

京都大学	博士 (理学)	氏名	李 河映
論文題目	Molecular mechanism by which <i>Djplac8-A</i> controls proliferation/differentiation of planarian pluripotent stem cells during regeneration (プラナリア再生時の <i>Djplac8-A</i> による成体多能性幹細胞の増殖・分化制御機構の解明)		
(論文内容の要旨)			
<p>プラナリアは成体内に多能性幹細胞である neoblasts を保持することで高い再生能力を持っている。本研究では、プラナリアが切断された時にどのようにして neoblasts の増殖を促進し、新たな分化細胞を生み出して再生を可能にしているのか、その制御メカニズムについて研究を行った。その結果、切断刺激である JNK シグナルが入ると plac8 ホモログ (<i>Djplac8-A</i>) 遺伝子の発現が抑制され、切断面近くの neoblasts の増殖が活性化されることが明らかとなった。また、<i>Djplac8-A</i> 遺伝子のノックダウン個体では、切断後の再生異常を引き起こすだけではなく、食餌後の増殖促進が維持される結果、幹細胞の自己複製が促進され、無性生殖による個体の再生産能が大幅に向上することもわかり、<i>Djplac8-A</i> 遺伝子は幹細胞の増殖のブレーキの役割を担う遺伝子であることが明らかとなった。本研究によって、幹細胞が、個体の栄養状況や損傷状況など、そのおかれた環境を認識して自己増殖と分化を制御しながら、個体の恒常性を維持する仕組みの一端を明らかにした。</p>			
<p>プラナリアは切断しても元通りに再生できる高い再生能力を持つことで知られる。しかし、プラナリアは再生だけではなく、通常においても自切して無性的に個体の再生産を行ったり、絶食が続くとプロポーショナルに縮んでいたり、また、環境の変化によっては有性化して卵と精子による有性生殖で個体の再生産を行ったりする。これらの多くのユニークな性質は、体細胞の 20% 近くを占める成体の多能性幹細胞 (neoblast: ネオブラス) の存在によって支えられている。断片化しても、neoblast が失った細胞や組織や器官を適切な場所に作ることで元通りの体を再生できる。そこで、本研究では、プラナリアに neoblast で特異的に発現する遺伝子に着目して neoblast の増殖と分化の制御に関する研究を行っている。</p>			
<p>具体的には、HiCEP 法というユニークな方法で neoblast 特異的な発現をする遺伝子の一つとして同定された plac8 ホモログ遺伝子 (<i>Djplac8-A</i> と命名される) に着目し、まずは、その機能について RNA 干渉法 (二重鎖 RNA を餌に混ぜてプラナリア体内に取り込ませる) によって遺伝子ノックダウンを行い、どのような表現型が出るかを検証している。形態的な変化は見られなかったものの、通常は 30 日間に平均すると 3 回の自切がなされるところが、RNAi 個体では平均 10 回の自切が見られた。どちらについても、およそ 8-9mm に到達すると自切していることから、<i>Djplac8-A</i> 遺伝子の RNAi 個体では、neoblast の増殖がより活発になっていることが予想された。次に、申請者は <i>Djplac8-A</i> 遺伝子の発現とタンパク質構造について解析している。発現については、確かに X 線感受性で PiwiA タンパク質を発現している neoblast で特異的に発現していること、また、<i>Djplac8-A</i> タンパク質に対する抗体を作製して細胞内分布を調べたところ膜に結合しているタンパク質であることを明らかにしている。</p>			
次に、申請者はなぜ RNAi 個体では自切頻度が大幅に上昇したかについて調べてい			

