

平成 22 年 4 月 12 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20791123
 研究課題名 (和文) マウス自己免疫性精子形成障害モデルにおける自己抗原の同定とその局在の解析
 研究課題名 (英文) Analysis of the autoantigens and its localization in murine experimental autoimmune orchitis
 研究代表者
 内藤 宗和 (NAITO MUNEKAZU)
 東京医科大学・医学部・講師
 研究者番号：10384984

研究成果の概要 (和文)：精子細胞・精子抗原は自身の免疫系により異物として認識されるが、血液-精巣関門によって免疫系から完全に守られていると考えられている。しかし、今回の研究により、直精細管および精巣網における血液-精巣関門の脆弱性を示した。また、自己免疫性精子形成障害モデルを用いたスクリーニングの結果から、その原因抗原となる可能性がある 18 の遺伝子候補を見出した。

研究成果の概要 (英文)：The testis is known as an immunologically privileged organ. In particular, the blood-testis-barrier (BTB) formed by Sertoli cells protects autoimmunogenic spermatids from attack by the self immune system. In our present study, we showed the BTB at the tubuli recti and the rete testis is incomplete. Moreover, 18 genes were found from the result of screening used by murine autoimmune orchitis model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 泌尿器科

キーワード：1. 精巣 2. 精子形成 3. 血液精巣関門 4. 自己免疫 5. 炎症

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

発性造精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。(畠山茂：人睾丸

萎縮の病理. 日病会誌 73, 3-29, 1984)。その大きな要因として、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、精子抗原が自身の免疫系により異物として認識されることが挙げられている。

申請者らは、同系マウスからの生きた生殖細胞（精祖細胞～精子）の反復皮下注射を行うことにより、アジュバントを用いないで自己免疫性精子形成障害を引き起こす疾患モデルを開発し様々な解析を行っている。従来のマウスの自己免疫性精子形成障害モデルは、精巣抗原と結核死菌を含んだ complete Freund's adjuvant を混合して皮下注射し、さらに非特異的免疫増強物質である百日咳死菌を静注して作成されてきた。しかし、我々のモデルは「免疫増強剤を用いて免疫反応を高めることなく、同系の精巣細胞のみを使うことで誘導できる」ということで、よりヒト自己免疫性精子形成障害に近いと考えられる。

このマウス自己免疫性精子形成障害モデルのリンパ球移入の解析により、CD4 陽性 T 細胞 (Th1) による遅延型過敏反応が自己免疫性精巣形成障害の主役となっており、病変の進展にはさらに免疫複合体や各種サイトカインが重要な因子であることがわかってきた。しかし、精巣内へのリンパ球浸潤機構、すなわち精巣内における autoreactive T cells への抗原提示のメカニズムは未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

正常の精巣間質には多くのマクロファージが存在し、抗原提示に関する Class II MHC antigens は精巣マクロファージに認められることが分かっている。また、申請者らは正常下で精巣マクロファージが密集している直精細管の周囲に一致して、自己免疫性精子形成障害モデルにおけるリンパ球浸

潤が始まることを報告してきた。そのため、自己免疫性精子形成障害モデルにおいて精巣マクロファージが抗原提示細胞としての役割を担っている可能性が考えられる。また、自己免疫性精子形成障害モデルにおいて自己抗原が精子・精子細胞にあることを免疫染色法にて確認している。しかしながら、マウス自己免疫性精子形成障害における自己抗原タンパク質は未だ同定されていない。そこで本研究では、免疫遺伝子学的手法を用いて自己抗原として認識されるタンパク質の同定を行い、そのタンパク質に対するモノクローナル抗体を作製し、それを用いて免疫電子顕微鏡法によって精巣内における自己抗原の局在を明らかにすることで、自己免疫性精子形成障害発症のための抗原提示のメカニズムを解明したい。

