



Title	Simple and highly efficient method for transient in vivo gene transfer to mid-late pregnant mouse uterus
Author(s)	香山, 晋輔
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46265
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	こうやましん輔
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第20143号
学位授与年月日	平成18年3月24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	Simple and highly efficient method for transient <i>in vivo</i> gene transfer to mid-late pregnant mouse uterus (妊娠中後期マウス子宮内への簡便で高効率な一過性遺伝子導入法の開発)
論文審査委員	(主査) 教授 村田 雄二 (副査) 教授 仲野 徹 教授 奥山 明彦

論文内容の要旨

【目的】

分娩・早産・妊娠中毒症といった妊娠関連事象・疾患では、子宮内で多くの遺伝子転写産物の増減が報告されている。しかし、それらの遺伝子転写産物が、各々の妊娠関連事象を誘発する中心的役割を成しているのか、あるいは、それらの事象の結果として產生されているのかについては不明なものが多くを占めている。子宮内の遺伝子発現産物の生理機能を解析するには、従来のノックアウトマウスやトランスジェニックマウスといった遺伝子操作マウスの解析では、胎生致死であったり、代償機構が働くことによって正常な表現系を示したりと不十分な結果が多かった。また、着床・陣痛発来といった妊娠関連事象における生理機能の変化では、非常に短時間で事象変化を認めるため、遺伝子操作による恒常的な遺伝子の欠失や過剰発現による生理的変化では、現象を正確に再現出来ていない可能性があった。そのため、私は妊娠の様々な時期に局所的に遺伝子を強制発現あるいは発現抑制させることが、妊娠関連事象の解明には有効であると考えた。本研究ではマウス妊娠子宮への一過性遺伝子導入法の確立を目的とした。

【方法ならびに成績】

Luciferase・ β -galactosidase 強制発現 plasmid (pcDNA3: CMV promoter) を、HVJ-E (Hemagglutinating Virus of Japan Envelope) ベクターに封入し、このベクター懸濁液 ($25 \mu l/horn$) を、麻酔下で開腹した交配後 14.5 日目の雌マウスの子宮腔内(卵膜外)へ導入した。このベクター懸濁液 $25 \mu l$ 中には、plasmid DNA: $80 \mu g$, HVJ-E vector: 1000 HAU が含まれている。

Luciferase 遺伝子導入 24・48・72 時間後に子宮を摘出し、子宮・胎盤・胎児・卵膜に分離し、各組織より蛋白を抽出して Luciferase 活性を測定した。また、 β -galactosidase 遺伝子導入 24 時間後に子宮を摘出し、子宮及び胎盤・胎児及び卵膜に分離し、凍結切片を作成、 β -galactosidase 染色を施行して導入遺伝子産物の発現局在について検討した。その結果、Luciferase 活性は、子宮・胎盤・卵膜において発現が認められたが、胎児には全く発現を認めなかった。また、子宮における Luciferase 活性は、遺伝子導入 72 時間後まで認められたが、その発現量は急速に減少した。 β -galactosidase 染色によると、脱落膜・胎盤基底膜・卵膜母体側に導入遺伝子の発現局在を認めた。

次に、遺伝子導入操作による胎児への影響について検討した。まず、胎児への導入遺伝子移行の有無を確認するために、 β -galactosidase 遺伝子導入後 24 時間後に子宮を摘出した。胎盤・卵膜・胎児に分離した後、各組織より DNA を抽出した。その DNA を鋳型として、plasmid の一部をプライマーとして PCR にかけて導入遺伝子の移行を検討したところ、胎盤・卵膜では導入遺伝子を認めたが、胎児には認められなかった。次に、遺伝子導入マウス群の妊娠経過を観察・比較したところ、交配後 18.5 日目での胎仔発育や分娩時期などの妊娠予後については sham 手術群と変わらず、この遺伝子導入操作自体では早産を惹起しなかった。

【総括】

HVJ-E を用いた遺伝子導入によって、妊娠中後期マウス子宮腔内（卵膜外）への安全で高効率な一過性遺伝子導入法を確立した。本法を用いて、陣痛発来・早産・妊娠中毒症などの妊娠関連事象・疾患に関わる可能性のある遺伝子を直接子宮腔内へ導入して、機能解析を行うことで、ノックアウトマウスなどの解析だけでは不十分であった妊娠関連事象・疾患における遺伝子動態の機能解析が可能になる。また、妊娠関連疾患に直接関わる遺伝子の同定を、将来的には、妊娠合併症に対する分子標的治療のターゲット分子の探索法に応用できると考える。

論文審査の結果の要旨

本研究では、妊娠の様々な時期の子宮内に遺伝子を一過性に発現させることができ、妊娠関連事象・疾患の解明には有用であると考え、マウス妊娠子宮への遺伝子導入法の確立を目的とした。

HVJ-E (Hemagglutinating Virus of Japan Envelope) vector を用いて、妊娠 14.5 日目の雌マウス子宮腔内（卵膜外）へ遺伝子導入した。導入された Luciferase 遺伝子の発現は、子宮・胎盤・卵膜に認められた。導入された β -galactosidase 遺伝子の発現局在は、脱落膜・胎盤基底膜・卵膜に認められた。PCR 法にて、胎児への導入遺伝子の移行は認めなかった。HVJ-E を用いた遺伝子導入法は、妊娠予後に影響を与えるなかった。

本研究により、妊娠中後期マウスの子宮内への安全で高効率な一過性遺伝子導入法を確立した。妊娠関連事象・疾患に関わる可能性のある遺伝子を、一過性に子宮腔内へ導入し、機能解析を行うことが可能となった。本法は、将来的には、妊娠合併症に対する分子標的治療のターゲット分子の探索法に応用できると考えられる。

妊娠中後期マウス子宮腔内への一過性遺伝子導入に初めて成功した。本研究は、審査員の合議により、学位に値するものと認める。