

平成30年6月14日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16191

研究課題名(和文) 前精原細胞における放射線障害の発生機序の解明：インフラマソーム機構との関連性

研究課題名(英文) Effect of inflammation on the viability of gonocytes exposed to gamma rays

研究代表者

渡部 浩之 (Watanabe, Hiroyuki)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：90608621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、炎症が線照射後の前精原細胞の死滅に関与するかどうかを検討することである。胎齢16.5日目で線照射された雄マウスの精巣では、炎症性サイトカインであるIL-1 およびIL-6のmRNA発現量が増加し、炎症が起きていることが確認された。胎齢16.5日のインフラマソーム構成分子(ASC)欠損マウスに線を照射したところ、野生型マウスと同様に前精原細胞の死滅が観察された。一方、精巣器官培養では培養液にLPSを添加することで精巣の発達が阻害された。以上の結果から、炎症が線照射後の前精原細胞の死滅に関与している可能性は低い、幼若期精巣の発達には悪影響を及ぼすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the effect of inflammation after  $\gamma$ -ray irradiation on the viability of gonocytes in prenatal mice. IL-1 and IL-6 mRNA expression increased in testes exposed to  $\gamma$ -rays, suggesting that inflammation occurred in testes after  $\gamma$ -ray irradiation. When ASC-deficient mice were exposed to  $\gamma$ -ray on Day 16.5 post-coitus, the male germ cells had already disappeared on Day 60 post-partum. In the organ culture of testis, meanwhile, addition of lipopolysaccharide into the culture medium disturbed the development of testis in vitro. These results demonstrated that inflammation induced by  $\gamma$ -ray irradiation was not the cause of cell death in gonocytes. However, it seemed that development of juvenile mouse testis affected by inflammatory responses.

研究分野：生殖生物学

キーワード：放射線 精子形成 精巣 精巣器官培養 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

放射線の影響はDNAの切断という形で細胞に現れる。多くの細胞ではこのDNA損傷は直ちに修復されるが、一部の細胞では完全には修復されず、細胞死を被ったり、そのダメージが細胞に蓄積したりする。一般的に、生殖細胞の放射線感受性は体細胞に比べて高いと言われているが、生殖細胞における放射線障害については未解明な部分も多く、特に継世代的な観点から検討した研究は未だに少ない。

(1) これまでの検討により、新生仔に $\gamma$ 線を照射した場合、精原細胞に分化した生殖細胞は $\gamma$ 線の影響を受けず、照射後生産された精子にはDNAダメージが蓄積していないことが明らかとなった。一方、胎仔期の精巣内に分布する前精原細胞に $\gamma$ 線を照射した場合、ほぼ全ての前精原細胞が死滅し、その個体は不妊となることが明らかとなっている。この研究成果から、胎仔期の前精原細胞だけが選択的に死滅することに着目した。この前精原細胞の死滅の原因は、 $\gamma$ 線照射によるDNA損傷だけではなく、何らかの他の要因も関与している可能性が考えられる。

(2) 成体の精子形成では、炎症反応は一酸化窒素を介して精細胞のアポトーシスを含む精巣機能の制御に影響している。放射線被ばくは慢性的な炎症を引き起こすことが報告されている。近年、無菌性の自然炎症を制御する分子複合体としてインフラマソームが注目され、動脈硬化等の疾病への関与が報告されている。インフラマソームは、危険シグナルに応じて細胞内で形成されるタンパク質複合体であり、炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ を成熟化させ、炎症反応を惹起する。またインフラマソーム形成は、細胞死の誘導や、DNA損傷修復経路の阻害にも関与することが報告されており、 $\gamma$ 線照射後の前精原細胞の死滅に関与している可能性も否定できない。

(3) 精巣器官培養法の確立により、幼若期マウスから回収した精巣片をアガロースゲルやメンブレンフィルター上で培養し精子を得られるようになった。この精巣器官培養法を利用すれば、 $\gamma$ 線を照射したときと同様の細胞応答(DNA損傷や炎症)を独立して再現し、前精原細胞への $\gamma$ 線の影響を詳細に観察できるかもしれない。

## 2. 研究の目的

本研究では、炎症が $\gamma$ 線照射後の前精原細胞の特徴的な死滅に関与するかどうかを検証することを目的とし、以下の実験を行った。

(1) 胎仔期後半の雄マウス前精原細胞において、放射線感受性がどのように変化するかを検討した。

(2) インフラマソーム構成分子欠損マウスを用いて、 $\gamma$ 線照射後の生殖細胞の生存性や精子形成の有無を検討した。

(3) 精巣器官培養法を用いて、DNA損傷や炎

症を独立して再現したとき、精巣片の発達や生殖細胞の生存性にどのような影響があるかを検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス前精原細胞における放射線感受性の変化

