

成体全能性幹細胞ニッチの探索とその分子的特徴の解明

Exploration of the adult pluripotent stem cell niche and its molecular characterization

(発生生物学会推薦)

代表研究者 東邦大学 鹿島 誠 Toho university Makoto Kashima

Pluripotent stem cells (PSCs) in adult invertebrates, such as planarians, retain their full differentiation potential (aPSCs) throughout their lifespan, facilitating regeneration and asexual reproduction. Nevertheless, the molecular mechanisms underlying aPSC maintenance remain largely elusive. In *Dugesia japonica*, neoblasts—*piwiA*-positive cells—are believed to encompass aPSCs. Recent studies have implicated the MTA protein in the regulation of neoblast migration, suggesting the presence of spatially defined aPSC niches. To identify candidate aPSC and niche cells, we conducted high-resolution single-cell RNA sequencing (scRNA-Seq) using TAS-Seq, which identified 63 cell types, including a *piwiA*-positive, differentiation marker-negative aPSC candidate. Spatial transcriptomics on control specimens identified approximately 30,000 transcript-rich spots and revealed regions associated with neoblasts. Clusters spatially adjacent to *piwiA*-positive cells were identified as candidate niche cells. To validate spatial gene expression, we developed a triple fluorescent in situ hybridization (FISH) system using full-length mRNA references generated via MAS-Seq. This study provides a cellular and spatial framework for elucidating the mechanisms that sustain aPSCs in planarians and establishes essential tools for future functional validation of niche candidates.

研究目的

多能性幹細胞 (PSC: Pluripotent Stem Cell) とは、“自己複製能”と“胎盤以外の全細胞種に分化可能な多能性”を備えた細胞である。iPS 細胞等の哺乳類 PSC は多能性を持つが、発生のごく初期 (2 細胞胚) が培養環境下でしか維持されない。一方、プラナリアなどの無脊椎動物は、成体内でも aPSC (adult PSC: 全細胞種に分化可能な全能性を持つ) を維持し、再生や無性生殖に利用している (Agata et al., 2006; Sánchez Alvarado & Yamanaka, 2014)。しかし、これらの無脊椎動物において aPSC を安定的に維持している分子基盤は解明されていない。プラナリアの高い再生能力は、neoblast と呼ばれる *piwiA* 遺伝子陽性細胞集団に依存しており、その一部が aPSC として機能すると考えられている (Hayashi et al., 2010; Wagner et al., 2011)。しかし、プラナリア aPSC は単離・同定はされておらず、aPSC 維持機構は不明である (Rossi & Salvetti, 2019)。一般的に、幹細胞の維持には生体内に存在する微小環境 (幹細胞ニッチ)

との相互作用が重要であり、幹細胞はニッチから離れることで自己複製を停止し、分化していく (Hicks & Pyle, 2023)。最近になって、プラナリアで aPSC ニッチの候補が Sato らによって発見された (Sato et al., 2022)。Sato らは細胞の移動に関わることが知られている MTA (Metastasis Associated) タンパク質のプラナリアホモログを摂餌 RNAi によって機能阻害することで、neoblast の移動が抑制され、その結果体内の特定の領域にのみ neoblast が局在することを明らかにした。興味深いことに、MTA 機能阻害個体では neoblast の自己複製は低下しない一方で、分化が抑制されていた。このことから、MTA 機能阻害個体でみられた neoblast 局在領域の周辺に aPSC ニッチが存在し、MTA を発現した neoblast が aPSC ニッチから離れ、分化していくという作業仮説が提唱された (図 1) (Sato et al., 2022)。しかし、現状 aPSC のマーカー遺伝子候補は同定されておらず、加えて、MTA 機能阻害個体でみられた neoblast 局在領域 (aPSC ニッチ候補) に一致する分布を示す分化細胞は知られ

ていない。そこで、本研究では、aPSC 候補およびニッチ構成細胞候補のマーカー遺伝子の探索に資するために、MTA 機能阻害個体に見られた neoblast 局在領域およびその周辺に存在する細胞の同定を目指した。

