

博士論文審査報告書

論文題目：セルソーターを用いたプラナリア幹細胞システムの解析

申請者名：林哲太郎

1. 論文内容の要旨

プラナリアの強い再生能力は、新生細胞と呼ばれる分化全能性の幹細胞によるものと考えられている。しかしながら、これまで新生細胞の全能性や、多様性の有無を証明できる確実な結果は、得られていない。これらを証明するためには、まずは、新生細胞の純化法の確立が必要であると考えられた。

そこで、プラナリアの新生細胞の「小型で核の占める割合が高い」という形態学的特徴と「X線照射によって消失する」という生理学的特徴を組み合わせることで、セルソーター（FACS）を用いて新生細胞分画「X1」「X2」を同定することに成功した。こうして初めて純化された新生細胞を single-cell PCR 法を用いて、単一細胞レベルの遺伝子発現解析を行った。その結果、増殖期の新生細胞分画「X1」では 87.6% の細胞で新生細胞マーカー遺伝子 (*DjpiwiA*) を発現している事が分かった。興味深いことに、この *DjpiwiA* を発現する新生細胞の中に、分化細胞マーカー遺伝子を共発現している細胞が見出された。さらに RNA 結合タンパク質遺伝子の発現パターンにも多様性があることが示され、これらのことから新生細胞には、多様性があることが立証された。また FACS を用いた解析法は、プラナリアの幹細胞研究のみならず、プラナリアの神経細胞、他の非モデル生物（カイメン）、モデル生物（マウス網膜細胞）においても非常に有用であることがわかった。

さらに、幹細胞の分化制御に関わる遺伝子についても、新たな知見を得ることに成功した。プラナリアの前後軸極性の獲得に関わる Wnt シグナル関連遺伝子の 1 つである *WntP-1* 遺伝子 (*DjwntP-1*) に着目して解析を行い、その発現が後方再生初期の旧組織内における分化細胞での発現と、それに引き続く幹細胞から分化し新たに生み出された細胞での発現の 2 段階に分けられる事を見いだした。後方再生初期の分化細胞での *DjwntP-1* の発現は、神経細胞を介した Hh シグナルが制御しており、これにより前後軸極性が決定されることが分かった。一方、再生中期における幹細胞から分化した細胞での *DjwntP-1* の発現は、他の Wnt 遺伝子群を下流で動かすことで、尾部再生のシグナルセンターとなり、幹細胞を介した尾部形成に必須である事がわかった。さらに、この *WntP-1* 発現細胞の幹細胞からの分化制御には、転写因子である LIM homeobox 遺伝子の 1 つである *Djisl* 遺伝子とそのコファクター *DjLDB1* の共役が必須であることを RNAi によって証明した。

2. 論文審査結果

申請者である林哲太郎は、プラナリア幹細胞の純化及び、プラナリア幹細胞の多様性について単一細胞レベルでの研究を行った。これまでプラナリアの幹細胞は、分化全能性の新生細胞と呼ばれる均一な細胞集団であると考えられてきた。申請者は、プラナリア幹細胞の X 線感受性と単純な細胞蛍光染色を組み合わせる事で、セルソーター (FACS) を用いたプラナリア新生細胞分画 (X1,X2) の同定に初めて成功した。さらに「FACS を用いた single-cell PCR 法 (FBSC-PCR 法)」という解析法を新たに開発し、これを用いて単一細胞レベルでの新生細胞の遺伝子発現解析を行った。すると増殖期の新生細胞分画 X1 の約 90% の細胞が、新生細胞マーカー遺伝子 *DjpiwiA* を発現している事が判明し、X1 分画が新生細胞分画である事を示した。さらにこれらの細胞の一部が、分化細胞マーカー遺伝子を発現していることが同定された。これにより、これまで生殖系列だけで観察されていた新生細胞の部分集団が、体細胞系列でも存在していることが初めて示され、プラナリアの幹細胞は、多様性を有していることが立証された。

また申請者は、プラナリアの幹細胞だけでなく、プラナリアの神経細胞、カイメンの襟細胞、マウスの網膜細胞など、様々な細胞種において FACS を用いた研究で成果をあげた。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成 22 年 1 月 26 日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

主査：渡辺憲二 印

副査：新免輝男 印

：大隅隆 印

：小倉尚志 印

：阿形清和 印

(京都大学大学院理学研究科、教授)