

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293064

研究課題名(和文)精子幹細胞の自己複製制御におけるCDK inhibitorの役割の解明

研究課題名(英文)Role of CDK inhibitors in self-renewal regulation of spermatogonial stem cell

研究代表者

篠原 美都 (Shinohara, Mito)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10372591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では精子幹細胞の自己複製と維持におけるCDK inhibitor (CDKI) p57遺伝子の関与について調べた。精子幹細胞の自己複製因子であるFGF2およびGDNFによりp57遺伝子発現が制御されることや、p57 conditional knockout マウスの精巣から樹立した精子幹細胞培養株(GS細胞)を用いてp57遺伝子の欠損により試験管内での自己複製活性や、移植におけるコロニー形成能が低下することを明らかにした。さらにシグナル伝達経路を明らかにするため、p57欠損GS細胞を用いてマイクロアレイ解析などにより、発現レベルの変化する遺伝子群を特定した。

研究成果の概要(英文)： In this project, we investigated the involvement of p57 gene, one of the Cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs), in the regulation of self-renewal and maintenance of spermatogonial stem cells (SSCs). The results showed that the expression of p57 gene was upregulated in SSCs by FGF2 and GDNF, the self-renewal factors of SSCs. Using cultured SSC cell lines, which were derived from conditional knockout mice of p57 gene, we identified that self-renewal activity of SSCs was reduced in vitro by p57 gene deficiency. To elucidate the signaling pathway, which mediates the effect of p57 gene, we screened for molecules by microarray analysis, whose expression levels were affected by p57 gene deficiency. Involvements of some of these molecules were confirmed by overexpression or knockdown in cultured SSC cell line.

研究分野：生殖医学

キーワード：幹細胞 細胞周期 生殖

## 1. 研究開始当初の背景

幹細胞の特徴は自己複製型分裂を行いつつ分化型分裂も行い、組織が必要とする細胞を供給することにある。その分裂パターンや増殖活性は組織の需要に応じて巧みに調節されている。そのメカニズムの中心に細胞周期調節機構があることが自明であるが、幹細胞は数も少なく機能的活性によってのみ定義されるため、適した実験系を確立することが困難であった。

精子幹細胞は精細管内に移植するとコロニーを作りドナー由来の精子形成をするため、血液幹細胞と同様に機能的解析が可能であり、また試験管内で長期培養・遺伝子操作が可能である。この精子幹細胞培養系 (Germline Stem:GS 細胞と命名) では幹細胞の機能的活性を保ったまま自己複製増殖を2年以上にわたって維持することが可能である。研究代表者らはこれらの実験系を用いて、精子幹細胞の自己複製と分化を司る分子機構を解析してきた。GS 細胞の自己複製に必要なサイトカイン GDNF と FGF 2 の下流のシグナルを解析し、(1) GDNF の下流として PI3K-Akt シグナルが、FGF2 の下流として MAP2K1-Etv5-Bcl6b 経路が関与していること (引用文献① Lee et al. *Development* 2007, 引用文献② Ishii et al. *Development* 2012)、(2) Ras-CyclinD2 シグナルは両方のサイトカインからのシグナルを受け、過剰発現によりサイトカイン非依存性に精子幹細胞の自己複製を維持できること (引用文献③ Lee et al. *Cell Stem Cell* 2009)、(3) G1 サイクリンのタイプにより G1 期における精子幹細胞の自己複製と分化の選択が行われている可能性があること、(4) PI3K-Akt 活性化は精子幹細胞の癌化を伴わないが、Ras-CyclinD2 強制発現と Bcl6b 強制発現はいずれもタイプは異なるが seminoma の形成を誘導すること、などを示した。また (5) 精子幹細胞の自己複製と分化の制御に Cyclin dependent kinase inhibitor (CDKI) が果たす役割に注目して研究を行ってきた。幹細胞の自己複製型と分化型増殖の選択には G0/G1 期の細胞周期制御が重要な役割を果たすと考えられている。CDKI には p21, p27, p57 からなる KIP family と、p16, p15, p18, p20 からなる INK4 family の二群があり、そのうち KIP family は血液幹細胞や神経幹細胞などで自己複製と分化の制御に関わることが報告されている。研究代表者らは KIP family のうち、p21 と p27 の精子幹細胞制御における関与を調べ、p27 KO マウスでは睾丸の巨大化を示すが、これは自己複製と分化のバランスが崩れ分化型分裂が亢進するためであること、一方 p21 は progenitor の増殖制御に関わることを見いだした (引用文献④ Kanatsu-Shinohara et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010)。また G タンパク質 Rac の抑制が p27 の発現を低下させ、分化型分裂を促進することも見いだした (引用文献⑤

