

令和元年6月19日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05046

研究課題名(和文)精子幹細胞の生存・自己複製における接着シグナルの分子メカニズムと機能的意義の解明

研究課題名(英文)Functional role and molecular mechanisms of adhesion signal in survival and self-renewal of spermatogonial stem cells

研究代表者

高島 誠司(Takashima, Seiji)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号：40396891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、精子幹細胞の生存と自己複製を担保する『増殖因子』と『細胞接着』のそれぞれの役割とその相互作用を明らかにするために行った。結果、GS細胞の幹細胞性における接着分子-細胞外マトリクス(ECM)の組み合わせは厳密に決まっていなかったことが判明した。一方、ECMの物理特性の影響の検証を行うべく、硬さ可変ECMの作出を行ったが、GS細胞の接着が可能な人工ECMの作製には至らなかった。一方この研究の過程で、2つの精子幹細胞自己複製因子のin vivoでの機能の違いを解析し、GDNFはより未分化な、FGF2は分化誘導に感受性の高い未分化型精原細胞の細胞集団を増加させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精子幹細胞は、精細管最外側にある精子幹細胞ニッチにおいて自己複製と分化を繰り返し、個体の生涯にわたり精子形成を続ける。この細胞は試験管内で培養し、精子を作り出すこと、遺伝子を改変することも可能なため、医療・畜産など様々な分野の技術発展に貢献する可能性がある。しかし、この細胞の試験管培養はマウス・ラット・ハムスターでしか達成されていない。精子幹細胞が試験管内でどのように生存保証と増殖を勝ち取るか、その原理を追求することは、経済家畜やヒトの精子幹細胞の試験管内培養を達成する上で重要な情報を提供する。

研究成果の概要(英文)：The present study was tried to unveil the role of crosstalk between self-renewal factors and cell adhesion that ensure survival and self-renewal of spermatogonial stem cells. As a result, it was found that the adhesion molecule-extracellular matrix (ECM) combination in stemness of GS cells was not strictly determined. On the other hand, in order to examine the influence of the physical properties of ECM, although the stiffness variable ECM was made, GS cells did not attached onto the matrix.

Meanwhile, in the course of this study, we revealed that two self-renewal factors differences in vivo function of two sperm stem cell self-replication factors. GDNF was more undifferentiated, and FGF2 was found to increase the cell population of undifferentiated spermatogonia that is sensitive to differentiation induction.

研究分野：生殖生物学・幹細胞生物学

キーワード：精子幹細胞 生存 自己複製 接着

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精子幹細胞は、精細管最外側にある精子幹細胞ニッチェにおいて自己複製と分化を繰り返し、個体の生涯にわたり精子形成を続ける。研究代表者はこれまで、研究協力者の篠原らが樹立した培養精子幹細胞 (Germline Stem Cell: GS 細胞)を用い、自己複製メカニズムの解明を進めてきた。

研究代表者は GDNF 刺激による RAS-AKT-CCND2 経路の活性化が GS 細胞の自己複製を誘導することを示した (Lee, Takashima et al., Cell Stem Cell, 2009)。続いて、細胞周期制御に関わる CDKN1B は精子幹細胞の分化型分裂/自己複製分裂を制御していることを見いだした (Kanatsu-Shinohara, Takashima et al., PNAS, 2010)。そして最近、GDNF 非存在下での精子幹細胞自己複製という従来のドグマに反する現象を発見し、この特殊な自己複製が FGF2 により保証されていることを示した (Takashima et al., Stem Cell Rep., 2015)。更にこの研究過程で、精子幹細胞の生存と自己複製にはインテグリンを介した ECM との接着が不可欠なことを見いだした。精子幹細胞の自己複製メカニズムを全て理解するには、未だ明らかでない『ECM との接着が果たす役割』を解明する必要がある。

2. 研究の目的

研究代表者は本研究計画において、精子幹細胞自己複製メカニズムの全容を把握する上で未解明となっている接着刺激の分子メカニズムを明らかにすると共に、自己複製因子刺激とのクロストークの有無とそのメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

