

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K11637

研究課題名(和文)放射線照射が精子受精能に与える影響：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 fertilizability of spermatozoa exposed to gamma-rays

研究代表者

渡部 浩之(WATANABE, Hiroyuki)

帯広畜産大学・畜産学部・講師

研究者番号：90608621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、線照射後に生産された精子の運動性やDNA正常性を調べるとともに、断続的な炎症が精子形成および精子性状に及ぼす影響を検討することである。新生仔への線照射は、その後生産される精子の運動性に影響しなかったが、精子DNAダメージを増加させた。リポ多糖の投与により断続的な炎症を誘起したとき、精子の運動性やDNA正常性に悪影響は見られなかった。一方で、リポ多糖投与による炎症は、体外受精後の受精率を低下させ、胚発生も阻害した。以上、新生仔期に線照射された雄マウスの精子にはダメージが蓄積されており、精巣における断続的な炎症は精子受精能を低下させる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで放射線の影響はDNA損傷に起因する細胞死に主眼が置かれ論じられてきた。一方、予備研究において、新生仔期に線を照射した雄マウスから回収した精子を体外受精に使用したとき、受精率が低下することが明らかとなった。本研究課題では、線照射後に生産された精子に生じた変化を特定し、線照射時に起きる炎症が精子の受精能やその後の胚発生成能に及ぼす影響を明らかにした。これら一連の成果は雄性生殖細胞が被る放射線影響の発生機序の解明に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, analyses of motility and DNA integrity of sperm collected from male mice after γ -ray irradiation were performed. In addition, the effect of inflammation during spermatogenesis on the viability of germ cells and sperm characteristics was investigated. Irradiation with γ -ray to the neonatal mice (2-14 days of age) affected DNA integrity of sperm, whereas there was no effect on the sperm motility. When the oocytes were fertilized in vitro with spermatozoa collected from male mice that were induced continuous inflammation by LPS administration, the rate of fertilization was lower than that of IVF eggs in the control group. Embryonic development of IVF eggs using LPS-administrated male was also impaired after the 4-cell stage. These results demonstrated that spermatozoa derived from male mice irradiated with γ -ray at the neonatal stage accumulated DNA damages. There was a possibility that continuous inflammation in testis decreased the fertilizability of spermatozoa.

研究分野：生殖生物学

キーワード：精子形成 炎症 放射線 DNA損傷 受精

1. 研究開始当初の背景

平成23年3月11日に発生した「福島第一原子力発電所の放射能漏れ事故」以来、放射線・原子力に対する国民の関心は非常に高まっている。ベルゴニー・トリポンドーの法則によれば、放射線の生体組織への影響は、細胞分裂頻度が高いほど、形態・機能が未分化なほど、将来行われる細胞分裂の回数が多いほど、強く現れる。一方で生殖細胞への放射線の影響は未解明な部分も多く、特に幼若期（胎仔や新生仔）に被ばくした場合、生殖細胞がどのような影響を受けるのかは明らかになっていない点が多い。

このような背景の下、申請者が行った予備実験によって、マウス新生仔に γ 線を照射したとき、性成熟後の個体から回収した精子の染色体には明らかなダメージは蓄積されていないが、体外受精後の受精率が低下することが明らかとなった。この γ 線照射後2ヶ月以上たって現れる『晩発性』の影響は今まで報告されておらず、精子が γ 線からどのような影響を受けた結果、受精能力が低下したのかは明らかになっていない。

放射線被ばくは慢性的な炎症を引き起こす。炎症反応は一酸化窒素（NO）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。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、放射線照射後の炎症への関与も報告されている。本研究では『 γ 線照射後のインフラマソームに起因する炎症が精子受精能低下を引き起こす』という仮説をたてた。

2. 研究の目的

γ 線照射後に見られた精子の受精能の低下は、新生仔期に受けた γ 線の影響が性成熟後に現れ、精子に何らかの変化をもたらした結果であると推察される。本研究では、新生仔期に γ 線を照射された雄個体から回収した精子にどのような変化が生じたかを明らかにするとともに、断続的な炎症が精子形成能および精子性状に及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 精子の回収・凍結保存