Takashima et al. *Cell Stem Cell* 2011)。

## 2. 研究の目的

幹細胞の自己複製型分裂と分化型分裂の選択は細胞周期の G0/G1 期に起こり、p21, p27, p57 からなる KIP ファミリーの CDK inhibitor (CDKI) がそれを制御すると考えられている。申請者らはこれまでの研究で精子幹細胞において p21 が progenitor の増殖制御に、p27 が幹細胞の自己複製制御に関与することを明らかにした。本研究は p57 の役割に焦点を当てて解析し、細胞周期制御が幹細胞の維持と分化において果たす役割を明らかにすることを目的に行った。

## 3. 研究の方法

本研究では p57 が精子幹細胞活性の維持に果たす役割を明らかにするため、p57 遺伝子の欠損または過剰発現が、精子幹細胞の活性を左右する要因である増殖能・ホーミング活性・接着性・自己複製維持のどの点に影響を及ぼすかを、conditional knockout マウスや GS 細胞培養系を用い、in vitro と in vitro の両面から解析した。また、p57 の上流のシグナルを明らかにするため、自己複製因子 FGF2 と GDNF への反応性や、精子幹細胞の自己複製維持に関与することが知られている分子群 (Foxo1, Etv5, Bcl6b, Plzf など) に注目し関連を調べるとともに、p57 の下流シグナルを明らかにするため、CyclinD など細胞周期制御分子や細胞骨格調節因子を中心に関連を調べた。

## 4. 研究成果

(1) p57-CKO マウスの精子幹細胞の移植アッセイ: p-57-CKO マウスを R26R マウスと交配し、ホモ個体より精巣細胞を採取し、Cre recombinase を発現するアデノウイルス (AXCAN-Cre) に試験管内で感染させた後、細胞を回収し W マウスの精巣に移植した。移植後 2 ヶ月でホスト精巣を摘出し、LacZ 染色により観察したところ、p57 遺伝子の欠損によりコロニー数の低下が見られた。

(2) p57-CKO マウスからの GS 細胞の樹立: p-57-CKO マウスのホモ個体精巣から常法に従って精子幹細胞培養株 (GS 細胞) を樹立した。

(3) 自己複製因子 FGF2/GDNF と p57 発現の関連の解析

① マウス精子幹細胞培養株 GS 細胞を血清のない培地でラミニンを用いたフィーダーフリー培養し、3 日の starvation の後、精子幹細胞の自己複製因子である FGF2 と GDNF をそれぞれ添加した。quantitative PCR (qPCR) 法により p57 の発現レベルへの影響を調べたところ、1 日後の RNA にて発現レベルの低下が見られた。

② p57 発現制御にどのシグナル経路が関与しているかを明らかにするため、これまでに精子幹細胞の自己複製制御との関わりが示唆

されてきたシグナル伝達経路(AKT, MAP2K1, JNK, ROS, など)を重点的に、阻害剤を用いて調べた。GS細胞をstarvation2日間の後、各種阻害剤を添加しさらに1日後にサイトカインを添加した。1日後に採取したRNAについてqPCR法にて調べたところ、p57発現の変化が抑制または消失しているものは認められなかった。

(4) p57欠損GS細胞の表現型・機能解析：p57-CKO GS細胞を試験管内でAxCAN-Creに感染させ、遺伝子欠損による影響を調べた。増殖速度、細胞外基質ラミニンへの接着性・RT-PCRやフローサイトメトリーによる精子幹細胞マーカーの発現を調べた。接着性には大きな変化は認められなかったが増殖低下が見られた。

