

博士論文（要約）

哺乳類の恒常的な精子発生における
直精細管の重要性

相山 好美

哺乳類の恒常的な精子発生における
直精細管の重要性

東京大学大学院農学生命科学研究科

獣医解剖学教室

平成 23 年度入学

獣医学専攻 博士課程 相山 好美

指導教員 九郎丸 正道

序 章

曲精細管における精子発生

哺乳類の精巣では、曲精細管とよばれる管状構造の上皮で精子発生が営まれる。曲精細管の内側は、セルトリ細胞と呼ばれる支持細胞に裏打ちされており、セルトリ細胞が隣り合うセルトリ細胞と血液精巣関門を形成することで、曲精細管の上皮（精上皮）は基底区画と体循環から隔離された傍腔区画とに分画される。基底区画では、精祖細胞の部分母集団である精原幹細胞（SSCs: spermatogonial stem cells）が自己複製によって自らの細胞数を一定に維持しながら周期的に分化型精祖細胞へと分化して精細胞を供給している。傍腔区画では、精母細胞が相同染色体の対合と組換えが起こる減数分裂を経て円形精子細胞となり、さらに長距離移動に備えて形態を変化させる伸長型精子細胞期を経て成熟した精子となる。精子発生はこのようなステップで進行するため、精上皮には精細胞が未熟な順に同心円状に配列している。一つの曲精細管の断面には分化段階の異なる精細胞が決まった組み合わせで存在し、精上皮ステージと呼ばれる。精上皮ステージの数には種差が認められ、マウスでは1 2、ハムスターでは1 3の精上皮ステージが認められる。ステージは曲精細管の領域ごとに異なり、それぞれの領域で生殖細胞と体細胞（セルトリ細胞やライディッヒ細胞）が液性因子を介して相互作用しながら、自律的に精子発生が営まれている（Russell, 1990）。

精子発生の恒常性を支える SSCs 維持機構

哺乳類の精巣が恒常的に精子を産生し続けることができるのは、SSCs が周期的に分

化して精細胞を供給する一方で、自己複製により絶えず自らを増幅させて一定数に維持しているためである (Brinster 2002; de Rooij, 2009; Phillips *et al.*, 2010; de Rooij and Griswold, 2012; Oatley and Brinster, 2012; Yoshida, 2012)。マウス生殖細胞系列のうち最も初期の細胞群は未分化型精祖細胞と呼ばれ、その形態から As (A single) 型、Apr (A paired) 型および Aal (A aligned) 型に分類される。古典的には As 型の未分化型精祖細胞が最も未分化な状態、すなわち SSCs であると考えられてきた (Russell, 1990)。ところが近年、TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達因子 GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) が濃度依存的に SSCs の自己複製と分化のバランスを調整していることが明らかとなり (Meng *et al.*, 2000; Hofmann *et al.*, 2005; Naughton *et al.*, 2006; Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2003; Kubota *et al.*, 2004; Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2005; Ryu *et al.*, 2005; Savitt *et al.*, 2012)、GDNF の受容体である GFR α 1 (GDNF receptor- α 1) を発現する細胞集団が SSCs として機能することが報告された (Morimoto *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2009; Nakagawa *et al.*, 2010; Hara *et al.*, 2014)。高濃度の GDNF に曝露された GFR α 1 陽性精原幹細胞は自己複製を行い、主に As 型、Apr 型の GFR α 1 陽性精原幹細胞の増加を促す。一方で、GDNF に曝露されなかった細胞は分化プログラムを開始し、c-Kit 陽性の分化型精祖細胞を経て精子発生に加わる (Hofmann 2008; Oatley and Brinster, 2008)。GDNF が欠如すると SSCs は増殖せず精子発生は破綻するが、逆に過剰発現した場合においても分化細胞の供給が滞るため精子発生は進行しない (Meng *et al.*, 2000)。つまり、哺乳類の恒常的な精子発生は、規則的な GDNF 発現により SSCs の自己複製と分化がバランス良く行われ、一定数の SSCs が維持されることによって支えられている。

直精細管と下流の管状構造

直精細管とは、曲精細管と精巣網の境界部に位置する精子発生を支持しない上皮を持つ短い管状構造を指す (図 0-1 A-C)。曲精細管で作られた精子は、直精細管を通過して精巣網へと送られ、精巣輸出管、精巣上体管を通過しながら受精能や運動能を獲得し、最終的に精巣上体尾部に貯蔵される。この一連の管状構造は、マウスでは胎齢 14.5 日頃に完成する (Combes *et al.*, 2009)。この時期の生殖腺 (精巣の原基) は中腎 (精巣上体の原基) に裏打ちされ、生殖腺の内部には精細管および精巣網が、中腎の内部には精巣輸出管および精巣上体管の原基 (ウォルフ管) が形成される (図 0-2 A)。その後、管状構造は発生の過程で複雑に湾曲しながら各上皮特有の機能を獲得し、成熟してゆく。

