

研究報告書

「Klfファミリーによる幹細胞機能制御の分子機構」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成27年3月

研究者: 依馬 正次

1. 研究のねらい

繊維芽細胞などの体細胞は、山中4因子と呼ばれる Oct4、Sox2、cMyc、Klf4によって多能性幹細胞へ初期化される。初期化因子には他に Nanog、STAT3、Esrrb など転写因子が報告されているが、多くの初期化因子は、発生初期、特に胚盤胞期の多能性幹細胞の出現の段階で重要な役割を果たしている。しかしKlf4は、皮膚のバリア形成に寄与するものの初期胚発生には必要ではないことが報告されていた。我々は Klf5 という Klf4 の類似遺伝子が胚盤胞期に必須の役割を果たすことを明らかにしていた。本研究では、Klf5 に着目することで初期胚発生過程における多能性獲得機構を解明することを目指した。また、ヒト iPS 細胞はマウス iPS/ES 細胞とは形態、成長因子依存性、遺伝子発現において異なるが、低い細胞増殖率はヒト iPS 細胞を実用化する上でのボトルネックの一つであると認識される。マウス ES 細胞は胚盤胞の内部細胞塊に相当するのに対して、ヒト ES 細胞は円筒胚の原始外胚葉に相当すると考えられている。Klf5 を始めとする Klfファミリー遺伝子は内部細胞塊やマウス ES 細胞に高発現するものの、ヒト ES 細胞やマウス原始外胚葉幹細胞には殆ど発現していない。そこで、ヒト iPS 細胞を、Klf ファミリー遺伝子を導入することにより幼弱で増殖性の高い細胞に変換し、扱いやすいヒト多能性幹細胞の開発を目標にした。

2. 研究成果

(1) 概要

我々の先行研究により、転写因子 Klf5 がマウス初期胚の発生に必須であることが分かっていたが、その分子基盤は殆ど不明であった。これまでの研究により、Klf5 は Fgf4 の発現を抑制し、FgfR の下流のシグナルを抑制する Srp4 の発現が低下していることを見出した。さらに FgfR 阻害剤、MEK 阻害剤を添加することで、Klf5 KO 胚の表現型は殆どレスキューされた。このことから、Klf5 は Fgf-FgfR-MAPK シグナルを抑制することで Nanog 陽性の多能性幹細胞の出現を保証する役割を果たしていることを解明した。重要なことに、マウス ES 細胞においても Klf5 は Fgf シグナルに関連する遺伝子群を制御することにより、ERK リン酸化レベルを低下させる役割を担っていることを明らかにした。こうした機能は Klf2、Klf4 には見られず、Klf5 に特有の性質であった。また、原始外胚葉幹細胞に 2i(MEK 阻害薬、GSK3 β 阻害薬)、LIF 存在下において Klf2/Klf4/Klf5 はリプログラミングを誘導することが可能であるが、MEK 阻害薬非存在下においては、Klf5 が顕著なリプログラミング活性を示し、MEK 阻害に類似した効果を発揮すると推察された。

Klf5 はマウス ES 細胞の増殖能を顕著に促進することが知られていたために、増殖能が低いヒト iPS 細胞をより増殖能が高いマウス型多能性幹細胞へと変換することを試みた。これま

で、ブタ iPS 細胞をモデル系として研究し、山中4因子によりマウス型多能性幹細胞に類似した状態に変換できることを、自治医大の花園先生との共同研究により明らかにした。

(2) 詳細

サブテーマ「マウス内部細胞塊の ES 化に関わる Klf5 下流遺伝子群の同定」

内部細胞塊の多能性獲得機構を明らかにするために、内部細胞塊細胞に於ける Klf5 の下流遺伝子群を同定することを

試みた。Klf5 ノックアウトマウスの表現型解析を詳細に行い、E2.75 では細胞数や細胞周期の異常が全く見られないものの、E3.0 では細胞周期の遅延が見られ始めることを見出した。そこで、E3.0 の野生型胚および Klf5 KO 胚から図1のように cDNA を増幅し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、Klf5 KO 胚では Fgf4 の発現が

