

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23500504

研究課題名(和文)再現性の高い免疫性不妊モデルの樹立とその予防・治療の試み

研究課題名(英文) Establishment of a highly reproducible model of immunological male infertility with analyses of related testicular autoantigens

研究代表者

伊藤 正裕 (Itoh, Masahiro)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：00232471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：2011年度は、マウスにおける新しい実験的自己免疫性精巣炎(EAO)モデルを、ドナーから摘出した精巣・精巣上体・精管を同系のレシピエントの腹膜に縫い付けて、レシピエントに精巣炎のみが起こることで確立した。この方法は簡便かつ確実にEAOを誘導するモデルとして普及しやすいと考えられる。2012-2014年度は、EAOを誘導する自己抗原の解析を行い、精巣特異的抗原タンパク質のSpotsを回収し、MS解析法にてEAOの抗原タンパク質を同定した。現在、確定できたタンパク質を回収してアミノ酸配列を決定し、「精製抗原」を大腸菌に作らせたものを解析することで、EAOを誘導する抗原の特定に繋がると考えた。

研究成果の概要(英文)：Experimental autoimmune orchitis (EAO) is one of the models of immunological male infertility. To establish a highly reproducible model of EAO, in 2011, we found that only one placement of a syngeneic donor's testes, epididymides and vasa deferentia into the abdominal cavity was sufficient to induce EAO on the recipient's testes in mice. It was also noted that the placement of testes, epididymides and vasa deferentia induced only orchitis without epididymo-vasitis. At the next three years, the testicular autoantigens were identified using sera obtained from EAO-affected mice. The testicular proteins were separated using two-dimensional gel electrophoresis, and the autoantigen proteins were identified by Western blotting and Mass spectrometry. Some identified testicular specific autoantigens have not been reported previously, and the clarification of these proteins will facilitate new approaches for understanding EAO.

研究分野：実験医学

キーワード：精子形成 自己免疫性精巣炎 自己抗原 タンパク質同定 マウス

### 1. 研究開始当初の背景

男性不妊症の大半が「造精機能障害」であり、その大部分が原因不明の「特異性」である。実際の「特異性造精機能障害」には、免疫学的因子(自己免疫・感染免疫)がかなり関与していると考えられる。最近、申請者らは精巣へのリンパ球浸潤と精子形成障害を引き起こす「実験的自己免疫性精巣炎(Experimental autoimmune orchitis = EAO)」の終末期像が、リンパ球浸潤の消失、精上皮の Maturation arrest や Sertoli cell only syndrome および精細管基底膜の肥厚を呈するなど、ヒト特異性造精機能障害の病理組織像と酷似していることを見だした。マウス EAO 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)の回復皮下注射でアジュバントを用いなくて疾患惹起する方法を開発した。しかし、この EAO モデルでは、特定の純系マウスにしか効率に誘導できず、従来モデルと同様に重症度が一定しないのが課題であった。一定して再現性と重症度の高い新 EAO モデルを確立すれば、疾患誘導が困難とされるマウス EAO の研究が他施設でも展開される可能性が広がる。

### 2. 研究の目的

臨床的に、特異性精子形成障害の患者には、精巣外傷、精巣捻転および精管結紮による精子抗原の免疫系への曝露の経歴が明かでない場合が多い。従来免疫学的精子形成障害モデルの研究は、精巣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、従来方法よりも容易な免疫法によって、どこの研究施設でも高率に発症させることができる再現性の高い「マウス自己免疫性造精機能障害モデル」を確立し、ターゲットとなる自己抗原の同定を行い、自己免疫性造精機能障害を誘導する抗原の特定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 動物

- 1) BALB/c マウス(無胸腺の nude マウスも入手可能な系統)
- 2) C3H/He マウス(精巣細胞皮下注射による EAO 誘導に高い感受性をもつ系統)
- 3) A/J マウス(内分泌腺の自己免疫に一般的に感受性の高い系統)
- 4) C57BL/6 マウス(自己免疫疾患解析に一般的に用いられる系統)
- 5) C.B.17/Icr マウス(scid マウスも入手可能な系統)
- 6) ICR マウス(毒性実験などで通常用いられる系統)

### 実験系

ドナーマウスから摘出した精巣・精巣上体・精管を同系のレシピエントマウスの腹膜に縫い付けて 50 日後に、レシピエントマウスの両側の精巣にリンパ球浸潤と造精機能障害の有無を観察する。また、レシピエントマウスの血清を採取して抗精子細胞抗体を測定する。各種マウスの実験的自己免疫性精巣炎(EAO)感受性の比較解析を行う。

