

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770226

研究課題名（和文）周期的な変動を示すマウス精子幹細胞の実体およびその維持機構の解明

研究課題名（英文）Characterization of mouse spermatogenic stem cells and their niche

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：本研究は精子幹細胞ニッチの実体を細胞・分子レベルで明らかにすることを目的とする。これまでの研究により、幹細胞が存在する血管近接領域に特異的に発現する遺伝子を 20 同定した。さらに、同定遺伝子の一つを欠いたマウスにおいて、精子幹細胞数が減少をすることを見いだした。今後、この遺伝子を機能解析することにより、発現細胞が幹細胞ニッチとしてどのように幹細胞を制御するかを明らかにする。

研究成果の概要（英文）：Stem cells are tightly linked to their niche or microenvironment, which regulates their behaviors. The mammalian germline stem cell (GSC) niche is likely to be located around the vascular-associated regions. However, specialized niche substructure and their cellular components within the seminiferous tubules have not been identified. To explore the detailed substructure and cellular components of the GSC niche, we initiated a comprehensive identification of the genes expressed around the vascular-associated regions within the seminiferous tubules. Until now, we verified 20 genes preferentially expressed around the vascular-associated regions by *in situ* hybridization. We anticipate that characterization of spatio-temporal expression patterns corresponding to putative stem cells will lead to greater understanding of stem cell-niche interactions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：生殖細胞、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

多くの動物は精子を形成し続けるために、

精子幹細胞を一定に保ち続ける。このバランスが崩れると、不稔あるいは腫瘍様の精巣肥大化が引き起こされる。しかし、マウスにおいて精子幹細胞は一定周期の間にその数を大きく変動することが予想されている。

本研究は、周期的な変動を示すマウス精子幹細胞の実体、およびその維持機構を明らかにすることを目的とする。すなわち、精子幹細胞およびそれを取り巻く微小環境（ニッチ）の実体を解明し、これらが一定周期の間、どのように変動するのかを詳細に解析する。これにより、継続的な精子形成を支えるホメオスタティックなメカニズムの解明に挑む。

2. 研究の目的

個体の一生を通じて精子が作られ続けるためには、精子を供給する大元となる精子幹細胞が必要である。しかし、精子幹細胞の実体やその維持機構は、ヒトを含むほ乳動物精巣においてほとんど明らかになっていない。

本研究は精子幹細胞および精子幹細胞を制御している微小環境（ニッチ）の実体を細胞・分子レベルで解明することを目標とする。

本研究の最終的なゴールは、精子幹細胞/ニッチに普遍的な分子基盤を解明することにより、ホメオスタティックな精子形成を支えるメカニズムの本質に迫ることである。

3. 研究の方法

精子幹細胞およびニッチで特異的に発現する遺伝子を同定するために、第一に、精子幹細胞/ニッチが偏在する精巣内の血管付近の細胞群をレーザーマイクロディセクション法により採取する。第二に、これらを用いてマイクロアレイ解析を行い、特異的発現を示す遺伝子を解析・同定する。第三に、これら遺伝子について、*insitu*ハイブリダイゼーション解析を行い、各遺伝子の精巣内での空間的な発現パターンを調べる。

4. 研究成果

(1) これまでに、400遺伝子について *in*

*situ*ハイブリダイゼーション解析を行い、精巣内の血管付近で特異的に発現する遺伝子を20同定した。

(2) その後、血管付近で特異的に発現する20種の遺伝子がそれぞれ精巣中のどの細胞で発現しているかを調べた。このとき、その細胞と精子幹細胞との空間的な位置関係をも明らかにするため、各遺伝子の発現パターンを3次元的に解明することを試みた。

(3) これまでに同定したニッチ特異的発現遺伝子の中から、CXCL12に的を絞って解析を進めた。発現解析の結果、CXCL12を発現する細胞が、精細管を覆うシート状構造をすること、さらに、血管・間質近傍に分布することが明らかとなった。次に、CXCL12発現細胞と精子幹細胞集団の位置関係を調べた。連続精巣切片を用いて調べた結果、ほとんどの精子幹細胞がCXCL12発現細胞の近くに分布していた。さらに培養下において、精子幹細胞はCXCL12発現細胞の周りに集まること、そして、精子幹細胞の増殖をCXCL12発現細胞が促進することが明らかとなった。以上の結果から、CXCL12発現細胞は精子幹細胞の近くで精子幹細胞の位置と増殖を制御する可能性が示唆された。

