

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：学術創成研究費

研究期間：2005～2009

課題番号：17GS0318

研究課題名（和文）プラナリアの再生組織構築を決定する位置情報システムの解明

研究課題名（英文）Unraveling molecular mechanisms to recreate 3D organ architecture

研究代表者

阿形 清和 (AGATA KIYOKAZU)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：70167831

研究成果の概要（和文）：プラナリアが、どのようにして位置情報を制御しながら、全能性の幹細胞から三次元構造をもつ機能的な脳を再生しているのかを解明し、そこで理解したことをマウス ES 細胞に適用しながら ES 細胞からマウスの脳をつくることを試みる

研究成果の概要（英文）：We investigated the mechanisms underlying organ regeneration from pluripotent stem cells in planarians. We applied these strategies to organ formation from mouse ES cells in vitro.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	90,700,000 円	27,210,000 円	117,910,000 円
2006 年度	84,300,000 円	25,290,000 円	109,590,000 円
2007 年度	83,200,000 円	24,960,000 円	108,160,000 円
2008 年度	83,400,000 円	25,020,000 円	108,420,000 円
2009 年度	83,600,000 円	25,080,000 円	108,680,000 円
総計	425,200,000 円	127,560,000 円	552,760,000 円

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：幹細胞、位置情報、器官形成

1. 研究開始当初の背景

再生医療の隆盛によって種々の幹細胞が単離されるようになったが、再生医学を現実のものにするためには、『幹細胞からいかに形と機能をもつ臓器・組織を再生・構築していくか』…が大きな課題として残っている。今の段階では幹細胞があっても、単なる細胞の塊を造ることしかできず、単に移植しているだけではガンを作ってしまう危険性すら残している。形あるものを生み出すためには、『発生・再生の場の座標軸』…すなわち位置情報形成が必須と考えられる

2. 研究の目的

再生の場において、幹細胞はどのようにして細胞同士を認識しながら座標と位置情報を形成できるのか、その分子メカニズムを明らかにすることが本研究プロジェクトのテーマである。具体的には、全身に幹細胞を保持していることによって高い再生能力を示すプラナリアを用いて、幹細胞から、形と機能をもった脳や咽頭を再生する分子メカニズムを解き明かし、そこで解明されたロジックを活かして哺乳動物で幹細胞から器官・臓器を形成することに挑戦する。

3. 研究の方法

(1) 再生初期に稼働する遺伝子の系統的な解析

プラナリアの特性(同じ切断面でも、元の頭方向にあった断片からは頭部、逆の面からは尾部が再生してくる)をいかして、(1)極性形成時(切断後 12 時間)で異なる発現をする遺伝子、(2)座標の再編成時(切断後 12-24 時間)に活性化される遺伝子、(3)脳再生時(切断後 24-36 時間)に活性化される遺伝子を、定量的トランスクリプトーム解析法(HiCEP 法)で探索し、『極性形成』と『位置情報形成』に関与する遺伝子群を系統的にスクリーニングする。それらの候補遺伝子について RNAi 法で機能解析して、脳の器官形成までに至る分子メカニズムを明らかにする。

(2) X 線照射プラナリアを用いた遺伝子発現比較

プラナリアでは X 線照射によって幹細胞のない状態がつかれるので、遺伝子発現解析を X 線照射個体で調べることで、再生に関与する遺伝子が幹細胞由来の発現なのか、分化した細胞由来なのかを明らかにすることで、分化細胞と幹細胞の役割の切り分けを行う。

(3) マウス ES 細胞プラナリア

また、プラナリアで発見された分子メカニズムについて、マウスでどこまで同じような分子が関与しているかを調べるとともに、それらの分子を操作して、マウスの種々の幹細胞からシャーレ内での器官形成に挑戦する。