成体の精巣の曲精細管では、セルトリ細胞が液性分泌物を内腔に分泌する一方、直精細管など下流の管状構造の上皮では水分の再吸収が活発に行われる (Russell, 1990; Russell and Griswold, 1993)。この水分再吸収にはエストロゲン受容体- α が関与することが知られており、エストロゲン受容体- α 欠損マウスでは精巣網に内腔液が貯留して異常な拡張を示すとともに、曲精細管の精上皮が脱落する (Hess *et al.*, 1997)。また、直精細管の末端領域には、特殊なセルトリ細胞の集団が管腔側に細胞質を突出させて弁のような構造 (セルトリバルブ; 図 0-1 A-C) を形作っている (Russell, 1993; Hess *et al.*, 2005)。これらの水分の分泌機構、再吸収機構および弁様構造による逆流防止機構などの働きにより、管状構造の内腔には内腔液の一方向性の流れ (Flow) が生じ、精子離

脱直後の運動能を持たない精子の運搬に関わると考えられている (Setchell, 1986; 図 0-2 B)。Flow の詳細な役割は未解明であるが、環境調節因子として精子発生に何らかの重要な役割を果たしている可能性が想定される。

これまでの精子発生研究は、曲精細管に重点をおいたものが多く、直精細管以降の管状構造に注意が払われることはほとんど無かった。しかし、哺乳類の恒常的な精子発生は、生殖細胞と体細胞の液性因子を介した相互作用によって支えられており、直精細管以降の管状構造は、環境調節に関わる Flow を形成するなど間接的に精子発生に関わっている可能性が高い。そこで本研究では、直精細管と恒常的な精子発生の関連性を明らかにすることを目的とし、第 1 章では精巣の皮下移植法を用いて直精細管など下流の管状構造が異所性精子発生に与える影響を検討し、第 2 章では下流の管状構造の機能を解明するため直精細管の SSCs 維持機構に着目して解析を行った。

図表およびその説明

图 0-1

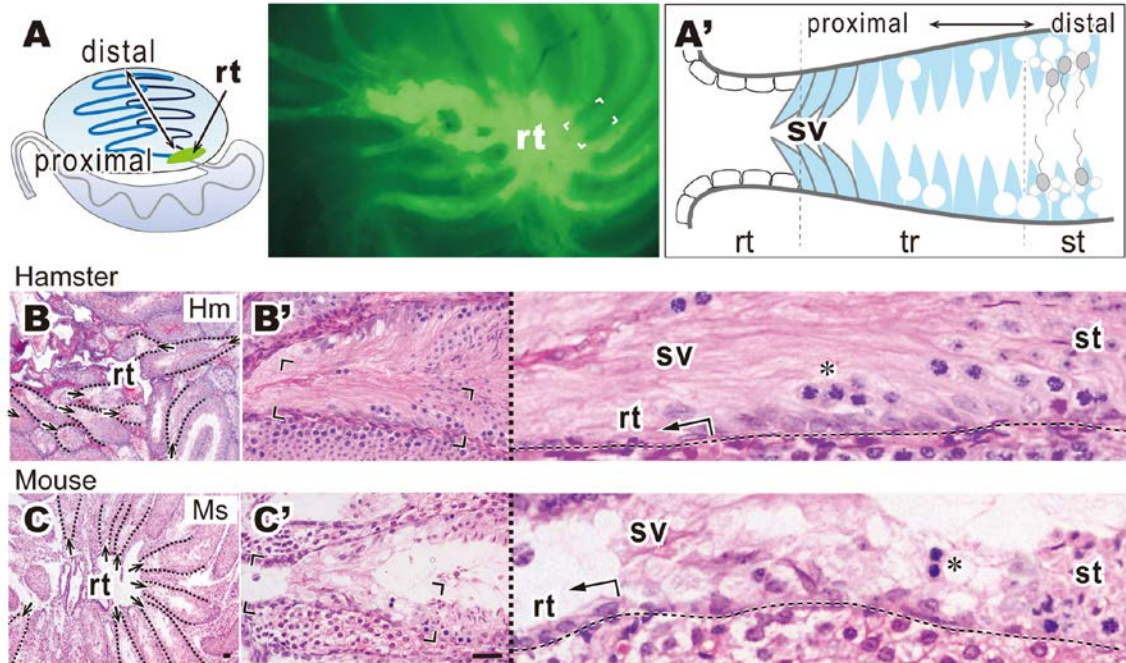


図 0-1 ハムスターおよびマウスの直精細管領域の構造

(A) 精巣網 (rt)、直精細管 (tr)、セルトリバルブ (SV)、ならびに曲精細管 (st)の概略図。(A') FITC-dextran を精巣輸出管より管腔内に注入して可視化した精巣網。げっ歯類の精巣網は白膜の直下に位置する。(A'') 曲精細管から精巣網への移行部の概略図。直精細管の上皮は精子発生を支えず、その末端部分には特殊なセルトリ細胞の集団が弁状の構造 (セルトリバルブ; SV) を形作っている。