る。その結果、餌あげ法による RNAi 個体では、餌をあげた後に見られる細胞増殖の促進がさらに促進されるとともに、上がった細胞増殖率が通常なら餌あげ 3 日後には元に戻るのに対し、RNAi 個体では細胞増殖のレベルが通常に戻るのに 7 日間かかることが明らかとなった。RNAi 個体では餌をあげた後の neoblast の高い増殖率が長期にわたって保持されるために細胞数が増加して自切頻度が上昇したものと推察された。さらに、給餌後に見られるような細胞増殖の促進は、切断刺激によっても引き起こされることが古くから知られていたが、切断個体で *Djplac8-A* 遺伝子の発現を調べたところ、切断面近くで *Djplac8-A* 遺伝子の発現およびタンパク質が消失すること、消失した領域で neoblast の細胞増殖が促進されることを見出した。これらの結果は、DjPlac-8 は neoblast の細胞増殖に対して負の制御をしているタンパク質であることが推察された。

ではなぜ切断後に切断面近くでのみ、*Djplac8-A* 遺伝子の発現が抑えられるのだろうか。その疑問に対して、申請者は切断刺激のメディエータとして知られる JNK シグナルに着目した。そして、JNK シグナルの阻害剤を処理した場合に *Djplac8-A* 遺伝子の発現抑制がかからなくなり通常通りの neoblast の増殖制御がかかることを示すことに成功している。すなわち、切断後によって活性化される JNK シグナルによって *Djplac8-A* 遺伝子の発現抑制が行われ、切断面近くでの細胞増殖の促進が行われることを明らかにしている。

さらに、JNK シグナルによって引き起こされる *Djplac8-A* 遺伝子の発現抑制、ひいてはその結果として引き起こされる neoblast の増殖促進の役割についても申請者は検証している。低濃度の JNK シグナルの阻害剤処理によって、定常の増殖には影響しないが、切断後の細胞増殖促進が起きないようにすると、眼の再生を含む再生異常が生じることが知られていたが、低濃度の JNK シグナルの阻害剤処理と同時に *Djplac8-A* 遺伝子をノックダウンして細胞増殖促進を起こすと細胞分化の初期マーカーの発現も上昇して再生異常がレスキューされるケースが増えることを示している。また、ERK シグナルを阻害して、切断後の細胞分化を抑制すると、JNK シグナルの上昇が抑えられることで、*Djplac8-A* 遺伝子の発現抑制がかからないことも示している。

また、過去において、*P2X* 遺伝子の RNA 干渉法によるノックダウンによって、今回みられた *Djplac8-A* 遺伝子ノックダウンによって生じる自切頻度の上昇と同じ表現型がすでに報告されている(ただし、*P2X* 遺伝子については切断後の細胞増殖の上昇には関わっていないことも併せて報告されている)。そして、今回の研究において、*P2X* 遺伝子と *Djplac8-A* 遺伝子のダブル・ノックダウンによってさらなる自切頻度の上昇は起きないことが報告されている。それらの結果をもとに、今回の発見について整理してみると、プラナリアにおいて neoblast は default 状態としては高い増殖活性をもっているが、定常状態においてはどちらかという P2X や DjPlac8-A の機能によって増殖をマイルドな状態に保持しており、切断シグナル(JNK シグナル)が入ったときは DjPlac8-A を抑制することで増殖促進を引き起こし再生を可能とし、また、給餌後においては P2X を介したシグナルで Plac8-A を抑制することで細胞増殖を引き起こすことで個体の成長を制御している可能性を示唆した。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本研究で、申請者はプラナリアの幹細胞が、体の中の環境(栄養状態や体の大きさや分化細胞と幹細胞のバランスなど)をいかに識別して、幹細胞の増殖と分化を制御しているかについて多くの新しい知見を得ることに成功している。特にプラナリアの幹細胞の細胞膜近傍で細胞を取り巻く環境をセンシングするシステムがあることの発見の意義は大きい。また、Plac8 ホモログ遺伝子がヒトのガンの増殖制御に関与しているとか、植物の細胞数の制御に関与しているといった知見と合わせると、Plac8 ホモログ遺伝子の機能は、プラナリアの幹砂防システムに限ったものではなく、多くの生き物における幹細胞の増殖と分化制御の普遍的なシステムの発見につながる可能性も高い。そういった意味において、本研究が将来的にガンの増殖制御や幹細胞を使った再生医療といった分野にも新たな知見を与えることが期待される。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。

また、令和4年3月29日に論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降