4. 研究成果

(1) プラナリアの再生から解読された器官形成のメカニズム解明のためのポイント

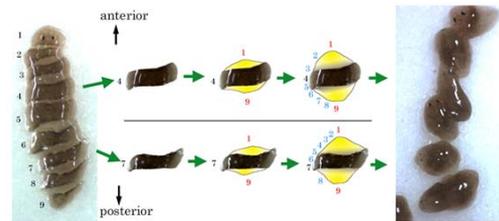
プラナリアの再生過程における時系列にそった遺伝子発現解析と、X 線照射によって幹細胞を除去した実験の組み合わせから、①幹細胞システムを制御するプライマリーな分子システムは〈分化した細胞が提供する位置情報システム〉であること、②位置情報をつくる分子システムも再生の時系列にそって変化し、それに反応する幹細胞も刻々と位置情報への反応性を変化させていること、③幹細胞がある程度コミットメントを受けると今度は位置情報を提供する側に変化しうることを見出した。これらの結果は、位置情報システムの理解だけでも、また幹細胞の研究だけでも、器官形成の謎に迫るには不十分でありことを示唆している。すなわち、〈位置情報をつくる分子システムのダイナミズム〉と〈幹細胞システムのダイナミズム〉の両方の解析と、さらに〈それら 2 つのダイナミズ

ムをマッチングさせる細胞・分子システム〉の理解の 3 点を同時平行的に研究しなくては器官形成のメカニズムの解明に至らないと結論された。

そこで、本研究では、上の 3 点のそれぞれについて研究を展開した。

(2) 位置情報をつくる分子システムの解明

位置情報は、1. 両端を作り(ディスタリゼーションと呼ばれる)、2. 次ぎにインターカレーションによって間をつくる、という普遍的な仕組みによって形成される。プラナリアの再生過程では、頭部再生芽が頭側の端となり、尾部再生芽が尾側の端となり、その間でのせめぎ合い(インターカレーション)によって体の位置情報が再編成され、全能性幹細胞が新たな位置情報に応じた細胞に分化することで、どの断片からも 1 個体が再生する。



① プラナリアの前後軸に沿った位置情報形成機構の解明(I) -頭側シグナルと尾側シグナルの同定

HiCEP 法によって、頭側で特異的に活性化される FGF 受容体と高い相同性をもつ新たな nou-darake ファミリー遺伝子が同定されるとともに、再生初期に MAP キナーゼの脱リン酸化酵素(mkp:MAP kinase phosphatase)遺伝子が活性化されることを見出した。これらの結果から、再生初期に MAP キナーゼが活性化され、かつ頭部形成に重要な機能を果たしていることが示唆された。実際、種々の阻害剤や RNAi を使った解析によって、頭側を作るシグナル分子は MAP キナーゼと結論された。また、尾側を作るシグナルが Wnt によって活性化される b-catenin であることが他のグループによって解読された。

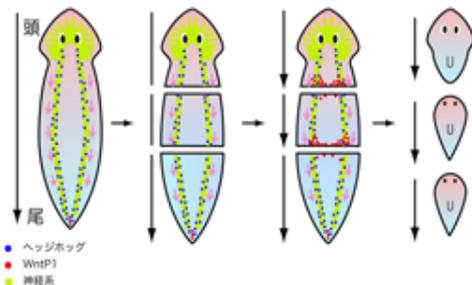
② プラナリアの前後軸に沿った位置情報形成機構の解明(II)-インターカレーションの分子メカニズムの解明

頭側を作るシグナルが MAP キナーゼであり、尾側を作るシグナルが b-catenin であることが解読されたことで、この 2 つのシグナルがどのように協調して(せめぎ合って)前後軸にそった位置情報を作るかの解読を行った。

HiCEP 法と EST 解析によって新規に同定された 3 つの nou-darakee like 遺伝子 (ndl-1, -2, -3: と命名) が体の前後軸にそって異なる領域で発現しており、前後軸にそった位置情報を作るのに重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで、RNAi と阻害剤を組み合わせた解析をすることによって、nou-darakee ファミリー遺伝子が、頭側からの MAP キナーゼのシグナル強度を制御するのみならず、尾側からくる b-catenin シグナルとのクロストークにも関与して、頭部・前咽頭部・咽頭部といった前後軸そった体の領域が作られることが明らかにされた。

