

## 論文の内容の要旨

論文題目 放射線によってメダカ精原細胞から誘導される精巣卵に関する研究

氏 名 永田 健斗

小型のモデル魚類であるメダカ (*Oryzias latipes*) は、人体の放射線生物影響の実験生物学モデルとして、古くから研究に用いられてきた。メダカの精原細胞は高い放射線感受性を示す一方、放射線に被ばくした精子形成期の細胞群は、精子形成を促進させ、異常な細胞を精巣から排除させる機構が存在する(Kuwahara et al., 2003)など、生殖細胞の放射線応答を解明する上でユニークなモデル系である。p53 を欠損するメダカではガンマ線の急性（一括）照射によって精原細胞から卵様細胞（精巣卵）が誘導される(Yasuda et al., 2012)が、その機序の詳細は全く不明である。

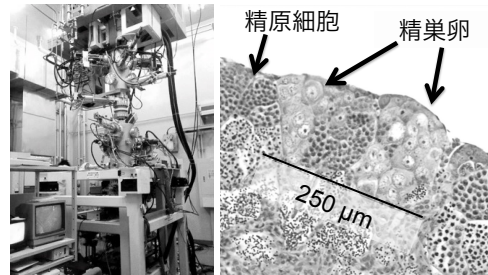
本研究では、全身性の放射線被ばくと精巣限局的な放射線被ばくによる精巣卵誘導の機序の差に注目し、精原細胞の異常分化機構について組織学的に検討した。さらに、高線量放射線および低線量放射線に全身ばく露することによって誘導される精巣卵を組織学的に観察し、その差異を評価した。精巣卵誘導機序を明らかとするため、RNA シーケンスのよる遺伝子発現解析を行った。この機序の解明によって放射線による次世代影響、特に昨今関心が高まっている低線量（率）放射線被ばくによる生態系影響の実用的な評価が実現することが期待できる。

### 第 1 章 重粒子イオンビームを利用した限局照射による精巣卵誘導の解析

量子科学技術研究開発機構高崎量子応用研究所が運用するイオン照射施設 TIARA (Takasaki Ion Accelerators for Advanced Radiation Application) の深度制御種子照射装置（ブロードビーム）を用いて、メダカ成魚の体表から 2.2 mm の深さまで達する炭素イオン(C<sup>6+</sup>、320 MeV)のブロードビームをメダカ成魚に照射し、その影響を組織学的に解析する方法が確立されている(Nagata et al., 2016)。Hd-rR 系統（野生型）のメダカ成魚に体側方向からブロードビーム(H<sup>+</sup>、2 Gy)を照射し組織を観察したところ、細胞死を示す cleaved-caspase 3 シグナルが B 型精原細胞で確認され、ブロードビーム照射により精巣全域に細胞が照射されることがわかった。

ガンマ線を全身照射した場合、脳-視床下部における内分泌系機能の擾乱が精巣卵生成に関与している可能性がある。そこで、TIARA の細胞局部照射装置（マイクロビーム）を利用して、精巣に限局して炭素イオンおよびプロトンイオンを照射した。マイクロアパーチャーを介して

サイクロトロンから輸送されるイオンを直径 250  $\mu\text{m}$  に絞り込んだビームを、p53 遺伝子変異メダカ成魚の精巣の一部に照射し 1 週間後に精巣組織を観察したところ、マイクロビームが侵入したと思われる部位にのみ限局して精巣卵が生成された。精巣卵の



ある領域は、ほぼマイクロビームのサイズで、その周辺の精巣組織は正常であった。以上より、p53 変異メダカ精巣における精巣卵誘導には、放射線によって精原細胞が放射線に直接的に被ばくすることが必要であることが強く示唆された。