3. 研究の方法

(1) マウス自己免疫性精子形成障害発症に関わる精子・精子細胞の自己抗原タンパク質の同定

動物：マウスには精子・精子細胞の自己抗原に対して 100% の感受性を示す系統である A/J マウスを用います。

実験系：

① マウスに同系精子・精子細胞

(1×10^7 cells/animals) を 14 日間隔で 2 回皮下注射し自己免疫性精子形成障害モデルマウスを作成する。

② 自己免疫性精子形成障害モデルマウスから血清を分離する。

③ 正常の精巣から抽出した同系精子・精子細胞の poly(A)+RNA を鋳型として 2 本鎖 DNA を合成する。

④ 制限酵素アダプターを付加し、 λ ファージベクター(λ ZAP II)に挿入する。

⑤ ②で分離した血清をプローブとしてブラークハイブリダイゼーションによるスク

リーニングを行う。

⑥ スクリーニングによって採取したベクターをヘルパーファージに感染させることによってインサー cDNA の断片を

pBluescript SK-にサブクローニングする。

⑦ DNAシーケンサーによって塩基配列を決定する。

(2) 「同定した自己抗原に対するモノクローナル抗体の作製」

⑧ ⑦にて決定された塩基配列をもとにモノクローナル抗体を作成する。

(3) 「作製したモノクローナル抗体を用いた自己抗原の局在の研究」

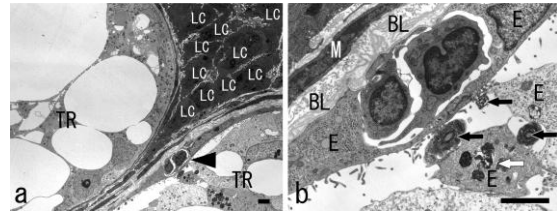
⑨ 免疫染色にて抗原提示タンパク質の発現部位を「自己免疫精子形成障害モデルの精巣」および「正常の精巣」において免疫組織化学的に解析する。

⑩ 免疫電子顕微鏡法を用い、自己抗原の局在を同定する。

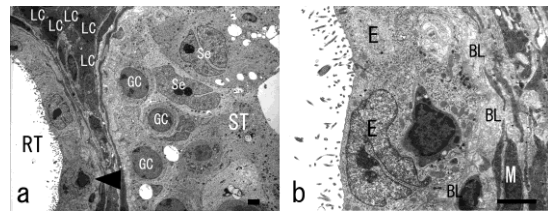
4. 研究成果

(1) 正常マウスの精巣における管腔内リンパ球の存在

正常マウスの精細管、直精細管、精巣網を光学顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いて観察した。また、対照群として自己免疫性精子形成障害モデルを作成し、比較検討した。その結果、リンパ球は精細管の中には全く観察されなかったが、極めて少数のリンパ球が直精細管と精巣網の基底膜を越えて8匹中2匹のマウスに観察された。また、これらのリンパ球は管腔内で精子に近接して存在していた。これらの結果により、正常下においても、リンパ球が直精細管と精巣網の中にある精子自己抗原を認識できる可能性を示した。〈Electron microscopical sections of the tubuli recti (TR) and the rete testis (RT) in normal mice.〉



Two lymphocytes (an arrowhead) have penetrated into the TR and were close to spermatozoa (black arrows). Phagosomes containing degenerated germ cell remnants (a white arrow) were observed in epithelial cells (E) of the TR. BL, basal lamina. LC, Leydig cell. M, myoid cell. Bar = 2 μ m.



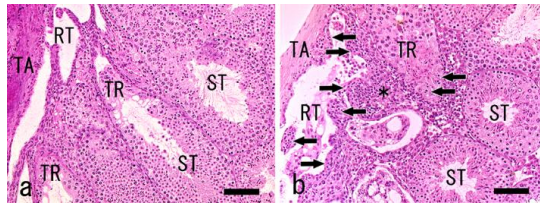
A lymphocyte (an arrowhead) had penetrated into the RT. It was located between two epithelial cells (E) of the RT. BL, basal lamina. GC, germ cell. LC, Leydig cell. M, myoid cell. Se, Sertoli cell. ST, seminiferous tubule. Bar = 2 μ m.

