

分子マーカーを用いたプラナリア間充織スペースの解剖と機能解析

京都大学大学院 理学研究科 生物科学専攻 寺元万智子

プラナリアは非常に強い再生能力を持つ生物である。この再生能力は、間充織スペースに分布する多能性幹細胞(新生細胞)に依存する。新生細胞は X 線照射によって特異的に消失する X 線感受性細胞である。近年、新生細胞とは異なる小型の新たな X 線感受性細胞が発見され、プラナリアには 2 種類の X 線感受性細胞が存在することが明かとなった。プラナリアの新生細胞と同定されていた多能性幹細胞を<Type 2 の X 線感受性細胞>、新規に同定された小型の X 線感受性細胞は<Type 1 の X 線感受性細胞>と命名され、Type 1 細胞と Type 2 細胞は間充織スペースの異なる領域に分布することが示唆されていた。また、近年になり、新生細胞は ERK シグナルが活性化されることで、未分化状態から脱し、分化状態へと移行することが報告された。このように、プラナリアの再生研究において幹細胞自体については形態的および分子的によく研究されているが、幹細胞を取り巻く環境、すなわち幹細胞が分布する間充織スペースについては、ほとんど研究が行われてこなかった。そこで、本研究では、幹細胞が分布する間充織スペースに焦点を当て、間充織スペースを構成する細胞群を明らかにすることで、プラナリアの幹細胞をその細胞環境も含めてシステムとして理解する試みを行った。

輪切り切片を用いた二重染色によって、Type 1 細胞は(頭から尾まで全体に分布)、筋肉

層直下の間充織スペースに Type 2 細胞(咽頭前領域から尾まで分布)は、Type 1 細胞よりもより内側の間充織スペースに分布して、オーバーラップしない領域に棲み分けるように分布していることを確認した。異なる細胞状態にある 2 種類の X 線感受性細胞が、間充織スペースの異なる領域に分布している事から、間充織スペースが外側と内側の 2 領域に分かれていることが予想された。そこで、本研究では、間充織スペースの外側と内側を区別するような分化細胞のマーカー遺伝子を半網羅的に探索した。その結果、外側に分布する 3 種類の間充織分化細胞と、内側に分布する 2 種類の間充織分化細胞を、分子マーカーを用いて同定することに成功し、プラナリアの間充織スペースは少なくとも 2 つの領域(Outer Region: OR と Inner Region: IR)に分けられ、異なる X 線感受性細胞と分化細胞によって構成されていることを明らかにすることに成功した。

次に、間充織スペースの 2 つの異なる領域(OR と IR)がプラナリアの幹細胞システムで果たしている役割を明らかにするために、OR および IR のそれぞれを構成する分化細胞の機能解析と、Type1 と Type2 の幹細胞の関係、そして幹細胞と分化細胞の関係を明らかにすることを試みた。

OR および IR に分布する細胞で特異的に発現する遺伝子 6 種類について RNA 干渉法でノックダウンしたが、残念ながら明瞭な表現型を得ることはできなかった。しかし、それら 6 種類の遺伝子について構造解析を行ったところ、OR 特異的遺伝子の 1 つは分泌因子をコードしていること、IR 特異的遺伝子の 2 つが細胞外基質をコードしていることが予測さ

れたことから、それらの遺伝子を特異的に発現している分化細胞が、間充織スペースに棲み分けている 2 種の X 線感受細胞に何らかの外部環境を提供している可能性が示唆された。

また、切片 in situ hybridization で詳細に *gypsy-PI* 発現細胞の分布を解析することで、*gypsy-PI* 発現細胞が OR に特異的に分布することを見出した。*gypsy-PI* 発現細胞は、*DjpiwiB* を機能阻害した個体において観察され、幹細胞を分化状態に移行させる ERK シグナル依存的に出現する。このことから、*gypsy-PI* 発現細胞は、ERK シグナルが活性化された新生細胞であると考えられている。*gypsy-PI* 発現細胞が OR に特異的に見出されたということは、OR は、筋肉層で作られる Wnt や BMP といった各種のシグナル分子と IR に分布する新生細胞 (Type 2 の X 線感受性細胞) が会う場を提供している可能性が示唆された。

さらに、再生個体の創傷部付近に形成される再生芽を構成する細胞が分化途中の細胞であることに着目し、再生芽形成過程における Type 1 細胞、Type 2 細胞、OR、IR、各種シグナル分子を産生する体壁筋の分布を詳細に観察することで、Type 1 細胞もしくは Type 2 細胞が分化途中の状態へと移行する場合の外部環境がどうなっているのかを観察した。その結果、明瞭な再生芽が形成される切断後 24 時間よりも早い段階である切断後 3-12 時間では、創傷部には OR と IR が存在せず Type 1 細胞と Type 2 細胞のみが分布していることが分かった。このことから、非再生時にはみられない再生特異的現象である再生芽形成過程では、少なくとも、体壁筋や間充織分化細胞の存在しない環境

においては、Type 1 細胞と Type 2 細胞の状態は維持されずに、分化途中の状態へと移行することが分かった。

以上の結果から、今回、IR に分布する新生細胞と、新生細胞の分化運命を決定するモルフォゲンを産生する筋肉層との間に、緩衝領域としての OR の存在を提示することに成功した。すなわち、OR は未分化のまま増殖している新生細胞と、未分化の新生細胞に運命決定するシグナルとを区切る緩衝領域を形成することで、新生細胞の未分化性の保持を保障するとともに、表皮の分化と位置情報に応じた細胞運命決定をする場を提供することでプラナリアの幹細胞システムを支える重要な領域を形成していることを示唆した。