GS 細胞の培養

LacZ 遺伝子を構成的に発現する DBA/2 マウスは、C57BL6/J 背景の ROSA26 マウス (構成的に LacZ を発現する) を DBA/2 系統に 5 世代以上バッククロスしたものを使用した。このマウスを交配し得られた生後 6-8 日目の LacZ 陽性オスマウスの精巣から精細管を取り出し、コラゲナーゼ・トリプシンによる段階的消化を行い、シングルセルを得た。この細胞を GS 細胞培地 (後述) に懸濁し、ゼラチンコート 6 穴ディッシュ上に播種した。翌日に浮遊細胞を回収し、6 穴ティッシュカルチャーディッシュに再播種したのち、出現した GS 細胞の細胞塊をマウス胎児線維芽細胞フィーダー上に再播種し、継代培養で維持した。この細胞は以後 ROSA GS 細胞とする。培地は、StemPro34 培地をベースに、以下の因子群を添加して使用した。25 µg/ml インスリン (ナカラ イテスク # 19251-24)、100µg/ml トランスフェリン (Sigma T1147)、60µM プトレシン (Sigma P7505)、30nM 亜セレン酸ナトリウム (Sigma S1382)、6 mg/ml グルコース (Sigma G7021)、200 µg/ml ピルビン酸 (Sigma P2256)、1µl/ml DL-乳酸 (L4263)、5mg/ml 牛血清アルブミン (MP Biomedicals 810661)、2 mM L-グルタミン (Sigma G7513)、50µM 2-メルカプトエタノール (Sigma M3148)、1×MEM ビタミン溶液 (Invitrogen 11120-052)、1×非必須アミノ酸溶液 (Invitrogen 11140-050)、100 µM L-アスコルビン酸 (Sigma A4544)、10 µg/ml d-ビオチン (Sigma B4501)、30 ng/ml β-エストラジオール (Sigma E2758)、60 ng/ml プロゲステロン (Sigma P8783)、10 ng/ml ヒト FGF2 (ペプロテック 100-18)、10 ng/ml ヒト GDNF (ペプロテック 450-10)、1%牛胎児血清 (BioWest S1820-500)。

遺伝子導入

遺伝子導入は、レンチウイルスベクターを用いて行った。マウス *Itga5* をクローニングした CSII-EF-MCS-IRES-Venus、pCAG-HIVgp、pCMV-VSV-G-RSV-Rev の三つのプラスミドベクターを 293T へトランスフェクトし、得られたウイルス溶液を 50,000×g、4℃、2 時間遠心して濃縮した。このウイルスを ROSA GS 細胞に 2~10 Multiplicity of infection で感染させた。フローサイトメーターで、一部の細胞で VENUS 発現が確認された。そこで、セルソーター (BD FACS Aria-IIIu) を用いて、VENUS 陽性細胞のみを純化して実験に使用した。

フローサイトメトリー

GS 細胞をトリプシン処理にて培養皿より回収し、下記に示す各種抗体で染色し、フローサイトメーター (BD FACS Calibur) で解析した。使用した抗体は以下の通り。Rat anti-mouse KIT monoclonal antibody (Clone: 2B8, eBioscience 14-1171)、Rat anti-human ITGA6 monoclonal antibody (Clone: GoH3, Biolegend 313602)、Biotin-conjugated hamster anti-rat ITGB1 monoclonal antibody (Clone: Ha2/5, BD Biosciences 555004)、Rat anti-EPCAM monoclonal antibody (Clone: G8.8, BioLegend 118202)、Rat anti-CD9 monoclonal antibody (Clone: KMC8, BD Biosciences 553758)、Allophycocyanin-conjugated goat anti-rat Ig (BD Biosciences 551019)、Allophycocyanin-conjugated streptavidin (BD Biosciences 554067)。

接着試験

12 穴培養皿にラミニンまたはフィブロネクチンをコートし、細胞を播種、1 時間後に浮遊細胞と接着細胞をそれぞれ計数し、接着率を算出した。

遺伝子発現解析

細胞を回収し、TRIZOL 試薬 (Invitrogen 15596-018) またはセパゾール RNA I Super G (ナカラ イテスク 09379-55) を用いてトータル RNA を抽出した。逆転写反応は、Verso cDNA 合成キット (Thermo AB-1453) 及び ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡 FSQ-301) を用いて行った。定量的 PCR 試薬は FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche Applied Science 04913914001)、及び TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ RR820A)、解析は Thermal Cycler Dice Real Time System TP-810 を用いて行った。使用したプライマーは Masaki et al., Stem Cell Rep., 2018、Sakai et al., J. Reprod. Dev., 2018、及び Takashima et al., Stem Cell Rep., 2015 を参照。

