

平成20年10月30日
筑波大学

胚性幹(ES)細胞化やその自己複製に関わる

転写因子 Klf5 を同定

発表者 筑波大学 大学院人間総合科学研究科 講師 依馬 正次
筑波大学 大学院人間総合科学研究科 教授 高橋 智
筑波大学 TARA センター 客員教授 藤井 義明

このたび、筑波大学・大学院人間総合科学研究科の研究グループ（依馬 正次講師、高橋 智教授、藤井 義明客員教授）は、理化学研究所（神戸）との共同研究により、Klf5 という転写因子が内部細胞塊（Inner Cell Mass、ICM）の幹細胞化（ES 細胞化）に必須であること、ES 細胞の自己複製に重要であることを明らかにしました。また同時に、体細胞からの万能細胞（iPS 細胞）樹立に用いられる Klf4 が、Klf5 と同様に ES 細胞の分化の抑制に関わるが、増殖に関しては Klf5 と異なり抑制的に作用することを明らかにしました。

マウスやヒトの内部細胞塊由来の胚性幹（ES）細胞は、全ての臓器に分化し得る多能性と旺盛な増殖性のために、生物学、再生医学分野で精力的に研究が行われています。しかしながら、内部細胞塊からどのように ES 細胞が樹立されるのか、すなわち ES 細胞化されるのかは良く分かっていません。また、ES 細胞の自己複製の分子機構も不明なところが多く残されています。

本研究成果の重要性は以下の2点にまとめられます。

- ① Klf5 を欠損したマウス内部細胞塊からは、ES 細胞が単離できないことを明らかにしました。これは Klf4 を含めて17種類存在する Klf ファミリー遺伝子の中で、ES 細胞化過程に関わるということが証明された初めての報告です。
- ② マウス ES 細胞に於いて Klf5 を欠損すると、増殖能の顕著な低下、分化傾向が見られる一方、Klf5 を過剰発現すると分化しなくなることを明らかにしました。このことにより、Klf5 の発現量を操作すれば、マウス ES 細胞の分化や増殖性を人為的に操作できることを示しました。

尚これらの研究成果は、11月6日付けで米科学誌セルステムセル（*Cell Stem Cell* Nov.6, 2008）に掲載される予定です。

<研究の背景>

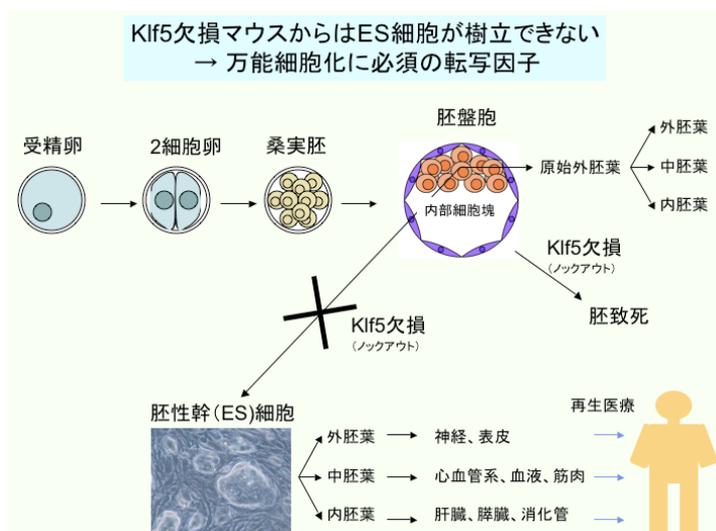
内部細胞塊由来の胚性幹 (ES) 細胞は、全ての臓器に分化し得る多能性と、旺盛な増殖性のために生物学、再生医学分野で精力的に研究がなされています。しかしながら、ES 細胞の自己複製 (未分化性維持・増殖) 過程は未だ不明な点が多く残されています。ES 細胞は、内部細胞塊から樹立されますが、その過程 (ES 細胞化) に関わる遺伝子群は殆ど分かっていません。また、今回我々が研究した **Klf5** と同じ遺伝子ファミリーに属する **Klf4** は、皮膚線維芽細胞などの体細胞を iPS 細胞化するための 4 因子に含まれていますが、なぜ **Klf4** が万能細胞化に重要であるのかは全く分かっていません。

