



体細胞初期化因子の本来の生理機能を解明

—iPS 細胞の樹立メカニズムの解明による再生医療への応用に期待—

本学動物生命科学研究センター 浅見拓哉特任助教、依馬正次教授らの研究グループは、JST 戦略的創造研究推進事業（さきがけ）「iPS 細胞と生命機能」の一環として、体細胞初期化因子である Klf5 が、マウス初期胚で ES 細胞の起源であるエピブラスト（＝多能性を有する細胞集団）の発生を制御していることを解明しました。

本研究グループは、Klf4 と類縁の遺伝子で体細胞初期化因子である Klf5 に着目し、初期胚のエピブラストの発生では Klf5 が重要な働きを担っていることを初めて明らかにしたものです。

この成果は、9月4日（月）付けで、英国専門誌「Development」誌にオンライン掲載されました。

つきましては、本件について広く周知いたしたく報道方よろしくお願いいたします。

POINT

- ・ 山中4因子の1つである Klf4 に類似している Klf5 が、ES 細胞の前段階であるエピブラストの発生に必要である。
- ・ 体細胞初期化因子 Klf5 の発生過程における生理機能は不明だった。
- ・ Klf5 を欠損した胚盤胞期胚では、多能性を有するエピブラストが消失している。
- ・ Klf5 欠損胚ではエピブラストを分化誘導する FGF4-ERK 経路が活性化している。
- ・ Klf5 は FGF4-ERK 経路を抑制することで、エピブラストの発生を制御している。
- ・ 本研究により、初期化因子による iPS 細胞樹立メカニズムの解明に繋がることが期待できる。

（送信枚数：本紙を含む5枚）

《内容詳細に関するお問い合わせ先》

滋賀医科大学 動物生命科学研究センター

特任助教 浅見拓哉

TEL：077-548-2208

tazami@belle.shiga-med.ac.jp

教授 依馬正次

TEL：077-548-2334

mema@belle.shiga-med.ac.jp

《プレスリリース発信元》

滋賀医科大学 企画（IR担当）課

評価係（担当：阪井・三添）

TEL：077-548-2012

e-mail：hqkouhou@belle.shiga-med.ac.jp

(別紙1) 内容詳細

体細胞初期化因子の本来の生理機能を解明

(9月4日付「Development」誌に掲載)

【研究の背景】

線維芽細胞などの体細胞は、山中4因子^{注1)}と呼ばれるOct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycにより多能性幹細胞^{注2)}へ初期化されます。初期化能力を持つ因子は他にNanog、Esrrbなどがありますが、多くの初期化因子は発生初期に多能性細胞の集団(=エピブラスト^{注3)})の発生に重要な役割を果たすことが報告されています(図1)。しかし、Klf4は皮膚のバリア形成に寄与するもののエピブラストの発生に重要ではないことが分かっていました。本研究グループの先行研究において、Klf4の類似遺伝子Klf5^{注4)}に着目してノックアウトマウスを作製したところ、Klf5が初期胚発生過程および内部細胞塊からのES細胞の樹立過程に重要な働きをしていることを報告しています。しかし、Klf5の初期発生における機能や分子機構は良く分かっていませんでした。

マウス初期胚発生では着床までに3つの細胞系譜の分化が行われます。最初の分化は8細胞期から16細胞期にかけて行われ、将来胎児へ発生する細胞集団である内部細胞塊と、胎盤組織へ分化する栄養外胚葉が分化します。内部細胞塊は着床前の後期胚盤胞期までに、ES細胞の起源で多能性を有するエピブラストと、将来卵黄囊へ分化する原始内胚葉へそれぞれ分化します。この内部細胞塊からのエピブラストと原始内胚葉の分化には線維芽細胞増殖因子(FGF4)^{注5)}が重要な機能を果たしていることが知られています。今回Klf5の初期発生における機能や分子機構は調べたところ、Klf5がFGF4を制御することにより、エピブラストの発生を制御するという本来の生理機能を明らかにすることができました。