GS 細胞移植と X-gal 染色

精子幹細胞移植は過去の報告に従い実施した (Takashima et al., Stem Cell Rep., 2018)。具体的には、成獣 WBB6F1-Kit^{fl}/Kit^{fl/y} マウス精細管に、4 μ L に調整した細胞分散液を注入した。この手法で、75~85%の精細管が細胞分散液で満たされた。移植2ヶ月後に精巣を摘出し、コロニー数をカウントした。移植された精子幹細胞は LacZ 遺伝子を発現するため、X-gal 試薬により紫色に発色する。そこで、摘出した精巣を 4% PFA in PBS (-) で固定したのち、X-gal 染色により移植精子幹細胞由来のコロニーを染色した。

硬さ可変の培養基板の作製

ゲルコーティングカバーガラスの作製は、以下に記した論文を参照にして行った (Kadow et al. 2007, Tse et al. 2010, Aratyn-Schaus et al. 2010, Trappmann et al. 2012, Yip et al. 2013, Higuchi et al. 2014)。直径 18 mm の丸カバーガラス (松波硝子工業株式会社、大阪) を 5N NaOH (和光純薬) に一晩浸漬した。これを 60°C で乾燥し、100 μ l のアミノプロピルトリエトキシシラン (3-Aminopropyltriethoxysilane: APES; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を滴下し、5~10 分間処理した。APES 処理後、純水で 5 分間の洗浄を 2 回行い、PBS [-] で希釈した 0.5% グルタルアルデヒド (20% Glutaraldehyde Solution; 和光純薬) 溶液に 30 分間浸漬した。親水化処理したカバーガラスは 60°C で乾燥した。カバーガラスにコーティングするゲルはポリアクリルアミドゲルを用いた。40% アクリルアミド溶液と 2% ビスアクリルアミド溶液を用い、Engler ら (2006) と Tse JR ら (2010) と Shimizu ら (2012) の論文を参考に 4 種類の硬さになるように混合溶液を作製し、混合溶液中の酸素を除去するため 20 分間脱気を行った。脱気後、ラジカル重合開始剤として純水で希釈した 10% 過硫酸アンモニウム (ナカライテスク) を混合溶液に対して 10%、ラジカル重合促進剤として N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (和光純薬) を 1% 添加し、ボルテックス攪拌した。攪拌後の溶液 25 μ l をジクロロジメチルシラン (Sigma-Aldrich) で疎水化処理したガラス板に滴下し、親水化処理したカバーガラスを被せて 30 分間静置した。その後、疎水化処理したガラス板から剥がすことでポリアクリルアミドゲルコートカバーガラス (以下、ゲルガラス) を作製した。ゲルガラスは純水に 0.1 M MES (ナカライテスク) と 0.5 M NaCl (和光純薬) を溶解し、pH 6.1 に調整した MES buffer に 5 分間浸漬することを 2 回繰り返し、未重合のアクリルアミド溶液を洗い落とす。ポリアクリルアミドゲルに細胞播種しても細胞は接着しないため、化学的な架橋反応によりゲルガラス上へ ECM のゼラチンをコーティングした。架橋剤として Sulfo-SANPAH を用いた。ゲルガラス上に 100 μ l の Sulfo-SANPAH 溶液を滴下し、波長 254 nm の UV を照射する UV クロスリンカー (フナコシ株式会社、東京) で、UV の放電管から約 5cm の距離で 10 分間処理した。その後、50 mM pH8.5 HEPES buffer を 100 μ l 滴下し、さらに 10 分間 UV 処理した。この処理を行うことで、Sulfo-SANPAH のアジド基が UV により活性化し、光分解によって生じたラジカルがポリアクリルアミドゲルとラジカル重合を起こして Sulfo-SANPAH とポリアクリルアミドゲルが接着する (Tse et al. 2010, Yip et al. 2013)。UV 処理後、50 mM pH8.5 HEPES buffer に 3 回浸漬し、余分な Sulfo-SANPAH 溶液を洗い落とす。その後ゼラチンを 0.2% 添加した 50 mM pH8.5 HEPES buffer に一晩浸漬した。この処理を行うことで、Sulfo-SANPAH の NHS 基の持つ活性化エステルがゼラチンのアミノ基と反応し、アミド結合を引き起こすことでゲルガラスにゼラチンを架橋できる。ゼラチン架橋後、ゲルガラスは 50 mM pH8.5 HEPES buffer で希釈した 0.5 M エタノールアミン (Ethanalamine; Sigma-Aldrich) 溶液に 30 分間浸漬した。この処理を行うことで、ゼラチンと架橋していない NHS 基をエタノールアミンのアミノ基と反応させ、未反応の NHS 基を取り除いた。その後 50 mM pH8.5 HEPES buffer に 30 分間浸漬、PBS で 2 回洗浄後 30 分間浸漬することで、エタノールアミンを洗い落した。エタノールアミン処理後のゲルガラスは 12 穴ディッシュに移し、クリーンベンチ内の UV に 15 分曝すことでゲルガラスの滅菌を行った。滅菌後、10% FBS 培地に一晩浸漬することで、ポリアクリルアミドゲルと培地を平衡化した (ゲルガラスの写真)。