## 第 2 章 高線量放射線により誘導される精巣卵の解析

慢性的な照射後の精巣組織影響を評価するために、p53 遺伝子欠損雄メダカに対して合計線量 5 Gy の慢性照射（線量率 0.37 mGy/min）を行ったところ、慢性照射終了直後の A 型精原細胞シストに精巣卵が観察された。慢性照射終了 1 ヶ月後の組織内には少数であるがより肥大した精巣卵が観察されており、その形態は卵巣内の卵母細胞と酷似していた。精原細胞数は慢性照射によって減少し、照射 28 日後には、完全には回復しなかった。一方で、同じ合計線量 (5 Gy) を 10 日間で分割した高線量の分割照射 (0.5 Gy/日  $\times$  10 回) を実施したところ、p53 欠損雄メダカでは慢性照射直後と同様に、照射直後に A 型精原細胞シスト内に小さな精巣卵が多数見出され、照射終了 28 日後ではさらに成長した精巣卵が観察された。さらに分割照射後 60 日でも、成長した精巣卵が組織に残存していた。これら結果は、p53 遺伝子欠損メダカにおいては、線量率を下げたり、分割的に照射することで、生じる精巣卵の性質が高線量急性（一括）照射の場合と異なることが明らかとなった。

また、p53 機能が正常である野生型メダカ(Hd-rR)においても、一括照射と異なり、分割照射の終了直後に少数ではあるが精巣卵が誘導されることを見出した(図 2)。放射線による精巣卵誘導において分化異常が生じるには、p53 遺伝子の欠損が必ずしも必須ではないことが強く示唆された。さらに、誘導された精巣卵は、照射 28 日後には完全に除去されたことから、p53 が精巣卵の除去に関わると推測された。

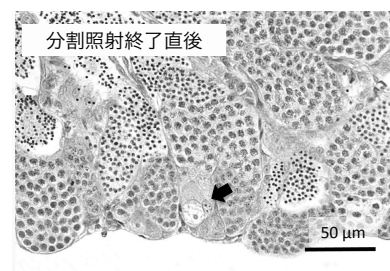


図 2. 野生型に誘導される精巣卵

ホルモン様物質でメダカ雄精巣に誘導される精巣卵の分子マーカーとして、卵母細胞に特異的に発現する 42Sp50 が用いられる。分割照射した野生型メダカ精巣において RT-PCR による発現解析を行ったところ、分割照射終了直後の精巣組織において 42Sp50 の発現が確認され、野

生型精巣においても放射線照射によって雌性遺伝子の発現が誘導されることを初めて示した。*42Sp50* の発現の局在を確認するために、急性照射（5 Gy）した 3 日後の p53 変異精巣において *in situ* hybridization を行ったところ、精巣組織辺縁部に位置する A 型精原細胞シストでのみ *42Sp50* の発現が確認され、放射線によって A 型精原細胞が精巣卵へと異常分化する初期の過程で *42Sp50* が発現誘導されていることが明らかとなった(図 3)。

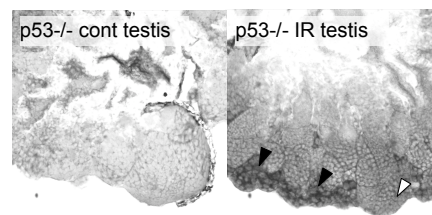


図 3. p53 変異メダカにおける *42Sp50* の局在

### 第 3 章 低線量・低線量率放射線により誘導される精巣卵の解析

100 mSv (=100 mGy) 以下の線量域では、ヒトにおいて疫学的手法によるがんリスクの有意な増加は認められていない。しかし、2011 年の福島第一原子力発電所の事故による放射能汚染問題を受けて、低線量・低線量率での長期被ばくにおける放射線の生物影響の再評価が求められている。本研究では、メダカ精巣に

おける精巣卵誘導を指標とした低線量放射線の長期被ばくによる生物影響を評価するため、p53 欠損メダカおよび野生型メダカに 50~500 mGy の低線量ガンマ線を照射し、精巣組織への影響を検討した。その結果、急性被ばくで