③ プラナリアの前後軸に沿った位置情報形成機構の解明 (III) - 頭側と尾側の極性を作るメカニズムの解明

頭側の再生芽で MAP キナーゼが、尾側の再生芽で b-catenin シグナルが活性化されるメカニズムが RNAi で頭から尾が再生してくる遺伝子 DjPatched (hh の受容体) の同定によって解明された。プラナリアでは前後にそった神経で hh がつくられており、神経の中を hh が一方向に流れていると仮定すると、体を切断されると、神経後方切断点より hh が漏れることで、Wnt の発現誘導がかかり、後方再生芽で b-catenin シグナルが活性化されることが理解された。体の極性を決めている分子メカニズムの解明に初めて成功した。



(3) 幹細胞システムのダイナミズムの解析

① FACS を用いた幹細胞の精製と 2 種類の幹細胞の同定

プラナリアで X 線に感受性の高い細胞を FACS で精製する方法を開発し、プラナリアには 2 種類の幹細胞がいることを明らかにした。それぞれの幹細胞に特異的なマーカー遺伝子を HiCEP 法で探索したところ、核内タンパク質をコードする #01 遺伝子を発現している間充織の周辺部に分布している幹細胞 (TypeI) と、幹細胞特異的な RNA 結合タンパク質 PIWI を発現して、間充織の深部に分布している幹細胞 (TypeII) に分けられることに成功した。

② 幹細胞ダイナミクスの解明

TypeII の幹細胞が従来 neoblast (新生細胞) 言われていた細胞と一致し、高い増殖性を保持しながら種々の分化細胞を提供していること、一方、TypeI の幹細胞は本研究で初めて明らかにされた休止期の幹細胞であることが判明した。さらに、TypeI と II の幹細胞は両方向の可塑性をもっており、p53 遺伝子はその切り換えを監視しており、TypeI の状態で幹細胞のクオリティ・チェックをしていることが示唆された。これらの事実から、われわれは、〈細胞ドッグ〉という概念を提唱した。すなわち、プラナリアでは、幹細胞のクオリティ・チェックを行う場所を提供することによって、恒常的に健康な幹細胞の維持管理を実現させ、幹細胞の無限増殖を可能にしていると考えられた。

(4) 幹細胞ダイナミズムと位置情報との関係

① 再生芽形成時にあける幹細胞ダイナミズム

再生初期段階に MAP キナーゼの脱リン酸化遺伝子 (Djmkp) が活性化されることが判明したことによって、切断後のシグナルの入り方と幹細胞の挙動が明らかとなった。すなわち、切断された刺激は、切断面近くの分化細胞で MAP キナーゼの一種である JNK シグナルが活性化され、その範囲にいる TypeII 幹細胞で MAP キナーゼが活性化され、活性化された幹細胞は piwi の転写を停止して再生芽を形成する。

② 尾部再生芽の形成と維持

再生芽形成の初期段階で、頭部再生芽も尾部再生芽も同じように MAP キナーゼの活性化によって形成される。が、尾部では、前述したように hh が神経末端から放出され、hh シグナルを受けた一部の分化細胞で WntP1 遺伝子が活性化される、この WntP1 が後方にできた再生芽に参画した幹細胞で WntP1 や Wnt11 遺伝子を活性化させ、尾部再生芽では Wnt シグナルのポジティブ・サーキットが形成される。その結果、断片後方部では b-catenin シグナルが広い範囲で活性化されるとともに、MAP キナーゼ・シグナルは抑制される。

さらに、この尾部再生芽の成長にともない再生芽の細胞から WntP1 陽性の分化細胞がつけられること、その時に LimHomeobox 遺伝子の転写活性が不可欠であることを見出した。LimHomeobox 遺伝子を欠損すると、尾部構造を維持できなくなることから、尾部側のアイデンティティを維持するためには、恒常的に幹細胞から位置情報を提供する分化細胞を作る機構が必要であることが判明した。

