

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

総合研究大学院大学 生命科学研究科 基礎生物学専攻
基礎生物学研究所 再生生物学研究室

黒木 義人

目次

序説	3
第一章	6
序論	7
結果	10
プラナリア aPSCs 精製における violet レーザーの有効性の検討と FACS プロファイリ ングの最適化	10
遺伝子発現による FACS 分画の特徴付け	12
violet レーザーを用いた FACS でソートした細胞の単一細胞トランスクリプトーム解析 における品質評価	14
scRNA-seq のための FACS ソーティング法の確立に向けて	16
FACS プロファイルにおける各細胞分画の分布と特徴付け	18
無染色の細胞調製による single-cell RNA-sequencing の品質向上	22
考察	24
第二章	27
第三章	28
実験材料と方法	30
謝辞	33
参考文献	34

序説

多能性幹細胞について

生物における組織の器官発生や恒常性維持には、幹細胞の分裂および分化による細胞の供給が必要である。幹細胞は適切な時期に、適切な場所で、適切な細胞種に分化することが重要であり、それらは遺伝子の転写やエピジェネティックなどの制御によって調節される。幹細胞は、限定された組織系譜の細胞に分化可能な組織幹細胞と生体を構成するほとんど全ての細胞種に分化可能な多能性幹細胞が知られている。哺乳類動物の多能性幹細胞としてよく研究されている ES 細胞(Embryonic Stem cells)は、胚盤胞の内部細胞塊を解離し、培養することによって樹立される(Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981)。ES 細胞は胚体外組織を除いてあらゆる細胞に分化することが可能である。もう一つの多能性幹細胞として、iPS 細胞(induced Pluripotent Stem cells)は、体細胞に遺伝子導入するリプログラミングによって樹立される(Takahashi & Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007)。多能性幹細胞は主に 2 つの異なる分化状態を示す。より未分化な状態であるナイーブ状態と分化するのに Ready-to-Go な状態に移行したプライムド状態である。マウス ES 細胞においては、ナイーブ状態の維持に ERK と GSK3 シグナル経路の阻害(2i)が必要である(Ying et al., 2008)。

プラナリアの成体多能性幹細胞（ネオブラスト）

プラナリア(*Dugesia japonica*)は、日本をはじめとするアジアの淡水に広く生息する扁形動物である(図 0A)。自ら体を千切っては元通りに再生させ、無性生殖を行うことが知られている。この日常的な再生はプラナリアが全身に保持しているネオブラスト(neoblast)と呼ばれる成体多能性幹細胞(adult pluripotent stem cells; aPSCs)が分裂および各組織の細胞に分化することで可能になっている(Agata & Watanabe, 1999; Agata et al., 2003; Shibata et al., 2010)。ネオブラストは頭部にはあまり見られず、咽頭領域を除く胴体部で広く分布している(図 0B)。ネオブラストは初期胚だけでなく成体においても維持され、多能性幹細胞として機能している(Davies et al., 2017)。電子顕微鏡による観察から、多能性幹細胞の典型的な特徴である細胞質に小胞体やゴルジ体を含む分化状態を示す特徴がないことや、その結果として細胞に占める細胞質の割合が極めて少ないこと、さらに生殖顆粒と類似したクロマトイド小体と呼ばれるユニークな RNA とタンパク質複合体の存在が明らかにされている(Auladell et al., 1993; Hayashi et al., 2006; Higuchi et al., 2007; Rouhana et al., 2010)。プラナリアではネオブラストが唯一の増殖細胞と考えられ、X 線に対して高い感受性を示す(Wolff & Dubois, 1948; Shibata et al., 1999; Sato et al., 2022a)。

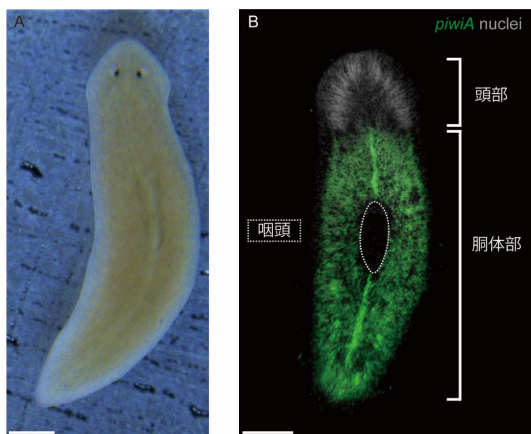


図 0 プラナリアにおけるネオブラストの分布

(A) プラナリア *Dugesia japonica* の明視野観察像。(B) 幹細胞マーカー遺伝子 *piwiA* の whole-mount in situ hybridization 観察像。スケールバーは 1 mm (A)、200 μ m (B)を示す。

ネオブラストが未分化性を維持する分子機構

プラナリアにおいて、ERK シグナルの活性化は aPSCs の細胞分化に必要である。ERK の上流遺伝子である MEK の阻害は aPSCs の増殖には影響を与えない一方で、ネオブラストの分化を妨げることが知られている(Tasaki et al., 2011)。ERK の活性化によってネオブラストは頭部の細胞に分化することが運命決定されるが、Wnt/ β カテニンシグナルは ERK シグナル経路を阻害して、体の後方をパターン形成する(Umesono et al., 2013)。

これまでのプラナリア細胞アトラスの研究

これまでは、主に別種のプラナリアである *Schmidtea mediterranea* を研究対象として、単一細胞トランスクリプトーム解析による細胞の遺伝子発現ダイナミクスが解析されてきた(Fincher et al., 2018; Plass et al., 2018; Zeng et al., 2018; Raz et al., 2021)。本研究で取り扱う *Dugesia japonica* における先行研究もあるが(García-Castro et al., 2021; Kashima et al., 2023)、ネオブラストの分子的特徴付けについては未だ知見が不足している。*Dugesia japonica* と *Schmidtea mediterranea* は個体の形態は似ているが、進化的距離は遠く離れている(Egger et al., 2009)。加えて、ネオブラストの移動(Sato et al., 2022a)や X 照射個体へのネオブラスト移植後の細胞分布(Ishida et al., 2023)についても異なるため、これらの 2 種のプラナリアを比較することで、ネオブラストの移動や増殖、分化などを制御する分子について新たな知見が期待できる。本研究ではネオブラストを含めたプラナリアの全身組織における大規模な細胞アトラスを構築して、細胞の分子的特徴付けを行った。

第一章

単一細胞トランスクリプトーム解析に向けた、プラナリア生細胞単離法の確立

序論

単一細胞トランスクリプトーム解析は、組織や器官において 1 細胞レベルでの遺伝子発現情報を取得することによって、組織における細胞集団の不均一性や発生段階を理解することを可能にした。例えば、胚や培養細胞において、その発生や器官形成、細胞分化を研究するために、単一細胞トランスクリプトーム解析が用いられている(Karaiskos et al., 2017; Farrell et al., 2018; Kanton et al., 2019; van den Brink et al., 2020; Mittnenzweig et al., 2021)。しかし、成体組織から単一の生細胞を単離することは、胚や培養細胞に比べてより困難である。これは、成体組織中の細胞が細胞同士あるいは細胞外基質と強固に結合していることや、組織そのものの複雑性に起因する。さらに、非モデル生物を実験対象とする場合においてはモデル生物に比べて、単一細胞トランスクリプトーム解析のための確立された方法がなく、生物種固有の特性を考慮して独自で細胞調製を行う必要がある。

プラナリアの aPSCs は FACS によって精製することができる(Hayashi et al., 2006)。この手法では、まず生体から細胞を解離した後に、Hoechst 33342 によって核を、Calcein-AM によって細胞質の染色を行う。細胞染色後に FACS を用いて、Hoechst の蛍光に基づく DNA 量と、Calcein の蛍光に基づく細胞質量の定量化を行い、X 線感受性分画 1(X1)、X 線感受性分画 2(X2)、X 線非感受性分画(Xis)の 3 つの分画に分けることが出来る。さらに、X1 細胞の約 90%、X2 細胞では約 30%の細胞が aPSCs マーカー遺伝子の一つである *piwiA* を発現している (Hayashi et al., 2006)。このプラナリアにおける FACS 精製手法は、細胞周期と細胞質量の情報を利用することで aPSCs の単離と遺伝子発現解析を可能にした。

プラナリア aPSCs における様々な生物学的プロセスに関わる分子メカニズムを理解するために、bulk RNA-seq(Shibata et al., 2012; Zhu et al., 2015; Neiro et al., 2022)や、単一細胞遺伝子発現解析(Hayashi et al., 2010; van Wolfswinkel et al., 2014; Zeng et al., 2018; Raz et al., 2021)、細胞移植実験(Wagner et al., 2011; Ishida et al., 2023)が行われてきた。これらの研究は FACS による細胞分取技術が基盤技術として存在しており、FACS による aPSCs 精製法の確

立が無ければ進歩しなかったと言える。また、FACS は解離した組織から標的の細胞を分取することだけでなく、複数の細胞が付着したダブレットを除去したり、死細胞や組織片のような低品質な細胞を除去したりすることができ、プラナリアのような生体組織から scRNA-seq を行う上では必要不可欠な操作である。

