

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 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657058

研究課題名（和文） 幹細胞間の競争に基づく精子品質管理機構への挑戦

研究課題名（英文） A challenge for the Quality Control of Sperm Based on Stem Cell Competition

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

研究成果の概要（和文）：マウスを対象として、精子の品質管理に直結する精子幹細胞間の競争現象を、幹細胞のパルス標識-追跡実験と数理統計学的により解析した。その結果、少数の幹細胞が非対称分裂を繰り返すという一般的な考えとは異なり、幹細胞は常に入れ替わっており、長い期間を見ると多くの幹細胞が機能を失う一方、少数の幹細胞が子孫幹細胞を増やしていた。さらに、幹細胞の入れ替りは数学的に確率的（stochastic）に起こることを発見した。

研究成果の概要（英文）：This study has investigated the competition between mouse spermatogenic stem cells that plays a crucial role in the quality control of sperm, by means of pulse label-chase of spermatogenic stem cells in combination with mathematical and statistical analyses. As a result, it has been discovered that stem cells are always turning over with each other and many of the stem cells lose their function while a small number of stem cell cohorts expand, which is contrary to a prevailing thought that stem cells are a few special cell types that always divided asymmetrically. Moreover, it has been discovered that stem cells' turnover occurs in a stochastic manner.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	0	1,900,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	330,000	3,330,000

研究分野：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：精子形成・遺伝情報・幹細胞・品質保証・マウス

1. 研究開始当初の背景

次世代に命をつなぐ配偶子は、ただ一つ一つの精子と卵細胞が次世代をつくる全ての遺伝情報を正しく継承する。このように、配偶子の品質を高いレベルで維持することは、

生物にとって本質的に重要な性質である。中でも、DNA の変異率を低く保つことは種が安定して継続するために必須である。実際、ほ乳類精子の DNA の変異率は体細胞に比べて極めて低いレベルに保たれることを示唆する

データもあり、高度な品質保証システムが想定されている。しかし、その実体は全く明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

研究代表者は、マウスの精子形成を対象として、長期間にわたって配偶子を作り出すおおもとの細胞として、配偶子の品質保証の鍵を握る精子形成幹細胞の実体とその挙動を細胞生物学的に解析して来た。

従来、幹細胞は組織（精巣）の中の少数の限られた特別な細胞で、一生にわたって非対称分裂を繰り返す続けると予想されて来た。しかし、研究代表者は、幹細胞に特異的に発現する遺伝子を同定し、これを利用して幹細胞とその子孫を不可逆的に標識してその運命を追跡することによって、精子幹細胞が一生の間には入れ替わっており、多数の配偶子を作り次の世代に生き残る幹細胞と、配偶子形成の舞台から退場する幹細胞が存在することを明らかにしていた(Nakagawa et al., 2007)。

そこで、配偶子としての品質に欠ける幹細胞、とりわけ DNA 変異率の高い幹細胞が排除される可能性が、仮説として浮上した。この仮説を実験的に検証するとともに、配偶子の品質管理に直結する「幹細胞間の競争」のメカニズムを細胞レベルで解明することを目的として、本研究は遂行された。

3. 研究の方法

幹細胞間の競争の様子を明らかにするために、幹細胞を不可逆的に標識した。具体的には、Ngn3 など幹細胞に発現する遺伝子の発現制御領域下にタモキシフェン依存的 Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスを利用した。適当なレポーターと組み合わせることにより、成体マウスに任意の時点でタモキシフェンを投与して幹細胞を GFP あるいは LacZ の発現によって不可逆的に標識して、ある期間の後に精巣を解剖して、子孫細胞を解析した。

4. 研究成果

精巣内でパルス標識された精子幹細胞とその子孫を長期間（数ヶ月～年）にわたって追跡した結果を、数理統計学的に詳細に解析した。その結果、幹細胞が次々と消える一方で、周辺の幹細胞から生まれた新たな幹細胞によって入れ替わることによる入れ替りが、数学的に確率論的（ stokastik ）に起こることを発見した。さらに、この入れ替りの頻度は 1-2 週間程度と予想外に高いことが、

数学的に示された (Klein et al., Cell Stem Cell 2010)。これは、「幹細胞は厳密な非対称分裂を繰り返して長期間にわたって維持される」という古典的な幹細胞観を否定する。配偶子の品質管理の視点からみると、将来にわたって多くの配偶子を生み出す幹細胞と、短期間で消滅する幹細胞の違いがどのような機構によるのかという、重要な問いを投げかけた。

次に、実際に競争を行なっている細胞群を遺伝子発現に基づいて組織学的に同定し、その運命（競争を生き残るか幹細胞でなくなるか）を 1 細胞レベル、日単位の分解能で詳細に検討することに成功した。その結果、一つ一つの細胞のレベルにおいても幹細胞間の競争が常に起こっている事が明らかになった。精子形成幹細胞間の競争の現場を明らかにした事により、そこで機能している配偶子の品質管理に直結する幹細胞間の競争の分子メカニズムの解明に重要な知見を与えた。

