

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：63904

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2008～2013

課題番号：20116004

研究課題名(和文)マウス精巣におけるGSC/ニッチ・システムの解明

研究課題名(英文)Investigation of GSC/niche system in the mouse testis

研究代表者

吉田 松生(YOSHIDA, Shosei)

基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・教授

研究者番号：60294138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 185,000,000円、(間接経費) 55,500,000円

研究成果の概要(和文)：マウスのGSC(精子形成幹細胞)とそれを制御するニッチ細胞及びニッチの場の実体を解明することを目的とし、独自に開発したライブイメージングやパルス標識法を用いて、精巣組織内での生きた幹細胞のふるまいを解析した。(1)GSC集団の持つ階層性と可逆性の発見、(2)マウスGSCが頻繁に入れ替わることの発見、(3)マウスGSCダイナミクスの単一細胞レベルでの解明、という成果に基づき、「単独で存在するAs細胞こそが幹細胞である」とする1971年に提唱された定説(Asモデル)に再考を求める、新規の幹細胞動態モデルを提唱した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the nature of mouse GSC (spermatogenic stem cells), as well as their niche and niche cells. By using originally developed experimental systems, we have investigated the behavior of stem spermatogonia in undisturbed testes. (1) Discovery of hierarchy and reversibility within the stem cell compartment, (2) discovery of frequent loss and replacement of stem cells, and (3) elucidation of the GSC dynamics at a single cell resolution together lead us to propose a model that would challenge the prevailing theory that was proposed in 1971.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：配偶子 幹細胞 ニッチ マウス 精巣

1. 研究開始当初の背景

GSC(配偶子幹細胞)とニッチの研究はショウジョウバエを用いた研究が先行していた。研究代表者は、ライブイメージングやパルス標識法を独自に開発し、マウス GSC である精子幹細胞の挙動を精巣組織の中でありのままに解析することに成功していた。更にそれによって、全く手がかりのなかったマウス GSC ニッチが、血管近傍の領域であることを発見していた (Dev. Cell 2007, Science 2007)。これにより、ショウジョウバエとマウスの間で比較しながら GSC/ニッチ・システムを研究し、種を越えた共通性と種ごとの独自性を知ることが現実的な挑戦となっていた。

2. 研究の目的

マウスの GSC である精子形成幹細胞とそれを制御するニッチ細胞、及びニッチの場の実体を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ライブイメージングやパルス標識法を用いて、精巣組織内で蛍光標識された生きた幹細胞のふるまいをありのままに解析した。マウス精巣内で精子幹細胞が局在する血管近傍領域の特殊性をマイクロダイセクション法を用いて解析した。それによって、精子形成が継続して進行することを保証する幹細胞ダイナミクスを解明した。

4. 研究成果

(1)マウス GSC 集団の持つ階層性と可逆性の発見 (Science 2010) :

幹細胞は限定された少数の細胞ではなく、主に自己複製する「真の幹細胞」と、そこから分化を開始しているものの「真の幹細胞」に戻って自己複製する潜在能力を維持している「潜在的幹細胞」からなることを見出した。これらが階層を形成して継続する精子形成を支える幹細胞集団を作るのである。この時、不可逆的に分化決定していると信じられてきた連結した精原細胞が、断片化することをライブイメージング法により見出した。この「幹細胞の逆戻り」の頻度は、障害後の再生過程において著しく上昇した。

(2)マウス GSC が頻繁に入れ替わることの発見 (Cell Stem Cell 2010) :

パルス標識された GSC を精巣組織内で長期間追跡した結果、「GSC は厳密な非対称分裂を繰り返して長く存続する」という、一般に信じられている幹細胞モデルと相容れない結果を得た。GSC は平均 2 週間以内という短い寿命で幹細胞としての機能を失い、周辺の幹細胞から生まれた新たな幹細胞によって置き換えられていた。この置き換えは、確率的 (ストカスティック) に起こることが数理的解析によって示された。

(3)マウス GSC ダイナミクスの単一細胞レベ

ルでの解明 (Cell Stem Cell 2014) :

上記の成果が明らかとした GSC の「集団としての動態」の基盤となる「個々の GSC の動態」をライブイメージングやパルス標識により一細胞の分解能で定量的に計測した結果、幹細胞の運命挙動は一つ一つバラバラであった。数理統計解析とモデリングの結果、このバラバラの挙動は不完全分裂による合胞体の形成や伸長と合胞体の断片化がストカスティックに起きた結果であると示唆された。