研究経過

本研究目的を達成する上で、使用するモデル生物である淡水生プラナリア *Dugesia japonica* を構成する細胞カタログは有用である。*D. japonica* を対象とした single cell RNA-Seq の実施例はあったものの、

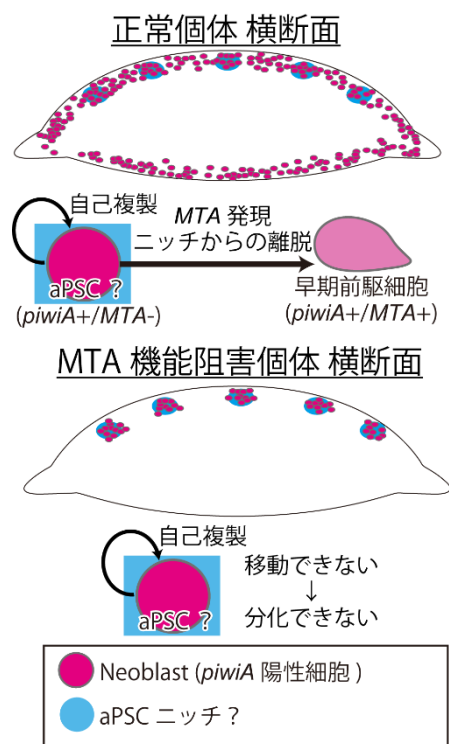


Fig 1 Working hypothesis of aPSC niche in planarian

細胞あたり百遺伝子程度しか検出されておらず網羅的な細胞種同定には不十分であった(García-Castro et al., 2021)。そこで、本研究ではまず、高い遺伝子検出力を誇る TAS-Seq 法(Shichino et al., 2022)を利用することで、*D. japonica* の細胞カタログ作製を行った。その結果、piwiA 陽性細胞群を含む 63 種からなる 3,404 細胞の単一細胞遺伝子発現データを取得した(Kashima et al., 2024)。この scRNA-Seq の結果では、MTA を発現する neoblast (piwiA 陽性細胞) では前駆細胞マーカーと細胞移動に関わることがマウス等で報告されている Rho GTPase をコードする *Djcdc42* が発現しており(Reymond et al., 2012; Yujia et al., 2019)、先行研究で提唱された作業仮説を支持する結果がえ

られた。また、aPSC 候補として、piwiA 陽性かつ分化途上の細胞マーカーである *Djcalu* (Kashima et al., 2018)を発現しない種類の細胞種を同定した。しかし、この細胞種で特異的なマーカー遺伝子を本 scRNA-Seq では検出することができず、プラナリア aPSC は piwiA など発現するものの、特異的な遺伝子発現を持たない没個性的な性質を持つ可能性が示唆された。

次に aPSC ニッチ構成細胞候補の探索のため、一細胞相当の解像度を持つ空間トランスクリプトーム解析を実施した(Stickels et al., 2021)。本来であれば、neoblast の局在変化が観察される、MTA 機能阻害個体で実施するべきではあるが、図 1 でみられる neoblast の局在変化は一過的であり、当該サンプルを空間トランスクリプトーム解析することは至難であったため、通常個体に対して行い実施し、MTA 機能阻害個体に見られた neoblast 局在領域に相当する領域の探索を目指した。正常個体のプラナリア凍結切片中の複数個体の横断面から、直径 10 μ m のスポットあたり平均 3,990 RNA 分子、782 遺伝子の検出に成功した(図 2)。プラナリア断片が存在しない領域

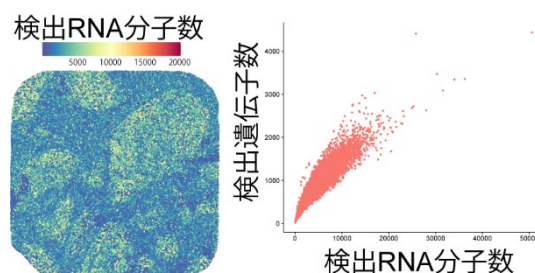


Fig 2 The number of detected molecules and genes in the spatial transcriptome analysis

