

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2018～2022

課題番号：18H05281

研究課題名(和文)精子幹細胞のアンチエイジング機構の解明

研究課題名(英文)Molecular Analysis of Spermatogonial Stem Cell Aging

研究代表者

篠原 隆司 (Shinohara, Takashi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：30322770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 148,800,000円

研究成果の概要(和文)：精子幹細胞はグルタミン由来のグルタチオンにより活性酸素(ROS)産生酵素Nox1由来のROSを抑えると共に高い塩基除去修復活性により突然変異率を体細胞よりも低く保つことで老化を抑制することを見出した。一方、自己複製因子により生じたROSが転写因子Bcl6bを介してNox1遺伝子を誘導し自己複製能を増強することを我々は明らかにした。更に、臨床で広く使われている体外受精や顕微受精が生殖細胞に不可逆な障害を引き起こすことを研究の過程で発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、我が国では14人に一人が生殖補助医療により生まれている。特に顕微受精はウサギ2匹、ウシ1匹が生まれたのみで臨床応用されたことからヒトに対する十分な安全性は検討されていない。今回の研究により我々が得た精子幹細胞のもつ強い老化抵抗性の分子機構の知見は今後の臨床応用に有益なものであるが、その応用を進める一方で現在の生殖補助医療の安全性に対する再検討を呼びかける必要がある。

研究成果の概要(英文)：We found that spermatogonial stem cells use glutamine for producing glutathione to protect themselves from damages by reactive oxygen species (ROS) produced by Nox1. They also possess stronger base excision repair activity than embryonic stem cells or somatic cells to minimize mutations. We also discovered that ROS induce Nox1 expression via translocation of BCL6B into the nucleus, which creates a positive feedback loop. In the course of our study to analyze the impact of long-term SSC culture, we accidentally found that in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, both of which are widely used for human infertility treatment, can cause implantation failure and congenital abnormalities in F2 offspring.

研究分野：生殖生物学

キーワード：精子形成 顕微受精

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年のがん治療の進展により多くのがん患者が生存するようになった。特に小児がん患者の生存は8-9割にのぼる。しかしながら、これらの患者のうちの約半数が不妊症になるという問題が生じている。女性の場合には卵巣の凍結保存が行われており、男性でも成人の場合には精子を凍結保存することにより妊孕性を保存することが出来る。ところが精子がない年齢の男児の場合には適切な方法がないため妊孕性を保存することが現状では不可能である。2003年に我々のグループがマウスより樹立した培養精子幹細胞である、germline stem (GS)細胞は試験管内では精原細胞として増殖するが、不妊マウスの精巣内へ移植すると精子形成を再開し子孫を作ることが出来る。このGS細胞の樹立により、同様な細胞をヒトでも樹立し小児がん患者の妊孕性保存に用いるという動きが生じ、世界各国でヒトGS細胞の樹立に向けて研究が進められている。

我が国ではヒト精巣組織を得ることが極めて難しいため、我々がヒトGS細胞の樹立を行うことは困難であった。しかしながら研究開始当初の時点において、マウスGS細胞の解析を通じて臨床応用に向けて課題となりうる点を解析することは十分に可能であった。実際に我々や他のグループの研究で得られた知見では臨床応用に向けての基礎研究データは十分とは言えないことから、独自の研究を展開できると考えた。特に我々のグループではマウスGS細胞の研究を通じて精子幹細胞には老化に対する反応が体細胞とは異なるという幾つかの知見を得ていた。例えば、体細胞は試験管内で一定回数分裂すると形質転換を起こすか老化して増殖停止に至る。しかしながらGS細胞は形質転換することなく5年以上にわたり増殖し続ける。染色体末端にあるテロメアは細胞老化の指標とされているが、GS細胞においては5年を超えて培養するとテロメア長は1.5~2kb程度で維持されたまま増殖は持続する。さらに我々はGS細胞が活性酸素(ROS)に抵抗性であることも見出していた。ROSはDNAに損傷を与え細胞老化を引き起こすとされているが、GS細胞の増殖にはROSが必要である(Cell Stem Cell 2013;12:774)。また高濃度のROSに暴露するとGS細胞はES細胞や体細胞よりも細胞死に抵抗性があることから、精子幹細胞にはROSによる損傷から自己のDNAを守る巧妙な仕組みを持つことが予想された。