プラナリアにおける FACS を用いた細胞分取には、核染色に用いる Hoechst 33342 の励起に UV レーザーが必要である。Hoechst 33342 は核を染色後に、FACS 解析を行うことによって、生物のゲノムサイズを推定することに用いられおり、実際にプラナリアにおいても先行研究がある(Nishimura et al., 2015)。Hoechst 33342 における励起波長のピークは 350 nm 付近であり、およそ 355 nm で励起可能な UV レーザーが Hoechst の効率的な励起に必要である(図 1A)。しかし、細胞への UV 照射は様々な細胞ダメージを誘導することが知られている(Lakin et al., 1999; Ishida et al., 2023)。一方で、UV よりも FACS に搭載されることが多い violet レーザー(波長 405 nm)を用いた場合には、Hoechst 33342 の励起効率は UV 励起時に比べて 5%以下にまで低減する(図 1B)。本研究では、プラナリアの FACS における violet レーザーの有効性を検討し、更に scRNA-seq を行うために必要とされる生細胞の新しい分取法の確立を行った。

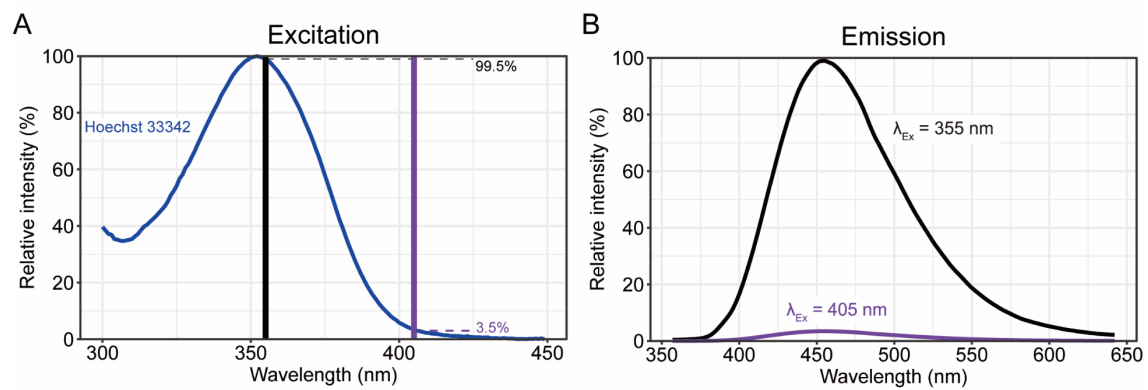


図1 核染色色素 Hoechst 33342 のスペクトル

(A) Hoechst 33342 の励起波長(青色)。黒色の垂線は UV レーザーに対応する 355 nm を示し、紫色の垂線は violet レーザーに対応する 405 nm を示す。

(B) UV レーザー(黒色)または violet レーザー(紫色)でそれぞれ励起された時の Hoechst 33342 の蛍光波長。波長データは FPbase (<https://www.fpbase.org>) (Lambert, 2019)から入手した。

結果

プラナリア aPSCs 精製における violet レーザーの有効性の検討と FACS プロファイリングの最適化

プラナリア組織における scRNA-seq を行うことを目的として、まずは単一細胞に分散された細胞調製において、UV レーザーの代わりに violet レーザーを用いた FACS による細胞精製手法を検討した。組織から細胞を機械的処理および酵素処理によって分散させた後に、細胞染色の条件は先行研究(Hayashi et al., 2006)に従い、18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342 および 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ calcein-AM で核と細胞質の染色を行った。そして violet レーザーで Hoechst を励起し、blue レーザーで calcein-AM をそれぞれ励起する FACS を用いて細胞をソーティングした。FACS のデータ解析において、X 軸に calcein-AM の蛍光強度を、Y 軸に Hoechst 33342 の蛍光強度をプロットし、X1 分画(S/G2/M 期の aPSCs)、X2 分画(G0/G1 期の aPSCs と分化細胞)、Xis 分画(分化細胞)からなる 3 つの細胞分画を定義した(図 2A)。しかし、X2 と Xis 分画で Hoechst 強度の低い方向へのシフトが見られた(図 2A)。これは、Hoechst の蛍光強度と DNA 量における直線性が失われてしまっており、calcein-AM に由来する蛍光の漏れ込みが影響していると考えられた。この問題を解決するために、calcein-AM の細胞染色の条件変更と FACS の蛍光補正を行った。具体的には、calcein-AM 濃度を 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に減らして、蛍光の漏れ込みを抑え、適切な蛍光補正を行った。その結果 X1, X2, Xis の FACS プロファイルは適切な形に修正された(図 2B)。改善された FACS プロファイルは、Hoechst と calcein の二重陽性細胞のうち 13%が X1 分画に割り当てられ、この割合は UV レーザーを用いた先行研究の FACS 解析(Hayashi & Agata, 2018)とおおよそ同等であった(図 2B)。さらに、X2 分画は 18%、Xis 分画は 63%の割合になり(図 2B)、こちらも先行研究とほぼ一致していた。Hoechst の励起に UV レーザーと violet レーザーを使った場合の X1 分画の割合を比較した時、割合はほとんど変わらず、統計学的に有意な差もなかった(図 2D, 2E)。以上の結果から、プラナリアの FACS 解析において、UV レーザーを代わりに violet レーザーを用いることは

有効であることが示された。

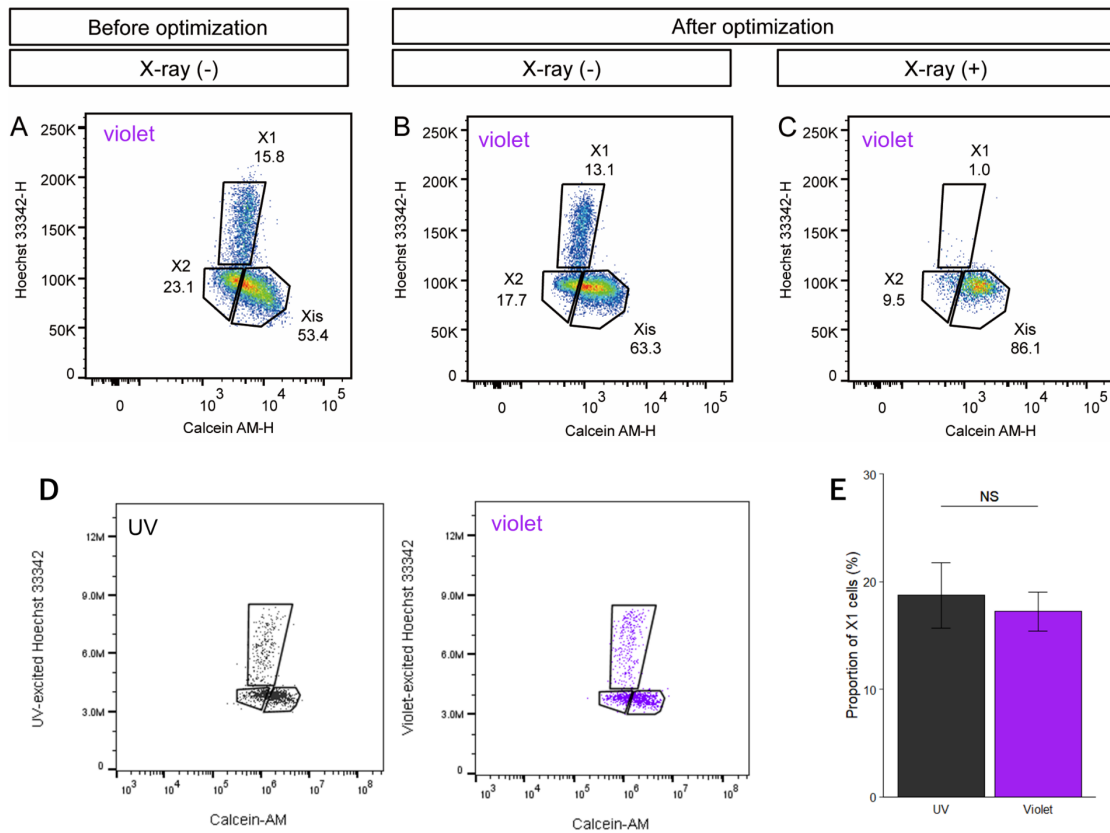


図2 プラナリア FACS 解析において violet レーザーは UV レーザーと同等の結果を示す

(A-D) プラナリアから解離した細胞を Hoechst 33342 および Calcein-AM によって染色後の FACS 密度プロット。Hoechst 33342 の UV または violet レーザーによる励起における比較を行った。

