

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590243

研究課題名(和文) 精子幹細胞の異種間移植法と *in vitro* 培養による精子形成への分化誘導法の確立研究課題名(英文) Establishment of the differentiation method to spermatogenesis by the xenogeneic transplantation of spermatogonia stem cells and the *in vitro* culture

研究代表者

曲寧 (Qu, Ning)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：70527952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：免疫不全マウスへの異種生殖細胞移植の研究が世界的に盛んに行われているが、免疫正常マウスにおける異種生殖細胞の免疫学的拒絶を詳細に調べた研究はない。本研究は免疫正常マウスに異種精原細胞を移植し、生殖細胞の生着および拒絶のメカニズムを解明した。移植する際精巣内微小環境での免疫寛容と精子形成の機構について解析し、ブスルファン前処置したマウスの精細管内TNF- α の増加と精巣間質にマクロファージの浸潤がみられ、アポトーシスを誘導するサイトカインのFas, FasL, caspase8の上昇とcaspase9の低下がみられた。さらに、精巣内抑制性サイトカインとM2マクロファージが関与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：There have been increasing reports on xenogeneic transplantation of mammalian male spermatogonial stem cells (SSCs). However, in most previous studies on xenogeneic SSCs transplantation, to avoid immunologic rejection, immunodeficient or immunosuppressed mice were used as the recipients, which were pre-treated with busulfan (Myleran, 1,4-butanediol methanesulfonate) for depletion of endogenous germ cells before the SSCs transplantation. This study demonstrated that in the testes of busulfan-treated immune-competent mice, the increase of TNF- α in the seminiferous tubule and the infiltration of the macrophage were seen in the interstitium, and the increase of apoptotic cytokine such as Fas, FasL, caspase8 and the decrease of caspase9 were detected. Furthermore, it was revealed that immune-suppressive cytokines and M2 macrophage in the testis are related with testicular immune privileged circumstances.

研究分野：生殖免疫学

キーワード：精子形成 精子幹細胞 異種移植 免疫寛容 マウス

1. 研究開始当初の背景

ヒト精原細胞を培養して精子を作らせるには、ブタなどの代替動物の精巣が不可欠であり、それには異種間精原細胞移植が必要である。現在、移植医療の分野では、臓器を移植された患者が拒絶反応を起こさないように遺伝子操作したクローンブタの作製に関する研究も盛んに行われている。精原細胞の異種間移植は、1996年 Brinster らによりラット精原細胞を免疫不全マウス精巣に移入して行われ、マウスの精巣上体からラットの精子が回収され、その精子を用いた受精にも成功した。次に、同じ方法でハムスター精原細胞をマウス精巣に移植する実験が行われ、精子形成が確認されている。さらに、イヌ、ブタ、サル、ヒトなどのドナー精原細胞がマウス精巣に生着することが分かり、現在、異種間精原細胞移植は生殖機能を解析するモデルとしても注目を集めている。これまでの異種間精原細胞移植では、宿主の免疫系による拒絶（排除）を避けるため、免疫不全マウスを宿主として用いてきた。そのため、免疫正常マウスを宿主に用いた異種間精原細胞移植の解析の報告は見当たらない。研究代表者らは、免疫正常マウスを宿主に用いて異種間精原細胞移植を行った場合でも、移植された精原細胞は免疫系に拒絶されない可能性が十分にあると考え、最近、ラット精原細胞を抗癌剤ブスルファン処理により精巣管内の生殖細胞を欠失させた免疫正常マウスに移植したところ、ラットの生殖細胞が生着し、正常に分化・成熟することを示され、さらに、この時、ラット精子形成に伴いラットとマウスに共通の精子形成促進因子が産生されていることを見出した。これより、この異種間精原細胞移植系は、精巣内微小環境での免疫寛容と精子形成の機構解明に有用と考えられる。この発見は、生殖組織とそれ以外の大半の組織での免疫寛容の程度の違いを再認識させられる結果となった。これは、近い将来は、男性不妊症の患者の精子幹細胞を *in vitro* 培養で増やし冷凍細胞のストックを作製し、必要に応じて融解後増やして、ヒトでの免疫反応が起こりにくいように遺伝子操作したブタの精巣に移植して精子形成を行わせ、患者由来の精子を大量に作らせるという代替移植医療にもつながる独創的な発見である。さらに、ラット精子形成に伴いラットとマウスに共通の精子形成促進因子が産生されていることも見出し、*in vitro* で培養した精子幹細胞を精子形成へ分化誘導する方法の開発につながる可能性も高い。

