

氏 名 黒木 義人

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2505 号

学位授与の日付 2024 年 3 月 22 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 単一細胞トランスクリプトーム解析によるプラナリア成体多能性  
幹細胞の特徴付け

論文審査委員 主 査 重信 秀治  
基礎生物学コース 教授  
阿形 清和  
基礎生物学コース 教授  
吉田 松生  
基礎生物学コース 教授  
梅園 良彦  
兵庫県立大学 大学院理学研究科 教授

## 博士論文の要旨

氏 名：黒木 義人

論文題目：

単一細胞トランスクリプトーム解析によるプラナリア成体多能性幹細胞の特徴  
付け

(Characterization of planarian adult pluripotent stem cells by single-cell transcriptome  
analysis)

Stem cells regulate their cell division, differentiation, and migration to supply several tissue cell types during development, regeneration, and homeostasis. Notably, pluripotent stem cells have self-renewal ability, a process that produces stem cells, and maintain pluripotency, which enables the stem cells to differentiate into various types of cells. Planarians (*Dugesia japonica*) are good model organisms used to study the molecular mechanisms of pluripotency maintenance and stem cell differentiation because they maintain neoblasts as adult pluripotent stem cells (aPSCs). Neoblasts play important roles as the cellular sources involved in tissue homeostasis and regeneration. A previous study using different planarian species (*Schmidtea mediterranea*) has speculated that neoblasts expressing *Tetraspanin 1* (Nb2 cells) were pluripotent neoblasts. However, some recent studies have reported that Nb2 cells contain the cells that are differentiating into nerves, and the fact of pluripotent neoblasts is still debatable. In this study, I obtained new insights into pluripotent neoblasts by using *D. japonica*, which differs from *S. mediterranea* in stem cell migration and proliferation distribution after neoblasts transplantation into X-ray irradiated animals.

To characterize the molecular features of aPSCs, committed cells, and differentiated mature cells in *D. japonica*, I performed single-cell RNA-sequencing

(scRNA-seq) on dissociated cells obtained from the entire body of mature individuals of this organism. A 10× Genomics Chromium platform was used to barcode the mRNA of individual cells. scRNA-seq lost spatial information in the process of cell preparation. To address this limitation and gain insight into spatial information, in situ hybridization chain reaction (HCR) was employed. This technique allowed us to visualize target mRNAs within the cells, thereby providing a valuable complement to the scRNA-seq data.

A method for isolating viable single cells from adult planarian bodies using fluorescence-activated cell sorting (FACS) was established. Initially, I employed a violet laser instead of ultraviolet (UV) laser, to excite Hoechst 33342, to reduce cellular damage. After optimizing the cell staining conditions and FACS compensation, I generated FACS profiles similar to those created using a previous method that employed a UV laser. Although high-quality RNA sequencing data was successfully obtained for aPSCs, non-aPSCs yielded low-quality RNA reads (i.e., < 60% of cells possessing barcoding mRNAs). To resolve this problem, I established a FACS gating condition without staining, effectively excluding low-quality cells and tissue debris. This non-staining isolation strategy reduced the post-dissociation time and enabled high-quality scRNA-seq results not only for aPSCs but also for differentiated cells (i.e., > 80%).

Next, utilizing the aforementioned single-cell isolation method, a cell atlas of *D. japonica* was created using means of scRNA-seq. The atlas contained 20,331 cells, which comprised 12 clusters corresponding to the tissue cell types. The aPSCs (*piwiA*<sup>+</sup>, *H2B-2*<sup>+</sup>), epidermis (*progl*<sup>+</sup>, *agat-1*<sup>+</sup>, *IFb*<sup>+</sup>), neuron (*SoxB*<sup>+</sup>, *PC2*<sup>+</sup>), muscle (*MHC-A*<sup>+</sup>), intestine (*gata456*<sup>+</sup>, *apob-1*<sup>+</sup>), protonephridia (*CA*<sup>+</sup>, *slc9a-9*<sup>+</sup>), *cathepsin*<sup>+</sup> cells (*CTSB*<sup>+</sup>, *CTSL2*<sup>+</sup>), and mesenchymal cells (*OR1/2*<sup>+</sup>, *IR1/2*<sup>+</sup>) were identified in the atlas. Based on gene expression patterning and pseudotime analysis, aPSCs that expressed high levels of *piwiA* (*piwiA*<sup>high</sup> aPSCs) were inferred as the most undifferentiated in all aPSC subtypes. To investigate the spatial distribution of *piwiA*<sup>high</sup> aPSCs in vivo, whole-

mount and sectioning of in situ HCR were conducted. A large number of *piwiA*<sup>high</sup> aPSCs were found to distribute asymmetrically, more on the dorsal side than the ventral side. Moreover, sub-clustering analysis of the aPSCs clusters identified a novel aPSCs subtype expressing high levels of ribosomal protein *Mak16B*. *Mak16B*<sup>+</sup> aPSCs clustered as *piwiA*<sup>middle</sup> subtype, and was suggested to differentiate aPSCs.