これらGS細胞を用いた培養実験の結果は精子幹細胞が特殊なアンチエイジング機構を持つことを示すが、一方で生体内の精子幹細胞のクローン数は老化と共に減少することを我々は報告していた(Dev Cell 2016;38:248)。精子幹細胞は生体内でも持続的に分裂しており、試験管内では事実上無限に増殖することを鑑みると、細胞分裂自体が幹細胞の減少の原因ではなく、精巣の体細胞からの老化シグナルが老化を誘導している可能性が高い。しかしながら、このような体細胞由来老化誘導シグナルは同定されていないという状況で我々は研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究は老化精子幹細胞の1) テロメア維持機構、2) DNA修復・ROS耐性機構の解明と3) 精巣体細胞からの老化促進シグナルの同定の三つを目標として研究を行ってきた。

3. 研究の方法

1)テロメア維持機構の解明では、GS細胞のテロメアの状態をテロメアFISHや可視化により解析すると共に、その結合因子を同定する。2)DNA修復についてはLacオペロンのリプレッサーであるLacI遺伝子を突然変異レポーターとして持つBig Blueマウスを用いて老化個体内の幹細胞における突然変異頻度も測定する。また相同組み換えもしくはEnd joining活性を比較測定できるコンストラクトをGS細胞に遺伝子導入し、それぞれの活性を評価する。更に精原細胞特異的に発現する転写因子を対象にしBase excision repair (BER)活性を指標としshort hairpin RNA (shRNA)を用いた遺伝子発現抑制により候補遺伝子を同定する。3)体細胞からの老化シグナルの同定では様々な老化モデル動物の精巣の遺伝子解析を行い、精子形成とテストステロン量を指標として老化表現型を誘導する分子を同定する。

4. 研究成果

申請時に1) テロメア維持機構、2) DNA修復・ROS耐性機構、3)精巣体細胞からの老化促進シグナルの同定の3つを目的として研究を開始した。以下にその成果を説明する。

(1) テロメア維持機構

これまでに長期培養したGS細胞の性質について解析を行い、論文発表に至った (PNAS 2019;116:16404)。GS細胞は60ヶ月の間培養しても増殖停止が起らず、DNAメチル化解析を行っても大きな変化を認められなかった。核型についても染色体は40本のままで正常であり、テロメア欠損細胞でよく見かけられるテロメア融合像はみられなかった。通常の細胞は一定回数の細胞分裂の後には分裂停止が起こるのに対して、老化したGS細胞は若いGS細胞より活発に増殖していた。老化とROSは関連が深いことが知られていることから、ROSレベルを調べたところ、当初の予想とは逆に老化GS細胞ではROSが低下していることが分かった。我々はNox1由来のROSがGS細胞の増殖に必要であることを報告していることから、Nox1の発現を調べたが顕著な差は認められなかった。ところがROSのもう一つの産生源であるミトコンドリアを調べたところ、老化GS細胞では顕著にミトコンドリア量が低下していることが分かった。ミトコンドリアはATPを作ることからGS細胞の代謝活性を測定すると、老化GS細胞では解糖系の活性が亢進していることが分かった (図1)。このように老化GS細胞には特徴的な異常が多く見つかったものの、60ヶ月培養したGS細胞を精巣に移植するとほぼ同数の幹細胞由来のコロニーを作ったことから老化は幹細胞活性には影響しないことが分かった。ところがこのコロニーを詳細に解析すると減数分裂の途中で分化が停止していた。正常な精子形成は培養後30ヶ月までは保たれているが、それ以降は消失することから、**老化は幹細胞活性よりも細胞分化能により大きな影響**を与えるようである。

この原因を明らかにするために、GS細胞の遺伝子発現解析を行ったところ、老化したGS細胞ではWnt7bの発現が顕著に上昇していることを見出した。Wnt7bはWntのnon-canonical経路を刺激しJNK経路を活性化する。そこで次のステップとしてH3K4me3およびH3K27me3抗体を用いたクロマチン免疫沈降解析を行った結果、Wnt7bのプロモーター領域ではH3K27me3のメチル化レベルが低下していることが分かった。H3K27残基にメチル化を誘導する分子としてはPRC2複合体が知られている。そこでこの複合体分子の個々の分子について遺伝子発現レベルを確認したところ、Phf1, Asx11分子の発現が低下していることを見出した。これらの分子を強制発現するとGS細胞の増殖が正常化することから、老化と共にGS細胞のH3K27me3のエピゲノム状態の変化が起こることによりWnt7bとその下流に位置するJNKが活性化されることで老化と共に増殖が亢進することが明らかになった。更なる解析の結果、このJNKシグナルの増強がミトコンドリアのマスター制御遺伝子であるPparg1aの発現を抑制したために老化GS細胞ではミトコンドリアの数が減少していることも分かった。

