

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592379

研究課題名(和文) DNA修復欠損マウス精巣変性状態におけるゲノムの質の低下した精子形成の解析

研究課題名(英文) Analysis of spermatogenesis with reduced quality of the genome in degenerate testis of DNA repair-deficient mice

研究代表者

中根 裕信 (NAKANE, Hironobu)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：10304205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：A群色素性乾皮症(XP)遺伝子(Xpa遺伝子)を欠損したXpa遺伝子欠損マウス(Xpaマウス)は、XP患者の精子形成不全を示し、XPの病態モデルとなる。我々は、Xpaマウス精巣の精巣幹細胞が、精巣変性状態に適応し、ゲノムの質は低下しても精子形成を継続できると考えている。これまでに得た遺伝子発現解析から、DNA修復、細胞周期、細胞死に関わる遺伝子の発現異常が検出されたので、Real-time PCRと免疫染色で試したが、発現異常は見られなかった。しかしながら、精巣変性に関わる新たな病態が見いだせ、今後の病態解明につながるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：We have showed that xeroderma pigmentosum group A (Xpa) gene-knockout mice [Xpa (-/-) mice] provide a valuable model for impaired spermatogenesis as well as for UV-induced skin tumors in XPA patients. Gene expression analysis of each aged Xpa mice testis showed a different expression pattern of DNA repair gene, cell cycle-related gene(checkpoint), apoptosis-related gene compared to control. We tried to check the different expression pattern of these genes by Real-time PCR and immunohistochemistry. We did not detected these difference of these genes by the above methods. However, we found other pathology of vacuole formation in the aged Xpa mice testis. These findings will help us to understand the impaired spermatogenesis in the Xpa mice.

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：アンドロロジー

キーワード：DNA修復欠損マウス 精子形成 精巣変性状態 ゲノム不安定性

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA 修復欠損マウス(Xpa マウス)が加齢と共に進行性の精子形成不全を示した。

Xpa マウス精巣の遺伝子発現解析から、DNA 修復、細胞周期(チェックポイント)、細胞死に関わる遺伝子発現も低下し、修復異常等が考えられた。さらに、これら遺伝子発現異常を示す時期の Xpa マウス精巣病変を精細管のステージも考慮して調べたところ、精巣変性状態と精子形成の継続が混在した病変が見られた。

(2) 生殖補助技術(ART)では、精子ゲノムの質の維持が重要であり、そのゲノム維持機構の解明が待たれている。また特発性造精不全の病態にも関わる可能性もある。

2. 研究の目的

本研究は、精子ゲノムの質の低下を生じる精巣病態を解明するために、Xpa マウス精巣変性状態での精子形成を継続する精細管に着目し、Xpa マウス精巣と精子の解析を行う。精巣病変は、病理組織学的に検索し、同時に網羅的解析を用いて機能異常も併せて解析する。これまでの解析から、Xpa マウス精巣の精巣幹細胞が、精巣変性状態[ゲノム不安定性]に適応かつ生存し、ゲノムの質は低下(DNA 損傷を持ったまま)しても精子形成を継続できることが病態としてあるという仮説を持っている。これら精巣変性状態下の精子形成は、正常と質的に異なる精巣幹細胞によって行われる可能性があり、本研究は上記仮説を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

Xpa マウス精巣病変の DNA 修復異常・幹細胞機能不全を検索するため、既に得た 3,6,12 ヶ月令 Xpa マウス精巣の遺伝子発現解析の結果を基に、種々の DNA 修復系、checkpoint 系、精原細胞・Sertoli 細胞の特異的発現等の遺伝子発現を調べた。サンプル数が十分ではないために結論が出せていないので詳細は控えるが、検索した遺伝子は、DNA 修復 [ヌクレオチド除去修復、塩基除去修復、複製後修復等に関わる遺伝子]、チェックポイント関連遺伝子、幹細胞関連遺伝子等で、いずれも雄性不妊や精巣変性に関与するものを選び検索した。

凍結保存した精巣組織は、マルチピースシヨッカー (YASUI KIKAI) で破碎し、RNA は RNeasyPlus mini kit (Quiagen) で精製し、各サンプルを Agilent2100 パイオアナライザ(アジレント・テクノロジー) で RNA の質を調べた。RNA の変性のないサンプルを用いて、上記の各検索遺伝子ごとに TaqMan probe を作成し反応の最適化を確認し、ABI 7900HT にて Real time PCR を行った。各サンプルごとに、最低でも 3 回は Real time PCR を行いデータの再現性を確かめた。

4. 研究成果

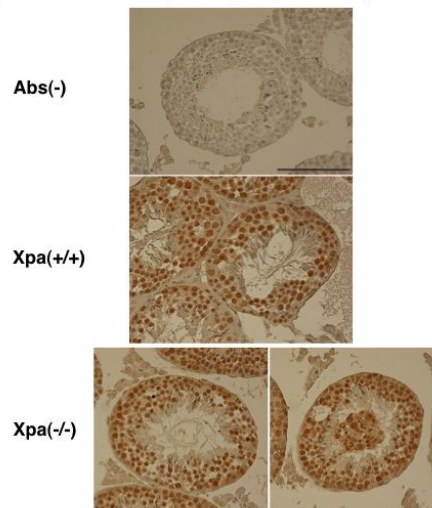
現時点で、3、6 ヶ月令 Xpa(+/+), Xpa(-/-) マウス精巣で各時期・遺伝子型の精巣を 2 匹分の解析は終了した。残念ながら、上記の方法で遺伝子発現解析の各遺伝子発現の差を確認できなかった。さらに、個体数を増やし解析しようとした矢先に、冷凍庫が故障し保存サンプルでの解析ができなくなった。現在、サンプル採取を再度行い上記実験系で確認中である。