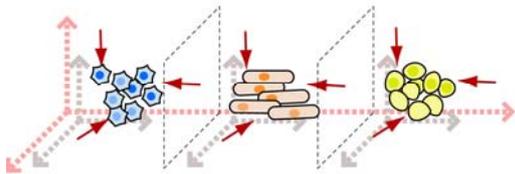
③頭部再生芽の形成

一方、頭部再生芽では、Patched が Wnt シグナルの活性化を抑制したままの状態であるために、頭部再生芽では幹細胞・分化細胞が協調しながら、ともに MAP キナーゼ・シグナルのポジティブ・サーキットを形成し、頭部を形成していくとともに、後方からくる b-catenin シグナルと相互作用することで、インターカレーションを引き起こすと理解された。

④脳原基の形成と脳原基内での位置情報形成

頭部では、nou-darake が MAP キナーゼ活性をある閾値以上の強度を保持することによって、再生芽に参画した幹細胞から脳の原基を形成するよう制御していると考えられた。また、脳の原基の後方で WntA が活性化されることによって、脳原基内にも前後軸に沿った位置情報がつくられることが明かとなり、体全体の極性に応じて、各臓器の原基にも座標がつくられることが判明した。これが、各臓器が体全体とコーディネートした形を持つ要因と考えられた。すなわち、幹細胞がすでに脳の細胞としてのコミットメントを受けた状態で b-catenin のシグナルを受けると脳の後方の神経細胞に分化するように制御されていることが示唆された。

このように、全能性幹細胞から臓器を再生するまでには、いくつもの段階的なコミットメントがあり、各段階に応じたシグナルシステムが稼働するとともに、それらのシグナルを維持する仕込みも臓器再生には不可欠であることが明かとなった。位置情報シグナルを維持するためには、幹細胞自身も位置情報を作る分化細胞になることが必要であり、このあたりに器官形成の複雑さがあり、今まで全くの手つかず状態であった理由がプラナリアを使って初めて明らかにされた。



【解説】プラナリアでは、前後軸の極性にもとづいて座標を形成しており、nou-darake がシグナル強度を一定に区切ることによって(灰色点線)体の領域を規定し、各領域に必要な臓器の原基が形成される。また、各原基ごとに Wnt の発現などによって臓器の座標が作られて、形のある臓器が再生される。

(5) マウス ES 細胞への応用

プラナリアの再生研究は、幹細胞だけから臓器を作ろうとしているところに落とし穴があることを示唆した。すなわち、分化した細胞から提供される種々のシグナルが初期段階で不可欠であること、またシグナルを維持するためにも、幹細胞が場を作るための細胞に分化できる環境を作る必要があることを示唆している。これらの観点を組み入れてマウス ES 細胞からの脳形成を試みた。

① マウスのシステムとプラナリアのシステムの共通性

プラナリアの再生研究が、意外とマウスの ES 細胞を用いた臓器再生研究に通じることが次々と明かとなった。まずは、マウス nou-darake ホモログ遺伝子のノックアウトマウスを作成したところ、マウスでも MAP キナーゼ活性が後方に漏れることによって、脳領域の後方拡大がプラナリアと同様にみられるという予備的な結果が得られた。すなわち、nou-darake 遺伝子は、MAP キナーゼ活性を一定以上に保つことによって、その発現範囲に頭部、すなわち脳を作るようにしている普遍的な仕組みであることが示唆された。

また、オースチン・スミスらによって、MAP キナーゼ活性と GSK3 活性を抑えれば、ES 細胞の維持増殖が可能であるという報告は、プラナリアでの全能性幹細胞のコミットメントに MAP キナーゼ活性、それに続く MAP キナーゼ活性と b-catenin シグナル強度で分化運命の決定がなされることとの共通性がみとれた。