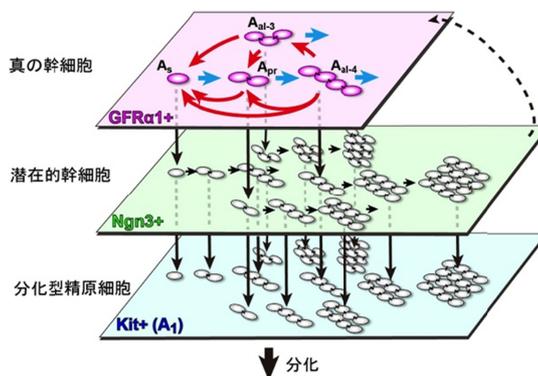
(4)新たな幹細胞動態モデルの提唱 (Cell Stem Cell 2014) :

以上の研究成果をまとめ、GSC の幹細胞動態を提唱した。

「真の幹細胞」は、形態的に異なる A_s 細胞と合胞体という状態を行き来しながら集団 (幹細胞プール) として自己複製する。

可逆的かつストカスティックな課程によって「潜在的幹細胞」を生じる。

「潜在的幹細胞」はその後不可逆的に「分化型精原細胞」に分化する。



これは、謎に包まれていたマウス GSC の真の挙動を明らかにすることによって、新たな幹細胞ダイナミクスモデルに至ったものである。

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 17 件)

K. Hara, T. Nakagawa, H. Enomoto, M. Suzuki, M. Yamamoto, *B. D. Simons and *S.

Yoshida: Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. *Cell Stem Cell* 査読有 14, 658-672 (2014)

DOI: 10.1016/j.stem.2014.01.019

<http://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2014/05/02.html>

T. Shirakawa, R. Yaman-Deveci, S. Tomizawa, Y. Kamizato, K. Nakajima, H. Sone, Y. Sato, J. Sharif, A. Yamashita, Y. Takada-Horisawa, S. Yoshida, K. Ura, M. Muto, H. Koseki, T. Suda and *K. Ohbo: An epigenetic switch is crucial

for spermatogonia to exit the undifferentiated state toward a Kit-positive identity.
Development 査読有 140, 3565-3576 (2013)
DOI: 10.1242/dev.094045
T. Sato, T. Yokonishi, M. Komeya, K. Katagiri, Y. Kubota, S. Matoba, N. Ogonuki, A. Ogura, **S. Yoshida** and *T. Ogawa: Testis tissue explantation cures spermatogenic failure in c-Kit ligand mutant mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 査読有 109, 16934-16938 (2012)
DOI: 10.1073/pnas.1211845109
R. Sugimoto, Y-i. Nabeshima and ***S. Yoshida**: Retinoic acid metabolism links the periodical differentiation of germ cells with the cycle of Sertoli cells in mouse seminiferous epithelium. **Mech Dev** 査読有 128, 610-624 (2012)
DOI: 10.1016/j.mod.2011.12.003
S. Yoshida: Elucidating the identity and behavior of spermatogenic stem cells in the mouse testis. **Reproduction** 査読有 144, 293-302 (2012)
DOI: 10.1530/REP-11-0320
T. Nakagawa, M. Sharma, Y-i. Nabeshima, R. E. Braun and ***S. Yoshida**: Functional Hierarchy and Reversibility within the Murine Spermatogenic Stem Cell Compartment. **Science** 査読有 328, 62-67 (2010)
DOI: 10.1126/science.1182868
C. K. Matson, M. W. Murphy, M. D. Griswold, **S. Yoshida**, V. J. Bardwell and *D. Zarkower: The Mammalian Doublesex Homolog DMRT1 Is a Transcriptional Gatekeeper that Controls the Mitosis versus Meiosis Decision in Male Germ Cells. **Dev Cell** 査読有 19, 612-624 (2010)
DOI: 10.1016/j.devcel.2010.09.010
A. Klein, T. Nakagawa, R. Ichikawa, ***S. Yoshida** and *B. D. Simons: Mouse germ line stem cells undergo rapid and stochastic turnover. **Cell Stem Cell** 査読有 7, 214-224 (2010) *co-corresponding authors
DOI: 10.1016/j.stem.2010.05.017
<http://www.nibb.ac.jp/press/2010/08/09.html>
***S. Yoshida**: Stem cells in mammalian spermatogenesis. **Dev Growth Differ** 査読有 52, 311-317 (2010)
DOI: 10.1111/j.1440-169X.2010.01174.x
吉田松生: 配偶子幹細胞-世代をつなぐキープレイヤーの正体と可能性 基礎の基礎 **細胞工学** (株)学研メディカル秀潤社 査読無 29, 634-637 (2010)
H. Suzuki, A. Sada, **S. Yoshida** and *Y. Saga: The heterogeneity of spermatogonia is revealed by their topology and expression of marker proteins including the germ cell-specific proteins Nanos2 and Nanos3. **Dev Biol** 査読有 336, 222-31. Epub 2009 Oct 8. (2009)
DOI: 10.1016/j.ydbio.2009.10.002