【研究成果】

初期胚発生過程におけるKlf5の機能を明らかにするため、Klf5遺伝子を働かなくさせたノックアウト(KO)マウスを作製し、着床までの発生段階毎にエピブラストと原始内胚葉のそれぞれのマーカーであるNanogとGata6の発現を免疫染色により解析しました。その結果、胚盤胞期Klf5 KO胚ではNanog陽性細胞が殆ど消失しており、内部細胞塊の殆どがGata6陽性細胞、すなわち原始内胚葉系列の細胞に置き換わっていることが分かりました。これらの結果から、Klf5がエピブラストの発生を制御する重要な因子であることが分かりました(図2)。

Klf5がどのようなメカニズムでエピブラストと原始内胚葉の分化バランスを調節しているのかを明らかにするため、Klf5 KO胚の遺伝子発現を網羅的に解析しました。その結果、初期胚盤胞期Klf5 KO胚ではFGF4と呼ばれる分泌性シグナル因子の発現が増加しており、ERKと呼ばれる細胞内シグナル伝達経路が活性化していることを見出しました。また、単一細胞レベルでの遺伝子発現解析を行った結果、本来は、将来エピブラストになるごく一部の細胞で発現するFGF4陽性細胞がKlf5 KO胚では増加していることが分かりました。このFGF4によって活性化されるERKシグナルは、エピブラストだけでなくマウスES細胞を分化誘導することが知られています。Klf5 KO胚においてFGF-ERK経路をFGF受容体阻害剤およびMEK阻害剤により遮断した結果、Klf5 KO胚の内部細胞塊にNanog陽性のエピブラスト細胞が出現しました(図3)。このことは、Klf5 KO胚ではFGF4の発現上昇に

より FGF-ERK 経路が活性化しており、Nanog 陽性エピブラスト細胞の消失を引き起こしていることを示すものです。これらの結果から、Klf5 が FGF4 の発現を制御することにより、エピブラストの発生を保証していることが明らかになりました。

【今後の展開】

今回の研究で明らかにした、初期胚発生における Klf5 による FGF4 と FGF-ERK 経路の制御は、体細胞の初期化や多能性幹細胞の維持における Klf 転写因子群の機能解明に繋がる可能性があります。特に、FGF-ERK 経路の活性化は多能性幹細胞の分化を誘導しますが、研究グループでは Klf5 をノックアウトしたマウス ES 細胞では FGF-ERK 経路が顕著に活性化されていることも見出しています。このことは、初期胚発生だけでなく多能性幹細胞の維持においても Klf5 が FGF-ERK 経路の活性を制御することにより未分化な状態の維持に働いていることを示すものです。さらに、体細胞の初期化による iPS 細胞の樹立過程においても FGF-ERK 経路の活性を調節することにより樹立効率が改善されることも知られていることから、今後体細胞の初期化過程で Klf5 の働きを調節することによる効率的な初期化方法の開発や Klf 転写因子群による初期化メカニズムの解明に繋がることが期待されます。