2. 研究の目的

精子幹細胞の *in vitro* 培養やその器官培養法による精子形成誘導には、個体の精巣が必要であるため、ヒト男性不妊症治療への応用を考えると、異種間精原細胞移植は不可欠である。そこで、本研究では、研究代表者らが最近見出した免疫正常マウスへのラット異種間精原細胞移植法を用いて、免疫正常マウスにラット精原細胞を移植し、移植された生殖細胞の生着（寛容）および拒絶（排除）と精子形成誘導に関する精巣内微小環境の要因を調べ、免疫寛容の誘導機構を解明し精子形成の促進因子の同定を試みる。

3. 研究の方法

ブスルファン処理した免疫正常マウス (C57BL/6) の精巣管内の生殖細胞を欠失させた後、ラット (SD) 精原細胞を移植した。100 日頃まで、経時的に精巣を摘出し組織学的解析を行い、移植したラット精原細胞の生着率を調べる。摘出した精子形成障害を起こした精巣と精子形成回復した精巣をホルムアルデヒド液で固定し、パラフィン包埋して光学顕微鏡切片を作成し、組織化学的に、免疫担当細胞・免疫グロブリン・補体 (CD4, CD8, B220, F4/80, C3, IgM, IgG, IgA)、増殖細胞 (BrdU, PCNA)、アポトーシス (Tunnel 法) を調べる。また、ブスルファン投与による精子形成障害を起こした精巣と精子形成回復した精巣から RNA およびタンパク質を抽出し、炎症性サイトカインと抑制性サイトカインの発現を PCR、ウエスタンブロッティングで解析する。

2012 年度

本研究の目的は、免疫正常マウスにラット精原細胞を移植し、生殖細胞の生着（寛容）および拒絶（排除）のメカニズムを解明することである。本年度は、ブスルファンの免疫抑制への影響を考察するため、ブスルファン処置したマウスの免疫機能と精子形成について解析した。まず、ブスルファンを投与したマウスの精巣内における生殖細胞の増殖 (PCNA) 細胞およびアポトーシス (Tunnel) 細胞の増減を検討した。また、蛍光活性化細胞選別装置 (FACS) を用いてブスルファンを投与したマウスの脾臓 T・B リンパ球を計測した。

2013 年度

昨年度のブスルファン処置したマウスの免疫機能と精子形成の解析の引き続き、今年度は精子形成誘導に関する精巣内微

小環境の要因を調べ、免疫寛容の誘導機構を解明し、ブスルファン処置したマウスの精巣内サイトカインと精巣間質にマクロファージについて調べた。同時に精子形成を回復させる条件を検討し、ブスルファンにより精子形成障害を回復方法が確立した。

2014 年度

前年度に引き続き、精子形成に改善効果のある液性因子の関与や精巣間質マクロファージの関与を検討した。ブスルファン投与による精子形成障害を起こした精巣と精子形成回復した精巣から RNA およびタンパク質を抽出し、TNF-a や IFN- γ などの炎症性サイトカインと IL-10 や IL-35 などの抑制性サイトカインの発現を PCR、ウエスタンブロッティングで解析した。差がある分子について、その発現を阻害する抗体や阻害剤を用いて、そのサイトカインの精子形成の関与を解析した。

2015 年度

2013 年度の結果から、マウス精子形成障害の精細管内 Tumor necrosis factor-a (TNF-a) の増加と精巣間質にマクロファージの浸潤がみられ、精子形成を回復させることにより精細管内 TNF-a と精巣間質にマクロファージの浸潤が低減することが明らかとなった。2015 年度は精巣間質に immune suppressive M2 マクロファージの機能について解析した。