[学会発表](115件、うち招待64件)

S. Yoshida: In vivo behavior of mouse spermatogenic stem cells in testicular microenvironment. **Mini-curso - "Spermatogonial stem cells physiology, niche and biotechnological potential of these cells in vertebrates"** Institute of Biological Sciences at Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, Nov. 29, 2013
S. Yoshida: Towards the understanding of the sperm stem cell niche in the mouse testis. **IV Workshop on Male Reproductive Biology**, Hotel Travel-Inn Ibirapuera, Sao Paulo, Brazil, Nov. 27, 2013
S. Yoshida: Spermatogenic stem cell dynamics in the mouse testis. **EMBL Monterotondo**, Monterotondo, Italy, Oct 25, 2013
伊神香菜子、杉本亮、**吉田松生**: レチノイン酸応答性の不均一を幹細胞集団がマウス精子形成を持続させる **日本動物学会第84回大会** 岡山 2013年9月26-28日
徳江萌、**吉田松生**: マウスの精子形成 "潜在的幹細胞" の制御機構 **日本動物学会第84回大会** 岡山 2013年9月26-28日
S. Yoshida: Niche microenvironment for the mouse spermatogenic stem cells. **The XXII North American Testis workshop "The Foundations of Male Fertility"**, Hyatt Regency San Antonio, San Antonio, Texas, April 10-13, 2013
吉田松生: 幹細胞制御機構: ニッチはどこまで解明されたか? **第35回日本分子生物学会 シンポジウム・ワークショップIW9II** 福岡国際会議場・マリメッセ福岡 福岡 2012年12月11日-14日(招待講演/オーガナイザー)
吉田松生: Mouse sperm stem cells: their behavior and functionality. **Swiss Japanese Developmental Biology Meeting** 京都ガーデンパレス 京都 2012年11月5日-8日
S. Yoshida: Behaviors and dynamics of the male germline stem cells in the mouse testis. **Mammalian meiosis network 2012 meeting**, La Maison du Seminaire, Nice, France, October 11-12, 2012
K. Hara, B. Simons and **S. Yoshida**: A theory for mouse spermatogenic stem cell maintenance based on single cell fate analyses and live imaging. **Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ Cells**, Cold Spring Harbor, New York, USA, October 2-6, 2012
北館祐、丸山亜裕美、市川理恵、**吉田松生**: マウス精子幹細胞を支えるニッチ細胞の探索 **日本遺伝学会第84回大会** 九州大学 福岡 2012年9月23日-27日
吉田松生: マウス精子形成を支える幹細胞の実体とその動態 **第30回日本受精着床学会総会・学術講演会 シンポジウム(基礎1)** 「精子幹細胞のバイオロジーとその応用」

大阪府立国際会議場 大阪 2012年8月30日-9月2日(招待講演/オーガナイザー)

S. Yoshida: Spermatogenic stem cell functionality in the mouse testis. *Scandinavian Physiological Society Annual Meeting*, Helsingin yliopisto, Helsinki, Finland, August 24-26, 2012

S. Yoshida: How are the self-renewal and differentiation of mouse spermatogenic stem cells balanced? *The 58/60th NIBB Conference "Germline"* Okazaki, Japan, July 17-21, 2012 (招待講演/オーガナイザー)

S. Yoshida: Spermatogenic Stem cells: their behavior and functionality in the mouse testis. *Symposium 3 Intrinsic and extrinsic control of stem cell systems, Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology* 神戸国際会議場 神戸 2012年5月28日-31日(招待講演/オーガナイザー)

S. Yoshida: In vivo behavior of the mouse spermatogenic stem cells. *Joint Meeting of the British societies for Cell Biology, Developmental Biology and the Japanese Society for Developmental Biologists* The University of Warwick, Warwick, UK, April 15-18, 2012