雄マウス新生仔の全身に、 ^{137}Cs γ 線を急照射および緩照射した。急照射では、生後4日および11日目の雄マウスに約660 mGy/minの線量率で集積線量が2 Gyになるまで照射した。また緩照射、生後2-7日および9-14日目の雄マウスに400 mGy/22 h/day (0.303 mGy/min) の線量率で集積線量が2 Gyになるまで照射した。 γ 線を照射した雄マウスを10週齢まで飼養した後、精巣および精巣上体を回収した。

8週齢の雄マウス腹腔内に0.3 ml生理食塩水に溶解したリポ多糖（LPS：0.5 mg/kg体重）を96時間間隔で投与した。対照群には等量の生理食塩水を投与した。その後、24時間ごとに体重測定を行い、初回の投与から40日後に精巣および精巣上体を回収した。

精巣上体から精子を回収後、R18S3液内に懸濁し、0.25 mlストローに封入した。その後、実験に使用するまで液体窒素中で保存した。

(2) 精子の運動解析・尾部の波形解析

10 μm 厚チャンバー内を遊泳している精子のイメージシーケンスを取得し（120フレーム/秒）、ImageJを用いて各画像における精子頭部の位置情報（座標）を記録した。記録した座標

から直線経路・曲線経路・平均経路を求め、各々の移動速度（直線速度：VSL、曲線速度：VCL、平均速度：VAP）を算出した。なお、平均経路は10フレームの移動平均から求めた。

同様のイメージシーケンスから繊毛・鞭毛運動解析用ソフトウェア Bohbohを用いて精子尾部の波形解析を行った。

(3) 精子DNA損傷度の定量化

精子をアガロースゲルに包埋、スライドガラス上に塗布した後、アルカリコメットアッセイ法により精子DNA 損傷の定量化を行った。

(4) 遺伝子発現解析

回収した精巣から mRNA を抽出し、逆転写後、IL-1 β ・Nlrp3・Ddx4 遺伝子の発現量を real-time PCR 法により定量した。

(5) 受精卵の作製

過剰排卵処置を施した雌マウスから成熟卵子を回収した。放射線照射および LPS 投与された雄から回収した精子を用いて、常法に従い体外受精または顕微授精により受精卵を作製した。顕微授精により作出した受精卵は、漸進固定空気乾燥法により第一卵割中期の染色体標本を作製し、染色体異常率を算出した。体外受精により作出した受精卵は、媒精後 120 時間目まで培養し、発生率を算出すると同時に発生スピードの観察を行った。

4. 研究成果

(1) 新生仔期に放射線照射された雄から回収した精子の運動性と DNA 正常性

生後 2-14 日目に γ 線を急照射および緩照射した雄マウスから回収した精子の運動解析を行った（図 1）。VCL が 10 $\mu\text{m}/\text{秒}$ 以上の精子を運動精子とみなし、解析に用いた。生後 4 日および 11 日目に γ 線を急照射したときの VSL は各々 14.08 および 15.66 $\mu\text{m}/\text{秒}$ 、VCL は 64.86 および 72.67 $\mu\text{m}/\text{秒}$ 、VAP は 36.79 および 42.40 $\mu\text{m}/\text{秒}$ となった。生後 2-7 日および 9-14 日目に γ 線を緩照射したときの VSL は各々 14.08 および 13.48 $\mu\text{m}/\text{秒}$ 、VCL は 66.20 および 65.26 $\mu\text{m}/\text{秒}$ 、VAP は 35.44 および 35.15 $\mu\text{m}/\text{秒}$ となった。また非照射対照群では VSL は 13.38 $\mu\text{m}/\text{秒}$ 、VCL は 63.66 $\mu\text{m}/\text{秒}$ 、VAP は 35.62 $\mu\text{m}/\text{秒}$ となり、放射線照射は精子の運動性に影響しなかった。さらに精子尾部の波形解析を行ったが、放射線照射群と非照射対照群の間に明確な違いは見られなかった。