(2) 免疫性精子形成障害における初期像の解析

マウス免疫性精子形成障害モデルを作製し、光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡および免疫染色法を用いて初期像の形態学的解析を行った。その結果、直精細管周辺に最初に浸潤するリンパ球はT細胞系だけでなくB細胞系も存在することが分かった。また、直精細管上皮の変性を伴いながら、いくつかのリンパ球は直精細管の管腔へ侵入し、分化していた。これらの形態学的観察結果により、免疫性精子形成障害において直精細管の上皮はT細胞およびB細胞の最初の標的となる可能性

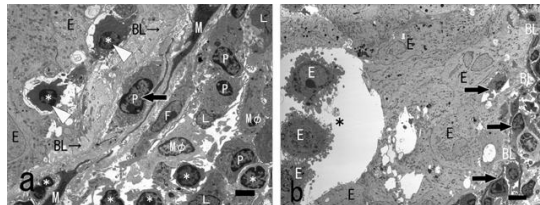
を示した。

<Light microscopical sections around the tubuli recti (TR) and the rete testis (RT) in a normal state (a) and at the initial stage of experimental autoimmune orchitis (b).>



An asterisk indicates lymphocytic infiltration around the TR and the RT. Arrows indicate the lymphocytes that had penetrated into the wall of TR and RT. ST, seminiferous tubule. TA, tunica albuginea. Bar=100 μ m.

<Electron microscopical sections around the tubuli recti (TR) at the initial stage of experimental autoimmune orchitis. >



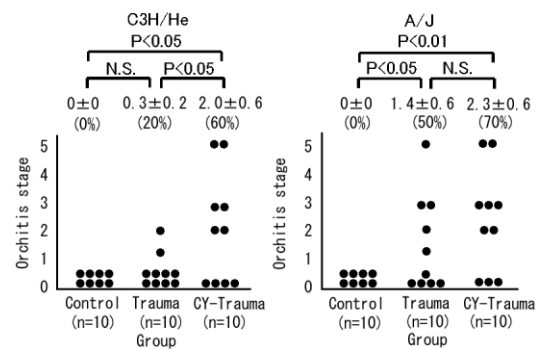
At the onset of EAO, some infiltrating lymphocytes (asterisks) and plasma cells (P) were seen. In particular, the solid arrow indicates a plasma cell penetrating beyond the myoid layer, and two white arrowheads indicate lymphocytes penetrating beyond the basal lamina (BL). Three TR epithelial cells (E) had become detached from the basal lamina and floated as a round form. F, fibroblast. M ϕ , macrophage. Bar=5 μ m.

(3) 片側精巣外傷で誘導される反対側精巣

の免疫性精子形成障害の形態解析

A/JマウスおよびC3H/Heマウスを用いて片側精巣外傷で誘導される免疫性精子形成障害モデルを作製し、光学顕微鏡による形態学的解析と遅延型過敏反応の測定を行った。その結果、外傷側は好中球優位の線維化変性が見られたが、反対側の精巣にはリンパ球浸潤を伴う精子形成障害を認めた。またA/JマウスはC3H/Heマウスよりも疾患感受性が高いことが分かった。

<The incidence and histopathological stage of ESO with or without CY pretreatment in A/J and C3H/He mice.>



The means \pm standard error are plotted. *P* values were obtained by means of the ANOVA/post-hoc test. N.S., not significant.

(4) 実験的自己免疫性精巣炎における原因抗原のスクリーニング

自己免疫性精巣炎に対して感受性の高いA/Jマウス精巣の精子・精子細胞から抽出した poly(A)+RNA を鋳型として cDNA を合成した。合成した cDNA に制限酵素アダプターを付加し、 λ ファージベクター(λ ZAP II)に挿入し、我々の自己免疫性精巣炎モデルマウスの血清を抗体としてプラークハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。陽性であったベクターを抽出した後、DNAシーケンサーによって塩基配列を決定し、

blast searchにて候補遺伝子を同定した。Data base上の情報から15個の遺伝子が精巣特異的発現をしており、また未解析の遺伝子が3個含まれていることがわかった。

これらの遺伝子の中に自己免疫性精巣炎を誘導する原因となる自己抗原たんぱく質が存在すると推測される。現在、予定していた研究計画に従い、これらの候補遺伝子を発現ベクターに組み込みタンパク質を抽出し実際投与することで自己免疫性精巣炎が誘導できるか実験を行っている。また、これらの候補遺伝子と免疫との関わりを調べる目的のため、発現解析を行っており、そのためのポリクローナル抗体の作製を行っている。

