

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870027

研究課題名(和文)放射線被ばくが雄性生殖細胞に及ぼす遺伝的リスクの評価

研究課題名(英文)Chromosomal risk of male germ cells in juvenile mice exposed to gamma-ray

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、幼若期マウス雄性生殖細胞の放射線感受性に及ぼす放射線照射時期と線量率の影響を調査することである。高線量率で前精原細胞期にガンマ線2 Gyを照射したとき、10週齢まで飼育した後の精巣重量は減少し、不妊となった。一次精母細胞における多価染色体出現率は高線量率で精原幹細胞期にガンマ線照射したときに高くなった。一方で、いずれの照射時期・線量率においても精子染色体異常の増加は見られなかった。以上の結果から、マウスの前精原細胞は放射線感受性が高いが、照射後に生産された精子にはダメージは蓄積していない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 radiation dose rate and irradiation period on radiosensitivity of male germ cells in juvenile mice. When gonocytes (day 16.5 post-coitus) were exposed to γ -ray at 2 Gy with high dose-rate, testicular weight was reduced at 10 weeks of age and no spermatozoa were found in the epididymis, leading to sterility at reproductive age. Percentage of primary spermatocytes with multivalent chromosomes was high in the group of spermatogonial stem cells (day 11 post-partum) exposed to γ -ray with high dose-rate. When the first mitotic chromosomes of in vitro fertilized zygotes were analyzed, the incidence of spermatozoa with chromosomal aberrations in any irradiation group was similar to that of the control group. These results suggested that gonocyte of mice had relative high radiosensitivity and that the risk for spermatozoa with chromosomal aberrations at any irradiation age and radiation dose-rate did not increase.

研究分野：生殖生物学

キーワード：放射線 精子 DNA損傷 前精原細胞 染色体

1. 研究開始当初の背景

放射線が照射されると細胞では DNA の二重鎖切断が誘起される。このとき、損傷により一部の細胞では細胞死を引き起こされるが、大部分の損傷は直ちに修復される。一方で、修復時に一定の割合でミスが起こり、染色体異常を持った細胞が作られる。この修復ミスが生殖細胞で起こった場合、その影響は次世代にまで及ぶことになる。

(1) 放射線の影響は、「集積線量」、「線量率」、「照射時期」により変動することが知られている。これらの中で集積線量の影響は古くから調べられており、高線量被ばくにより、その個体は不妊になることが分かっている。また、線量率や照射時期の影響も調べられているが、照射後に生産される配偶子の遺伝的安全性まで検討した報告は少なく、さらに「線量率」・「照射時期」の影響を合わせて検討した報告もほとんどされていない。

(2) DNA の二重鎖切断が誘起されると、切断部位のヒストン H2AX はリン酸化され (γ H2AX)、DNA 修復タンパク質と共同で DNA 損傷を修復する。精子自体には DNA 修復能が無いため、精子核 DNA の二重鎖切断は受精後の卵子内で行われる。すなわち、受精した卵子内での γ H2AX の検出により DNA 修復 (=DNA 損傷の程度) を可視化することが可能になる。この γ H2AX の検出と受精卵の染色体分析を組み合わせることで、精子核 DNA に対する放射線照射の影響をより正確に評価できるかもしれない。

(3) 放射線障害を継代的な観点から調査するには、障害 (DNA 損傷) の有無を調べた生殖細胞を用いて、その後の受精能・発生能を調べることが重要であるが、現在までのところ、技術的な問題によりそのような研究は行われていない。

2. 研究の目的

本研究では、雄性生殖細胞の放射線感受性を調べるとともに、放射線障害を継代的な観点から調査することを目的とし、以下の実験を行った。

(1) 胎仔期後半から新生仔期のマウスに異なる線量率で放射線を照射したときの雄性生殖細胞における放射線感受性を評価した。

(2) 受精時に卵子内で行われる精子核 DNA の修復量を可視化・定量する。また受精卵の第一卵割中期で行った精子染色体分析の結果と合わせて、放射線照射が雄性生殖細胞に及ぼす遺伝的リスクを評価する。

(3) 研究代表者が確立した「精子の受精前遺伝学的診断法」(引用文献①)を利用して放射線照射後のマウス精子に存在する精子核 DNA の異常を検出できるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 幼若期マウス雄性生殖細胞の放射線感受性：照射時期・線量率の影響

