

論文審査の結果の要旨

氏名 桑原 義和

本論文は 4 章からなり、第 1 章はメダカ雄生殖細胞において γ 線で誘発されるアポトーシス、第 2 章は γ 線で誘発されるアポトーシスにおける p53 関与の検討、第 3 章はメダカ雄生殖細胞における γ 線誘発 DNA2 本鎖切断再結合の解析、第 4 章は γ 線照射による精原細胞の分化促進、について述べられている。

メダカの精巣では、精原幹細胞を含む全ての分化段階の生殖細胞を組織学的に明確に識別することができるため、死細胞の分化段階を周囲の生細胞の様態から判定することが可能である。そこで、 γ 線照射後に誘発される細胞死を組織学的に調べ、 γ 線誘発致死高感受性細胞集団の同定を試みた。まず、核凝縮を起こした細胞を死細胞の指標とし、 γ 線照射後に誘発される精原幹細胞と分化型精原細胞の細胞死を、経時的に調べた。その結果、精原幹細胞および分化型精原細胞の細胞死頻度は、4.75Gy 照射 12-18 時間後に最大になった。また、核凝縮を起こした細胞では TUNEL 法により DNA の断片化が検出され、 γ 線で誘発される細胞死は、アポトーシスであることが示唆された。次に、 γ 線照射 12 時間後における線量効果関係を調べると、特に初期の分化型精原細胞が γ 線に致死高感受性を示し、0.11Gy の線量でも統計学的に有意な頻度で細胞死が誘発された。一方、0.11Gy の線量では精原幹細胞に細胞死は誘発されず、閾値が存在した。さらに、0.64Gy の線量を 0.95Gy/min の線量率で照射して細胞死を調べると、精原幹細胞では 0.003Gy/min で照射した場合の 9 倍、初期の分化型精原細胞では 3 倍多く細胞死が誘発されることがわかった。このことから、精原幹細胞は DNA 修復能の高いことが示唆された。さらに、少なくとも初期の分化型精原細胞の細胞死には、p53 タンパク質が関与していることが示され、これらの細胞にはわずかなゲノム損傷をも感知し細胞死により淘汰する監視機構の存在が示唆された。

γ 線による主な細胞致死作用は DNA の 2 本鎖切断によると一般的に考えられている。本研究により精原幹細胞には γ 線誘発細胞死に関して閾値が存在し、分化型精原細胞に比べて γ 線に耐性であることが示された。また、一般的に幹細胞は DNA 修復能が高いことも示唆されている。 γ 線照射を受けた細胞では、細胞周期の進行が停止し DNA の損傷を修復するが、分化期にある哺乳類の雄生殖細胞では顕著な細胞周期進行の遅延は生じないと一般的に考えられている。本研究により、精原幹細胞は分化型精原細胞や一次精母細胞に比べて DNA2 本鎖切断再結合能が高いことが示されたので、分化段階にある生殖細胞とは異なり、精原幹細胞では γ 線照射後に細胞周期進行の遅延が生じるのではないかと推測した。そこ

で、精原幹細胞及び分化型精原細胞と一次精母細胞に関して、 γ 線照射後の細胞周期進行の遅延を、BrdU 標識率により調べた。その結果、 γ 線照射を受けた精原幹細胞では細胞周期進行の遅延がおこるが、分化型精原細胞と一次精母細胞にはおこらないことが示唆された。次に、4.75Gy の γ 線照射後に分化型精原細胞と一次精母細胞を BrdU で標識し、標識細胞の分化段階を経時的に調べることで、アポトーシスでは排除されずに生き残った分化型精原細胞と一次精母細胞の精子形成に至る過程を解析した。その結果、標識細胞の 90%以上が精子に分化するには通常は 17 日を要するが、照射した場合には 5 日以内に精子へ分化することがわかった。一般に、雄生殖細胞の分化は放射線の影響を受けないと考えられていたが、本研究により、 γ 線照射を受けた分化型精原細胞期以降の細胞は、精子への分化が促進されることが示された。

本研究の結果、精原幹細胞では、(1) γ 線誘発アポトーシスに関して閾値が存在すること、(2)DNA の 2 本鎖切断は分化型精原細胞・一次精母細胞に比べてより速やかに再結合されること、および(3)細胞周期進行の遅延が生じることを新たに明らかにした。従って、精原幹細胞に生じたゲノム損傷は、まず修復されるが、修復しきれなかった細胞はアポトーシスにより排除されることが考えられる。本研究により、 γ 線照射後に生き残った大部分の分化型精原細胞期以降の雄生殖細胞は精子へ急速に分化することにより精巣内から一掃され、そのあと、ゲノム損傷の少ない精原幹細胞からの分化が新たに始まるというリセット機能の存在が示唆された。

なお、本論文第 1 章、第 4 章は、嶋 昭紘・三谷 啓志・島田 敦子との共同研究であるが、論文提出者が主体となり分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

従って、博士(理学)の学位を授与できると認める。