(5) p57遺伝子の下流ターゲットの同定

①マイクロアレイ解析によるスクリーニング：p57のconditional-KOマウスから樹立したGS細胞を用い、アデノウイルスによりin vitroにてcre recombinaseを導入した。2日後に採取したRNAを用いてマイクロアレイ解析を行った。

②p57 KO GS細胞への遺伝子導入による自己複製異常の機能的レスキュー：p57 KO GS細胞では増殖の低下が認められた。そこで、マイクロアレイ解析や、ウェスタンブロッティングによってp57の欠損により変化が認められた因子について、p57 KO GS細胞へ遺伝子導入を行い、この細胞の自己複製異常のレスキューを試み、p57 KO GS細胞の増殖低下を緩和する遺伝子を見いだした。

<引用文献>

①Lee 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), 1853-1859 (2007).

②Ishii K., Kanatsu-Shinohara M., Toyokuni S., Shinohara T. FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of Etv5 and Bcl6b through MAPK2K1 activation. *Development* 139(10), 1734-1743 (2012).

③Lee 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).

④Kanatsu-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).

⑤Takashima S., Kanatsu-Shinohara M., Tanaka T., Takehashi M., Morimoto H., Shinohara T. Rac mediates mouse spermatogonial stem cell homing to germline niches by regulating transmigration through the blood-testis barrier. *Cell Stem Cell* 9(5), 463-475 (2011).

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計11件)

①Kanatsu-Shinohara M., \*Tanaka T., Ogonuki N., Ogura A., Morimoto H., Cheng PF., Eisenman RN., Trumpp A., Shinohara T. Myc/Mycn-mediated glycolysis enhances mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *GenesDev.* 30(23):2637-2648(2016) (\*equal contribution) 査読有  
doi:10.1101/gad.287045.116.

②Tanaka T., Kanatsu-Shinohara M., Lei Z., Rao CV., Shinohara T. The luteinizing hormone-testosterone pathway regulates mouse spermatogonial stem cell self-renewal by suppressing WNT5A expression in Sertoli cells. *Stem Cell Reports* 7(2): 279-91 (2016) 査読有  
doi: 10.1016/j.stemcr.2016.07.005.

③Kanatsu-Shinohara M., Naoki H., Shinohara T. Nonrandom germline transmission of mouse spermatogonial stem cells. *Dev Cell* 38 (3): 248-61 (2016) 査読有  
doi: 10.1016/j.devcel.2016.07.011.

④Kanatsu-Shinohara M., Morimoto H., Shinohara T. Fertility of male germline stem cells following spermatogonial transplantation in infertile mouse models. *Biol Reprod.* 94(5):112 (2016) 査読有

⑤Kanatsu-Shinohara M., Morimoto H., Shinohara T. Enrichment of mouse spermatogonial stem cells by the stem cell dye CDy1. *Biol Reprod.* 94(1):13 (2016) 査読有  
doi: 10.1095/biolreprod.115.135707.

⑥Tanaka, T., Kanatsu-Shinohara M., Hirose, M., Ogura, A., Shinohara, T. Pluripotent cell derivation from male germline cells by suppression of Dmrt1

and Trp53. *J. Reprod. Dev.*  
2015;61(5):473-84 査読有  
doi: 10.1262/jrd.2015-059.

⑦Tanaka, T., Kanatsu-Shinohara M.,  
Shinohara, T. The CDKN1B-RB1-E2F1  
pathway protects mouse spermatogonial  
stem cells from genomic damage. *J. Reprod.*  
*Dev.* 61, 305-316 (2015) 査読有  
doi: 10.1262/jrd.2015-027.

⑧Morimoto H., Kanatsu-Shinohara M.,  
Shinohara T. ROS-generating oxidase Nox3  
regulates the self-renewal of mouse  
spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.*  
92(6): 147 (2015) 査読有  
doi: 10.1095/biolreprod.114.127647.

