

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17591704
 研究課題名（和文） リンパ球移入および生殖細胞移植を用いた免疫性精子形成障害モデルの作成とその解析
 研究課題名（英文） Analyses of testicular autoimmunity by the use of transplantation of lymphocytes and germ cells
 研究代表者
 伊藤 正裕（ITO MASAHIRO）
 東京医科大学・医学部・教授
 研究者番号：00232471

研究成果の概要：

2005-2007 年度まで、自作のインジェクション装置「ガスバーナーでガラス管（1.0×90mm、Narishige 社）に熱を加えて、萎縮した精細管に移植可能な外径約 50um」を作成し、精細管内あるいは精巣網内注入法を確立した。また、C57BL/6j マウスおよび先天的に生殖細胞を欠いている w/w マウスに、蛍光緑発色するグリーンマウス（= C57BL/6-Tg(CAG/Acr-EGFP)C3-No1-FJ002Osb：精子を含むすべての細胞が蛍光緑発色するマウス）の生殖細胞を移植する実験を試み、移植 3 ヶ月後に移植されたマウスの精細管中に蛍光緑発色の細胞が散在（生着）することを観察しました。2008 年度は、C57BL/6j マウスをブスルファン（45mg/kg）処理し、精細管内の生殖細胞を欠失させた後に、それらマウス精巣への SD ラットの精祖細胞移植を行い、異種の移植細胞の生着または拒絶の比較解析を検討した。その結果、移植 3 ヶ月後マウスの精細管中にラットの生殖細胞が生着し分化することを観察した。また、移植されたマウスの精巣上体から精子を抽出して smear section を作成し、成熟したラットとマウスの両方の spermatozoa を確認した。ブスルファン処理されたマウスの精巣と異なり、マウス内因性精子形成もある程度回復が観られた。現在、ラット生殖細胞の nude あるいは scid マウスの精巣への移植による生殖細胞分化の研究が盛んに行われているが、本年度の研究の結果より、免疫正常マウスでも、ラットの生殖細胞の生着ができ、正常に分化・成熟することが分かった。さらに、ブスルファン処置後ラットの生殖細胞移植された精巣には、ラットの精子形成のみならず、マウス自身の精子形成も再生することが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	2,800,000	0	2,800,000
2006 年度	300,000	0	300,000
2007 年度	300,000	90,000	390,000
2008 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
総計	3,800,000	210,000	4,010,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：移植、AutoMACS、Green Mouse、busulfan、SCID、精細管、マウス

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90%が特発性（原因不明）とされている。特発性造精障害の精巢生検では、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、免疫学的機作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認識されることが挙げられている。マウスの自己免疫性精子形成障害モデルは、精巢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が、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）の反復皮下注射でアジュバントを用いないで疾患惹起する方法を開発し、疾患を引き起こす CD4 + T 細胞株を樹立した。また、最近では、片側精巢外傷により、反対側精巢にリンパ球浸潤と造精障害を起こす交感性精巢炎を、疾患誘導困難とされていたマウスで成功した。これらの疾患モデルを用いた様々な解析により、精子・精子細胞の自己抗原は、血液 精巢関門（セルトリ セルトリ関門）で免疫系から隔絶されているだけでなく、免疫学的には認識されているものの免疫調節（抑制）により拒絶されないでいることがわかってきた。

2. 研究の目的

臨床的に、特発性精子形成障害の患者には、精巢外傷、精巢捻転および精管結紮による精子抗原の免疫系への暴露の経歴が明かでない場合が多い。従来の免疫学的精子形成障害モデルの研究は、精巢抗原をマウスに免疫（皮下注射）して疾患を引き起こす方法で行われてきた。本研究では、「精子は、血液 精巢関門により免疫系より隔絶されていないが、自

己免疫反応を抑制する機構により宿主に拒絶されないでいる」という考えに立脚し、人工的な精巢抗原感作を行わずに、免疫系を修飾することによる男性不妊モデル作成を目指したい。そのために、nude よび scid マウスへの(1) Tリンパ球の移入と(2) 異型あるいは異種の生殖細胞の移植を組み合わせた実験を行い、それにより免疫学的造精障害を誘導することができるかどうかを様々な条件下で研究し、生殖細胞と免疫系の連関について解析したい。

