に対する治療と同じく、生殖細胞に対する遺伝子治療が注目されるようになって考えられる。私たちはこれまでに、将来の遺伝子治療の可能性を探る目的で精巣内遺伝子導入を研究してきた。

2. 研究の目的

精子を利用した遺伝子導入は 1971 年の Brackett らに始まり、様々な方法が試みられてきたが、臨床応用が可能になるような確立されたものは無い。私たちはエレクトロポレーションを用い、*in vivo* での精巣内遺伝子導入法を改良し、精子へ遺伝子導入することに成功している。具体的には、オワンクラゲ由来の蛍光蛋白を改良したものを外来遺伝子として精子に発現させている。

この蛍光蛋白発現精子の作成は、効率に優れ安全性も高く、精子形成や受精・胚発生のメカニズムの研究に有用なツールとなるが、私たちは更にこれを発展させ、機能的な遺伝子と蛍光蛋白との融合蛋白を精子に発現させることを目指している。精子を用いることで、精巣内精子を用いた顕微受精 (TESE-ICSI) の普及により軽視されてきた受精能獲得・先体反応、受精といった現象において、目的とする遺伝子がどのように発現・局在しているのか、あるいはその動態についてもリアルタイムに観察することが可能となり、男子不妊症の原因解明にきわめて重要な役割を果たすものと考えられる。

配偶子に対する遺伝子治療という観点からも、蛍光蛋白の発現を指標に標的遺伝子の存在をビジュアル化することが出来るため、遺伝子導入された精子を生存したままの状態、確実に選別することが可能となる。最終的には、遺伝子治療がなされた精子を用い

て、遺伝子異常を次世代に継承させない理想的な治療法の開発へと繋げることを目標としている。

3. 研究の方法

(1) 融合蛋白発現ベクターの作成

マウス精巣の cDNA ライブラリーから既知のプライマーを用いて、PCR 法により KL2 遺伝子を増幅する。得られた PCR 産物を TOPO ベクターにサブクローニングし、全塩基配列が正しいことを確認しておく。

PLC ζ 遺伝子を GFP もしくは YFP 遺伝子と結合させ、サイトメガロウイルスのエンハンサーと chicken の β -actin プロモーターを含む pCAG ベクターに組み込んで、融合蛋白の発現ベクターを作成する。同時に GFP または YFP のみを発現するコントロールベクターも作成しておく。

HEK293 細胞にリン酸カルシウムを用いて、前述の融合蛋白発現ベクターを遺伝子導入し、48 時間培養する。これらの細胞から、ウェスタンブロット法により合成された蛋白の検出を行い、予想される分子量と一致することを確認しておく。

(2) マウス精巣への遺伝子導入

ICR 系の雄マウスを用い、麻酔下に精巣内へ融合蛋白発現ベクターを注入し、エレクトロポレーション法に基づいて精巣に電気刺激を加える。この際の電気刺激の条件によって遺伝子の発現効率が大きく異なるため、我々の過去のデータに基づいて最適と思われる条件を採用する。

電気刺激後、2 週ないし 3 週後に上記マウスを屠殺し、精巣及び精巣上体を摘出する。精巣は直ちに液体窒素で凍結保存し、後に凍結切片を作成する。蛍光顕微鏡下で融合蛋白の発現・局在を観察する。精巣の一部は遺伝

子導入による精巣へのダメージを検討するためグルタルアルデヒドで固定し、切片を作成した後に TUNEL 染色を行ってアポトーシスの検出を行うほか、H-E 染色を行い組織学的に造精機能障害について検討する。精巣上体尾部からは精子を回収し、蛍光顕微鏡下で融合蛋白の発現及び局在について観察を行う。

(3) 融合蛋白発現精子を用いた IVF-ET

セルソーターを用いて精巣上体精子から融合蛋白発現精子を分離し、IVF に供する。同系統の雌マウスに hCG および hMG を投与することで過剰排卵を誘起し、十分な数の卵を確保しておく。