(B, C) ハムスター (Hm; B) およびマウス (Ms; C) のセルトリバルブの HE (hematoxylin and eosin) 染色像。矢印 (左図) : セルトリバルブ領域、アスタリスク: 分化型の精細胞の集塊

Scale bars = 50 μ m

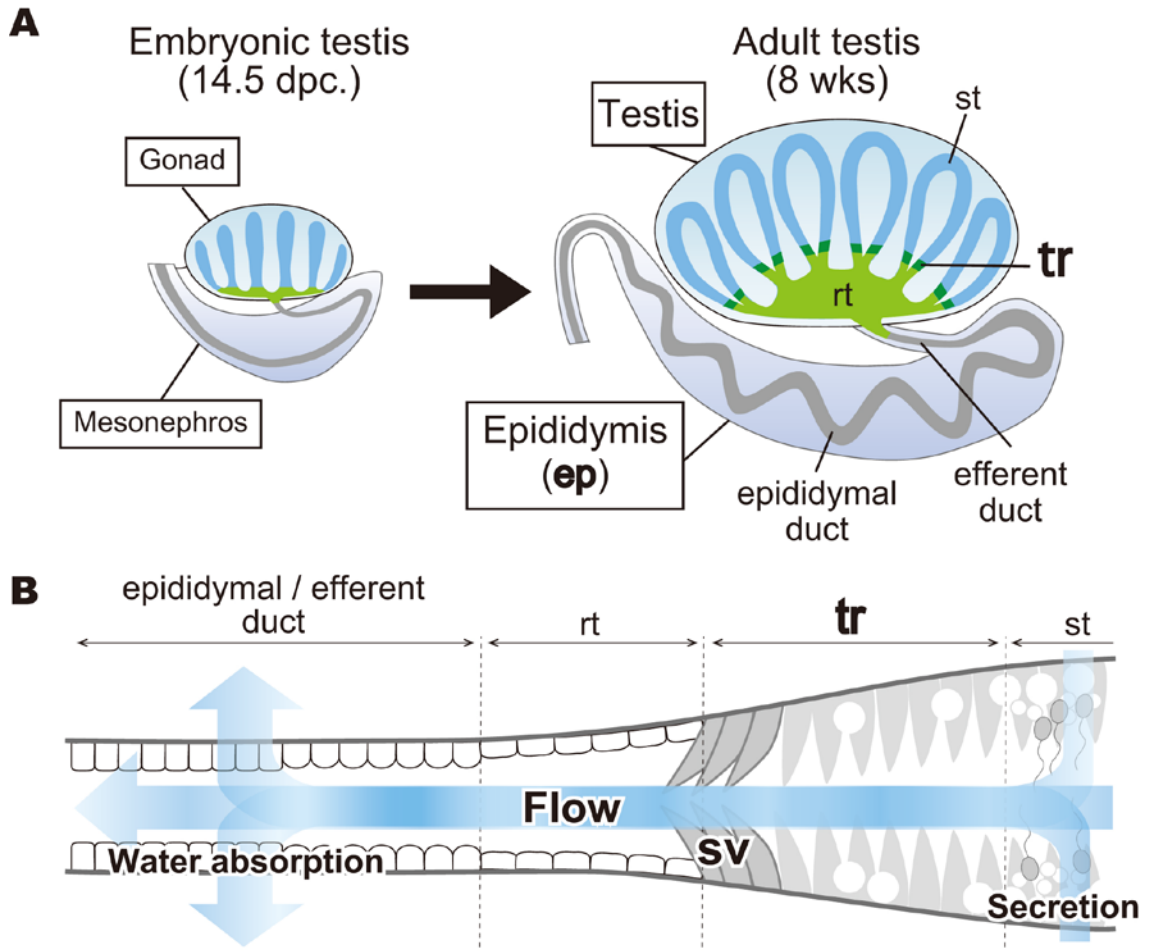


図 0-2 哺乳類の精巣、精巣上体を構成する管状構造の発生と管腔内を流れる Flow

(A) 哺乳類の精巣および精巣上体を構成する一連の管状構造の発生の概略図。マウスでは一連の管状構造の原基は胎齢 14 日前後に形成される。精巣 (Testis) の原基である生殖腺 (Gonad) の内部には曲精細管 (st)、直精細管 (tr)、精巣網 (rt) が形成され、精巣上体 (Epididymis) の原基である中腎 (Mesonephros) の内部には精巣輸出管 (efferent duct) および精巣上体管 (epididymal duct) が形成される。