マウスの初期胚では、内部細胞塊から ES 細胞、原始外胚葉からは胚盤葉上層由来幹細胞 (epiblast stem cell ; EpiS 細胞)、ヒト胚盤葉からはヒト ES 細胞が単離されています。これらの 3 つの多能性幹細胞は性質が大きく異なることが知られています。例えば、同じ ES 細胞でもマウス ES 細胞は増殖が極めて早いものに対して、ヒト ES 細胞は増殖が緩やかで、増殖因子に対する要求性も異なります。このように同じと思われる ES 細胞での違いの原因は分かっていません。

<研究内容>

当研究グループでは、15 年ほど前に肝臓の薬物代謝酵素 **cyp1a1** の遺伝子発現研究から **Klf5** (BTEB2) と呼ばれる転写因子を発見しました。近年の研究から **Klf5** が動脈硬化などに関与していることが明らかにされてきていましたが、**Klf5** の本来の生理機能については明らかにされていませんでした。今回我々が **Klf5** 欠損マウスを作製したところ、欠損マウス胚は着床しないために、胎生早期に致死となることを明らかにしました。この研究の過程で、**Klf5** が内部細胞塊にも高発現していることが分かりました。内部細胞塊から万能細胞である ES 細胞が得られるはずですが、**Klf5** 欠損マウスの内部細胞塊からは、ES 細胞を樹立することができませんでした。このような実験結果から、**Klf5 が内部細胞塊細胞の ES 細胞化に必須の遺伝子であることを見出しました** (下図参照)。

図 1 Klf5 欠損マウスの作製によって明らかになった Klf5 の生理機能

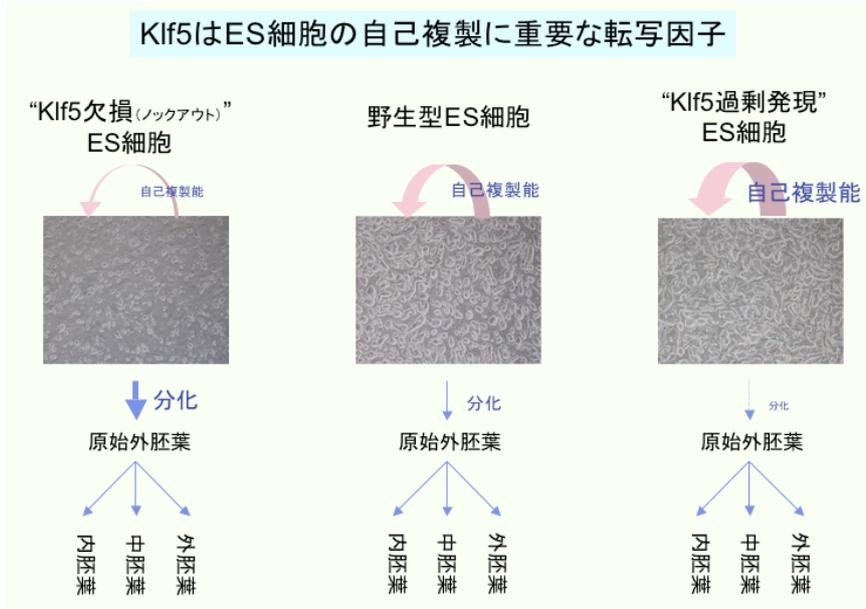


Klf5 は着床に関わる栄養膜細胞で高発現し、Klf5 欠損マウスは着床しないため胎生致死になることが分かりました。また、通常内部細胞塊から ES 細胞が樹立されますが、Klf5 欠損マウス胚からは樹立することができませんでした。

一方、既に樹立されたマウスの ES 細胞では、Klf5 を欠損した ES 細胞を樹立することは可能であり、試験管内の一定の条件下で維持することが可能でした。このことは、**Klf5 が内部細胞塊から ES 細胞化の過程で必須である一方、その後の ES 細胞の自己複**