### 解析項目

- 1) 重量解析: 精巣重量と体重を測定する。
- 2) 精巣組織解析: 摘出した精巣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、(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)の観察を行う。
- 4) 自己抗原の同定: 二次元電気泳動にて精巣・精巣上体および精管のタンパク質を分離し、Western blot 法で EAO を発症したマウスの血清抗体と反応させ、精巣上体・精管タンパク質には認められない精巣固有の反応タンパク質の Spots を回収して MS 解析により EAO の抗原タンパク質を同定する。

### 2011 年度

実験的自己免疫性精巣炎(EAO)は、精巣抗原に対する自己免疫により、精巣へのリンパ球浸潤と造精障害を引き起こす免疫学的ヒト男性不妊症の疾患モデルのひとつである。マウスにおける新しい実験的自己免疫性精巣炎(EAO)モデルの確立のため、A/J、C3H/He と ICR マウスから摘出した精巣・精巣上体・精管を同系のレシピエントマウスの腹膜に縫い付けて 50 日後に屠殺し、レシピエントマウスの両側の精巣にリンパ球浸潤と造精機能障害を観察する。また、レシピエントマウスの血清を採取して抗精子細胞抗体価を測定する。

### 2012 年度

前年度は摘出した精巣・精巣上体・精管を同系のレシピエントマウスの腹膜に縫い付けるだけで、再現性の高い EAO を誘導することを明らかにした。当該年度は EAO モデルを用いて、Western blot 法、2 次元電気泳動、免疫電顕にて自己免疫性精巣炎を誘導する自己抗原の解析を行った。

### 2013 年度

前年度の EAO を誘導する自己抗原の解析に引き続き、当該年度は自己抗原の同定を行

った。2次元電気泳動にて検出された30種類以上の精管・精巣上体には発現していない精巣特異的抗原タンパク質の Spots を回収し、MS解析法を用いてEAOの抗原タンパク質を同定した。

#### 2014年度

EAOは最初、モルモットを用いて行われたが、その後、ラット・ラビット・マウスにおいてもEAOが誘導されることが明らかにされた。マウスにおいて、我々は同系生殖細胞の皮下注射のみによって、EAOを誘導した。このマウスEAOにも現在2次元電気泳動の解析を行い、抗原同定が進んだ。2014年度は、異種であるラット/モルモットの生殖細胞を皮下注射することで、マウスの精巣に自己免疫応答が起こるかどうかを検討した。マウス/ラット/モルモット生殖細胞共通のタンパク質からマウスEAOを誘導する抗原の同定を行った。

#### 4. 研究成果

##### 2011年度

レシピエントマウスの両側の精巣にリンパ球浸潤と造精機能障害が起こることを明らかにした。A/J, C3H/He, ICRマウスには精巣炎の発症率はそれぞれ89%、80%、80%であり、3種間の発症率の有意差はなかった。しかし、3種間の重症度(EAO stage: Itoh et al., 1995)は、A/J, C3H/He, ICRマウスはそれぞれ $3.3 \pm 1.7$ 、 $1.5 \pm 1.0$ 、 $1.3 \pm 1.2$ であり、A/Jマウスの重症度が有意に高いことが示された。また、どの種類のレシピエントマウスにも、精巣炎のみが発症し、精巣上体炎や精管炎は誘導されなかった。さらに、レシピエントマウスの血清を採取し、同系正常マウスの精巣・精巣上体・精管凍結切片にて、自己抗体の解析を行なったところ、抗精子細胞抗体と抗精子抗体のみが検出された。

##### 2012年度

精巣抗原タンパクの解析としてWestern blot法、2次元電気泳動、また詳細な局在解析として免疫電顕を行った。血清内のEAO抗原の発現をWestern blot法にて解析した結果、精子および精子細胞に対する自己抗体が経時的に増加することが示された。また、2次元電気泳動にて30種類以上の自己抗原が検出された。現在、検出された抗原タンパクをMS解析法を用いて同定している。さらに、免疫電顕にて抗原の局在は先体、細胞膜、細胞質と様々な場所に発現している事を明らかにした。