(5) 実験的自己免疫性精巣炎における自己抗原タンパク質の精製

スクリーニングの結果から、自己免疫性精巣炎 (Experimental autoimmune orchitis: EAO)の原因抗原となる可能性がある18の遺伝子を候補として挙げた。今年度は、候補遺伝子の発現タンパク質とEAO誘導の関与について vivoにて検討するにあたり、リコンビナントタンパクの作製を行った。

A/Jマウス精巣からとってきたmRNAを用いて、目的遺伝子のCDS全長をPCRにて増幅し、抽出した。増幅した目的遺伝子をGlutathione S-transferase (GST) 融合たんぱく質用発現ベクター (pDEST™15, invitrogen)に組み込み、DH5 α にトランスフォームし、シークエンスにて塩基配列を確認した。その後、BL21 (DE3)へトランスフォームし、IPTGを用いてタンパク質の発現を誘導した。タンパク質発現の有無は、抗GST抗体を用いて確かめた。培養温度、時間、IPTG濃度など様々な条件検討を行ったが、上記の方法ではタンパク質の発現を得ることができなかった。そこで、GST融合たんぱく質用発現ベクターを変更 (pGEX-2T) し、タンパク

質発現の誘導を行った。その結果、18ある候補遺伝子の中で、5つのタンパク質の誘導に成功した。得られたタンパク質は全て不溶性タンパク質であった。そのため、当初の計画ではGSTビーズにより、目的タンパク質のみを精製したものをマウスに感作し、EAOの誘導を試みる予定であったが、精製を行わずに感作し、炎症の誘導の有無を比較検討することにした。現在、発現誘導されたタンパク質の投与量の検討を行っている。また、まだ発現が得られていない13の遺伝子についても条件検討、ベクターの変更などを行い、目的タンパク質の誘導を試みる方針である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14件)

- ① Hirai S, Naito M, Terayama H, Ning Q, Miura M, Itoh M, Difference in abundance of blood and lymphatic capillaries in the murine epididymis, *Medical Molecular Morphology*, 査読有, 43, 2010, 37-42
- ② Naito M, Hirai S, Terayama H, Ning Q, Kawata S, Itoh M, Histopathology of the tubuli recti at the start of experimental autoimmune orchitis in mice, *Medical Molecular Morphology*, 査読有, 42, 2009, 230-235
- ③ Naito M, Sakamoto Y, Terayama H, Hirai S, Ning Q, Aota Y, Itoh M, Effect of unilateral testicular rupture on histopathology and germ cell delayed-type hypersensitivity in C3H/He and A/J mice, *Journal of Reproductive Immunology*, 査読有, 81, 2009, 55-61
- ④ Kawakita H, Tsuchida A, Miyazawa K, Naito M, Shigoka M, Kyo B, Enomoto M, Wada T, Katsumata K, Ohyashiki K, Itoh M, Tomoda

A, Aoki T, Growth inhibitory effects of vitamin K2 on colon cancer cell lines via different types of cell death including autophagy and apoptosis, *International Journal of Molecular Medicine*, 査読有, 23, 2009, 709-716

⑤ Naito M, Terayama H, Hirai S, Qu N, Moriyama H, Itoh M, The presence of intra-tubular lymphocytes in normal testis of the mouse, *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 査読有, 2008, 85, 91-96

⑥ Naito M, Itoh M, Patterns of Infiltration of Lymphocytes into the Testis Under Normal and Pathological Conditions in Mice, *American Journal of Reproductive Immunology*, 査読有, 59, 2008, 55-61, Review

⑦ Qu N, Terayama H, Naito M, Ogawa Y, Hirai S, Kitaoka M, Yi SQ, Itoh M, Caput epididymitis but not orchitis was induced by vasectomy in a murine model of experimental autoimmune orchitis, *Reproduction*, 査読有, 135, 2008, 859-866

⑧ Yokoyama T, Miyazawa K, Naito M, Toyotake J, Tauchi T, Itoh M, Yuo A, Hayashi Y, Georgescu MM, Kondo Y, Kondo S, Ohyashiki K. : Vitamin K2 induces autophagy and apoptosis simultaneously in leukemia cells, *Autophagy*, 査読有, 4, 2008, 629-640

