

機関番号：12102

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390429

研究課題名 (和文) IgM/A 受容体欠損マウスにおける精子形成異常の解析

研究課題名 (英文) Abnormal spermatogenesis in IgM/A receptor-deficient mice.

研究代表者

本多 伸一郎 (SHIN-ICHIRO HONDA)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：60360640

研究成果の概要 (和文)：

Fcα/μR 遺伝子欠損マウス由来生殖細胞は WBB6F1-*W/W^u* マウス精巣内への移植後に精子への分化が認められたため Fcα/μR 遺伝子欠損マウスにおける精子形成異常は生殖細胞自身ではなく、精巣細胞側の異常であると考えられた。また、BALB/c マウス ES 細胞を用いて作製した Fcα/μR 遺伝子欠損マウスにおいては正常の精子形成が認められたため、精子形成における Fcα/μR 遺伝子の関与はマウスの遺伝背景によって異なると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Fcα/μR^{-/-} germ cell differentiated to sperm normally after transplantation to WBB6F1-*W/W^u* mice testis, indicating that the defects of spermatogenesis in Fcα/μR^{-/-} mice were caused by stromal cells of testis, but not by germ cell itself. Newly generated Fcα/μR^{-/-} mice of BALB/c mice background showed normal spermatogenesis, suggesting that the roles of Fcα/μR in spermatogenesis were influenced by strains of mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2008 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総 計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：Fc 受容体、IgM/A、精子形成

1. 研究開始当初の背景

申請者らは IgM および IgA に対する Fc 受容体、Fcα/μR を世界に先駆けて同定することに成功したが、Fcα/μR は RT-PCR 法 および

ノザン解析によりリンパ組織のみならず、腸管、腎臓および精巣に発現が認められた。申請者らは Fcα/μR 遺伝子欠損マウス (Fcα/μR^{-/-}) を作製したところ、このマウ

スはメンデルの法則に従って産まれてきたものの、全く予期せぬことに $Fc\alpha/\mu R^{-/-}$ 雄マウスは完全な不妊を呈した。

2. 研究の目的

本研究では $Fc\alpha/\mu R^{-/-}$ マウスにおける精子形成異常のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

$Fc\alpha/\mu R$ の発現を精子形成の各分化ステージとの関わりの中で明らかにし、その発現が精子形成に関わっていることを細胞移植実験によって検討した。

(1) 精巣における $Fc\alpha/\mu R$ 発現解析

① $Fc\alpha/\mu R^{-/-}$ マウスおよび野生型マウスから採取した精巣をコラゲナーゼ処理して回収した細胞を分画化し、各分化段階における $Fc\alpha/\mu R$ の発現を検討した。

② 精巣細胞は存在するものの、*c-kit* 変異によって生殖細胞が存在しない $WBBF1-W/W^f$ マウス由来の精巣を用いて RT-PCR を行い、生殖細胞および精巣細胞における $Fc\alpha/\mu R$ の発現を明らかにした。

(2) $Fc\alpha/\mu R^{-/-}$ マウスにおける生殖細胞分化異常の形態学的解析

$Fc\alpha/\mu R^{-/-}$ マウスの精巣を採取し、コラゲナーゼ処理後に得られる各分化段階の精子細胞について、その形態を電子顕微鏡および走査型電子顕微鏡を用いて検討した。

(3) $Fc\alpha/\mu R$ 発現細胞が精子分化に果たす役割の解析

$Fc\alpha/\mu R^{-/-}$ マウスの生殖細胞の精子形成能を検討するため、生殖細胞が存在しない $WBB6F1-W/W^f$ マウスの精巣内へ $Fc\alpha/\mu R^{-/-}$ マウスまたは野生型マウス由来精巣細胞を移植し、3ヵ月後に精巣を摘出し、HE染色による組織学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 精子の各分化段階における $Fc\alpha/\mu R$ の発現を RT-PCR を用いて検討した結果、

$Fc\alpha/\mu R$ 遺伝子は精母細胞 (spermatocytes) および精子細胞 (spermatid) に発現していることが明らかになった。

(2) $WBBF1-W/W^f$ マウスの精巣においても $Fc\alpha/\mu R$ 遺伝子の発現が確認されたことから、 $Fc\alpha/\mu R$ 遺伝子は精巣細胞にも発現していることが明らかになった。

(3) 透過型電子顕微鏡 Transmission-type Electron Microscope (TEM) を用いて、精巣における精子細胞の分化について観察を行ったところ、野生型マウス精巣内には精原細胞 (spermatogonia)、精母細胞 (spermatocytes)、球状 (round spermatid) および伸長精子細胞 (elongated spermatid) が認められたが、 $Fc\alpha/\mu R^{-/-}$ マウスの精巣内では球状精子細胞は異常な形態を示し、伸長精子細胞は確認されなかった。さらに走査型電子顕微鏡 Scan-type Electron Microscope (SEM) を用いて、成熟精子の観察を行ったところ、野生型マウス由来の成熟精子は三日月状の形態をしていたのに対して、 $Fc\alpha/\mu R^{-/-}$ マウス由来の成熟精子は数が激減しており、存在した精子についても頭部が屈曲したり、凝集したような異常形態を呈していた。