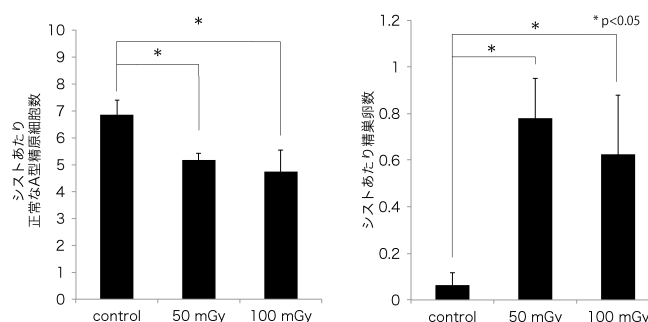


図 4. 50 mGy 照射 7 日後の p53 変異精巣の精巣卵誘導

率 3.33 mGy/min, 照射時間 15 分) を照射した p53 欠損メダカ精巣においても、精巣卵が有意に誘導されることを見出した(図 4)。また野生型メダカにおいても、低頻度ではあるが低線量・低線量率のガンマ線照射により精巣卵へ分化転換や精原細胞の細胞死の増加が確認された。これらの結果は、p53 の有無に関わらず精原細胞が低線量放射線に対して極めて高感受性であることを明らかに示していた。一方で、高線量放射線の被ばくで見られた精子形成加速に伴う B 型精原細胞シスト数の減少や、精原細胞の増殖停止は認められず、低線量放射線は精原細胞の分化にのみ影響を与えと考えられた。また、合計線量 100 mGy の低線量放射線を 2 種の線量率（69.4  $\mu$ Gy/min, 9.99  $\mu$ Gy/min）で照射したところ、線量率が上がると精巣卵が増加し、精原細胞は減少することが明らかとなった。

#### 第4章 p53 変異精巣における次世代シーケンサーを用いた精巣卵誘導時の遺伝子発現機構の解析

放射線照射後の精巣卵誘導に関わる因子を詳細に特定するために、高線量（5 Gy）急性照射の3日後と高線量（5 Gy）分割照射3日後の p53 遺伝子欠損メダカの精巣において、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。放射線照射により、双方において卵巣特異的な遺伝子（ZP family genes）の発現が誘導されていたが、分割照射後のほうがより発現誘導が強く、精巣卵の成長を促すことが示唆された。また、急性照射および分割照射のいずれによっても生殖幹細胞を安定化させている *nanos2/3* の発現が抑制されており、放射線によって精原細胞の維持機構が乱され、卵へと分化転換することが示唆された。さらに、高線量放射線は体細胞におけるステロイドホルモン新生にも影響を与えることが示唆された。

さらに 100 mGy のガンマ線を7日間かけて被ばくさせた p53 変異メダカの精巣において RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。高線量放射線（急性照射、分割照射）よりも低線量放射線に被ばくした場合では発現が変動した遺伝子が少なく、かつ卵形成関連遺伝子の発現が少なく、低線量放射線は卵の成長を促すのではなく、精原細胞の異常分化のみを引き起こすことが示唆された。

さらに、放射線による体細胞への影響を排除するため、シングルセル RNA シーケンスによる p53 変異精巣の一細胞解析を行った。非照射精原細胞をクラスター解析し、マウス、ヒト等すでに報告されている精原細胞特異的なマーカー遺伝子をもとに、精原細胞特異的な遺伝子発現パターンを明らかにした。

#### 総合結論

本研究において、p53 遺伝子を欠損したメダカ精巣では放射線照射により A 型精原細胞が異常に分化して精巣卵が誘導されること、急性被ばくよりも慢性的な被ばくの方がより効率的に精巣卵を誘導し生じた精巣卵が精巣内で排除されないこと、精巣卵の誘導は極めて高感受性であり、これまで検討されてなかった低線量（50 mGy 程度）でも誘導されることを見出した。p53 遺伝子が寄与する DNA の損傷修復機構、細胞周期制御、アポトーシスによる損傷細胞の除去機構によって、野生型の精巣では精巣卵の誘導は顕在化せず、これまで見出されなかったものと考えられる。本研究では低線量、低線量率の放射線被ばくが精原細胞の分化機能への潜在的なリスクであることを明らかにした。

福島県の放射線汚染地域で報告がなされ始めている、動植物への生殖機能の影響が報告されていることも踏まえ、低線量放射線による生殖細胞の野生型では顕在化していない影響を、p53 欠損メダカをモデルとして定量的に評価・把握することが可能であると考えられる。