(A) violet レーザーへの最適化を行う前の X 線非照射個体のプロファイル

(B) violet レーザーへの最適化を行った後の X 線非照射個体のプロファイル

(C) violet レーザーへの最適化後かつ X 線照射個体(照射後 7 日)のプロファイル

(D) UV または violet レーザーで励起した時の FACS プロファイルの比較

(E) UV または violet レーザーで励起された X1 細胞の割合の比較。平均±標準誤差で示した

(Student's *t*-test, $p = 0.5094$, NS = not significant, $n = 3$)。

遺伝子発現による FACS 分画の特徴付け

violet レーザーによって励起された X1/X2/Xis 細胞の遺伝子発現を特徴付けるために、定量的逆転写 PCR(qRT-PCR)によって、aPSCs マーカー遺伝子と分化組織マーカー遺伝子の発現について解析した。*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)*をハウスキーピング遺伝子として正規化を行い、遺伝子発現量を算出した。X1 細胞については、幹細胞関連遺伝子である *piwiA* (Reddien et al., 2005; Yoshida-Kashikawa et al., 2007; Hayashi et al., 2010; Shibata et al., 2012)と細胞周期関連遺伝子群の *proliferating cell nuclear antigen (pcna)*, *minichromosome maintenance complex component-2 (mcm2)*, *mcm3* (Salveti et al., 2000; Orii et al., 2005; Hayashi et al., 2010)が顕著に発現していた(図 3A, 3B)。一方で、Xis 細胞では神経細胞マーカー遺伝子の *Prohormone Convertase 2 (PC2)*と *synaptotagmin (syt)* (Agata et al., 1998; Tazaki et al., 1999)、筋肉細胞マーカー遺伝子 *Myosin Heavy Chain (MHC)-A* と *MHC-B* (Kobayashi et al., 1998; Cebrià et al., 1999; Orii et al., 2002)の高発現を確認した(図 3A, 3B)。X2 細胞は3つの分画では中程度の幹細胞関連遺伝子と分化組織マーカー遺伝子の発現を示した(図 3A, 3B)。UV レーザーで励起されて分取された X1/X2/Xis 細胞の結果(Hayashi et al., 2006)と同様の結果が得られたことで、violet レーザーを用いた FACS 解析においても X1/X2/Xis 分画が分取できることが裏付けられた。

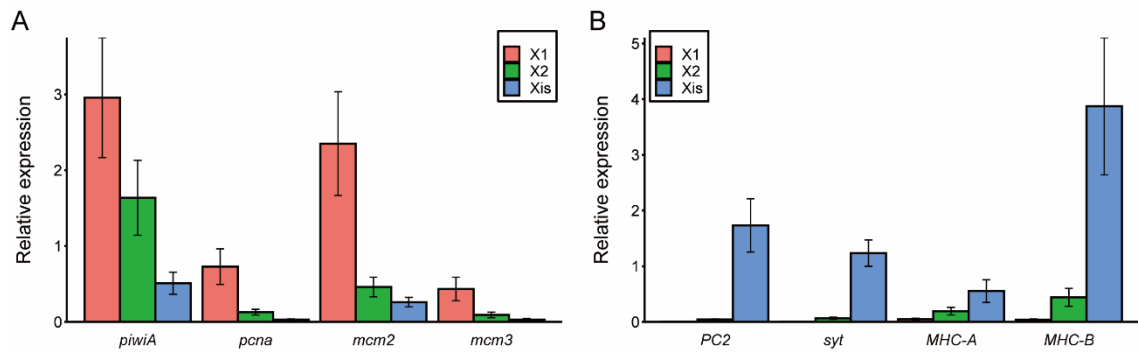


図3 violet レーザーによって励起された X1/X2/Xis 細胞の分子的特徴付け

(A, B) FACS でソーティングした X1/X2/Xis 細胞をそれぞれ qRT-PCR によって各遺伝子の発現量を解析した。各発現量は *G3PDH* によって標準化し、平均±標準誤差(n=3)で示した。

(A) 幹細胞関連遺伝子である *piwiA*, *pcna*, *mcm2*, *mcm3* の発現量の相対比較。

(B) 分化組織マーカー遺伝子である *PC2*, *syt*, *MHC-A*, *MHC-B* の発現量の相対比較。

violet レーザーを用いた FACS でソートした細胞の単一細胞トランスクリプトーム解析における品質評価

単一細胞トランスクリプトーム解析における violet レーザーで励起された X1/X2/Xis 細胞の品質評価として、細胞の生存率を計測した。細胞調製の過程でダメージを受けた細胞は、mRNA そのものの分解や ambient RNA による不正確な mRNA バーコーディングをもたらすと考えられるため、細胞の生存率の Quality control (QC)は重要である。そこで、propidium iodide (PI)蛍光色素によって、FACS ソーティング後の各分画の細胞を染色して生存率を定量化した。算出された生存率はそれぞれ、X1 が 93%, X2 が 89%, Xis が 84%であり(図 4A, 4B)、violet レーザーを用いた FACS で効率的に生細胞を単離できていると示唆された。しかし、これらの細胞でそれぞれ scRNA-seq の解析を行い、リードのマッピング後の QC を実行すると想定外の結果が得られた。10× Genomics Chromium platform を用いた scRNA-seq では、mRNA と単一の細胞が正確にバーコーディングされているか評価する指標の一つとして“fraction reads in cells”がある。X1 細胞におけるこの値は 80.5%であったが、X2 細胞では 68.2%まで減少し、正しくバーコーディングされていないリードの割合が増えている(図 4C)。Xis 細胞のライブラリではさらに下がって 52.6%となった(図 4C)。以上の結果は、violet レーザーを用いた FACS による細胞の精製法は、scRNA-seq 解析において、aPSCs を含む X1 細胞では良好な品質のライブラリが構築できるものの、分化細胞を含む X2 および Xis 細胞では改善の余地があることを示唆した。

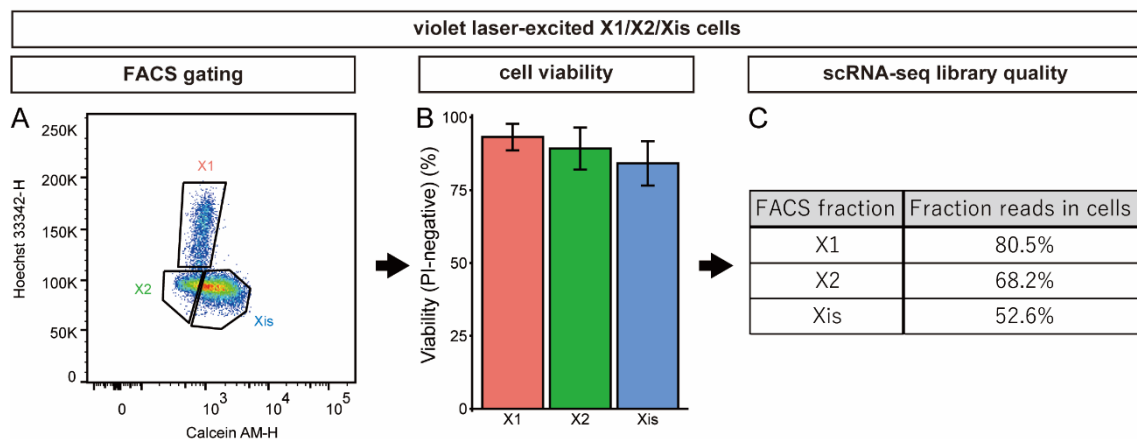


図 4 violet レーザーによって励起された X1/X2/Xis 細胞の scRNA-seq における品質評価

(A) 生存率の計測および scRNA-seq に用いた細胞の FACS ゲーティングプロファイル。

(B) FACS ソーティング直後における X1/X2/Xis 細胞の生存率の比較。PI 染色を行い、PI 陰性細胞を生存細胞(平均±標準誤差, n = 3)としてカウントした。

(C) X1/X2/Xis 細胞における scRNA-seq ライブラリをリファレンスゲノム配列にマッピング後に算出した “fraction reads in cells” の比較。

scRNA-seq のための FACS ソーティング法の確立に向けて

分化細胞においても scRNA-seq におけるライブラリの品質を向上させるために、FACS プロファイルに着目して、細胞分取の過程を改良した。Hoechst 33342 と calcein-AM で染色した後に violet レーザーを使った FACS による細胞分取の過程で、FSC (forward scatter) -A (Area) 対 SSC (side scatter) -A プロットによって、壊死組織片（デブリ）や死細胞が含まれる分画と生細胞が含まれる分画が明確な 2 つの分画に分けられていることが分かった(図 5A)。FSC の輝度は細胞の大きさ、SSC は細胞内部構造の複雑さを反映する。それぞれの分画についてイメージングセルソーター (BD 社製 FACS Discover S8) を用いた細胞形態の観察から(図 5B)、デブリ分画には不定形の組織片が多数確認された。一方で生細胞の分画では、丸い形の典型的な生細胞が観察された。生細胞分画における PI 陽性細胞の割合はわずか 3% と非常に低いこと(図 5C, 5D)からも、生細胞だけが上手くゲーティング出来ていることを裏付けた。

