

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：55301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06677

研究課題名(和文)ギャップ結合による多能性幹細胞の長期間維持機構の解明

研究課題名(英文) Long term maintenance of pluripotent stem cells by GAP junction in planarian

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・教授

研究者番号：60402781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：プラナリアは全身に広く分布する全能性幹細胞である新生細胞を維持し、適切に分化制御することで、高い再生能力を発揮する。本研究では生体内における全能性幹細胞の維持機構を明らかにすることを目的とした。プラナリアのMTA相同遺伝子である、MTA-A、MTA-B遺伝子の機能阻害個体で見られる新生細胞の局在変化と、その結果、再生不全が起こる。ギャップ結合に使われるイネキシン遺伝子であるinx-B遺伝子を同時機能阻害すると、MTA-Aの表現形のみ回復された。これらの結果から、新生細胞の維持にはMTAとinx-Bが関与する機構と、これとは別にMTA-Bが関与する機構の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトでは不可能な、生体内で長期にわたって分化全能性幹細胞を維持しているプラナリアから、その機構を学ぶことを本研究の目的とした。その結果、プラナリアはMTA遺伝子の発現を制御することで、幹細胞の接着性を変化させ、その結果、幹細胞の維持を行っている可能性を示唆できた。in vitroにおいても長期間の維持の困難な全能性幹細胞を、良い状態で維持できる内在的な仕組みの一端を示すことができた本研究は、基礎的な再生研究に対して学術的な意義があり、さらに今後の再生医療の発展に寄与できる社会的意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：Although planarians maintain pluripotent stem cells named neoblasts widely distributed throughout mesenchymal space, the molecular mechanism for the neoblast maintenance is still unknown. In this study, I aimed to reveal the mechanism for the neoblast maintenance. Dysfunction of planarian MTA homolog genes, MTA-A and MTA-B, by RNAi caused alternation of distribution pattern of neoblasts and regenerative defect simultaneously. This suggests that distribution pattern seemed in MTA knockdown planarians might be involved in maintenance of neoblasts. Double knockdown of MTA-A and a planarian innexin gene, inx-B, that is used in GAP junction could rescue the phenotype observed in MTA-A single knockdown planarians. In contrast to this, simultaneous knockdown of MTA-B and inx-B could not affect phenotype of MTA-B single knockdown planarians, suggesting that there are two mechanisms for neoblast maintenance using different MTA genes in planarians.

研究分野：発生生物学

キーワード：全能性幹細胞 MTA 再生 プラナリア

## 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の生体は幹細胞から分化細胞を供給されることにより維持されている。脊椎動物の成体ではニッチと呼ばれる細胞外微小環境によって組織幹細胞が維持されている。哺乳類の場合、組織幹細胞は限られた種類の分化細胞を供給する。しかしながら、組織幹細胞の発生過程をたどると、胚盤胞期に一過的に現れる内部細胞塊と呼ばれる分化多能性(pluripotency)の細胞集団に由来から派生していることがわかる。すなわち、哺乳類には内部細胞塊を成体までの長期間にわたって維持する仕組みがないことを示している。従って、内部細胞塊に由来するES細胞の維持には複数の液性因子を添加する必要がある。しかしながらES細胞集団内の個々の細胞の遺伝子発現を観察すると、多能性の維持に重要な*nanog*遺伝子の発現ですら、ゆらぎがあることが確認されており、強固な多能性維持にはニッチとの接触が重要であることが強く示唆される。

無脊椎動物では成体になってもES細胞と同様の分化多能性(pluripotency)を腫瘍化させることなく維持し、必要に応じて自由自在に分化細胞を供給できる種が多く存在している。そのひとつが、扁形動物門三岐腸類に属する非寄生性の淡水産プラナリアである。ナミウズムシ(*Dugesia japonica*)は湖沼・河川に広く分布する淡水産プラナリアの一種である(図1)。体長は約1 cm程度であるが、頭部には眼や脳が存在し、体全体には三つに枝分かれした発達した腸が広がり、中央に咽頭が位置する組織化された体制を持っている。このプラナリアの特徴として、個体が成長すると体の中央付近で自らくびり切れ、各断片が完全な個体へと再生することで増殖する、自切と呼ばれる無性生殖を行うことが挙げられる。この個体再生は人為的に切断することでも容易に再現できることから再生のモデル生物として古くから着目されてきた。1991年に確立されたナミウズムシのクローン系統であるGI系統は、今日まで無性生殖だけで維持されている。この旺盛な再生能力は、個体の全身に存在している、新生細胞と呼ばれる分化多能性の成体幹細胞によって支えられている。GI系統の新生細胞は、個体再生過程のみならず成長や恒常性においても、長期間に渡り分化細胞を供給し続けている。新生細胞の分化に関するメカニズムは多く報告されているが、新生細胞、それ自身と、その多能性を維持するメカニズムに関する知見はほとんどないのが現状である。我々は、ヒストン脱アセチル化複合体の構成タンパク質であり、ガンの転移に関与することが知られている*MTA*遺伝子のプラナリア相同遺伝子の解析から、ギャップ結合によって新生細胞外のニッチと結合している可能性、さらに新生細胞同士が結合し未分化因子を共有することで新生細胞自身も幹細胞性や分化多能性を維持するニッチとして働きうる可能性を見出した。そこで本研究では哺乳類などのモデル生物を使用することではアプローチできない、分化多能性(pluripotency)を成体内で長期間にわたって維持する分子メカニズムについて検討することを主眼とした。