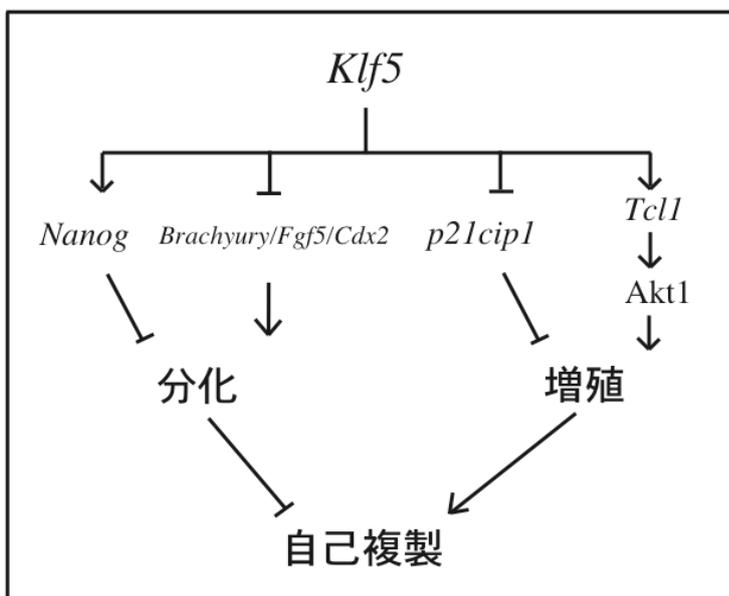
製には必ずしも必要ではないことを示しています。しかしながら、Klf5 は ES 細胞に於いても重要な役割を果たしていることも見出しました。Klf5 を欠損したマウス ES 細胞は増殖能が低く、分化傾向が見られました。逆に Klf5 を過剰発現させると、元来増殖スピードが速いことで知られるマウス ES 細胞が、更に早く増殖するようになりました。同時に、分化をさせようとしても分化しないことが分かりました。このように Klf5 の発現レベルに応じて、ES 細胞の増殖能・分化能が劇的に変化することから、ES 細胞中の Klf5 の発現を操作することにより、ES 細胞の増殖・分化を制御する技術の開発に繋がること期待されます（下図参照）。

図 2 Klf5 は ES 細胞の増殖・分化の抑制に極めて重要である。



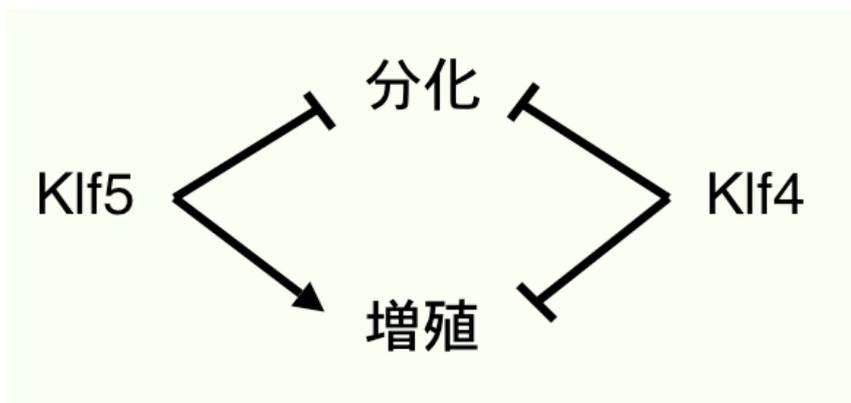
各種実験から、Klf5 は Tc1-Akt 系や、Nanog の制御にも関わっていることが明らかにしました（下図参照）が、Klf5 による ES 細胞化や ES 細胞の増殖制御の詳細な機構は今後の解析が必要です。