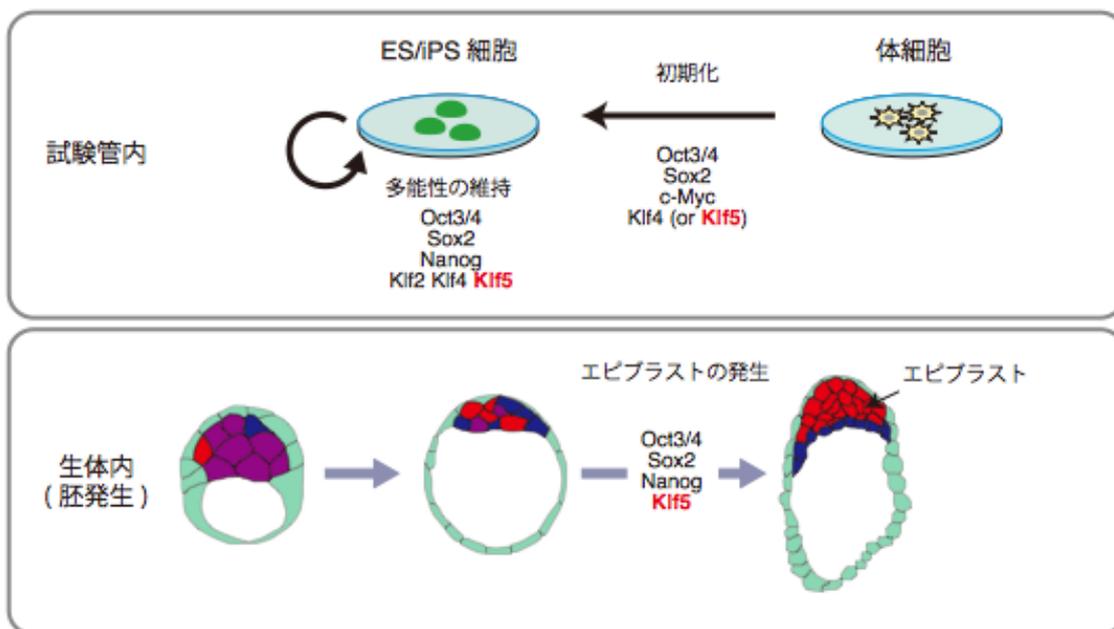


図 1. 初期化因子の試験管内と生体内における機能

Klf5 は Klf4 の類似遺伝子であり、体細胞を初期化する能力を持つ。これまでに Oct3/4、Sox2、Nanog の多能性細胞集団 (=エピブラスト) の発生における役割は報告されてきたが、Klf5 については不明だった。

初期胚盤胞期胚

後期胚盤胞期胚

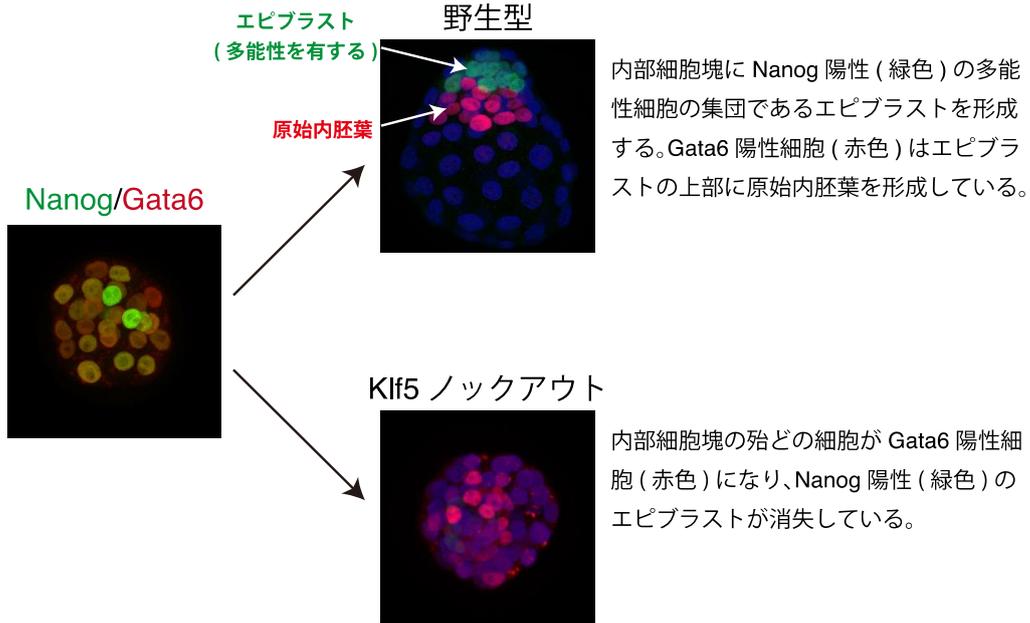


図 2. Klf5 はマウスの胚発生においてエピブラストの発生を保証している

初期胚盤胞期では全ての細胞で Nanog と Gata6 を同時に発現しているが、後期胚盤胞期までの間にエピブラストは Nanog を、原始内胚葉は Gata6 を選択的に発現する。