以上、マウスにおいて精子幹細胞がお互いに競争しながら長期間にわたる精子形成を継続しているという我々の発見を発展させ、幹細胞集団を組織学的に同定し、お互いに数学的にランダムに勝ち負けが決まることを発見した意義は大きい。一方で、精子形成における遺伝子変異を定量的に検出することも試みた。頻度が非常に低かったために、データは着実に積み重ねたが有意な結果を得るに至らなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. A. Gely-Pernot, M. Raverdeau, C. Célébi, C. Dennefeld, B. Feret, M. Klopfenstein, **S. Yoshida**, N. B. Ghyselinck, and M. Mark: Spermatogonia Differentiation Requires Retinoic Acid Receptor Gamma. *Endocrinology* 153: 438-449 (2011) 査読：有
2. R. Sugimoto, Y-i. Nabeshima and **S. Yoshida**: Retinoic acid metabolism links the periodical differentiation of germ cells with the cycle of Sertoli cells in mouse seminiferous epithelium. *Mechanisms of Development* 128: 610-624 (2011) doi:10.1016 査読：有
3. T. Sato, Y. Aiyama, M. Ishii-Inagaki, K. Hara, N. Tsunekawa, K. Harikae, M. Uemura-Kamata, M. Shinomura, X. B. Zhu, S. Maeda, S. Kuwahara-Otani, A. Kudo, H.

- Kawakami, M. Kanai-Azuma, M. Fujiwara, Y. Miyamae, **S. Yoshida**, M. Seki, M. Kurohmaru and Y. Kanai: Cyclical and patch-like GDNF distribution along the basal surface of sertoli cells in mouse and hamster testes. *PLoS ONE* 6: e28367. doi:10.1371/journal.pone.0028367 査読：有
4. C. K. Matson, M. W. Murphy, M. D. Griswold, **S. Yoshida**, V. J. Bardwell and D. Zarkower: The Mammalian Doublesex Homolog DMRT1 is a Transcriptional Gatekeeper that Controls the Mitosis versus Meiosis Decision in Male Germ Cells. *Developmental Cell* 19: 612-624 (2010) 査読：有
 5. A. Klein, T. Nakagawa, R. Ichikawa, ***S. Yoshida** and *B. D. Simons
*co-corresponding authors: Mouse germ line stem cells undergo rapid and stochastic turnover. *Cell Stem Cell* 7: 214-224 (2010) 査読：有
 6. Y. Nakane, K. Ikegami, H. Ono, N. Yamamoto, **S. Yoshida**, K. Hirunagi, S. Ebihara, Y. Kubo and T. Yoshimura: A mammalian neural tissue opsin (Opsin 5) is a deep brain photoreceptor in birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 107: 15264-15268 (2010) 査読：有
 7. T. Nakagawa, M. Sharma, Y-i. Nabeshima, R. E. Braun and **S. Yoshida**: Functional Hierarchy and Reversibility within the Murine Spermatogenic Stem Cell Compartment. *Science* 328: 62-67 (2010) 査読：有
 8. **S. Yoshida**: Stem cells in mammalian spermatogenesis. *Development Growth and Differentiation* 52, 311-317 (2010) 査読：有
 9. **吉田松生**：配偶子幹細胞—世代をつなぐキープレイヤーの正体と可能性 基礎の基礎 *細胞工学* 29, 634-637 (2010) 査読：無
 10. 北舘 祐, **吉田松生**：マウスの精子形成幹細胞集団とニッチ. *細胞工学* 29, 652-657 (2010) 査読：無
- [学会発表] (計 25 件)
1. **S. Yoshida**: Sperm Stem Cells in the Mouse. *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, "The Life of a Stem Cell: From Birth to Death"*, Olympic Valley, USA, March 11 - 16, 2012
 2. **S. Yoshida**: Sperm Stem Cell Behaviors In Mouse Testis. *The World Congress on Reproductive Biology*, Cairns, Queensland, Australia, October 9 - 11, 2011
 3. **S. Yoshida**: Sperm Stem Cell Competition and the Niche. *Gordon Research Conference. Mammalian Gametogenesis and Embryogenesis*, Waterville Valley, NH, USA, August 21 - 26, 2011
 4. **S. Yoshida**: Sperm Stem Cells in the Mouse Testis. *International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 9th Annual Meeting*, Toronto, Canada, June 15 - 18, 2011
 5. **S. Yoshida**: Function and Regulation of the Spermatogenic Stem Cells. *The 8th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility (PRSFS)*, Hong Kong, China, May 27 - 29, 2011
 6. **S. Yoshida**: Stem Cell System in Mammalian Spermatogenesis. *The 2011 Biomodulation Symposium on 'Biotechnology for Future Era'*, Seoul National University, Seoul, Korea, May 26 - 27, 2011
 7. **吉田松生**：マウス精子形成幹細胞の正体はどのようなものか？ 第 10 回日本再生医療学会総会 京王プラザホテル (東京) 2011 年 3 月 1 日-2 日
 8. **吉田松生**：成体マウス精巢の in vivo イメージングによる未分化精原細胞の挙動の解析 第 5 回 NIBB イメージングフォーラム カンファレンスセンター (岡崎) 2011 年 1 月 11 日-12 日
 9. **吉田松生**：マウス精子形成を支える幹細胞集団のふるまい 新学術領域研究「性差

