

Title	Highly efficient and minimally invasive in-vivo gene transfer to the mouse uterus using haemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector
Author(s)	中村, 仁美
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45303">https://hdl.handle.net/11094/45303</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 中 村 仁 美

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 8 5 3 5 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 6 年 3 月 2 5 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

医学系研究科臓器制御医学専攻

学 位 論 文 名 Highly efficient and minimally invasive in-vivo gene transfer to the mouse uterus using haemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector  
(haemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope ベクターを用いた高効率でかつ低侵襲なマウス子宮に対する生体内遺伝子導入)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 村 田 雄 二

(副査)

教 授 網 野 信 行 教 授 金 田 安 史

## 論 文 内 容 の 要 旨

## 【目的】

近年の補助的生殖医療の発展において旧来の体外受精-胚移植に顕微授精の技術が加わったことにより、受精率は大幅に向上した。しかし、全体の妊娠率は依然 20%台であり、受精率と妊娠率の乖離の原因として着床不全が注目され、着床の機能解析が重要であると考えられている。ところが機能解析のための遺伝子欠損マウスが致死的であったり他の遺伝子の代償による正常化のため着床現象のような一過性の現象の解析には不適當な場合が多く、着床機構の解明、とくにその物質的基盤の解析は進んでいない。着床という一過性の現象の解析には生体内で子宮内膜に一過性に遺伝子産物を発現させたり、失活させたりすることが有効であると考えられる。そこで生体内への遺伝子を導入するにあたり安全性、効率、その遺伝子産物の発現期間などの問題を検討したうえで今回、着床期にかかわる遺伝子産物の解析を目的とし、マウスを用いた子宮内膜への一過性の遺伝子導入法の確立を試みた。

## 【方法】

Luciferase 強制発現 plasmid または  $\beta$ -galactosidase 強制発現 plasmid を細胞融合能をもつ不活性センダイウイルスを用いた Haemagglutinating Virus of Japan envelope (HVJ-E) に封入した。8~10 週齢の ICR 雌マウスを同系の雄と交配させ、交配後 1.5 日目に麻酔下で開腹し、HVJ-E vector 懸濁液を子宮頸部をクランプした子宮腔内に卵管側より 30G 針を用いて注入した (160  $\mu$ g DNA/2000 HAU/匹)。10 分後クランプをはずし閉腹した。一定時間後に子宮を摘出し Luciferase 活性を測定し、導入効率の検討を行った。同様にして HVJ-liposome と lipofectAMINE® を用いた cationic liposome による導入を行い導入効率の比較を行った。24 時間後の摘出子宮で凍結切片を作成し、X-gal を基質として発色させ、導入した  $\beta$ -galactosidase の局在について検討した。また、HVJ-E 導入による妊娠への影響と導入遺伝子が胎児に移行していないかどうか交配後 10.5 日目の胎児および胎盤を用いて PCR 法にて検討した。

## 【成績】

従来の cationic lipofection および HVJ-liposome にくらべて HVJ-E vector を用いた方法では 100 倍以上の導入効

率が認められた。Luciferase 活性は導入 24 時間後に発現のピークをむかえ、導入 5 日後では発現が消失した。 $\beta$ -galactosidase 染色を行うと導入した  $\beta$ -galactosidase 遺伝子産物は内臓上皮細胞に局在しており、間質および筋層では発現は認められなかった。HVJ-E を導入した群において妊娠率は 100% であり一匹あたりの胎仔数、出生仔体重および cranio-rump length はコントロールとして vehicle を導入した群と有意差を認めなかった。また PCR 法における検討で、交配後 10.5 日目における胎児、胎盤において導入遺伝子は認められなかった。

#### 【総括】

一般にアデノウイルスなどウイルスベクターを用いる遺伝子導入方法は導入効率は高いが安全性の問題のため、その使用は特に生殖領域においては不相当と考えられる。HVJ-E vector による遺伝子導入方法は HVJ を不活化し導入遺伝子を HVJ 内に封入して HVJ の外殻を用いる non-viral vector であるため安全性が高い。cationic lipofection をはじめとする従来の遺伝子導入方法にくらべ導入遺伝子の発現効率が高く、導入遺伝子の発現は一過性であり、子宮内臓局所に限局して遺伝子を発現させるマウス子宮への遺伝子導入方法を確立した。またこの方法は妊娠率、産仔数および出生仔体重等に影響をあたえず、胎仔および胎盤に導入遺伝子が移行しないことを確認した。この基礎的な検討は、着床を促進する物質的基盤の検討を通じて着床不全による不妊、不育症の治療法となる大きな可能性を含んでいる。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は着床機構の検討のために HVJ-E ベクターを用いて高効率かつ低侵襲な、マウス子宮局所における一過性の生体内遺伝子導入法を開発した報告である。子宮においては過去に cationic lipofection による遺伝子導入の報告があるが、今回の HVJ-E ベクターによる方法は一般的な cationic lipofection にくらべて遺伝子導入効率が 100 倍以上高く、導入遺伝子の発現は一過性であり、子宮内臓局所に限局して遺伝子を発現させることに成功した。また、妊娠に影響を与えず、導入遺伝子が胎児、胎盤に移行しないことを確認している初めての報告である。この方法は今後子宮における様々な現象の物質的基盤の検討を行うための道具として大きな役割を果たす事が示唆される。この基礎的な検討は、着床を促進する物質的基盤の検討を通じて着床不全による不妊、不育症の治療法となる大きな可能性を含んでおり審査員の合議により、博士（医学）の学位授与に値するものと判定した。