ゼラチン微粒子による in vivo 未分化型精原細胞の刺激

京都大ウイルス・再生研の田畑泰彦教授より譲渡されたゼラチンマイクロスフェア 1mg に mouse FGF2 及び mouse GDNF (ともに peprotech) を 10 μ g ずつ含浸させ、8 週齢の野生型 C57BL6/J (B6) マウス (清水実験材料、もしくは日本 SLC)、及び抗がん剤ブスルファンを 44 mg/kg b. w. で投与し生殖細胞を除去した B6 マウスに移植した。移植 1 日後/10 日後に精巣を摘出し、解析に供した。

免疫染色

摘出した精巣は、4% PFA in PBS (-) で4℃一晩固定したのち、30% ショ糖 in PBS (-)で置換後、OCT コンパウンド (サクラファインテック) に包埋した。これをマイクロトームで10 μm厚に薄切し MAS コートスライドガラス (松浪) に貼り付け、蛍光免疫染色を行なった。薄切切片はOCT コンパウンドを洗い流した後、氷冷の0.1% TritonX-100 (SIGMA) in PBS(-)で処理したのち、10%ロバ血清・0.1% 牛血清アルブミン・0.1% Tween-20 in PBS(-)で、1時間室温でブロッキングしたのち、一次抗体反応を行なった。使用した抗体は以下のとおり。Goat anti-rat GFRA1 antibody (AF560 R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN)、Rabbit anti-BrdU antibody (NBP2-14890 Novus Biologicals, Littleton, CO)、Rabbit anti-PLZF antibody (sc-22839 Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX)、Rabbit anti-RARG monoclonal antibody (#8965 Cell Signaling Technology, Danvers, MA)、Alexa Fluor 488/555/647-conjugated donkey anti-rabbit IgG (A-21206, A-21432, A-21447 Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA)。

4. 研究成果

①接着におけるインテグリン依存性の検証

培養精子幹細胞 (Germline Stem cell, GS 細胞) は基底膜成分であるラミニンに対し、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ を介し接着することで、生存と増殖が可能となる。しかし、インテグリン非依存性に細胞接着を引き起こすポリ-L-リジンコートしたディッシュ上に接着させた場合、GS 細胞は増殖することができず、アポトーシスに陥った。この際、自己複製因子 GDNF はこのアポトーシスをある程度抑制したが、FGF2 は全く抑制しなかった。この現象は、接着により生じるシグナルがインテグリンを介しており、これが GDNF により入力される生存・増殖シグナルをコントロールしていることを示していた。

②接着におけるインテグリン α 鎖-細胞外マトリクスの選択性の検証

インテグリン α 鎖は接着するマトリクスの種類を規定する。GS 細胞はインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ を介し基底膜成分であるラミニンと接着するが、ゼラチンやフィブロネクチンとは接着することができない。これは、必要な α 鎖が発現していないことによる。GS 細胞の生存と増殖には細胞外マトリクスへの接着が必要であるが、これが、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ -ラミニン相互作用に特異的なものかを検証した。GS 細胞にインテグリン $\alpha 5$ を強制発現させたところ、フィブロネクチンへの接着が可能となり、生存と増殖も示した。接着による GS 細胞の生存・自己複製の担保は、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ -ラミニン相互作用に特異的なものではなく、他の α 鎖-細胞外マトリクスの組み合わせでも代償可能であることが示された。

