

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592465

研究課題名(和文) 雄性生殖細胞への遺伝子導入による遺伝子疾患治療の試み

研究課題名(英文) Studies of the spermatogenic cell-specific expression of the exogenous gene.

研究代表者

正田 朋子 (SHODA, Tomoko)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：50345716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：最近、重症男性不妊症例でもARTの技術によって児を得ることができるようになったが、精子の数的もしくは機能的な異常の形質が遺伝する可能性がある。本研究では、精子頭部の形態形成に關与する Hook1 遺伝子を利用した。この遺伝子のプロモーターならびに YFP cDNA を接続したプラスミドを用いて、精細管内に導入した結果、精子形成細胞にのみ、しかも分化過程の特異的な期間にのみ限局して、細胞内で特異的に外来遺伝子を発現させることが可能であることが明らかになった。さらに、翻訳領域の Hook1 cDNA を接続することにより、導入された細胞内で Hook1 遺伝子を合成し得ることが確認された。

研究成果の概要(英文)：Recently, the fertility treatment for the severe oligospermatozoa or azospermatozoa was improved by the intracytoplasmic sperm injection (ICSI). However, the abnormality of male spermatogenesis will be hereditary to their next stage. In this case, if the treatment to get the normal sperm with the gene transfer to the testis is possible, the abnormal gene will not be inherited to the next generation. For this purpose, we try to gene transfer to the mice testis in vivo to get the normal sperm. The combination of the plasmid cDNA injection into seminiferous tubules and the electroporation (EP) has become an efficient and convenient assay system for spermatogenetic specific gene expression during spermatogenesis of mice. In this study, we evaluated the possibility of this technique using the fluorescent protein as a marker. Using this technique, it would be a useful method as a gene therapy for the abnormal sperm.

研究分野：分子内分泌

キーワード：遺伝子治療 遺伝子導入 生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、重症不妊症に対する治療法として体外受精胚移植 (IVF-ET) や卵細胞質内精子注入法 (ICSI) 法などの ART (Assisted Reproduction Treatment) が臨床応用されてきた。とくに、重症男性不妊症については、ICSI 法による精子の細胞質内への注入により、多くの症例で妊娠を成立させることが可能となっている。しかしながら、精子の数的ならびに機能的異常に基づいた重症男性不妊症の中には、Y 染色体の微小領域もしくは広領域の欠失が原因となっているものが少なからず存在しており、このような症例を ICSI で治療した場合に、仮に男児を妊娠した場合には、その男児に父親の精子の数的機能的異常の形質が遺伝する。これまでの臨床診療の中で、この問題は、現在の不妊治療において解決すべき最大の問題の一つであると痛感させられてきた。しかしながら、現在のところ、この Y 染色体の部分欠失の子孫への遺伝の防止については、基礎的にも臨床的にもまったく研究が進んでいない状況である。そこでこの問題の将来的な解決を展望して、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、将来的には、Y 染色体の部分欠失に基づく精子機能障害患者の精巣の精原細胞に、欠失部分を含む遺伝子断片を導入することにより精子の形態ならびに機能の正常化せしめ、しかも、男児への Y 染色体の部分欠失が遺伝すること阻止する方法を確立することを展望して、そのために必要な基礎的な検討を開始することである。具体的には、3 年間の研究年限内に、マウスを実験動物として、精巣の精原細胞に欠失領域の遺伝子を導入し、DNA 欠失に基づく精子の形態ならびに機能異常の治療方法の確立を試みる。この目的で、マウス遺伝性疾患のモデルとして *azh* マウスを用いる。この *azh* マウスは、第 4 染色体上の *Hook-1* 遺

伝子が部分的に欠損した結果、精子の頭部の形態異常が生じたマウスであり、そのホモ接合体 (*azh* *-/-*) のオスは、精子は形成されるものの受精能がなく不妊となることが明らかにされている。また、この *azh* *-/-* のオスの精子でも、*azh* *-/-* のメスの卵に ICSI することにより産仔が得ることができること、しかしながら、その産仔のうちオスには父親の形質が遺伝して、その精子頭部には形態異常が生じて妊孕性がないこと、しかもその表現型は世代を経ると悪化することが報告されている。本研究では、まず第 1 に、*azh* *-/-* マウス精巣の精原細胞に *wild type Hook-1 cDNA* を導入し、形成される精子の形態を正常化することを試みる。この研究を通して、*Hook-1* 遺伝子の正常化による遺伝子治療の可能性を確認すると同時に、マウス精巣の精原細胞へのより効率的な遺伝子導入方法を開発する。つづいて第 2 に、*azh* *-/-* マウス精巣の精原細胞に、*Hook-1* 遺伝子の欠損部分を含む正常型のゲノム DNA を導入し、欠損遺伝子を修復して正常形態精子を得ることを追求する。本研究では、精原細胞に精子の形態形成や機能獲得に関連する特定の遺伝子の異常に対して、精原細胞に正常遺伝子を導入して「治療」する方法を実験動物レベルで追求する。