3. 研究の方法

動物

- 1) ICR マウス () (5 週齢)
- 2) ICR nude マウス () (5 週齢) < 先天性胸腺欠損マウス >
- 3) C57BL/6j マウス () (5 週齢)
- 4) CB17/Icr-scid マウス () (5 週齢) < 先天性 T・B 細胞機能不全マウス >
- 5) SD ラット () (4-14 日齢)

実験系

正常マウス (ICR・C57BL/6j) と先天性免疫不全マウス (ICR nude・CB17/Icr-scid) を busulfan (40mg/kg) で処理し、精細管内の生殖細胞を欠失させた後に、それらマウス精巢への SD ラットあるいは異型マウスの精祖細胞移植を行い、生殖後 20-100 日後に、移植細胞の生着または拒絶の比較解析を行う。

解析項目

- 1) 重量解析：精巢重量と体重を測定する。
- 2) 精巢組織解析：摘出した精巢をブアン液で固定し、テクノビット包埋して光学顕微鏡切片を作成し、精子形成障害および炎症細胞浸潤の有無と程度を観察する。
- 3) 組織化学的解析：摘出した精巢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、(a) 免疫担当細胞・免疫グロブリン・補体 (CD4,

CD8, B220, F4/80, C3, IgM, IgG, IgA)
 (b) 増殖細胞 (BrdU, PCNA) (c) ア
 ポトーシス (Tunnel 法)

2005 年度

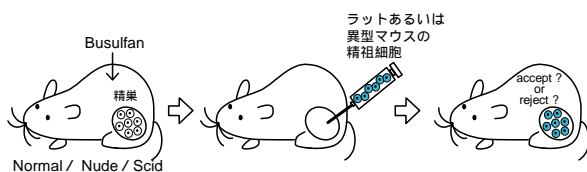
正常マウス (ICR・C57BL/6j) と先天性免疫不全マウス (ICR nude・CB17/Icr-scid) を busulfan (25-40mg/kg) で処理し、精細管内の生殖細胞脱落させを観察する。

2006 年度

正常マウス (ICR) と先天性免疫不全マウス (ICR nude) を busulfan (40mg/kg) で処理し、精細管内の生殖細胞を欠失させた後に、それらマウス精巣へのグリーンマウス (C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)C14-Y01-FM131Osb・C57BL/6-Tg(CAG/Acr-EGFP)C3-No1-FJ002Osb : 精子以外のすべての細胞が蛍光緑発色・精子を含むすべての細胞が蛍光緑発色) の精祖細胞移植を行い、生殖後 20-100 日後に、移植細胞の生着または拒絶の比較解析を行う。

2007-2008 年度

正常マウス (C57BL/6j) と先天性免疫不全マウス (CB17/Icr-scid) を busulfan (40mg/kg) で処理し、精細管内の生殖細胞を欠失させた後に、それらマウス精巣への SD ラットの精祖細胞移植を行い、生殖後 20-100 日後に、移植細胞の生着または拒絶の比較解析を行う。