③非生理的条件下で生存した GS 細胞の機能解析

インテグリン $\alpha 5$ 強制発現 GS 細胞がフィブロネクチン・ラミニン双方に同程度の接着能力を示す。そこでこの細胞を、フィブロネクチンまたはラミニンで培養した場合の増殖速度を比較したところ、双方とも対数増殖を示し、有意差は見られなかった。これらのことから、細胞外マトリクスへの接着様式について、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ -ラミニン相互作用は、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ -フィブロネクチンで代用できることが示された。また一方、ポリ L リジンによる強制接着では生存を保証できないこと、インテグリン $\beta 1$ ノックアウト GS 細胞はフィーダー細胞上で生存することも判明していることから、インテグリンを介した細胞外環境との相互作用は必要だが、インテグリン $\beta 1$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ に限らず、より幅広い接着様式でこのシグナルを賄えることが示唆された。次に、細胞増殖と遺伝子発現が細胞外マトリクスにより変化するかを検証した。インテグリン $\alpha 5$ 強制発現 GS 細胞をラミニンまたはフィブロネクチン上で培養し、リアルタイム PCR 及び FACS により精子幹細胞マーカーの発現を比較したが、調べた 15 種類のマーカーではいずれも有意な差は見られなかった。そして、フィブロネクチン上で培養したインテグリン $\alpha 5$ 強制発現 GS 細胞を不妊マウス精巣に移植したところ、生着、精子形成を再開することを確認した。つまり、非生理的な接着シグナルでも、精子幹細胞活性が維持されることを確認した。

④細胞外マトリクスの物理的条件が幹細胞に与える影響の解析

硬さを自在に変えられる人工細胞外マトリクスを作製し、硬さを操作することで GS 細胞にどのような影響が及ぼされるかを検証することを目指し、前段階の実験としてまず、胚性がん細胞 F9 を培養可能な、硬さ可変の人工細胞外マトリクスの作製を試みた。マトリクスの物理基盤をポリアクリルアミドゲルとし、これに Sulfo-SANPAH を紫外線架橋で化学結合させ、ゲル表面にタンパク質との高い反応性を示す NHS 基を付与した。このゲルにゼラチンを反応させ、細胞接着性を付与した。

異なる硬さで培養した F9 の細胞挙動を検証するため、1.8 kPa、7.4 kPa、34.9 kPa、70.0 kPa の硬さの人工 ECM 上で F9 を培養した。位相差顕微鏡観察にて、作製した人工 ECM に細胞が接着し生存していたため、細胞培養基板として実験に用いることができると判断した。1.8 kPa、7.4 kPa の硬さ上で培養した F9 は広がって接着せず、丸く盛り上がったような細胞の集合体を作った。一方、34.9 kPa、70.0 kPa の硬さ上で培養した F9 は広がって接着し、平らな細胞形態をと

った。これらのことは、F9 細胞が気質に接着するには、ある程度の硬さが必要であることを示している。

これらの結果に基づき、GS 細胞を接着させられる人工マトリクスの創生に挑戦した。NHS 基を付与したポリアクリルアミドゲルに、GS 細胞接着基質であるラミニンを反応させた。結果、GS 細胞は一旦接着するものの、細胞播種翌日には剥離して浮遊状態のままコロニーを形成していた。このマトリクスには F9 細胞は接着できるため、作製したマトリクスに細胞接着能は付与されていると判断できる。GS 細胞はもともとそれほど接着力の高い細胞ではない。接着に必要なリガンド数が十分でなかったか、あるいは硬さが足りなかったか、であると推察される。

⑤GDNF と FGF2 の機能的差異

GDNF と FGF2 はともに真正の精子幹細胞自己複製因子である。しかし、FGF2 が *in vivo* でも同様に自己複製因子として機能するかは不明であった。そして本研究計画①ではこの 2 つに大きな機能的差異があることが示唆された。そこで、GDNF と FGF2 が *in vivo* でも自己複製因子として機能するかを検証することにした。