##### 2013年度

当該年度は2次元電気泳動にて検出された30種類以上の精管・精巣上体には発現していない精巣特異的抗原タンパク質の Spots を回収し、MS解析法を用いて同定した。確定できた多数のタンパク質の中には、HSP70関

連のタンパク質があったことを明らかにした。

##### 2014年度

マウスにラット生殖細胞を感作したところ、マウスに抗マウスTGC自己抗体が検出され、EAOが誘導された。一方、モルモット生殖細胞を感作したマウスにはEAOが誘導されなかった。2次元電気泳動の銀染色により、正常マウス/ラット/モルモット生殖細胞に共通のタンパク質を検出した。また、正常マウス生殖細胞のタンパク質を2次元電気泳動で分離した後、各実験群の血清を用いてWestern blottingを行ったところ、マウス生殖細胞群とラット生殖細胞群に共通Spotsが見られたが、モルモット生殖細胞群には見られなかった。このことは、モルモット生殖細胞には存在しないマウス/ラットとの共通生殖細胞の抗原がマウス自己免疫性精巣炎の原因タンパクとなっていることを示唆する。2次元電気泳動の解析においても、これを支持する結果が得られた。将来的にMS解析を用いて共通生殖細胞抗原のタンパク同定が可能になり、EAOを誘導する抗原の特定に繋がると考えられる。現在、確定できたタンパク質を回収して質量解析にかけてアミノ酸配列を決定し、リコンビナントタンパク質精製技術に用いて「精製抗原」を大腸菌に作らせたものを解析している。

#### 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13件)

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. *Anat Sci Int*. 査読有, 2015 (in press)

Naito M, Hirai S, Terayama H, Qu N, Hayashi S, Hatayama N, Kawamura H, Nakano T, Itoh M. Neonatal estrogen treatment with  $\beta$ -estradiol 17-cypionate induces in post-pubertal mice inflammation in the ductuli efferentes, epididymis, and vas deferens, but not in the testis, provoking obstructive azoospermia. *Med Mol Morphol*. 査読有, 47(1), 2014, 21-30.  
DOI: 10.1007/s00795-013-0034-z.

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*. 査読有, 46(5), 2014, 556-63.  
DOI: 10.1111/and.12116.

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*. 査読有, 23;9(4), 2014, e96120.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0096120.  
eCollection 2014.

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*. 査読有, 59(5), 2013, 485-90.  
DOI: 10.1111/j.2047-2927.2012.00015.x.

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*. 査読有, 33(7), 2013, 652-60.  
DOI: 10.1002/jat.2713.

Hirai S, Naito M, Terayama H, Qu N, Kuerban M, Musha M, Itoh M. Lymphangiogenesis in chronic inflammation in the testis. *Andrology*. 査読有, 1(1), 2013, 147-54.

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*. 査読有, 59(2), 2013, 139-44.

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*. 査読有, 45(1), 2012, 35-44.  
DOI: 10.1007/s00795-011-0539-2.

Kuerban M, Naito M, Hirai S, Terayama H, Qu N, Musha M, Ikeda A, 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. *J Androl*. 査読有, 33(5), 2012, 824-31.

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 Fertil*, 査読有, 24(2), 2012, 337-43.  
DOI: 10.1071/RD10349.

Terayama H, Naito M, Qu N, Hirai S, Kitaoka M, Ogawa Y, Itoh M. Intratesticular expression of mRNAs of both interferon  $\gamma$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  is significantly increased in experimental autoimmune orchitis in mice. *J Reprod Dev*. 査読有, 57(2), 2011, 296-302.

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, epididymides, and vasa deferentia in recipient mice. *J Reprod Immunol*. 査読有, 90(2), 2011, 195-201.  
DOI: 10.1016/j.jri.2011.03.008.

〔学会発表〕(計 26 件)

