

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 23 年 9 月 20 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790572

研究課題名（和文） 精子・精子細胞を用いた雄性避妊ワクチン開発の試み

研究課題名（英文） Male contraceptive vaccine using the sperm and the spermatid in mice

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）：男性免疫性不妊のモデルである自己免疫性精子形成障害マウスを用いて、精子・精子細胞自己抗原を用いた雄性避妊ワクチンの開発を試みた。その結果、18の遺伝子候補の中から、5つのタンパク質の誘導に成功した。5つのタンパク質により、軽度の自己免疫反応が見られた。また、自己免疫性精子形成障害マウスの炎症の終末像の病態を明らかにした。これらの結果は、避妊ワクチンの開発に繋がるものである。

研究成果の概要（英文）：Experimental autoimmune orchitis (EAO) is a model of immunological inflammation demonstrating development of male infertility. We tried to develop the male contraceptive vaccine using murine EAO model induced by the immunization of sperm and spermatid antigens. The results showed that five kinds of protein from candidating 18 genes were adequate for induction of EAO. Moreover, we clarified the pathology of post-active inflammation stage of EAO. These results lead to the development of male contraceptive vaccine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学 社会医学

科研費の分科・細目：公衆衛生学・健康科学

キーワード：1. 精巣 2. 精子形成 3. 男性不妊 4. 人口爆発 5. ワクチン

1. 研究開始当初の背景

不妊と避妊は表裏一体の関係にあり、不妊の原因を追究してその機序を解明することは、不妊の治療に貢献するだけで

なく、新たな避妊法の開発にもつながる重要な研究課題である。不妊の原因は多岐にわたるが、免疫因子の関与が数多く

報告され、女性側の原因として「抗透明帯抗体」と「抗精子抗体」の存在が明らかになった。しかし、男性免疫性不妊の原因は未だ分かっていない。近年では、人工授精を基軸とした生殖補助技術の進歩により、免疫性不妊患者の治療成績は著しく向上してきた。

一方、発展途上国を中心とした爆発的な人口増加の抑制策として、人為的に免疫性不妊を誘導する避妊ワクチンの開発が WHO（世界保健機構）を中心に検討されている。その抗原候補として、免疫性不妊に関連する「透明帯特異抗原」と「精子特異抗原」が注目されている。透明帯特異抗原はヒトを含めた多くの動物で各糖タンパク（ZP1、ZP2、ZP3）の構造遺伝子が同定された。その遺伝子組換えタンパクを用いた雌に対する避妊ワクチンが開発され、すでに犬や馬などの動物に応用されている。他方、精子特異抗原は、避妊を誘導する抗原を同定するには至っておらず、候補となる抗原（LDH-C4、PH20、RSA など）を用いて研究が進められている。しかし、これらの研究の主な実験の対象は雌であり、雄に対する避妊ワクチンの開発は非常に遅れている。その理由として、免疫性不妊症は女性側の因子を中心に研究が進められてきたため、男性免疫性不妊症の原因の解明が遅れていることが挙げられる。

2. 研究の目的

申請者らは、男性免疫性不妊のモデルである自己免疫性精子形成障害マウスを

独自に開発し、解析を行ってきた。最近、その疾患モデルの血清中 IgG 抗体が特異的に精子・精子細胞に結合することを利用して、新たな精子・精子細胞自己抗原の同定に成功した。これらの自己抗原の中には、特異的に自己免疫性精子形成障害を引き起こす原因抗原が含まれている可能性が高く、その原因抗原を解明することができれば、男性避妊ワクチンの開発につながると考えている。本研究では、これら 18 の遺伝子から自己抗原タンパク質を精製し、マウスに感作することで自己免疫性精子形成障害を引き起こす原因抗原を同定したい。その上で、原因抗原の感作によって免疫環境変化、内分泌環境変化および精巣以外の臓器に影響がないかどうかを解析し、男性避妊ワクチンの開発につなげていきたい。

3. 研究の方法

本研究は、免疫性精子形成障害を引き起こす原因抗原を同定し、男性ワクチンを開発することが目的です。そこでまず、申請者らが免疫性精子形成障害モデルの血清 IgG 抗体から同定した 18 の遺伝子を用いてタンパク質を精製し、マウスに感作します。感作したマウスの妊孕性を確認し、精巣を組織学的に解析することで、免疫性精子形成障害を引き起こす原因抗原を同定します。次に同定した原因抗原を免疫した場合に起こる内分泌環境変化および他臓器障害の有無を調べ、男性避妊ワクチンの開発を目指します。