幼若期マウス雄性生殖細胞は、妊娠後期の胎

仔で前精原細胞と呼ばれるステージにあり、その後、生後 4 日目あたりで精原幹細胞へと分化する。すなわち 1) 前精原細胞期、2) 移行期、3) 精原幹細胞期に区別することができる。B6C3F₁を用いて、これらのステージの雄性生殖細胞に以下の条件で放射線照射を行った。

高線量率照射：胎齢 16.5 日目 (前精原細胞期)、生後 4 日 (移行期) および 11 日目 (精原幹細胞期) のマウスの全身に、¹³⁷Cs ガンマ線 2 Gy を 690 mGy/min の線量率で急照射した。

低線量率照射：胎齢 14.5-19.5 日 (前精原細胞期)、生後 2-7 日 (移行期) および 9-14 日 (精原幹細胞期) のマウスの全身に、¹³⁷Cs ガンマ線を 400 mGy/day の線量率で 5 日間連続照射し、集積線量を 2 Gy とした。

ガンマ線照射した雄マウスを 10 週齢まで飼養した後、実験に用いた。精巣上体尾部から精子を回収し常法に従いラフィノース・スキムミルク液 (R18S3 液) を用いて液体室素中に凍結保存した。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-エオシン染色標本作製した。また一部の精巣を細切し、生殖細胞を含む細胞懸濁液を回収した。得られた懸濁液をカリクレイン A (50 nM、2 時間) で処理することで早期染色体凝縮を誘導し (PCC)、カルノア液で固定後、一次精母細胞の染色体標本作製した。凍結精子を 37°C の温水中で融解した後、未受精卵に媒精し、体外受精卵を作製した。精子染色体を観察するために、第一卵割中期に漸進固定空気乾燥法にて固定し、染色体標本とした。

(2) 卵子内での精子核 DNA 修復の可視化

高線量率で移行期および精原幹細胞期の雄性生殖細胞にガンマ線照射した個体から回収した精子を用いて、受精後に卵子内で行われる精子核 DNA の修復を可視化した。上述のように凍結精子を融解し、卵細胞質内精子注入法 (ICSI) にて受精卵を作製した。ICSI 後 1.5 時間目に 1% パラホルムアルデヒドで固定し、FITC で標識された抗 γ H2AX 抗体で免疫染色した。核を DAPI にて対比染色し、共焦点顕微鏡で蛍光画像を取得した。Image J ソフトウェアを用いて精子核に占める DNA 損傷領域を算出した。また非照射の個体から採取した精子を対照群として使用した。

(3) 精子の受精前遺伝学的診断法による遺伝的ダメージの検出

10 週齢の雄マウスに高線量率でガンマ線 2 Gy を急照射し、その後回収した精子を液体室素中に凍結保存した。「精子の受精前遺伝学的診断法」によって、ガンマ線照射により受けた精子核 DNA ダメージを検出できるかを確かめた。すなわち、融解した精子を除核した未受精卵に顕微注入し、雄性発生卵を作出することで、精子核を人為的に複製、2 細胞期

まで発生させた。割球を単離し、賦活化センダイウイルスを用いてそれぞれの割球を新鮮な未受精卵に融合させ、PCCを誘導した。その後融合卵を漸進固定空気乾燥法にて固定・染色体標本を作製し、マルチカラー-FISH法により各染色体を同定した。各割球由来の染色体を分析し、片方の割球の染色体構成から他方の割球の染色体構成を予測できるかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) 幼若期マウス雄性生殖細胞の放射線感受性：照射時期・線量率の影響

① ガンマ線照射時のマウス精巣組織切片像を図1に示した。胎齢16.5日の精巣では精細管内腔に前精原細胞が分布しており、生後4日目になると少数の前精原細胞と基底膜上に精原幹細胞が確認できた。生後11日目では精原細胞は減数分裂を開始しており、一次精母細胞が多数観察できた。このようにガンマ線照射時の精巣内には、それぞれ異なる3種類のステージの生殖細胞が存在していた。

