

## 遺伝子異常に関わる対策：精子遺伝子導入による 運動率と受精能の変化

名古屋市立大学医学部泌尿器科学教室（主任：郡健二郎教授）

佐々木昌一，小島 祥敬，窪田 裕樹

田貫 浩之，林 祐太郎，郡 健二郎

### EFFECTS OF THE GENE TRANSFER INTO SPERM MEDIATED BY LIPOSOMES ON SPERM MOTILITY AND FERTILIZATION IN VITRO

Shoichi SASAKI, Yoshiyuki KOJIMA, Hiroki KUBOTA,

Hiroyuki TATSURA, Yutaro HAYASHI and Kenjiro KOHRI

*From the Department of Urology, Nagoya City University Medical School*

To clarify the problems of gene transfer in the fertility clinic, we investigated the safety and effectiveness of the gene transfer of mouse sperm using the lipofection method.

We used the pCAGGS-lacZ plasmid connected with cytomegalovirus enhancer/chicken  $\beta$ -actin promoter as an adventitious gene. After incubation of the DNA-liposome complex and mouse sperm of epididymis in the medium, we investigated the sperm motility after gene transfer, in vitro fertilization rate of the gene transferred sperm, and gene expression of the fertilized ovum and fetus.

Sperm motility was lowered significantly with the increase in DNA density. The fertilization rate for in vitro fertilization was lowered significantly with the increase in DNA density. Gene expression was observed in some of the fertilized ova. In the fetus 12.5 days after embryo transfer, gene transfer was confirmed by the PCR method, but we could not find gene expression by X-gal staining.

We proved that the sperm with a gene transferred by the lipofection method could fertilize the ovum and transfer adventitious gene to ova. We speculate that sperm motility and fertility rate were lowered because the introduction of DNA and the DNA-liposome complex destroyed parts of the cell. Development of a sperm fractionation method for DNA transfer and establishment of a method for effective and safe DNA transfer are awaited.

(Acta Urol. Jpn. 46 : 591-595, 2000)

**Key words:** Sperm motility, Fertilization, Gene transfer, Gene expression, Mouse

### 緒 言

男子不妊症に対する補助生殖技術の進歩に伴い、精子形成障害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、次世代に継承される可能性が危惧される。

その対策としては、精子の遺伝子診断を行い、異常の認められないものを用いた ICSI を行うことがもっとも生理的であると思われるが、現在のところ、生存精子のまま鑑別することは困難であり、また将来的に可能になったとしても、採取されたすべての精子に異常を認めるようなケースには応用できない。

また受精卵の遺伝子診断は、技術上困難で、胚移植前の胚生検が可能であるが、その安全性、倫理上の問題、遺伝子異常を診断されたときは胚移植をしないのか、という問題が残る。胎児診断は最も容易であるが、診断後の治療には問題が残っている。

これらの遺伝子異常に対応するためには、将来的には、他の遺伝子病と同様に、その遺伝子異常を修復して治療する対象になる可能性がある。

現在のところ、生殖系細胞に対する遺伝子治療は、導入される遺伝子の個体へ与える影響について、技術的に未解明の部分が多く、また導入された遺伝子が次世代に受け継がれる可能性が高いなどの倫理的な問題により禁止されている。

いいかえれば、遺伝子異常に関わる対策としての生殖細胞への遺伝子導入における問題点を、われわれが解明していく必要があると言える。

そこでわれわれは、生殖領域における遺伝子導入の臨床的問題点・安全性について、リポフェクション法によるマウス精子への遺伝子導入を行って検討した。

### 対 象 と 方 法

精子へ外来遺伝子を導入して、①遺伝子導入後の精

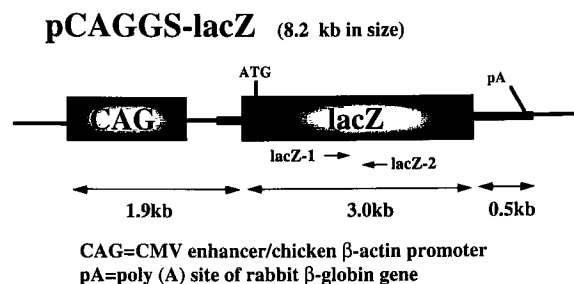


Fig. 1. The adventitious gene (pCAGGS-lacZ).

子運動能, ②遺伝子導入された精子の体外受精 (in vitro fertilization: IVF) 率, ③受精卵および胎仔における遺伝子発現について検討した。

実験動物として, 7週齢の B6D2F1 雌雄マウスおよび同週齢の ICR 雌雄マウスを, 7日間飼育後, 実験に供した。

精子は, B6D2F1 雄マウスの精巣上体尾部より採取し, これを BSA (bovine serum albumin, Sigma, St. Louis) 10 mg/ml を含む HTF (human tubular fluid medium, Irvine Scientific, Santa Ana) 中で, 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator 内に90分放置してから, 以下の実験に供した。

導入遺伝子として pCAGGS-lacZ (cytomegarovirus enhancer/chicken β-actin promoter に lacZ 遺伝子を連結させたもの) (Fig. 1) を使用した。

3 cm dish 上に 300 μl の HTF 溶液を入れ, DNA 0.5~15 μg とリポフェクション試薬 (Lipofect AMINE®, GIBCO BRL, Rockville) 2 μg とを混和し, 最終濃度が0 (コントロール), 1, 10, 20, 30 μg/ml となるように濃度を調整後, 30分室温にて放置してから実験に用いた。

#### ①遺伝子導入後の精子運動能の測定

2×10<sup>6</sup>/ml 精子浮遊液と 1, 10, 20, 30 μg/ml DNA-liposome 複合体溶液とを混和し, 精子濃度 1×10<sup>6</sup>/ml, DNA 濃度 0.5, 5, 10, 15 μg/ml の検体溶液を作成した。それぞれを精子運動自動解析装置 HTM-2030 (Hamilton-Thorn Research 社製) にて, 精子運動率を測定した。

#### ②遺伝子導入された精子の体外受精率

卵は, PMSG (pregnant mare's serum gonadotrophin, Serotropin®, 帝国臓器, 東京) および hCG (human chorionic gonadotrophin, Gonatropin®, 帝国臓器, 東京) によりホルモン処理をし, 過剰排卵させた B6D2F1 雌マウスの卵管膨大部より採取したものをを用いた<sup>1)</sup> 濃度調整した精子を, HTF (含 BSA 10 mg/ml) 培養液下にて媒精し, 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator 内に放置した。5時間後に十分洗浄し, HTF (含 BSA 5 mg/ml) 培養液下で20時間放置した後, 2細胞に卵割したものを授精したものとした。

#### ③受精卵および胎仔における遺伝子発現の検索

受精卵は, X-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド) を用いた β-galactosidase 活性の染色を行い, 導入遺伝子の発現を観察した<sup>1)</sup>

また前述の IVF によって得られた受精卵を, 精管結紮された ICR 雄マウスと交配して作製した同種偽妊娠マウスの卵管膨大部へ, 胚移植した。その後, 12.5日胎仔および羊膜を採取した。

羊膜から DNA を Tris-HCl, EDTA, SDS, protease K を含む抽出液より調整した。抽出した DNA を用いて PCR 法を行い, lacZ 遺伝子の検出をすることにより, 胎仔への遺伝子導入の有無を調べた。プライマー lacZ-1: 5'-GCCGAAATCCCGAATCTCTA-3', lacZ-2: 5'-GGCTTCATCCACCACATACA-3' を用い, PCR 反応は 94°C 30秒, 63°C 30秒, 72°C 30秒により, 30サイクルで行った。酵素は Taq DNA polymerase (宝酒造, 東京) を用いた。