生後 2-14 日目に γ 線を急照射および緩照射した雄マウスから回収した精子の DNA 損傷の度合いを調べるためにコメットアッセイを行った（図 2）。非照射対照群では、Tail length が 10（任意単位、以下同）以下の位置に頂点があるのに対し、放射線照射群では照射時期・線量率に関わらず、ヒストグラムの頂点が 40 から 80 の間に移動しており、放射線による精子DNA の損傷が確認され

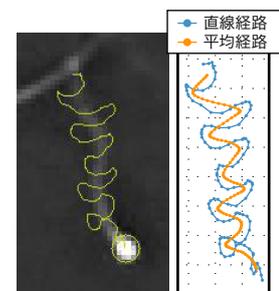


図 1. 精子頭部の軌道

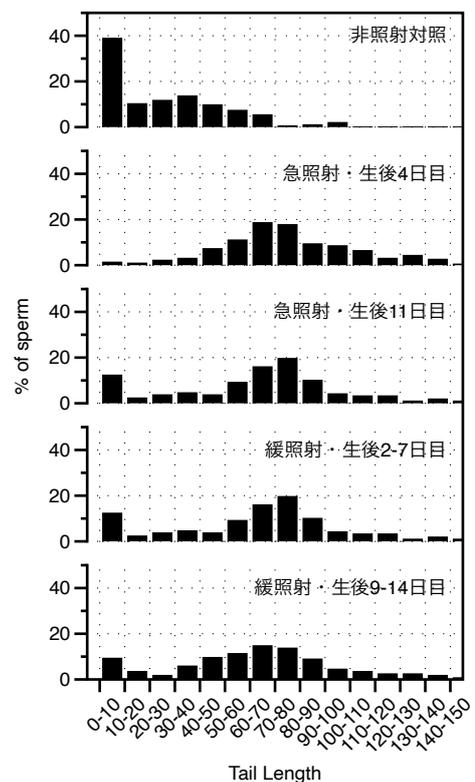


図 2. 新生仔期に γ 線照射された雄から回収した精子の DNA 正常性

た。全精子数に占める Tail length が 20 以下の精子の割合は、生後 4 日および 11 日目に γ 線を急照射した精子では 2.5% および 9.9% となり、生後 2-7 日および 9-14 日目に γ 線を緩照射した精子では 15.4% および 13.3% となった。一方非照射対照群では、Tail length が 20 以下の割合が 49.1 % であった。また、各群の Tail length の平均値は、非照射対照群で 21.3、生後 4 日および 11 日目に γ 線を急照射したときでは 83.3 および 67.6、生後 2-7 日および 9-14 日目に γ 線を緩照射したときでは 63.4 および 66.4 となり、放射線照射により Tail Length の値が高くなる傾向が見られた ($P = 0.0663$)。

生後2-14日目に γ 線を急照射および緩照射した雄マウスから回収した精子を用いて作出した体外受精卵の染色体異常率は2.2-6.0%であり、非照射対照群 (2.5%) と同程度であることが報告されている (Watanabe et al., Mol. Reprod. Dev. 2017)。しかし、体外受精では卵子内に侵入する精子は自然に選抜されるため、染色体異常率が過小評価される恐れがある。そこで顕微授精によって作出された受精卵の染色体分析を行った。生後4日目に2 Gyの γ 線を急照射した精子を顕微授精に使用したときの構造的染色体異常率は5%となり、通常の体外受精で見られた染色体異常率と同程度であった。

(2) LPS を腹腔内投与された雄から回収した精子の運動性、DNA 正常性と受精能

精子形成の期間中、断続的に炎症が起きたときの影響を調べるために、雄マウスの腹腔内に LPS を 96 時間間隔で投与した。LPS 投与翌日に体重の減少が見られたが、投与の回数を重ねるごとに体重の減少幅は小さくなり、8 回目以降の投与では体重の減少はほとんど見られなかった。