また同時に、各遺伝子産物に対する抗体、特にリン酸化蛋白質認識抗体を用いて、各時期の精巣を免疫組織法で検索したが、各遺伝子発現の差を確認できなかった。この方法は、少量の初期の変性細胞をも同定するために有用であると考え実施したが各遺伝子型精巣間での差は見られなかった。さらに精巣変性もあったのでアポトーシス関連蛋白質の変化も同法で確認したが、差を確認できなかった。二本鎖 DNA 切断の修復異常でも精子形成不全が生じるので、3 ヶ月令 Xpa マウス精巣で二本鎖 DNA 切断時に活性化されるリン酸化された H2AX(Ser139)の認識抗体で検討してみたが、下の組織像に示すように精上皮の空胞の大小でも、精細胞の免疫染色性の顕著な差は見られなかった。このことから、Xpa マウスの精子形成不全は二本鎖 DNA 切断の修復異常ではないと考えられた。

我々は、Xpa(-/-)マウスの精巣変性について調べたところ、各精細管の精上皮に形成される空胞の数とサイズの変化があり、未知の病態が関与していることが予想できた。

上記の実験過程で、今回解析した種々の遺伝子に発現の変化がなくても、空胞化変性に関与し、その変性過程で精子ゲノムの質が低下しうる新たな病態を見いだせた。今後、この病態解析を通じて Xpa マウス精巣の病態解明が進むと考えている。

Phospho-Histone H2A.X(Ser139) in 3-months Xpa mice testis



Phospho-Histone H2A.X(Ser139) immunohistochemistry was done with anti-Phospho-Histone H2A.X (Cell Signaling) at a dilution of 1/500 by antigen retrieval [C. A. Midgley, et al., J. Cell Sci. 101, 183 (1992)]. The Histofine SAB-PO(R) Kit(Nichirei) was used for visualization of primary antibody binding. Sections were counterstained with hematoxylin. We confirmed all pathological changes using at least 3 mice in this study. Magnification bar : 100µm

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)

An oblique ultrathin sectioning method to prevent the loss of biological suspensions.

Katsumoto T, Inaga S, Kameie T, Nakane H,

Naguro T, Kaidoh T

J. Electr. Microsc. Technol. Med. Biol.

Vol.27(2),(2013) in press 査読あり。

〔学会発表〕(計 8 件)

Histological analysis of impaired spermatogenesis in xeroderma pigmentosum group A gene (*Xpa*)-deficient mice

Hironobu Nakane, Kiyoji Tanaka, Toshio

Kameie, Sumire Inaga, Tomonori Naguro

第 34 回日本分子生物学会、平成 23 年 12 月

13-16 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Histological analysis of adipose tissues in *Xpg* null mice

Hironobu Nakane, Tadahiro Shiomi, Toshio

Kameie, Sumire Inaga, Tomonori Naguro

第 117 回日本解剖学会総会・全国学術総会、

平成 24 年 3 月 26-28 日、山梨大学(山梨県

甲府市)

“Mouse models of DNA repair and neurological disease -Insight from neuropathology of DNA repair-deficiency disorders-”

Hironobu Nakane,

リエゾンラボ研究会(招待講演)、平成 24 年

4 月 28 日、熊本大学発生医学研究所(熊本県

熊本市)

コケイン症候群モデル動物における腎臓の解析

中根裕信

CS 研究報告会、平成 25 年 2 月 2 日、国立成育医療研究センター(東京都世田谷区)

Histological examination of impaired spermatogenesis in xeroderma pigmentosum group A gene (*Xpa*)-deficient mice

Hironobu Nakane, Kiyoji Tanaka, Toshio

Kameie, Sumire Inaga, Tomonori Naguro,

Toshiyuki Kaidoh

第 118 回日本解剖学会総会・全国学術総会、

平成 25 年 3 月 28-30 日、香川大学医学部(香

川県高松市)

Immunohistochemical evaluation of impaired spermatogenesis in xeroderma pigmentosum group A gene (*Xpa*)-deficient mice

Nakane, H., Tanaka, K., Kameie, T., Inaga,

S., Naguro, T., Kaidoh, T.

第 36 回日本分子生物学会年会、平成 25 年 12

月 3-6 日、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

コケイン症候群モデル動物における腎臓の解析

中根裕信

CS 研究報告会、平成 26 年 2 月 1 日、国立成

育医療研究センター(東京都世田谷区)

Histopathological analysis of kidney in *Xpg* null mice

H Nakane, T Shiomi, T Kameie, S Inaga,

T Naguro, T Kaidoh

The International Symposium on

Xeroderma Pigmentosum and Related

Diseases: Disorders of DNA Damage

Response -Bench to Bedside-, March 5-7,

2014, Kobe International Conference

Center (Kobe, Hyogo)

〔図書〕(計 1 件)

Mitochondria form continuous intracellular network-structures visualized with high-resolution field-emission scanning electron microscopy

T. Naguro, H. Nakane, and S. Inaga

Scanning Electron Microscopy for the Life Sciences (Series: Advances in Microscopy and Microanalysis), Cambridge University Press, p50-70, 2013

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中根 裕信 (NAKANE Hironobu)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：10304205

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし