

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月24日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08159

研究課題名(和文) 精巣組織はどこまで免疫学的に守られているのか？

研究課題名(英文) Immunosuppressive microenvironment in the testicular tissues

研究代表者

伊藤 正裕 (Itoh, Masahiro)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：00232471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに精巣の特殊な免疫環境を解析するために精巣組織片の移植研究が行われてきたが、精巣の臓器そのものを移植して解析した報告はなかった。そこで我々は、異所性精巣移植技術を考案し、免疫学的実験移植モデル(急性拒絶モデル・慢性拒絶モデル・異性間移植モデル)を確立した。この移植技術を用いる事により、精巣の免疫反応を臓器全体で観察することが可能になり、精巣に比べ精巣上体は顕著に拒絶反応を呈することが示された。また、異性間の移植を行うことにより、雄では許容される精巣・精巣上体などの生殖系が雌では認識されず、雌由来の免疫細胞が雄生殖系に対し免疫学的障害を誘起する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの同所性精巣移植法は、術者の技術や手術時間・成功率の不安定さなどの影響が大きく、実験の精度が不安定であった。今回、考案した異所性精巣移植法は、それらの要素を払拭する簡易かつ成功率の高い画期的な移植技術であり、精巣の臓器全体の免疫反応を形態学的に観察する方法として他施設でも展開が可能である。また、これまで骨髄移植後に生じる男性不妊症の原因として放射線および抗がん剤治療による影響の研究が多くなされてきたが、今回の我々の研究成果により男性において異性由来のドナー免疫細胞がGVH様反応を引き起こし、男性生殖系に免疫学的障害を誘起するという新たな可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Transplantation studies of testicular tissues have been conducted to analyze the immune privileged status of testis in the past. However, in order to analyze the immune privilege testis, it is important to transplant and observe the testicular whole organ. Therefore, we developed heterotopic testis transplantation with epididymis, and were established immunological experimental transplantation model (acute rejection model, chronic rejection model, heterosexual transplantation model). By using the transplantation model, it has become possible to observe the immune response of testicular whole organ, and the epididymis has been shown the significant rejection compared to the testis. In addition, by performing heterosexual transplantation, male reproduction systems such as testis and epididymis that are tolerated autoimmune system aren't tolerated the female immune systems, and immune cells from females induce immunological damage to male reproductive systems.

研究分野：生殖生物学

キーワード：ラット 精巣 異所性移植 免疫特権

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精巣は、免疫寛容の時期が過ぎた思春期に入ってから、半数体である精子細胞や精子という新たな分化抗原をもった細胞を大量に作るようになる。よって、精子細胞および精子は自己より異物扱いされやすく強い自己免疫源性を有しているとされている。しかし、セルトリ細胞間で構成される blood-testis barrier (BTB) が強固に精子細胞・精子を自己の免疫系より守っていることが分かっている。さらに、近年では BTB 外側の精巣間質においても異系移植片が生着しやすいという数々の報告から、セルトリ細胞のみならず、間質のライディッヒ細胞、筋様細胞あるいは精巣マクロファージ、血管内皮細胞までもが immune privileged sites (=免疫学的に保護された場所) に関与しているという考えが主流になってきている。しかし、研究代表者らは非特異的免疫増強剤を一切用いずに、同系動物の精子細胞・精子を皮下注射するだけで、自己免疫性精巣炎を容易に誘発するモデルの開発に成功している。これは「精巣とは本当に immune privileged site なのか？」という疑問を抱かせるものであった。また、臨床的研究によると、放射線治療や抗癌剤治療の一環で骨髄移植を受けた男性患者は、男性ドナーよりも女性ドナーの骨髄細胞を移植された方が不妊症(精子形成障害)になりやすいという報告がある。これは、男性において異性由来の donor リンパ球が graft-versus-host reaction (GVHD) を引き起こし、精巣に何らかの免疫学的障害を引き起こしている可能性を示唆するものである。これまでに、精巣の immune privileged status を解明するために様々な研究が行われてきたが精巣そのものを支配動脈吻合によって移植し解析した報告は未だない。その最大の理由は、移植技術の確立がたいへん困難であったことである。今回、研究代表者らは頸部動脈と吻合させ、人工陰嚢を作成する移植術式を開発した。これにより、骨髄移植 GVHD 実験と併せて、精巣を に移植するとどうなるか? の骨髄細胞を に移植するとその精巣はどうなるか? という2側面から精巣の免疫学的特性の解析が可能と考えた。

