

セルトリ細胞への遺伝子導入による新規男性不妊治療法の開発

—ヒト不妊治療への応用に期待—

概要

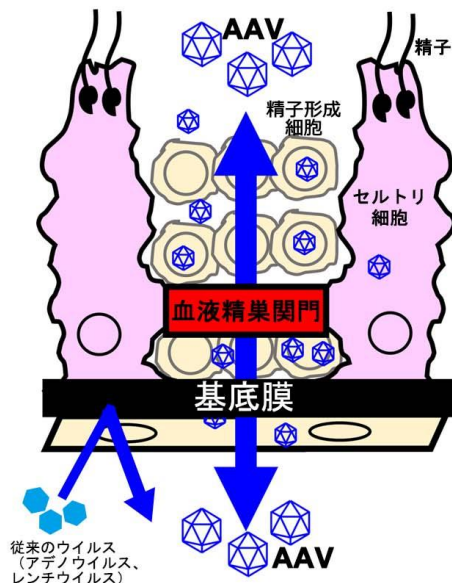
日本において増加している不妊症は、原因の半分が男性側にあり、多くの場合に精子形成異常が見られます。精子形成異常は、精子形成細胞と体細胞であるセルトリ細胞のいずれに欠陥があった場合でも発生します。これまでは減数分裂が終了した成熟細胞の段階で精子形成が停止した場合については治療が可能でしたが、それ以前の分化段階の細胞に異常があった場合には治療法がありませんでした。京都大学大学院医学研究科の篠原隆司 教授、理化学研究所バイオリソースセンターの小倉淳郎 室長らの研究グループは、きわめて治療が困難だった男性不妊症「セルトリ細胞遺残症候群」について、アデノ随伴ウイルスを用いた精巣への新規遺伝子導入法を開発し、不妊症モデルマウスの精子形成を回復させることに成功しました。本手法は、当該ウイルスが感染した細胞のゲノムに遺伝子を挿入せず、炎症反応も起こさない点で先行研究よりも安全性に優れており、3ヶ月以上にわたってセルトリ細胞での遺伝子発現が継続するため、ヒトのように精子形成期間が長い場合でも発現の持続が期待できる画期的なものです。今後はヒト男性不妊症の原因遺伝子の特定と、より高い安全性の確保によって、本手法のヒト不妊治療への応用が期待されます。

本研究は、2018年4月6日に米国の科学誌「Stem Cell Reports」誌にオンライン掲載されました。

1. 背景

日本において不妊症は増加しており、現在は6組に1組が不妊であると言われています。不妊症の原因の半分は男性側にあり、多くの場合に精子形成異常が見られます。精子形成は生殖細胞である精子形成細胞と体細胞であるセルトリ細胞の密接な相互作用が必要です。したがって、いずれの細胞に欠陥があった場合でも精子形成が途中で停止し、不妊症となります。ヒトでは顕微授精の方法を用いることで、このような分化が停止した精子形成細胞を用いて不妊症を解決することができるようになってきましたが、この手法は減数分裂が終

AAVは血液精巣関門と基底膜を通過して、セルトリ細胞に感染し遺伝子を導入できる
→精巣への遺伝子導入がより簡便に



男性不妊症モデルマウスの遺伝子治療に成功

未処理モデルマウス精巣
精細管が空

Kitl発現AAV感染モデルマウス精巣
精子形成が回復し、精子や精子形成細胞で精細管が満たされた
*の部分が精細管内

精子形成が回復してできた精子を用いて顕微授精を行い、正常な産仔を得た

CD4 CD8
Kitl発現AAV感染モデルマウス精巣
炎症反応 (CD4またはCD8陽性細胞、緑色) は誘導されなかった。

わった比較的成熟した精子形成細胞にしか適応できず、それ以前の分化段階の細胞に異常があった場合には現在も治療法がありません。特に今回の実験の対象となったセルトリ細胞遺残症候群 (Sertoli cell only syndrome) は男性不妊の 10%程度と言われている疾患で、ほとんど精子形成細胞が見当たらないという極めて治療困難なものです。

男性不妊症については、これまでに実験動物を用いて幾つかの方法で不妊症治療が行われて来ました。私たちのグループでは 2002 年にアデノウイルスを用いた遺伝子治療を行い、不妊症マウスモデルの遺伝子治療に成功しました。これは不妊症の遺伝子治療としては最初の試みでした。同年に米国のグループがレンチウイルスという別のタイプのウイルスを用いた、同様な不妊治療の成功が報告されました。これらの実験動物を用いた不妊症の遺伝子治療の成功は、ヒトへの応用も期待させるものでした。