(B) 管状構造の内腔を流れる Flow の形成。成体の精巣の曲精細管では、セルトリ細胞が液性分泌物を内腔に分泌する。一方、直精細管など下流の管状構造の上皮では、液性成分の再吸収が活発に行われている。さらに、直精細管の末端領域には特殊なセルトリ細胞の集団が細胞質を管腔側に突出させて弁のような構造を形作っており (セルトリバルブ)、管腔内液の逆流防止機能を担っていると考えられている。これらの機能により、管腔内には液性成分の一方向性の流れ (Flow) が形成される。

第 1 章

マウス皮下組織における
恒常的な精子発生の試み

本章の内容は、雑誌掲載の形で出版する計画があるため公表できない。

5年以内に出版予定。

第 2 章

ハムスターの セルトリバルブ領域における 新規の精原幹細胞ニッチの発見

本章の内容は、雑誌掲載の形で出版する計画があるため公表できない。

5年以内に出版予定。

総合考察

本研究では、精巢の皮下移植法および組織学的解析により、直精細管など下流の管状構造が恒常的な精子発生に与える影響を検証し、以下の2点を明らかにした。

1) 直精細管など下流の管状構造は、皮下移植法における高効率かつ恒常的な精子発生の誘導に重要である(下流の管状構造を精巢とともに皮下移植すると、精子発生効率が2.11%から38.62%に向上)。下流の管状構造を精巢と同時に移植した群では、野生型マウスと同様のSSCsニッチ動態が認められ、少なくとも6ヵ月の間高効率な精子発生が持続したことから、恒常的な精子発生を誘導可能な系であると考えられる。これは、下流の管状構造の水分再吸収機構および直精細管のセルトリバルブ構造が一方向性のFlowの形成に寄与し、管腔内環境の正常化に役立ったためと考えられる。(第1章 マウス皮下における恒常的な精子発生の試み)

2) 直精細管のセルトリバルブ領域には、これまで知られていなかった固定的なSSCsニッチが存在する。セルトリバルブ領域には、性成熟後も増殖能を有しニッチ因子GDNFを恒常的に発現する特殊なセルトリ細胞が存在し、これら細胞がニッチ細胞としてSSCsを選択的に維持していることが示唆される。(第2章 ハムスターのセルトリバルブ領域における新規の精原幹細胞ニッチの発見)

以上の研究結果は、これまで注意を払われて来なかった直精細管など下流の管状構造が恒常的な精子発生に対して重要な役割を有することを強く示唆するものである。これらの知見は、例えば畜産業界などへの応用を目指した種々の異所性精子発生手法の更なる改良に役立つと考えられる。

現在、畜産業界、特に牛の繁殖に関わる分野では、優良遺伝子を持つ雄家畜（種雄）の精子を凍結保存して人工授精に供する技術が普及し、畜産物の安定供給に貢献している。しかし、現時点の技術では種雄を個体レベルで管理する必要があるため、莫大なスペース、時間および経済的コストがかかる上に、選ばれた種雄の伝染病や災害などによる損失リスクが絶えず存在する。また、家畜の精子発生メカニズムの解明は、畜産業の更なる振興のために重要であるが、種雄の実験室レベルでの取り扱いの難しさから十分な研究がなされていなかった。このような背景から精巢の基礎研究分野では、種雄を個体レベルで飼育する現行の手法に代わる新たな管理形態として、室内での維持が可能な異所性精子発生手法の開発が進められてきた。

現在までに報告されている異所性精子発生のアプローチは大きく二つの手法に分けられる。

第一の手法は、未熟な精巢組織を *in vitro* 器官培養、あるいはヌードマウスの体内（皮下組織、腎皮膜下）で成熟させる方法である。前者の *in vitro* 器官培養については、近年、新生子の精巢を StemPro (Invitrogen) を含む特殊な培地上で器官培養することで、完全な精子発生に成功した例が報告された (Sato et al., 2011)。しかしながら、この手法では、培養液の浸透性の問題から精子発生が行われる領域が精巢組織の外縁部に限局してしまう。また、曲精細管が盲管となっていることが想定され、実用化に十分な効率での精子発生は難しいと考えられる。この問題の解決には下流の管状構造が鍵を握っている可能性がある。下流の管状構造を繋げた状態で培養することにより、曲精細管の盲管