⑨Takashima S., Kanatsu-Shinohara M.,  
Tanaka T., Morimoto H., Inoue K., Ogonuki  
N., Jijiwa M., Takahashi M., Ogura A.,  
Shinohara T. Functional Differences  
between GDNF-dependent and  
FGF2-dependent mouse spermatogonial stem  
cell self-renewal. *Stem Cell Reports.*  
4(3):489-502 (2015) 査読有  
doi: 10.1016/j.stemcr.2015.01.010.

⑩Ishii K., Ishiai M., Morimoto H.,  
Kanatsu-Shinohara M., Niwa O., Takata M.,  
Shinohara T. The  
Trp53-Trp53inp1-Tnfrsf10b pathway  
regulates the radiation response of mouse  
spermatogonial stem cells. *Stem Cell*  
*Reports* 3 (4), 676-89 (2014) 査読有  
doi: 10.1016/j.stemcr.2014.08.006

⑪Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N.,  
Matoba S., Morimoto H., Ogura A.,  
Shinohara T. Improved serum- and  
feeder-free culture of mouse  
spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.*  
91(4):88. (2014) 査読有  
doi: 10.1095/biolreprod.114.122317.

[学会発表] (計5件)

①平成29年3月17-18日  
生命動態システム科学四拠点 合同シンポ  
ジウム  
篠原美都「精子幹細胞の寿命と精子形成へ  
の寄与の動態解明」  
理化学研究所 生命システム研究センター

②平成28年6月28-29日  
新学術領域「幹細胞老化と疾患」第三回領  
域会議  
篠原美都「長期培養系を用いた精子幹細胞  
の老化メカニズムの解明」  
東京大学 伊藤国際学術研究センター

③平成28年2月17日  
文部科学省 科学研究費補助金 新学術領  
域研究 「生殖細胞のエピゲノムダイナミ  
クスとその制御」による国際シンポジウム  
Epigenome Dynamics and Regulation in Germ  
cells  
Clock Tower Centennial Hall, Kyoto  
University  
Mito Kanatsu-Shinohara, Hiroko Morimoto,  
and Takashi Shinohara  
“Enrichment of mouse spermatogonial  
stem cells by a stem cell dye CDy1”

④平成27年6月19-20日  
新学術領域「幹細胞老化と疾患」第二回領  
域会議  
篠原美都「長期培養系を用いた精子幹細胞  
の老化メカニズムの解明」  
新潟グランドホテル

⑤平成24年8月30-31日  
特定領域研究「細胞増殖制御」終了シンポ  
ジウム  
篠原美都「精子幹細胞の自己複製制御機構」  
東京工業大学・大蔵前会館・くらまホール

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

①研究室ホームページ

[http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/~mo  
lgen/research\\_summary.html](http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/~molgen/research_summary.html)

②京都大学広報

一つの幹細胞からできる精子の数は周期的  
に変動することを発見

[http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/re  
search\\_results/2016/160809\\_1.html](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2016/160809_1.html)

③科学技術振興機構 (JST) ホームページ

一つの幹細胞からできる精子の数は周期的  
に変動することを発見

[http://www.jst.go.jp/pr/announce/20160  
809/index.html](http://www.jst.go.jp/pr/announce/20160809/index.html)

アウトリーチ活動

平成28年9月18日

「幹細胞が精子を作る活性には周期がある」  
「京都大学アカデミックデイ2016-みんなで

対話する京都大学の日-」  
京都大学百周年時計台記念館

新聞報道

①平成 28 年 8 月 12 日 科学新聞 4 面  
効率が種の保存左右 精子形成に周期あり  
精巣幹細胞分化が鍵

②平成 28 年 8 月 19 日 京都新聞 25 面  
精子幹細胞研究成果 京大グループ 形成  
周期的、遺伝子に偏り

③平成 28 年 12 月 22 日 産経新聞 夕刊 8  
面  
精子幹細胞の複製・分裂 2 種類の遺伝子が  
関与 京大チーム

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし

(4) 研究協力者 該当なし