

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700454

研究課題名（和文） 不妊疾患マウスと iPS 細胞を用いた治療モデルの開発

研究課題名（英文） Development of infertility treatment model using infertile mice and iPS cells

## 研究代表者

磯谷 綾子（ISOTANI AYAKO）

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：20444523

研究成果の概要（和文）：生殖細胞が消失した不妊疾患患者に対する治療法は全く存在していない。そこで、本研究では性染色体異常により生殖細胞が消失するクラインフェルター症候群モデルの XXY 型マウスを用いて、治療モデルの開発を試みた。まず、生殖細胞の再生を行うために、人口多能性幹細胞（iPS 細胞）の樹立を試みた。しかしながら、iPS 細胞様の株は数ライン樹立できたものの、外来遺伝子を除去できなかったために、生殖細胞の再生には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：Infertility treatment for patients with germ cell loss does not exist at all. In this study, we attempt to develop a germ cell loss treatment model using a XXY type mouse which has the sex chromosome abnormality as Klinefelter's syndrome model. First, in order to regenerate the germ cells, we attempted the establishment of induced pluripotent stem cell (iPS). Some iPS cell-like lines were able to establish. However, the foreign gene could not be removed from iPS cell-like lines. As a result, the regeneration of germ cells did not reach.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：

キーワード：生殖細胞、不妊、疾患モデル、iPS 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

生殖補助技術の発展により、近年の日本では約 65 人に 1 人が体外受精によって誕生している。しかし、どんなに高度な生殖医療をもってしても、生殖細胞のないヒトから新たに生殖細胞を作り出すことは不可能であった。

このような生殖細胞をもたない不妊疾患の 1 つである XXY 型性染色体異常を示すクラインフェルター症候群は約 1000 人に 1 人の男性で見られる。臨床所見として、特有の症状はあるものの、日常生活にほとんど支障を示さず、不妊治療の段階で初めて分かるケースが多い。稀に、精巣内に精子が見られ、顕微授精によって、子供を授かるヒトもいるが、多くはセルトリセル・オンリー・シンドロームで、不妊治療時には生殖細胞が全くない深刻な男性不妊疾患である。

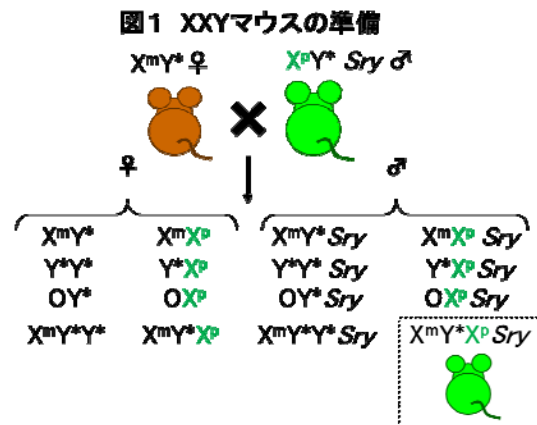
XXY 型マウスでも、種間に関係なく、誕生後に生殖細胞が消失するセルトリセル・オンリー・シンドロームの表現形を示し、ヒトのクラインフェルター症候群のモデルになりえることが報告されている。

## 2. 研究の目的

これまでに、何らかの理由で生殖細胞がなくなってしまった不妊疾患患者に対する治療法は全く存在していない。そこで、本研究では、性染色体異常により生殖細胞が消失するクラインフェルター症候群モデルの XXY 型マウスより、人口多能性幹細胞 (iPS 細胞) を樹立して、治療方法がなかった生殖細胞のない不妊疾患に対する治療モデルの開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

1) XXY 型の性染色体異常で生殖細胞をもたないクラインフェルター症候群のモデルマウスは XY 性転換マウスと XY-Sry トランスジェニックマウスより誕生させることができる (図 1)。この交配によって誕生した XXY 型の核型を持つ雄の個体より繊維芽細胞を調整する。



2) 調整した XXY 型繊維芽細胞に piggyBac システムを用いて、*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *Myc* の 4 遺伝子を導入して iPS 細胞を樹立する。