化を防ぐと同時に、水分再吸収機構の働きにより内腔液が速やかに排出されて培養液の循環が改善される可能性がある。加えて、セルトリバルブニッチからの SSCs の供給が安定した精子発生を支えることが期待されるため、試行の価値があると考えられる。一方、後者の精巣組織を免疫不全動物の体内で成熟させる方法については、本研究で示した通り、下流の管状構造を同時移植することにより、少なくともマウスの同種間移植においては恒常的かつ高効率な精子発生に成功したと考えている。しかしながら、本手法を大型家畜の精巣に応用することは、マウスの皮下組織の空間的制約および血液供給の制約から不可能である。従って、今後は必要な領域のみをマウスに部分移植する、あるいはウサギなど室内飼育が可能な中型動物を用いて種雄の精巣を維持する戦略が必要となるだろう。

第二の手法は、SSCs を含む精巣の細胞懸濁液をヌードマウスの曲精細管に直接移植する方法である。これは、レシピエント動物が持つ一連の管状構造を活用することができる点において極めて優れた手法であると考えられる。しかしながら、この手法ではラット、ハムスターなど近縁動物の場合はマウスの曲精細管内で完全な精子発生を誘導できるものの、ウサギ、イヌ、ブタ、ウシ、ウマ、類人猿およびヒトなど系統発生的にマウスと離れた動物をドナーとした場合には精子発生が進行しない (Dobrinski et al., 2005)。これは、減数分裂以降の生殖細胞の分化、特に精子の形態形成には動物種固有のセルトリ細胞が必要であるためと考えられている。従って、家畜など系統の離れた動物種で完全な精子発生を誘導するためには、まず、マウスのセルトリ細胞を除去してドナー動物のセルトリ細胞と置換する必要があるが、現時点ではセルトリ細胞の除去には

カドミウム等の劇物を使用する他方法が無い。現在、当研究室ではヒト細胞が持つジフテリア毒素受容体をマウスのセルトリ細胞特異的に発現させ、毒素投与によりセルトリ細胞を除去する **TRECK** 法によるセルトリ細胞欠損マウスの作出を試みている。これが成功し、異種動物の生殖細胞とセルトリ細胞を同時に定着させることができれば、最新型の異所性精子発生手法として多くの分野に貢献するだろう。

このように、直精細管の重要性が示されたことによって、異所性精子発生手法の更なる改良に向けた方針が立てられた。今後、当研究をきっかけに下流の管状構造の機能解明が進み、さらに高次の視点から様々な生殖発生工学の技術開発が進むことを期待している。

引用文献

- Amoyel, M., J. Sanny, M. Burel and E. A. Bach** (2013). "Hedgehog is required for CySC self-renewal but does not contribute to the GSC niche in the *Drosophila* testis." *Development* **140**(1): 56-65.
- Brinster, R. L.** (2002). "Germline stem cell transplantation and transgenesis." *Science* **296**(5576): 2174-2176.
- Bunt, S. M. and G. R. Hime** (2004). "Ectopic activation of Dpp signalling in the male *Drosophila* germline inhibits germ cell differentiation." *Genesis* **39**(2): 84-93.
- Campos-Junior, P. H., G. M. Costa, S. M. Lacerda, J. V. Rezende-Neto, A. M. de Paula, M. C. Hofmann and L. R. de Franca** (2012). "The spermatogonial stem cell niche in the collared peccary (*Tayassu tajacu*)." *Biol Reprod* **86**(5): 155, 151-110.
- Chan, F., M. J. Oatley, A. V. Kaucher, Q. E. Yang, C. J. Bieberich, C. S. Shashikant and J. M. Oatley** (2014). "Functional and molecular features of the Id4+ germline stem cell population in mouse testes." *Genes Dev* **28**(12): 1351-1362.
- Chen, L. Y., P. R. Brown, W. B. Willis and E. M. Eddy** (2014). "Peritubular myoid cells participate in male mouse spermatogonial stem cell maintenance." *Endocrinology* **155**(12): 4964-4974.
- Clouthier, D. E., M. R. Avarbock, S. D. Maika, R. E. Hammer and R. L. Brinster** (1996). "Rat spermatogenesis in mouse testis." *Nature* **381**(6581): 418-421.
- Combes, A. N., E. Lesieur, V. R. Harley, A. H. Sinclair, M. H. Little, D. Wilhelm and P. Koopman** (2009). "Three-dimensional visualization of testis cord morphogenesis, a novel

tubulogenic mechanism in development." *Dev Dyn* **238**(5): 1033-1041.

Costoya, J. A., R. M. Hobbs, M. Barna, G. Cattoretti, K. Manova, M. Sukhwani, K. E.

Orwig, D. J. Wolgemuth and P. P. Pandolfi (2004). "Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells." *Nat Genet* **36**(6): 653-659.