でもバックグラウンドノイズとして RNA 分子が検出されたため、その影響を取り除く目的で空間トランスクリプトーム解析結果に対して ROI を指定しかつ個体毎の分割指定可能なプログラムを開発した。本プログラムを利用することで計 17 断面に含まれる約 3 万個のスポットを同定し、下流解析に用いた(図 3)。

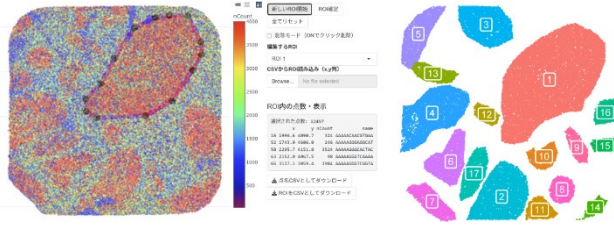


Fig 3 In-house ROI selector for spatial transcriptome analysis

本空間トランスクリプトーム解析では、例えば、*DjAF012108-65* 切片上での発現パターン及び UMAP プロット上で明確な特異性が確認された。一方で、neoblast マーカーである *piwiA* は切片上では局在が確認されたが、UMAP プロットでは幅広い発現パターンが確認され (図 4)、neoblast の多様性を空間トランスクリプトーム解析でも確認することができた。

DjAF012108-65

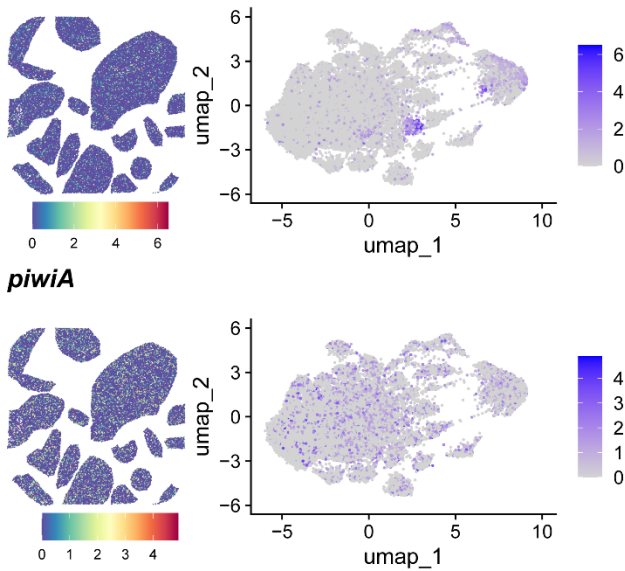


Fig 4 Examples of detected gene expression

空間トランスクリプトーム解析のワークが確認されたため、便宜的にスポット (≒細胞) を 20 のクラ

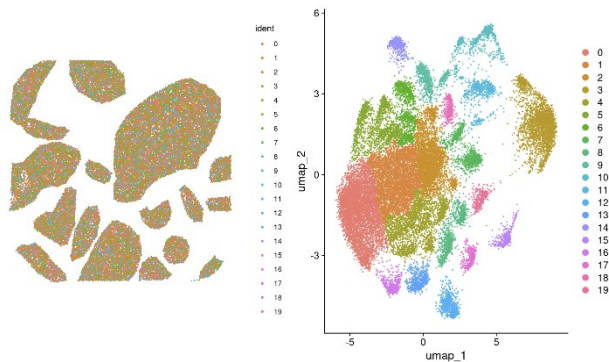


Fig 5 A clustering result and *piwiA* expression of the spatial transcriptome analysis

スター (≒細胞種) に分類した (図 5)。現状のクラスタリング解析結果では、*MTA* 機能阻害個体に見られた neoblast 局在領域に相当する領域に相当する空間分布を示すクラスターが同定されなかったため、各スポットの最も近くにいるスポットのクラスターの同定を行った。その結果、*piwiA* が検出されたクラスターに対して統計的に有意なクラスター、すなわち neoblast に有意に隣接する細胞種の候補を得ることができた (図 6)。例えば、*piwiA* が検出されたクラスターの一つであるクラスター 18 には *piwiA* 陰性 (=分化細胞) のクラスター 1 が隣接しており、本解析によって、neoblast の近傍に存在するニッチを構成する分化細胞候補の同定可能性が支持された。