我々はGS細胞で見出した現象が生体内においても当てはまるかどうかを検討するために、老化マウスモデルであるKlotho欠損マウスおよびヒト老化モデルとして使われる2歳を超えた老化Brown Norwayラットの解析を行った。これらの動物は精子形成が途中で停止していることから、GS細胞を移植した場合と似た結果を示していた。解析の結果、いずれの系においても**Wnt7bの発現の亢進と解糖系の活性化**が起こっており、未分化精原細胞の増殖が亢進していた。これらの結果は老化に伴うWnt7bシグナルの亢進が、生体内の精子幹細胞の老化にも関わっていることを強く示唆する。

上記の実験と並行して、テロメア結合分子としてCDKN1Cを同定した。GS細胞においてCdkn1cの欠損はテロメアの融合を引き起こすことが明らかになった (投稿準備中)。

(2) DNA修復・ROS耐性機構の解明

幹細胞を用いた細胞治療において重要なのはDNAの突然変異である。これまでに行われたヒトES細胞においては核型異常に加えて点突然変異が検討されてきた。一般的にはマウスおよびヒトES細胞は体細胞よりも突然変異頻度が低いことが知られている。そこで我々はGS細胞についての突然変異頻度を測定する目的で次世代シーケンサーを用いてGS細胞の突然変異解析を行なった。この実験では5年間培養したGS細胞を使い解析を行なったところ、GS細胞は1)多能性幹細胞よりも突然変異頻度が5-10倍程度低いこと、2)通常ES細胞ではC-to-A transversionが多いのに対して、体細胞の組織幹細胞で見られているC-to-T transitionが多いことを見出した (Sci Rep 2021;11:24199)。

我々はGS細胞の中ではサイトカインシグナルがNox1を刺激してROSの産生を行なっているこ

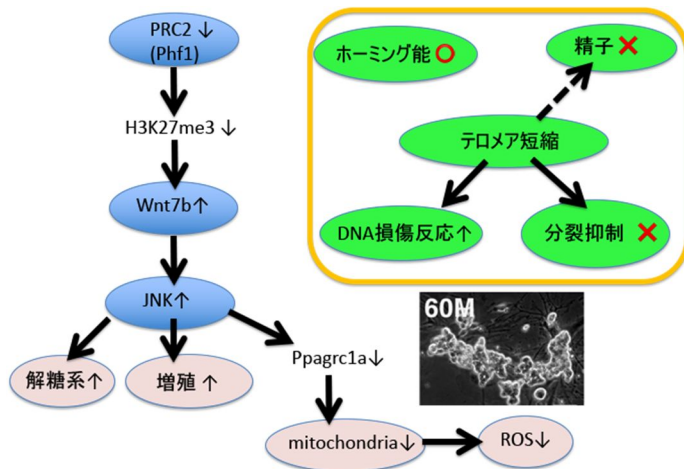


図1. 精子幹細胞の老化プロセス

PRC2 複合体の活性低下により Wnt7b-JNK シグナルが亢進し、増殖活性が上がり解糖系も刺激される。

とを以前に報告した(Cell Stem Cell 2013;12:774)。精子幹細胞の自己複製因子としてGlial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)とfibroblast growth factor 2が知られているが、これらのサイトカインをGS細胞に添加するとMAPK14, MAPK7の活性化が起こり、転写因子BCL6が核内に移行しNox1遺伝子を活性化することがROS産生の主たる経路であることを明らかにした。この経路をさらに詳細に解析することにより、Nox1由来のROSが再びサイトカインシグナルの伝達に必要であり、**Mapk14およびMapk7を刺激することによりポジティブフィードバックを形成してNox1の発現を刺激するというメカニズムが働いていることを見出した**(Life Sci Alliance 2019;2:2)(図2)。

