

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08142

研究課題名(和文) 精子免疫ラットを用いた免疫系細胞による精子形成障害発症機序の解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of experimentally induced autoimmune orchitis in rats

研究代表者

野口 純子 (Noguchi, Junko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主席研究員

研究者番号：80189381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：精子は免疫系細胞から非自己として認識される。自己免疫性精巣炎は免疫性細胞が精子形成細胞を攻撃することで起きる。私達はラットに自己免疫性精巣炎を誘起し、炎症の原因となる免疫系細胞の同定と、精巣細胞が受ける影響について解明を進めた。前者について、TNF を発現するリンパ球の関与がうかがわれた。精子形成を支えるセルトリ細胞は細胞間の接着によりにバリアを形成するが、精巣炎では接着に関与するタンパク質の発現や局在が異常で、バリア機能が破綻することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液精巣関門(BTB)による免疫系細胞からの精子形成細胞の隔離と精巣の免疫寛容は、精子形成に不可欠である。これらの仕組みが破綻すると、自己免疫性精巣炎による精子形成障害が発生する。多くの場合この病気は無症状で進行し、かつ一旦発症すると回復は困難で、男性不妊の一因となっている。その一方で、もし人為的にこの病気を誘起できれば雄の不妊化が実現するので、現在は捕獲に頼るイノシシやシカ等の野生動物の生息数管理が可能となる。自己免疫性精巣炎の発症機序の解明と抗原物質の同定は、男性不妊の治療・予防と新たな野生動物管理手法の開発の両面から不可欠である。

研究成果の概要(英文)：Since sperm is potentially autoantigenic, there are several mechanisms in the testis to prevent them from the immune attack. We examined the rat testis with experimentally induced autoimmune orchitis. The results indicated that activated T cells might interact directly to the testicular cells and affect Sertoli cell functions. Several types of junction molecules were influenced in the expression or localizations, resulting in impairing the function of the blood-testis barrier.

研究分野：繁殖生物学

キーワード：精子形成 免疫寛容 血液精巣関門 自己免疫性精巣炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精子形成は個体の成熟後に開始する。一方で、免疫系細胞の自己/非自己の識別はそれ以前に確立するため、固有のタンパク質を多く有する精子は、免疫系細胞から非自己として攻撃されることとなる。そのため精巣は精子が免疫系細胞に攻撃されないよう、隔離する仕組みを持つ。血液精巣関門はその中心であり、更に精巣内に常在する免疫系細胞は鎮静化した状態(免疫寛容)にある。何らかの原因により免疫系細胞が精子形成を障害することがあり、男性不妊の一因となっている(自己免疫性精巣炎)。これまでに精巣抽出物を成熟雄マウスあるいはラットに接種することで自己免疫性精巣炎の実験モデルが開発され、造精障害発症機序の解明に利用されてきた。発症した精巣では精巣間質に炎症性細胞の浸潤が顕著で、これらの細胞が産生するサイトカイン等が直接的、あるいは間接的に血液精巣関門のバリア機能を阻害することで精細管内環境が変化し、精子形成が阻害されると理解されている。一方で、ヒトの臨床データ、即ち男性不妊患者の精巣組織では間質のリンパ球浸潤の発生は一定程度であり、従来の実験モデルとの不一致がある。また、精子あるいは精巣由来抗原を認識する T 細胞を正常マウスに移入しても病態を再現することができず、精子形成障害の発症機序の詳細は不明であった。

2. 研究の目的

代表者は、精子を抗原としてラットに自己免疫性精巣炎を誘起する手法を開発した。この方法で発症した精巣では間質に顕著な炎症性細胞の浸潤がないにも関わらず、精細管では著しい生殖細胞の変性・脱落が見られる。この時、少数の免疫系細胞が精細管に付着する様子が観察された。この炎症性細胞と精細管(セルトリ細胞)との相互作用を解明することは、自己免疫性精巣炎における精子形成障害の発生機序の理解に役立つと考えた。

3. 研究の方法

自己免疫性精巣炎の発症機序を解析するにあたり、以下の2方面からの解析を行った。

(1) 発症に關与する精巣細胞の同定

自己免疫性精巣炎は T 細胞 (CD4 陽性) による細胞性免疫反応により発症する。T 細胞は抗原提示細胞(細胞表面に MHC クラス II を発現)により抗原提示を受けて活性化する。通常、マクロファージや樹状細胞が抗原提示を行う。しかし、精子投与による精巣炎では精細管にこうした細胞が付着する状況が認められず、精細管に付着した炎症性細胞は精細管を構成する細胞自体に抗原提示を受ける可能性がある。このことを明らかにするため、精細管から細胞を採取し、フローサイトメトリーにより MHC クラス II の発現を解析した。他方、精子を抗原として認識する T 細胞を正常雄に移入し、病態の再現を試みた。