② プラナリアのアイデアを組み込んだマウス ES 細胞から脳を作る試み

マウス ES 細胞から脳を作るためには、マウス ES 細胞にどのようにして周囲からの位置情報を付加し、さらに位置情報を維持するための環境を提供するかを工夫しなくてはならない。そこで、われわれは、発生初期のニワトリ胚の発生の場を借りて、それらの環境を提供することを試みた。すなわち、マウス ES 細胞のシートを胚盤葉期のニワトリ胚の将来の脳原基になる場所に移植した。すると、われわれの期待通りに、ニワトリ胚の環境下で、周囲のニワトリ胚から位置情報が不可されるとともに、ダイナミックに変化する維持機構も稼働して、ニワトリ胚の中でマウス脳が器官形成されることを見出した。マウスにおいても器官形成にはプラナリア同様に幹細胞と位置情報のダイナミズムのマッチングの重要性を示すことに成功した意義は大きく、今後はマッチング・メカニズムの解明を行い、脳を作ることを目指す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 56 件)

1. Different requirements for post-transcriptional regulators and translational initiation factors during planarian regeneration and stem cell maintenance. L. Rouhana, N. Shibata and K. Agata, *Dev. Biol.* 341, 429-443(2010) 査読有
2. Analysis of motor function modulated by cholinergic neurins in planarian *Dugesia japonica*. K. Nishimura, Y. Kitamura, T. Taniguchi and K. Agata, *Neuroscience*, 168, 18-30(2010) 査読有
3. Single-cell gene profiling of planarian stem cells using fluorescent activated cell sorting and its "index sorting" function for stem cell research. T. Hayashi, N. Shibata, R. Okumura, T. Kudome, O. Nishimura, H. Tarui and K. Agata, *Dev. Growth Differ.* 52, 131-144(2010) 査読有
4. Cellular and molecular dissection of pluripotent adult somatic stem cells in planarians. N. Shibata, L. Rouhana and K. Agata, *Dev. Growth Differ.* 52, 27-41(2010) 査読有
5. Planarian Hedgehog/Patched establishes anterior-posterior polarity by regulating Wnt signaling. S. Yazawa, Y. Umesono, T. Hayashi, H. Tarui, and K. Agata, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 22329-22334(2009) 査読有
6. Planarians maintain a constant ratio of different cell types during changes in body size by using the stem cell system. H. Takeda, K. Nishimura and K. Agata, *Zool. Sci.* 26, 805-813(2009) 査読有
7. Identification of a novel planarian G-protein-coupled receptor that responds to serotonin in *Xenopus laevis* oocytes. K. Nishimura, K. Unemura, J. Tsushima, Y. Yamauchi, J. Otomo, T. Taniguchi, S. Kaneko, K. Agata, and Y. Kitamura, *Biol. Pharm. Bull.* 32, 1672-1677(2009) 査読有
8. Evolution and regeneration of the planarian central nervous system. Y. Umesono and K. Agata, *Dev. Growth Differ.* 51, 185-195(2009) 査読有
9. Characterization of tyramine β -hydroxylase in planarian *Dugesia japonica*. Cloning and expression. K. Nishimura, Y. Kitamura, T. Inoue, Y. Umesono, K. Yoshimoto, T. Taniguchi and K. Agata, *Neurochem. Inter.* 53, 184-192(2008) 査読有
10. Identification of glutamic acid decarboxylase gene and distribution of GABAergic nervous system in the planarian *Dugesia japonica*. K. Nishimura, Y. Kitamura, Y. Umesono, K. Takeuchi, K. Takata, T. Taniguchi and K. Agata, *Neuroscience*, 153, 1103-1114(2008) 査読有
11. Expression and functional analysis of *musashi*-like genes in planarian CNS regeneration. S. Higuchi, T. Hayashi, H. Tarui, O. Nishimura, K. Nishimura, N. Shibata, H. Sakamoto and K. Agata, *Mech. Dev.* 25, 631-645(2008) 査読有
12. Brain regeneration from pluripotent stem cells in planarian. K. Agata and Y. Umesono, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 363, 2071-2078 (2008) 査読有
13. Identification of glutamic acid decarboxylase gene and distribution of GABAergic nervous system in the planarian *Dugesia japonica*. K. Nishimura, Y. Kitamura, Y. Umesono, K. Takeuchi, K. Takata, T. Taniguchi and K. Agata, *Neurosci.* 153, 1103-1114(2008) 査読有
14. Characterization and categorization of FACS-sorted planarian stem cells by ultrastructural analysis. S. Higuchi, T. Hayashi, I. Hori, N. Shibata, H. Sakamoto and K. Agata, *Dev. Growth Differ.*, 49, 571-581 (2007) 査読有
15. *Wnt* signaling is required for antero-posterior patterning of the planarian brain. C. Kobayashi, K. Ogawa and K. Agata, *Dev. Biol.*, 306, 714-724 (2007) 査読有
16. Clathrin-mediated endocytic signal is required for the regeneration as well as homeostasis of planarian CNS. T. Inoue, T. Hayashi, K. Takeuchi and K. Agata, *Development* 134, 1679-1689 (2007) 査読有
17. Reconstruction of dopaminergic neural network and locomotion function in planarian regenerates. K. Nishimura, Y. Kitamura, T. Inoue, Y. Umesono, S. Sano, K. Yoshimoto, M. Inden, K. Takata, T. Taniguchi, S. Shimohama and K. Agata, *Dev. Neurobiol.* 67, 1059-1078 (2007) 査読有
18. Regeneration-dependent conditional gene knockdown (Readyknock) in planarian: Demonstration of requirement for *Djsnap-25* expression in the brain for negative phototactic behavior. T. Takano, J. Pulvers, T. Inoue, H. Tarui, H. Sakamoto, K. Agata and Y. Umesono, *Dev. Growth Differ.*, 49, 383-394 (2007) 査読有
19. Unifying principles of regeneration I: epimorphosis versus morphallaxis. K. Agata, Y. Saito and E. Nakajima, *Dev. Growth Differ.* 49, 73-78 (2007) 査読有
20. Two different evolutionary origins of stem cell systems and their molecular basis. K. Agata, E. Nakajima, N. Funayama, N. Shibata, Y. Saito and Y. Umesono, *Semin. Cell Dev. Biol.*, 17, 503-509 (2006) 査読有
21. Structure and function of primitive immunoglobulin superfamily neural cell adhesion molecules: a lesson from studies on planarian. E. Fusaoka, T. Inoue, K. Mineta, K. Agata and K. Takeuchi, *Genes to Cells* 11, 541-555 (2006)