1. 伊藤正裕. 進化と発生からみた「ヒト精子の生きにくさ」. 第 32 回日本受精着床学会総会・学術講演会 (招請講演) (2014.8.1) 東京
2. 曲 壑. 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 (2014.12.13) 東京
3. 小川夕輝. 微量カドミウム曝露は自己免疫障害を増悪させる. 第 29 回日本生殖免疫学会 (2014.12.13) 東京
4. 寺山隼人. 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・精巢毒性研究会 (2014.6.12) 長野
5. Qu N. Traditional oriental Chinese medicine protects against busulfan- induce male infertility in mice. 第 119 回日本解剖学会・全国学術集会 (2014.3.27-29) 栃木
6. 倉 升三幸. Low dose di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) exposure increases susceptibility to testicular autoimmunity in mice. 第 119 回日本解剖学会・全国学術集会 (2014.3.27-29) 栃木
7. 平柳淑恵. 免疫正常マウスにおけるブスルファンの免疫系と生殖器系への影響. 第 119 回日本解剖学会・全国学術集会 (2014.3.27-29) 栃木
8. 小川夕輝. 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
9. Hirai S. Role of macrophages in newly formed lymphatic vessels in the testis. 12<sup>th</sup> International Congress of Reproductive Immunology (2013.5-28-6.1) Boston, USA
10. Terayama H. Testicular immune-microenvironment in the Epstein-Barr virus-induced gene-3 (EBI3) knock out

- mice. 12th International Congress of Reproductive Immunology (2013.5-28-6.1) Boston, USA
11. 平井宗一. 精巣における虚血障害および鬱血障害の違い. 第 118 回日本解剖学会・全国学術集会(2013.3.28-30) 香川
  12. 寺山隼人. 精巣とサイトカイン. 第 118 回日本解剖学会・全国学術集会(2013.3.28-30) 香川
  13. 曲 寧. 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
  14. 北岡三幸. 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
  15. Hirayanagi Y. 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
  16. 曲 寧. 異種生殖細胞に対する免疫正常マウスの精巣組織反応. 第 27 回日本生殖免疫学会総会・学術集会(2012.12.8-9) 大阪
  17. Qu N. 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・精巣毒性研究会 共同開催学会(2012.6.29-30) 兵庫
  18. 曲 寧. 異種生殖細胞に対する免疫正常マウスの精巣組織反応. 第 117 回日本解剖学会・全国学術集会(2012.3.26-28) 山梨
  19. 寺山隼人. 雌雄血清中における生殖腺に対する自己抗体について. 第 117 回日本解剖学会・全国学術集会(2012.3.26-28) 山梨
  20. 北岡三幸. マウス精巣に対する Di-(2-ethylhexyl)phthalate の炎症誘導効果. 第 117 回日本解剖学会・全国学術集会(2012.3.26-28) 山梨
  21. Ogawa Y. The effect of cadmium on immunoenvironment in the testis. 第 117 回日本解剖学会・全国学術集会(2012.3.26-28) 山梨
  22. Kuerban M. Germ cell death in testicular autoimmunity. 第 117 回日本解剖学会・全国学術集会(2012.3.26-28) 山梨
  23. Musha M. The effects of adjuvants on autoimmune responses against testicular antigens in mice. 第 117 回日本解剖学会・全国学術集会 (2012.3.26-28)山梨
  24. 平柳淑恵. Autoimmune responses induced by immunization with xenogenic testicular germ cells alone. 第 117 回日本解剖学会・全国学術集会(2012.3.26-28) 山梨
  25. 曲 寧. 異種生殖細胞に対する免疫正常マウスの精巣組織反応. 第 67 回日本顕微鏡学会学術講演会 ( 招請講演 ) (2011.5.16-18) 福岡
  26. 平井宗一. 自己免疫性精巣炎における細胞死. 第 43 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 ( 招請講演 ) (2011.9.9-10) 大阪
- 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  
川本 英一 (KAWAMOTO, Eiichi)  
東京医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：20074718
- 佐々木 啓 (SASAKI, Hiraku)  
順天堂大学・スポーツ健康科学部・助教  
研究者番号：20384969
- 内藤 宗和 (NAITO, Munekazu)  
愛知医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10384984
- 曲 寧 (QU, Ning)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70527952
- 平井 宗一 (HIRAI, Shuichi)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70516054
- 寺山 隼人 (TERAYAMA, Hayato)  
東海大学・医学部・講師  
研究者番号：00384983
- 林 省吾 (HAYASHI, Shogo)  
東京医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：60349496
- 池田 あゆみ (IKEDA, Ayumi)  
東京医科大学・医学部・助教  
研究者番号：90617515
- 畑山 直之 (HATAYAMA, Naoyuki)  
東京医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80534792

(3)研究協力者

小川 夕輝 (OGAWA, Yuki)

倉升(北岡) 三幸 (KURAMASU, Miyuki)

平柳 淑恵 (HIRAYANAGI, Yoshie)

KUERBAN, Maimaiti

MUSHA, Muhetaerjiang