

課題番号	LS065
------	-------

**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24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が、血液系以外のほ乳類の幹細胞ではニッチとの関わりは殆ど明らかにされていない。

平成24年度の研究では精子幹細胞移植においてホーミングに関わる分子機構を明らかにするため、血液幹細胞のケモカインシグナルであり、また胎生期の生殖細胞の遊走にも関与している CXCR4/CXCL12 に着目して関与を調べた。また CXCR4/CXCL12 とニッチ構成分子との相互作用を明らかにするため、CXCR4/CXCL12 が精子幹細胞の形態や遊走能・接着性や、増殖に及ぼす影響を調べ、また精子幹細胞の自己複製因子 GDNF シグナルとのクロストークについて調べた。

2. 研究の実施状況

本年度の研究では、精巣のセルトリ細胞の初代培養と共培養すると精子幹細胞がその下に潜り込んで特有の“敷石状コロニー”を形成し、ニッチへのホーミング現象を試験管内で模倣した現象がみられることから、これをアッセイ系として CXCR4/CXCL12 シグナルの関与を重点的に調べた。(1)精子幹細胞による敷石状コロニー形成は遊走化因子 CXCL12 によって促進され、逆に CXCL12 の受容体 CXCR4 の阻害剤 AMD3100 によって阻害された。また精子幹細胞の自己複製因子 GDNF も敷石状コロニーの形成を促進した。また GDNF の刺激によって精子幹細胞での CXCR4 受容体の発現が増強することから、両シグナルは協調して精子幹細胞のホーミングを促進していることが示唆された。(2)そこでこれらのシグナルのホーミングにおける関与を個体の精巣内でも調べた。CXCR4 ノックアウトマウスから精子幹細胞集団を採取し精巣内に移植したところ、コロニー形成が低下した。また精子幹細胞に GDNF の受容体 Ret の機能を部分的に阻害する Dominant Negative 体を発現させた場合もコロニー形成が低下した。(3)さらに精細管内に直接 CXCL12 および GDNF を発現するレンチウイルスを注入し、体内でセルトリ細胞に発現させ、1-2週間後、これを宿主として GS 細胞を移植した結果、CXCL12 を強制発現させた精巣は精子幹細胞の生着率が高いことが分かった。一方 GDNF では有意な差が見られなかった。これらの結果からニッチに発現する CXCL12 と GDNF が協調して精子幹細胞のホーミングを促進していることが明らかになった。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 7 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 5 件</p> <p><u>Kanatsu-Shinohara M.</u>, Morimoto H., *Shinohara T. Enrichment of mouse spermatogaonial stem cells by melanoma cell adhesion molecule expression. <i>Biology of Reproduction</i> 2012; 87(6):139</p> <p>*<u>Kanatsu-Shinohara M.</u>, Inoue K., Takashima S., Takehashi M., Ogonuki N., Morimoto H., Nagasawa T., Ogura A., Shinohara T. Reconstitution of mouse spermatogonial stem cell niches in culture. <i>Cell Stem Cell</i> 2012; 11, 567-578</p> <p>Ishii K., <u>Kanatsu-Shinohara M.</u>, Toyokuni S., *Shinohara T. FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of Etv5 and Bcl6b through MAPK2K1 activation. <i>Development</i> 2012; 139(10):1734-1743</p> <p>Takehashi M., Tada M., <u>Kanatsu-Shinohara M.</u>, Morimoto H., Kazuki Y., Oshimura M., Tada T., *Shinohara T. Hybridization of testis-derived stem cells with somatic cells and embryonic stem cells in mice. <i>Biology of Reproduction</i> 2012; 86(6):178</p> <p>Morimoto H., Lee J., Tanaka T., Ishii K., Toyokuni S., <u>Kanatsu-Shinohara M.</u>, *Shinohara T. In vitro transformation of mouse testis cells by oncogene transfection. <i>Biology of Reproduction</i> 2012; 86(5):148</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 2 件</p> <p>Morimoto, H., Iwata K., Ogonuki N., Inoue K., Ogura A., <u>Kanatsu-Shinohara M.</u>, Morimoto T., Yabe-Nishimuara C., *Shinohara T. ROS are required for spermatogonial stem cell self-renewal. <i>Cell Stem Cell</i> In press.</p> <p>*<u>Kanatsu-Shinohara M.</u>, Shinohara T. Proliferation and differenatiation of male germline stem cells. <i>Annu. Rev. of Cell and Developmental Biology</i> In press.</p>
<p>会議発表 計 1 件</p>	<p>専門家向け 計 1 件</p> <p>平成 24 年8月30-31日 (発表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・くらまえホール</p> <p>一般向け 計 0 件</p>
<p>図書 計 1 件</p>	<p>篠原美都・篠原隆司 「幹細胞から見た生殖系の老化」アンチ・エイジング医学 特集「細胞老化、臓器老化、組織老化」 株式会社メディカルレビュー社 2013 年第9巻 第2号 p30-34</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にて研究成果を紹介。 http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/~molgen/index.html</p> <p>2012年10月5日 京都大学広報「マウス精子幹細胞の支持環境の試験管内での再構成」 http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2012/121005_1.htm</p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>2012年10月1日 京都大学広報センターにて記者会見 篠原美都 Cell Stem Cell 誌の論文発表について</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計2件</p>	<p>2012年10月5日 京都新聞朝刊24面「精子幹細胞 増殖環境を再現—京大など、試験管内に 移植治療に応用期待」</p> <p>2012年10月5日 産経新聞朝刊23面「精巢内定着率上昇 タンパク質特定 京大グループ」</p>
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成24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	41,500,000	41,500,000	0
間接経費	37,200,000	12,300,000	12,450,000	12,450,000	0
合計	161,200,000	53,300,000	53,950,000	53,950,000	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	5,531,352	41,500,000	0	47,031,352	46,973,807	57,545	0
間接経費	11,070,000	12,450,000	0	23,520,000	1,307,044	22,212,956	0
合計	16,601,352	53,950,000	0	70,551,352	48,280,851	22,270,501	0

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	44,417,596	細胞培養用試薬、プラスチック、一般試薬等
旅費	358,959	研究打ち合わせ、学会出席
謝金・人件費等	0	
その他	2,197,252	動物飼育管理費、微生物モニタリング、 サンプル配送料等
直接経費計	46,973,807	
間接経費計	1,307,044	
合計	48,280,851	

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
米国アフィメトリクス社 製GeneChip Scanner	GeneChip 3000 Scanner 3000 7G System	1	11,967,375	11,967,375	2012/8/28	京都大学・医学研 究科
米国アジレント・テクノロジー社 製マイクロアレイデータ解析不 ソフトウェア	GeneSpring GX	1	630,000	630,000	2012/9/13	京都大学・医学研 究科
イルミナ TruSeq SBS Kit	v3-HS	1	1,543,920	1,543,920	2012/10/2	京都大学・医学研 究科
米国プロメガ社製 Luminescence System	GloMax- Multi+Luminesc ence System with Instinct Software with Shaking and Heating	1	2,693,250	2,693,250	2013/2/7	京都大学・医学研 究科