次のステップとしてNox1欠損マウスからGS細胞を樹立し、Nox1がどのように自己複製に効いているのかをより詳細に検討しようとした。ところが当初の予想とは異なり、Nox1欠損GS細胞は野生型のGS細胞と同様の速度で増殖することが分かった。培養条件を検討した結果、Nox1欠損GS細胞は1%の低酸素濃度の時によく増殖が低下することを見出した。実際に精巣内では幹細胞は低酸素の状態で維持されていることから、我々の観察結果はこれと合致するものである。さらに、**Hif1が欠損しているマウスにおいては精子幹細胞活性が消失しており、Hif1がMycを刺激することで幹細胞の自己複製が起こることが分かった**(Genes Dev 2021;35:250)。このようにROSの制御は周囲の酸素レベルと密接に関わっており、酸素レベルは体細胞が決められているため、体細胞が精子幹細胞の老化に及ぼす影響は大きいと予想される。

このようにGS細胞の増殖にはROSが必要なものであるが、ROSにはDNAのダメージを誘導する

という問題がある。実際に過酸化水素をES細胞や胎児繊維芽細胞に添加すると急速に細胞死を起こす。しかしながら、GS細胞では過酸化水素を同じ濃度で添加してもほとんど影響が見られず、却ってその増殖を刺激する。過酸化水素はDNA二重鎖切断を引き起こすのみならず、点突然変異も引き起こすことが知られている。DNA二重鎖切断の修復の活性をES細胞、胎児繊維芽細胞(MEF)、GS細胞と比較したところ、GS細胞はES細胞とほぼ同等の相同組替え能力をもちDNA二重鎖切断を修復することが可能であるが、BERによる点突然変異の修復能が顕著に高いことを見出した。そこでBERに関わる酵素の遺伝子発現を調べたところ、いずれの酵素もES細胞やMEFよりも高発現していることが明らかになった。

中でもOgg1の発現は突出して高いことが分かった。

Ogg1欠損マウスは他のグループにより作成されているが、特に生殖細胞において目立った表現型が認められていない。しかしながら、Ogg1と機能が共通する遺伝子であるMth1, Mutyhのトリプル変異マウスを作成すると、最初は目立った表現型を示さないが、8世代目になると水頭症や無眼球症のマウスが生まれてくるようになり正常な成長した個体を得ることが困難になった。この直接の原因は明らかになっていないが、GからTへの点突然変異の頻度が基本レベルである 1.1×10^{-8} 変異/塩基/世代から18倍高い、 2×10^{-7} 変異/塩基/世代の頻度へと顕著に増大することが理由であると考えられている (Sci Rep 2015;4:4689)。生殖細胞において継代を重ねるごとに変異が蓄積するのは、唯一の幹細胞である精子幹細胞においてであることを間接的に示唆するものである。これらの結果から**GS細胞がROSに抵抗性であるのは、Ogg1経路によりBER活性が亢進していることが原因**であると結論した (Biol Reprod 2021;706)。

これらの結果から、ROSがDNAダメージを起こした際にDNA修復する過程については明らかにすることが出来た。しかしながら、ROSが無制限に発生すると精子幹細胞にダメージを与えるのを十分に止めることが出来ない。ROSの産生にはNOX1が必要であるが、ROSの発生を抑制するメカニズムを明らかにする過程で、我々はグルタミンが重要な役割を果たすことを見出した。グルタミンはATP産生に関わる重要な栄養源として知られている。我々はGS細胞の増殖に影響するアミノ酸をスクリーニングした結果、グルタミンが欠損したGS細胞ではROS産生が亢進し、幹細胞活性が失われることがわかった。**グルタミンの欠損による細胞死はNOX1を欠損したGS細胞では顕著に抑制されることから、グルタミンから産生されるグルタチオンがNOX1由来のROSを抑えていることがわかった** (Development in press)。一方でROSのもう一つの産生源として知られるミトコンドリア由来のROSは幹細胞に対する影響はほとんど見られなかった。ミトコンドリア特異的なDNAトポイソメラーゼであるTop1mt欠損GS細胞ではROS産生が同様に減弱しているにも関わらず、グルタミン欠損培地において野生型細胞と同様に細胞死を起こすことがわかった。従って、グルタミンはNOX1由来のROSに対してのみ有効であることになる。NOX1由来

