

氏名	浅 見 真 紀
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	理 学
学位授与番号	博甲第2616号
学位授与の日付	平成15年 9月30日
学位授与の要件	自然科学研究科生命分子科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Isolation and characterization of planarian neurons and stem cells by fluorescence activated cell sorting (FACS) (プラナリアの神経細胞と幹細胞のセルソーターによる純化および同定)
論文審査委員	教授 香川 弘昭 教授 鎌田 堯 理化学研究所 阿形 清和

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

近年 RNA 干渉法などの開発によって遺伝子レベルでのプラナリアの研究が可能となった。しかし、遺伝子機能の詳細な解析のためには、遺伝子と個体レベルをつなぐ細胞レベルでの解析が不可欠であり、この点がプラナリアを使った研究のボトルネックとなっていた。本研究では、フルオレッセンス・アクティブイティッド・セルソーター(FACS)を用いることによって、より純度の高いプラナリア細胞集団の分取法の検討をおこなうとともに、細胞レベルでの解析を可能にする方法を開発した。従来の FACS による分取が、細胞表面の蛍光抗体を利用した方法であるのに対し、本研究においては、プラナリア解離細胞を一般の蛍光試薬で染色した後、プラナリアの個体の構造特性や細胞特性を利用した細胞の分取を試みた。その結果、細胞表面の特異抗体が無いプラナリアの細胞についても、特定の細胞種の選択的分取に成功するとともに、純化した細胞分画について、分子生物学的特徴づけや培養を行うことによって、以下のような新規な知見を得た。

第一に、プラナリアが頭部に神経細胞の塊からなる脳を持つことに着目し、頭部由来解離細胞と体幹部由来解離細胞の細胞構成の違いを FACS で比較解析して、プラナリアの脳神経細胞を高純度で分取することに成功した。また、分取した神経細胞の長期培養が可能となったことによって、プラナリアの神経細胞が培養基質依存的な神経形態や遺伝子発現を行うことを見出し、プラナリアの神経細胞が高い可塑性を有していることを明らかにした。

第二に、X 線照射によって幹細胞が特異的に消失する実験事実に基づいて、照射個体と、非照射個体由来の解離細胞を FACS 分画法で比較解析し、X 線照射によって特異的に消失する 2 つの細胞分画 (X1, X2) と、X 線非感受性の細胞分画 (XIS) の分取に成功した。細胞分画ごとの遺伝子発現解析や、レーザー・スキャニング・サイトメーター (LSC) による細胞周期解析により、X1、X2 細胞集団はそれぞれ増殖期・静止期の幹細胞集団に対応し、XIS 分画細胞集団は神経や筋肉などの分化細胞で構成されていることを明らかにした。更に、単一細胞レベルでの遺伝子発現解析により、プラナリアの幹細胞集団がヘテロな幹細胞集団である結果を得た。

本研究で確立された FACS を用いた新規な細胞分取法によって、プラナリアにおいても、遺伝子と個体レベルをつなぐ細胞レベルでの解析が可能となり、RNA 干渉法と細胞培養や FACS 解析を組み合わせることによって、より詳細な遺伝子機能解析が可能となった。

論文審査結果の要旨

プラナリアの高い再生能力を支える幹細胞システムを理解するには、幹細胞の単離精製が不可欠である。本研究はセルソーターを使ってプラナリアの幹細胞と思われる細胞集団の精製に成功した。これまでセルソーターを用いて細胞を選別する場合は、細胞表面マーカーで細胞を蛍光染色していたが、本実験では幹細胞がX線照射に対して感受性が高い性質を利用して、ヘキストやカルセインといった一般的な蛍光染色だけで選別した。すなわち、X線照射で特異的に消失する細胞分画を集めて幹細胞を精製した。また、細胞分画後の分析についても多くの工夫がなされており、個々の細胞単位での遺伝子解析はプラナリアの幹細胞システムの細胞レベルでの理解に大きな進展をもたらした。解析結果から、プラナリアの幹細胞にも細胞周期に入っているタイプのもので入っていないものとの大別され、細胞周期に入っているものについては、いくつかのサブタイプの細胞に分けられそうだという知見が得られており、従来の見解（プラナリアでは幹細胞は均一で、いつも細胞周期の回っている〈新生細胞〉だけで構成されている）とは異なる結果を示した。プラナリアの幹細胞システムが特殊なものではなく高等動物の幹細胞システムと同様であることが示唆された意義は大きい。また、幹細胞の精製に先立ち、頭部と体幹部との解離細胞の比較から頭部に特異的に存在する細胞集団を分取して脳の神経細胞を精製し、それらの神経細胞が異なる基質の上で可塑性を示すことも示した。

本研究は新しい方法により、特定細胞の分取に成功し、プラナリアの脳機能解明に神経生理学的なアプローチを可能した。本学学位規定により、本研究は博士の学位に値すると判定する。