ゼラチンマイクロスフェアにこれらの因子を含浸させマウス精巣に移植したところ、双方ともに未分化型精原細胞 (*in vivo* での精子幹細胞を含む細胞集団) の過剰な増加が観察された。しかし同時に、GDNF が立体的な未分化型精原細胞コロニーを誘導する一方、FGF2 は基底膜に沿った平面的なコロニーを誘導することを見出した。そこで、これらの細胞の分化度を比較すべく、PLZF 及び RARG の陽性率を検証したところ、PLZF はどちらの因子で誘導されたコロニーでも 90% 以上の細胞が陽性であったが、RARG は GDNF 誘導コロニーにおける未分化型精原細胞の 2 割強が陽性であったのに対し、FGF2 誘導性コロニーは 6 割以上の細胞が RARG 陽性であった。RARG は精子幹細胞の分化を誘導するレチノイン酸の受容体であり、この分子の欠損は分化不全を呈する。つまり、RARG 陽性細胞は未分化型精原細胞の分化感受性を規定する分子である。実際、RARG を強制発現させた未分化型精原細胞は、RA に反応して分化する (Ikami et al., Development, 2015)。おそらく FGF2 は、未分化型精原細胞の中でもより分化誘導感受性の高い細胞集団を拡大する機能があると推察された。

さらに、FGF2 が精巣体細胞に与える影響についても検証した。抗がん剤ブスルファンの投与により生殖細胞を除去したマウス精巣に、増殖因子含浸ビーズを移植し、定量的 PCR にて遺伝子発現解析を行なった。結果、精巣体細胞への FGF2 刺激は *Gdnf* と *Cyp26b1* の発現抑制を引き起こした。実は精子幹細胞における *Rarg* の発現は、普段 GDNF により抑制されており、それがなくなると発現上昇する。一方 FGF2 は発現に影響しない。つまり、FGF2 が精巣内で RARG 陽性の未分化型精原細胞を増加させたのは、FGF2 が精巣内 *Gdnf* の発現を抑制し、GDNF 量の低い条件を創出し、そこで未分化型精原細胞を増殖させたためであると考えられる。また、*Cyp26b1* は RA 代謝酵素をコードするが、同じファミリーであるところの *Cyp26a1*, *Cyp26c1* と違い、RA の有無に依存せず恒常的に発現する。ところが、FGF2 刺激は *Cyp26b1* のみを有意に抑制した。つまり、*Cyp26b1* は RA 濃度とは独立し FGF2 濃度に依存して制御されることが判明した。そして FGF2 は、RARG 陽性の未分化型精原細胞を生み出すだけでなく、同時に *Cyp26b1* を抑制することで RA の活性を維持する役割も果たすことが示唆された。これらの機能を考慮すると、FGF2 は真正の自己複製因子としての機能を有するにも関わらず、*in vivo* では体細胞に作用することで、未分化型精原細胞を分化させる働きがあることが推察された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) **Takashima S.** Biology and manipulation technologies of male germline stem cells in mammals. **Reprod Med Biol** 2018;17:398-406. (Invited Review, 査読あり)
- (2) Masaki K, Sakai M, Kuroki S, Jo J, Hoshina K, Fujimori Y, Oka K, Amano T, Yamanaka T, Tachibana M, Tabata Y, Shiozawa T, Ishizuka O, Hochi S, **Takashima S.** FGF2 has distinct molecular functions from GDNF in the mouse germline niche. **Stem Cell Rep** 2018;10:1782-1792. (査読あり)
- (3) Sakai M, Masaki K, Aiba S, Tone M, **Takashima S.** Expression dynamics of self-renewal factors for spermatogonial stem cells in the mouse testis. **J Reprod Dev** 2018;64:267-275. (査読あり)
- (4) **Takashima S,** Shinohara T. Culture and transplantation of spermatogonial stem cells. **Stem Cell Res** 2018;29:46-55. (Invited Review, 査読あり)
- (5) 高島誠司 (2017) 哺乳類精子幹細胞の試験管内操作技術. 日本胚移植学雑誌 39, 143-149. (査読あり)
- (6) Yamanaka, T., Tashima, K., Takahashi, R., **Takashima, S.**, Goto, T., Hirabayashi, M., Hochi, S. (2016). Direct comparison of Cryotop® vitrification and Bicell® freezing on recovery of functional rat pancreatic islets. **Cryobiology** 73, 376-382. (査読あり)