Davies, B., C. Baumann, C. Kirchhoff, R. Ivell, R. Nubbemeyer, U. F. Habenicht, F.

Theuring and U. Gottwald (2004). "Targeted deletion of the epididymal receptor HE6 results in fluid dysregulation and male infertility." *Mol Cell Biol* **24**(19): 8642-8648.

Davies, E. L. and M. T. Fuller (2008). "Regulation of self-renewal and differentiation in adult

stem cell lineages: lessons from the *Drosophila* male germ line." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **73**: 137-145.

de Cuevas, M. and E. L. Matunis (2011). "The stem cell niche: lessons from the *Drosophila*

testis." *Development* **138**(14): 2861-2869.

de Rooij, D. G. (2009). "The spermatogonial stem cell niche." *Microsc Res Tech* **72**(8): 580-585.

de Rooij, D. G. and M. D. Griswold (2012). "Questions about spermatogonia posed and

answered since 2000." *J Androl* **33**(6): 1085-1095.

Di Carlo, A. D., G. Travia and M. De Felici (2000). "The meiotic specific synaptonemal

complex protein SCP3 is expressed by female and male primordial germ cells of the mouse embryo." *Int J Dev Biol* **44**(2): 241-244.

Dobrinski, I. (2005). "Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic

animals." *Anim Reprod Sci* **89**(1-4): 137-145.

- Dobrinski, I., M. R. Avarbock and R. L. Brinster** (1999). "Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes." *Biol Reprod* **61**(5): 1331-1339.
- Dobrinski, I., M. R. Avarbock and R. L. Brinster** (2000). "Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes." *Mol Reprod Dev* **57**(3): 270-279.
- Dovere, L., S. Fera, M. Grasso, D. Lamberti, C. Gargioli, B. Muciaccia, A. M. Lustri, M. Stefanini and E. Vicini** (2013). "The niche-derived glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) induces migration of mouse spermatogonial stem/progenitor cells." *PLoS One* **8**(4): e59431.
- Geijsen, N., M. Horoschak, K. Kim, J. Gribnau, K. Eggan and G. Q. Daley** (2004). "Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells." *Nature* **427**(6970): 148-154.
- Hara, K., T. Nakagawa, H. Enomoto, M. Suzuki, M. Yamamoto, B. D. Simons and S. Yoshida** (2014). "Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states." *Cell Stem Cell* **14**(5): 658-672.
- Hess, R., L. R. França, M. Skinner and M. Griswold** (2005). "Structure of the Sertoli cell." *Sertoli cell biology*: 19-40.
- Hess, R. A., D. Bunick, K. H. Lee, J. Bahr, J. A. Taylor, K. S. Korach and D. B. Lubahn** (1997). "A role for oestrogens in the male reproductive system." *Nature* **390**(6659): 509-512.
- Hofmann, M. C.** (2008). "Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem

cell niche." *Mol Cell Endocrinol* **288**(1-2): 95-103.

Hofmann, M. C., L. Braydich-Stolle and M. Dym (2005). "Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF." *Dev Biol* **279**(1): 114-124.

Honaramooz, A., A. Snedaker, M. Boiani, H. Scholer, I. Dobrinski and S. Schlatt (2002). "Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice." *Nature* **418**(6899): 778-781.

Janke, C. and J. C. Bulinski (2011). "Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions." *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(12): 773-786.

Kanatsu-Shinohara, M., K. Inoue, N. Ogonuki, H. Morimoto, A. Ogura and T. Shinohara (2011). "Serum- and feeder-free culture of mouse germline stem cells." *Biol Reprod* **84**(1): 97-105.

Kanatsu-Shinohara, M., K. Inoue, S. Takashima, M. Takehashi, N. Ogonuki, H. Morimoto, T. Nagasawa, A. Ogura and T. Shinohara (2012). "Reconstitution of mouse spermatogonial stem cell niches in culture." *Cell Stem Cell* **11**(4): 567-578.

Kanatsu-Shinohara, M., H. Miki, K. Inoue, N. Ogonuki, S. Toyokuni, A. Ogura and T. Shinohara (2005). "Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions." *Biol Reprod* **72**(4): 985-991.

Kanatsu-Shinohara, M., T. Muneto, J. Lee, M. Takenaka, S. Chuma, N. Nakatsuji, T. Horiuchi and T. Shinohara (2008). "Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes." *Biol Reprod* **78**(4): 611-617.

Kanatsu-Shinohara, M., N. Ogonuki, K. Inoue, H. Miki, A. Ogura, S. Toyokuni and T.