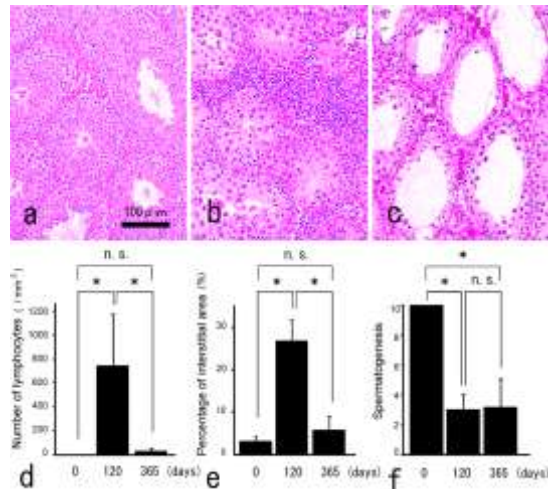
4. 研究成果

(1) 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

昨年度、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の遺伝子から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。誘導したタンパク質5種類をEAOに感受性が高いA/Jマウスに免疫し、自己免疫性精子形成障害が誘導されるかどうか検討した。タンパク質5種類の容量をそれぞれ10 μ g、20 μ g、50 μ gとし、complete Freund's adjuvant (フロイト完全アジュバント)とBordetella pertussis (百日咳死菌)を混合して2週間間隔で2回皮下注射し、EAO誘導を試みたが、発症は軽度であった。そこで5種類のタンパク質10 μ gを同時に同じマウスに皮下注射することを試みたが、EAOの発症は軽度だった。現在、容量と投与回数を変えて、どのタンパク質がEAOを強く誘導するかどうかを検討中である。また、18ある候補遺伝子の中で、まだ発現が得られていない13の遺伝子は、GST融合たんぱく質用発現ベクターをpGEX-2Tとし、大腸菌を用いてタンパク質の誘導を試みたが、十分な誘導が困難であった。そこで現在、動物細胞を用いて条件検討、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ている。

(2) 自己免疫性精巣炎の終末像

自己免疫性精巣炎の終末像は、ヒト特発性精



巣炎の病理像と非常に似た病態であることが分かった。

Light microscopy of EAO on days 0 (a), 120 (b), and 365 (c). The number of lymphocytes / mm² testicular tissue (d), the ratio of interstitial area / testicular tissue (e), and Johnsen's score (f) were given for each section on days 0, 120 and 365. Data were expressed as means \pm SD, and the ANOVA/post-hoc test was employed for statistical analysis on days 0, 120 and 365.

Parameters	Idiopathic spermatogenic disturbance in men	Late stage of murine EAO
① Lymphocytic inflammation	resolution	resolution
② Sertoli only syndrome	20%	100%
③ Maturation arrest	62%	100%
④ Deposits of IgG and C3	54%	100%
⑤ Hypertrophied basal lamina	84%	100%
⑥ Leydig cell accumulation	76%	100%

P>0.05 was considered not significant. n. s., not significant. * P<0.001.

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 18 件)

Naito M, Hirai S, Terayama H, Qu N, Kuerban M, Musha M, Kitaoka M, Ogawa Y, Itoh M. : Post-inflammation stage of autoimmune orchitis induced by immunization with syngeneic testicular germ cells alone in mice. *Medical Molecular Morphology* (in press)

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. *Reproduction, Fertility and Development* (in press)

Hatayama N, Naito M, Hirai S, Kozhima T, Seki K, Li X, Itoh M. : Preservation by Desiccation of Isolated Rat Hearts for 48 Hours using Carbon Monoxide (PCO = 4,000 hPa) and Oxygen (PO₂ = 3,000 hPa) Cell Transplant. (in press)

Nishimori H, Hayashi S, Naito M, Murakami G, Fujita M, Hosokawa M. : Mucosal lymphatic vessels of the esophagus distant from the cancer margin: morphometrical analysis using 27 surgically removed specimens of squamous cell carcinoma located in the upper or middle thoracic esophagus. *Okajimas Folia Anatomica Japonica* (in press)

Mihara M, Hayashi Y, Iida T, Moriguchi H, Hara H, Yamamoto T, Narushima M, Todokoro T, Uchida G, Hayami S, Sawamoto N, Naito

M, Koshima I. Autologous groin lymph node transfer for lymph network reconstruction after head-and-neck cancer resection and neck lymph node dissection: a case report. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* (in press)

Naito M, Terayama H, Hirai S, Ning Q, Yi SQ, Miyaki T, Itoh M. : Multiple renal vessels associated with testicular vessels. *Surgical and Radiologic Anatomy* 2011 Sep;33(7):637-9.

Terayama H, Itoh M, Naito M, Hirai S, Qu N, Kuerban M, Musha M. : Experimental model of autoimmune orchitis with abdominal placement of donor's testes, epididymes and vasa deferentia in recipient mice. *Journal of Reproductive Immunology* 2011 Aug;90(2):195-201.