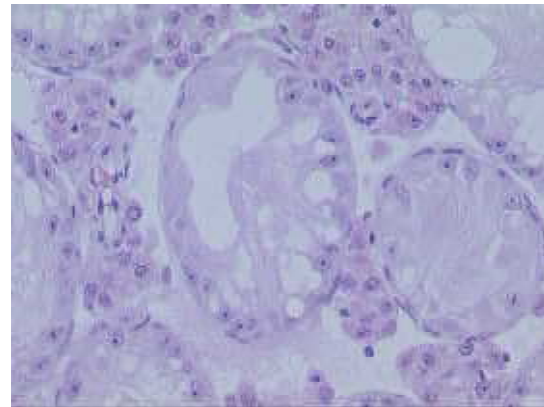


4. 研究成果

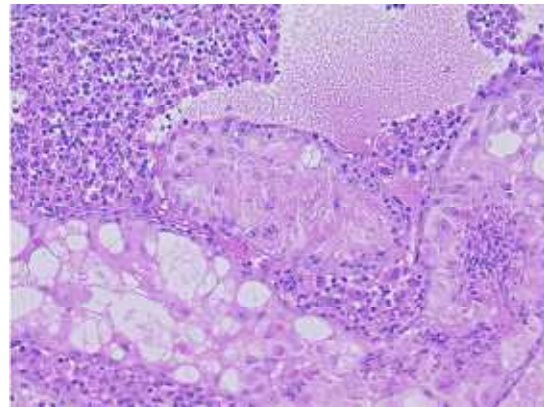
2005 年度

自作のインジェクション装置「ガスバーナーでガラス管 (1.0×90mm、Narishige 社) に熱を加えて、萎縮した精細管に移植可能な外径約 50μm」を作成し、精細管内あるいは精巣網内注入法を確立した。また、レシピエントマウスとして、雄 ICR nude および ICR マウスの精上皮をブスルファン (Sigma-Aldrich 社) の量 (25mg ~ 40mg/kg) やブスルファンの溶解方法 (DMSO や生理

食塩水の溶解量) など様々な方法で脱落させ観察し、その結果から投与方法 (40mg busulfan/DMSO+生理食塩水 300ul/mouse の腹腔内投与) や投与期間 (4 週間) を決定した。



ICR busulfan(40mg/kg) 4weeks



ICR nude busulfan(40mg/kg) 4weeks

2006 年度

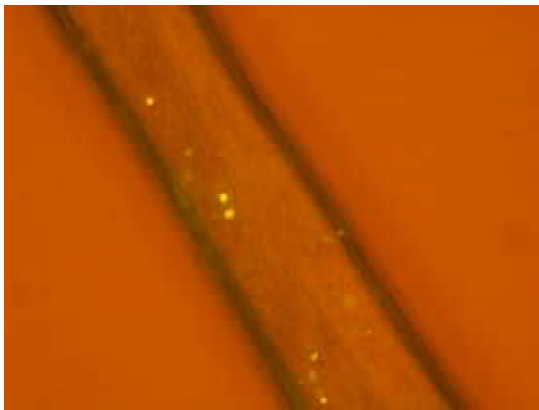
40mg busulfan (Sigma-Aldrich 社) / DMSO + 生理食塩水 300ul/mouse の腹腔内投与を行った naive ICR マウスおよび先天的に生殖細胞を欠いている w/w マウスにおいてグリーンマウス

(C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)C14-Y01-FM131Osb・

C57BL/6-Tg(CAG/Acr-EGFP)C3-No1-FJ002Osb : 精子以外のすべての細胞が蛍光緑発色・精子を含むすべての細胞が蛍光緑発色) 生殖細胞 (green SSCs) (3×10^6 cells) の移植を精巣網内注入法にて試み、3 ヶ月後にプレパラート上で精巣白膜を剥離及び精細管露出し、UV 蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、蛍光緑発色の細胞が散在し、negative control として上記 busulfan 投与した ICR マウスの精細管中には蛍光像が見られなかった事から、少なくともグリーンマウスの生殖細胞は精細管中に存在している事が明らかになった。