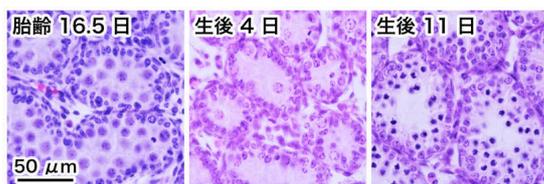


図1. ガンマ線照射時の精巣内生殖細胞

② 幼若期にガンマ線照射し10週齢まで飼育したマウスの精巣重量は、線量率と照射時期に大きく影響を受けた。精巣重量は、高線量率および低線量率で前精原細胞期にガンマ線を照射したとき(27.3および72.0 mg)、他のステージに照射したとき(164.1-211 mg)と比較して有意に低い値となった。

精巣最大径の部分の精細管数を測定したところ、線量率に関わらず前精原細胞期に照射したときに有意に低い値となった(図2)。また精子形成が行われている精細管の割合においても、前精原細胞期に照射したときに低くなった(3.1および44.2%)。

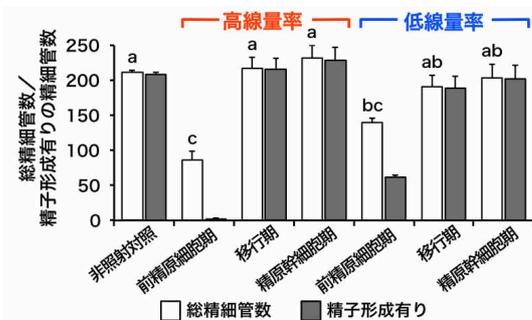


図2. ガンマ線照射後の精巣の発育

③ 幼若期にガンマ線照射し10週齢まで飼育したマウスの精巣内にある一次精母細胞の染色体分析を行った。相互転座により生じる鎖状4価・環状4価染色体(図3; 矢印)を異常としてカウントした。高線量率で精原幹

細胞に照射したとき、染色体異常率が5.7%となり、他の実験群と比較して(0.1-0.9%)有意に高い値となった。

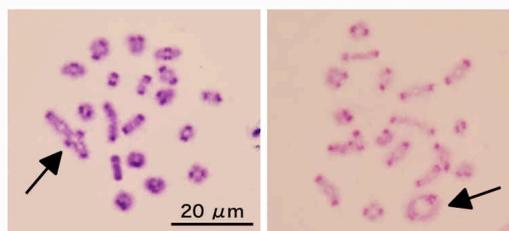


図3. 一次精母細胞の染色体異常

④ 幼若期にガンマ線照射した後、新たに作られた精子を用いて体外受精を行った。図2にも示されているように、高線量率で前精原細胞期に照射したとき、ほとんどの精細管で精子形成が認められず、精巣上部尾部から精子が回収できなかったため、この実験から除外した。高線量率で移行期・精原幹細胞期に照射した群および低線量率で前精原細胞期に照射した群で受精率が45.4-70.0%となり、低線量率で移行期・精原幹細胞期に照射した群(93.5および99.4%)と比較して有意に低くなった。なお、非照射対照群の受精率は96.4%であった(図4)。

第一卵割中期の染色体分析を行ったところ、精子染色体正常性は各実験群で96.3-100%であり、非照射対照群(99.0%)と差違は見られなかった。

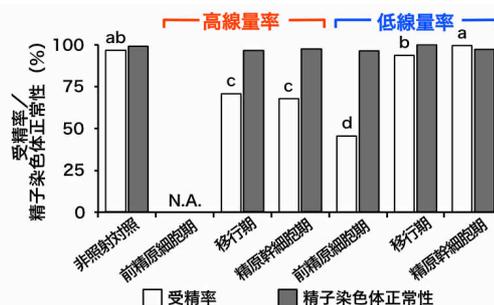


図4. 体外受精後の受精率と染色体正常性

これらの結果は、幼若期マウスの雄性生殖細胞へのガンマ線照射は性成熟後の繁殖能力に影響することを示している。特に高線量率で前精原細胞期に照射したとき、精巣の発達は大きく損なわれ、その個体は不妊となった。また照射時期を精原幹細胞期に変更すると性成熟後の精巣の発達は良好だが、一次精母細胞の染色体異常が増加した。一方で、照射後に作られる精子では、照射時期によっては受精率が低下するものの、精子染色体にはダメージは蓄積していなかった。受精率が低下する原因や前精原細胞期でのみ放射線感受性が高い理由は今後の検討課題である。