また胎仔の X-gal 染色で, 遺伝子発現の有無についても検討した。

なお, 比較実験として, トランスジェニックマウス作製法に準じて, 自然交配によって得られた受精卵に対して DNA の微小注入法を行った。前核に対し微小ガラス管を用いて, pCAGGS-lacZ (4 ng/μl) を注入した受精卵を, 偽妊娠マウスの卵管膨大部に胚移植し, 胎仔において遺伝子導入および遺伝子発現の有無について検討した。

## 結 果

#### ①遺伝子導入後の精子運動能

精子運動率は, DNA を含まないリポフェクション試薬のみの場合に比べ, DNA 濃度依存性に低下し, 0.5 μg/ml 以上では統計学的有意差を認めた (Table 1)。

Table 1. The sperm motility

| DNA concentration (μg/ml) | 0  | 0.5 | 5   | 10   | 15   |
|---------------------------|----|-----|-----|------|------|
| Sperm motility (%)        | 64 | 60  | 51* | 44** | 21** |

\* P < 0.005 for DNA 0 μg/ml. \*\* p < 0.001 for DNA 0 μg/ml (chi-square test).

Table 2. Effect of varying DNA concentration on in vitro fertilization frequency

| DNA concentration (μg/ml) | 0    | 0.5  | 5     | 10     |
|---------------------------|------|------|-------|--------|
| No. of oocytes            | 96   | 102  | 130   | 88     |
| No. of two-cell embryos   | 66   | 56   | 43    | 10     |
| Efficiency (%)            | 68.8 | 54.9 | 33.1* | 11.4** |

\* p < 0.01 for DNA 0 μg/ml. \*\* p < 0.001 for DNA 0 μg/ml (chi-square test).



Fig. 2. Two-cell embryos after in vitro fertilization using the sperm-mediated pCAGGS-lacZ plasmid. Expression of the exogenous gene was confirmed in some embryos, but not in others by X-gal staining. A chimera embryo was also found (arrow).

## ②遺伝子導入された精子の体外受精率

IVF における受精率は, DNA を含まないリポフェクション試薬のみの場合は約70%であったが, DNA を加えることにより, DNA 濃度依存性に有意に低下した (Table 2).

## ③受精卵および胎仔における遺伝子発現

精子へ遺伝子導入後に IVF を行った受精卵において, X-gal 染色で遺伝子の発現が認められた. 一部に発現のみられなかったものや, キメラの受精卵が観察された (Fig. 2).

妊娠12.5日目の胎仔の羊膜より DNA を調整し PCR を行い, 遺伝子導入の有無を調べたところ, 遺伝子導入効率は, 受精卵へ遺伝子を微小注入した場合と, 精子へ遺伝子導入後に IVF を行った場合とで, 有意差は認められなかった. しかし, 胎仔の X-gal 染色で, 遺伝子発現の有無を調べたところ, 精子内遺伝子導入後 IVF 例では, すべての例で発現が見られなかった. すなわち, 精子に遺伝子導入をした場合, その遺伝子は次世代へ継承されることがあっても, 発現はされていないことが確認された (Table 3).

## 考 察

男性不妊症の治療は, その原因解明を待たずに飛躍的な進歩をとげ, 精巣内精子を用いた顕微授精 (TESE-ICSI) など, これらの技術は今まで挙児の可能性のなかった夫婦に, 多くの喜びをもたらしてい

る.

しかし顕微授精の長期的安全性の確認は, まだ十分とは言えず, また正常である妻から採卵することなど, 問題がないとはいえない. さらに精子形成障害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, 次世代に継承される可能性が危惧される.

男子不妊症患者の遺伝子解析から, 一部の無精子症患者の Y 染色体長腕の精子形成に関わる遺伝子領域 azoospermia factor (AZF) における変異・欠損が報告されている<sup>2,3)</sup> 現在までに, ヒト Y 染色体の RBM<sup>4)</sup> や DAZ<sup>5)</sup> などが精子形成に関わる遺伝子として cloning されてきてるが, 最近マウスにおいて, 常染色体に存在する DAZLA (DAZ-like autosomal) 遺伝子が, 精子形成に関わることが報告された<sup>6,7)</sup> DAZLA はヒトでは常染色体 3p24 または25に mapping され, DAZ と相同性の高い領域を有し, 種を越えマウスとも高い相同性を有している<sup>8)</sup>.

これらのことから, 特発性の男性不妊症のかなりは遺伝子病であり, 補助生殖技術の進歩は, 無精子症の男性の Y 染色体上の異常を, その男児に継承するばかりでなく, 精子形成の責任遺伝子が常染色体にあるとしたら, 生まれた女児にも継承されることになり, 次々世代の男児が, 無精子症となる可能性を秘めている.

われわれは, これらの遺伝子異常に対する配偶子遺伝子治療について, 現在における効率と, 精巣組織や精子に対する侵襲について検討してきた.

精子への遺伝子導入は, 1971年 Brackett ら<sup>9)</sup> によって単純遺伝子導入が初めて行われた. その後, liposome 法による導入<sup>10,11)</sup>, electroporation 法による導入<sup>12)</sup> などが試みられてきたが, これらは基礎的な生殖工学技術の進歩が目的であり, 将来の臨床応用を目的とした, 遺伝子導入による細胞障害については, あまり考案されていない.

われわれは, まずリポフェクション法にて, 精子に遺伝子導入を行い, 精子運動性の変化と受精率への影響について検討した. 結果は, 精子運動率および受精率とも, DNA 濃度依存性に低下した. このことは, 男性不妊症患者に応用する場合, きわめて大きな問題になると考えられる.

また, 精子への遺伝子導入は, 受精卵へ遺伝子導入を行った場合と同程度に胎仔への遺伝子導入がなされ

Table 3. Gene expression and transfer rate in fetus

|                                                         | No. eggs | 2-cell | Fetus (12.5) | PCR | LacZ stain |
|---------------------------------------------------------|----------|--------|--------------|-----|------------|
| IVF control                                             | 150      | 98     | 39           | —   | —          |
| IVF after gene transfer into sperm (DNA 5.0 $\mu$ g/ml) | 150      | 80     | 25           | 5   | 0          |
| Micro injection of the gene into fertilized ovum        | 150      | 138    | 60           | 8   | 7          |

るにもかかわらず、遺伝子発現が見られないことは、今後の大きな課題であると思われる。さらに、染色体の標的部位への導入は、現在のところ不可能であり、今後研究を進めていく必要がある。

しかしながら、受精卵以降の段階で遺伝子導入を行うことに比べ、精子への遺伝子導入は非常に簡便で、導入された精子を生存したまま判別することができれば、技術的にも倫理的にも、他の方法より容認されやすいものと考えられる。

精子形成は幹細胞である精祖細胞の増殖や分化、精母細胞の減数分裂、精子細胞への形態変化といくつかの過程に分けられるが、これには支持細胞であるセルトリ細胞や、間質のライディッヒ細胞による複雑な細胞間相互作用が関与している。無精子症のような男子不妊症の治療としては、これらの支持細胞や間質細胞への遺伝子導入の可能性はある。

最近これらの基礎的研究も行われ始め、精巣への遺伝子導入も試みられつつある<sup>13-16)</sup> われわれの実験結果では、DNAを直接精巣に注射した場合は、精細管内の細胞へは遺伝子は導入されず、間質細胞のみに導入したいときには、容易に行うことができる方法である可能性が示されている<sup>13)</sup> また精細管内直接注入は、手技的には複雑であるが、アデノウイルスベクターを用いた場合は、セルトリ細胞のみに遺伝子導入をすることができた。この結果から、精巣内のオートクライン、パラクラインの解明が進めば、精子形成障害の治療への可能性が開けてくる。