4 . 研究成果

2012 年度

精巣重量と精子数はブスルファン投与後 2 日目では、コントロールに比較して有意な差を認めなかったが、ブスルファン投与後 60 日目ではブスルファン投与群において精巣重量、精子数ともに有意に減少した。精巣内の Tunnel 陽性細胞数は正常の精巣と同程度であったが、PCNA 陽性細胞数はブスルファン投与後 60 日目ではブスルファン投与群において有意に減少した。一方、脾臓重量はブスルファン投与後 2 日目ではブスルファン投与群で有意に減少していたが、ブスルファン投与後 60 日目では有意な差は認めなかった。更に、ブスルファン投与後 2 日目のブスルファン投与群では、コントロールと比べ Tリンパ球のマーカーである CD3 陽性細胞数と Bリンパ球のマーカーである B220 陽性細胞数とともに有意に減少するのに対し、ブスルファン投与後 60 日目では、有意な差は認めなかった。

2013 年度

ブスルファンを投与したマウスの精細管内 Tumor necrosis factor-a (TNF-a) の増加と精巣間質にマクロファージの浸潤がみられ、同時に精子形成を回復させる条件を検討し、精子形成を回復させることにより精細管内 TNF-a と精巣間質にマクロファージの浸潤が低減することが明らかとなった。この結果は障害した精子細胞によって誘発された精巣内免疫環境の変化と精巣炎のメカニズムの解析に新しいデータであり、精巣内微小環境での免疫寛容と精子形成の機構解明に有用と考えられる。

2014 年度

ブスルファン投与による精子形成障害を起こした精巣と精子形成回復した精巣から RNA を抽出し、アポトーシスを誘導するサイトカインの発現を real-time RT PCR で解析した。ブスルファンを投与したマウスの精巣 TNF-a, Fas, FasL, caspase8 の上昇と caspase9 の低下がみられ、caspase3 は有意な変化はなかった。

2015 年度

前年度に引き続き、精巣間質に immune suppressive M2 マクロファージの機能について解析したところ、抑制性サイトカインの IL-27 や IL-35 の共通分子である、EBI3 は精巣内に M2 マクロファージに発現して、EBI3 をノックアウトすると精子形成障害と炎症性サイトカインの IFN- γ の上昇がみられた。この結果により精子形成障害の改善作用機序への液性因子や精巣内マクロファージの関与が明らかになった。

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 21 件)