3) piggyBac システムを用いて、樹立した iPS 細胞から導入した遺伝子を抜き取り、発生工学的な手技を用いて、生殖細胞を再生試みる。

4) ラット胚より ES 細胞を樹立してマウス胚に注入して異種キメラを作製し、ES 細胞由来の生殖細胞が形成されるかどうかを調べる。

## 4. 研究成果

1) XXY 型の雄マウスの胎児と個体を得ることができ、胎児もしくは、個体の尻尾から繊維芽細胞を調整することができた。

2) XXY 型のマウス胎児や成獣の尻尾から調整した繊維芽細胞へ piggyBac システムを用い

て、Oct4, Sox2, Klf4, Myc の 4 遺伝子を導入し iPS-like 細胞の樹立に成功した(図 2)。

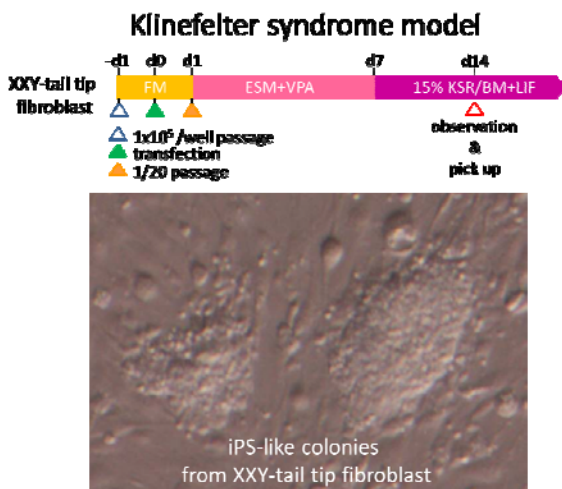


図 2. XXY マウスの尻尾由来繊維芽細胞より誘導した iPS 細胞

3) 本研究では、外来遺伝子のない iPS 細胞を得ることが重要なポイントとなる。

piggyBac システムは、2)で行ったように、トランスポゼースの働きによって、トランスポゾンで挟まれた塩基配列をベクターから染色体に導入できるだけでなく、逆に染色体から 1 塩基も残さずに抜き取ることもできる。そこで、本システムを用いて、iPS 細胞様の株から *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *Myc* の 4 遺伝子を抜き取る試みを行った。しかし、残念ながら、iPS 細胞誘導遺伝子が完全になくなった iPS 細胞株を得ることはできなかった。この結果は、複数の箇所に挿入された iPS 細胞誘導遺伝子は piggyBac により染色体から切り出されるが、piggyBac は切り出すだけでなく、染色体に挿入させる活性もあるので、別の箇所に挿入してしまったのではないかと予測された。このことは、多コピー数の遺伝子が導入されなければ iPS 細胞は樹立されにくいことを示唆し、外来遺伝子を持たない iPS 細胞の樹立の難しさを示した。

4) 一方で、異種動物を用いた不妊治療モデルの確立も試み、GFP で標識されたトランスジェニックラットの ES 細胞を樹立した。マウスの胚盤胞に打込んで異種キメラを作製することにより、ラット精子の形態を示す精子が確認された。この結果は、異種動物を用いた遺伝子組換え動物の作製や、不妊治療モデルの可能性を示唆した。

#### 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. Isotani, A., Hatayama, H., Kaseda, K., Ikawa, M., and Okabe, M. Formation of a thymus from rat ES cells in xenogeneic nude mouse<-->rat ES chimeras. *Genes Cells* 16, 397-405 (2011). 査読有 [DOI : 10.1111/j.1365-2443.2011.01495.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2011.01495.x)

2. Horie, K., Kokubu, C., Yoshida, J., Akagi, K., Isotani, A., Oshitani, A., Yusa, K., Ikeda, R., Huang, Y., Bradley, A., and Takeda, J. A homozygous mutant embryonic stem cell bank applicable for phenotype-driven genetic screening. *Nat Methods* 8, 1071-1077 (2011). 査読有 [DOI : 10.1038/nmeth.1739](https://doi.org/10.1038/nmeth.1739)

[学会発表] (計 3 件)

1. 磯谷綾子、畑山英、かせ田一宏、伊川正人、岡部勝 「異種キメラ動物を使って ES 細胞から臓器をつくる。」、10-10、『第 58 回日本実験動物学会総会』、2011 年 5 月 25 日、東京

2. 磯谷綾子、畑山英、かせ田一宏、伊川正人、岡部勝 「A trial to form an organ from ES cells --- a rat thymus in rat-nude mouse

chimera --- 」、『平成 22 年度研究業績発表  
会』、2011 年 1 月 21 日、大阪

3. 磯谷綾子、畑山英、かせ田一宏、伊川正人、  
岡部勝 「マウス←ラットキメラを用いた臓  
器形成モデルの確立」、4P-1337、『第 33 回日  
本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会  
大会 合同大会』、2010 年 12 月 16 日、神  
戸

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

磯谷 綾子 (ISOTNI AYAKO)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：20444523

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：