

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18572

研究課題名(和文)自己免疫性精子形成障害における自己抗原の同定～種を越えた共通抗原の同定～

研究課題名(英文)Identification of testicular autoantigen in autoimmune orchitis

研究代表者

永堀 健太(Nagahori, Kenta)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：50759561

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):男性不妊症の約60%は特発性精子形成障害であり、特発性精子形成障害の精巣生検においては、リンパ球浸潤などが認められる症例も多く、何らかの免疫操作が関わっていると考えられている。しかしながら、これまでに自己免疫精巣炎が惹起される自己抗原の詳細は明らかになっていない。本研究では精巣自己抗原候補分子(Hspa41やGit1)によるマウスへの免疫化が実験的自己免疫性精巣炎(EAO)を誘発することを明らかにした。また、Hspa41とGit1に対する液性免疫と細胞性免疫の両方がEAO発症と密接に関連していることを実証し、ヒト男性不妊症の診断のためのバイオマーカーとして応用できる新たな可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性精子形成障害の精巣生検において、免疫グロブリンや補体沈着が認められる症例、つまり自己免疫性精子形成障害は多く報告されているが、その原因となる自己抗原の詳細については未だに不明である。本研究では実験的自己免疫精巣炎を誘導する因子を発見した。本研究の成果は、自己免疫性精巣炎の病因を理解するための新しいアプローチ法を提供し、自己免疫に基づく精子形成の障害に対する新しい診断法および検査法・治療法など新たな技術開発に対する重要な基礎的知見を提供する。

研究成果の概要(英文):Clinically, 60% of male infertility cases are categorized as idiopathic spermatogenic disturbance. In previous studies, lymphocytic infiltration and immune deposits were present in several testis biopsy specimens, indicating that inflammatory or immunological factors contribute to the occurrence of the lesions. However, autoimmunogenic antigens that induce autoimmune orchitis have not yet been identified. In this study, we found that immunization of male mice with testis-specific autoimmunogenic antigen (Hspa41 and Git1) was sufficient to induce experimental autoimmune orchitis. In addition, we demonstrated that both antibodies and T-cell activity against Hspa41 and Git1 are closely related to the pathogenesis of EAO, suggesting their utility as biomarkers of male infertility in humans.

研究分野：生殖免疫学

キーワード：精巣 自己免疫精巣炎 精子形成障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

男性不妊の原因の約 90%が「精子形成障害」であり、「精子形成障害」の原因の約 70%が特発性(原因不明)とされている。特発性精子形成障害の精巣生検では、リンパ球浸潤や免疫グロブリン・補体沈着が認められる症例も多く、それらに対しては、免疫学的機序の関与が考えられている。その大きな要因として、精子細胞・精子が免疫系の発達よりはるかに遅れて分化成熟してくるために、「強い自己免疫原性を持つ新たな抗原」を有するようになり、それら抗原が「自己でありながら非自己(異物)」として認識されることが挙げられている。これまでの先行研究によると、精巣の炎症を惹起させる自己抗原については、実験的自己免疫性精子形成障害(experimental autoimmune orchitis: EAO)モデルの血清自己抗体を用いた研究でいくつか抗原候補分子が挙げられている。さらに、マウスに、ラット雄性生殖細胞を皮下注射したところ自己免疫性精子形成障害を生じたと報告されており、種を越えた共通抗原の存在も示唆されている。しかしながら、これまでに細胞性免疫が惹起される自己抗原や共通抗原の詳細は未だ明らかになっていないのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者がマウス EAO モデルを用いてタンパク質および遺伝子の両面から同定した 18 種類の新規精巣自己抗原候補分子を用いて、[1]自己免疫性精子形成障害を惹起する自己抗原分子は何なのか？ [2]同定された自己抗原分子は種を越えて自己免疫性精子形成障害を引き起こすのか？という自己免疫性精子形成障害発症の機序とその原因分子という疾患の核心に迫る。本研究の結果は、ヒト男性不妊症の「検査法の開発」および「予防法の確立」に大きな進歩をもたらす。

3. 研究の方法

同定した精巣自己抗原候補分子は EAO を引き起こすか？

精巣自己抗原候補分子 ~ のプラスミドを HEK293T 細胞に導入し、産生物をカラム法により精製することで ~ のタンパク質を作成した(表 1)。この作成したタンパク質をそれぞれ 100 µg に調整し完全フロイントアジュバント(complete Freund's adjuvant: CFA)と不活化百日咳(*Bordetella pertussis*: BP)とともに A/J マウス(8 週齢)に 14 日間隔で 2 回皮下注射し、初回注射時から 40 日、60 日、120 日目に精巣や精巣上体を含む他の器官(脳、腎、腸管など)および血清をサンプリングした。その後、重量解析や組織学的解析(ヘマトキシリン・エオジン染色、免疫組織化学染色)を用いて解析を行った。

