

学 位 論 文 要 約

研究題目

Characterization of a spontaneously occurring self-reactive antibody against sperm in mice
(雄マウスに自然発生した抗精子自己抗体の性状分析)

兵庫医科大学大学院医学研究科

医科学専攻

器官・代謝制御系

産科学婦人科学 (指導教授 柴原浩章)

氏 名 陳月焜

【諸言】

WHO によると、不妊の原因の約 50%は男性側にあると報告されている。その多くは精液中の精子数の減少や運動率の低下であるが、精子に対する自己抗体が妊孕性を障害する症例があることも報告されている。本学産科婦人科学講座では長年この問題に取り組んできた。先行研究として、マウス精子に反応する自己抗体をモノクローナル抗体(Ts3)として樹立していた。本研究では、この抗精子自己抗体の性状を分析した。

【研究目的】

抗精子抗体による男性不妊症についてマウスのモデル実験として、加齢雄マウスに自然発生した抗精子自己抗体 (Ts3) を用い、対応抗原の分析並びに、精子および受精への影響について検討した。

【研究方法】

抗精子自己抗体 (Ts3) の対応抗原の局在は、マウス精巣上体尾部精子をホルマリン固定後、免疫蛍光染色法により調べた。雄性生殖組織における分布は、精巣、精巣上体と輸精管の免疫組織染色法にて調べた。Ts3 の対応抗原の同定のために、精子タンパクを SDS (sodium dodecyl sulfate) で 95℃、5 分で粗抽出した後、TCA・アセトンで沈殿処理し、urea、chaps を含む膨潤液で再溶解した。二次元電気泳動(isoelectric focusing と SDS-PAGE)、western blotting を行い、Ts3 を一次抗体として、enhanced chemiluminescence(ECL)で反応スポットを検出した。同様に泳動したゲルより対応するスポットを切り出し、トリプシン消化して、質量分析に用いた。生物学的機能検査として、補体依存性精子不動化試験を行い、マウス精子とモノクローナル抗体 Ts3 とモルモット補体を混合し、精子の運動数をカウントした。対照として非働化処理をした補体を用いた。対照補体における精子運動率を活性補体の精子運動率で除して精子不動化値(SIV)を算出し、SIV : 2 以上を抗体陽性として、精子の運動に及ぼす影響を調べた。また、Ts3 を体外受精および胚の培養メディウムに加え、受精と着床前初期胚の発育に及ぼす影響について調べた。また免疫蛍光染色法により、着床前初期胚(2細胞期胚から8細胞期胚)における Ts3 の対応抗原の局在を調べた。

【結果】

Ts3 はマウス精子の鞭毛の midpiece と principal piece に反応した。雄性生殖組織を用いた免疫染

色では、精巣内の生殖細胞とセルトリ細胞、精巣上体および輸精管の上皮細胞、管腔内の精子の尾部に陽性反応が見られた。二次元電気泳動と western blotting 解析では、4つのスポットが分子量約 25000 から 60000 まで、pI 5 から 6 までに検出された。質量分析の結果では、スポットの一つは outer dense fiber protein 2 (ODF2) が有力な分子としてヒットした。他のスポットはケラチンとミトコンドリアの成分であり、Ts3 の対応抗原としては除外できると考えた。3 匹の雄マウスの精子を用いて精子不動化試験を行い、いずれも精子不動化作用が認められた。体外受精の実験では、受精は阻害されなかったが、in vitro における胚の発育は阻害された。着床前胚の免疫蛍光染色法では、2、4、8 細胞期胚の膜表面と細胞接触部に強い反応を認めた。

【考察】

本研究では抗精子自己抗体 Ts3 の対応抗原は midpiece と principal piece に局在した。雄性生殖組織では体細胞にも反応が見られた。質量分析で検出された分子は、ODF2、ケラチン、ミトコンドリア成分であった。Outer dense fiber (ODF) は精子鞭毛の主要な構造の 1 つで、midpiece と principal piece に局在していることが知られている。ODF はタンパクの高次構造として 2 つの主要なタンパクが含み、ODF2 はその 1 つである。免疫蛍光染色により、Ts3 によって認識される抗原は、midpiece と principal piece に存在して、ODF の分布と一致していた。ケラチンとミトコンドリアの成分を検出したことについて、検出されたケラチンの種類と精子鞭毛にある特定のケラチンのタンパク質は異なっており、コンタミネーションであると考えた。また、ミトコンドリアの成分が検出されたが、ミトコンドリアは精子鞭毛の midpiece に局在していることが知られているので、ODF2 と交差反応する可能性もあるが、Ts3 の局在が principal piece にも及んでいるため、ODF2 を Ts3 の対応抗原として同定した。Ts3 は受精を阻害しなかったが、精子の運動と着床前胚の発生を阻害した。また、ODF2 は着床前胚の細胞膜にも存在する可能性が示された。

遺伝子改変を用いた研究では、ODF2 遺伝子のエクソン 9 に遺伝子トラップを挿入すると、胚は着床前致死に至るという結果が報告されている。また、別の研究では、ODF は精子の運動性に直接影響はないが、精子尾部の安定性と弾性回復力を維持し、精子を保護する役割を果たしていると報告している。

ODF2 は、精子に特異的なタンパクではなく、染色体分裂に関連する中心体成分として存在することが知られている。ODF タンパクは、さまざまな哺乳類の種において保存されている。ヒトの ODF タンパクはマウスと高い配列類似性を共有していることから、ODF2 はヒトにおいても抗精子抗体が認識する自己抗原となる可能性がある。したがって、ヒトにおける ODF2 に対する自己抗体の存在が、不妊症を引き起こす可能性も考えられる。

今後、この抗精子自己抗体発生のメカニズムを解明する研究が必要である。さらに、着床前初期胚への阻害作用が一時的なものなのか、妊娠を通じて継続するものなのかを明らかにすることも重要である。

【結語】

マウスモデル実験により、抗精子自己抗体が生殖能力を障害し、不妊症の原因となる可能性があることを示した。また、自然発生自己抗体 Ts3 の対応抗原の分析により、ODF2 を標的抗原としていることを明らかにした。さらに、ODF2 が精子の運動性と着床前胚の発育に関与している可能性を示した。