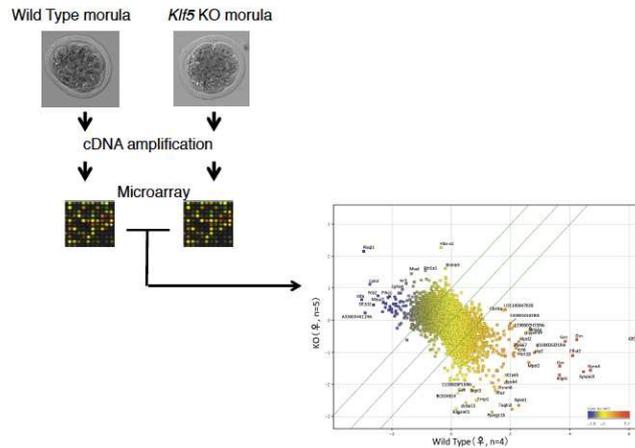


図1. マウス胚盤胞胚におけるKlf5の標的配列探索。微量のRNAからcDNAを増幅し、マイクロアレイ解析により、Fgf4が上昇していることを見出した。

亢進していること、Fgf 受容体の下流でブレーキとして作用する Spry4 の発現が低下していることを見出した。そのことから結果として Mapk 経路が活性化されており、それが細胞周期の遅延や細胞死の亢進に繋がっていることが示唆された。その仮説を検証するために、FgfR 阻害剤、MEK 阻害剤存在下で Klf5 KO 胚を培養したところ、細胞周期異常は解消され、細胞数は野生型と同レベルまでレスキューされた。さらに通常 Klf5 KO 胚の内部細胞塊からは ES 細胞は樹立されませんが、FgfR 阻害剤もしくは MEK 阻害薬存在下で培養することにより Nanog 陽性の細胞の出現がレスキューされることが分かった(図2)。24時間 MEK 阻害薬下で培養した

胚盤胞から内部細胞塊を精製し、ES 細胞の樹立を試みたところ、野生型胚と比較して 50%程度の効率で ES 細胞を得ることが出来た。従って Mapk 経路の阻害によって、Klf5 KO 胚に見られる多能性幹細胞の発達不全過程もレスキューされることが分かった。以上の事から、Klf5 は Fgf-FgfR-Mapk 経路を抑制することで、正常な多能性幹細胞の出現・維持を保証していることを解明した。また、c-Myc が Max と協調することで、マウス ES 細胞中での pERK 水準を調節していることを示した(論文1)。

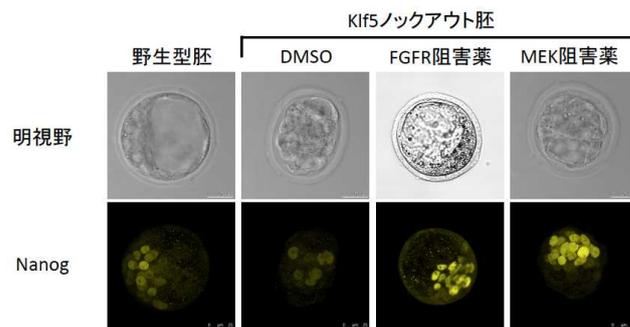


図2. FGFR阻害によるKlf5ノックアウト胚のレスキュー。Nanog陽性多能性幹細胞が正常に発生しないKlf5ノックアウトマウス胚盤胞胚をFGFR阻害、あるいはMEK阻害処理を行うことで、ほぼ表現型がレスキューされる。

サブテーマ「Klf5 過剰発現によるヒト iPS 細胞の特性変換」

Klf5 ノックアウト ES 細胞の遺伝子発現様式は、原始外胚葉由来幹細胞 (EpiSC) と類似していることが判明している。原始外胚葉由来幹細胞は、マウス ES 細胞と異なり、ヒト ES 細胞が持ついくつかの主要な特質 (緩やかな増殖、FGF 依存性、その他遺伝子発現) を有している。マウス ES 細胞に於いて Klf5 を強制発現させると、Fgf5 や Brachyury の発現がさらに低下し、LIF を抜いても分化しなくなることから、さらに未分化な状態に移行したと考えられる。このようなことから、ヒト ES 細胞に於いて Klf5 を過剰発現させた場合に、マウス ES 細胞様の特性 (高い増殖能、その他特徴的な遺伝子発現) を獲得するのではないかと推測した。花園先生との共同研究により、キメラ形成能を有する Naïve ブタ iPS 細胞 (Kusabira-Orange を恒常的に発現するブタ線維芽細胞から樹立) について研究を行ったところ、この iPS 細胞は Naïve 性のマーカーである STELLA を高発現し、キメラ形成能を有していることを示した。この細胞は内在性の KLF2 や KLF5 を高発現することが分かった。レトロウイルスベクター由来の Kusabira-Orange の発光強度には幅があり、強陽性細胞が存在する一方、殆ど陰性の細胞が存在することが分かった。興味深いことに、陰性の細胞では内在性の STELLA、OCT3/4、NANOG などの発現が亢進している一方、ウイルス由来の外来遺伝子の発現は低かった。Kusabira-Orange 強陽性細胞においては、遺伝子発現様式において逆の関係が見られた。これらのことから、蛍光陰性の細胞ではリプログラミングが進行しているものの、外来遺伝子の発現が低くなるため、リプログラミングが完全に進行しない可能性が考えられた (論文2)。