しかし、その後の研究でアデノウイルスは炎症を起こすこと、長期にわたって遺伝子発現を維持できないためにヒトのように精子形成の期間が長い場合 (ニヶ月以上) には効用が期待できないことなどが分かってきました。また、レンチウイルスについては生殖細胞に遺伝子導入が起こる可能性が高く、実際にヒトの治療に用いるには危険が大きいことが明らかになってきました。その後、精巣の精細管内への細胞移植や精巣の器官培養を用いた実験でも成功が報告されましたが、いずれの手法もヒトへの応用にはまだ技術的な問題が解決できておらず、減数分裂以前の分化段階に異常がある男性不妊症に対しては、今も治療法がない状態です。

2. 研究手法・成果

今回私たちは、アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus, AAV) というウイルスを用いた遺伝子治療により、男性不妊の治療に成功しました。AAV は遺伝子治療に最も有望とされるウイルスで、既にヒトの血友病や黄斑変性症などについて、海外では活発に臨床試験が進められています。AAV は他のウイルスと異なり、100 種類を超えるキャプシド (ウイルスを取り囲むたんぱく質の殻) により特定の細胞へ感染することができます。またレンチウイルスのように導入遺伝子が感染した細胞のゲノム DNA に挿入されないという利点もあります。私たちは精巣における AAV の感染標的を調べる目的で、精細管内もしくは精細管の外側である間質組織にウイルスを注入しました。その結果、AAV はその注入方法に拘らず精巣細胞に広く感染することが分かりました。これまでに試されたウイルスは、精巣と外界を隔てる基底膜や血液精巣関門という構造が邪魔をして限局的にしか感染することができず、精細管内の細胞に感染するのは困難でした。しかし、AAV は幅広い種類の細胞に感染することができるのです。

そこで、私たちは AAV を用いてセルトリ細胞遺残症候群のモデルマウス (SI/SI^d マウス) の治療を試みました。このマウスは *Kitl* というセルトリ細胞が発現する生殖細胞の分化に必要な因子に突然変異が入っており、その結果精子が欠損している先天性のセルトリ細胞遺残症候群モデルマウスです。このマウスの精巣には非常に未分化な幹細胞が少量存在するものの、組織解析では生殖細胞が見当たらないという点で、これまでもヒトのセルトリ細胞遺残症候群として使われてきました。私たちが *Kitl* 遺伝子を持つ AAV をこのマウスの精巣に感染させると、感染後 2 ヶ月ほどで不妊マウスの精巣に精子形成が回復しました。生じた精子を用いて顕微受精を行ったところ、正常な子孫を得ることが出来ました。

このことは AAV がセルトリ細胞の遺伝子欠損を補うのに有効である可能性を示していますが、一世代限りのセルトリ細胞とは異なり、もし生殖細胞のゲノムに挿入された場合、次世代に遺伝子疾患を引き起こす危険

があります。そこで、生まれてきた子孫の DNA を回収して遺伝子がゲノム内に挿入されているかを調べたところ、いずれの子孫にも外来ウイルス DNA は存在せず、生殖細胞ゲノムに挿入されないことが明らかになりました。さらに AAV 感染後の精巣において炎症細胞が誘導されていないことも確認できました。これらの結果から、本手法の安全性も確認されました。

3. 波及効果、今後の予定

AAV は感染した細胞のゲノムに遺伝子を挿入しないという点と炎症を起こさないという点で、これまでに不妊症の遺伝子治療で用いられてきたウイルスよりも優れています。また 3 ヶ月以上にわたりセルトリ細胞での遺伝子発現が継続しており、ヒトのように精子形成期間が長い場合でも発現の持続が期待できます。AAV は精巣のどの部分から注入しても精巣細胞に感染できること、特定のキャプシドを使うと標的細胞のみに遺伝子導入できることなどから、従来よりも簡便で、より安全な遺伝子治療が可能になると予想されます。

本研究成果を臨床へと展開するためには、次の二つの問題を解決する必要があります。一つ目は男性不妊症の原因遺伝子の同定です。現在のところセルトリ細胞が原因となっている不妊症の遺伝子はマウスでは数多く同定されています。しかしながらヒトでは研究が進んでおらず、原因となる遺伝子は殆ど明らかになっていません。したがって、男性不妊症の原因遺伝子の同定は喫緊の課題です。もう一つの課題は、安全性の確保です。AAV は特定の精巣細胞に感染させることができますが、ヒトにおいても同様に特異的な感染が可能か、また生殖細胞には導入されないのかなどについて動物実験により詳細に検討する必要があります。この二つの課題を解決することが出来れば、今回の私たちの研究成果はヒトに応用することも十分に可能であると考えています。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、文部科学省新学術領域「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」、上原記念財団、武田科学振興財団、内藤記念科学奨励金、戦略的想像研究推進事業（さきがけ）、日本医療研究開発機構、日本学術振興会の支援を受けました。

<論文タイトルと著者>

タイトル : In vivo genetic manipulation of spermatogonial stem cells and their microenvironment by adeno-associated viruses

著者 : Satoshi Watanabe, Mito Kanatsu-Shinohara, Narumi Ogonuki, Shogo Matoba, Atsuo Ogura, Takashi Shinohara

掲載誌 : Stem Cell Reports