2. 研究の目的

精巣は、脳や網膜と同様に免疫学的に特別に守られた場所とされており、これまでに様々なトレーサーを用いた BTB の機能形態学的研究や異系組織片の精巣内への移植成功が報告されてきた。しかしながら、精巣の臓器そのものを移植して解析した報告はその移植技術の難しさから報告がなく、精巣における免疫反応を臓器全体で観察することは困難であった。そこで、本研究では、ドナー精巣をレシピエントの頸部皮下に顕微鏡下手術を用いて頸部動脈に吻合し、人工陰嚢を作成する異所性精巣移植技術を開発し、異性の免疫系に精巣そのものを晒すとその精巣組織はどうなるか? 異性の免疫系に精巣そのものを曝すとその精巣組織はどうなるのか? という新たな発想で精巣の immune privileged status を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

動物

- 1) LEW ラット (血管変異が少ない系統)
- 2) ACI ラット (心臓や腎臓の移植モデルにおいて急性拒絶群に用いられる系統)
- 3) F344 ラット (心臓や腎臓の移植モデルにおいて慢性拒絶群に用いられる系統)
- 4) C57BL/6 マウス (自己免疫疾患解析に一般的に用いられる系統)

実験系

1) 異所性 (頸部) 精巣移植

LEW ラットから摘出した精巣・精巣上体・精管を LEW (同系移植モデル; Control)、ACI (急性拒絶モデル)、F344 (慢性拒絶モデル) をレシピエントとして異所性 (頸部) に移植し、各器官におけるリンパ球浸潤と精子形成障害の有無を観察する。異所性精巣移植は、ドナー精巣を精巣動脈・腹大動脈と共に、精巣静脈を下大静脈と共に摘出し、精管は前立腺付近で切断し、長い状態で精巣と共に摘出する。それぞれの血管の末端を吻合閉鎖し、一端をレシピエントの総頸動脈(=腹大動脈)と、内頸静脈(=下大静脈)に繋ぎ、血流を再開し、精巣を比較的体温が低い頸部背側へ人工陰嚢として静置する。また、内分泌学的影響を考慮して、移植前および移植後にレシピエントの両側性腺を摘除する去勢群と摘除しない非去勢群を作り比較する。

2) 異性間精巣移植

LEW ラットから摘出した精巣・精巣上体・精管を同系 および に対し、頸部異所性に移植を行う。移植方法は、”1)”に従い、移植3日後に精巣および精巣上体切片の HE 染色による精子形成障害、炎症細胞浸潤、精巣の障害程度を検討する。

3) 骨髄移植

C57BL/6 マウスに対して同系の同性間および異性間における骨髄移植を行い、レシピエントマウスにおける雄性生殖器への炎症性細胞浸潤や形態変化を観察する。骨髄移植前日にレシピエント C57BL/6 マウスを麻酔下にて固定し、10 Gy の骨髄破壊的放射線照射を行った。この時、精巣局部のみを鉛板にて遮蔽し、放射線による精巣への影響を軽減させた。放射線照射から24時間後、ドナー C57BL/6 の大腿骨から骨髄細胞 (1×10^7 cell) を採取し、同性間() および異性間() にて尾静脈から骨髄移植を行い、移植から120日後に評価を行った。

解析項目

- 1) 重量解析: 精巣、精巣上体、肝臓、脾臓、腎臓の重量測定と HE 標本観察
- 2) 精巣組織解析: 精巣切片の HE 染色による精子形成障害、炎症細胞浸潤、精巣の障害程度を

検討する。免疫組織化学法で、精巣内の微小環境の変化および細胞の局在を検討する {リンパ球 (CD4、CD8、B220)、マクロファージ・樹状細胞 (F4/80、MHC class II)、免疫グロブリン (IgG、IgA、IgM)、補体 (C3)、サイトカイン分泌分布 (IFN- γ 、IL-1、IL-6、IL-10、IL-12、TGF- β 、TNF- α)}; アポトーシス (Fas、FasL、Bax、Bcl-2、各種 caspase、TUNEL 染色) }

3) 血清学的解析: 抗精子抗体測定、各種ホルモンの測定

4) 生化学的解析: 摘出した精巣と脾臓からタンパク質を抽出し、サイトカイン、リンパ球、マクロファージ・樹状細胞、免疫グロブリン、補体などをウエスタンブロット法で半定量する。