3. 研究の方法

(1) マウス *Hook-1 cDNA* のクローニング

野生型 C57BL/6 マウスの精巣より RNA を調製し、RT-PCR 法により読み枠 (ORF) の全長をクローニングする。

(2) マウス *Hook-1* 遺伝子のプロモーター領域のゲノムクローニングと使用領域の検討

マウスゲノムライブラリーより、*Hook-1* 遺伝子のプロモーター領域をクローニングする。*Hook-1* 遺伝子のコアプロモーター領域は同定しているが、シス調節領域ならびにその調節機構については未解明である。そのため、コア領域を含む 5 kb 程度をクローニングして、いろいろなサイズの断片を準備する。ついで、これらの断片の下流に YFP 遺伝子を接続し、プラスミドベクターにサブクローニングする。それらをマウス精巣の精細

管内にガラス管で作成したマイクロピペットを用いて注入し、エレクトロポレーション法で精原細胞に様々な条件（電圧、電流の方向、回数、等）で遺伝子導入する。遺伝子導入したマウスを 60 日後に屠殺して、精巣内ならびに精巣上体において YFP 陽性の精子の数を解析する。

また、同時に、精原細胞への遺伝子導入効率がより高い条件を決定し、以下の研究に用いる。

(3) Hook-1 発現ベクターの構築

上記 (2) で決定した Hook-1 遺伝子の高活性のプロモーターの下流に Hook-1 cDNA の ORF を連結し、さらにその下流に YFP cDNA を連結したコンストラクトをプラスミドベクターを用いて構築する。

(4) PHG のマウス精原細胞への遺伝子導入

azh -/- C57BL/6 マウスの精巣の精細管内に PHG を注入し、上記 (2) で決定した条件を用いて精原細胞に遺伝子導入する。遺伝子導入から 60 日後に屠殺して、精巣内ならびに精巣上体において GFP 陽性の精子を探索し、この GFP 陽性精子の形態を観察する。また、形態が正常化した精子については体外授精法によりその受精能が正常に復したことを確認する。

(5) マウス Hook-1 遺伝子のゲノムクローニング

azh -/- マウスにおけるエキソン 10 と 11 を含む 2011 bp の Hook-1 遺伝子の欠失部位領域を含むゲノム DNA を野生型 C57BL/6 マウスのゲノムライブラリーより、約 10 kb 程度にわたってクローニングする。クローニングした DNA を、上記の 2011 bp を含む種々の長さのゲノム DNA 断片とし、それぞれをサブクローン化する。

(6) azh -/- C57BL/6 マウス由来の ES 細胞の樹立

本研究では、前述 (1) でサブクローンした様々なサイズのゲノム断片の DNA を azh -/- C57BL/6 マウスの精原細胞に遺伝子導入して、相同組み換えの際に「欠失した 2011 bp の領域」を正常化することを最終目標とするが、そのための基礎的検討として、まず、azh -/- C57BL/6 マウス体細胞由来の培養細胞を用いて、細胞への遺伝子の導入条件の検討、遺伝子の至適サイズの検討、最も高率に組み換えを起こし得る遺伝子断片の検討を行う。

そのためには、培養過程で性格が変化しやすい初代培養細胞を用いるのではなく、比較的細胞の性格を維持しやすい ES 細胞を用いる。残念ながら現段階では、azh -/- C57BL/6 マウス由来の ES 細胞は樹立されていないので、まず、この ES 細胞の樹立を行う。すなわち、azh -/- の雌マウスの卵子を採取し、azh -/- の雄マウスの精子を（前

述のように自然妊娠は不可能であるので）顕微授精して受精卵を作成し、胚盤胞まで発生させた後に、内細胞塊を単離して ES 細胞株を樹立する。

(7) azh -/- C57BL/6 マウス由来の ES 細胞への「欠失部分を含む遺伝子断片」の導入

前述 (1) において作成した種々のサイズの「欠失した 2011 bp の領域」を含む遺伝子断片をサブクローニングベクターより切り出し生成する。

一方、ユニバーサルプロモーターの下流に GFP 遺伝子を接続した遺伝子断片（市販の発現ベクターより切り出して作成）を、前述 (2) において樹立した azh -/- マウス由来の ES 細胞に、様々な条件で遺伝子導入し、GFP のシグナルによってその導入効率を検討する。遺伝子導入の条件として、エレクトロポレーションの諸条件、遺伝子のサイズ、遺伝子量を検討する。