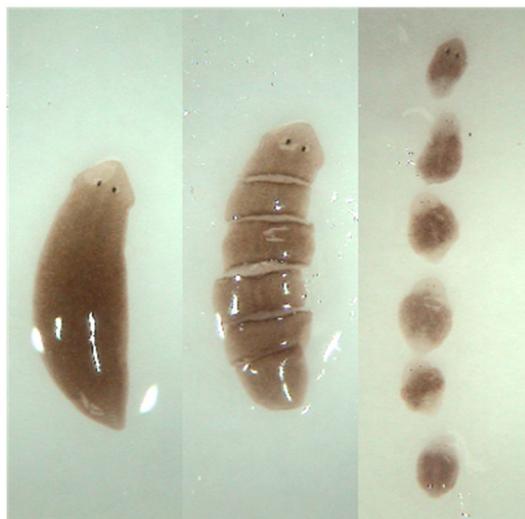


図1 ナミウズムシの再生。

左から切断前、切断直後、再生1週間のナミウズムシを示す。

## 2. 研究の目的

本研究ではプラナリアの新生細胞を長期間維持している分子メカニズムをギャップ結合による細胞接着に着目して外部因子、内部因子の両方向から明らかにすることを目的とした。先行研究によって、2つのプラナリア*MTA*遺伝子(*MTA-A*および*MTA-B*)機能障害個体ではどちらも無脊椎動物のギャップ結合に使われるイネキシン(*inx-B*)の発現が上昇すること、さらに新生細胞が個体内の特定の領域だけに局在するように変化することが示された(図2上)(Sato et al., 2022)。この時、新生細胞同士は枝状に連結しているように観察された(図2下)。このような個体では新生細胞が存在しているにも関わらず再生能力が著しく低下した。これらの結果から、*MTA*機能障害個体では未知のニッチから新生細胞が離脱できず、さらにギャップ結合が増強されることによって新生細胞間で多能性を維持する細胞内因子が共有されることで、細胞分化が抑制された結果、分化細胞が供給されずに再生不全を起こしたと考えられた。そこで具体的な研究

目的として、新生細胞以外でギャップ結合を形成しうる *inx-B* 発現細胞をニッチと仮定し、その細胞種の同定と機能解析、さらに新生細胞同士のギャップ結合を介して共有される多能性因子の同定を目指した。

### 3. 研究の方法

上記の目的のため、当初の予定では、(1) RNA 干渉法 (RNAi) による *inx-B* の機能阻害、さらに *MTA* 機能阻害個体における表現系が *inx-B* の機能阻害によってレスキューされるかを検討することで、新生細胞維持におけるギャップ結合の役割を明らかにする、(2) ギャップ結合を形成するイネキシンはホモフィリックに結合するため、*inx-B* の *in situ* ハイブリダイゼーションとシングルセル RNA-seq 発現解析から *inx-B* を発現する分化細胞を同定し、特異的遺伝子機能阻害等から実際にニッチとして働く細胞を明らかにする、(3) ギャップ結合を介して新生細胞間を移動しうる多能性因子の同定、に焦点を絞って解析する予定であった。