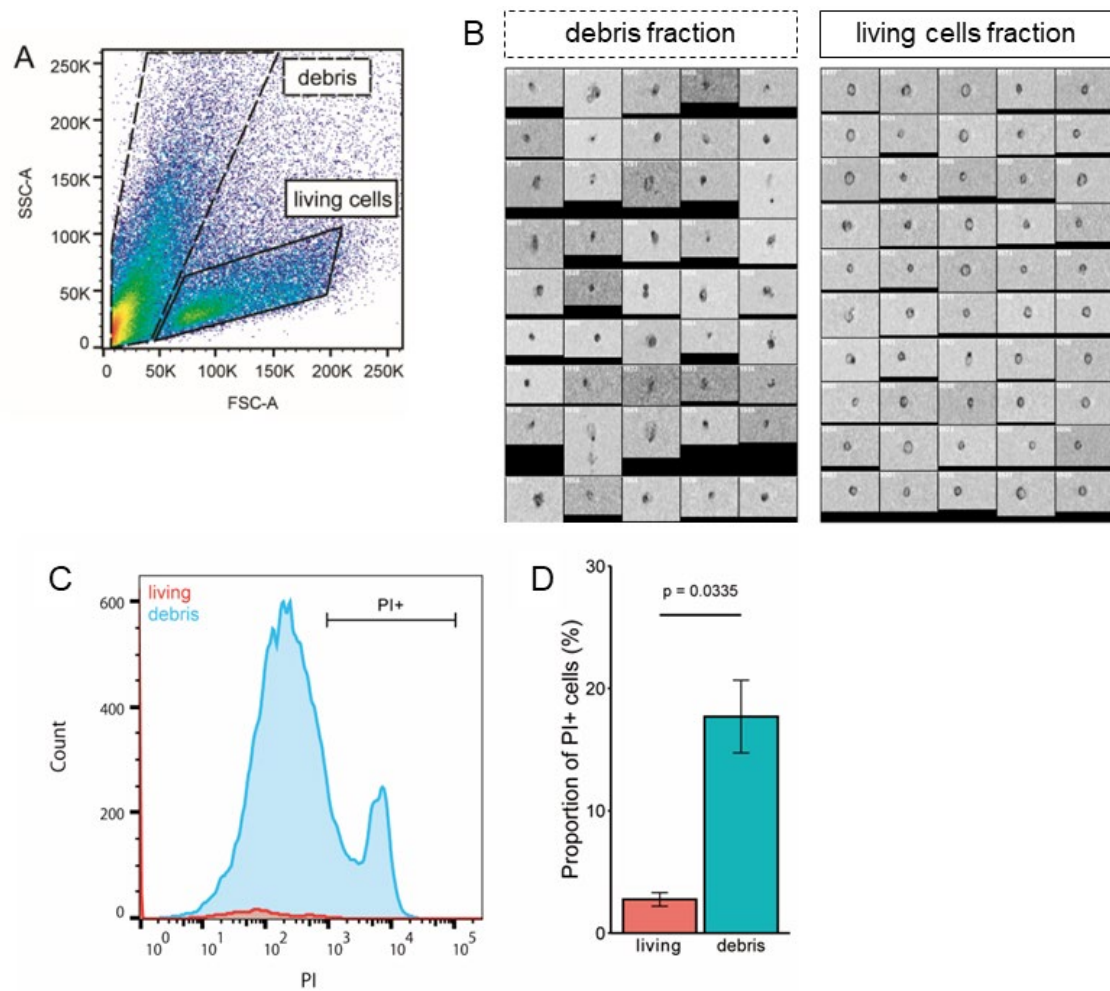


図5 FACSゲーティングによる生存細胞と死細胞の効率的な分離

(A) Hoechst および Calcein AM によって染色後の細胞懸濁液の FACS 密度プロット。

(B) イメージングセルソーターを用いた FACS 解析中の細胞形態の観察。

(C) 生細胞分画とデブリ分画における PI 染色蛍光の FACS 解析。

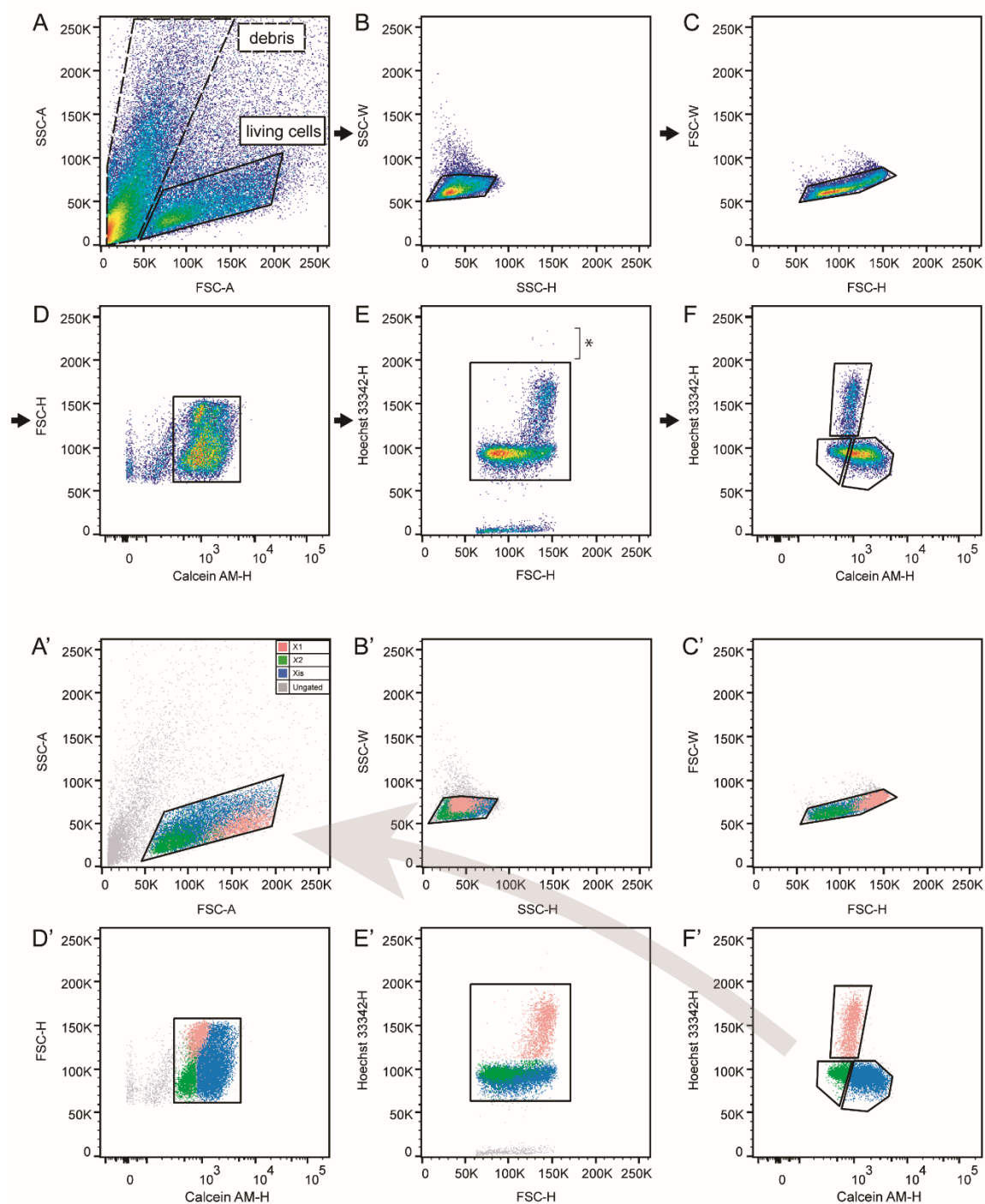
(D) 図 5C から算出された PI 陽性細胞(平均 \pm 標準誤差, $n = 3$)の割合の比較(Student's t -test)。

FACS プロファイルにおける各細胞分画の分布と特徴付け

次に、Hoechst 33342 と calcein-AM で染色をした上で得られたこの生細胞分画について、各種 FACS パラメーターを用いて詳細な分析を行った。具体的には、まずは生細胞分画を同定(図 6A)した後に、SSC と FSC の width パラメーター(W)を使用したダブルットの除去を行った(図 6B, 6C)。生体から解離した組織では特に細胞凝集体が含まれることが予想され、この手順は単一細胞による適切なプロット情報を得る上で重要である。さらに、細胞膜と核を確実に保持した細胞を得るために、calcein-AM と Hoechst 33342 が二重陽性細胞をゲーティングした(図 6D, 6E)。細胞ダメージによって細胞質が流出したり、核を失ったりした細胞は、calcein-AM 陰性または Hoechst 33342 陰性分画に分布した。また、SSC-W と FSC-W によるゲーティングに加えて、Hoechst のゲーティングも DNA 量の情報に基づいた細胞凝集体の除去に役立っていた(図 6E、アスタリスク)。最終的に、calcein-AM 対 Hoechst 33342 によるゲーティングを設定することで、X1、X2、Xis 分画が同定された(図 6F)。

