

76. 精子幹細胞の放射線保護に関わる分子機構の解明

篠原 隆司

Key words : 精子幹細胞, 放射線, 自己複製, *p53*,
Trp53inp1

京都大学 医学部 遺伝医学講座
分子遺伝学

緒 言

精子形成細胞は放射線照射に敏感な組織であり, 放射線に照射された個体は容易に妊孕能を失う. しかし, 照射が低線量であった場合は残存した精子幹細胞の自己複製分裂により妊孕能を復活する. 精子幹細胞の放射線感受性を担う分子機構については未だ未解明の問題が多く残されている. 例えば, DNA ダメージへの応答において重要な役割を担う *p53* は精子幹細胞の生存には関与しないと報告されている^{1,3)}. また, DNA 修復についても体細胞とは異なる分子機構を有しているとの報告もある⁴⁾. しかしながら, 従来の研究では精子幹細胞がその形態を基礎に同定されており, そのために正確に幹細胞を同定できていない点, および生殖細胞周囲の組織へ及ぼす放射線の影響が無視されている点が問題であると我々は考え, これらの問題を克服するために, 本研究では機能的なアッセイ法である精子幹細胞移植法ならびに培養精子幹細胞である Germline Stem (GS) 細胞の培養系という2つの新たな実験手法を用い, 精子幹細胞における DNA ダメージ応答の分子機構の解析を行った.

方 法

マウス GS 細胞は野生型および *p53* knockout (KO) マウスから常法により樹立された⁵⁾. 全ての遺伝子 Knockdown (KD) は Open Biosystem から購入された shRNA を発現するレンチウイルスを感染させることにより行われた. *p53* KO マウスは相沢慎一博士, *DR5* KO マウスは A. Winoto 博士, *Trp53inp1* KO マウスは A. Carrier 博士より供与された. 細胞移植については輸精管への注入法により行われた.

結 果

まず, *p53* の関与について精子幹細胞移植法を用いて検討を行った. 蛍光を発する *p53* KO マウス精巣を放射線照射した後にトリプシンにより細胞をばらし, 不妊処理を行ったマウスの精巣にマイクロインジェクションを行い, 移植後2ヶ月後にコロニー数を UV 照射下でカウントした. コロニー数を野生型と比較すると, *p53* KO マウスの精巣には幹細胞活性を保つ細胞が多く含まれていることが明らかとなった. 同様に野生型 GS 細胞よりも *p53* KO GS 細胞は放射線耐性能が高いことも確認された. これらの結果は *p53* が精子幹細胞の生存に関与することを示す.

次に我々は GS 細胞を用い *p53* による放射線照射後の細胞死制御メカニズムの解析を試みた. *p53* は内因性経路と外因性経路という二つの異なる経路を用いて細胞死を引き起こす. まず内因性経路について, 細胞死関連分子とされる BH3-only family 蛋白質に属する遺伝子群の KD 後に GS 細胞における放射線感受性を調べたところ, *Puma* を KD したときにのみ GS 細胞が多く生き残ることが明らかとなった. この結果は *Puma* が *p53* の下流として細胞死を誘導している可能性を示唆していた. しかしながら, GS 細胞の中には精子幹細胞は 1-2%しか含まれていないことから, *Puma* を KD された GS 細胞中に含まれている精子幹細胞の存在の確認を移植アッセイにより試みた.

移植後2ヶ月でドナー細胞由来のコロニー数を評価すると, *Puma* を KD された GS 細胞は対照群に比べ移植後のコロニー形成能が著しく低下していることが分かった. 従って, この移植実験の結果は幹細胞の性質を持たない分化決定した細胞の生存に *Puma* が関与することを示唆した (図 1).