表 1. 精巣自己抗原候補分子

Number	Name
①	Tubulin, beta 2c1 (Tubb2c)
②	ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit A (Atp6v1a)
③	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta (Pdhb)
④	Heat shock protein 1-like: Hspa11 (Hsc70t)
⑤	Fructose biphosphatase 1 (Fbp1)
⑥	Leucine rich repeat containing 34 (Lrrc34)
⑦	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, spermatogenic (Gapdhs)
⑧	Pyruvate dehydrogenase E1 alpha 2 (Pdha2)
⑨	DAZ-associated protein 1 (Dazap1)
⑩	N-acetyltransferase 9 (Nat9)
⑪	Zinc and ring finger 4 (Znrf4)
⑫	Y box protein 1 (Ybx1)
⑬	Syntaxin 18 (Stx18)
⑭	Germ cell-specific gene 1 (Gsg1)
⑮	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit E (Eif3s)
⑯	Atlastin GTPase 3 (Atl3)
⑰	G protein-coupled receptor kinase-interactor 1 (Git1)
⑱	Heat shock protein 4 like (Hspa4l)

精巣自己抗原候補分子と T 細胞および血清自己抗体の反応性

雄性生殖細胞(Testicular germ cell: TGC)を 14 日間隔で 2 回皮下注射することで作成する EAO モデルマウスから T 細胞および血清自己抗体を採取し、精巣自己抗原候補分子との反応性を *ex vivo* 評価法を用いて確認する。具体的には採取した T 細胞と精巣自己抗原候補分子を共培養後、培養上清を回収し、ELISA 法で、リンパ球増殖能(MTT 法)などを用いて解析する。また、EAO モデルマウスから採取した血清自己抗体を用いて、96 ウェルプレートに固相化した精巣自己抗原候補分子と反応するかを ELISA 法により解析する。

4. 研究成果

マウス EAO を引き起こす精巣自己抗原の同定

18 種類の精巣自己抗原候補分子を CFA と BP を混合して 14 日間隔で 2 回皮下注射し、経時的(40 日後、60 日後、120 日後)に精巣、脳、腎臓、腸管を摘出し、組織学的に解析した。また、Control 群には、自己抗原候補分子を精製する際に用いた緩衝液と CFA と BP を混合したものの皮下注射し、同様に解析を行った。40 日後においてはマウス体重・精巣重量に変化は認められなかった。し

かしながら、120日後のマウス体重は実験群で変化は認められなかったが、精巣重量は自己抗原候補分子を皮下注射した実験群(熱ショックタンパク質(Hspa4l)、GTPase 活性化タンパク質(Git1)など)において有意に減少した($p < 0.05$)。精巣の組織学的観察では接種後40日目には精巣白膜周辺に多少のリンパ球が認められるようになり、120日目には精子形成障害を伴う自己免疫精巣炎様の炎症反応が高頻度で起きることが確認された(図1)。また、脳や腎臓、腸管をはじめとする他の臓器についても組織的観察を行ったが、炎症反応は認められなかった。したがって、今回精巣炎が観察された自己抗原候補分子(Hspa4l、Git1など)は精巣に特異的に炎症を引き起こす分子であることが示唆された。

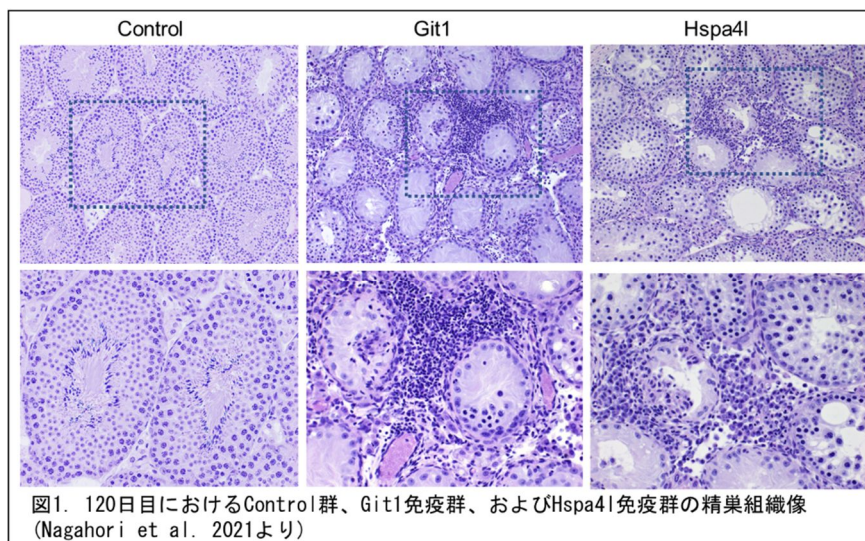


図1. 120日目におけるControl群、Git1免疫群、およびHspa4l免疫群の精巣組織像 (Nagahori et al. 2021より)