ICR green SSCs-transplanted 3months



ICR green SSCs-transplanted 3months

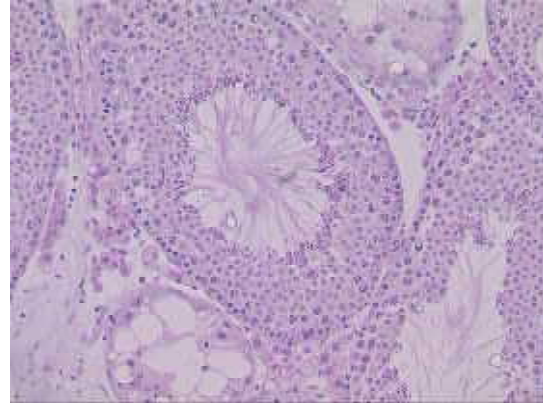
2007 年度

グリーンマウスのバックグラウンド種である C57BL/6j マウスをレシピエントとして同様の移植実験の検討を行い、生殖細胞生着を確認しました。また、ドナー生殖細胞を移植されたレシピエントの精巣を OCT compound 包埋して凍結切片を作成し、免疫組織化学的に免疫担当細胞 (CD4, CD8, B220, F4/80) とアポトーシス (Tunnel 法) 細胞の存在を検討したところ、グリーンマウス生殖細胞を移植した ICR scid、ICR nude、naive ICR マウスおよび w/w マウスの精巣中に CD4 陽性 T 細胞と B220 陽性 B 細胞の浸潤およびマクロファージが観察されましたが、w/w マウスは炎症細胞の浸潤の程度が他のマウスに比べ軽度であることがわかりました。また、Tunnel 陽性細胞の存在は正常の naive ICR の精巣と同程度でした。

2008 年度

C57BL/6j マウスをブスルファン (40mg/kg) 処理し、精細管内の生殖細胞を欠失させた後に、それらマウス精巣への異種の SD ラットの精祖細胞 (rat SSCs) 移植を行い、移植 3 ヶ月後マウスの精細管中にラットの生殖細胞が生着し分化することを観察した。また、移植されたマウスの精巣上体から精子を抽出して smear section を作成し、成熟したラットと

マウスの両方の spermatozoa を確認した。ブスルファン処理されたマウスの精巣と異なり、マウス内因性精子形成もある程度回復が観られた。



Testis rat SSCs-transplanted 3months



Epididymis rat SSCs-transplanted 3months



Smear of epididymal spermatozoa
rat SSCs-transplanted 3months

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 11 件)

Naito M, Sakamoto Y, Terayama H, Hirai S, Qu Ning, Aota Y, Itoh M.

Histopathology and delayed-type hypersensitivity of C3H/He and A/J mice after unilateral testicular rupture.

Journal of Reproductive Immunology 2009 (in press) 査読有

Naito M, Terayama H, Hirai S, Qu Ning, Moriyama H, Itoh M.

The presence of intra-tubular lymphocytes in normal testis of the mouse.

Okajimas Folia Anatomica Japonica, 85(3), 91-6, 2008, 査読有

Terayama H, Shuang-Qin Yi, Naito M, Qu Ning, 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, 30(8), 657-61, 2008, 査読有

Tokunaga Y, Terayama H, Naito M, Qu Ning, Hirai S, Ogawa Y, Shuang-Qin Yi, Itoh M.

Splenic cytokines in mice immunized with testicular germ cells.

International Journal of Andrology, 31(5), 471-476, 2008, 査読有

Qu N, Terayama H, Naito M, Ogawa Y, Hirai S, Kitaoka M, Shuang-Qin Yi, Itoh M.

Caput epididymitis but not orchitis was induced by vasectomy in a murine model of experimental autoimmune orchitis.

Reproduction, 135, 859-866, 2008, 査読有

Naito M, Itoh M.

Patterns of Infiltration of Lymphocytes into the Testis Under Normal and Pathological Conditions in Mice.

American journal of reproductive immunology, 59(1), 55-61, 2008, 査読有

Takahashi K, Naito M, Terayama H, Qu N, Cheng L, Tainosho S, Itoh M.

Immunomorphological aspects of the tubuli recti and the surrounding interstitium in normal mice.

International Journal of Andrology, 30(1), 21-27, 2007, 査読有

Miura Y, Naito M, Ablake M, Terayama H, Shuang-Qin Yi, Qu Ning, Cheng L, Suna S, Jitsunari F, Itoh M.

Short term effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on testes, liver, kidneys and pancreas in mice.

Asian Journal of Andrology, 9(2), 199-205, 2007, 査読有

Naito M, Terayama H, Nakamura Y, Hayashi S, Miyaki T, Itoh M.