FACS 解析ソフトウェアのバックゲーティング機能を使って、X1/X2/Xis 細胞の FACS プロットにおける由来を追跡した(図 6A'-6F')。図の見方は、X1/X2/Xis 細胞をそれぞれ異なる三色で染め分けてから(図 6F'、X1: マゼンタ、X2: 緑、Xis: 青)、各段階の FACS プロット上に X1、X2、Xis 細胞がどこに分布するのかを表現した。その結果、生細胞分画においても、三種類の細胞が上手く染め分けられるように分布していることが判明した(図 6A')。具体的には、X1 細胞(マゼンタ)は FSC 輝度(細胞の大きさを反映)の高い分画に、X2 細胞(緑)は FSC 輝度の低い集団として分布していた。X1 細胞は FSC 輝度の高い分画に集中し、X2 細胞は FSC 輝度の低い集団として分布していた。これらの細胞分布の違いは、G0/G1 期の X2 細胞が S/G2/M 期の X1 細胞へ細胞周期の進行に伴って、細胞の大きさが拡大する特性を反映していると考えられた。先行研究においても、X1 細胞と X2 細胞における細胞分布の違いは報告されている(Hayashi et al., 2006; Higuchi et al., 2007)。さらに、多くの Xis 細胞(青)が X1 または X2 細胞よりも SSC 輝度のより高い分画に分布していることがわかった。

これは細胞分化が進行する間に細胞内のオルガネラが発達し、細胞内粒度が増したことを示唆している(Higuchi et al., 2007; Mohamed et al., 2021)。



(図 6 説明文は次頁に続く)

図 6 単一細胞に分散された X1/X2/Xis 細胞を分取するための FACS ゲーティングとバックゲーティング解析

- (A) まず初めにプラナリア組織から解離した細胞を forward scatter (FSC, 細胞サイズを反映) 対 side scatter (SSC, 細胞内粒度を反映) パラメーターで展開し、生細胞をゲーティングした(実線)。死細胞分画は破線で示した。
- (B) SSC-H 対 SSC-W によるダブレット除去。
- (C) FSC-H 対 FSC-W によるダブレット除去。
- (D) calcein-AM 蛍光による細胞質を保持した細胞のゲーティング。
- (E) Hoechst 33342 蛍光に基づく核を保持し、かつ非ダブレット細胞のゲーティング。アスタリスクはダブレット集団を示す。
- (F) Calcein-AM 対 Hoechst 33342 によって同定した X1/X2/Xis 分画。
- (A'-F') A-F に対応した X1(ピンク色)、X2(緑色)、Xis(青色)、非ゲーティング細胞(灰色)のそれぞれの由来を示したバックゲーティングプロット。

無染色の細胞調製による single-cell RNA-sequencing の品質向上

FACS のバックゲーティング機能を用いた解析から、X1/X2/Xis 細胞はゲーティングの出発点である FSC-A 対 SSC-A ゲートにおいて、既に分布がおおまかに分離していることがわかった(図 6A')。そこで、細胞調製時の細胞へのダメージを最小限にするために、さらに無染色による迅速な細胞分取法の確立を試みた。蛍光染色せずに、細胞解離後すぐに FACS にかけたことで、死細胞やデブリ分画の割合が激減することがわかった(図 7A、cf. 図 6A')。次に、先のバックゲーティングの結果に基づき FACS のゲーティングを FSC の大きな分画(X1 細胞を含む)と小さな分画(X2 細胞を含む)の二つに分けて設定した(図 7A)。続いて、それぞれの分画はダブレット除去のゲーティング(FSC-H 対 FSC-W および SSC-H 対 SSC-W)を行ってから、ソーティングした。核および細胞質染色を行う前述の方法に比べて、無染色でのソーティングは、ほとんど全ての細胞が PI 染色陰性の生存細胞であり、両方の分画で生存率の向上が見られたことから (図 7B)。そして、scRNA-seq のバーコーディング品質指標である“fraction reads in cells”についても、80%以上に改善された(図 7C)。したがって、無染色細胞ソーティングによって aPSCs と分化細胞の両方で高い生存率で生細胞を分取することが可能になり、精度高く mRNA と細胞がバーコーディングされた scRNA-seq 解析が可能になった。

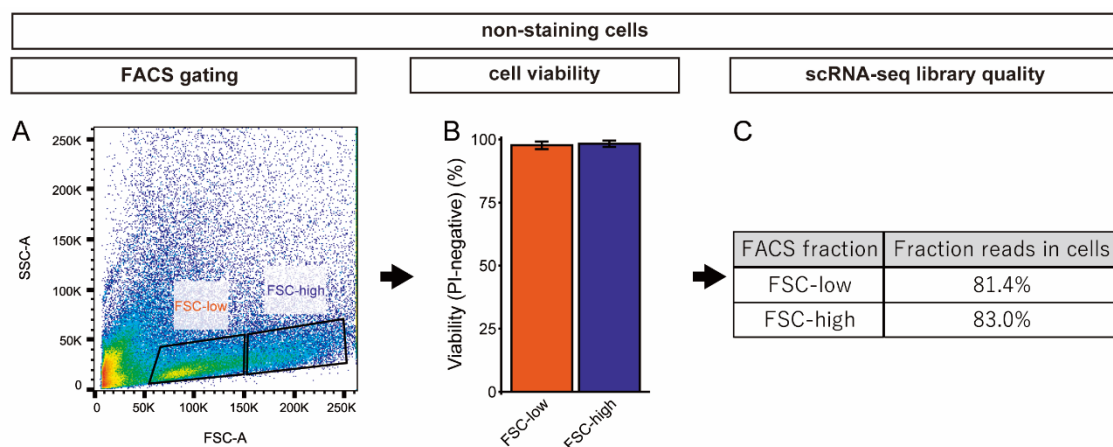


図 7 single-cell RNA-seq における細胞品質を改善した無染色細胞分取法を確立

- (A) 無染色の細胞分取法に用いた FACS ゲーティング。FSC 輝度で細胞分画を 2 つに分割した(FSC-low と FSC-high)。
- (B) FACS ソーティング直後における FSC-low/high 細胞の生存率の比較。PI 染色を行い、PI 陰性細胞を生存細胞(平均±標準誤差, n = 3)としてカウントした。
- (C) FSC-low/high 細胞における scRNA-seq ライブラリをリファレンスゲノム配列にマッピング後に算出した “fraction reads in cells” の比較。

考察

発生生物学、免疫学、腫瘍学などの分野において、免疫担当細胞の表現型解析、細胞周期解析、単一細胞遺伝子発現解析など様々な研究手法が FACS を基盤技術としている (Kang et al., 2009; Jensen et al., 2021; Bose et al., 2023)。特に遺伝子発現解析の分野では、トランスクリプトームとエピゲノムや、トランスクリプトームと空間情報のようなマルチオミクス解析 (Mantri et al., 2021; Khateb et al., 2022; Keuls et al., 2023; Cui et al., 2023) を用いて、新しい科学的知見が蓄積されつつある。単一細胞マルチオミクス解析は細胞種特異的な遺伝子発現を明らかにすることによって、組織における細胞集団の不均一性や遺伝子発現ネットワーク、細胞状態の遷移などの理解に寄与している。本研究成果においては、プラナリアの成体から scRNA-seq を行うことに向けて、FACS による生存した幹細胞と分化細胞を単離する手法を確立し、前述のオミクス技術に対しても活用が期待される。

本研究では、プラナリアの aPSCs を単離する FACS 解析で使われる Hoechst 33342 の励起に、violet レーザーの有効性を確認し、より汎用的なセルソーターで FACS 解析が可能であることを示した。FACS の光源として使われる violet レーザーは UV の代わりや多色解析にしばしば使われている。Hoechst 33342 の励起には、UV の代わりに violet レーザーを使用した時には、励起効率は 5% 以下まで減少するものの、X1 分画を同定する上では十分な蛍光シグナルを保持していた (図 2A-C)。violet レーザーを用いてプラナリアの FACS 解析を行う過程で、calcein-AM の濃度が FACS プロファイルでの細胞分布に影響を与えていることを見出した (図 2A, 2B)。calcein-AM は violet レーザーによってわずかに励起されて (1%)、Hoechst 33342 の蛍光に漏れこんでいたと考えられる。しかし、calcein-AM 濃度を下げたことと蛍光補正を適切に設定したことによって正しい形の FACS プロファイルが得られ、UV レーザーを使用せずにプラナリア aPSCs を分取することができた。実際に、この手法は最近の研究で細胞周期解析を行うために使用され (Sato et al., 2022b)、有効性を示している。aPSCs に加えて、神経細胞においても、Hoechst 33258 と Merocyanine 540 染色と FACS によ

