

# マウス卵子形成不全の遺伝子治療の成功

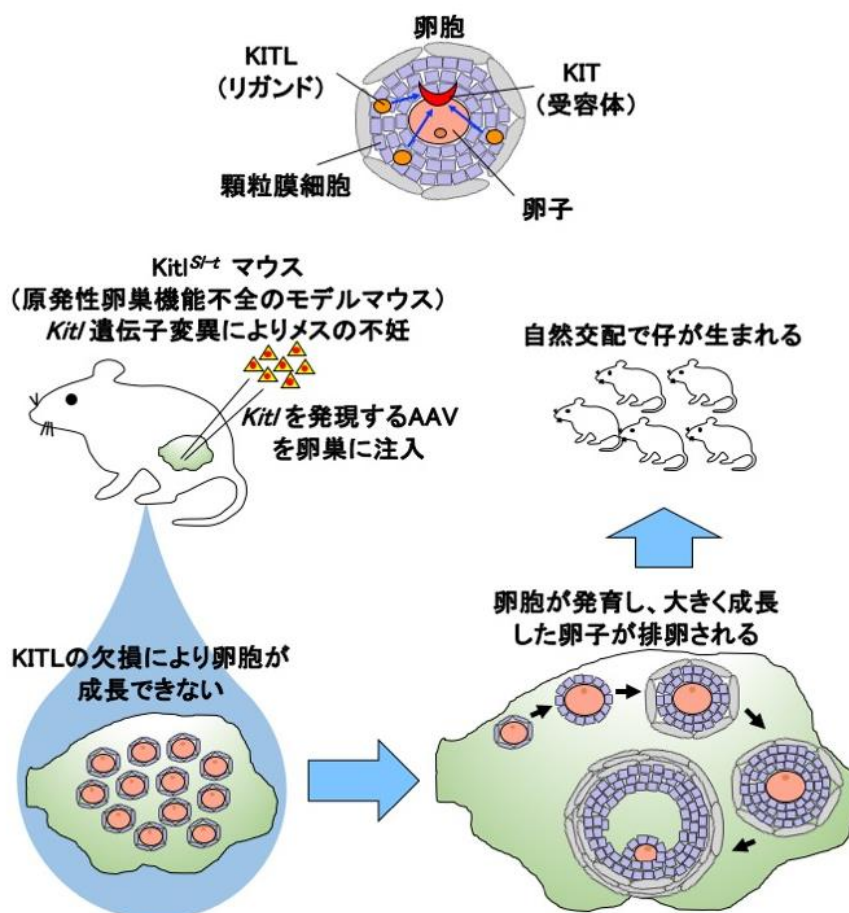
—女性不妊治療への応用に期待—

## 概要

京都大学大学院医学研究科の篠原美都助教と篠原隆司教授らのグループは、卵子形成促進分子であるサイトカイン<sup>注1</sup>の Kit ligand (Kitl) の卵巣への遺伝子導入により女性不妊症の遺伝子治療に成功しました。

Kitl は卵子形成を誘導する分子で、卵子を取り囲む体細胞である顆粒膜細胞<sup>注2</sup>に発現しています。Kitl を欠損した *Kitl*<sup>Sl-t</sup> マウスは卵子形成不全のため、先天性不妊症になります。原発性卵巣機能不全は 40 歳の女性の 1%程度に見られ、現在治療法はありません。今回、我々はアデノ随伴ウイルス (AAV)<sup>注3</sup>を用いて原発性卵巣機能不全のモデルマウスである *Kitl*<sup>Sl-t</sup> マウスの遺伝子治療に成功しました。AAV はヒト遺伝子治療に用いられており、血友病、パーキンソン病などの治療の成功報告が相次いでいます。Kitl を発現する AAV を投与された卵巣では卵子形成が開始し、自然交配により子孫が生まれました。子孫には AAV 遺伝子の挿入はありませんでした。本研究から、AAV による遺伝子治療が女性不妊症の治療につながる可能性が示唆されました。