- Shinohara** (2003). "Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells." *Biol Reprod* **69**(2): 612-616.
- Kawase, E., M. D. Wong, B. C. Ding and T. Xie** (2004). "Gbb/Bmp signaling is essential for maintaining germline stem cells and for repressing bam transcription in the *Drosophila* testis." *Development* **131**(6): 1365-1375.
- Kent, J., S. C. Wheatley, J. E. Andrews, A. H. Sinclair and P. Koopman** (1996). "A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination." *Development* **122**(9): 2813-2822.
- Ketola, I., M. Anttonen, T. Vaskivuo, J. S. Tapanainen, J. Toppari and M. Heikinheimo** (2002). "Developmental expression and spermatogenic stage specificity of transcription factors GATA-1 and GATA-4 and their cofactors FOG-1 and FOG-2 in the mouse testis." *Eur J Endocrinol* **147**(3): 397-406.
- Kidokoro, T., S. Matoba, R. Hiramatsu, M. Fujisawa, M. Kanai-Azuma, C. Taya, M. Kurohmaru, H. Kawakami, Y. Hayashi, Y. Kanai and H. Yonekawa** (2005). "Influence on spatiotemporal patterns of a male-specific Sox9 activation by ectopic Sry expression during early phases of testis differentiation in mice." *Dev Biol* **278**(2): 511-525.
- Kiger, A. A., D. L. Jones, C. Schulz, M. B. Rogers and M. T. Fuller** (2001). "Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue." *Science* **294**(5551): 2542-2545.
- Komai, Y., T. Tanaka, Y. Tokuyama, H. Yanai, S. Ohe, T. Omachi, N. Atsumi, N. Yoshida, K.**

- Kumano, H. Hisha, T. Matsuda and H. Ueno** (2014). "Bmi1 expression in long-term germ stem cells." *Sci Rep* **4**: 6175.
- Kubota, H., M. R. Avarbock and R. L. Brinster** (2004). "Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(47): 16489-16494.
- Leatherman, J. L. and S. Dinardo** (2008). "Zfh-1 controls somatic stem cell self-renewal in the *Drosophila* testis and nonautonomously influences germline stem cell self-renewal." *Cell Stem Cell* **3**(1): 44-54.
- Meng, X.** (2000). "Regulation of Cell Fate Decision of Undifferentiated Spermatogonia by GDNF." *Science* **287**(5457): 1489-1493.
- Michel, M., A. P. Kupinski, I. Raabe and C. Bokel** (2012). "Hh signalling is essential for somatic stem cell maintenance in the *Drosophila* testis niche." *Development* **139**(15): 2663-2669.
- Morimoto, H., M. Kanatsu-Shinohara, S. Takashima, S. Chuma, N. Nakatsuji, M. Takehashi and T. Shinohara** (2009). "Phenotypic plasticity of mouse spermatogonial stem cells." *PLoS One* **4**(11): e7909.
- Morrison, S. J. and A. C. Spradling** (2008). "Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life." *Cell* **132**(4): 598-611.
- Nagai, R., M. Shinomura, K. Kishi, Y. Aiyama, K. Harikae, T. Sato, M. Kanai-Azuma, M. Kurohmaru, N. Tsunekawa and Y. Kanai** (2012). "Dynamics of GFRalpha1-positive

spermatogonia at the early stages of colonization in the recipient testes of W/Wnu male mice." *Dev Dyn* **241**(8): 1374-1384.

Nagano, M., J. R. McCarrey and R. L. Brinster (2001). "Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes." *Biol Reprod* **64**(5): 1409-1416.

Nagano, M., P. Patrizio and R. L. Brinster (2002). "Long-term survival of human spermatogonial stem cells in mouse testes." *Fertil Steril* **78**(6): 1225-1233.

Nakagawa, T., M. Sharma, Y. Nabeshima, R. E. Braun and S. Yoshida (2010). "Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment." *Science* **328**(5974): 62-67.

Naughton, C. K., S. Jain, A. M. Strickland, A. Gupta and J. Milbrandt (2006). "Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate." *Biol Reprod* **74**(2): 314-321.

Noce, T., S. Okamoto-Ito and N. Tsunekawa (2001). "Vasa homolog genes in mammalian germ cell development." *Cell Struct Funct* **26**(3): 131-136.

Oatley, J. M. and R. L. Brinster (2008). "Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals." *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**: 263-286.

Oatley, J. M. and R. L. Brinster (2012). "The germline stem cell niche unit in mammalian testes." *Physiol Rev* **92**(2): 577-595.

Oatley, J. M., M. J. Oatley, M. R. Avarbock, J. W. Tobias and R. L. Brinster (2009). "Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell

self-renewal." *Development* **136**(7): 1191-1199.

Oatley, M. J., K. E. Racicot and J. M. Oatley (2011). "Sertoli cells dictate spermatogonial stem cell niches in the mouse testis." *Biol Reprod* **84**(4): 639-645.