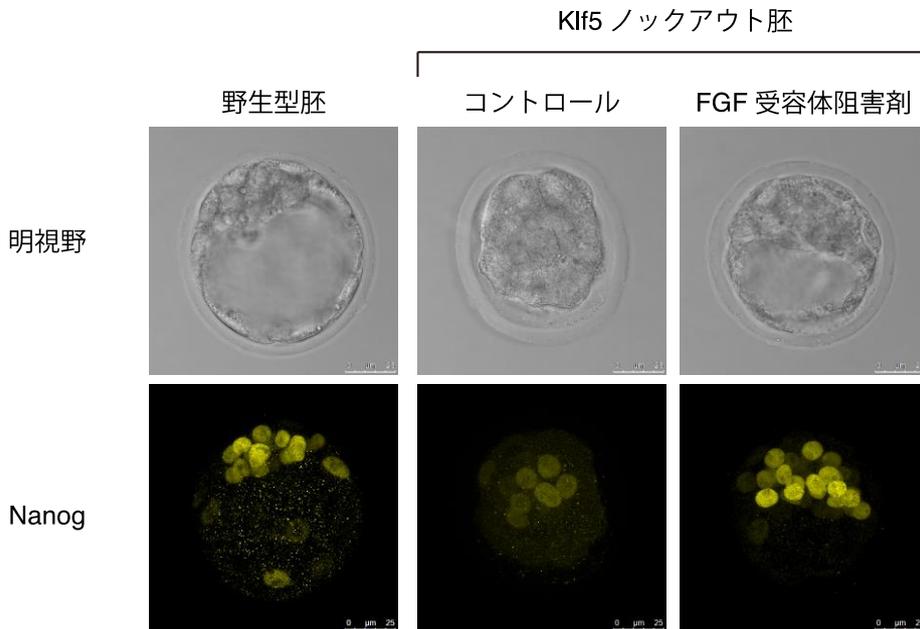


図 3. 野生型胚と Klf5 ノックアウト胚における Nanog 遺伝子の発現

Nanog は京都大学 iPS 細胞研究所 山中伸弥 教授らが同定した、多能性幹細胞で発現する遺伝子で、初期化因子である。マウス胚ではエピブラストに発現している。Klf5 ノックアウト胚では Nanog の発現は野生型胚と比較して著しく減弱しているが、FGF 受容体の阻害剤を加えた培養液中で発生させる事により、Nanog の発現が回復する。このことは、Klf5 ノックアウト胚では FGF による細胞内シグナルが活性化していることを示している。

【論文タイトル】

Klf5 maintains the balance of primitive endoderm to epiblast specification during mouse embryonic development by suppression of Fgf4

【タイトル和訳】

Klf5 はマウス初期胚発生において Fgf4 の抑制により原始内胚葉とエピブラストの分化バランスを維持する

【著者名】

Takuya Azami, Tsuyoshi Waku, Ken Matsumoto, Hyojung Jeon, Masafumi Muratani, Akihiro Kawashima, Junn Yanagisawa, Ichiro Manabe, Ryozo Nagai, Tilo Kunath, Tomonori Nakamura, Kazuki Kurimoto, Mitinori Saitou, Satoru Takahashi, and Masatsugu Ema,

【用語解説】

注1). 山中 4 因子:

京都大学 山中伸弥 教授らが体細胞を初期化し、ES 細胞と同等の多能性をもつ iPS 細胞を樹立する際に用いた、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 つの遺伝子。特に、Klf4 は Klf5 と同じ Klf ファミリー遺伝子の一つであるが、体細胞の初期化や多能性幹細胞における機能は良く分かっていない。

注2). 多能性幹細胞:

身体を構成する全ての細胞・組織に分化する能力(多能性)を有する幹細胞。代表的な多能性幹細胞である胚性幹(Embryonic Stem; ES)細胞はマウス胚盤胞期胚の多能性細胞であるエピブラストに由来する。山中 4 因子に代表される初期化因子を用いて体細胞の初期化により樹立される iPS 細胞は ES 細胞と同等の多能性を有しており、再生医療や創薬分野での研究が精力的に進められている。

注3). エピブラスト:

ES 細胞の起源であり、内部細胞塊から分化した多能性を持つ細胞。

注4). Klf5:

Klf5 は、ショウジョウバエの体節形成に働く Krüppel 遺伝子に相同性を持つ遺伝子群である、Krüppel-like factor(Klf)ファミリーの一つ。ヒトおよびマウスでは 17 遺伝子群が同定されており、共通して C 末端側に DNA 結合ドメインであるジンクフィンガーを持つ転写因子として機能する。

注5). FGF4:

線維芽細胞増殖因子(Fibroblast growth factor; FGF)の一つであり、FGF 受容体に結合して細胞に分化、増殖のシグナルを伝えるシグナル伝達物質として機能する。