蛍光顕微鏡下で先体反応に始まる受精・胚発生のプロセスにおける融合蛋白の動態を観察する。KL2 は c-kit のリガンドとして様々な生理現象に関与しているものと考えられるので、従来は知られていない役割を理解する手がかりとするべく、できる限り長時間にわたりビデオに記録しておく。

前述の受精卵・胚は、同系統の雌マウスの子宮内に移植し、産仔を得るとともに正常に出産まで至る割合も検討する。次世代における導入遺伝子の発現の有無を検討し、またサザンブロット法にて導入遺伝子の存在も確認する。また、次世代における造精機能・妊よう性についても検討を行なう。

4. 研究成果

(1) 融合蛋白発現ベクターの作成

マウス精巣の cDNA ライブラリーから既知のプライマーを用いて、PCR 法により KL2 遺伝子を増幅し、EYFP および EGFP ベクターにサブクローニングして融合蛋白発現ベクターを構築した。遺伝子導入時の条件設定のため、マウス精巣にエレクトロポレーション法により EYFP および EGFP ベクターを導入して、

EYFP 蛋白および EGFP 蛋白の発現につき検討を行ない、あらかじめ最適な条件を決定しておいた。目的とする KL2 と EYFP または EGFP との融合蛋白が正しく発現されることを確かめるため、哺乳類由来の細胞である HEK293 細胞に磷酸カルシウムを用いて、前述の融合蛋白発現ベクターを遺伝子導入して 48 時間培養した。これらの細胞から、ウェスタンブロット法により合成された蛋白の検出を行い、予想される分子量と一致することを確認した。

(2) マウス精巣への遺伝子導入

in vivo での導入条件の決定のため、5 週齢の ICR マウスを用いて、 $3\mu\text{g/ml}$ に調整した KL2-EYFP または KL2-EGFP ベクター溶液を精巣網から逆行性に注入した後に 50V, 50msec で単回の電気刺激を行い、一定の期間の後 (20 日, 40 日, 60 日) に融合蛋白の発現を観察した。主にセルトリ細胞と精細胞に融合蛋白の発現が見られ、明らかな造精機能障害は認められなかった。また、この蛋白の発現は遺伝子導入後少なくとも 8 週間にわたり持続することも確認できた。この条件下では精巣上体精子の中に、KL2 と EYFP または EGFP との融合蛋白を発現する精子がおおよそ 10% の割合で認められた。これらの精子の回収を試みたが、生存精子はわずかな数しか得られず、マウス卵との IVF は成功しなかった。

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 2 件)

- ① Parrington J, Coward K, Hibbitt O, Kubota H, Young C, McIlhinney J, Jones O. In vivo gene transfer into the testis by electroporation and viral

infection—a novel way to study testis and sperm function. Soc Reprod Fertil Suppl. 2007;65:469-74 査読あり

- ② Coward K, Kubota H, Parrington J. In vivo gene transfer into testis and sperm: developments and future application. Arch Androl. 2007 Jul-Aug;53(4):187-97. Review. 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

- ① Hiroki Kubota, Kevin Coward, Olivia Hibbitt, Jeff McIlhinney, Kenjiro Kohri, John Parrington: Expression of recombinant PLC ζ in mouse sperm. American Urological Association Annual Meeting, 2008. 5. 17-22, Orland
- ② 窪田 裕樹, Kevin Coward, Olivia Hibbitt, Jeff McIlhinney, 郡健二郎, John Parrington: 精巣内遺伝子導入による recombinant PLC ζ 発現マウス精子の作製. 第 96 回日本泌尿器科学会総会、2008. 4. 25, 横浜
- ③ Hiroki Kubota, Kevin Coward, Olivia Hibbitt, Nilendran Prathalingam, William Holt, Kenjiro Kohri, John Parrington: Generation of fluorescent sperm by use of *in vivo* gene transfer to hamster testes. American Urological Association Annual Meeting, 2007. 5. 19-24, Anaheim

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪田 裕樹 (KUBOTA HIROKI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号 : 10347403

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし