

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 25 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：2013～2017

課題番号：25114004

研究課題名(和文) マウス配偶子産生におけるGSCの制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigating the mechanisms for GSC regulation in mouse gametogenesis

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) 174,900,000円

研究成果の概要(和文)：精巣では長期間にわたって多数の精子を継続して産生し、次世代を確実に残す。これは、精子形成幹細胞が精子を作る「分化」と自分自身を残す「自己複製」とをバランスよく行う事が保証している。本研究はマウスを用いて、幹細胞の行動原理に関する新しいモデルの提唱、不可逆的に分化する時に起こるゲノムDNAの変化の解明、自己複製と分化を両立する新規分子メカニズムの発見、幹細胞が数を維持したり移植後に精子形成を再構築するメカニズムの解明を通して、精子形成幹細胞の実体解明に貢献した。

研究成果の概要(英文)：Continual production of numerous sperm in the testes ensured the continuity of life. Here, spermatogenic stem cells play essential roles through giving rise to both the sperm-producing differentiating cells and the self-renewing stem cells, in a well balance manner. This study has contributed toward the understanding of the nature of spermatogenic stem cells by proposing a novel model for the stem cell dynamics, discovering a crucial change in the status of genome DNA, discovery of novel molecular mechanisms making the selfrenewal and differentiation compatible in uniform tissue environment, as well as investigating the mechanisms underlying the stem cell number regulation and post-transplantation repopulation.

研究分野：発生生物学

キーワード：遺伝子 幹細胞 分化 クロマチン修飾

1. 研究開始当初の背景

新学術領域研究「配偶子幹細胞制御機構」(2008-2013年度)などによる研究成果によって、それまで謎に包まれていたマウス GSC(配偶子幹細胞)の機能的同定と柔軟な動態の解明、それを支える組織微小環境の解析が急速に進展していた。次の課題として幹細胞の本質、すなわち、幹細胞の数を保ちながらも自己複製と分化のバランスをとり、さらには組織の状況に応じてそのバランスを柔軟に変化させる制御メカニズムの解明がクローズアップされていた。

2. 研究の目的

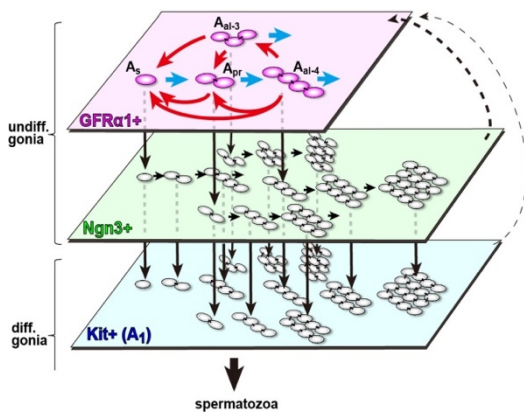
本研究はマウス精子幹細胞の動態(行動原理)及びそれを制御するメカニズムを解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

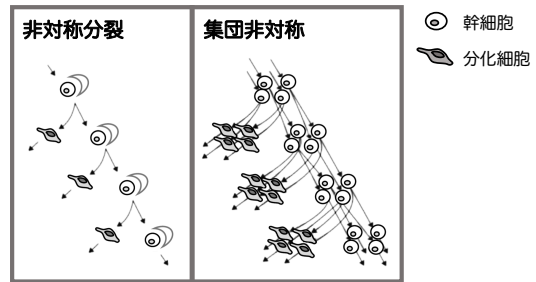
幹細胞を特異的に標識して追跡する運命追跡、蛍光タンパク質によって可視化された幹細胞の精巢内生体ライブイメージング、幹細胞機能を持つ細胞の詳細な遺伝子発現解析、同じくエピジェネティック修飾状態の解析を行った。さらに、上記の解析から得られた定量的データを数理統計解析や物理モデル解析などの手法を用いて解析した。

4. 研究成果

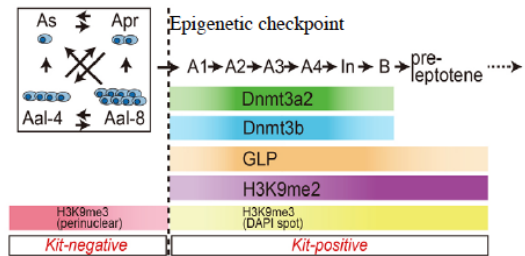
(1)マウス精子幹細胞動態の新しいモデルの提唱(Cell Stem Cell 2014):精子幹細胞の動態を単一細胞レベルでの運命追跡および生体ライブイメージングにより解析し、数理モデルを構築した。幹細胞は、単核の細胞と合胞体の状態を行き来して幹細胞プールを形成すると言う新しいモデルを提唱した。これは、1971年以來の定説に再考を迫るものであった。



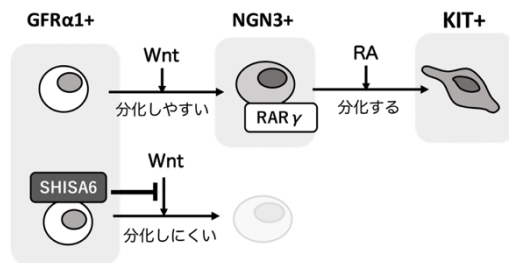
この動態の結果、「幹細胞は非対称分裂を繰り返す」という古典的な考え方ではなく、「個々の幹細胞はランダムに増殖と分化を行う一方で集団レベルで自己複製と分化のバランスを取る」という集団非対称の動態を示す事が明らかとなった。



(2)エピジェネティックチェックポイントの発見 (Development 2013):幹細胞が可逆的に行き来するプールから出て不可逆的に分化する段階で、ゲノムのエピジェネティック修飾が不連続に変化すること、その変化が分化において重要な枠割を果たす事を見出し、エピジェネティックチェックポイントと名付けた。分化の可逆性と不可逆性を分子レベルで説明するものとしてインパクトを与えた。



(3)自己複製と分化を両立する新規メカニズムの解明 (Development 2015, Stem Cell Reports 2017):精巢内では、同様に分化シグナル Wnt やレチノイン酸に曝される幹細胞の中に、自己複製する細胞と分化する細胞がバランスよく共存する。そのメカニズムは不明であったが、我々が新規に同定した Wnt 抑制因子 Shisa6 や、レチノイン酸受容体 (RAR γ) が不均一に発現することで、分化シグナルに対する感受性が不均一になるという新規のメカニズムを見出した。明確な幹細胞ニッチ構造に依存せずに幹細胞機能を説明できるメカニズムとして重要な提案である。



(4)幹細胞動態のさらなる解析(論文未発表):明確なニッチ構造のない組織で幹細胞の密度を恒常的に維持する新規のメカニズム、移植後の幹細胞が精子形成を再構築するダイナミクス、並びに新規に見出した幹細胞の運動の性質と意義の解析を、数理モデルを活用して解析している。いずれも精子形成幹細胞の未解明の重要な性質に迫るものである。

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 11 件) すべて査読あり

- ① Shawki HH, Oishi H, Usui T, Kitadate Y, Basha WA, Abdellatif AM, Hasegawa K, Okada R, Mochida K, El-Shemy HA, Muratani M, Ogura A, Yoshida S, and *Takahashi S: MAFB is dispensable for the fetal testis morphogenesis and the maintenance of spermatogenesis in adult mice. *PLoS One* 13, e0190800 (2018) doi.org/10.1371/journal.pone.0190800
- ② Kurita-Suzuki A, Kamo Y, Uchida C, Tanemura K, Hara K, and *Uchida T: Prolyl isomerase Pin1 is required sperm production by promoting mitosis progression of spermatogonial stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 497, 388-393 (2018) doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.090
- ③ Tokue M, Ikami K, Mizuno S, Takagi C, Miyagi A, Takada R, Noda C, Kitadate Y, Hara K, Mizuguchi H, Sato T, Taketo MM, Sugiyama F, Ogawa T, Kobayashi S, Ueno N, Takahashi S, Takada S, and *Yoshida S: SHISA6 confers resistance to differentiation-promoting Wnt/ β -catenin signaling in mouse spermatogenic stem cells. *Stem Cell Reports* 8, 561-575 (2017) dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.01.006
- ④ Yoshida S: From cyst to tubule: innovations in vertebrate spermatogenesis. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 5, 119-131 (2016) doi.org/10.1002/wdev.204
- ⑤ Umezu K, Hiradate Y, Oikawa T, Ishiguro H, Numabe T, Hara K, and *Tanemura K: Exogenous neurotensin modulates sperm function in Japanese Black cattle. *J Reprod Dev* 62, 409-414 (2016) doi.org/10.1262/jrd.2016-055
- ⑥ Zhou Z, Shirakawa T, Ohbo K, Sada A, Wu Q, Hasegawa K, Saba R, and *Saga, Y: The RNA binding protein Nanos2 organizes a post-transcriptional buffering system to retain primitive state of mouse spermatogonial stem cells. *Dev Cell* 34, 96-107 (2015) doi.org/10.1016/j.devcel.2015.05.014
- ⑦ *Ohbo K, and Tomizawa S: Epigenetic regulation in stem cell development, cell fate conversion, and reprogramming. *Biomol Concepts* 6, 1-9 (2015) doi.org/10.1515/bmc-2014-0036
- ⑧ Kubo N, Toh H, Shirane K, Shirakawa T, Kobayashi H, Sato T, Sone H, Sato Y, Tomizawa S, Tsurusaki Y, Shibata H, Saito H, Suzuki Y, Matsumoto N, Suyama M, Kono T, Ohbo K, and *Sasaki H: DNA methylation and gene expression dynamics

during spermatogonial stem cell differentiation in the early postnatal mouse testis. *BMC Genomic* 16, 624 (2015) doi.org/10.1186/s12864-015-1833-5

- ⑨ Ikami K, Tokue M, Sugimoto R, Noda C, Kobayashi S, Hara K, and *Yoshida S: Hierarchical differentiation competence in response to retinoic acid ensures stem cell maintenance during mouse spermatogenesis. *Development* 142, 1582-1592 (2015) doi.org/10.1242/dev.118695
- ⑩ Hara K, Nakagawa T, Enomoto H, Suzuki M, Yamamoto M, *Simons BD, and *Yoshida S: Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. *Cell Stem Cell* 14, 658-672 (2014) doi.org/10.1016/j.stem.2014.01.019
- ⑪ Shirakawa T, Yaman-Deveci R, Tomizawa S, Kamizato Y, Nakajima K, Sone H, Sato Y, Sharif J, Takada-Horisawa Y, Yoshida S, Ura K, Muto M, Koseki K, Suda T, and *Ohbo K: An epigenetic switch is crucial for spermatogonia to exit the undifferentiated state toward a Kit-positive identity. *Development* 140, 3565-3576 (2013) doi.org/10.1242/dev.094045

[学会発表] (計 15 件)

- ① S. Yoshida: Dynamical regulation of spermatogenic stem cells in homeostasis and after transplantation. *CDB Symposium 2018 "Dynamic Homeostasis From Development to Aging"*, Kobe, Japan, March 26-28, 2018 (招待講演)
- ② M. Tokue and S. Yoshida: Cell-intrinsic mechanism underlies the SSC fate selection between differentiation and self-renewal in an open niche environment of seminiferous tubules. *50th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction*, Marriott Wardman Park, Washington D.C., 13-16 July 2017
- ③ Yoshida: Dynamics of Spermatogenic Stem Cells in the Open Niche Environment. *"Germinal Stem Cell Biology" Gordon Research Conference*, The Chinese University of Hong Kong, China June 18-23, 2017 (招待講演)
- ④ S. Yoshida: Competition for FGFs yields robust homeostasis in the density of mouse spermatogenic stem cells. *"Advances in Stem Cells and Regenerative Medicine" EMBO Conference*, EMBL Heidelberg, Germany May 23-26, 2017 (招待講演)
- ⑤ Tomizawa S, Kobayashi Y, Shirakawa T, Hoshi I, Nakajima K, Royo H, Peters AHFM, Anastassiadis K, Stewart AF, and Ohbo K: Kmt2b is required for spermatogenesis through both bivalent and

- monovalent priming of the spermatogenic stem cell epigenome. *EMBO conference: Nuclear structure and dynamics*, L'Isle sur la Sorgue, France, October 4-8, 2017
- ⑥ **Hara K**, Tanemura K, and **Yoshida S**: Diffusive motion dynamics of sperm stem cells in mouse testis. *Fourth World congress of reproductive biology*, Sept. 27-29, 2017
- ⑦ **S. Yoshida**: Density regulation of spermatogenic stem cells by FGFs in the mouse seminiferous tubules. *Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ Cells*, Cold Spring Harbor, USA, October 4-8, 2016 (招待講演)
- ⑧ **S. Yoshida**: Density regulation of spermatogenic stem cells in the mouse testis. *The Stem Cell Niche - Development and Disease*, Favrholm Campus Conference Center, Copenhagen, Denmark, May 22-26, 2016 (招待講演)
- ⑨ Tomizawa S, Shirakawa T, Dahl A, Alexopoulou D, Anastasiadis, K, Stewart AF, and **Ohbo K**: Role of histone methyltransferase Mll2 for male germ cell differentiation. *Gordon Research Conference, Chromatin Structure and Function*, Les Diablerets Conference Center, Les Diablerets, Switzerland, May 22-27, 2016
- ⑩ **S. Yoshida**: Single-cell resolution analysis of mouse spermatogenic stem cell dynamics, *Wellcome Trust Advanced Courses and Scientific Conferences "Single Cell Biology"*, Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridge, UK, March 8-10, 2016
- ⑪ **S. Yoshida**: Stem cell dynamics in the mouse testis, *The 10th CDB Lecture*, Center for Developmental Biology, RIKEN, Kobe, Japan, October 19-20, 2015
- ⑫ **S. Yoshida**: Spermatogenic stem cell pool control by lymphatic endothelial cells through FGF5. *Gordon Research Conference. Germinal Stem Cell Biology*, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China, May 31 - June 5, 2015
- ⑬ 大保和之: エピジェネティクスの視点から見た精原幹細胞分化 第60回日本生殖医学会シンポジウム「生殖細胞の産生制御機構」パシフィコ横浜 2015年4月26日(招待講演)
- ⑭ **S. Yoshida**: Mouse spermatogenic stem cells: their in vivo identity and dynamics. *EMBL Conference on Stem Cells in Cancer and Regenerative Medicine 2014*, EMBL, Heidelberg, Germany, October 9-12, 2014
- ⑮ **S. Yoshida**: A single-cell-resolution analysis of the sperm stem cell dynamics in the mouse testis. *The World Congress of Reproductive Biology 2014*, Edinburgh International Conference Centre, Edinburgh, UK, September 2-4, 2014 (招待講演)
- [図書] (計2件)
- ① **Yoshida S**. (2018). Regulatory mechanism of spermatogenic stem cells in mice: their dynamic and context-dependent behavior. In *Reproductive & Developmental Strategies*, K. Kobayashi, T. Kitano, Y. Iwao, and M. Kondo, eds. (Springer), Chapter 4. Stem Cell.
- ② 吉田松生 ギルバート発生生物学 第17章 (翻訳) *Developmental Biology*, tenth edition, Scott F. Gilbert 2013年刊, *メディカルサイエンスインターナショナル* P599-635, 2015年3月
- [その他]
ホームページ等
<http://www.nibb.ac.jp/adventures-in-germline-wonderland/index.html>
<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~finemorp/index.html>
<http://www.agri.tohoku.ac.jp/seisyoku/index.html>
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
大保 和之 (OHBO, Kazuyuki)
横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授・
研究者番号: 70250751
原 健士朗 (HARA, Kenshiro)
東北大学・農学研究科・准教授・
研究者番号: 60551546 (平成28年度から
研究分担者)
- (3) 連携研究者
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
中川 俊徳 (NAKAGAWA, Toshinori)
基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・助教・
研究者番号: 50456894
原 健士朗 (HARA, Kenshiro)
東北大学・農学研究科・准教授・
研究者番号: 60551546 (平成27年度まで
連携研究者)
- (4) 研究協力者
Benjamin D. Simon, David Jorg (ケンブリッジ大学)
小川 毅彦 (横浜市立大学)
古関 明彦 (理化学研究所)
小林 悟 (筑波大学)
高橋 智 (筑波大学)
中村 隼明 (広島大学)
高田 慎治、上野 直人 (NIBB)