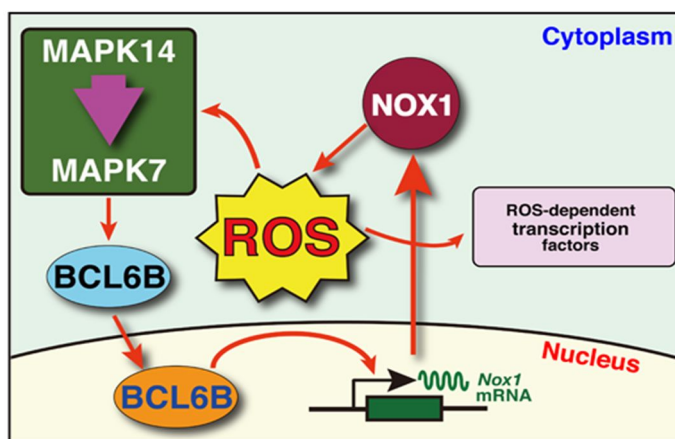


図 2. ROS 刺激による GS 細胞の増殖
ポジティブフィードバック形成が起こり、ROS シグナルが増幅されることで増殖能が亢進する。

のROSは幹細胞で必要であるが、ミトコンドリア由来のROSは分化型細胞でのみ必要とされていることから精子形成は巧みなROS制御により維持されていることが明らかになった(Genes Dev 2021;35:250)。

(3) 精巢体細胞からの老化促進シグナルの同定

老化精巢では精子形成レベルが低下し、幹細胞の数も減少していく。この原因になる分子をRNAシーケンスで探索する過程で我々はCldn11分子に注目した。Cldn11は老化と共に精巢全体における発現が低下する。免疫染色ではCldn11は精巢では精原細胞とセルトリ細胞に発現しており、セルトリ細胞間において血液精巢関門を作る。そこで生殖細胞とセルトリ細胞のそれぞれにおけるCldn11の機能を調べるために、Cldn11欠損マウスを用いて精子幹細胞の移植実験を行なった。Cldn11欠損マウスは血液精巢関門が破綻しており、精母細胞の段階で精子形成が停止して先天的に不妊となっている。生殖細胞でCldn11を欠損したマウスの精子幹細胞を野生型の精巢に移植すると正常な精子形成を生じた。逆に野生型生殖細胞をCldn11欠損マウスの精巢へと移植した場合にも正常な精子形成が観察された。これらのコントロール実験として**Cldn11マウスの右精巢細胞を左精巢へ自家移植すると、精子形成を再開して子孫を得ることが出来た。**

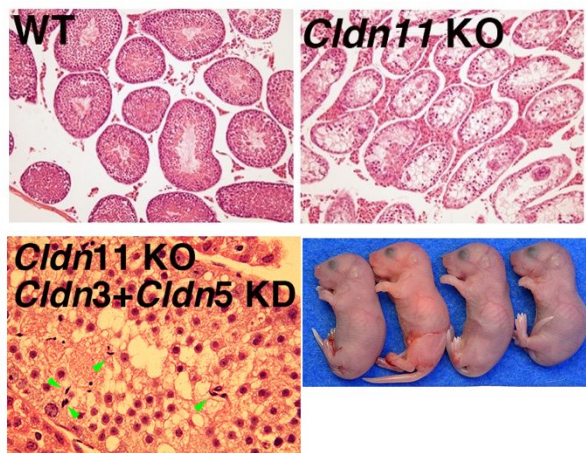


図 3. Cldn11 欠損マウスでの自家移植
Cldn11 欠損マウスは精子がないが(右上) 自家移植や Cldn3/5 の発現抑制により精子形成が再開し(左下) 子孫を得られる(右下)。

この現象の原因を探るために免疫染色を行なったところ、Cldn11欠損精巢においてはセルトリ細胞においてCldn11の類似分子である、Cldn3とCldn5の発現が野生型細胞より発現が増強していることが明らかになった。そこでCldn11欠損マウスの精巢へCldn3およびCldn5に対するshRNAを注入したところ、精子形成が再開し子孫を得ることが出来た(図3)。これらの結果はCldn11が構成する**血液精巢関門が精子形成に必要なものではないことを示すのみならず、幹細胞の自家移植で疾患を治療できることを示す初めてのものである。**