マウス前精原細胞が放射線抵抗性を獲得する時期を特定するために、妊娠15.5-18.5日目の妊娠マウスおよび生後0日目の雄マウス新生仔の全身に、 $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ 線を約660 mGy/minの線量率で集積線量が2 Gyになるまで照射した。 $\gamma$ 線を照射した雄マウス(胎仔および新生仔)を10週齢まで飼養した後、実験に用いた。回収した精巣は重量を測定後、直ちにブアン液で固定し、パラフィン切片法によりヘマトキシリン-エオシン染色標本を作製し、精巣最大径の部分の精細管数を測定した。

### (2) インフラマソーム構成分子欠損マウスにおける $\gamma$ 線照射後の精子形成

インフラマソームの全身性抑制制御が $\gamma$ 線照射後の精巣の発達・前精原細胞の生存性・精子形成能に及ぼす影響を検討するために、インフラマソーム構成分子(アダプター分子:ASC)欠損マウス同士を交配させ、妊娠16.5日目のマウスに2 Gyの $\gamma$ 線を照射した。得られた雄マウスを10週齢まで飼養後、回収した精巣からヘマトキシリン-エオシン染色標本を作製した。

### (3) 前精原細胞への $\gamma$ 線の影響: 精巣器官培養による検討

炎症反応と前精原細胞の死滅の関連性を検討した。妊娠16.5日目のマウスから回収した雄マウス胎仔を実験に用いた。雄マウス胎仔から精巣を採取後、アガロースゲル上のせ、培養を開始した(34°C、5% CO<sub>2</sub>)。1週間に1回、全量の培養液を交換しながら少なくとも4週間培養を継続した。 $\gamma$ 線を照射したときと同様の細胞応答(DNA損傷や炎症)を再現するために、以下の実験群を設けた。

① DNA損傷のみを再現するために、精巣器官培養開始時にDNAの二重鎖切断を誘起するブレオマイシンで90分間処理し、その後、上記の培養条件で培養した。

② 炎症反応のみを再現するために、バクテリアエンドトキシン(リポ多糖:LPS)を終始培養液に添加し、培養した。

## 4. 研究成果

### (1) マウス前精原細胞における放射線感受性の変化

胎齢15.5-18.5日目および生後0日目の雄マウスに $\gamma$ 線を照射後、10週齢まで飼養したときの精巣重量は27.4-126.9 mgとなり、非照射対照区(215.7 mg)と比較して有意に低い値となった。一方、胎齢15.5-17.5日目に $\gamma$ 線を照射したマウスの精巣重量(27.4-37.3 mg)は、胎齢18.5日目および生後0

日目に $\gamma$ 線照射したマウス（122.7–126.9 mg）と比較して極端に低い値となった。この結果から、形態的には同じ前精原細胞であっても胎齢 17.5–18.5 日を境に放射線感受性が大きく変化することが明らかとなった。

精巣最大径の部分の精細管数は、精巣重量と同様に $\gamma$ 線照射により有意に減少した。また特に精巣の発達を阻害された胎齢 15.5–17.5 日目に $\gamma$ 線を照射したマウスでは、観察された精細管のうち 3–14%の精細管でのみ精子形成が認められた。一方、胎齢 18.5 日目および生後 0 日目に $\gamma$ 線照射したマウスの精巣内では 92–94%の精細管で精子形成が認められた。

次に胎齢 16.5 日目に $\gamma$ 線を照射後、経時的に精巣を回収・固定し、前精原細胞の数がどのように推移するかを観察した。その結果、 $\gamma$ 線が照射を受けた後、前精原細胞はすぐには死滅せず、生後 3 日目（ $\gamma$ 線照射後 6 日目）でアポトーシス様の形態学的変化を呈することが明らかとなった。