(4) $Fc\alpha/\mu R^{-/-}$ マウス由来精巣細胞を移植した $WBB6F1-W/W^f$ マウスの精巣内には野生型マウス由来精巣細胞を移植した精巣と同様に正常に精子が分化し、精細管内腔には尾部の伸長した成熟精子が確認された。透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いた解析においても両精巣細胞から成熟した精子に明らかな相違は認められなかった。よって $Fc\alpha/\mu R^{-/-}$ マウスにおける精子形成異常は生殖細胞自身の異常ではなく、精巣細胞の異常であると考えられた。

(5) 新たに BALB/c マウス由来胚性幹細胞を用いて BALB/c $Fc\alpha/\mu R^{-/-}$ マウスを作製して精子形成を検討したところ、BALB/c $Fc\alpha/\mu R^{-/-}$ マウスは雌マウスとの交配によって正常に産仔

が得られ、BALB/c $Fc\alpha/\mu R^{-/-}$ マウスの精巣内では野生型マウスの精巣と同様に精子形成が正常に進行しており、尾部の伸長した成熟精子が精細管内腔に確認された。また、BALB/c $Fc\alpha/\mu R^{-/-}$ マウスの精巣上体には成熟精子の貯留が確認され、野生型マウスとの間に明らかな差は認められなかった。雌マウスとの交配においても 129 マウス由来胚性幹細胞と B6 マウスとの交配から得られた $Fc\alpha/\mu R^{-/-}$ マウスで認められた雄性不妊は BALB/c $Fc\alpha/\mu R^{-/-}$ マウスにおいては認められず、 $Fc\alpha/\mu R$ 遺伝子の欠損による精子形成異常はマウスの遺伝背景に強く影響され则认为られた。

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 5 件)

① Nabekura T, Shibuya K, Takenaka E, Kai H, Shibata K, Yamashita Y, Harada K, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya A. A critical role of DNAM-1 in the development of acute graft-versus-host disease in mice.

Proc Natl Acad Sci USA (査読有) 43:18593-18598, 2010

② Cho Y, Honda S[#], Usui K, Yoshizawa Y, Takagaki K, Shibuya A. Requirement of the cytoplasmic portion for dimer formation of $Fc\alpha/\mu$ receptor expressed on cell surface. *Mol Immunol.* (査読有) 47:878-882, 2010

([#]corresponding author)

③ Honda S, Kurita N, Miyamoto A, Cho Y, Usui K, Takeshita K, Takahashi S, Yasui T, Kikutani H, Kinoshita T, Fujita T, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Enhanced humoral immune responses against T-independent antigens in $Fc\alpha/\mu R$ -deficient mice.

Proc Natl Acad Sci. USA (査読有)

27:11230-11235, 2009

④ Kurita N*, Honda S*, Usui K, Shimizu Y, Miyamoto A, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K,

Shibuya A. Identification of the $Fc\alpha/\mu R$ isoform specifically expressed in the kidney tubules. *Mol Immunol.* (査読有) 46:749-753, 2009 (*equally contributed)

⑤ Iguchi-Manaka A, Kai H, Yamashita Y, Shibata K, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Yasui T, Kikutani H, Shibuya K, Shibuya A. Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. *J Exp Med.* (査読有) 13:2959-2964, 2008

〔学会発表〕(計 4 件)

① 本多伸一郎 他、Regulation of serum IgA production by the $Fc\alpha/\mu$, an Fc receptor for IgA and IgM、第 14 回国際免疫学会議、2010 年 8 月 22 日～27 日、神戸

② 本多伸一郎 他、Regulation of serum IgA production by the $Fc\alpha/\mu R$, an Fc receptor for IgA and IgM、第 39 回 日本免疫学会総会・学術集会、2009 年 12 月 2 日～4 日、大阪

③ 本多伸一郎 他、Increased anti-PC natural IgM production and resistance against *Streptococcus pneumoniae* infection in mice deficient in $Fc\alpha/\mu R$, an Fc receptor for IgA and IgM、第 38 回 日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 1 日～3 日、京都

④ 渋谷彰、本多伸一郎、Enhanced humoral Immune responses against T-independent antigens in $Fc\alpha/\mu R$ -deficient mice. 、FASEB Summer Research Conference、2008 年 8 月 7 日、New Heaven, USA

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称： $Fc\alpha/\mu$ レセプターを介する生体機能調節物質のスクリーニング方法

発明者：渋谷彰、本多伸一郎

権利者：渋谷彰、本多伸一郎

種類：工業所有権
番号：特願 2008-263584
出願年月日：2008 年 10 月 10 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/immunology/immunol.index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 伸一郎 (SHIN-ICHIRO HONDA)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
講師
研究者番号：60360640

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

栗田 尚樹 (NAOKI KURITA)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
大学院生

臼井 健太 (KENTA USUI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
大学院生