方法としては、(1) に関しては RNAi による *inx-B* 機能阻害個体、*MTA* と *inx-B* の 2 重機能阻害個体の新生細胞維持に関しては、プラナリア個体内での新生細胞の局在、個体再生能力の有無 (*MTA-A* および *MTA-B* 機能阻害個体の回復など) から評価する。(2) に関しては X 線照射個体において *inx-B* の発現解析を行い、無照射個体と比較することで分化細胞での *inx-B* の発現の有無を確認する。分化細胞で発現が確認された場合、シングルセル RNA-seq、*in situ* ハイブリダイゼーションや免疫染色などから発現細胞を同定する。シングルセル RNA-seq で得られた発現カタログから候補細胞の分化や機能に關与すると思われる遺伝子の RNAi による機能阻害を行い、新生細胞のニッチとして働きうるかを検証する。(3) に関しては *MTA* 機能阻害個体と *inx-B* 機能阻害個体から精製した新生細胞の RNA-seq 解析とプロテオミクス解析を行い、ギャップ結合を介して新生細胞で共有される分子の同定を目指す。

実際には、新型コロナによる研究活動の停止などで、現在までに (1) および、(2) の一部を実行できた。

### 4. 研究成果

まず、先行研究における *MTA-A* および *MTA-B* 遺伝子機能阻害個体における再生不全の再現性の確認と、*inx-B* の機能阻害個体における表現系をそれぞれ単独の RNAi によって確認した。*MTA-A* および *MTA-B* 遺伝子を単独で RNAi したのうち頭部、胴部、尾部の 3 断片に切断し 1 週間後の再生を確認した。その結果、先行研究と同様に *MTA-A* および *MTA-B* 遺伝子 RNAi 個体では、ほとんどの個体が完全に再生しないか、不完全な再生を示した (表 1)。一方、*inx-B* 単独 RNAi 個体では再生に関しては正常に起こり、表現系は認

### コントロール MTA機能阻害

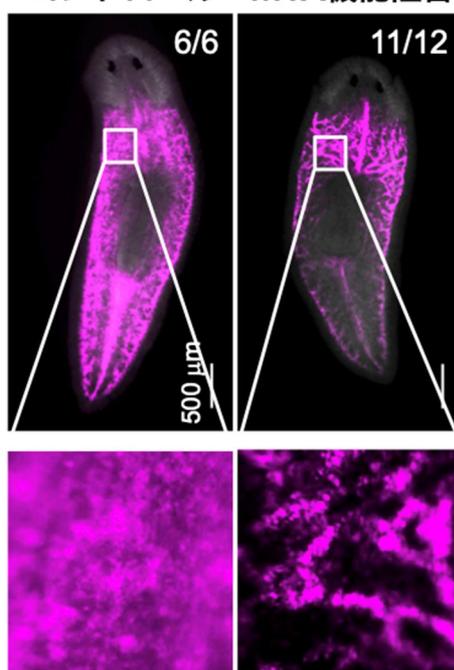


図 2 MTA 機能阻害個体における新生細胞の局在。  
左がコントロール個体で、右が MTA 機能阻害個体。機能阻害個体で新生細胞の局在の変化が見られる。

	EGFP (RNAi)		
	再生(○)、	不完全再生 (△)	再生なし (×)
頭部断片	7/7	-	-
胴部断片	7/7	-	-
尾部断片	7/7	-	-
<i>MTA-A</i> (RNAi)			
頭部断片	-	3/12	9/12
胴部断片	3/12	4/12	5/12
尾部断片	4/12	1/12	7/12
<i>MTA-B</i> (RNAi)			
頭部断片	-	3/7	4/7
胴部断片	-	1/7	6/7
尾部断片	-	2/7	5/7
<i>inx-B</i> (RNAi)			
頭部断片	13/13	-	-
胴部断片	13/13	-	-
尾部断片	13/13	-	-
<i>MTA-A, inx-B</i> (RNAi)			
頭部断片	6/8	2/8	-
胴部断片	6/8	1/8	1/8
尾部断片	8/8	-	-
<i>MTA-B, inx-B</i> (RNAi)			
頭部断片	4/6	2/6	-
胴部断片	-	-	6/6
尾部断片	-	-	6/6

表 1 RNAi による再生能への影響

められなかった(表1)。長期間飼育しても変化はなかった。

次に *MTA-A* および *MTA-B* 遺伝子の単独機能阻害個体でみられる再生不全に *inx-B* が関係しているかどうかを *MTA-A/inx-B* および、*MTA-B/inx-B* の二重 RNAi によって確認した。その結果、*MTA-A/inx-B* の二重機能阻害個体では *MTA-A* 単独機能阻害個体で観察された再生不全がレスキューされ、ほとんどの断片で正常な再生が観察された。一方、*MTA-A/inx-B* の二重機能阻害では、*inx-B* 単独 RNAi 個体と同様に胸部断片、尾部断片のほとんどが再生不全を示した。