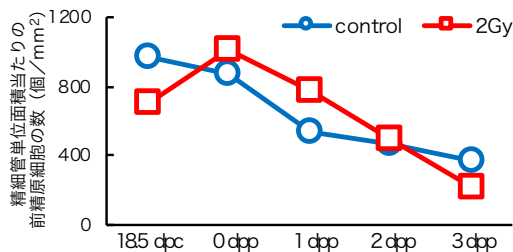


図1.  $\gamma$ 線照射後の精巣における前精原細胞数の変動

## (2) インフラマソーム構成分子欠損マウスにおける $\gamma$ 線照射後の精子形成

胎齢 16.5 日目で $\gamma$ 線を照射された雄マウスの精巣において、炎症が起きているかどうかを確かめるために、炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  および IL-6 とインフラマソーム構成分子である NLRP3 および CASP1 の mRNA 発現量を定量した。 $\gamma$ 線照射から 1 日後の胎齢 17.5 日目では、同時期の非照射対照区と比較して、IL-1 $\beta$  の mRNA 発現量は 1.6 倍に増加し、生後 1 および 4 日齢にかけて 1.2–1.5 倍で推移した。また IL-6 の mRNA 発現量は生後 1 日目で非照射対照区の 3.4 倍になった。一方、NLRP3 の mRNA 発現量は生後 4 日齢までの間、大きな変化は見られなかったが、CASP1 の mRNA 発現量は生後 1 および 4 日齢で非照射対照区の 2 倍

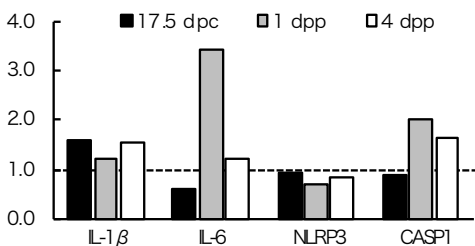


図2.  $\gamma$ 線照射後の精巣における mRNA 相対的発現量の変化（非照射対照区を 1 とする）

および 1.6 倍になった。この結果は、 $\gamma$ 線照射後の精巣において、生後 3 日齢でアポトーシス様の前精原細胞が見られた上記の結果と一致し、 $\gamma$ 線照射後の精巣内で炎症が起きていることを示している。

次に ASC 欠損マウスを用いて、インフラマソームの全身性抑制制御が $\gamma$ 線照射後の前精原細胞の生存性および精子形成能に及ぼす影響を検討した。 $\gamma$ 線を照射後、10 週間まで飼養した ASC 欠損マウスから回収した精巣上部尾部には精子は認められなかった。また精巣から作製した組織切片を観察したところ、ほとんどの精細管内で生殖細胞は見られず、1 層のセルトリ細胞が観察できるだけであった。また一部の精細管では精子形成が認められたが、その頻度は低く、野生型マウスに $\gamma$ 線を照射したときと同様の頻度であった。この結果は、炎症が $\gamma$ 線照射後に見られる前精原細胞の死滅に及ぼす影響は極めて小さいことを示している。

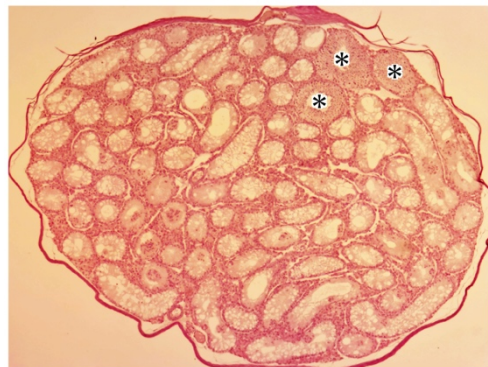


図3.  $\gamma$ 線を照射された ASC 欠損マウスの精巣 (\*: 精子形成が認められる精細管)

## (3) 前精原細胞への $\gamma$ 線の影響：精巣器官培養による検討

胎齢 16.5 日目の雄マウス胎仔から回収した精巣の器官培養では、4 週間の培養で精巣片は順調に発達し、精細管内に一次精母細胞が観察された（図 4）。一方、 $\gamma$ 線を照射した胎齢 16.5 日目の雄マウス胎仔の精巣を 4 週間培養したとき、精巣の発達は明らかに悪く

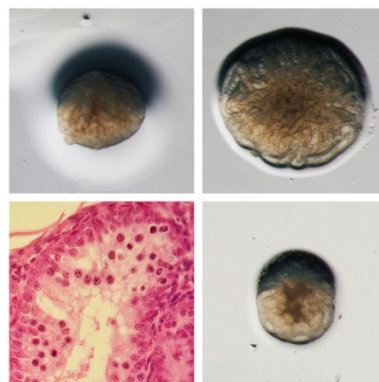


図4. 精巣器官培養

上段左：培養前

上段右：4 週間培養後

下段左：精細管内の一次精母細胞

下段右： $\gamma$ 線照射後の精巣（4 週間培養後）



なった。精巣の器官培養中に DNA 損傷や炎症を再現すると、ブレオマイシンや LPS の濃度依存的に精巣の発達が悪くなった (図 5)。特に LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ ) を培養液に添加したとき、精巣片の中央部が黒くなり、精細管の構造がはっきりしなくなった。この結果から、DNA 損傷だけでなく炎症も精巣の発達に悪影響を及ぼすことが明らかとなった。

