

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：55301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07421

研究課題名(和文) 全能性幹細胞を長期間維持する内的・外的要因の探求

研究課題名(英文) Intrinsic-, extrinsic factors for long-term maintenance of planarian stem cells

研究代表者

柴田 典人 (Shibata, Norito)

津山工業高等専門学校・総合理工学科・准教授

研究者番号：60402781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：プラナリアは身体中、どこで切断されてもすべての断片が再生する高い再生能力を持つ。研究室では29年間にわたり再生だけでクローンが維持されている。この高い再生能力は新生細胞と呼ばれる、どんな細胞種にもなれる全能性幹細胞によって支えられている。本研究では長期間にわたって新生細胞が維持されているメカニズムを明らかにすることを目的とした。結果として、MTAという遺伝子がないと新生細胞から別の細胞種になれないことが示唆された。この遺伝子は細胞の接着性を介して適切な細胞種を生み出しながら、一方で新生細胞の維持に重要な役割を果たしていると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

あらゆる細胞種になれる万能細胞であるES細胞の元になる哺乳類の内部細胞塊は発生過程のごく初期に一過的に現れるが、発生過程が進むと万能性を持つ細胞は失われる。一方で、プラナリアは大人になっても多くの万能細胞である新生細胞を身体中に維持して、がん化させることなく自由自在に操っている。ES細胞を成体内で維持する機構がない哺乳類では、長期にわたる万能幹細胞の維持のメカニズムを知ることはできない。今回、プラナリアというユニークな生物を使うことで、哺乳類ではガンの転移の際に働くことが知られているMTA遺伝子が万能細胞の維持、移動、分化に関与しているらしいことを明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：Planarian has regenerative ability which planarian can regenerate from almost all tiny body fragments. We maintain planarians only by regeneration for 29 years in our laboratory. This remarkable regenerative ability is dependent on pluripotent stem cells called neoblasts. In this study, I focused on how planarian can maintain neoblasts for a long time. In the result, I found that planarian MTA genes might be involved in maintenance of neoblasts. When I inhibited gene function of planarian MTA by RNAi, planarian could not regenerate even though neoblasts existed. This result suggests that MTA-depleted neoblast can not differentiate into several differentiated cells. Thus, MTA might regulate precise cell differentiation from neoblasts, and maintenance of neoblasts.

研究分野：発生生物学

キーワード：幹細胞 プラナリア 全能性 ニッチ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

幹細胞の分化全能性の維持機構を細胞、分子レベルで理解することは再生医療といった応用面だけでなく、分子機構の種を超えた普遍性など基礎的な生物の理解のためにも非常に重要である。幹細胞の維持に関係するものとしてニッチと呼ばれる細胞外基質が知られている。哺乳類では全ての細胞に分化できる全能性を発揮する内部細胞塊に由来する ES 細胞の維持には細胞接着因子である E カドヘリンが関与していることが知られているが、数十年にわたって ES 細胞を全能性のまま培養し続けられるかに関しては全く未知である。さらに他の生物における分化全能性幹細胞の維持機構はほとんど報告がなかった。

高い再生能力を持つプラナリア (*Dugesia japonica*) は、成体において全細胞数の約 30% を占める全能性幹細胞 (新生細胞) を保持している。我々が研究室で再生力を使った無性生殖のみで増殖させているクローン系統は、29 年にわたり新生細胞を枯渇させる事無く維持し続けている。これは新生細胞を維持する強固なニッチの存在を示唆しているが、その細胞、分子基盤に関しては未知である。我々はこれまで、新生細胞特異的遺伝子を多数同定しさらに 1 細胞レベルの多遺伝子発現解析によって、新生細胞集団内の遺伝子発現の不均一性を発見し、新生細胞の多様性の存在を示唆した。近年、その中から表皮系新生細胞が同定されたが、真の新生細胞は未同定であり、その維持メカニズムについても未知であった。

そこで、本研究では、プラナリアの全能性幹細胞を 25 年以上にわたって維持している未知のニッチを明らかにし、ニッチに局在する真の全能性幹細胞を同定し、この細胞を起点とした成体全能性幹細胞システムの理解を目的とする。我々はプラナリア MTA 相同遺伝子の解析から全能性幹細胞が接着するニッチと期待される間充織領域を発見した。そこで、MTA 遺伝子の機能阻害個体が発現が変化する細胞接着因子に着目して全能性幹細胞ニッチを細胞、分子レベルで解明する。最終的に、このニッチに局在する真の幹細胞を中心にプラナリア全能性幹細胞システムの階層性を理解する。