(4) さらに、同定遺伝子の一つを欠いたマウスにおいて、精子幹細胞数が減少をすることを見いだした。この結果は、この細胞が生体精巣で幹細胞を実際に制御することを示している。今後、この遺伝子を機能解析することにより、発現細胞が幹細胞ニッチとしてどのように幹細胞を制御するかを明らかにする。

(5) 本研究により、長年不明であったほ乳動物精子幹細胞ニッチの候補となる細胞が初めて同定された。今後、精子幹細胞およびニッチの分子的特徴および細胞レベルの挙動を詳細に解析することにより、継続的な精子形成を支えるホメオスタティックなメカニズムの解明につながると考えられる。

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1件)

Kitadate, Y., and Kobayashi, S.
Notch and Egfr signaling act antagonistically to regulate germ-line stem cell niche formation in *Drosophila* male embryonic gonad.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 107,14241-14246.(2010) 査読有

[学会発表](計9件)

Yu Kitadate, Ayumi Maruyama, Rie Ichikawa, Shosei Yoshida,
“Vasculature-associated CXCL12 positive peritubular cells are important cell types associated with the distribution of spermatogenic stem cells”, GERM CELLS meeting in Cold Spring Harbor Laboratory, 平成24年10月3日, Cold Spring Harbor, New York, (The United States of America)

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、平成24年9月26日、九州大学医学部百年講堂(福岡県福岡市)

Yu Kitadate, Ayumi Maruyama, Rie Ichikawa, Shosei Yoshida,
“Characterization of mouse male germline stem cell niche by gene expression profiling using laser capture microdissection”, The 58th/60th NIBB Conference “Germline”, 平成24年7月19日, 岡崎カンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

Yu Kitadate, Ayumi Maruyama, Rie Ichikawa, Shosei Yoshida,
“CHARACTERIZATION OF MOUSE MALE GERMLINE STEM CELL NICHE BY GENE EXPRESSION PROFILING USING LASER CAPTURE MICRODISSECTION”, ISSCR 10th annual meeting, 平成24年6月15日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

北館祐 丸山亜裕美 市川理恵 吉田松

生、
「レーザーマイクロダイセクション法によるマウス精子幹細胞ニッチの同定」第34回日本分子生物学会年会、平成23年12月13日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Yu Kitadate, Rie Ichikawa, Shosei Yoshida,
“Characterization of mouse male germline stem cell niche by gene expression profiling using laser capture microdissection”, NIBB-Princeton Symposium “Proteomics, Metabolomics, and Beyond”, 平成23年11月1日, 岡崎カンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

Yu Kitadate, Rie Ichikawa, Shosei Yoshida,
“Characterization of mouse male germline stem cell niche by gene expression profiling using laser capture microdissection”, Stem Cell Biology in Cold Spring Harbor Laboratory 平成23年9月21日 Cold Spring Harbor, New York, (The United States of America)

Yu Kitadate, Rie Ichikawa, Shosei Yoshida,
“Characterization of mouse male germline stem cell niche by gene expression profiling using laser capture microdissection”, GERM CELLS meeting in Cold Spring Harbor Laboratory 平成22年10月6日 Cold Spring Harbor, New York, (The United States of America)

北館祐、
「マウス精子幹細胞ニッチで発現する遺伝子の網羅的探索」研究事例紹介セミナー(次世代レーザーマイクロダイセクションシステム) 平成22年5月12日、基礎生物学研究所(愛知県岡崎市)

[図書](計1件)

北館祐 吉田松生、秀潤社、『細胞工学』
29「マウス精子形成幹細胞集団とニッ

チ ヌ (2 0 1 0) pp652-657.

〔その他〕

ホームページ等

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

http://www.nibb.ac.jp/germcell/members_info/Kitadate.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

北館 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

(2)研究分担者

(3)連携研究者