我々は精巢の老化に関わる別の分子としてCdc42を見出した。Cdc42はsmall Gタンパク質として知られるが、我々はセルトリ細胞で特異的にCdc42を欠損するマウスを作製した。このマウスは若い段階では特に異常が認められなかったが、成熟後に急速に精子形成が減弱し不妊症となった。精子幹細胞もこのマウスでは枯渇していたため、精子幹細胞の自己複製因子であるGDNFの発現を解析したところ、Cdc42欠損マウスの精巢においてはGDNFの発現が消失していることが明らかになった。従って、Cdc42はセルトリ細胞から分泌されるGDNFの発現を制御する重要な分子であり、老化に伴って起こる精子形成減弱の原因分子の一つである可能性がある (Cell Rep 2021;36:109550)。

精子形成が完成するためには精巢内にあるライディッヒ細胞から産生されるテストステロンが必要である。我々は老化個体において健康状態の良い個体ではテストステロンが高いが、老化が進行した個体ではその濃度が著しく低下していることを見出した。またマウスを我々は2年間にわたり強制時差ぼけ条件下でマウスを飼育したところ、未分化精原細胞の増殖が半減することを見いだした。この現象の原因を探るために免疫染色を行なったところ、2年間にわたりChronic jet lag条件(4日もしくは7日に一度8時間ずつ明暗周期が早く始まる)で飼育したマウスではテストステロンとその合成酵素が顕著に低下していた。