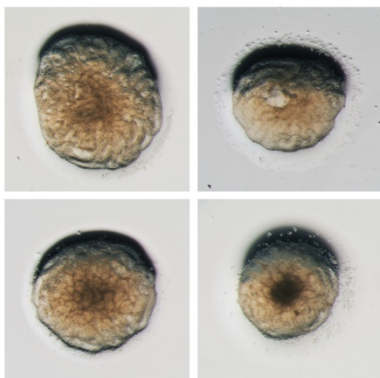


図5. DNA損傷と炎症が精巣発達に及ぼす影響  
 上段左: 5  $\mu\text{g/ml}$  ブレオマイシン  
 上段右: 50  $\mu\text{g/ml}$  ブレオマイシン  
 下段左: 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS  
 下段右: 10  $\mu\text{g/ml}$  LPS

以上のように、精巣器官培養は胎仔期の精巣や前精原細胞への毒性試験に有効である。一方で、培養中の精巣片は中央部が盛り上がったドーム型となる。その結果、精巣片の中央部の発育が悪くなり、精巣器官培養による生殖細胞の生存性の評価が難しくなる。この精巣片中央部の発育不良は、培養中の精細管が重なり合うことで酸素不足になっていることが原因だと考えられる。そこで当初の予定を変更して、精細管の重なりを軽減することで精巣器官培養法の改良を試みた。

精細管の重なりを軽減するために、培養中の精巣片を上から押さえ、人為的に扁平化した。精巣片にカバーガラスをのせて培養したところ、培養開始後 24 時間で精細管の輪郭が不明瞭になった。一方、ガス透過フィルムを用いたところ、精巣片は順調に発達し、培養開始から 4 週間経過した後でも精巣片の広範囲にわたって明瞭な精細管が観察できた (図 6)。また従来法で培養した精巣片と同様に、精細管内には一次精母細胞が観察された。さらに LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ ) を培養液に添加したとき、上記の実験と同様に、精巣・精細管の発達が悪くなることが確認できた。

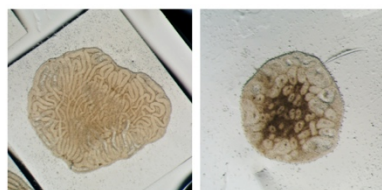


図6. ガス透過フィルムを用いた精巣器官培養  
 左: 非照射対照区 (Control)  
 右: 10  $\mu\text{g/ml}$  LPS

培養終了後の精巣片から細胞懸濁液を作製し、全細胞数に対する生殖細胞数の割合を算出したところ、ガス透過フィルムをのせて培養した精巣片で 6.8%であり、従来の方で培養した精巣片 (8.8%) と同等の値を示した (表 1)。この結果から、精巣片上にガス透過フィルムをのせて培養することで、精巣片の広範囲にわたって精細管の構造を維持したまま培養できることが明らかとなった。

表1. 精巣器官培養後の生殖細胞数の割合

培養法	Group	総細胞数	生殖細胞数	総細胞数/ 生殖細胞数
従来法	Control	1338	118	0.088
ガス透過フィルム	Control	2001	137	0.068
ガス透過フィルム	LPS (1 $\mu\text{g/ml}$ )	1087	81	0.075

以上の結果から、前精原細胞の放射線感受性は胎齢 17.5–18.5 日を境に大きく変化することが明らかとなった。また、炎症が  $\gamma$  線照射後の前精原細胞の死滅に関与している可能性は低いものの、幼若期精巣の発達には悪影響を及ぼすことが明らかとなった。この点はまだ不明な点が多く更なる検討が必要である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Watanabe H, Kohda A, Komura JI, Tateno H. Preservation of chromosomal integrity in murine spermatozoa derived from gonocytes and spermatogonial stem cells surviving prenatal and postnatal exposure to  $\gamma$ -rays in mice. *Mol Reprod Dev*, 2017, 84, 638–648.  
DOI: 10.1002/mrd.22832

[学会発表] (計 1 件)

- ① Shimizu T, Yura R, Miyamoto A, Tateno H, Watanabe H, Lipopolysaccharide exposure to spermatozoa affects embryo development in mice, Fourth World Congress of Reproductive Biology, 2017年9月27–29日、沖縄県

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡部 浩之 (WATANABE, Hiroyuki)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90608621