本研究成果は、2022 年 4 月 28 日午前 0 時 (日本時間) に国際学術誌「Cell Reports Medicine」誌にオンライン掲載されました。



卵子の栄養分が受け取れないために不妊症になっている成熟した変異メスマウスの卵巣にアデノ随伴ウイルスを導入したところ、卵胞が発育し、自然交配で子孫を得ることができました。子孫には遺伝子は見当たりませんでした。

## 1. 背景

現在 6 組に 1 組の夫婦が不妊であり、その原因の半分は女性側にあるとされています。女性の場合、男性とは異なり出生後に生殖細胞の数が減少し続けます。卵子細胞の生存は卵子を取り囲む体細胞である顆粒膜細胞によって支えられ、顆粒膜細胞に発現する Kitl が卵子の生存を促進する分子として知られています。卵子と顆粒膜細胞は卵胞を形成していますが、その周囲には「血液卵胞関門」と呼ばれるバリアーが存在し、外部からの物質の卵胞内への侵入を制限し卵子発生を保護しています。

卵子には Kitl の受容体であるチロシンキナーゼ型分子の Kit が発現し、両者の適切な相互作用により卵子形成が進行します。もしこの相互作用が阻害されると、卵子形成は停止し不妊症になります。Kitl<sup>Sl-t</sup> マウスでは生まれた時に原始卵胞が存在しますが、Kitl を欠損しているためその後卵胞が発育せず、先天性不妊になります。Kitl<sup>Sl-t</sup> マウスはヒトの病気では原発性卵巣機能不全と呼ばれる疾患のモデルマウスです。原発性卵巣機能不全においては卵巣が正常に働かなくなり、排卵が起こらないために子孫を得ることができません。この疾患の患者さんは 40 歳女性の 1%程度の頻度を占めており、現在のところ治療方法がなく卵子提供を受けて妊娠するしかない状況です。

AAV は非病原性でありゲノムに挿入されないため、2000 年代に入ってから遺伝子治療に適用しようという機運が高まり、様々な霊長類から 100 種類程度の AAV が分離されています。現在 AAV は血友病やパーキンソン病、網膜色素変性症などに対する遺伝子治療に用いられており、今後も対象となる疾患は増加していくものとみられます。AAV は「脳関門」という脳組織と血流を隔てるバリアーや、「血液精巣関門」という精巣組織と血流を隔てるバリアーを通過できる能力があることから、我々はこのウイルスは「血液卵胞関門」も通過できるのではないかと考えました。もしこのバリアーを通過できるのであれば、卵胞に遺伝子を導入することで卵子形成の欠陥を治療できるとの仮説を立てました。

## 2. 研究手法・成果

我々は先天的に Kitl を欠損するために不妊症になっている Kitl<sup>Sl-t</sup> マウスを利用しました。このマウスでは卵巣における Kitl の発現が完全に欠落しており、卵巣内には最も未分化な原始卵胞しか存在しません。原始卵胞は成熟したマウスの卵巣でも確認することができますが、卵子形成が進行しないために正常な排卵は不可能です。

我々は最初に血液卵胞関門を通過する AAV ウイルスをスクリーニングしました。AAV には 100 種類を超えるウイルスがあり、ウイルスの表面分子の構造により分類されています。中でも AAV9 と呼ばれるタイプのウイルスが血液卵胞関門を通過することを見出しました。AAV9 は卵胞内の顆粒膜細胞に感染することができますが、卵子には感染しないことも確認することができました。

そこで我々は Kitl を発現する AAV9 ウイルスを作成し、成熟した Kitl<sup>Sl-t</sup> マウスの卵巣内にガラス針を用いてウイルスを卵巣内に導入しました。このマウスの卵巣を組織学的に解析したところ、遺伝子導入の直後から卵胞の発育が開始し、成熟卵胞の形成まで確認できました。そこで遺伝子導入を行なった雌マウスを雄マウスと交配させたところ、遺伝子導入から約 2 ヶ月で自然交配により子孫を得ることが出来ました。19 匹のマウスに遺伝子治療を行った結果、8 匹 (42.1%) のマウスから合計 29 匹 (平均 3.6 匹) の子孫が生まれており、うち 1 匹の雌は二回出産することができました。生まれてきた子供は次世代の産仔を産むことも確認しました。