1. 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. Anatomical Science International. 90(4):264-74. 2015 (査読 有)
2. 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. *Reproductive Biology*. 15(3):163-71. 2015 (査読 有)
3. Hayashi S, Hirai S, Naito M, Kawata S, Qu N, Hatayama N, Terayama H, Moriyama H, Itoh M. Scimitar vein descending from the right inferior lobe to the inferior vena cava beneath the diaphragm: a rare case. *Anatomical Science International*. 90(2):123-5. 2015 (査読 有)
 4. Yoshimoto T, Chiba Y, Furusawa J, Xu M, Tsunoda R, Higuchi K, Mizoguchi I. Potential clinical application of interleukin-27 as an antitumor agent. *Cancer Sci*. 106 (9), 1103-1110, 2015. (査読 有)
 5. Mizoguchi I, Chiba Y, Furusawa J, Xu M, Tsunoda R, Higuchi K, Yoshimoto T. Therapeutic potential of interleukin-27 against cancers in preclinical mouse models. *Oncoimmunology*, 2015 May 27;4(10) (査読 有)
 6. 徐明利、曲寧、溝口出、古澤純一、千葉祐規乃、伊藤正裕、善本隆之：炎症疾患におけるTh17関連サイトカインIL-17, IL-22, IL-23の役割. *炎症と免疫* Vol. 23, No.2, 66-72, 2015
 7. Qu N, Naito M, Terayama H, Hirai S, Musha M, Itoh M. Chronological changes of delayed-type hypersensitivity in mice immunised with testicular germ cells alone. *Andrologia*. 46(5):556-63. 2014 (査読 有)
 8. Terayama H, Yoshimoto T, Hirai S, Naito M, Qu N, Hatayama N, Hayashi S, Mitobe K, Furusawa J, Mizoguchi I, Kezuka T, Goto H, Suyama K, Moriyama H, Sakabe K, Itoh M. Contribution of IL-12/IL-35 common subunit p35 to maintaining the testicular immune privilege. *PLoS One*. 2014 Apr 23;9(4):e96120. (査読 有)
 9. Naito M, Hirai S, Terayama H, Qu N, Hayashi S, Hatayama N, Kawamura H, Nakano T, Itoh M. Neonatal estrogen treatment with 17- β -estradiol induces inflammation in the ductuli efferentes, epididymis, and vas deferens, but not in the testis, provoking obstructive azoospermia. *Medical Molecular Morphology*. 47(1):21-30. 2014 (査読 有)
 10. Mizoguchi I, Yoshimoto T, Katagiri S, Furusawa J, Chiba Y, Mizoguchi J, Tauchi T, Ohyashiki J H, Ohyashiki K. Immunologic control of chronic myeloid leukemia leading to treatment-free remission. *J. Hematol. Transfus*. 2(3): 1024, 2014. (査読 有)
 11. Yoshimoto T, Mizoguchi I, Katagiri S, Tauchi T, Furusawa J, Chiba Y, Mizoguchi J, Ohyashiki J H, Ohyashiki K. Immunosurveillance markers may predict patients who can discontinue imatinib therapy without relapse. *Oncoimmunology* 2014 May 14;3: (査読 有)
 12. Qu N, Xu M, Mizoguchi I, Furusawa J, Kaneko K, Watanabe K, Mizoguchi J, Itoh M, Kawakami Y, Yoshimoto T. Pivotal roles of T-helper 17-related cytokines, IL-17, IL-22, and IL-23, in inflammatory diseases. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013:968549. (査読 有)
 13. Hirai S, Naito M, Terayama H, Qu N, Kuerban M, Musha M, Itoh M. Lymphangiogenesis in chronic inflammation in the testis. *Andrology* 1(1): 147-154. 2013 (査読 有)
 14. Ogawa Y, Itoh M, Hirai S, Suna S, Naito M, Qu N, Terayama H, Ikeda A, Miyaso H, Matsuno Y, Komiyama M, Mori C. Cadmium exposure increases susceptibility to testicular autoimmunity in mice. *J Appl Toxicol* 33(7):652-60. 2013 (査読 有)
 15. Kitaoka M, Hirai S, Terayama H, Naito M, Qu N, Hatayama N, Miyaso H, Matsuno Y, Komiyama M, Itoh M, Mori C. Effects on the local immunity in the testis by exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in mice. *J Reprod Dev* 59(5): 485-490. 2013 (査読 有)
 16. Musha M, Hirai S, Naito M, Terayama H, Qu N, Hatayama N, Itoh M. The effects of adjuvants on autoimmune responses against testicular antigens in mice. *J Reprod Dev* 59(2): 139-144. 2013 (査読 有)
 17. Chiba Y, Mizoguchi I, Mitobe K, Higuchi