- 構築の分子基盤」第2回領域会議 総合研究大学院大学(葉山) 2010年12月15日-17日
10. **S. Yoshida**: Stem Cell Functionality in the Mouse Spermatogenesis. *The 16th International Conference of the International Society of Differentiation (ISD)*, Nara, Japan, November 14-18, 2010
 11. **吉田松生**: マウス精子形成幹細胞の正体はどのようなものか? 配偶子制御 第3回シンポジウム(第55回日本生殖医学会総会・学術講演会シンポジウム「精子形成研究のあらたなるフロンティア: 幹細胞から精子の品質まで」あわぎんホール(徳島) 2010年11月11-12日
 12. K. Hara, Y. Kitadate, H. Enomoto and **S. Yoshida**: Microenvironmental Control of Stem Cell Population in Mouse Spermatogenesis. *Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ Cells*, Cold Spring Harbor, New York, USA, October 5-9, 2010
 13. **吉田松生**: ほ乳類の精子形成を支える幹細胞の究明 第5回 認識と形成研究会 ホテルグリーンピア南阿蘇(熊本) 2010年9月4日-5日
 14. **S. Yoshida**, R. Sugimoto and Y. Kitadate: Spatiotemporal control of the spermatogenic stem cells in the mouse testis - toward the understanding of the stem cell niche. *The 2010 Society for the Study of Reproduction (SSR) Meeting, Minisymposium "Germ Cell Microenvironments"*, Milwaukee, Wisconsin, USA, July 30 - August 3, 2010
 15. **吉田松生**: マウス精子形成を支える幹細胞の実体の究明 大阪大学生命機能研究科研究交流会 大阪大学(大阪) 2010年7月20日
 16. **S. Yoshida**: Gamete stem cells. *43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists Jointly Sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network*, Kyoto, Japan, Jun 20 - 23, 2010
 17. **S. Yoshida**: Behaviour and control of undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *The 16th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis (European Testis Workshop; ETW)*, The Complesso Alberghiero Biodola-Hermitage, Italy, May 8-12, 2010
 18. **吉田松生**: 精子を作り続ける仕組みを探る 第7回学習院大学生命科学シンポジウム 学習院大学(東京) 2010年4月24日
 19. K. Hara, K. Inada, R. Sugimoto, Y. Kitadate, H. Enomoto, and **S. Yoshida**: Active migration of the GFR α 1-expressing asingle spermatogonia in mouse seminiferous tubules. *Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ Cells*, Cold Spring Harbor, New York, USA, October 5 -9, 2010
 20. Y. Kitadate, R. Ichikawa, and **S. Yoshida**: Characterization of mouse male germline stem cell niche by gene expression profiling using laser capture microdissection. *Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ Cells*, Cold Spring Harbor, New York, USA, October 5 -9, 2010
 21. R. Sugimoto, Y. Saga, Y. Nabeshima and **S. Yoshida**: Differentiation of stem/progenitor spermatogonia is controlled by germ cells of advanced stages in mouse spermatogenesis. *Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ Cells*, Cold Spring Harbor, New York, USA, October 5 -9, 2010
 22. R. Sugimoto, Y. Saga, Y-i. Nabeshima and **S. Yoshida**: Stem cell differentiation is controlled by their progeny in mouse spermatogenesis. *43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists*, Kyoto, Japan June 20, 2010
- [図書] (計2件)
1. A. Spradling, M. T. Fuller, R. E. Braun, and **S. Yoshida**: Germline Stem Cells. A

Cold Spring Harbor Perspectives in
Biology Collection, "Germ Cells", Cold
Spring Harbor Laboratory Press, 1-20
(2011)

2. **S. Yoshida**: Stem cell niche system in
mouse spermatogenesis. **Stem Cell
Biology and Regenerative Medicine
Series**, "Male Germline Stem Cells:
Developmental and Regenerative
Potential" Humana Press, 159-175 (2011)

[その他]

ホームページ等

http://www.nibb.ac.jp/sections/developmental_biology/yoshida/

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

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