S. Yoshida: Sperm stem cells in the mouse. *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, "The Life of a Stem Cell: From Birth to Death"* Resort at Squaw Creek, Olympic Valley, USA, March 11-16, 2012

S. Yoshida: Sperm stem cell behaviors in mouse testis. *The World Congress on Reproductive Biology*, Cairns Convention Centre, Cairns, Australia, October 9-11, 2011

S. Yoshida: Sperm stem cell competition and the niche. *Gordon Research Conference, Mammalian Gametogenesis and Embryogenesis*, Waterville Valley Resort, Waterville Valley, USA, August 21-26, 2011

S. Yoshida: Sperm stem cells in the mouse testis. *International Society for Stem Cell Research 9th Annual Meeting*, The Fairmont Royal York, Toronto, Canada, June 15-18, 2011

⑲ **S. Yoshida:** Function and regulation of the spermatogenic stem cells. *The 8th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility*, Luk Kwok Hotel, Hong Kong, China, May 27-29, 2011

⑳ **S. Yoshida:** Stem cell system in mammalian spermatogenesis. *The 2011 Biomodulation Symposium on "Biotechnology for Future Era"* Seoul National University, Seoul, Korea, May 26-27, 2011

㉑ **K. Hara, Y. Kitadate, H. Enomoto and S. Yoshida:** Microenvironmental control of stem cell population in mouse spermatogenesis. *Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ*

Cells, Cold Spring Harbor, New York, USA, October 5-9, 2010

㉒ **S. Yoshida, R. Sugimoto and Y. Kitadate:** Spatiotemporal control of the spermatogenic stem cells in the mouse testis - toward the understanding of the stem cell niche. *The 2010 Society for the Study of Reproduction Meeting, Minisymposium "Germ Cell Microenvironments"*, Midwest Airlines Center, Milwaukee, USA, July 30-August 3, 2010

㉓ **S. Yoshida:** Gamete stem cells. *43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists Jointly Sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network*, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan, Jun 20-23, 2010 (オーガナイザー)

㉔ **S. Yoshida:** Behaviour and control of undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *The 16th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis*, the Complesso Alberghiero Biodola-Hermitage, Isola d' Elba, Italy, May 8-12, 2010

㉕ **吉田松生:** マウス精子形成幹 / 前駆細胞の分化と精細管の組織構築 生殖系列領域会議第2回合同シンポジウム「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」コクヨホール 東京 2009年11月27日

㉖ **吉田松生:** マウス精子形成幹細胞とそのニッチの同定に向けて 日本動物学会第80回大会2009 静岡 公開シンポジウム「配偶子幹細胞制御に関する研究の新展開」配偶子制御 第1回シンポジウム 静岡県コンベンションアーツセンター 静岡 2009年9月17-19日

㉗ **S. Yoshida:** Spermatogenic stem cell system and its niche in the mouse testis. *Keystone Symposium: Stem Cell Niche Interactions*, Fairmont Chateau Whistler, Whistler, Canada, April 21-26, 2009

[図書] (計 2 件)

*A. Spradling, M. T. Fuller, R. E. Braun, and **S. Yoshida:** Germline Stem Cells. *A Cold Spring Harbor Perspectives in Biology Collection, "Germ Cells"*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1-20 (2011)

***S. Yoshida:** Chapter 8: Stem cell niche system in mouse spermatogenesis. *Stem Cell Biology and Regenerative Medicine Series, "Male Germline Stem Cells: Developmental and Regenerative Potential"* Humana Press, 159-175 (2011)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/germcell/>

<http://www.nibb.ac.jp/gamete-stem-cell/>

報道関連

中日新聞(2012年3月7日16面)「精子の源」神秘に迫る 岡崎から挑む-自然科学研究機構の若手(2)

Newton(2010年6月号P120)膨大な量の精子をつくりつづけるしくみとは?

アウトリーチ活動

基生研一般公開 2013年10月5日

基生研一般公開 2010年10月2日

NBRP-NIBB トレーニングコース 2012年8月9日-10日

http://www.nibb.ac.jp/medaka_course/

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 松生 (YOSHIDA, Shosei)

基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・教授

研究者番号：60294138

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

杉本 幸彦 (SUGIMOTO, Yukihiro)

熊本大学・医学薬学研究部・教授

研究者番号：80243038

北舘 祐 (KITADATE, Yu)

基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・助教

研究者番号：10455214

原 健士朗 (HARA, Kenshiro)

基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・助教

研究者番号：60551546