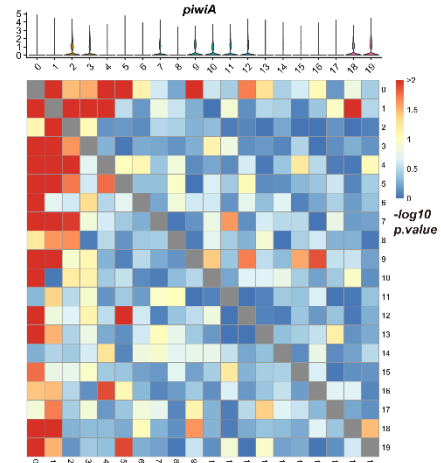


Fig 6 Most neighbor clusters of each spot. P-values were calculated with fisher's test.

細胞周辺で発現する遺伝子の同定目途がたったため、その検証および詳細な解析のために、三重蛍光 in situ 法の確立を行った。従来、*D. japonica* の蛍光 in situ 法は DIG と FITC を用いた二重染色と色数に限りがあり (Kashima et al., 2024)、またバックグラウンドが高いという課題が存在した。そこで、ISHpalette (Tsuneoka & Funato, 2020) の導入を試みた。まず、ロングリードシーエンサーを利用した MAS-Seq 法 (Al' Khafaji et al., 2024) による網羅的な mRNA の全長決定を行うことで、HCR のプローブ設計に不可欠な *D. japonica* の完全長 mRNA リファレンスの作製も完了した。得た完全長 mRNA リファレンスをもとに三種類の *piwi* ファミリー遺伝子に対するプローブを設計し、三重蛍光 in situ 染色を試みたところ、*D. japonica* でホルマウント三重蛍光 in situ 染色に成功し (図 5)、空間トランスクリプトーム解析結果を検証するための技術基盤の確立が完了した。

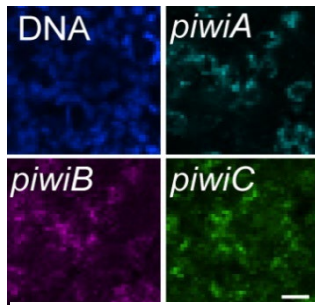


Fig 3 Triple in situ hybridization by HCR.
Scale bar is 10 μ m

考察

本研究で実施した空間トランスクリプトーム解析は検出遺伝子数が飽和していないと考えられる (図2)。しかし、現状のデータでも、空間情報を持つほぼ一細胞解像度のトランスクリプトーム解析結果を得られおり、今後シーケンスの読みだしを行うとともに、scRNA-Seqの結果と統合解析することで、検出遺伝子数の向上が期待される。今回示した20種類のクラスターの分類では、MTA機能阻害個体に見られたneoblast局在領域に相当する領域は観察されなかったが、今後より詳細なクラスターを行うことで、当該領域の同定が期待される。当該領域が同定された場合は本研究で確立した三重蛍光in situ染色法を利用することで、従来の二重蛍光染色と比較して効率的な組織学的な検証が可能である。neoblastに近接する分化細胞 (= ニッチ構成細胞候補) が同定された後は、ニッチ構成細胞候補で発現する遺伝子の機能検証を進めていくことで、プラナリアaPSCの維持・制御機構に迫っていくことが可能であろう。

参考文献

- Agata, K., Nakajima, E., Funayama, N., Shibata, N., Saito, Y., & Umesono, Y. (2006). Two different evolutionary origins of stem cell systems and their molecular basis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 17(4), 503–509.
- Al'Khafaji, A. M., Smith, J. T., Garimella, K. V., Babadi, M., Popic, V., Sade-Feldman, M., Gatzert, M., Sarkizova, S., Schwartz, M. A., Blaum, E. M., Day, A., Costello, M., Bowers, T., Gabriel, S., Banks, E., Philippakis, A. A., Boland, G. M., Blainey, P. C., & Hacohen, N. (2024). High-throughput RNA isoform sequencing using programmed cDNA

concatenation. *Nature Biotechnology*, 42(4), 582–586.