査読有

22. Isolation of planarian X-ray-sensitive stem cells by fluorescence-activated cell sorting
T. Hayashi, M. Asami, S. Higuchi, N. Shibata and K. Agata, *Dev. Growth Differ.* 48, 371-379 (2006) 査読有

23. Neural projections in planarian brain revealed by fluorescent dye tracing. K. Okamoto, K. Takeuchi and K. Agata, *Zool. Sci.* 22, 535-546 (2005) 査読有

〔学会発表〕 (計 40 件)

1. K. Agata, Regeneration in planarian, Frontiers in Stem Cells and Regeneration Advanced Training Course, 2009/10/7 Woods Hole, USA.

2. K. Agata, Brain regeneration from pluripotent stem cells in planarian German Dev. Biol. Meeting, 2009/3/28 Hannover Germany

3. K. Agata, Maintenance and regulation of planarian pluripotent stem cells, 23th Naito Conference, 2008/11/12 Shonan Village Center, Kanagawa Japan

4. K. Agata, Brain regeneration from pluripotent stem cells in planarian, Biology Seminar, 2007/10/31 UC Berkeley USA

〔図書〕 (計 8 件)

1. Planaria: A Model for Drug Action and Abuse (Brain and neural networks)
K. Nishimura, H. Yamamoto, Y. Kitamura and K. Agata LANDES BIOSCIENCE, 12page(2008)

2. Stem Cells: From Hydra To Man (Stem cells in planarian.) K. Agata, Springer, pp59-74 (2008)

3. Planarian nervous system
H. Takeda, K. Nishimura and K. Agata
Scholarpedia, 3(6):5558 (2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿形 清和 (AGATA KIYOKAZU)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号 : 70167831