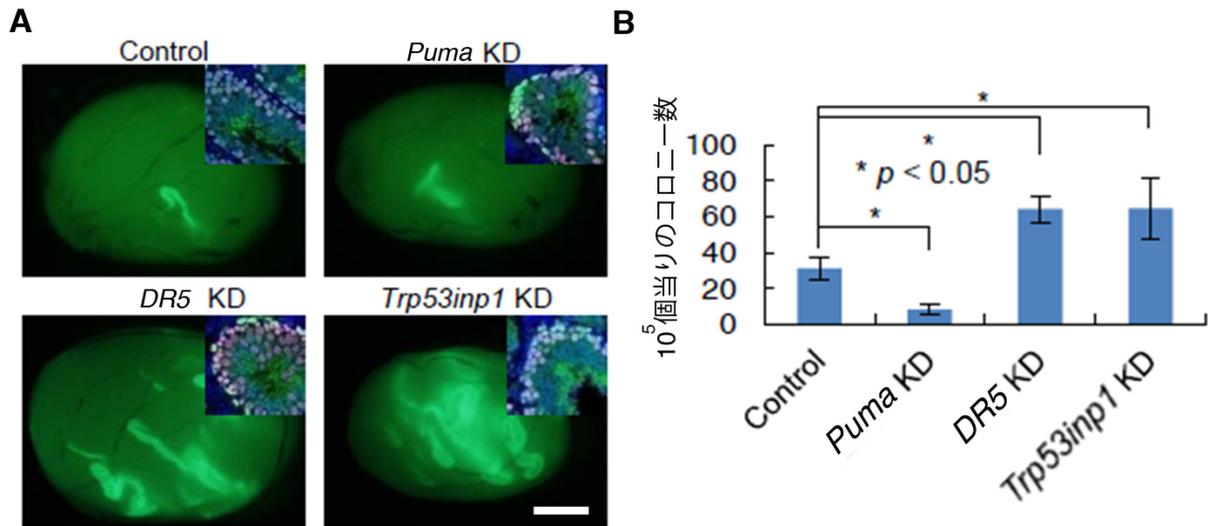


図1. 放射線照射されたGS細胞における遺伝子KDの影響.

- A) 移植された精巣. 移植細胞は蛍光を発している. inset: 減数分裂マーカーであるSYCP3による免疫染色像.
 B) 精巣に生じたコロニー数. Scale bar: 1 mm. Error bar: SE. Asterisk: $p < 0.05$.

これらのGS細胞を用いた実験はマウス胎児線維芽細胞上で行われたものであったが、GS細胞をラミニン上で培養し放射線照射を行うと、線維芽細胞との共培養時より放射線感受性が低下する。この観察から我々はGS細胞の細胞死には細胞死の外因性経路も寄与するのではないかと考えた。そこで培養上清に含まれる細胞死を誘導する候補分子をEnzyme-linked immunosorbent assayにより調べたところ、TRAILが多く含まれていることが判明した。更にGS細胞は放射線照射によりp53依存性にTRAILの受容体であるDR5を発現することもReal-time polymerase chain reactionの結果から明らかとなった。DR5をGS細胞でKDすると放射線照射しても移植アッセイ後の幹細胞の生存が亢進したことからDR5は精子幹細胞の生存に関与することが確認された。生殖細胞の欠損した*Kit*変異マウスにおいて放射線照射後にTRAILの発現が増強することから、体細胞、恐らくは精細管内に存在するセルトリ細胞がTRAILを発現し、生殖細胞で発現されるDR5に結合する結果、精子幹細胞の細胞死が誘導されることが示唆された。

最後にp53がDR5を誘導する分子機構についての解析を行った。我々は放射線照射により活性酸素の濃度が上昇してくることに着目した。p53には抗酸化活性があることから、p53の下流であり抗酸化活性を持つ*Trp53inp1*がDR5の発現誘導に関与するのではないかと我々は考えた⁹⁾。実際にGS細胞では*Trp53inp1*を過剰発現するとDR5の発現を誘導するのみならず、*Trp53inp1*をKDすることによりGS細胞の放射線感受性が低下した。両遺伝子のKOマウスを用いた解析を行った結果、生体内の精子幹細胞も放射線に対してより抵抗性を持つことが確認された(図2)。

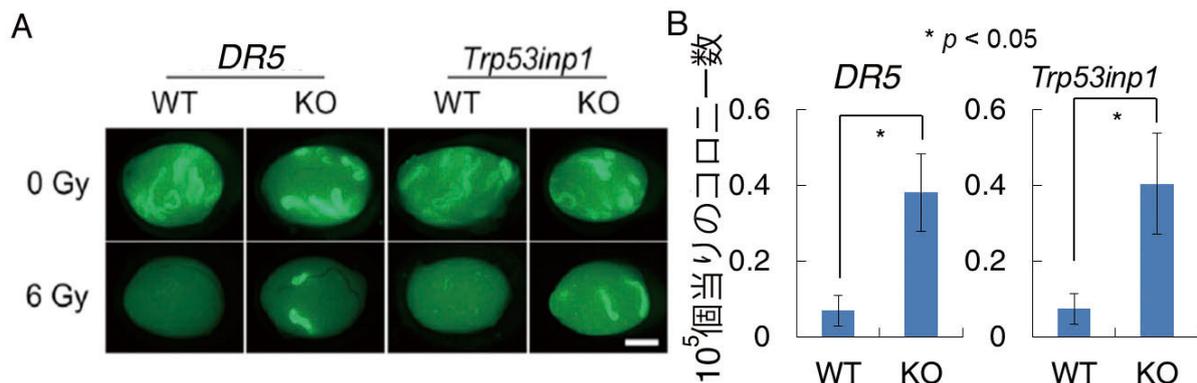


図2. 放射線照射された *DR5* および *Trp53inp1* KO マウスの精子幹細胞活性.

A) 移植された精巣. 移植細胞は蛍光を発している. B) 精巣に生じたコロニー数. Scale bar: 1 mm. Error bar: SE. Asterik: $p < 0.05$.