Finally, I investigated molecular mechanisms underlying the maintenance of *piwiA*<sup>high</sup> aPSCs. X-ray irradiation ablated aPSCs, and a sublethal dose caused the formation of a branch-like structure, in which aPSCs that survived irradiation proliferated. A previous study showed that aPSCs maintained their pluripotent state while preventing differentiation in this branch-like structure. I found *piwiA*<sup>high</sup> aPSCs surviving within this structure. Treatment of two kinase inhibitors for ERK and GSK3 signaling pathways (2i) induced the aPSCs branch-like structure without irradiation, suggesting that ERK and GSK3 signaling pathways contribute to the maintenance of *piwiA*<sup>high</sup> aPSCs. Further, 2i treatment impaired the differentiation of the *piwiA*<sup>middle</sup> aPSCs subtype from the *piwiA*<sup>high</sup> aPSCs. Therefore, *piwiA*<sup>high</sup> aPSCs under 2i condition may be naive stem cells.

In conclusion, I created a cell atlas of the planarian *D. japonica* using single-cell transcriptome analysis and uncovered the gene expression dynamics during aPSCs differentiation. A novel subtype of *D. japonica* aPSCs was identified, which was suggested to play roles in unknown translational regulation by the ribosomal protein Mak16B. Furthermore, 2i treatment was shown to prevent differentiation of putative pluripotent neoblasts, suggesting that the molecular mechanisms maintaining naïve pluripotent stem cells are conserved between planarians and mice.

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏名 黒木 義人

論文題目 単一細胞トランスクリプトーム解析によるプラナリア成体多能性幹細胞の特徴付け

本研究は、プラナリア（ナミウズムシ: *Dugesia japonica*: *D.jap*）の高い再生能力を支えるネオブラスト(neoblast)と呼ばれる成体多能性幹細胞（adult Pluripotent Stem Cell: aPSCs）の特性と幹細胞システムを単一細胞トランスクリプトーム解析によって理解することを旨とした研究である。

ナミウズムシを用いた単一細胞レベルでの遺伝子発現解析は 2000 年代からセルソーター(FACS)を用いて単一細胞を 96 ウェルプレートに集めて定量的な qPCR によって進められていたが、ここでは近年に開発された 10× Genomics Chromium プラットフォームを使用しての single-cell transcriptome (scRNA-seq)解析が行われている。ただし、従来の Hoechst 33342 と Calcein AM といった蛍光色素を用いた FACS によるプラナリアの細胞選別法を用いると RNA の分解が一部の細胞で進行していることを見出されたことから、scRNA-seq に適した単一細胞の分取法を確立するところから本研究は行われている。

まずは、FACS を用いた細胞選別時に用いる紫外線 (UV) レーザーが RNA や細胞にダメージを与える可能性が高いことから、紫色のレーザーを UV レーザーの代わりに使用した細胞選別法を開発し、scRNA-seq を行った。その結果、aPSCs に対しては高品質な RNA シーケンシングデータを得ることに成功するものの、分化細胞からは高品質の RNA リードを得られなかった。次に、蛍光染色なしで低品質な細胞や組織デブリを効果的に排除する FACS ゲーティング条件を見出したことで、蛍光染色なしで FACS によって生細胞だけを速やかに選別することが行われた。その結果、aPSCs だけでなく分化細胞からも高品質な scRNA-seq 結果を得ることに成功した。この短時間で単一の生細胞だけを FACS で選別して scRNA-seq を行なう方法はプラナリアに限らず、様々な非モデル動物を用いた scRNA-seq 解析のスタンダードな方法になることが期待された。

この新たに確立された FACS を用いた単一細胞分取法を用いて、プラナリアの aPSC を含む全細胞種について scRNA-seq 解析を行い、プラナリアの細胞アトラスを作製した。20,331 個の細胞における scRNA-seq の結果によって、ナミウズムシの細胞は大きく分けて 12 個のクラスターによって構成されていることが明らかになった。具体的には、aPSCs (*piwiA+*、*H2B-2+*)、表皮細胞 (*prog1+*、*agat-1+*、*IFb+*)、神経細胞 (*SoxB+*、*PC2+*)、筋肉細胞 (*MHC-A+*)、腸細胞 (*gata456+*、*apob-1+*)、原腎細胞 (*CA+*、*slc9a-9+*)、カテ

プシン陽性細胞 (*CTSB+*、*CTSL2+*)、および間充織細胞 (*OR1/2+*、*IR1/2+*) などが特定された。さらに、遺伝子発現のパターンと疑似時間解析によって、*piwiA* を高レベルで発現する aPSCs (*piwiA<sup>high</sup>* aPSCs) が全ての細胞の最も根元に位置する細胞であることが示唆された。すなわち、ナミウズムシでは *piwiA<sup>high</sup>* aPSCs から全ての細胞種が産み出される幹細胞システムを構築することで、高い再生能力を発揮していることが示唆された。