精巣自己抗原候補分子による免疫反応の検出 TGC 誘発 EAO マウスモデルから抽出した血清自己抗体とT細胞との反応性について検討を行った。各自己抗原候補分子を10、50、100および200 μg に調整し抽出したT細胞と共培養したところ、Hspa4lとGit1の2種類においてT細胞の活性化を意味する増殖反応が認められた($p < 0.05$)(図2)。また、ELISA法により各精巣自己抗原候補分子と血清自己抗体との反応性を確認したところ、T細胞解析と同様にHspa4lおよびGit1に反応する自己抗体が検出された($p < 0.05$)(図3)。この結果は、自己免疫精巣炎を引き起こす精巣自己抗原候補分子と一致しており、重要な結果だと考える。したがって、今回反応が認められた自己抗原候補分子(Hspa4l、Git1など)は免疫性の精巣炎を早期発見する極めて重要な因子であり、今後の検査法開発の一助となる可能性がある。

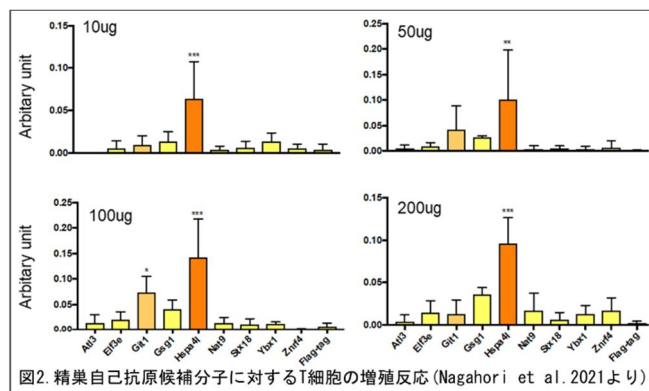


図2. 精巣自己抗原候補分子に対するT細胞の増殖反応 (Nagahori et al. 2021より)

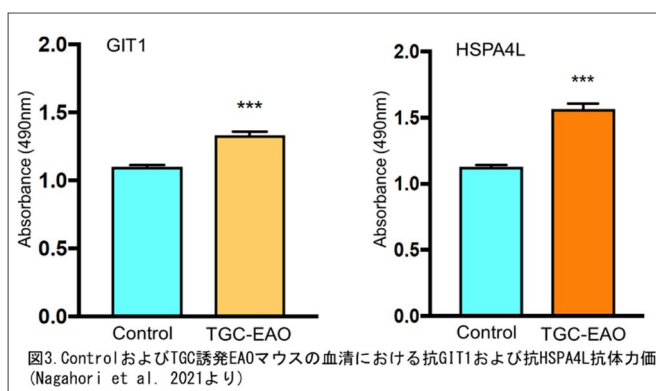


図3. ControlおよびTGC誘発EAOマウスの血清における抗GIT1および抗HSPA4L抗体力価 (Nagahori et al. 2021より)

現在、種を超えた共通抗原の同定のためにラットに対し同定したマウス自己抗原をアジュバントと共に接種し組織学的解析を行ったところ明らかなリンパ球浸潤及び精子形成障害は認められなかった。しかしながら、ラットに対しマウスTGCをアジュバントと共に接種したところリンパ球浸潤と精子形成障害が認められた。これはラット及びマウス間に自己免疫精巣炎を誘起する共通抗原が存在することを示しており、今後はこれら異種EAOモデルを用いた抗原解析および抗原接種量の検討が必要である。

引用文献

- 1) Nagahori K et al. Heat shock protein A4L is a potent autoantigen for testicular autoimmunity in mice. J Reprod Immunol. 2021 145:1033