しかしながら、緒言でも述べたように、生殖系細胞に対する遺伝子治療は、倫理的問題により禁止されている。今後われわれは、DNA導入精子の分別法の開発、高い導入効率、次世代への安全性、胎児および出生後の遺伝子発現や染色体の標的部位への導入など、安全で確実なDNA導入条件を開発し、臨床応用上での倫理上のコンセンサスを確立していくことが必要と思われる。

## 結 語

精子への遺伝子導入は比較的簡便に行われるものと思われた。また遺伝子が導入された精子は、卵子との受精が可能で外来性遺伝子が受精卵に伝達可能であることが証明された。一方で遺伝子導入により精子の一部に何らかの障害がおり、精子の運動能や受精率の低下が起こると推察された。今後DNA導入精子の分別法の開発と効率かつ安全なDNA導入条件の設定が必要と考えられた。

稿を終えるにあたって、導入遺伝子 pCAGGS-lacZ をご提供下さった、大阪大学分子防御医学講座の宮崎純一教授、ならびに技術指導をいただきました東海大学総合医学研究所

佐藤正宏博士に深謝申し上げます。

なお、本研究の一部は、文部省科学研究補助金基盤(B)(09470350)により援助されたものである。

## 文 献

- 1) Hogan B, Beddington R, Costantini F, et al.: Manipulating the mouse embryo. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1994
- 2) Vogt PH, Edelmann A, Hirschmann P, et al.: The azoospermia factor (AZF) of the human Y chromosome in Yq11: function and analysis in spermatogenesis. *Reprod Fertil Dev* **7**: 685-693, 1995
- 3) Nagafuchi S, Namiki M, Nakahori Y, et al.: A minute deletion of the Y chromosome in men with azoospermia. *J Urol* **150**: 1155-1157, 1993
- 4) Reijo R, Lee TY, Salo P, et al.: Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* **10**: 383-392, 1995
- 5) Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P, et al.: Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* **347**: 1290-1293, 1996
- 6) Ruggiu M, Speed R, Tagarrt M, et al.: The mouse *DAZL* gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* **389**: 73-77, 1997
- 7) Yen PH, Chai NN and Salido EC: The human autosomal gene *DAZL*: testis specificity and a candidate for male infertility. *Hum Mol Genet* **5**: 2013-2017, 1996
- 8) Okabe M, Ikawa M and Ashkenas J: Male infertility and the genetics of spermatogenesis. *Am J Hum Genet* **62**: 1274-1281, 1998
- 9) Brackett BG, Baranska W, Sawicki W, et al.: Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci* **68**: 353-357, 1971
- 10) Bachiller D, Schellander K, Peli J, et al.: Liposome-mediated DNA uptake by sperm cells. *Mol Reprod Dev* **30**: 194-200, 1991
- 11) Francolini M, Lavitrano M, Lamia CL, et al.: Evidence for nuclear internalization of exogenous DNA into mammalian sperm cells. *Mol Reprod Dev* **34**: 133-139, 1993
- 12) Gagné MB, Pothier F and Sirard MA: Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes. *Mol Reprod Dev* **29**: 6-15, 1991
- 13) 小島祥敬, 佐々木昌一, 水野健太郎, ほか: マウス精巣組織への遺伝子導入と造精機能への影響. *日泌尿会誌* **91**: 237, 2000
- 14) Muramatsu T, Shibata O, Ryoki S, et al.: Foreign gene expression in the mouse testis by localized in

- vivo gene transfer. *Biochem Biophys Res Commun* **233** : 45-49, 1997
- 15) Sato M, Iwase R, Kasai K, et al. : Direct injection of foreign DNA into mouse testis as a possible alternative of sperm-mediated gene transfer. *Anim Biotechnol* **5** : 19-31, 1994
- 16) Blanchard KT and Boekelheide K : Adenovirus-mediated gene transfer to rat testis in vivo. *Biol Reprod* **56** : 495-500, 1997

(Received on April 10, 2000)  
(Accepted on June 19, 2000)