両遺伝子の KD は放射線のみならずシスプラチンやマイトマイシン C による抗癌剤による細胞死についても精子幹細胞の生存を促進した.

考 察

私たちは GS 細胞の培養により周囲細胞の影響を取り除くのみならず移植実験による機能的解析を利用することで, *p53* が精子幹細胞の細胞死に関与することを明確に示すことができた. 更に従来報告では *Puma* が精子幹細胞の細胞死に関わるとされていたが, 我々の実験結果から *Puma* は分化決定された精原細胞の細胞死に関わっており, 精子幹細胞においては外因性経路である *p53-Trp53inp1-DR5* 経路が関与していることが示された⁸⁾. *Puma* は体内の様々な組織幹細胞の放射線照射による細胞死に関与すると報告されているが⁹⁾, 精子幹細胞はこれらの体細胞組織の幹細胞とは異なったメカニズムにより細胞死を起こすのではないかと予想される.

近年の悪性腫瘍治療法の進展により小児がんの7割以上の患者が5年以上生存する. その結果, 現在では20代の若者の500人に一人が小児がん経験者である. しかし一方で, 治療の副作用により生存者の約3割が不妊症となることが知られている. 成人の場合は, 精子保存法を用いて精子凍結を行うことが可能であるが, 未成熟な小児の場合には精子を回収することができず, 悪性腫瘍の治療による不妊症は深刻な問題となっている¹⁰⁾. しかしながら, 精子幹細胞は小児の精巣にも存在することから, 悪性疾患の治療時にこの細胞を保護すれば妊孕性を維持することができる可能性がある. 我々の報告にある通り, *p53-Trp53inp1-DR5* 経路は放射線照射や抗癌剤に対する精子幹細胞の生存に関わる重要な経路であることから, この経路を操作することで精子幹細胞の生存を保護することができれば将来的には男児患者の妊孕性保護に役立つことが期待される.

共同研究者

本研究の共同研究者は京都大学大学院医学研究科分子遺伝学分野の篠原美都, 森本裕子, 放射線生物研究センター晩発効果研究部門の高田 稔, 石合正道, 福島県立医大放射線医学県民健康管理センター国際連携部門の丹羽太貫である. 最後に本研究にご支援賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します.

文 献

- 1) Hasegawa, M., Zhang, Y., Niibe, H., Terry, N. H. & Meistrich, M. L. : Resistance of differentiating spermatogonia to radiation-induced apoptosis and loss in *p53*-deficient mice. *Radiat. Res.*, **149** : 263-270, 1998.
- 2) Beumer, T. L., Roepers-Gajadien, H. L., Gademan, I. S., van Buul, P. P., Gil-Gomez, G., Rutgers, D. H. & de Rooij, D. G. : The role of the tumor suppressor *p53* in spermatogenesis. *Cell Death Differ.*, **5** : 669-677, 1998.
- 3) Hendry, J. H., Adeeko, A., Potten, C. S. & Morris, I. D. : *P53* deficiency produces fewer regenerating spermatogenic tubules after irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, **70** : 677-682, 1996.

- 4) Rube, C. E., Zhang, S., Miebach, N., Fricke, A. & Rube, C. : Protecting the heritable genome: DNA damage response mechanisms in spermatogonial stem cells. *DNA Repair*, **10** : 159-168, 2011.
- 5) Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S. & Shinohara, T. : Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol. Reprod.*, **69** : 612-616, 2003.
- 6) Cano, C. E., Gommeaux, J., Pietri, S., Culcasi, M., Garcia, S., Seux, M., Barelier, S., Vasseur, S., Spoto, R. P., Pébusque, M. J., Duseti, N. J., Iovanna, J. L. & Carrier, A. : Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 is a major mediator of p53 antioxidant function. *Cancer Res.*, **69** : 219-226, 2009.
- 7) Forand, A. & Bernardino-Sgherri, J. : A critical role of PUMA in maintenance of genomic integrity of murine spermatogonial stem cell precursors after genotoxic stress. *Cell Res.*, **19** : 1018-1030, 2009.
- 8) Ishii, K., Ishiai, M., Morimoto, H., Kanatsu-Shinohara, M., Niwa, O., Takata, M. & Shinohara, T. : The Trp53-Trp53inp1-Tnfrsf10b pathway regulates the radiation response of mouse spermatogonial stem cells. *Stem Cell Reports*, **3** : 676-689, 2014.
- 9) Qiu, W., Carson-Walter, E. B., Liu, H., Epperly, M., Greenberger, J. S., Zambetti, G. P., Zhang, L. & Yu, J. : PUMA regulates intestinal progenitor cell radiosensitivity and gastrointestinal syndrome. *Cell Stem Cell*, **2** : 576-583, 2008.
- 10) Jensen, J. R., Morbeck, D. E. & Coddington, C. C. 3rd. : Fertility preservation. *Mayo Clin. Proc.*, **86** : 45-49, 2011.