(2) 発症精巣の血液精巣関門のバリア機能の解析

これまでの観察から、炎症を発症した精巣では約2週間で生殖細胞が変性・脱落し(急性期)、その後は精子形成が回復することなく無精子症が続くことが示唆された。この急性期の精巣では血液精巣関門のバリア機能の破綻が起きている可能性がある。そこで、トレーサーを用いてバリア機能を検索した。更に、バリアの成立に不可欠な細胞間接着(タイトジャンクション、ギャップジャンクション等)に關与するタンパク質の発現と局在を検討した。

4. 研究成果

(1) 発症に關与する精巣細胞の同定

発症精巣の精細管から細胞を採取し、フローサイトメトリーを実施した。その結果、ごく少数ではあるが、マクロファージや樹状細胞とはことなる MHC クラス II 発現細胞が確認された(図1)。この分画の細胞を回収し遺伝子発現を定量的 PCR により解析したところ、セルトリ細胞および精細管周囲筋様細胞が特異的に発現する遺伝子(セルトリ細胞: Tjp1 および Cldn11、筋様細胞: Myh11 および Cnn1)の発現が確認され、この2種の細胞が MHC II を発現する可能性が示唆された。

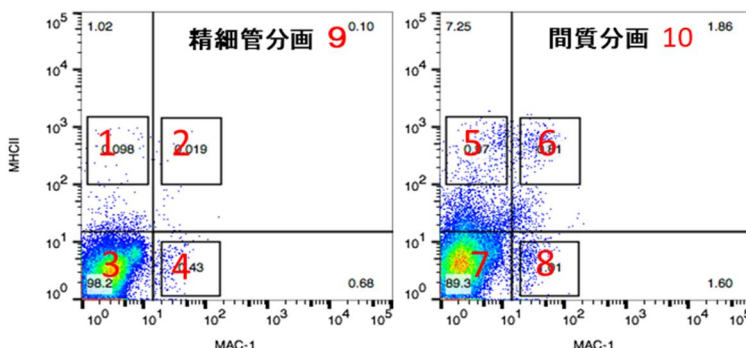


図1. MHC クラス II 発現細胞の解析
発症精巣の精細管分画細胞に MAC-1 (マクロファージマーカー) を発現しない MHC II 発現細胞が検出された(区画1)。

移入試験のドナー細胞として、精子を投与したラットのリンパ節から T 細胞(感作 T 細胞)を採取し、培養条件下で抗原提示により活性化する培養手法を開発した。この方法により精子抗原特異的 T 細胞を 100 倍以上に増殖できた(図 2)。これらの細胞を正常雄に移入し自己免疫性精巣炎の発症を確認中である。

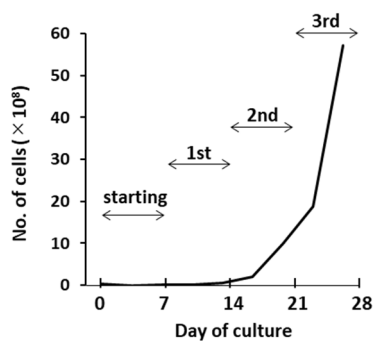


図 2 抗原刺激による T 細胞の増殖
精子抗原に感作した T 細胞に培養条件下で反復して抗原刺激を与えた. 2 回目以降の抗原刺激で急激に増殖した.

(2) 発症精巣の血液精巣関門のバリア機能の解析

血液精巣関門のバリア機能が破綻することをピオチントレーサー試験により確認した(図 3)。このとき、タイトジャンクションの構成因子である CLDN11 の局在異常、ギャップジャンクションの主要構成因子である Cx43 の発現低下など、バリア機能の破綻の原因と考えられる現象が認められた。

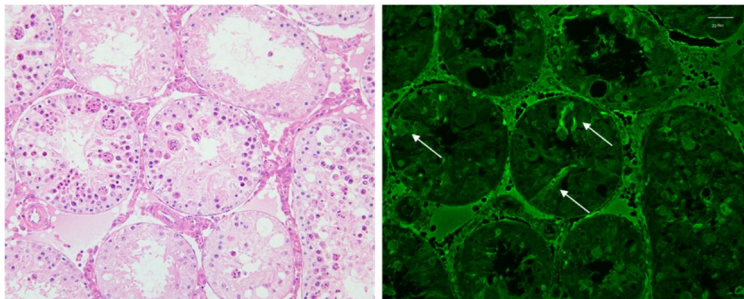


図 3. 自己免疫性精巣炎精巣のトレーサー試験
生殖細胞の脱落が進行中の精細管にトレーサーの侵入が認めれる(左、矢印). 右写真は隣接切片の HE 染色像.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Junko Noguchi, Tadashi Furusawa, Thanh Q. Dang Nguyen, Kazuhiro Kikuchi and Hiroyuki Kaneko
2. 発表標題 Spermatogenesis-specific disorder in rat experimental autoimmune orchitis induced by allogeneic sperm immunization
3. 学会等名 WCRB Fourth World Congress of Reproductive Biology (WCRB2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野口純子, 菊地和弘, タイン クァン ダン - ゲン, 古澤軌
2. 発表標題 精子免疫後のラット自己免疫性精巣炎におけるTNF 陽性細胞と精子形成障害
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考