### 2. 研究の目的

最近、我々は哺乳類において腫瘍の転移能の獲得に関与する *MTA1* (Metastatic Tumor Antigen 1) のプラナリア相同遺伝子 (*MTA-A*, *B*) が、新生細胞で発現していることを見いだした。この遺伝子の機能阻害個体で新生細胞の局在を観察すると、コントロール個体では遊離した移動性の新生細胞が間充織空間に広く観察されるのに対し、機能阻害個体では、遊離した新生細胞が減少し枝状に新生細胞同士が結合して局在していた。新生細胞の局在異常を示す機能阻害個体では新生細胞は分裂能を有しているにも係らず再生不全が起きる事から、新生細胞の分化が抑制されている事が示唆された。多くの成体幹細胞では、細胞分化はニッチから離脱する事で惹起され、ニッチ内に留められる幹細胞は細胞分化が抑制される事が報告されている。これらの事から、*MTA-A*, *B* 機能阻害個体の特殊な局在を示す新生細胞は、ニッチから離脱できず細胞分化が出来ない状態、つまり真の新生細胞の状態を維持し続けているのではないかと考えられる。

そこで、研究目的として、プラナリア *MTA-A*, *B* 遺伝子機能阻害個体における細胞接着に関与する遺伝子の発現の変化と新生細胞局在を指標として新生細胞ニッチを細胞、分子レベルで同定、*MTA* 遺伝子機能阻害個体とニッチ分子の機能阻害個体での新生細胞動態、遺伝子発現解析による真の新生細胞特異的遺伝子の同定、通常個体のシングルセル遺伝子発現解析などによる真の新生細胞を頂点としたプラナリア幹細胞システムの階層性の理解、を行いたい。

これまで、成体に全能性幹細胞を持つ動物種の幹細胞ニッチに関する研究はほとんど行なわれておらず、その細胞、分子レベルの解明は全能性幹細胞研究に大きな進展をもたらすことが期待される。さらに真の全能性幹細胞を同定し、その遺伝子発現特性が明らかになれば、トーマス・ハント・モーガンの研究以来、100 年近くの謎であるプラナリアの再生能力の謎の一端を明らかに出来ることが期待される。

### 3. 研究の方法

*MTA* 機能阻害個体において、新生細胞がどのような変化を受けているかを、プラナリアの上半身だけ X 線照射することで確認した。プラナリアの下半身を鉛版で遮蔽し、X 線を照射することで、上半身のみ X 線が照射されたプラナリアを作成できる。これを *MTA-A* または *B* の RNAi を行なったプラナリアに対して行い、新生細胞の挙動を特異的マーカーの *in situ* ハイブリダイゼーションや免疫染色によって新生細胞の挙動を確認した。成体の *in vivo* で新生細胞を維持するニッチの分子生物学的な探索のため、RNA 干渉法 (RNAi) によって作出した *DjMTA-A*, *-B* 機能阻害個体の次世代シーケンサーを用いた RNA-seq を実施し、コントロール個体と遺伝子発現量の比較を行なった。多くの幹細胞システムではニッチと真の幹細胞は細胞接着により結合し相互作用している。プラナリアの *DjMTA-A*, *B* 機能阻害個体では、ニッチと新生細胞、または新生細胞同士の接着力が增強されているように見える事から、標的遺伝子としては多くのニッチ/幹細胞の結合が必要とされている、同種親和性の細胞接着分子、細胞外基質のレセプター、傍分泌因子や接触分泌因子のリガンドとレセプターなどに着目して解析した。実際に遺伝子発現が変化するかどうかを RT-qPCR で確認した。

#### 4. 研究成果

*MTA* 遺伝子のプラナリア相同遺伝子の機能阻害を行い、細胞の挙動の変化、機能阻害個体での遺伝子発現の変化を調べ、ニッチの有無を検討した。RNAi によってプラナリアの 2 つの *MTA* 相同遺伝子 (*MTA-A*, *MTA-B*) 遺伝子をそれぞれ機能阻害すると再生不全が観察される。この時、通常のプラナリアでは間充織全体に存在している新生細胞が、筋状に繋がった状態で存在する。