る精製方法が確立されていることから(Asami et al., 2002; Inoue et al., 2007)、本研究結果の応用が期待される。

Violet レーザーの使用によって定義された X1/X2/Xis 細胞は、qRT-PCR によってそれぞれ特性の異なる細胞集団であることを確認した(図 3A, 3B)。細胞増殖マーカー遺伝子(*pcna*, *mcm2*, *mcm3*)の発現量は X2 および Xis よりも X1 細胞で高く、遺伝子発現と Hoechst 蛍光によって推定された DNA 量との間に相関が示された。一方で、神経細胞と筋肉細胞を含む分化組織細胞のマーカー遺伝子(*PC2*, *syt*, *MHC-A*, *MHC-B*)は Xis 細胞で発現上昇していた。先行研究(Hayashi et al., 2006)と似た細胞集団を分取出来ていると考えられる。

violet レーザーで励起された X1/X2/Xis 細胞は、いずれも 80%以上の PI 陰性細胞であったため、scRNA-seq への適用が可能であると予想した。しかし、実際には X1 細胞では問題なくライブラリが調製できたものの、X2 と Xis 細胞のライブラリ品質は低く、the fraction of reads (mRNA が正確にバーコーディングされた割合)がそれぞれ 68.2%と 52.6%であった。プラナリア組織細胞における核染色の毒性に関して、核染色は細胞の増殖活性と生存率を減少させることが示唆されている(Ishida et al., 2023)。scRNA-seq 解析においても、死細胞由来の ambient RNA がデータ解析においてノイズになることが報告されている(Janssen et al., 2023; Xi et al., 2023)。したがって、ライブラリ調製の過程では、生細胞を更に純度良く精製することが求められた。さらに、プラナリアの全身組織の細胞アトラスを構築し、細胞の多能性や細胞分化のメカニズムを理解するためには、幹細胞と分化細胞の両方を解析する必要がある。そこで、scRNA-seq を行うための、生存した幹細胞および分化細胞を精製する無染色細胞分取法を確立した。FACS プロットでの X1/X2/Xis 細胞の由来を追跡(バックゲーティング)した結果が細胞ソーティングをより単純にし、細胞ダメージを最小限にするのに役立った(図 6)。バックゲーティング解析の結果、FSC 対 SSC プロットにおいて、X1 細胞と X2 細胞はそれぞれ異なる細胞分画に分布していることが分かった(図 6A')。そして、ソーティングの単純化(細胞の無染色)と細胞調製時間の短縮が scRNA-seq 解析の品質を改

善した。例として、デブリ分画の割合は細胞染色を行わないことで減少していた(図 6A, 7A)。さらに、the fraction of reads の値も無染色による細胞調製では向上していた(図 7C)。これらの結果から、分化細胞における scRNA-seq のライブラリの品質は、細胞染色と調製時間による影響を強く受けることを示唆した。本研究の無染色細胞分取法は幹細胞だけでなく分化細胞についても scRNA-seq の解析を可能にした。そして、無染色によって生細胞だけを FACS で精製する方法は、今後プラナリアだけでなく、多くの生物種の scRNA-seq に適用されるようになるものと推測される。

プラナリアでは、FACS によって標的細胞を単離するのに有効な細胞表面マーカーの抗体が限られている。しかし、別種のプラナリアである *Schmidtea mediterranea* では、レポーター遺伝子のような外来遺伝子の導入が可能になっている(Hall et al., 2022)。本研究で確立された細胞分取法は、目的遺伝子の標識技術と組み合わせることで、より標的細胞を絞った発展的な解析に応用が期待される。それに加えて、シンプルな無染色ソーティング法は、プラナリアに限らず、強固に接着した組織やオルガノイドなどから生細胞を単離する時にも適応可能であると考ええる。

第二章

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分子的特徴付け

第三章

ERK と GSK シグナル経路の阻害による幹細胞への影響

第二章および第三章については、未発表データを含むため、本要約では記載を省略する。

実験材料と方法

プラナリアの維持

プラナリア *Dugesia japonica* の無性生殖個体である SSP 系統(Nishimura et al., 2015)を、21°C に設定したインキュベーター内で、脱塩素された水道水で維持した(Mori et al., 2019)。ニワトリのレバーを週 2 回与え、実験前には 1 週間以上絶食した個体を使用した。

FACS

体長 8 mm の個体 10 匹を氷上にてメスで細かい断片になるまで刻み、5/8 Holtfreter's solution (37 mM NaCl, 0.42 mM KCl, 1.5 mM NaHCO₃, 0.57 mM CaCl₂, pH 7.4)に懸濁した。Trypsin (Nacalai)を終濃度 0.1%になるように加え、21°Cで 5 分間転倒混和を行った。wide bore tip を用いて 60 回ピペッティングした。90 × g、4°C、3 分間の遠心で Trypsin solution を洗浄した。細胞ペレットは 1 mL の 5/8 Holtfreter's solution に再懸濁し、30 μm および 20 μm のセルストレーナー(Sysmex)を通した。X1/X2/Xis 分画の同定には、18 μg/mL Hoechst 33342 (DOJINDO)および 0.1 μg/mL Calcein-AM (Sigma)の染色条件で、暗所の 21°Cで 2 時間静置した。サンプルは FACS Melody (Becton Dickinson)によって解析し、図 6 で示したようにゲーティングを設定した。FACS Melody での解析では、Hoechst 33342 の蛍光の励起光に 405 nm violet laser、calcein-AM には 488 nm blue laser を用いた。scRNA-seq の実験には、細胞染色を行わずに、FSC-A 対 SSC-A プロットで展開し、生細胞分画を FSC-A 輝度によって 2 つに分けて、それぞれの分画をダブレット除去(SSC-H 対 SSC-W、FSC-H 対 FSC-W によるゲーティング)した後にソーティングした。FACS 解析中の細胞の形態観察には、イメージングセルソーターFACS Discover S8 (Becton Dickinson) の CellView 機能を用いた。

X 線照射

SOFTEX B-4 (SOFTEX)を用いて、致死量の場合は 150 R、亜致死量の場合は 3.5 R の X 線を照射した。

qRT-PCR

FACS でソーティングした細胞(約 150,000 細胞)またはプラナリア個体(1-5 匹)について、ISOGEN-LS (Nippon Gene)を用いて、マニュアルに従って total RNA を抽出した。cDNA は QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN)を使用して、マニュアルに従い合成を行った。Total RNA から合成した cDNA を鋳型とした。プライマーセットは先行研究と同じものを使用した(Hayashi et al., 2010; Takano et al., 2007)。PCR 反応液組成は、1× QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix (QIAGEN), 0.6 μM 遺伝子特異的プライマー, cDNA を含む。qPCR 解析は、50°C 2 分、95°C 15 分、(1) 95°C 15 秒、(2) 60°C 30 秒、(3) 72°C 1 分 ((1)から(3)を 50 サイクル)の設定で行い、*G3PDH* または *α-tubulin* の発現量を内部標準として $\Delta\Delta C_t$ 法による比較定量を行った。

10× Chromium ライブラリの構築

FACS で分取した細胞を 700-1,200 cells/μL に調製し、約 16,500 細胞を Chip にロードした。Chromium Single Cell 3' v3.1 chemistry (10× Genomics)を使用し、マニュアルに従ってライブラリを構築した。最終的にライブラリは Illumina Novaseq にて 150 bp paired-end のシーケンシングを行なった。次世代シーケンシングの結果、3,168,239,737 リードを得た。

scRNA-seq のバイオインフォマティクス解析

次世代シーケンシングによって得られたリードは、Cell Ranger software (10× Genomics, v6.1.2)を使用して、デフォルトのパラメーターで、ゲノムリファレンス配列(An et al., 2018, <http://planarian.jp/>)にマッピングを行い、UMI をカウントした。マッピングの結果、1 細胞あたり平均 135,901 リード、平均 1,279 遺伝子、5,756 UMIs が検出された。

謝辞

本研究の遂行にあたり、指導教員として大変お世話になりました阿形清和博士に感謝申し上げます。

単一細胞トランスクリプトーム解析については、郷康広博士、辰本将司博士、石川裕恵氏にお世話になりました。感謝申し上げます。

授業科目の生命科学プロGRESSとして、重信秀治博士、小山宏史博士、野中茂紀博士、大野薫博士、四方明格博士には、研究の進捗について多くの議論をして頂きました。感謝を申し上げます。