	<i>EGFP</i> (RNAi)	
	均一な局在	枝状の局在
頭部断片	4/4	-
胸部断片	4/4	-
尾部断片	4/4	-
	<i>MTA-A</i> (RNAi)	
頭部断片	3/10	7/10
胸部断片	6/12	6/12
尾部断片	3/9	6/9
	<i>MTA-B</i> (RNAi)	
頭部断片	2/7	5/7
胸部断片	2/6	4/6
尾部断片	3/7	4/7
	<i>inx-B</i> (RNAi)	
頭部断片	12/12	-
胸部断片	11/11	-
尾部断片	10/10	-
	<i>MTA-A, inx-B</i> (RNAi)	
頭部断片	7/7	-
胸部断片	6/7	1/7
尾部断片	3/3	-
	<i>MTA-B, inx-B</i> (RNAi)	
頭部断片	6/6	-
胸部断片	-	5/5
尾部断片	-	4/4

表2 RNAiによる新生細胞の局在への影響

次にこれらの機能阻害個体における新生細胞の局在を、新生細胞得意的タンパク質である DjPiwi-A の抗体を用いた免疫染色によって確認した。コントロール個体 (*EGFP* RNAi 個体) では新生細胞は全身の間充織に広く、ほぼ均一に存在している(図2)。先行研究と一致して、*MTA-A* および *MTA-B* 遺伝子の単独機能阻害個体では、新生細胞が枝状に連なり、間充織の限定された領域に局在していた(図2)。*inx-B* の RNAi 個体では、コントロール個体と同様の、全身での分布がみられた(表2)。*inx-B* との二重機能阻害によって、再生不全がレスキューされた *MTA-A* 機能阻害個体 (*MTA-A/inx-B* RNAi) では新生細胞の枝状の局在が見られず、コントロール個体と同様に全身に広く分布していた。これに対し、*MTA-B/inx-B* の二重 RNAi 個体では、*MTA-B* 単独機能阻害個体と同様に、新生細胞が枝状に連なり、間充織の限定された領域に局在していた。これらの結果から、*MTA-A* 遺伝子の機能阻害個体で見られる枝状の新生細胞の局在変化は *inx-B* の発現上昇によって起きている可能性を示唆している。また、*MTA-B* の機能阻害で見られる枝状の新生細胞の局在変化は *inx-B* RNAi でレスキューできなかったことから、別の細胞接着分子によって制御されている可能性が示唆された。しかしながら、新生細胞の分布が枝状に局在パターンを変化すると幹細胞性が強制され、分化能が抑制されることは共通しており、プラナリアにはギャップ結合を介した幹細胞の維持機構が存在していることを強く示唆できた。今回の解析では、分化細胞での *inx-B* の発現は確認できなかったが、新生細胞同士が、細胞分化を抑制する分子を共有して、その維持を行なっている可能性を強く示唆することができた。

プラナリアの幹細胞研究は多く報告されており、特に近年のシングルセルレベルの網羅的遺伝子発現解析から、新生細胞の不均一性や、特定の分化細胞への分化制御などが明らかとなりつつある。しかしながら、どのような機構によって、一定の集団が多能性を持った状態で長期間維持されているかについては、いまだにほとんど報告はなく、本研究が、その解決の糸口になることが期待される。

< 引用文献 >

Migratory regulation by MTA homologous genes is essential for the uniform distribution of planarian adult pluripotent stem cells. Yuki Sato, Norito Shibata, Chikara Hashimoto, Kiyokazu Agata. Dev. Growth Differ. 2022.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Lee Hayoung, Hikasa Kanon, Umesono Yoshihiko, Hayashi Tetsutaro, Agata Kiyokazu, Shibata Norito	4. 巻 149
2. 論文標題 Loss of <i>plac8</i> expression rapidly leads pluripotent stem cells to enter active state during planarian regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.199449	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 Sato Yuki, Shibata Norito, Hashimoto Chikara, Agata Kiyokazu	4. 巻 64
2. 論文標題 Migratory regulation by <i>MTA</i> homologous genes is essential for the uniform distribution of planarian adult pluripotent stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 150-162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12773	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 Kashima Makoto, Agata Kiyokazu, Shibata Norito	4. 巻 62
2. 論文標題 What is the role of PIWI family proteins in adult pluripotent stem cells? Insights from asexually reproducing animals, planarians	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 407 ~ 422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12688	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------