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Qu Ning, Nagahori Kenta, Kuramasu Miyuki, Ogawa Yuki, Suyama Kaori, Hayashi Shogo, Sakabe Kou, Itoh Masahiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Effect of Gosha-Jinki-Gan on Levels of Specific mRNA Transcripts in Mouse Testes after Busulfan Treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 432 ~ 432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines8100432	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyaso Hidenobu, Nagahori Kenta, Takano Kaiya, Omotehara Takuya, Kawata Shinichi, Li Zhong-Lian, Kuramasu Miyuki, Wu Xi, Ogawa Yuki, Itoh Masahiro	4. 巻 31
2. 論文標題 Neonatal maternal separation causes decreased numbers of sertoli cell, spermatogenic cells, and sperm in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicology Mechanisms and Methods	6. 最初と最後の頁 116 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15376516.2020.1841865	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Qu Ning, Kuramasu Miyuki, Nagahori Kenta, Ogawa Yuki, Hayashi Shogo, Hirayanagi Yoshie, Terayama Hayato, Suyama Kaori, Sakabe Kou, Itoh Masahiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Co-Administration of the Traditional Medicines Hachimi-Jio-Gan and Hochu-Ekki-To Can Reverse Busulfan-Induced Aspermatogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1716 ~ 1716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21051716	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Kumpei, Nagahori Kenta, Qu Ning, Kuramasu Miyuki, Hirayanagi Yoshie, Hayashi Shogo, Ogawa Yuki, Hatayama Naoyuki, Terayama Hayato, Suyama Kaori, Hirai Shuichi, Sakabe Kou, Itoh Masahiro	4. 巻 19
2. 論文標題 The effectiveness of traditional Japanese medicine Goshajinkigan in irradiation-induced aspermatogenesis in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Complementary and Alternative Medicine	6. 最初と最後の頁 362 ~ 362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12906-019-2786-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Qu Ning, Ogawa Yuki, Kuramasu Miyuki, Nagahori Kenta, Sakabe Kou, Itoh Masahiro	4. 巻 19
2. 論文標題 Immunological microenvironment in the testis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 24 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12293	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 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	4. 巻 34
2. 論文標題 免疫寛容を受けていない精巣抗原遺伝子の同定	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reproductive Immunology and Biology	6. 最初と最後の頁 27 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mierxiati Saimi, Shota Moriya, Zhong-Lian Li, Hidenobu Miyaso, Kenta Nagahori, Shinichi Kawata, Takuya Omotehara, Yuki Ogawa, Hirotsugu Hino, Keisuke Miyazawa, Kou Sakabe, Masahiro Itoh	4. 巻 46
2. 論文標題 Cytonuclear Estrogen Receptor Alpha Regulates Proliferation and Migration of Endometrial Carcinoma Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The tokai journal of experimental and clinical medicine	6. 最初と最後の頁 7-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyaso Hidenobu, Takano Kaiya, Nagahori Kenta, Kawata Shinichi, Li Zhong-Lian, Kuramasu Miyuki, Wu Xi, Ogawa Yuki, Itoh Masahiro	4. 巻 102
2. 論文標題 Neonatal maternal separation increases the number of p27-positive Sertoli cells in prepuberty	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reproductive Toxicology	6. 最初と最後の頁 56 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reprotox.2021.03.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagahori Kenta, Hirai Shuichi, Hatayama Naoyuki, Kuramasu Miyuki, Omotehara Takuya, Kawata Shinichi, Li Zhonglian, Miyaso Hidenobu, Ogawa Yuki, Qu Ning, Terayama Hayato, Hayashi Shogo, Yi Shuang-Qin, Naito Munekazu, Itoh Masahiro	4. 巻 145
2. 論文標題 Heat shock protein A4L is a potent autoantigen for testicular autoimmunity in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 103318 ~ 103318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jri.2021.103318	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Omotehara Takuya, Nakata Hiroki, Nagahori Kenta, Itoh Masahiro	4. 巻 157
2. 論文標題 Comparative anatomy on the development of sperm transporting pathway between the testis and mesonephros	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 321 ~ 332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-021-02057-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagahori Kenta, Kuramasu Miyuki, Kawata Shinichi, Yakura Tomiko, Li Zhonglian, Hirai Shuichi, Qu Ning, Itoh Masahiro	4. 巻 157
2. 論文標題 GIT1 is an untolerized autoantigen involved in immunologic disturbance of spermatogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 309 ~ 319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-021-02061-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagahori Kenta, Qu Ning, Kuramasu Miyuki, Ogawa Yuki, Kiyoshima Daisuke, Suyama Kaori, Hayashi Shogo, Sakabe Kou, Yoshimoto Takayuki, Itoh Masahiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Changes in Expression of Specific mRNA Transcripts after Single- or Re-Irradiation in Mouse Testes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 151 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes13010151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永堀健太
2. 発表標題 GTPase活性化タンパク質（GIT1）免疫によるマウス自己免疫精巢炎
3. 学会等名 日本生殖免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永堀健太
2. 発表標題 GTPase活性化タンパク質（GIT1）の局在と自己免疫への関与
3. 学会等名 日本解剖学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永堀健太
2. 発表標題 熱ショックタンパク質（HSP）免疫によるマウス自己免疫精巢炎
3. 学会等名 日本生殖免疫学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------