Ogawa, T., I. Dobrinski, M. R. Avarbock and R. L. Brinster (1999). "Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes." *Biol Reprod* **60**(2): 515-521.

Okabe, M., M. Ikawa, K. Kominami, T. Nakanishi and Y. Nishimune (1997). "'Green mice' as a source of ubiquitous green cells." *FEBS Lett* **407**(3): 313-319.

Phillips, B. T., K. Gassei and K. E. Orwig (2010). "Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**(1546): 1663-1678.

Rodriguez-Sosa, J. R. and I. Dobrinski (2009). "Recent developments in testis tissue xenografting." *Reproduction* **138**(2): 187-194.

Russell, L. D. (1990). "Histological and histopathological evaluation of the testis."

Russell, L. D. and M. D. Griswold (1993). The sertoli cell. Clearwater, Coche River Press.

Ryu, B. Y., H. Kubota, M. R. Avarbock and R. L. Brinster (2005). "Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(40): 14302-14307.

Sato, T., 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** (2011). "Cyclical and patch-like GDNF distribution along the basal surface of Sertoli cells in mouse and hamster testes." *PLoS One* **6**(12): e28367.
- Sato, T., K. Katagiri, A. Gohbara, K. Inoue, N. Ogonuki, A. Ogura, Y. Kubota and T. Ogawa** (2011). "In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes." *Nature* **471**(7339): 504-507.
- Savitt, J., D. Singh, C. Zhang, L. C. Chen, J. Folmer, K. M. Shokat and W. W. Wright** (2012). "The in vivo response of stem and other undifferentiated spermatogonia to the reversible inhibition of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in the adult." *Stem Cells* **30**(4): 732-740.
- Setchell, B. P.** (1986). "The movement of fluids and substances in the testis." *Aust J Biol Sci* **39**(2): 193-207.
- Sharpe, R. M., C. McKinnell, C. Kivlin and J. S. Fisher** (2003). "Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood." *Reproduction* **125**(6): 769-784.
- Shivdasani, A. A. and P. W. Ingham** (2003). "Regulation of stem cell maintenance and transit amplifying cell proliferation by tgf-beta signaling in Drosophila spermatogenesis." *Curr Biol* **13**(23): 2065-2072.
- Spradling, A., M. T. Fuller, R. E. Braun and S. Yoshida** (2011). "Germline stem cells." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(11): a002642.
- Suzuki, H., A. Sada, S. Yoshida and Y. Saga** (2009). "The heterogeneity of spermatogonia is

revealed by their topology and expression of marker proteins including the germ cell-specific proteins Nanos2 and Nanos3." *Dev Biol* **336**(2): 222-231.

Tainosho, S., M. Naito, S. Hirai, H. Terayama, N. Qu and M. Itoh (2011). "Multilayered structure of the basal lamina of the tubuli recti in normal mice." *Med Mol Morphol* **44**(1): 34-38.

Tsunekawa, N., M. Matsumoto, S. Tone, T. Nishida and H. Fujimoto (1999). "The Hsp70 homolog gene, Hsc70t, is expressed under translational control during mouse spermiogenesis." *Mol Reprod Dev* **52**(4): 383-391.

Tulina, N. and E. Matunis (2001). "Control of stem cell self-renewal in Drosophila spermatogenesis by JAK-STAT signaling." *Science* **294**(5551): 2546-2549.

White-Cooper, H. and N. Bausek (2010). "Evolution and spermatogenesis." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**(1546): 1465-1480.

Yang, Q. E., D. Kim, A. Kaucher, M. J. Oatley and J. M. Oatley (2013). "CXCL12-CXCR4 signaling is required for the maintenance of mouse spermatogonial stem cells." *J Cell Sci* **126**(Pt 4): 1009-1020.

Yeh, J. R., X. Zhang and M. C. Nagano (2012). "Indirect effects of Wnt3a/beta-catenin signalling support mouse spermatogonial stem cells in vitro." *PLoS One* **7**(6): e40002.

Yoshida, S. (2010). "Stem cells in mammalian spermatogenesis." *Dev Growth Differ* **52**(3): 311-317.

Yoshida, S. (2012). "Elucidating the identity and behavior of spermatogenic stem cells in the

mouse testis." *Reproduction* **144**(3): 293-302.

Yoshida, S., M. Sukeno and Y. Nabeshima (2007). "A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis." *Science* **317**(5845): 1722-1726.

Yuan, H. and Y. M. Yamashita (2010). "Germline stem cells: stems of the next generation." *Curr Opin Cell Biol* **22**(6): 730-736.

Zhang, L., J. Tang, C. J. Haines, H. L. Feng, L. Lai, X. Teng and Y. Han (2011). "c-kit and its related genes in spermatogonial differentiation." *Spermatogenesis* **1**(3): 186-194.