

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成23年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	ホーミングにおける精子幹細胞の動態の分子的解析
研究機関・ 部局・職名	京都大学・医学研究科・助教
氏名	篠原美都

1. 当該年度の研究目的

幹細胞はニッチと呼ばれる特殊な微小環境において生息する。ニッチは幹細胞の自己複製増殖や分化を支持している。骨髄移植では血液幹細胞がレシピエントの体内で造血を起こすには、ホーミングと呼ばれる現象により幹細胞ニッチに到達して増殖することが必要であり、そのプロセスにはケモカインによる幹細胞の遊走や、細胞外基質との相互作用などが関与することが近年明らかとなった。幹細胞とニッチの相互関係は極めて動的であり、幹細胞の機能調節の根幹をなすものである。しかし血液系以外のほ乳類の幹細胞ではそのメカニズムは殆ど明らかにされていない。

本年度の研究では、1)精子幹細胞のホーミング制御分子であるインテグリンの発現制御機構を解明するため、インテグリンの“inside-out signaling”に示唆される分子群などの関与を調べた。また2)Drosophila の生殖細胞で Cadherin が重要な役割を果たすとされることから、マウス精子幹細胞のホーミングにおける Cadherin の関与を Dominant negative 体を用いて調べた。

2. 研究の実施状況

1) Integrin の発現制御機構の解明

インテグリンの下流分子であり、かつ血液幹細胞ホーミングへの関与が示唆されている Rac ファミリー分子について精子幹細胞での発現を調べたところ、Rac1 が強く発現していた。Rac1 発現はラミニンへの接着により亢進し、GDNF など自己複製誘導因子により逆に抑制される。Rac1 の conditional ノックアウトマウスの精子幹細胞は、移植により生着率が優位に低下していた。また Dominant negative (DN) 体により幹細胞の移植による生着率が低下した。しかしながら精細管にてタイトジャンクションが形成される前の幼若な精巣に移植したところ、Rac1-DN 細胞は正常に生着し、自己複製能が亢進した。そこで、Rac1 はタイトジャンクションの通過に関与する可能性が示唆されたため、タイトジャンクション構成分子の Claudin ファミリー分子の関与を RNAi 法によって調べた。その結果、精子幹細胞における Claudin3 遺伝子のノックダウンにより、ホーミング活性が低下することから、精子幹細胞に発現する Claudin 分子とセルトリ細胞に発現する Claudin 分子が作用して、ホーミングが起こる可能性が示唆された。