Tainosho S, Naito M, Hirai S, Terayama H, Qu N, Itoh M. : Multilayered structure of the basal lamina of the tubuli recti in normal mice. *Medical Molecular Morphology* 44: 34-38 (2011)

Kawaguchi T, Miyazawa K, Moriya S, Ohtomo T, Che X, Naito M, Itoh M, Tomoda A. : Combined treatment with bortezomib plus bafilomycin A1 enhances cytotoxic effect along with induction of endoplasmic reticulum (ER) stress in U266 myeloma cells: Crosstalk among proteasome, autophagy-lysosome, and ER Stress. *International journal of oncology* 38:643-654 (2011)

Naito M, Yi SQ, Terayama H, Hirai S, Qu N, Itoh M. : A left testicular artery arising from a middle mesenteric artery. *Clinical anatomy* 24:266-267 (2011)

Terayama H, Naito M, Qu N, Hirai S, Kitaoka M, Ogawa Y, Itoh M. : Intra-testicular expression of mRNAs of both interferon γ and tumor necrosis factor α is significantly increased in experimental autoimmune orchitis in mice. *The journal of reproduction and development* 57:296-302 (2011)

Miyaso H, Komiyama M, Matsuno Y, Naito M, Hirai S, Itoh M, Mori C. : The Changes of Cortactin p80/85 Isoform Profiles and Tyrosine Phosphorylation Status during Spermatogenesis in the Mouse Testis. *Journal of Andrology* 31:507-518 (2010)

Qu N, Naito M, Terayama H, Hirai S, Li J, Ogawa Y, Kitaoka M, Itoh M. : Developmental ontogeny of autoantigens associated with localized autoimmunity in murine testis and epididymis. *Journal of Reproductive Immunology* 87: 45-51 (2010)

Li J, Yi SQ, Terayama H, Naito M, Hirai S, Qu N, Wang HX, Yi N, Ozaki N, Itoh M. : Distribution of ghrelin-producing cells in stomach and the effects of ghrelin administration in the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Neuro Endocrinology Letters* 31: 406-412 (2010)

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* 43:37-42 (2010)

Wang H, Yi S, Li J, Terayama H, Naito M, Hirai S, Ning Q, Yi N and Itoh M. : Effects of splenectomy on spontaneously chronic pancreatitis in aly/aly mice. *Clinical and Developmental Immunology* 2010:614890 (2010)

Ohtomo T, Miyazawa K, Naito M, Moriya S, Kuroda M, Itoh M, Tomoda A. : Cytoprotective effect of imatinib mesylate in non-BCR-ABL-expressing cells along with autophagosome formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391: 310-315 (2010)

[学会発表] (計5件)

学内 学会発表・一般講演 Autoimmune orchitis is one of main causes of idiopathic male infertility? 第167回東京医科大学医学会総会(2011.6.4)東 Munekazu Naito, Shuichi Hirai, Hayato Terayama, Ning Qu, Maimaiti Kuerban, Muhetaerjiang Musha, Yuki Ogawa, Masahiro Itoh

国内 学会特別講演・招待講演 自己免疫性精子形成障害における微小環境の解析 第43回日本臨床分子形態学会総会・学術集会(2011.9.9-10)大阪 内藤 宗和

国際 学会一般講演 Pathology of post-inflammation stage of autoimmune orchitis induced by immunization with syngeneic testicular germ cells alone in

mice 6th European Congress of
Andrology (2010. 9. 29-10. 1) Greece
Munekazu Naito, Shuichi Hirai, Hayato
Terayama, Ning Qu, Masahiro Itoh

国際 学会特別講演・招待講演 Autoimmune
orchitis is one of main causes of
idiopathic male infertility?

International Symposium for Immunology of
Reproduction/25th Annual meeting of Japan
Society for Immunology of Reproduction,
Joint Meeting (2010. 8. 29-30) 大阪 Munekazu
Naito, Shuichi Hirai, Hayato Terayama,
Ning Qu, Masahiro Itoh

国内 学会一般講演 ヒト特発性精子形成障
害と類似した病理像を呈するマウス自己免
疫性精巣炎の後期像 日本アンドロロジー学
会 第29回学術大会ならびに総会および第16
回精子形成・精巣毒性研究会共同開催学会
(2010. 7. 30-31) 東京 内藤 宗和, 平井 宗
一, 寺山 隼人, 曲 寧, 北岡 三幸, 小
川 夕輝, 伊藤 正裕

[図書] (計 1件)

邦文 編集・監修 「スunksの生物学」IV-
5 : 生殖器 学会出版センター 15
9-169 2011 内藤 宗和, 平井
宗一, 寺山 隼人, 伊藤 正裕, 九郎
丸正道*, 木曾 康郎*

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[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・医学科・人体構造
学講座・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 :