

# プラナリアにおける多能性幹細胞の

## 移動・自己複製・分化の関連性の解析

佐藤 勇輝

ES細胞やiPS細胞といったマウスやヒトの多能性幹細胞が *in vitro* で樹立されたことにより、多能性幹細胞を用いた再生医療に大きな注目が集まっている。しかし、これらの多能性幹細胞を成体に移植すると奇形腫と呼ばれる腫瘍を形成してしまう。このため、マウスやヒトでは成体内で多能性幹細胞を維持・利用することができないと考えられる。扁形動物門に属するプラナリアは高い再生能を持つことで知られ、成体内の間充織全体に *neoblasts* と呼ばれる幹細胞を均一に保持している。X線照射によって *neoblasts* を特異的に消失させると、プラナリアは組織恒常性を維持できず再生もできなくなる。しかし、X線照射した個体に *neoblast* を1細胞移植することで、低い確率ながら全組織の恒常性や再生能を回復させることができる。よって、*neoblasts* には多能性幹細胞が含まれていることが示されている。近年では *single-cell* レベルの解析を行うことで、*neoblasts* は多能性幹細胞だけでなく分化能が限定された幹細胞も含む *heterogeneous* な集団であることが報告されている。「なぜプラナリアは成体内で多能性幹細胞を維持・利用できているのか」という問いに答えることはプラナリア研究の大きな命題である。本研究では、*neoblasts* の移動と自己複製に着目し、これらの現象が分化に与える影響を解析することで、*neoblasts* に含まれる多能性幹細胞が成体内でどのように制御されているかを考察した。

第一章では、*neoblasts* の移動を制御する可能性のある遺伝子として *metastatic tumor antigen (MTA)* ホモログ遺伝子に着目し、*neoblasts* の移動と分化の関係を解析した。プラナリアに存在する2つの *MTA* ホモログ (*MTA-A*, *MTA-B*) をそれぞれ RNAi によって機能阻害すると、これらの機能阻害個体では *neoblasts* が自己複製をして存在しているにも関わらず、*neoblasts* の分化が抑制されていることが示唆された。また興味深いことに、通常 *neoblasts* は間充織全体に均一に存在しているが、*MTA-A* (RNAi)、*MTA-B* (RNAi) 個体では *neoblasts* が樹状クラスターを形成して密集した状態で存在するようになり、さらに *neoblasts* が正常に移動できなくなっていることが示された。以上の結果から、*MTA-A* (RNAi)、*MTA-B* (RNAi) 個体で *neoblasts* が樹状クラスターを形成

した領域は *neoblasts* が未分化状態を保つために接着している幹細胞ニッチを反映しており、*MTA-A* と *MTA-B* は *neoblasts* の移動と幹細胞ニッチからの離脱を制御しているのではないかと考えられた。

第二章では、*MTA-A* (RNAi)、*MTA-B* (RNAi) 個体で観察された樹状領域が幹細胞ニッチである可能性を *MTA* (RNAi) 以外の手法で検証できないか検討した。この結果、①プラナリアに低線量 X 線を照射した際に生き残った少数の *neoblasts* が増殖して全身に再分布する過程で樹状クラスターを形成すること、②プラナリアの胚発生過程で胚直径が 500  $\mu\text{m}$  を超える発生後期から孵化直前の幼若期にかけて *neoblasts* が樹状クラスターを形成していることを見出した。これらの結果は *neoblasts* が樹状クラスターを形成している領域が *neoblasts* の幹細胞ニッチであることを強く示唆する。さらに分子学的な解析を行った結果、幹細胞ニッチ内で樹状クラスターを形成している *neoblasts* はギャップ結合を形成する *innexin-B* を高発現しており、樹状の幹細胞ニッチから離れる際にはイオンチャネル共役型ヌクレオチド受容体 P2X-A を発現している可能性が示唆された。

第三章では、細胞周期停止を導き G0 期へ移行させる機能をもつ *cdc20 homolog 1 (cdh1)* のホモログ遺伝子に着目し、*neoblasts* の自己複製と分化の関係性を解析した。プラナリアのドラフトゲノムでは *p16* や *p21* といった細胞周期を停止させるための CDK inhibitors が見つからず、*cdh1* が細胞周期停止を担う主要な遺伝子であることが示唆される。実際に *cdh1* (RNAi) 個体では *neoblasts* が劇的に増加している様子が観察され、*cdh1* を機能阻害すると *neoblasts* が細胞周期を停止できず自己複製を続けることが示唆された。一方で、*cdh1* (RNAi) 個体では前駆細胞や分化細胞が減少しており、再生過程で分化誘導シグナルである ERK シグナルが活性化されても *neoblasts* が分化できない様子が観察された。よって、細胞周期を動かして自己複製を続けている *neoblasts* は分化誘導シグナルに応答できず未分化状態を保ち、細胞周期の停止によって *neoblasts* が分化誘導シグナルへの応答能を獲得して分化するのではないかと考えられた。

以上の結果を併せて、*neoblasts* はギャップ結合によって樹状の多能性幹細胞ニッチと接着し自己複製を続けることで多能性を維持しており、*MTA-A* と *MTA-B* によって *neoblasts* が幹細胞ニッチの外へ移動し *cdh1* によって細胞周

期停止が導かれることで分化が始まるのではないかと考えられる。本研究では、プラナリアを用いることで成体内に存在する多能性幹細胞ニッチの存在を初めて示唆し、幹細胞ニッチと関連して移動・自己複製・分化がどのように関連することで多能性幹細胞が *in vivo* で維持・利用されているのかを提唱した。