本研究では、この筋状の新生細胞がどのような性質を持っているのかを確認した。機能阻害個体の新生細胞の分裂能に関しては M 期マーカーであるリン酸化ヒストン H3 抗体を用いた免疫染色や *PCNA* などの分裂マーカーの発現などの解析から、通常個体の新生細胞と同様であることが明らかとなった。一方で、細胞の移動能に通常個体と比較して異常が見られることが分かった。新生細胞は X 線照射によって特異的に死滅させることができる。プラナリアの中央より後方を鉛版で遮蔽して照射すると、遮蔽されていない上半身のみ新生細胞が除去される個体を作成できる。このような個体では、照射後に後方から前方へのランダムな新生細胞の移動が観察される。*MTA-A* 機能阻害個体において、同様の照射実験を行ったところ、後方からの新生細胞の移動が観察されたが、筋状に繋がった状態で移動していた。さらに *MTA-B* の機能阻害個体では全く移動が確認できなかった。これらの結果はプラナリア *MTA* 遺伝子が、新生細胞の接着性を変化させることで細胞の移動性を制御していることを強く示唆している。

また、*MTA-A* 遺伝子の RNAi 個体で見られた筋状の細胞移動は、腸管などの、外部のニッチと思われる組織とのインタラクションによって、新生細胞の分化が抑制されているのではないかとこの仮説を支持していると思われる。さらに *MTA* 機能阻害個体では、ギャップ結合に關与するイネキシン (*inx-B*) の発現が優位に増加していることを RNA-seq と RT-qPCR を使うことで明らかにした。さらに、*MTA* 遺伝子の機能阻害個体では、細胞の増殖・分化に關与することが明らかとなっている *P2X* 遺伝子の発現が減少することも分かった。*P2X* は 50% 程度の新生細胞が発現しており、新生細胞が活性化されると発現し、細胞分化に寄与するらしいことを示唆されている。これらのことから、プラナリアの *MTA* 遺伝子は細胞の接着性を変化させ、新生細胞が特定のニッチから出られなくなることから細胞分化が抑制され、再生不全を起こすこと、さらには新生細胞自身がニッチとなりうるということが予想された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Makoto Kashima, Kiyokazu Agata, Norito Shibata	4. 巻 60 (5)
2. 論文標題 Searching for non-transposable targets of planarian nuclear PIWI in pluripotent stem cells and differentiated cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dev. Growth Differ.	6. 最初と最後の頁 260-277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12536	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Norito Shibata, Kiyokazu Agata	4. 巻 1774
2. 論文標題 RNA Interference in Planarians: Feeding and Injection of Synthetic dsRNA.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 455-466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-7802-1_18	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kumagai, N., Kashima, M, Shibata, N., Agata, K.
2. 発表標題 Heterogeneity of RNP granules specific to planarian adult pluripotent stem cells and its functions
3. 学会等名 International Planarian Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sato, Y., Shibata, N., Agata, K.
2. 発表標題 The migration of neoblasts in <i>Dugesia japonica</i> , indicating the different stem cell regulation within highly regenerative planarians
3. 学会等名 International Planarian Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊谷信是、鹿島誠、柴田典人、阿形清和
2. 発表標題 成体多能性幹細胞に特異的なRNP顆粒の不均一性とその機能
3. 学会等名 日本動物学会 第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤勇輝、柴田典人、阿形清和
2. 発表標題 プラナリア種間における異なる全能性幹細胞の移動制御機構
3. 学会等名 日本動物学会 第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sato, Y. Shibata, N. and Agata, K
2. 発表標題 New categorization of planarian stem cell population based on possible stem cell niche
3. 学会等名 日本発生物学会第50回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sato, Y. Nagao, R. Shimazaki, A. Sekii, K. Kobayashi, K. Shibata, N. and KAgata, K
2. 発表標題 プラナリアの胚発生期における全能性幹細胞ニッチの形成
3. 学会等名 日本動物学会第87回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柴田典人
2. 発表標題 プラナリアの幹細胞を起点とする前後軸に沿った再生の分子機構
3. 学会等名 平成29年度中国四国地区生物系三学会合同大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shibata, N
2. 発表標題 in vivo adult pluripotent stem cells in planarian -How can planarian maintain the stem cells in the adult body?-
3. 学会等名 The international research symposium on Germness and Pluripotency of the Planarians in comparison with the Fly and Mouse Systems
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kumagai, N. Kashima, M. Shibata, N. and Agata, K.
2. 発表標題 Heterogeneity of RNP granules specific to planarian adult pluripotent stem cells and its function
3. 学会等名 日本発生学会第52会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田典人
2. 発表標題 再生シグナルに応答したプラナリア幹細胞の活性化
3. 学会等名 日本発生学会第52会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----