5) 分子生物学的解析: 精巣から mRNA を抽出し、各種炎症性サイトカイン遺伝子、アポトーシス関連遺伝子の発現を Real time RT-PCR を用いて定量する。

4. 研究成果

2015 年度

これまで報告されてきた同所性精巣移植に変わり、より簡易かつ成功率の高い”異所性精巣移植技術”をラットにおいて考案・確立した。異所性精巣移植と同所性精巣移植において手術時間と成功率を比較した結果、異所性精巣移植の手術時間は 59.9 ± 7.1 min と同所性の約 3 分の 1 であった。成功率においては、同所性では 71% だったのに対して、異所性では 100% であった。また、今回我々が考案した異所性精巣移植における問題点として精管閉塞、血流閉塞、温度障害などが懸念されるため、3 群 (精管を結紮した精管結紮群、支配血管を結紮した虚血群、精巣を腹腔に移動させた停留精巣群) の対照群の精巣と組織学的に比較した。その結果、対照群から見られるような精子形成障害は異所性精巣移植群の精巣では確認できず、頸部皮下へ移植しても精巣は正常に機能することがわかった。これにより頸部異所性精巣移植の移植モデルとしての有用性が示唆された。

2016 年度

異所性精巣移植を用い、同系移植群 (LEW \times LEW)、急性拒絶群 (LEW \times ACI)、慢性拒絶群 (LEW \times F344) を確立し、この 3 群における免疫応答の差異を移植から 3 日後に検討した。その結果として、慢性拒絶群においては、精細管の構造が保たれており、同系群と有意な差はなかった。その一方で、急性拒絶群では、多くの精細管に精子形成障害をきたしているのが観察され、定量した結果においても同系群との差は有意であった。また急性拒絶群は、精巣内の毛細血管周辺にリンパ球が見られ、CD4、CD8 の免疫組織化学染色の結果では、同系群、慢性拒絶群と比べ有意にそれらの陽性細胞が認められた。Real-Time RT-PCR では、炎症性サイトカイン (IFN- γ 、IL-10、IL-1) 、細胞死関連 (Caspase3、8) の発現が急性拒絶群において有意に高いことを示した。慢性拒絶群は、同系移植群と有意な差は見られなかった。今回得られた結果により、異所性精巣移植が精巣の免疫学的実験移植モデルとして有用であることが示唆された。

2017 年度

異所性精巣移植を用いて、同性間移植 () 群と異性間移植 () 群の 2 群を確立し、移植から 3 日後に評価を行った。両群において移植精巣における精細管の構造は保たれており、精子形成障害は認められなかった。しかしながら、同性間移植群に比べ異性間移植群では移植精巣内の毛細血管および精巣の白膜に存在する血管周辺に CD4 陽性リンパ球が多く認められた。さらに、精巣と同時に移植した精巣上体では、異性間移植群のみ CD8 陽性リンパ球の浸潤が認められ、精巣上体炎様の組織像を示した。これにより、精巣と精巣上体という非常に近い臓器であっても異なる種類のリンパ球浸潤が誘起されることが示唆され、異性間移植群のみに精巣上体炎が起きたことから、では許容される精巣・精巣上体の免疫特権がでは認識されず、の生殖系がの免疫細胞により異物として認識されることを示された。つまり、男性において異性由来の免疫細胞、特にリンパ球が精巣をはじめとする男性生殖器系に何らかの免疫学的障害を引き起こすことを示唆している。

2018 年度

同性間移植に比べ異性間移植において急性拒絶反応が生じることをふまえて同性間 () および異性間 () 骨髄細胞移植による免疫応答を比較した。結果として両群において精子形成障害が認められた。しかしながら、この結果は骨髄移植をせずに放射線のみを照射した群にも認められたため放射線による影響だと考えられた。また、放射線照射群および同性間骨髄移植群では精巣周囲にリンパ球は確認されなかったが、異性間骨髄移植群では精巣白膜に存在する血管周辺にリンパ球が認められ、精巣上体周囲においてもリンパ球の浸潤が認められた。この違いの原因を解明するために放射線照射群を詳細に解析した結果、生殖細胞を保護している精巣の BTB および精巣上体の blood-epididymis barrier が放射線照射により破壊され、精巣や精巣上体が有する免疫特権の一部が失われており、免疫細胞により強く拒絶反応が生じたと考えられる。これらの結果は、男性において異性由来のドナーリンパ球が GVHD を引き起こし、精巣に何らかの免疫学的障害を引き起こしている可能性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Qu N, Terayama H, Hirayanagi Y, Kuramasu M, Ogawa Y, Hayashi S, Hirai S, Naito M, Itoh M. Induction of experimental autoimmune orchitis by immunization with xenogenic testicular germ cells