精巣における炎症性サイトカインである IL-1 β の mRNA 発現量は、LPS 投与後に大きく上昇し、投与後 24 時間で対照群の 3.9 倍となった。投与後 72 時間で対照群と同程度となった。初回の投与から 40 日後の精巣における IL-1 β 相対発現量では、対照群と LPS 投与群の間に有意な差は見られなかった。一方で、インフラマソーム構成分子である Nlrp3 相対発現量では、LPS 投与群が対照群の約 2.8 倍となり、有意に高くなった ($P < 0.05$)。生殖細胞に特異的に発現する Ddx4 相対発現量においても、LPS 投与群が対照群に比べ有意に高くなった ($P < 0.05$)。

LPS を 96 時間間隔で投与した雄から回収した精子の運動解析を行った。対照群および LPS 投与群の VSL は各々 8.28 および 8.32 $\mu\text{m}/\text{秒}$ 、VCL は 52.09 および 50.87 $\mu\text{m}/\text{秒}$ 、VAP は 25.76 および 26.89 $\mu\text{m}/\text{秒}$ となり、LPS 投与は精子の運動に影響しなかった。

コメットアッセイによる精子 DNA 損傷の定量では、全精子数に占める Tail length が 10 以下の精子の割合は、対照群および LPS 投与群で各々 24.6% および 16.3% となったが、放射線照射した精子で見られたようなヒストグラムの頂点のずれは見られなかった (図 3)。

LPS を 96 時間間隔で投与した雄から回収した精子の受精能とその後の胚発生能を調べた。体外受精後の受精率は対照群で 58.6% であったのに対し、LPS 投与群で 11.6% となり、LPS 投与により低くなった。また作出された受精卵の発生は図 4 のようになり、LPS を投与することにより胚発生率が低下した。胚盤胞まで発生した胚の発生動態を調べたところ、対照群では第

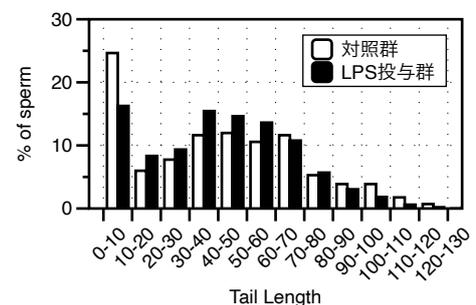


図 3. LPS を投与された雄から回収した精子の DNA 正常性

一卵割は媒精後 17 時間 33 分、第二卵割は 40 時間 47 分で完了し、第三卵割は 52 時間 5 分から始まった。一方、LPS 投与群での発生動態は発育した胚が少なかったものの、対照群と同様の発生スピードだった。

以上の結果から、新生仔期に γ 線を照射された雄マウスの精子にはコメットアッセイで検出される何らかのダメージが蓄積されており、これが受精能低下に関与している可能性が考えられた。また、精子形成中に起きた断続的な炎症は精子受精能を低下させる可能性が示された。

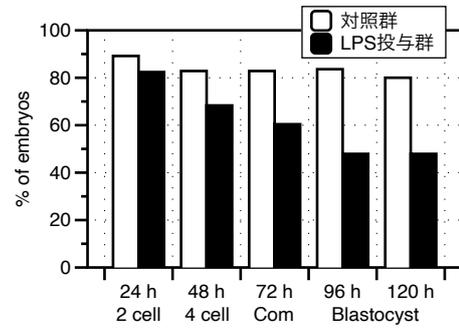


図 4. LPS を投与された雄から回収した精子由来受精卵の発生

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiroyuki Watanabe, Hiroshi Suzuki	4. 巻 38
2. 論文標題 Morphokinetic analysis of development to the morula of mouse embryos fertilized in vitro using an incubator with time-lapse cinematography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Mammalian Ova Research	6. 最初と最後の頁 61-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 尾島沙来、渡部浩之
2. 発表標題 マウス精巣での炎症が精子形成能および受精能に及ぼす影響
3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------