この実験と並行して、我々は精子形成細胞の老化に対する影響を直接調べる目的で顕微受精実験を行なった。この実験ではBrown Norwayラットを用いた。老化したBrown Norwayラットは生殖細胞の数は減弱するものの、精子は残存している。この精子を用いて顕微受精(intracytoplasmic sperm injection; ICSI:卵子に一個の精子を注入して受精させる技術)の手法を用いて子孫作成を行なった場合には全く子孫が得られないことが明らかになった。一方で若いBrown Norwayラットの精子を用いた場合には正常な子孫を得ることが出来た。精子形成細胞は体の中で概日リズムがない唯一の細胞として知られているが、我々の結果は精巢体細胞がテストステロンを介して精子形成細胞の老化に影響を与え、その受精能力を制御していることを示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 6件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Hiroko Morimoto, Narumi Ogonuki, Mito Kanatsu-Shinohara, Shogo Matoba, Atsuo Ogura, Takashi Shinohara | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 Spermatogonial stem cell transplantation into nonablated mouse recipient testes | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Stem cell reports | 6. 最初と最後の頁 1832-1844 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2021.05.013. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Chuma S, Kanatsu-Shinohara M, Katanaya A, Hosokawa M, Shinohara T. | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Genomic stability of mouse spermatogonial stem cells in vitro. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep | 6. 最初と最後の頁 24199 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-03658-1. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Mori Y, Takashima S, Kanatsu-Shinohara M, Yi Z, Shinohara T. | 4. 巻 36 |
| 2. 論文標題 Cdc42 is required for male germline niche development in mice. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cell Rep | 6. 最初と最後の頁 109550 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.109550. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Kanatsu-Shinohara M, Chen G, Morimoto H, Shinohara T. | 4. 巻 66 |
| 2. 論文標題 CD2 is a surface marker for mouse and rat spermatogonial stem cells. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 J Reprod Dev | 6. 最初と最後の頁 341-347 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2020-019 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Mori Y, Ogonuki N, Hasegawa A, Kanatsu-Shinohara M, Ogura A, Wang Y, McCarrey JR, Shinohara T. | 4. 巻 104 |
| 2. 論文標題 OGG1 protects mouse spermatogonial stem cells from reactive oxygen species in culture. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biol Reprod | 6. 最初と最後の頁 706-716 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iaaa216 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Morimoto H, Yamamoto T, Miyazaki T, Ogonuki N, Ogura A, Tanaka T, Kanatsu-Shinohara M, Yabe-Nishimura C, Zhang H, Pommier Y, Trumpp A, Shinohara T. | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 An interplay of NOX1-derived ROS and oxygen determines the spermatogonial stem cell self-renewal efficiency under hypoxia. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Genes Dev | 6. 最初と最後の頁 250-260 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.339903.120 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Morimoto, H., Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Kamimura, S., Ogura, A., Yabe-Nishimura, C., Mori, Y., Morimoto, T., Watanabe, S., Otsu, K., Yamamoto, T. and Shinohara, T. | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 ROS amplification drives mouse spermatogonial stem cell self-renewal. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Life Sci. Alliance | 6. 最初と最後の頁 2 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.201900374 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Kanatsu-Shinohara, M., Yamamoto, T., Toh, H., Kazuki, Y., Kazuki, K., Imoto, J., Ikeo, K., Oshima, M., Shirahige, K., Iwama, A., Nabeshima, Y., Sasaki, H. and Shinohara, T. | 4. 巻 116 |
| 2. 論文標題 Aging of spermatogonial stem cells by Jnk-mediated glycolysis activation. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 PNAS | 6. 最初と最後の頁 16404-16409 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1904980116 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Morimoto, H., Kanatsu-Shinohara, M., Orwig, K. E. and Shinohara, T. | 4. 巻 102 |
| 2. 論文標題 Expression and functional analyses of EPHA2 in mouse spermatogonial stem cells. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biol. Reprod. | 6. 最初と最後の頁 220-232 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioz156 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Shinohara, T. and Kanatsu-Shinohara, M. | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Transgenesis and genome editing of mouse spermatogonial stem cells by lentivirus pseudotyped with Sendai virus F protein. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Stem Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 447-461 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.02.001 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|--------------------------|
| 1. 著者名 Morimoto H, Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Kamimura S, Ogura A, Yabe-Nishimura C, Mori Y, Morimoto T, Watanabe S, Otsu K, Yamamoto T, Shinohara T. | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 ROS amplification drives mouse spermatogonial stem cell self-renewal. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Life Sci Alliance | 6. 最初と最後の頁 e201900374 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.201900374. | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Watanabe S, Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. | 4. 巻 100 |
| 2. 論文標題 Sendai virus-mediated transduction of mammalian spermatogonial stem cells. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Biol Reprod | 6. 最初と最後の頁 523-534 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioy192. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Kanatsu-Shinohara M, Morimoto H, Watanabe S, Shinohara T. | 4. 巻 64 |
| 2. 論文標題 Reversible inhibition of the blood-testis barrier protein improves stem cell homing in mouse testes. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 J Reprod Dev. | 6. 最初と最後の頁 511-522 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2018-093. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Watanabe S, Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Matoba S, Ogura A, Shinohara T. | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 In vivo genetic manipulation of male germline stem cells and their microenvironment by adeno-associated viruses. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Stem Cell Reports. | 6. 最初と最後の頁 1551-1564 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2018.03.005. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計8件(うち招待講演 7件/うち国際学会 3件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 篠原隆司 |
| 2. 発表標題 不妊症の遺伝子治療 |
| 3. 学会等名 理研パイオリソースセンター設立20周年記念シンポジウム(招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 篠原隆司 |
| 2. 発表標題 不妊症の遺伝子治療 |
| 3. 学会等名 生殖細胞と減数分裂研究の過去、現在、未来"およびサテライトシンポジウム(招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takashi Shinohara |
| 2. 発表標題 Effect of spermatogonial manipulation on offspring |
| 3. 学会等名 Molecular and cellular mechanisms of brain systems generating individuality (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 篠原隆司 |
| 2. 発表標題 宇宙環境が精子幹細胞に及ぼす影響についての解析 |
| 3. 学会等名 日本宇宙生物科学会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------|
| 1. 発表者名 篠原隆司 |
| 2. 発表標題 精子幹細胞の老化メカニズム |
| 3. 学会等名 若手支援技術講習会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takashi Shinohara |
| 2. 発表標題 Aging of spermatogonial stem cells. Long Live spermatogonial stem cells! |
| 3. 学会等名 Brinster Symposium (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|------------------------------|
| 1. 発表者名 篠原隆司 |
| 2. 発表標題 精子幹細胞の移植による妊孕性の回復 |
| 3. 学会等名 日本アンドロロジー学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takashi Shinohara |
| 2. 発表標題 Tight junction and the fate of transplanted spermatogonial stem cells |
| 3. 学会等名 Gordon research conference on Mammalian Reproduction（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

| | | |
|--|------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 1.Method of introducing polynucleotide into cell in testis | 発明者 篠原隆司、渡邊哲史 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-004529 | 出願年 2019年 | 国内・外国の別 外国 |

| | | |
|---|------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 雄性生殖細胞またはセルトリ細胞にポリヌクレオチドを導入する方法 | 発明者 篠原隆司、渡邊哲史 | 権利者 京都大学 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/017650 | 出願年 2019年 | 国内・外国の別 外国 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

| | | |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織 | | |
| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|