

|  |   |    |      |
|--|---|----|------|
| 京都大学   | 博士（医学）  | 氏名 | 森 圭史 |
| 論文題目   | OGG1 protects mouse spermatogonial stem cells from reactive oxygen species in culture<br>(OGG1 は活性酸素種からマウス精子幹細胞を守る) |    |      |
| <p>(論文内容の要旨)</p> <p>生殖細胞は次世代に伝わる唯一の細胞種であるため、生殖細胞のゲノムに生じた DNA 障害が修復されずにゲノム配列に変異が生じると次世代以降の個体に遺伝病が生じる可能性がある。DNA 障害をもたらす内在性原因として活性酸素種 (ROS) がある。活性酸素種 (ROS) のうち過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) は生理的な細胞代謝の過程で必ず生じる副産物でありさまざまな DNA 障害をもたらす。例えば H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は DNA の鎖断裂をもたらしたり、グアニンを 8-オキシグアニン (8-OxoG) に変換したりする。二本鎖断裂は細胞死や染色体転座の原因となり、DNA 複製の際に 8-OxoG は相補鎖で高頻度にアデニンが取り込まれてしまうためにトランスバージョン型の点変異の原因となる。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による二本鎖断裂は非相同末端結合 (NHEJ) や相同組み換え (HR) によって、8-OxoG は塩基除去修復 (BER) という修復システムによって除去されることが体細胞や胚性幹細胞 (ES 細胞) では知られているが、精子幹細胞にて H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による DNA 障害の修復機構についてはこれまでに知られていない。そのため本研究では H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対して精子幹細胞がどのような防御機構をもっているかを解明することを目的とした。</p> <p>精子幹細胞は精巣の生殖細胞のうち約 0.02% しか存在しないため生体からはごく少量のサンプルしか回収できず、生化学的、分子生物学的研究が困難である。本研究では培養によって対数増殖が可能であり、薬剤選択やウイルスによる遺伝子操作も可能である培養精子幹細胞 (GS 細胞) を用いた。GS 細胞に対する対照群としては ES 細胞、GS 細胞由来の多能性幹細胞 (mGS 細胞)、体細胞である胎仔線維芽細胞 (MEF) を用いた。ES 細胞と mGS 細胞は性質としてはほぼ同一である。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対する各種細胞の感受性を検討したところ、GS 細胞は他の細胞に比べて H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対する感受性が低いことがわかった。GS 細胞の NHEJ 活性は ES 細胞、mGS 細胞と同様に MEF よりも低く、HR 活性については GS 細胞と ES 細胞はほぼ同等レベルであった。点変異頻度を評価できるレポーターを用いた実験を行ったところ GS 細胞の点変異頻度は低く、高い BER 活性を有することが示唆された。</p> <p>次に GS 細胞が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に高い耐性をもつことの原因となる遺伝子について検討したところ BER 関連遺伝子の発現が全般的に他の細胞よりも高く、とくに OGG1 の発現量が顕著に高いことが明らかになった。OGG1 は 8-OxoG を認識して切断する酵素であり、BER の第 1 段階に重要である。GS 細胞にて OGG1 をノックダウンすると H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による DNA 障害の修復能力が低下し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 曝露下での生存率も低下した。以上の結果により、GS 細胞では他の細胞に比べて BER 関連遺伝子の OGG1 の発現が亢進しているため H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による DNA 障害が修復されやすく、ROS 曝露下でも生存率が高い</p> |   |    |      |

ということが示唆された。本研究は幹細胞の遺伝子修復機構に迫る結果であり、医学的意義が認められる。

(論文審査の結果の要旨)

生殖細胞に変異が入ると次世代から遺伝病が生じてしまう可能性があるため、生殖細胞の遺伝子修復は個体の遺伝情報伝達において重要な役割を果たす。これまでの研究では体細胞に比較すると生殖系列細胞では突然変異が低いことが知られている。しかしながら、そのメカニズムについては明らかになっていない。申請者は精子の源である精子幹細胞に注目し、遺伝子操作も可能である培養精子幹細胞 (GS 細胞) を用いて精子幹細胞の遺伝子修復機構の解析を行った。胚性幹細胞、GS 細胞由来多能性幹細胞、胎仔線維芽細胞の三種類の細胞と比較したところ、GS 細胞は DNA 障害をもたらす過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) に対する感受性が低く、高い塩基除去修復 (BER) 活性を有することが示唆された。GS 細胞では BER 関連遺伝子を他の細胞よりも強く発現しており、中でも H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により生じる損傷塩基の 8-オキシグアニンを切断する機能を持つ OGG1 の発現量が高いことが明らかになった。GS 細胞において OGG1 を過剰発現すると DNA 修復能力が亢進し H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対する感受性が低くなった。一方、short hairpin RNA により OGG1 の発現抑制を行うと DNA 修復能力が低下し H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による細胞死が亢進した。これらの結果は、GS 細胞における BER 遺伝子、特に OGG1 の発現が GS 細胞における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 抵抗性の獲得に重要な役割を果たしていることを示唆する。

以上の研究は精子幹細胞が活性酸素種に対して高い耐性をもつ理由の解明に貢献し、精子幹細胞の遺伝子修復機構の解明に寄与するところが大きい。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 3 年 2 月 3 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降