Left testicular artery arching over the ipsilateral renal vein.

Asian Journal of Andrology, 8(1), 107-110, 2006, 査読有

Terayama H, Naito M, Nakamura Y, Iimura A, Tamatsu Y, Shimada K, Itoh M.

Corrosion Casts of Convolved Testicular Arteries in Mice and Rats.

Archives of Andrology, 51(6), 471-80, 2005, 査読有

Itoh M, Terayama H, Naito M, Ogawa Y, Tainosho S.

Tissue microcircumstances for leukocytic infiltration into the testis and epididymis in mice.

Journal of Reproductive Immunology, 67(1-2), 57-67, 2005, 査読有

[学会発表](計 36 件)

1. 曲 寧, 伊藤正裕, 免疫学的保護器官である精巣への異種生殖細胞移植の試み, 2009/3/28, 岡山理科大学

2. 寺山隼人, マウスにおける自己免疫性精巣炎を引き起こす自己抗原の解析, 第 114 回日本解剖学会総会, 2009/3/28, 岡山理科大学

3. 内藤宗和, 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, 第 114 回日本解剖学会総会, 2009/3/28, 岡山理科大学

4. 平井宗一, マウス自己免疫性精子形成障害モデルの終末期の解析, 第 114 回日本解剖学会総会, 2009/3/28, 岡山理科大学

5. 寺山隼人, マウス自己免疫性精巣炎を引き起こす自己抗原のプロテオーム解析, 第 23 回日本生殖免疫

- 学会総会, 2008/12/6, 富山国際会議場
6. 平井宗一, マウス自己免疫性精巣炎を引き起こす自己抗原の遺伝学的解析, 第 23 回日本生殖免疫学会総会, 2008/12/6, 富山国際会議場
 7. 内藤宗和, 新生児期エストロゲン投与による精路系の炎症惹起, 第 23 回日本生殖免疫学会総会, 2008/12/6, 富山国際会議場
 8. 寺山隼人, Analysis of target antigens for testicular autoimmunity in mice, 第 53 回日本生殖医学会総会, 2008/10/23, 神戸国際会議場
 9. 内藤宗和, Morphological responses in the testis, epididymis and vas deferens following neonatal estrogen treatment in mice. 第 53 回日本生殖医学会総会, 2008/10/23, 神戸国際会議場
 10. 内藤宗和, Morphological responses in the testis, epididymis and vas deferens following neonatal estrogen treatment in mice. 日本アンドロロジー学会第 27 回学術大会および第 13 回精子形成・精巣毒性研究会, 2008/7/4, 京都
 11. Hirai S, Analysis of target antigens for testicular autoimmunity in mice. 日本アンドロロジー学会第 27 回学術大会および第 13 回精子形成・精巣毒性研究会, 2008/7/4, 京都
 12. Naito M, Morphological responses in the testis, epididymis and vas deferens following neonatal estrogen treatment in mice. 28th Annual Meeting American Society for Reproductive Immunology, June 14th 2008, Chicago, USA
 13. Hirai S, Distribution of blood and lymphatic vessels in murine epididymis, 28th Annual Meeting American Society for Reproductive Immunology, June 14th 2008, Chicago, USA
 14. 寺山隼人, 環境毒性物質投与によるマウス精巣障害におけるサイトカイン変化, 第 22 回日本生殖免疫学会・学術集会, 2007/11/30, 東京
 15. 寺山隼人, Changes of cytokines production during testicular autoimmunity in mice, 第 72 回日本泌尿器学会東部総会, 2007/8/29, 札幌
 16. 内藤宗和, A rare case of bilateral multiple renal vessels associated with testicular vessels, 第 72 回日本泌尿器学会東部総会, 2007/8/29, 札幌
 17. Itoh M, Immunopathology of murine experimental autoimmune orchitis (EAO), 27th Annual Meeting of American Reproductive Immunology, 2007/5/14, Tronto Canada
 18. Terayama H, Changes of cytokines production during murine experimental autoimmune orchitis, 27th Annual Meeting of American Reproductive Immunology, 2007/5/14, Tronto Canada
 19. Naito M, Penetration of Lymphocytes into the tubular wall of normal testes in mice. An electron microscopic study, 27th Annual Meeting of American Reproductive Immunology, 2007/5/14, Tronto Canada
 20. 内藤宗和, 自己免疫性精巣炎における液性免疫因子の関与, 第 112 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2007/3/27, 大阪
 21. 伊藤正裕, 精子形成障害、受精 - 着床障害、習慣性流産 および妊娠中毒症の裏にある免疫進化的背景, 第 16 回 JMS(Jichi Medical School)不妊症診療勉強会, 2007/1/18, 自治医大
 22. 内藤宗和, 自己免疫性精巣炎における液性免疫因子の関与, 第 21 回日本生殖免疫学会・学術集会, 2006/12/2, 東京
 23. 内藤宗和, 両側重複腎血管の一例, 第 111 回日本解剖学会・全国学術集会, 2006/3/29, 神奈川