2) Cadherin の関与の検討

Cadherin family の分子の Dominant negative 体(理研 CDB: 竹市雅俊博士から供与)を GS 細胞に遺伝子導入し、薬剤選択により遺伝子が安定的に挿入された細胞を樹立した。この細胞の試験管内での増殖速度は野生型と差がなかった。また精巣内移植を行ったが、コロニー数、コロニーの形態なども野生型と差が認められなかった。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文</p> <p>計7件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計7件 (*Corresponding author)</p> <p>FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of Etv5 and Bcl6b through MAP2K1 activation. Ishii K., <u>Kanatsu-Shinohara M.</u>, Toyokuni S., Shinohara T*. Development 2012; 139(10):1734-43. (研究代表者の関与:実験の立案、実験結果の解釈および執筆)</p> <p>Hybridization of testis-derived stem cells with somatic cells and embryonic stem cells in mice. Takehashi M., Tada M., <u>Kanatsu-Shinohara M.</u>, Morimoto H., Kazuki Y., Oshimura M., Tada T., Shinohara T*. Biol. Reprod. 2012; 86(6):178, 1-9. (研究代表者の関与:実験の立案、実験結果の解釈および執筆)</p> <p>In vitro transformation of mouse testis cells by oncogene transfection. Morimoto H., Lee J., Tanaka T., Ishii K., Toyokuni S., <u>Kanatsu-Shinohara M.</u>, Shinohara T. Biol. Reprod. 2012; 86(5)148, 1-11. (研究代表者の関与:実験の立案、実験結果の解釈および執筆)</p> <p>Rac mediates mouse spermatogonial stem cell homing to germline niches by regulating transmigration through the blood-testis barrier. Takashima S., <u>Kanatsu-Shinohara M.*</u>, Tanaka T., Takehashi M., Morimoto H., Shinohara T*. Cell Stem Cell 2011;9(5):463-75. (研究代表者の関与:研究全体の中心的進行、実験の立案、実験結果の解釈および執筆)</p> <p>Dynamic changes in EPCAM expression during spermatogonial stem cell differentiation in the mouse testis. <u>Kanatsu-Shinohara M.</u>, Takashima S., Ishii K., Shinohara T*. PLoS One 2011; 6(8):e23663. (研究代表者の関与:実験の立案・遂行、実験結果の解釈および執筆)</p> <p>Homologous recombination in rat germline stem cells. <u>Kanatsu-Shinohara M.*</u>, Kato-Itoh M., Ikawa M., Takehashi M., Sanbo M., Morioka Y., Tanaka T., Morimoto H., Hirabayashi M., Shinohara T. Biol. Reprod. 2011; 85(1):208-17. (研究代表者の関与:研究全体の中心的進行、実験の立案・遂行、実験結果の解釈および執筆)</p> <p>Unstable side population phenotype of mouse spermatogonial stem cells in vitro. Shinohara T*, Ishii K., <u>Kanatsu-Shinohara M.</u> J. Reprod. Dev. 2011; 57(2):288-95. (研究代表者の関与:実験の立案・遂行、実験結果の解釈および執筆)</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計0件</p> <p>(未掲載) 計0件</p>
<p>会議発表</p> <p>計1件</p>	<p>専門家向け 計1件</p> <p>The 84th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society <u>Mito Kanatsu-Shinohara</u>, Seiji Takashima, Takashi Shinohara “Molecular mechanisms of spermatogonial stem cell homing to niche” 京都・国際会館 平成 23 年9月 22 日 分子生物学会</p> <p>一般向け 計0件</p>
<p>図書</p> <p>計0件</p>	<p></p>

様式19 別紙1

<p>産業財産権 出願・取得状 況 計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>篠原研究室ホームページ http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/~molgen/index.html 京都大学広報「マウス精子幹細胞における細胞生着メカニズムを解明—効率的な細胞移植技術につながる可能性」 http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2011/111104_1.htm</p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>京都大学アカデミックデイ 平成24年3月10日、京都大学百周年時計台記念館 対象者:一般 参加者数:326人 京都大学主催の一般公開の催し。「精子を作る幹細胞とその環境」と題するポスターにて、精子形成における幹細胞の役割、精巣の支持環境が幹細胞に及ぼす作用などについて、高校生・大学生向けに説明した。</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計1件</p>	<p>京都新聞(11月5日 27面)「精子幹細胞の増殖に働くタンパク質特定」</p>
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	124,000,000	41,000,000	0	83,000,000	0
間接経費	37,200,000	12,300,000	0	24,900,000	0
合計	161,200,000	53,300,000	0	107,900,000	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	40,500,270	0	0	40,500,270	34,968,918	5,531,352	0
間接経費	12,300,000	0	0	12,300,000	1,230,000	11,070,000	0
合計	52,800,270	0	0	52,800,270	36,198,918	16,601,352	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	33,562,926	培養用試薬、実験動物、分子生物実験試薬等
旅費	143,580	研究打ち合わせ
謝金・人件費等	0	
その他	1,262,412	実験動物飼育費、シーケンス外注
直接経費計	34,968,918	
間接経費計	1,230,000	
合計	36,198,918	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
三洋電機 超低温 フリーザー	MDF-U700VX	1	2,184,000	2,184,000	2012/1/24	京都大学 分子 棟318号室
NBS スタックブル インキュベーター	I126R	1	1,871,100	1,871,100	2012/1/24	京都大学 分子 棟318号室
米国バイオラッドラ ボラトリーズ社	1707004JA	1	655,200	655,200	2011/12/27	京都大学 分子 棟318号室