この予備実験によって決定した ES 細胞に対する高効率な遺伝子導入条件を用いて、種々のサイズの「欠失した 2011 bp の領域」を含む遺伝子断片を ES 細胞に導入し、培養を継続する。遺伝子導入後、3 日目、7 日目、14 日目に細胞を回収し、定量的 PCR 法により「欠失した 2011 bp の領域」が相同組み換えによって正常化した ES 細胞の割合を検討する。

(8) azh -/- マウスにおける Hook-1 遺伝子の欠失部位を含む野生型ゲノム DNA の精原細胞への導入

前項までの検討によって、azh -/- C57BL/6 マウスの「欠失した 2011 bp の領域」を正常化するための至適な部分のゲノム DNA を、同様に前項までの検討で決定した高効率な遺伝子導入法を用いて azh -/- マウスの精原細胞に遺伝子導入する。遺伝子導入から 60 日後に屠殺して、精巣内ならびに精巣上体において精子の形態を観察し、正常な形態を示す精子を探索する。この研究では、この「正常な形態を示す精子」を同定することが極めて困難と思われるが、単に鏡視するだけでなく、精子の運動性を利用したり、セルソーターを利用したりしながら、ごく少数と思われる正常化した精子を見いだす。なお、形態が正常化した精子については体外授精法によりその受精能が正常に復したことを確認する。さらに、その産仔（雄）の遺伝子解析ならびに精子の機能解析を行い、Hook-1 遺伝子のエキソン 10 と 11 の欠失が正常化するとともに、Hook-1 遺伝子の異常の仔への伝搬が断ち切られたことを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 共焦点レーザー顕微鏡による観察

pCMV-YFP を導入した精巣では、精細管内の広汎な範囲で、YFP の発現を認める細胞が確認された。また、精細管切片においても精

細管の広い範囲で YFP の発現が認められた。一方、pHP-YFP を導入した精巣では、YFP 陽性細胞は精細管の限局した部位に局在していた。また、精細管切片でも、精細管の一部にのみ YFP の発現が認められた。

pHP-HK-YFP を導入した精巣では、pHP-YFP 導入精巣と同様に精細管の限局した部位にのみ YFP の発現が認められた。このことから、精細管内の特定の細胞でのみ Hook1 プロモーターが活性化され、Hook1-YFP 融合タンパクが合成されたことが確認された。

(2)免疫組織化学的解析

pHP-YFP 導入精細管で認められた YFP 発現細胞の同定を目的として、pHP-RFP を導入した精巣の免疫組織化学的解析を行った結果、共焦点レーザー顕微鏡による解析結果と同様に精細管内の非常に限局した細胞にのみ特異的に認められ、RFP 陽性細胞はパキテン期以降の精細胞のみであった。今回の観察の範囲では、精原細胞や成熟精子には染色された細胞は認められなかった。

本研究では、精子頭部の形態形成に關与する Hook1 遺伝子を利用した。Hook1 遺伝子は、精子形成過程において精母細胞より発現し精子頭部の microtubule manchette の形成に關与する。この遺伝子のプロモーターならびに YFP cDNA を接続したプラスミドを用いて、精細管内に導入した結果、精子形成細胞にのみ、しかも分化過程の特異的な期間にのみ限局して、細胞内で特異的に外来遺伝子を発現させることが可能であることが明らかになった。さらに、翻訳領域の Hook1 cDNA を接続することにより、導入された細胞内で Hook1 遺伝子を合成し得ることが確認された。本研究では、安全性が高い電気穿孔法を利用し、生殖細胞に遺伝子を導入し、外来遺伝子を特異的な細胞でのみ発現させることが可能であることを明らかにした。今後、さらに高い確率での遺伝子導入を可能にする手段の確立と、欠損部分を補われた遺伝子が導入された精子より実際の妊孕性の確認ならびにその産仔（雄）の遺伝子解析ならびに精子の機能解析を行い欠失遺伝子の伝搬が途絶えたことを証明することが必要となる。本研究を利用して、精巣内に数多く存在する生殖細胞のうち正常に成熟し形態・機能に問題のない精子が得られるならば、遺伝子異常による形態的・機能的異常が修復され ART の併用により妊孕性の回復が期待できる。また、さらに将来的には、外来遺伝子を精原細胞の染色体へ組み込むことにより、遺伝子異常を修復した正常精子を形成せしめ、子孫への遺伝子異常の伝搬を断ち切ることが可能となると考える。

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1件)

深澤宏子, 正田朋子, 平田修司:
MII 卵紡錘体移植における細胞質持ち込み量の検討. 日産婦誌 66 (2):858, 2014.

6. 研究組織

(1)研究代表者

正田 朋子 (SHODA, Tomoko)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号: 5 0 3 4 5 7 1 6

(2)研究分担者

平田 修司 (HIRATA, Shuji)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号: 0 0 2 2 8 7 8 5