- K, Nagai H, Nishigori C, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 enhances the expression of TRAIL and TLR3 in human melanomas and inhibits their tumor growth in cooperation with a TLR3 agonist poly(I:C) partly in a TRAIL-dependent manner. *PLoS One*, 2013 Oct 14;8(10) (査読 有)
18. Mizoguchi I, Yoshimoto T, Katagiri S, Mizuguchi J, Tauchi T, Kimura Y, Inokuchi K, Ohyashiki J H, Ohyashiki K. Sustained up-regulation of effector natural killer cells in chronic myeloid leukemia after discontinuation of imatinib. *Cancer Sci.* 104, 1146-1153, 2013. (査読 有)
 19. Qu N, Naito M, Li J, Terayama H, Hirai S, Itoh M. Xenogeneic and endogenous spermatogenesis following transplantation of rat germ cells into testes of immunocompetent mice. *Reprod Fert Develop* 24: 337-343. 2012 (査読 有)
 20. Kuerban M, Naito M, Hirai S, Terayama H, Qu N, Ikeda A, Musha M, Koji T, Itoh M. Involvement of Fas/Fas-L and Bax/Bcl-2 systems in germ cell death following immunization with syngeneic testicular germ cells in mice. *Journal of Andrology* (2012 Sep-Oct;33(5):824-31) (査読 有)
 21. Naito M, Hirai S, Terayama H, Qu N, Kuerban M, Musha M, Kitaoka M, Ogawa Y, Itoh M. Postinflammation stage of autoimmune orchitis induced by immunization with syngeneic testicular germ cells alone in mice. *Med mol morphol* 45(1): 35-44. 2012 (査読 有)
- [学会発表](計 11 件)
1. 曲 寧, 寺山隼人, 平井宗一, 林省吾, 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 (特別講演) 第 121 回日本解剖学会・全国学術集会 (2016.3.28-30) 福島
 2. Qu N, Hirayanagi Y, Hayashi S, Hirai S, Hatayama N, Kuramasu M, Ogawa Y, Naito M, Itoh M Goshajinkigan completely recover the severe aspermatogenesis after busulfan treatment in mice 第 120 回日本解剖学会・全国学術集会 第 20 回日本生理学会大会 合同大会 (2015.3.21-23) 神戸
 3. 小川夕輝, 倉升三幸, 曲 寧, 平井宗一, 林 省吾, 畑山直之, 伊藤正裕 微量カドミウム曝露は自己免疫性精子形成障害を増悪させる 第 29 回日本生殖免疫学会総会・学術集会 (2014.12.12-13) 東京
 4. 曲 寧, 平柳淑恵, 林省吾, 平井宗一, 畑山 直之, 倉升三幸, 小川夕輝, 伊藤正裕 ブスルファン処置マウスの精子形成障害における牛車腎気丸の治療効果 第 29 回日本生殖免疫学会総会・学術集会 (2014.12.12-13) 東京
 5. 寺山隼人, 内藤宗和, 善本隆之, 平井宗一, 曲 寧, 倉升三幸, 金沢輝久, 隅山香織, 坂部貢, 伊藤正裕 Contribution of IL-35 to maintaining the testicular immune privilege アンドロロジー学会第 33 回学術大会および第 20 回精子形成・精巣毒性研究会 (2014.6.12-13) 長野
 6. 小川夕輝, 倉升三幸, 曲 寧, 平井宗一, 林 省吾, 畑山直之, 内藤宗和, 伊藤正裕 微量カドミウム曝露は自己免疫性精子形成障害を増悪させる 第 20 回日本免疫毒性学会学術大会 (2013.9.12-13) 東京
 7. Hirayanagi Y, Qu N, Hirai S, Terayama H, Naito M, Nakamura Y, Itoh M The effect of busulfan on the immune system and spermatogenesis in immune-competent mice 第 118 回日本解剖学会・全国学術集会 (2013.3.28-30) 香川
 8. 北岡三幸, 平井宗一, 寺山隼人, 曲 寧, 畑山直之, 小川夕輝, 内藤宗和, 伊藤正裕 Low dose di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) exposure increases susceptibility to testicular autoimmunity in mice 第 118 回日本解剖学会・全国学術集会 (2013.3.28-30) 香川
 9. 曲 寧, 寺山隼人, 平井宗一, 平柳淑恵, 内藤宗和, 伊藤正裕 Autoimmune responses induced by immunization with xenogenic testicular germ cells alone

第 118 回日本解剖学会・全国学術集会
(2013.3.28-30)香川

10. 寺山隼人, 内藤宗和, 曲寧, 平井宗一, 畑山直之, 伊藤正裕 精巢とサイトカイン

第 118 回日本解剖学会・全国学術集会
(2013.3.28-30)香川

11. Qu N, Terayama H, Hirai S, Hirayanagi Y, Naito M, Itoh M Autoimmune responses induced by immunization with xenogenic testicular germ cells alone

日本アンドロロジー学会第 31 回学術大会ならびに総会および第 18 回精子形成・精巢毒性研究会 共同開催学会
(2012.6.29-30)兵庫

6 . 研究組織

(1)研究代表者

曲寧 (QU Ning)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：70527952

(2)研究分担者

伊藤 正裕 (ITOH Masahiro)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：00232471

善本 隆之 (YOSHIMOTO Takayuki)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：80202406