24. 内藤宗和, 実験的自己免疫性精巣炎の微細構造変化の解析, 第 20 回日本生殖免疫学会総会, 2005/12/2, 大阪
25. 寺山隼人, 特発性男性不妊モデルにおけるサイトカイン分泌動態, 第 20 回日本生殖免疫学会総会, 2005/12/2, 大阪
26. 内藤宗和, Tissue microcircumstance of experimental allergic orchitis induced by immunization with viable syngeneic testicular germ cells in mice, 第 156 回東京医科大学医学会総会, 2005/11/5, 東京
27. Terayama H, Detection of cytokines and hormone in murine experimental autoimmune orchitis, 第 10 回日本生殖内分泌学会, 2005/11/3, 東京
28. 内藤宗和, 実験的自己免疫性精巣炎の微細構造変化の解析, 第 37 回日本臨床分子形態学会総会ならびに学術講演会, 2005/9/30, 大阪
29. Itoh M, Experimental sympathetic orchitis in C3H/He and A/J mice 4th Asian-Pacific International Congress of Anatomists, 2005/9/7, Turkey
30. Naito M, Electron microscopical changes of experimental autoimmune orchitis (EAO) induced by immunization with viable syngeneic testicular germ cell alone, 4th Asian-Pacific International Congress of Anatomists, 2005/9/7, Turkey
31. Terayama H, Detection of cytokines in murine experimental autoimmune orchitis, 4th Asian-Pacific International Congress of Anatomists, 2005/9/7, Turkey
32. 伊藤正裕, 精子形成障害の免疫学的組織環境, 第 24 回日本アンドロロジ-学会学術大会および第 10 回精子形成・精巣毒性研究会, 2005/7/22, 横浜
33. 寺山隼人, Detection of cytokines in murine experimental autoimmune orchitis, 第 24 回日本アンドロロジ-学会学術大会および第 10 回精子形成・精巣毒性研究会, 2005/7/22, 横浜
34. 内藤宗和, Electron microscopical changes of experimental autoimmune orchitis

(EAO) induced by immunization with viable syngeneic testicular germ cell alone, 第 24 回日本アンドロロジ-学会学術大会および第 10 回精子形成・精巣毒性研究会, 2005/7/22, 横浜

35. 寺山隼人, 精巣動脈及び卵巣動脈の走行異常, 第 110 回日本解剖学会総会・国学術集会, 2005/3/29, 富山

36. 内藤宗和, Testicular artery arching over renal vein; A possible cause of renal vein hypertension, 第 110 回日本解剖学会総会・国学術集会, 2005/3/29, 富山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 正裕 (ITO Masahiro)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：00232471

(2) 研究分担者

寺山 隼人 (TERAYAMA Hayato)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：00384983

内藤 宗和 (NAITO Munekazu)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：10384984

平井 宗一 (HIRAI Shuichi)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：70516054

易 勤 (YI Tsutomu)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：70334753

(3) 連携研究者