図 3 Klf5 は Tc1-Akt シグナル経路により増殖を制御するが、実際の実効下流遺伝子群は不明な点が多い。



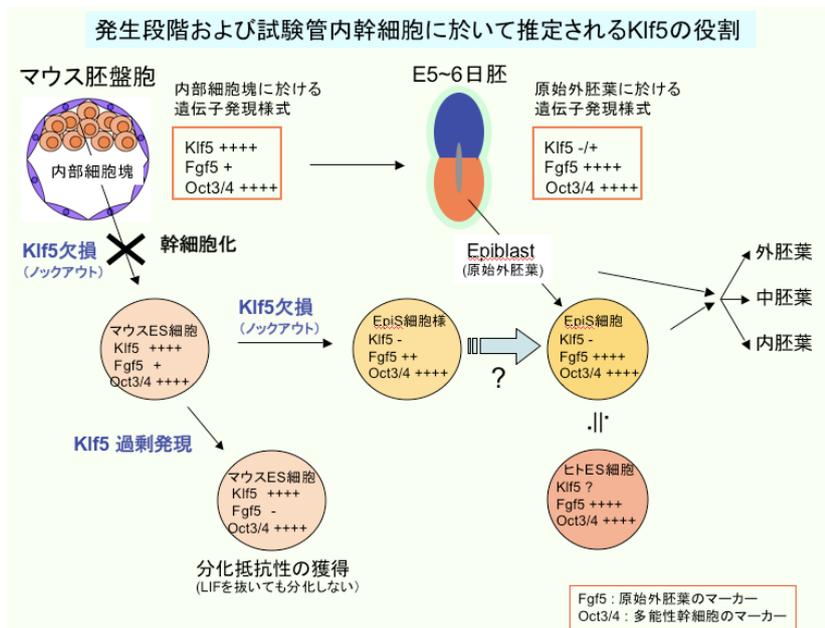
これまで **Klf5** と同じファミリーに属する **Klf4** によって、体細胞から **iPS** 細胞が誘導されることが報告されています。興味深いことに、**Klf4** だけでなく **Klf5** やその他のいくつかの **Klf** ファミリー遺伝子群も、**iPS** 細胞化能を有していることが分かっていますが、今までに発生過程で **ES** 細胞化に関わる **Klf** 遺伝子は知られていませんでした。例えば、**Klf4** 欠損マウスは、皮膚のバリア形成や腸管の発生異常のために生後致死となりますが、幹細胞化に関わる結果は報告されていません。以上のことから、**Klf5** と **Klf4** は類似の機能を有しているが一部の機能が異なっていることが推測されます。そこで **ES** 細胞で、**Klf5** と **Klf4** の機能を比較検討したところ、**Klf4**、**Klf5** ともに分化を抑制することが分かりました。しかし、**Klf5** が増殖能を促進した一方で、**Klf4** は増殖を抑制しました(下図参照)。これまでも **Klf5** と **Klf4** の機能の違いについて報告されていましたが、**ES 細胞に於いても機能的な違いがあることが明らかとなりました。**

図 4 ES 細胞に於ける **Klf5** と **Klf4** の機能上の関係



<まとめと今後の展望>

今回の研究結果をまとめると以下ようになります。**Klf5** が内部細胞塊からの **ES** 細胞樹立過程に必須であることを明らかにしました。**Klf5** が **ES** 細胞の分化を抑制すると同時に増殖を促進することで、**ES** 細胞の自己複製を制御していることを示すことができました。一方 **iPS** 細胞誘導に用いられる **Klf4** は、**ES** 細胞の分化を抑制する点に関しては **Klf5** と同様な機能を有するが、増殖に関しては抑制的に作用することが判明しました。**Klf5** 欠損 **ES** 細胞は、ヒト **ES** 細胞や **EpiS** 細胞に部分的に類似した生物特性および遺伝子発現を示しました。また、**Klf5** が胚の着床に極めて重要であり、欠損胚は早期に致死となることを示しました。



今後、内部細胞塊からの ES 細胞化過程での Klf5 の機能をより詳細に理解できれば、類似の過程と考えられる体細胞からの iPS 細胞化の分子レベルでの理解に繋がるのが期待されます。またマウス ES 細胞と EpiS 細胞、ヒト ES 細胞との関係を明らかにできる可能性があります。さらに、Klf5 がマウス ES 細胞の増殖を強く促進することが示されたため、増えにくい幹細胞（ヒト ES、畜産関連種の内部細胞塊細胞）を、未分化性を保持しつつ増幅させることに応用できると考えられます。

以上