⑨ Shuang-Qin Yi, Terayama H, Naito M, Hirai S, Alimujang S, Yi N, Tanaka S, Itoh M, Absence of the celiac trunk: Case report and review of the literature, *Clinical Anatomy*, 査読有, 21, 2008, 283-286

⑩ Terayama H, Shuang-Qin Yi, Naito M, Ning Qu, Hirai S, Kitaoka M, Iimura A,

Moriyama H, Steinke H, Itoh M, Right gonadal arteries passing dorsally to the inferior vena cava: embryological hypotheses, *Surgical and Radiologic Anatomy*, 査読有, 30, 2008, 657-661

⑪ Yo Tokunaga, Terayama H, Naito M, Ning Qu, Hirai S, Ogawa Y, Shuang-Qin Yi, Itoh M, Splenic cytokines in mice immunized with testicular germ cells. *International Journal of Andrology*, 査読有, 31, 2008, 471-476

⑫ Buhe S, Miyaki T, Saito T, Sawuti A, Terayama H, Naito M, Yi SQ, Itoh M, A study of the accessory hepatic vein to segments VI and VII with a morphological reconsideration of the human liver, *Surgical and Radiologic Anatomy*, 査読有, 30, 2008, 201-207

⑬ Nakamura Y, Ning Qu, Terayama H, Naito M, Shuang-Qin Yi, Moriyama H, Itoh M Structure of thymic cysts in congenital lymph nodes lacked mice, *Anatomia Histologia Embryologia*, 査読有, 37, 2008, 126-130

⑭ Shuang-Qin Yi, Li J, Terayama H, Naito M, Iimura A, Itoh M. : A rare case of inferior mesenteric artery arising from the superior mesenteric artery, with a review of the literature, *Surgical and Radiologic Anatomy*, 査読有, 2008, 30, 159-165

[学会発表] (計 7件)

① 内藤宗和、平井宗一、寺山隼人、曲寧、伊藤正裕
Morphological responses in testis, epididymis and vas deferens following neonatal estrogen treatment

日本生殖免疫学会 2008年10月23日 神戸国際会議場

② 内藤宗和、平井宗一、寺山隼人、曲寧、北岡三幸、小川夕輝、川村秀登、伊藤正裕

Morphological responses in testis, epididymis and vas deferens following neonatal estrogen treatment 日本生殖免疫学会 2008年7月4日 先斗町歌舞伎練場

③ 内藤宗和、平井宗一、寺山隼人、曲寧、川村秀登、中野隆、伊藤正裕

マウス新生児期エストロゲン投与による精路系の炎症惹起 日本解剖学会 2008年3月28日 岡山理科大学

③ Hirai S, Naito M, Terayama H, Qu N, Itoh M

Terminal stage of murine autoimmune orchitis 29th Annual Meeting of American Reproductive Immunology 2009年6月5日 McCormick Place, Chicago, USA

④ Qu N, Naito M, Terayama H, Hirai S, Qu N, Itoh M

Preliminary characterization of relevant autoantigens in murine testicular autoimmunity 29th Annual Meeting of American Reproductive Immunology 2009年6月5日 McCormick Place, Chicago, USA

⑤ Terayama H, Naito M, Hirai S, Qu N, Itoh M

Proteome analysis of target antigens for testicular autoimmunity in mice 29th Annual Meeting of American Reproductive Immunology 2009年6月5日

McCormick Place, Chicago, USA

⑥ 寺山隼人、内藤宗和、曲寧、平井宗一、伊藤正裕

精巣自己免疫における抗原の解析 日本解剖学会関東支部第19回懇話会(シンポジウム) 2009年6月27日 千葉大学

⑦ 内藤宗和、平井宗一、寺山隼人、曲寧、北岡三幸、小川夕輝

自己免疫性精子形成障害における微小環境の解析 第115回日本解剖学会総会・国学会集(シンポジウム) 2010年3月28日 岩手医科大学

[その他]
ホームページ等
<http://www.tokyo-med.ac.jp/anatomy/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤宗和 (NAITO MUNEKAZU)
東京医科大学・医学部・講師・
研究者番号：103843984

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：