本研究は日本科学研究会の笹川科学研究助成および日本学術振興会の特別研究員制度による助成を受けたものです。

最後に、大学院での生活面を支えて頂いた両親に感謝致します。

参考文献

- Agata, K., Soejima, Y., Kato, K., Kobayashi, C., Umesono, Y. & Watanabe, K. (1998). Structure of the planarian central nervous system (CNS) revealed by neuronal cell markers. *Zoological Science*, 15(3), 433-440. <https://doi.org/10.2108/zsj.15.433>
- Agata, K., Tanaka, T., Kobayashi, C., Kato, K. & Saitoh, Y. (2003). Intercalary regeneration in planarians. *Developmental Dynamics*, 226(2), 308-316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/dvdy.10249>
- Agata, K. & Watanabe, K. (1999). Molecular and cellular aspects of planarian regeneration. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 10(4), 377-383. <https://doi.org/10.1006/scdb.1999.0324>
- An, Y., Kawaguchi, A., Zhao, C., Toyoda, A., Sharifi-Zarchi, A., Mousavi, S. A., Bagherzadeh, R., Inoue, T., Ogino, H., Fujiyama, A., Chitsaz, H., Baharvand, H. & Agata, K. (2018). Draft genome of *Dugesia japonica* provides insights into conserved regulatory elements of the brain restriction gene nou-darake in planarians. *Zoological Letters*, 4, 24. <https://doi.org/10.1186/s40851-018-0102-2>
- Asami, M., Nakatsuka, T., Hayashi, T., Kou, K., Kagawa, H. & Agata, K. (2002). Cultivation and characterization of planarian neuronal cells isolated by fluorescence activated cell sorting (FACS). *Zoological Science*, 19(11), 1257-1265. <https://doi.org/10.2108/zsj.19.1257>
- Auladell, C., Garcia-Valero, J. & Baguñà, J. (1993). Ultrastructural localization of RNA in the chromatoid bodies of undifferentiated cells (neoblasts) in planarians by the RNase-gold complex technique. *Journal of Morphology*, 216(3), 319-326. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jmor.1052160307>
- Bose, B., Nihad, M. & P, S. S. (2023). Pluripotent stem cells: Basic biology or else differentiations aimed at translational research and the role of flow cytometry. *Cytometry A*. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24726>
- Cebrià, F., Bueno, D., Reigada, S. & Romero, R. (1999). Intercalary muscle cell renewal in planarian pharynx. *Development Genes and Evolution*, 209(4), 249-253. <https://doi.org/10.1007/s004270050249>

- Cui, G., Dong, K., Zhou, J.-Y., Li, S., Wu, Y., Han, Q., Yao, B., Shen, Q., Zhao, Y.-L., Yang, Y., Cai, J., Zhang, S. & Yang, Y.-G. (2023). Spatiotemporal transcriptomic atlas reveals the dynamic characteristics and key regulators of planarian regeneration. *Nature Communications*, 14(1), 3205. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39016-0>
- Davies, E. L., Lei, K., Seidel, C. W., Kroesen, A. E., McKinney, S. A., Guo, L., Robb, S. M. C., Ross, E. J., Gotting, K. & Alvarado, A. S. (2017). Embryonic origin of adult stem cells required for tissue homeostasis and regeneration. *eLife*, 6, e21052. <https://doi.org/10.7554/eLife.21052>
- Egger, B., Steinke, D., Tarui, H., De Mulder, K., Arendt, D., Borgonie, G., Funayama, N., Gschwentner, R., Hartenstein, V., Hobmayer, B., Hooze, M., Hroudá, M., Ishida, S., Kobayashi, C., Kualess, G., Nishimura, O., Pfister, D., Rieger, R., Salvenmoser, W., Smith, J., III, Technau, U., Tyler, S., Agata, K., Salzburger, W. & Ladurner, P. (2009). To Be or Not to Be a Flatworm: The Acoel Controversy. *PLOS ONE*, 4(5), e5502. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005502>
- Evans, M. J. & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154-156. <https://doi.org/10.1038/292154a0>
- Farrell, J. A., Wang, Y., Riesenfeld, S. J., Shekhar, K., Regev, A. & Schier, A. F. (2018). Single-cell reconstruction of developmental trajectories during zebrafish embryogenesis. *Science*, 360(6392), eaar3131. <https://doi.org/doi:10.1126/science.aar3131>
- Fincher, C. T., Wurtzel, O., de Hoog, T., Kravarik, K. M. & Reddien, P. W. (2018). Cell type transcriptome atlas for the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Science*, 360(6391). <https://doi.org/10.1126/science.aag1736>
- García-Castro, H., Kenny, N. J., Iglesias, M., Álvarez-Campos, P., Mason, V., Elek, A., Schöner, 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), 89. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02302-5>
- Hall, R. N., Weill, U., Drees, L., Leal-Ortiz, S., Li, H., Khariton, M., Chai, C., Xue, Y., Rosental, B., Quake, S. R., Sánchez Alvarado, A., Melosh, N. A., Fire, A. Z., Rink, J. C. & Wang, B. (2022). Heterologous reporter expression in the planarian *Schmidtea mediterranea* through

- somatic mRNA transfection. *Cell Reports Methods*, 2(10), 100298. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2022.100298>
- Hayashi, T. & Agata, K. (2018). A Subtractive FACS Method for Isolation of Planarian Stem Cells and Neural Cells. *Methods in Molecular Biology*, 1774, 467-478. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7802-1_19
- Hayashi, T., Asami, M., Higuchi, S., Shibata, N. & Agata, K. (2006). Isolation of planarian X-ray-sensitive stem cells by fluorescence-activated cell sorting. *Development, Growth & Differentiation*, 48(6), 371-380. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2006.00876.x>
- Hayashi, T., Shibata, N., Okumura, R., Kudome, T., Nishimura, O., Tarui, H. & Agata, K. (2010). Single-cell gene profiling of planarian stem cells using fluorescent activated cell sorting and its "index sorting" function for stem cell research. *Development, Growth & Differentiation*, 52(1), 131-144. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2009.01157.x>
- Higuchi, S., Hayashi, T., Hori, I., Shibata, N., Sakamoto, H. & Agata, K. (2007). Characterization and categorization of fluorescence activated cell sorted planarian stem cells by ultrastructural analysis. *Development, Growth & Differentiation*, 49(7), 571-581. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2007.00947.x>
- Inoue, T., Hayashi, T., Takechi, K. & Agata, K. (2007). Clathrin-mediated endocytic signals are required for the regeneration of, as well as homeostasis in, the planarian CNS. *Development*, 134(9), 1679-1689. <https://doi.org/10.1242/dev.02835>
- Ishida, M., Kuroki, Y. & Agata, K. (2023). Establishment of a new method to isolate viable x-ray-sensitive cells from planarian by fluorescence-activated cell sorting. *Development, Growth & Differentiation*, 65(9), 577-590. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/dgd.12886>
- Janssen, P., Kliesmete, Z., Vieth, B., Adiconis, X., Simmons, S., Marshall, J., McCabe, C., Heyn, H., Levin, J. Z., Enard, W. & Hellmann, I. (2023). The effect of background noise and its removal on the analysis of single-cell expression data. *Genome Biology*, 24(1), 140. <https://doi.org/10.1186/s13059-023-02978-x>
- Jensen, H. A. & Wnek, R. (2021). Analytical performance of a 25-marker spectral cytometry immune monitoring assay in peripheral blood. *Cytometry Part A*, 99(2), 180-193. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cyto.a.24290>

- Kang, H. & Sánchez Alvarado, A. (2009). Flow cytometry methods for the study of cell-cycle parameters of planarian stem cells. *Developmental Dynamics*, 238(5), 1111-1117. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21928>
- Kanton, S., Boyle, M. J., He, Z., Santel, M., Weigert, A., Sanchís-Calleja, F., Guijarro, P., Sidow, L., Fleck, J. S., Han, D., Qian, Z., Heide, M., Huttner, W. B., Khaitovich, P., Pääbo, S., Treutlein, B. & Camp, J. G. (2019). Organoid single-cell genomic atlas uncovers human-specific features of brain development. *Nature*, 574(7778), 418-422. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1654-9>
- Karaiskos, N., Wahle, P., Alles, J., Boltengagen, A., Ayoub, S., Kipar, C., Kocks, C., Rajewsky, N. & Zinzen, R. P. (2017). The Drosophila embryo at single-cell transcriptome resolution. *Science*, 358(6360), 194-199. <https://doi.org/doi:10.1126/science.aan3235>
- Kashima, M., Komura, R., Sato, Y., Hashimoto, C. & Hirata, H. (2023). A resource of single-cell gene expression profiles in a planarian *Dugesia japonica*. *Development, Growth & Differentiation*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/dgd.12893>
- Keuls, R. A., Oh, Y. S., Patel, I. & Parchem, R. J. (2023). Post-transcriptional regulation in cranial neural crest cells expands developmental potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(6), e2212578120. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.2212578120>
- Khateb, M., Perovanovic, J., Ko, K. D., Jiang, K., Feng, X., Acevedo-Luna, N., Chal, J., Ciuffoli, V., Genzor, P., Simone, J., Haase, A. D., Pourquié, O., Dell’Orso, S. & Sartorelli, V. (2022). Transcriptomics, regulatory syntax, and enhancer identification in mesoderm-induced ESCs at single-cell resolution. *Cell Reports*, 40(7), 111219. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111219>
- Kobayashi, C., Kobayashi, S., Orii, H., Watanabe, K. & Agata, K. (1998). Identification of two distinct muscles in the planarian *Dugesia japonica* by their expression of myosin heavy chain genes. *Zoological Science*, 15(6), 861-869. <https://doi.org/10.2108/zsj.15.861>
- Lakin, N. D. & Jackson, S. P. (1999). Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*, 18(53), 7644-7655. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203015>
- Lambert, T. J. (2019). FPbase: a community-editable fluorescent protein database. *Nature Methods*, 16(4), 277-278. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0352-8>