(2) 卵子内での精子核DNA修復の可視化

上述のようにガンマ線照射後に作られた精子の染色体には異常が見られなかったが、受精時に卵子内で修復された可能性も否定できない。DNA損傷検出マーカーである γ H2AXの検出を行ったところ(図5)、高線量

率で移行期・精原幹細胞期に照射した群において精子核に占める DNA 損傷領域は非照射対照群と同様の値であった (0.48-0.73%)。

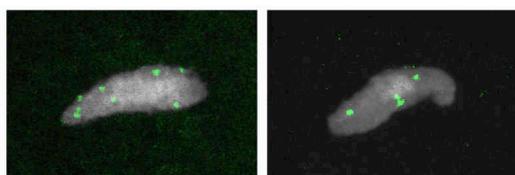


図5. 受精後1.5時間目における精子核のγH2AX局在

上述の精子染色体分析の結果でも精子染色体異常の増加は見られなかったため、幼若期にガンマ線照射した後、新たに作られた精子にはガンマ線照射由来の DNA 損傷は蓄積していないと考えられた。

(3) 精子の受精前遺伝学的診断法による遺伝的ダメージの検出

ガンマ線照射に起因する異常を精子の受精前遺伝学的診断法によって検出可能かどうかを検討した。上述のように、幼若期マウスへのガンマ線照射は精子核 DNA の損傷に寄与しなかったため、この実験では 10 週齢の雄マウスにガンマ線を急照射し、その後直ちに回収した精子を用いた。

除核した未受精卵にガンマ線を照射した精子を顕微注入し、雄性発生胚を作成した。2 細胞期まで発育した雄性発生胚の割球に異常を持った染色体が均等に分配されるかどうかを検討したところ、2 割球とも正常なものは 57.6%、異常なものは 33.3%、正常と異常のモザイクであったものは 9.1%であった。図 6 の矢印・矢頭に示すように、2 割球とも異常であった 2 細胞期胚では、2 割球とも同じ染色体に由来する異常が観察された。

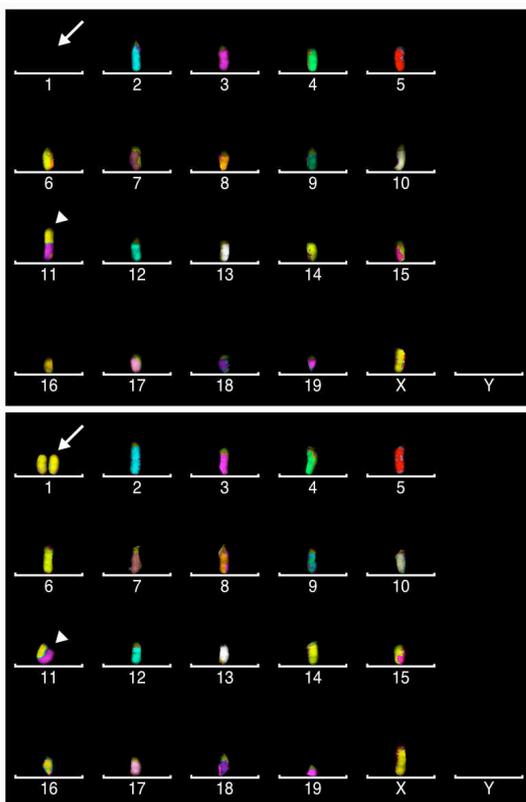


図6. 精子の受精前遺伝学的診断法の診断結果

この結果から、片方の割球を分析することで他方の遺伝的構成を予測することが可能であることが推察され、精子の受精前遺伝学的診断法は放射線照射された精子の遺伝的リスクの評価に有効であることが示された。

<引用文献>

- ① Watanabe H, Kusakabe H, Mori H, Yanagimachi R, Tateno H. Production of offspring after sperm chromosome screening: an experiment using the mouse model. *Human Reproduction*, 2013, 28, 531-537

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 渡部 浩之、香田 淳、立野 裕幸、幼若期マウス雄性生殖細胞の放射線感受性に及ぼす線量率と照射時期の影響、第 108 回日本繁殖生物学会、2015 年 9 月 17 日、宮崎県
- ② 渡部 浩之、立野 裕幸、予め染色体分析された一組の配偶子からの受精卵作出とその発生能、第 106 回日本繁殖生物学会、2013 年 9 月 14 日、東京都

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