〔学会発表〕（計 12 件）

- (1) Kaito Masaki, Shunta Sakanishi, Shigeru Kyuwa, Shigeru Kakuta, and Seiji Takashima 『Dysregulated interleukin-1 activity results in male infertility』, ICIS 2017 at Kanazawa. 2017/10/29-11/1
- (2) Kaito Masaki, Shunsuke Kuroki, Jun-ichiro Jo, Makoto Tachibana, Yasuhiko Tabata, Seiji Takashima 『Ambivalent behavior of fibroblast growth factor 2 in mouse germline niche』, WCRB 2017 at Okinawa. 2017/9/26-28
- (3) Akihiro Tsuchimoto, Masaaki Tone, Seiji Takashima 『Depletion of recipient germ cells compromises the spermatogenesis of transplanted testis tissue』, WCRB 2017 at Okinawa. 2017/9/26-28
- (4) Shota Aiba, Haruhiko Adachi, Kaito Masaki, and Seiji Takashima 『The role of neuroendocrine system in regulating spermatogenesis』, WCRB 2017 at Okinawa. 2017/9/26-28
- (5) Seiji Takashima, Mizuki Yagi, Kaito Masaki, Shunsuke Kuroki, Makoto Tachibana, Yuki Fujimori, Kazuo Hoshina, Kenji Oka, Toshiyasu Amano, Tanri Shiozawa, Osamu Ishizuka and Shinichi Hochi 『Differential expression of self-renewal factors for spermatogonial stem cells in the mammalian testicular niche』, ISSCR 2016 at San Francisco, 2017/6/14-16 ISSCR
- (6) Seiji Takashima, Kaito Masaki, Jun-ichiro Jo, and Yasuhiko Tabata “Bivalent role of FGF2 in mouse spermatogonial niche” in Annual meeting of International Society for Stem Cell Research at Boston, June 2017.
- (7) Seiji Takashima, Mizuki Yagi, Kaito Masaki, Shunsuke Kuroki, Makoto Tachibana, Yuki Fujimori, Kazuo Hoshina, Kenji Oka, Toshiyasu Amano, Tanri Shiozawa, Osamu Ishizuka and Shinichi Hochi “Differential expression of self-renewal factors for spermatogonial stem cells in the mammalian testicular niche” in Annual meeting of International Society for Stem Cell Research at San Francisco, June 2016.
- (8) 高島誠司, 正木魁人 『精子幹細胞自己複製因子 FGF2 の精巣内での役割』、日本畜産学会第 122 回大会、2017/3/26~30
- (9) 高島誠司, 正木魁人, 黒木俊介, 立花誠, 保地眞一、八木瑞貴 『2つの精子幹細胞自己複製因子の精巣内発現動態と機能の比較』、第 109 回日本繁殖生物学会、2016/9/12~14
- (10) 正木魁人、八木瑞貴、角田茂、坂西俊太、久和茂、高島誠司、『ヒト雄性不妊病態モデルの解析』、第 109 回日本繁殖生物学会、2016/9/12~14
- (11) 刀根 将晃 高島誠司、『抗ガン剤 Busulfan が精子幹細胞ニッシュへ及ぼす負の影響』、第 109 回日本繁殖生物学会、2016/9/12~14
- (12) 足立晴彦, 八木瑞貴, 高島誠司、『精巣機能制御における末梢神経の役割の解明』、第 109 回日本繁殖生物学会、2016/9/12~14

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/textiles/guidance/teacher/prof/57000.html>

<http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.jUyUyayV.html>

https://science-tiger.wixsite.com/takashimalabhomepage?fb_ref=Default

<https://www.mendeley.com/profiles/seiji-takashima2/>

<https://researchmap.jp/mostovoi-kyoto/>

<https://scholar.google.co.jp/citations?user=5DfgXjIAAAAJ&hl=ja>

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：篠原 隆司

ローマ字氏名：Takashi Shinohara

研究協力者氏名：越後貫 成美

ローマ字氏名：Narumi Ogonuki

研究協力者氏名：戎家 美紀

ローマ字氏名：Miki Ebisuya

研究協力者氏名：吉田 裕安材

ローマ字氏名：Hiroaki Yoshida