遺伝子治療において最も危惧される副作用は子孫のゲノムへの遺伝子挿入です。そこで、この生まれてきた子供の DNA を用いて AAV9 の配列の有無を複数の方法で検討したところ、どの子孫にも AAV9 のゲノムが挿入されていないことがわかりました。

以上の結果により、我々は先天的雌不妊症のマウスモデルにおいて遺伝子治療により妊孕性の回復に初めて成功しました。これまで原発性卵巣機能不全は難治性疾患として知られていましたが、卵巣への遺伝子治療の開発により女性不妊症の新たな治療法が生じる可能性があります。

### 3. 波及効果、今後の予定

近年の次世代シーケンサー技術の進展により女性不妊症の原因遺伝子が次々と明らかになってきています。例えばFSHR, FOXL2, INHAなどの遺伝子は顆粒膜細胞に発現する遺伝子で、その機能不全は不妊症の原因になっていますが、現段階では治療法がありません。しかしながら、このようなケースでも今後の研究の進展によっては遺伝子治療により正常な遺伝子を導入することで子孫を得られる可能性があります。このようにAAVを用いて卵子の分化を促進すれば、卵巣内の体細胞が原因となる不妊症を治療できる可能性があるため、本研究結果は女性不妊症の新規治療法の開発につながる可能性があります。

しかしながら、AAVは既に臨床応用されているとは言え、完全に安全なものとは限りません。筋肉などの体細胞の組織において遺伝子挿入が低い頻度で起こりうるということが報告されています。こうした危険性がどのくらい生殖細胞においてもあるのか、実験動物を用いて今後慎重に検討する必要があります。

また、今回の実験では遺伝子治療を行ったマウスのうち4割程度しか出産できなかったことから、現在の技術をさらに改善することももう一つの重要課題だと考えています。

### 4. 研究プロジェクトについて

今回の研究はAMED (17933225, JP21gm1110008)、科学研究費補助金 (19K22512, 19H05750, 19H04906, 18H04882, 18H05281, 18H02935)、上原財団、武田科学振興財団からの支援により行われました。

#### <用語解説>

- (注1) **サイトカイン**：液性因子の1つで、ホルモンなどのように細胞から放出されて別の細胞に作用する化合物のこと。
- (注2) **顆粒膜細胞**：卵子と細胞質でつながっており、卵子形成を直接支え栄養分を卵子に与える細胞。またエストロゲンを分泌することでも知られる。卵子形成が進むに連れてその数が増えていく。
- (注3) **アデノ随伴ウイルス (AAV)**：小型(~20nm)のパルボウイルスに属するウイルスである。一本鎖のDNAをもち、増殖・非増殖細胞のいずれにも感染し免疫毒性・遺伝毒性が低いという特徴がある。また、非分裂細胞においても長期間の目的遺伝子発現が可能であるため、ウイルスベクターとして臨床応用に有望視されている。

#### <研究者のコメント>

これまで女性不妊症に対する遺伝子治療は不可能だと考えられていましたが、AAVを利用することで思いがけなく成功することができました。特に自然交配で子孫を生んだのには驚きました。不妊マウスのお腹がいつともなく大きくなっていくのを見て、「あれ？本当に生まれてくるのだろうか」とワクワクし、動物室にネズミを見にいくのが毎日楽しみでした。赤ちゃんを見つけた時は本当に嬉しかったです（篠原隆司）。

#### <論文タイトルと著者>

タイトル：Adeno-associated virus-mediated gene delivery to ovaries restores fertility in congenital infertile mice (卵巣へのアデノ随伴ウイルスの投与による先天性不妊マウスの妊娠性回復)

著者：Mito Kanatsu-Shinohara, Jiyoung Lee, Takehiro Miyazaki, Hiroko Morimoto, and Takashi Shinohara

掲載誌：Cell Reports Medicine DOI：https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100606