- Mantri, M., Scuderi, G. J., Abedini-Nassab, R., Wang, M. F. Z., McKellar, D., Shi, H., Grodner, B., Butcher, J. T. & De Vlaminc, I. (2021). Spatiotemporal single-cell RNA sequencing of developing chicken hearts identifies interplay between cellular differentiation and morphogenesis. *Nature Communications*, 12(1), 1771. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21892-z>
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(12), 7634-7638. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.78.12.7634>
- Mittnenzweig, M., Mayshar, Y., Cheng, S., Ben-Yair, R., Hadas, R., Rais, Y., Chomsky, E., Reines, N., Uzonyi, A., Lumerman, L., Lifshitz, A., Mukamel, Z., Orenbuch, A.-H., Tanay, A. & Stelzer, Y. (2021). A single-embryo, single-cell time-resolved model for mouse gastrulation. *Cell*, 184(11), 2825-2842.e2822. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.004>
- Mohamed Haroon, M., Lakshmanan, V., Sarkar, S. R., Lei, K., Vemula, P. K. & Palakodeti, D. (2021). Mitochondrial state determines functionally divergent stem cell population in planaria. *Stem Cell Reports*, 16(5), 1302-1316. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.03.022>
- Mori, M., Narahashi, M., Hayashi, T., Ishida, M., Kumagai, N., Sato, Y., Bagherzadeh, R., Agata, K. & Inoue, T. (2019). Calcium ions in the aquatic environment drive planarians to food. *Zoological Letters*, 5, 31. <https://doi.org/10.1186/s40851-019-0147-x>
- Neiro, J., Sridhar, D., Dattani, A. & Aboobaker, A. (2022). Identification of putative enhancer-like elements predicts regulatory networks active in planarian adult stem cells. *eLife*, 11, e79675. <https://doi.org/10.7554/eLife.79675>
- Nishimura, O., Hosoda, K., Kawaguchi, E., Yazawa, S., Hayashi, T., Inoue, T., Umesono, Y. & Agata, K. (2015). Unusually Large Number of Mutations in Asexually Reproducing Clonal Planarian *Dugesia japonica*. *PLoS One*, 10(11), e0143525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143525>
- Orii, H., Ito, H. & Watanabe, K. (2002). Anatomy of the planarian *Dugesia japonica* I. The muscular system revealed by antisera against myosin heavy chains. *Zoological Science*, 19(10), 1123-1131. <https://doi.org/10.2108/zsj.19.1123>

- Orii, H., Kato, K., Agata, K. & Watanabe, K. (1998). Molecular Cloning of Bone Morphogenetic Protein (BMP) Gene from the Planarian. *Zoological Science*, 15(6), 871-877, 877.
- Orii, H., Sakurai, T. & Watanabe, K. (2005). Distribution of the stem cells (neoblasts) in the planarian *Dugesia japonica*. *Development Genes and Evolution*, 215(3), 143-157. <https://doi.org/10.1007/s00427-004-0460-y>
- Plass, M., Solana, J., Wolf, F. A., Ayoub, S., Misios, A., Glažar, P., Obermayer, B., Theis, F. J., Kocks, C. & Rajewsky, N. (2018). Cell type atlas and lineage tree of a whole complex animal by single-cell transcriptomics. *Science*, 360(6391), eaaq1723. <https://doi.org/doi:10.1126/science.aaq1723>
- Raz, A. A., Wurtzel, O. & Reddien, P. W. (2021). Planarian stem cells specify fate yet retain potency during the cell cycle. *Cell Stem Cell*, 28(7), 1307-1322.e1305. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.03.021>
- Reddien, P. W., Oviedo, N. J., Jennings, J. R., Jenkin, J. C. & Sánchez Alvarado, A. (2005). SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science*, 310(5752), 1327-1330. <https://doi.org/10.1126/science.1116110>
- Rouhana, L., Shibata, N., Nishimura, O. & Agata, K. (2010). Different requirements for conserved post-transcriptional regulators in planarian regeneration and stem cell maintenance. *Developmental Biology*, 341(2), 429-443. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.02.037>
- Salveti, A., Rossi, L., Deri, P. & Batistoni, R. (2000). An MCM2-related gene is expressed in proliferating cells of intact and regenerating planarians. *Developmental Dynamics*, 218(4), 603-614. [https://doi.org/10.1002/1097-0177\(2000\)9999:9999::aid-dvdy1016>3.0.co;2-c](https://doi.org/10.1002/1097-0177(2000)9999:9999::aid-dvdy1016>3.0.co;2-c)
- Sato, Y., Shibata, N., Hashimoto, C. & Agata, K. (2022a). Migratory regulation by MTA homologous genes is essential for the uniform distribution of planarian adult pluripotent stem cells. *Development, Growth & Differentiation*, 64(3), 150-162. <https://doi.org/10.1111/dgd.12773>
- Sato, Y., Umesono, Y., Kuroki, Y., Agata, K. & Hashimoto, C. (2022b). Proliferation maintains the undifferentiated status of stem cells: The role of the planarian cell cycle regulator Cdh1. *Developmental Biology*, 482, 55-66. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.12.006>

- Shibata, N., Hayashi, T., Fukumura, R., Fujii, J., Kudome-Takamatsu, T., Nishimura, O., Sano, S., Son, F., Suzuki, N., Araki, R., Abe, M. & Agata, K. (2012). Comprehensive gene expression analyses in pluripotent stem cells of a planarian, *Dugesia japonica*. *The International Journal of Developmental Biology*, 56(1-3), 93-102. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113434ns>
- Shibata, N., Rouhana, L. & Agata, K. (2010). Cellular and molecular dissection of pluripotent adult somatic stem cells in planarians. *Development, Growth & Differentiation*, 52(1), 27-41. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2009.01155.x>
- Shibata, N., Umesono, Y., Orii, H., Sakurai, T., Watanabe, K. & Agata, K. (1999). Expression of vasa(vas)-Related Genes in Germline Cells and Totipotent Somatic Stem Cells of Planarians. *Developmental Biology*, 206(1), 73-87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9130>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861-872. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663-676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takano, T., Pulvers, J. N., Inoue, T., Tarui, H., Sakamoto, H., Agata, K. & Umesono, Y. (2007). Regeneration-dependent conditional gene knockdown (Readyknock) in planarian: Demonstration of requirement for Djsnap-25 expression in the brain for negative phototactic behavior. *Development, Growth & Differentiation*, 49(5), 383-394. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2007.00936.x>
- Tazaki, A., Gaudieri, S., Ikeo, K., Gojobori, T., Watanabe, K. & Agata, K. (1999). Neural network in planarian revealed by an antibody against planarian synaptotagmin homologue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 260(2), 426-432. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0933>
- van den Brink, S. C., Alemany, A., van Batenburg, V., Moris, N., Blotenburg, M., Vivié, J., Baillie-Johnson, P., Nichols, J., Sonnen, K. F., Martinez Arias, A. & van Oudenaarden, A. (2020). Single-cell and spatial transcriptomics reveal somitogenesis in gastruloids. *Nature*, 582(7812), 405-409. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2024-3>

- van Wolfswinkel, J. C., Wagner, D. E. & Reddien, P. W. (2014). Single-cell analysis reveals functionally distinct classes within the planarian stem cell compartment. *Cell Stem Cell*, 15(3), 326-339. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.06.007>
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.1203983>
- Wolff, E. t. & Dubois, F. (1948). Sur la migration des cellules de régénération chez les Planaires. *Revue suisse de zoologie*, 55, 218-227. <https://doi.org/10.5962/bhl.part.117877>
- Xi, J., Park, S. R., Lee, J. H. & Kang, H. M. (2023). SiftCell: A robust framework to detect and isolate cell-containing droplets from single-cell RNA sequence reads. *Cell Systems*, 14(7), 620-628.e623. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cels.2023.06.002>
- Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Battle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P. & Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 453(7194), 519-523. <https://doi.org/10.1038/nature06968>
- Yoshida-Kashikawa, M., Shibata, N., Takechi, K. & Agata, K. (2007). DjCBC-1, a conserved DEAD box RNA helicase of the RCK/p54/Me31B family, is a component of RNA-protein complexes in planarian stem cells and neurons. *Developmental Dynamics*, 236(12), 3436-3450. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21375>
- Zeng, A., Li, H., Guo, L., Gao, X., McKinney, S., Wang, Y., Yu, Z., Park, J., Semerad, C., Ross, E., Cheng, L. C., Davies, E., Lei, K., Wang, W., Perera, A., Hall, K., Peak, A., Box, A. & Sánchez Alvarado, A. (2018). Prospectively Isolated Tetraspanin(+) Neoblasts Are Adult Pluripotent Stem Cells Underlying Planaria Regeneration. *Cell*, 173(7), 1593-1608.e1520. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.006>
- Zhu, S. J., Hallows, S. E., Currie, K. W., Xu, C. & Pearson, B. J. (2015). A mex3 homolog is required for differentiation during planarian stem cell lineage development. *eLife*, 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.07025>