in mice. J Reprod immunol. 査読有. 2017. 121: 11-16, doi: 10.1016/j.jri.2017.04.006.

2. Yi K, Hatayama N, Hirai S, Qu N, Hayashi S, Kawata S, Nagahori K, Naito M, Itoh M. Development of heterotopic transplantation of the testis with the epididymis to evaluate an aspect of testicular immunology in rats. PLoS One. 査読有. 2017. 12(5): e0177067, doi: 10.1371/journal.pone.0177067.
3. Hirai S, Hatayama N, Naito M, Nagahori K, Kawata S, Hayashi S, Qu N, Terayama H, Shoji S, Itoh M. Pathological effect of arterial ischemia and venous congestion on rat testes. Sci Rep. 査読有. 2017. 7(1):5422, doi: 10.1038/s41598-017-05880-2.
4. 伊藤正裕. 生殖細胞/ 生殖腺の免疫学的研究のこれから-Future directions of investigation on gamete and gonadal immunology in the male-. Reprod Immunol Biol. 査読有. 2017. 32(1): 1-6.
5. Terayama H, Hirai S, Naito M, Qu N, Katagiri C, Nagahori K, Hayashi S, Sasaki H, Moriya S, Hiramoto M, Miyazawa K, Hatayama N, Li Z, Sakabe K, Matsushita M, Itoh M. Specific autoantigens identified by sera obtained from mice that are immunized with testicular germ cells alone. Sci Rep. 査読有. 2016. 6:35599. doi: 10.1038/srep35599.
6. Hirai S, Naito M, Kuramasu M, Ogawa Y, Terayama H, Qu N, Hatayama N, Hayashi S, Itoh M. Low-dose exposure to di- (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) increases susceptibility to testicular autoimmunity in mice recently. Reprod Biol. 査読有. 2015. 15(3):163-71. doi: 10.1016/j.repbio.2015.06.004.
7. Hirayanagi Y, Qu N, Hirai S, Naito M, Terayama H, Hayashi S, Hatayama N, Kuramasu M, Ogawa Y, Itoh M. Busulfan pretreatment for transplantation of rat spermatogonia differentially affects immune and reproductive systems in male recipient mice. Anat Sci Int. 査読有. 2015. 90(4):264-74. doi: 10.1007/s12565-014-0261-y.
8. 伊藤正裕. 特発性精子形成障害男性の原因は？What is the cause of idiopathic spermatogenic disturbance? 東医大誌. 2015. 査読有. 73(1): 17-18.

[学会発表](計 13 件)

1. 永堀健太, 平井宗一, 倉升三幸, 表原拓也, 宮宗秀伸, 李忠連, 小川夕輝, 伊藤正裕. 免疫寛容を受けていない精巢抗原遺伝子の同定. 第 33 回日本生殖免疫学会学術集会(2018.11.25) 東京
2. 伊藤正裕. 種の維持を支えてきた生殖と免疫 - アンドロロジーの立場から. 日本アンドロロジー学会第 37 回学術大会および第 26 回精子形成・精巢毒性研究会共同開催学会(招請講演)(2018.6.15) 兵庫
3. Nagahori K, Hirai S, Terayama H, Omotehara T, Miyaso H, Li ZL, Qu N, Hatayama N, Ogawa Y, Naito M, Itoh M. Analysis of specific proteins of testicular germ cells for testicular autoimmunity in mice. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会(2018.3.29) 東京
4. 伊藤正裕. 種の保存を支える生殖と免疫 - 雄性的立場からリンパ・免疫系懇話会(招請講演)(2018.3.27) 東京
5. Nagahori K, Terayama H, Hirai S, Kuramasu M, Qu N, Omotehara T, Miyaso H, Li ZL, Ogawa Y, Itoh M. Analysis of testicular specific proteins identified by sera obtained from immunization of mice with testicular germ cells alone. The American society for reproductive immunology 37th Annual Meeting (2017.9.18) Chicago
6. 永堀健太, 寺山隼人, 平井宗一, 倉升三幸, 曲寧, 宮宗秀伸, 李忠連, 小川夕輝, 林省吾, 伊藤正裕. マウス免疫学的雄性不妊症の標的自己抗原の同定の試み. 日本アンドロロジー学会第 36 回学術集会(2017.6.30) 岡山
7. 宮宗秀伸, 伊藤正裕. TESE の際に留意すべき精巢の組織環境 日本アンドロロジー学会第 36 回学術集会(招請講演)(2017.6.30) 岡山
8. Nagahori K, Hirai S, Terayama H, Kuramasu M, Qu N, Miyaso H, Li ZL, Ogawa Y, Hayashi S, Naito M, Sakabe K, Itoh M. Analysis of specific proteins for immunized with testicular germ cells alone in mice. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会(2017.3.30) 長崎