- García-Castro, H., Kenny, N. J., Iglesias, M., Álvarez-Campos, P., Mason, V., Elek, A., Schönauer, A., Sleight, V. A., Neiro, J., Aboobaker, A., Permanyer, J., Irimia, M., Sebé-Pedrós, A., & Solana, J. (2021). ACME dissociation: a versatile cell fixation-dissociation method for single-cell transcriptomics. *Genome Biology*, 22(1), 1–34.
- Hayashi, T., Shibata, N., Okumura, R., & Kudome, T. (2010). Single-cell gene profiling of planarian stem cells using fluorescent activated cell sorting and its “index sorting” function for stem cell research. 131–144.
- Hicks, M. R., & Pyle, A. D. (2023). The emergence of the stem cell niche. *Trends in Cell Biology*, 33(2), 112–123.
- Kashima, M., Komura, R., Sato, Y., Hashimoto, C., & Hirata, H. (2024). A resource of single-cell gene expression profiles in a planarian *Dugesia japonica*. *Development, Growth & Differentiation*, 66(1), 43–55.
- Kashima, M., Agata, K., & Shibata, N. (2018). Searching for non-transposable targets of planarian nuclear PIWI in pluripotent stem cells and differentiated cells. *Development Growth and Differentiation*, 60(5), 260–277.
- Reymond, N., Im, J. H., Garg, R., Vega, F. M., D'agua, B. B., Riou, P., Cox, S., Valderrama, F., Muschel, R. J., & Ridley, A. J. (2012). Cdc42 promotes transendothelial migration of cancer cells through β 1 integrin. *Journal of Cell Biology*, 199(4), 653–668.
<https://doi.org/10.1083/JCB.201205169/VIDEO-6>
- Rossi, L., & Salvetti, A. (2019). Planarian stem cell niche, the challenge for understanding tissue regeneration. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 87, 30–36.
- Sánchez Alvarado, A., & Yamanaka, S. (2014). Rethinking differentiation: Stem cells, regeneration, and plasticity. *Cell*, 157(1), 110–119.
- Sato, Y., Shibata, N., Hashimoto, C., & Agata, K. (2022). Migratory regulation by MTA homologous genes is essential for the uniform distribution of

planarian adult pluripotent stem cells. *Development, Growth & Differentiation*.

- Shichino, S., Ueha, S., Hashimoto, S., Ogawa, T., Aoki, H., Wu, B., Chen, C.-Y., Kitabatake, M., Ouji-Sageshima, N., Sawabata, N., Kawaguchi, T., Okayama, T., Sugihara, E., Hontsu, S., Ito, T., Iwata, Y., Wada, T., Ikeo, K., Sato, T.-A., & Matsushima, K. (2022). TAS-Seq is a robust and sensitive amplification method for bead-based scRNA-seq. *Communications Biology*, 5, 602.
- Stickels, R. R., Murray, E., Kumar, P., Li, J., Marshall, J. L., Di Bella, D. J., Arlotta, P., Macosko, E. Z., & Chen, F. (2021). Highly sensitive spatial transcriptomics at near-cellular resolution with Slide-seqV2. *Nature Biotechnology*, 39(3), 313–319.
- Tsuneoka, Y., & Funato, H. (2020). Modified in situ Hybridization Chain Reaction Using Short Hairpin DNAs. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 527340.

- Wagner, D. E., Wang, I. E., & Reddien, P. W. (2011). Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science*, 332(6031), 811–816.
- Yujia, S., Tingting, G., Jiaxin, L., Saisai, Z., Zhitai, H., Qingnan, T., & Shoutao, Z. (2019). Cdc42 regulate the apoptotic cell death required for planarian epidermal regeneration and homeostasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 112, 107–113.

研究の発表

口頭発表

1. 多検体 RNA-Seq によるデータ駆動型生命現象の観察法, 第9回日本先天異常学会勉強会, 2025
2. プラナリア研究を加速させるデータ駆動型生物学アプローチ, Looking back of studies on planarian regeneration and future directions, 2024