

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2007～2010

課題番号：19689007

研究課題名 (和文)

精子幹細胞の自己複製機構の解明

研究課題名 (英文)

Self-renewal mechanism of spermatogonial stem cells

研究代表者

篠原 美都 (SHINOHARA MITO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10372591

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：幹細胞・生殖・遺伝学

1. 研究計画の概要

精子幹細胞は成体の精巣にあり、一生にわたって精子形成の源となる細胞である。研究代表者らは 2003 年にマウスの精子幹細胞の長期培養系を確立し、これを Germline stem (GS) 細胞と命名した。この細胞の特徴は非常な長期にわたり安定的に増殖することであり、2年間で 10^{85} 倍 (139 passages) に増え、その間増殖速度や幹細胞としての活性・インプリンティングや核型などに全く変化を示さず、2年の培養後も正常な子孫を作った。

本研究の目的は幹細胞の安定した自己複製機構がどのようなメカニズムで成り立っているのか、そしてその破綻がどのように起こるのかを精子幹細胞を使って明らかにすることである。具体的には、GS 細胞の2年以降の増殖を追跡し、寿命の測定とともに、どのように終焉を迎えるかを観察する。また GS 細胞の自己複製を司るシグナル伝達経路の解明と、寿命と自己複製活性の関連について調べる。

2. 研究の進捗状況

5年以上にわたり GS 細胞の増殖曲線を記録した。同時に精巣内移植を行って幹細胞活性や分化能を調べた。増殖速度は長期培養によって衰えないが、幹細胞活性や分化能は低下していくことが分かった。

精子幹細胞の自己複製制御に関わる分子の解明を試み、Cyclin D2 が自己複製維持に関わることを明らかにした。また Cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) の p21 や p27 が GS 細胞の増殖に影響を及ぼすこと、特に p27 は精子幹細胞の自己複製制御に関与することを明らかにした。

3. 現在までの達成度

ほぼ計画通り達成している。

4. 今後の研究の推進方策

長期培養による精子幹細胞の分化能の低下のメカニズムの解明と、長期培養が自己複製シグナルに及ぼす影響の解析が残された課題であり、平成 22 年度はこれらを中心に解析し、成果のとりまとめを行う。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 15 件) (全て査読有)

- ① Kanatsu-Shinohara M., Takashima S., Shinohara T. Transmission distortion by loss of p21 or p27 cyclin-dependent kinase inhibitors following competitive spermatogonial transplantation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107(14):6210-6215 (2010).
- ② Morimoto H., Kanatsu-Shionohara M., Takashima S., Chuma S., Nakatsuji N., Shinohara T. Phenotypic plasticity of mouse spermatogonial stem cells. PLoS One. 4(11):e7909, p1-9 (2009).
- ③ Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Miki H., Inoue K., Morimoto H., Takashima S., Ogura A., Shinohara T. Genetic influences in mouse

- spermatogonial stem cell self-renewal. *J. Reprod. Dev.* 56(1):145-153 (2010).
- ④ Lee J., Kanatsu-Shinohara M., Morimoto H., Kazuki Y., Takashima S., Oshimura M., Toyokuni S., Shinohara T. Genetic reconstitution of mouse spermatogonial stem cell self-renewal in vitro by Ras/cyclin D2 activation. *Cell Stem Cell* 5(1):76-86 (2009).
- ⑤ Takashima S., Takehashi M., Lee J., Chuma S., Okano M., Hata K., Suetake I., Nakatsuji N., Miyoshi H., Tajima S., Tanaka Y., Toyokuni S., Sasaki H., Kanatsu-Shinohara M., Shinohara T. Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects. *Biol. Reprod.* 81(1):155-64 (2009).
- ⑥ Kanatsu-Shinohara M., Takehashi M., Shinohara T. Brief history, pitfalls, and prospects of mammalian spermatogonial stem cell research. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 73:17-23 (2008).
- ⑦ Lee J., Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Miki H., Inoue K., Morimoto H., Ogura A., Shinohara T. Heritable imprinting defect caused by epigenetic abnormalities in mouse spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* 80(3):518-27 (2009).
- ⑧ Kanatsu-Shinohara M., Takehashi M., Takashima S., Lee J., Morimoto H., Chuma S., Raducanu A., Nakatsuji N., Fässler R., and Shinohara T. Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche depends on b1-integrin. *Cell Stem Cell* 3(5):533-42 (2008).
- ⑨ Kanatsu-Shinohara M., Kato M., Takehashi M., Hirabayashi M., and Shinohara T. Production of transgenic rats following lentiviral transduction and xenogeneic transplantation of spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* 79(6):1121-8 (2008).
- ⑩ Kanatsu-Shinohara M., Muneto T., Lee J., Takenaka., Chuma S., Nakatsuji N., Horiuchi T., Shinohara T. Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes. *Biol. Reprod.* 78(4):611-7 (2008).
- ⑪ Kanatsu-Shinohara M., Lee J., Inoue K., Ogonuki N., Miki H., Toyokuni S., Ikawa M., Nakamura T., Ogura A., Shinohara T. Pluripotency of a single spermatogonial stem cell in mice. *Biol. Reprod.* 78(4):681-7 (2008).
- ⑫ Takehashi M, Kanatsu-Shinohara M., Miki H, Lee J, Kazuki Y, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Oshimura M, Ogura A, Shinohara, T. Production of knockout mice by gene targeting in multipotent germline stem cells. *Dev. Biol.* 312, 344-352 (2007).
- ⑬ Kanatsu-Shinohara M. and Shinohara T. Culture and genetic modification of mouse germline stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 312(1):344-52 (2007).
- ⑭ Lee J., Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Ogonuki N., Miki H., Toyokuni S., Kimura T., Nakano T., Ogura A., Shinohara T. Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells. *Development* 134(10), 1853-9 (2007).
- ⑮ Takehashi M., Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Ogonuki N., Miki H., Toyokuni S., Ogura A., Shinohara T. Adenovirus-mediated gene delivery into mouse spermatogonial stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(8), 2596-601 (2007).

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)