9. 永堀健太, 平井宗一, 寺山隼人, 倉升三幸, 曲 寧, 宮宗秀伸, 李忠連, 小川夕輝, 林 省吾, 伊藤正裕. EAO 血清抗体に特異的に反応する自己抗原タンパク質の同定. 第 31 回日本生殖免疫学会学術集会 (2016.12.3) 兵庫
10. 畑山直之, 曲 寧, 林省吾, 平井宗一, 倉升三幸, 永堀健太, 小川夕輝, 高橋薫平, 伊藤正裕. ラットにおける異所性精巣移植の試み. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (シンポジウム)(2016.3.29) 福島
11. Hirai S, Naito M, Terayama H, Qu N, Hatayama N, Hayashi S, Itoh M. Analysis of target antigens for testicular autoimmunity in mice. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会(2016.3.29) 福島
12. Qu N, Terayama H, Hirai S, Hayashi S, Hatayama N, Kuramasu M, Ogawa Y, Sakabe K, Itoh M. Testicular immune privilege and macrophage. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (シンポジウム)(2016.3.28) 福島
13. 平井宗一, 寺山隼人, 曲 寧, 畑山直之, 倉升三幸, 小川夕輝, 坂部貢, 伊藤正裕. 精巣におけるマクロファージの免疫寛容機構. 第 30 回日本生殖免疫学会総会・学術集会 (シンポジウム)(2015.11.21) 熊本

〔図書〕(計 1 件)

Masahiro Itoh, Springer, Testicular Autoimmunity-A Case of Male Infertility, 2017, 232.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：畑山 直之

ローマ字氏名：HATAYAMA, Naoyuki

所属研究機関名：愛知医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号 (8 桁)：80534792

研究分担者氏名：曲 寧

ローマ字氏名：QU, Ning

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号 (8 桁)：70527952

研究分担者氏名：平井 宗一

ローマ字氏名：HIRAI, Shuichi

所属研究機関名：東京医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：70516054

研究分担者氏名：林 省吾

ローマ字氏名：HAYASHI, Shogo

所属研究機関名：国際医療福祉大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8桁): 60349496

研究分担者氏名: 宮宗 秀伸

ローマ字氏名: MIYASO, Hidenobu

所属研究機関名: 東京医科大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号 (8桁): 80422252

研究分担者氏名: 李 忠連

ローマ字氏名: LI, Zhong-Lian

所属研究機関名: 東京医科大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号 (8桁): 80319532

研究分担者氏名: 永堀 健太

ローマ字氏名: NAGAHORI, Kenta

所属研究機関名: 東京医科大学

部局名: 医学部

職名: 助教

研究者番号 (8桁): 50759561

研究分担者氏名: 表原 拓也

ローマ字氏名: OMOTEHARA, Takuya

所属研究機関名: 東京医科大学

部局名: 医学部

職名: 助教

研究者番号 (8桁): 40800545

研究分担者氏名: 倉升 三幸 (北岡三幸)

ローマ字氏名: KURMASU(KITAOKA), Miyuki

所属研究機関名: 東京医科大学

部局名: 医学部

職名: 助手

研究者番号 (8桁): 70468643

研究分担者氏名: 小川 夕輝

ローマ字氏名: OGAWA, Yuki

所属研究機関名: 東京医科大学

部局名: 医学部

職名: 助手

研究者番号 (8桁): 20529250