なお、scRNA-seq は単一細胞での詳細な遺伝子発現解析を可能にしたものの、個体内での細胞の空間情報は失われる。そこで、細胞の個体内での空間情報を得るために、in situ hybridization chain reaction (HCR) 解析を行い、細胞内での *piwiA* mRNA の分布を定量的に視覚化することで、個体内での *piwiA<sup>high</sup>* aPSCs の分布を調べたところ、*piwiA<sup>high</sup>* aPSCs は腹側よりも背側に多い傾向はあるものの、細胞クラスターを作ることなくほぼ全身に散在していることを明らかとなった。

*piwiA/H2B-2+* の aPSCs のクラスターについて、さらなるサブクラスター分析をしたところ、全ての細胞種を産み出すと考えられた *piwiA<sup>high</sup>* aPSCs サブクラスターの他、*Mak16B* 遺伝子を発現する *Mak16B+* aPSCs のサブクラスターが新たに見いだされた。興味深いことに *Mak16B* 遺伝子はリボソーム結合たんぱく質をコードしており、他の動物種でも保存されている Mak16 タンパク質とは違い、その N 末端側に他のタンパク質と結合するのに機能する PDZ ドメインが付加されたユニークな構造を持つことが判明した。すなわち、プラナリアで見出される Mak16A タンパク質はリボソームの生合成に関与する普遍的な分子であるのに対し、*Mak16B* タンパク質はリボソームでの翻訳制御に関与する特殊な機能を持つ可能性が示唆された。このことは、プラナリアのネオブラストではクロマトイド小体という RNA と RNA 結合タンパク質で構成されるユニークな複合体の存在が知られていることから、*Mak16B* タンパク質がプラナリアの幹細胞システムにおける翻訳制御に関与することが期待され、本研究によって初めて見出された新しい幹細胞制御因子となるかもしれない。

本研究では、scRNA-seq によって、プラナリアの細胞種を遺伝子発現にもとづいて正確にタイピングし、さらに疑似時間解析を加えることでその細胞系譜を推察した。そして、*piwiA<sup>high</sup>* aPSC の幹細胞からあらゆる種類の細胞が産み出されることを示唆するとともに、リボソーム結合タンパク質である *Mak16B* タンパク質が幹細胞から各種の分化細胞を産み出す過程での翻訳制御にかかわっている可能性を見出し、本研究がもたらした新たな知見と言える。また、他の先行研究結果と合わせると、*piwiA<sup>high</sup>* aPSC の幹細胞があっただけではプラナリアの再生能は発揮されないことが考えられ、プラナリアで多能性幹細胞システムが機能するためには *piwiA<sup>high</sup>* aPSC と *Mak16B+* aPSCs の 2 つのサブクラスターの存在が必要であることが示唆されたことの生物学的意義は大きい。

さらに、本研究では、*piwiA<sup>high</sup>* aPSC と *Mak16B+* aPSCs の 2 つの幹細胞サブクラスターの関係にもプレリミナリーではあるが新たな知見をもたらしている。すなわち、チロシン・リン酸化シグナルに関与する ERK 分子と Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルに関与する GSK3

分子の 2 つの阻害剤(2i)の存在下で飼育したナミウズムシについて調べたところ、*piwiA<sup>high</sup>* aPSC には影響ないものの *Mak16B+* aPSCs の顕著な減少が見られた。これらのことから、*piwiA<sup>high</sup>* aPSC から *Mak16B+* aPSCs に移行するのに、それらの 2 つのシグナルが重要な関わりを持つことが示唆された。似たような現象が、マウスの胚性多能性幹細胞(ES)に見出されており、2i 存在下で維持される naïveES とそれから一歩進んだ primedES が知られている。今回、プラナリアで似たようなシステムが多能性幹細胞で見出されたことから、幹細胞の数を保持しながら必要な分化細胞を産み出す特性を持つ多能性幹細胞システムにおいて 2 つの状態を保持することは、幹細胞システム維持機構として不可欠なシステムであることを示唆しているのかもしれない。

本研究では、プラナリアを用いた単一細胞トランスクリプトームの信頼度の高い解析法を確立して、プラナリアの高い再生能力を支える成体多能性幹細胞システムの理解について多くの新たな知見をもたらしたことは博士の学位にふさわしい研究として評価できる。また、博士論文の内容の一部は既に国際誌に掲載されていることから英語能力についても十分であると判定された。以上により審査委員会は、本論文が博士学位の授与に相応しい研究であると認定した。なお、審査会については令和 6 年 1 月 30 日に、基礎生物学研究所の第一セミナー室にて外部委員 1 名がオンラインで参加するハイブリッド形式で行った。