また、マウス型ヒト iPS 細胞の樹立後、循環器前駆細胞への分化手法を確立することを目指している。これまでにマウス ES 細胞をモデル系として、Flk1 陽性多分化性細胞が心血管系細胞へと分化する機構を解析し、分泌性因子による Flk1 活性化の分子機構を解明した (論文3)。

3. 今後の展開

本研究によって、げっ歯類初期胚において多能性幹細胞が出現する仕組みや、体細胞から Naïve 型多能性幹細胞が誘導される過程の一端が明らかとなった。今後は、非ヒト霊長類であるカニクイザルを利用できる施設を管理しているという利点を活かし、キメラ貢献能を有する霊長類多能性幹細胞を化合物によって誘導する方法の確立を試みる予定である。これによって、扱いやすいヒト多能性幹細胞の開発に繋げていきたいと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究目的の一つである胚発生初期における多能性獲得機構については、Klf5 が発生過程において MEK 阻害薬に類似した活性を発揮し、正常な Nanog の発現を維持することで多能性幹細胞の出現を保証していることを明らかにすることで、達成できたと考えている。また、体細胞からのリプログラミング過程においても、内在性の Klf5 が Nanog 陽性多能性幹細胞の出現に必須であることを明らかにしており、胚発生過程および体細胞からの多能性獲得

機構の類似性を明らかに出来たと自己評価している。一方、キメラ貢献能を有するブタ iPS 細胞の樹立・解析に共同研究で取り組み、ヒト Naïve iPS 細胞が直面する問題(外来性遺伝子への依存性)を再現できることを見出した。しかし、外来遺伝子に依存しない Naïve 化の方法自体は樹立することが出来なかった。今後、カニクイザルなどの非ヒト霊長類多能性幹細胞をモデル系として用いて、キメラ貢献能を有する Naïve 多能性幹細胞の研究を進めていく予定である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

もともとこの分野で堅実な業績を上げている中堅研究者で、多能性についての経験豊かな専門家として、若いさきがけの研究者の相談相手になってもらうことも含めて、採択した。研究については採択当時から進めていた KLF5 と多能性についての研究を地道に進めたと評価している。残念ながら論文数は極めて少ないが、Cell Stem Cell, Development と高いレベルの雑誌に採択されており、実際の研究内容も着実に、重要性の高い貢献をしていると評価している。また期待通り、領域アドバイザーの花園教授、さきがけメンバーの佐々木研究者などと共同研究を行い、成果を上げている。これ以外にも、若手研究者に的確にアドバイスを行っており、十分期待の成果をあげたと評価する。

さきがけ期間中に、滋賀医大動物生命科学研究センターの教授に着任し、現在はサルを用いた研究へと舵を切りつつある。iPS も含め、依馬研究者の能力が最大限に活かせるポジションであると今後の活躍を期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Hishida T, Nozaki Y, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Ema M, Takahashi S, Nishimoto M, Okuda A.、Indefinite Self-Renewal of ESCs through Myc/Max Transcriptional Complex-Independent Mechanisms.、Cell Stem Cell、9、37-49、2011
2. Fujishiro SH, Nakano K, Mizukami Y, Azami T, Arai Y, Matsunari H, Ishino R, Nishimura T, Watanabe M, Abe T, Furukawa Y, Umeyama K, Yamanaka S, Ema M, Nagashima H, Hanazono Y. Generation of Naive-like Porcine Induced Pluripotent Stem Cells Capable of Contributing to Embryonic and Fetal Development.、Stem Cells and Development、2013, 22: 473-482.
3. Ishitobi H., Wakamatsu A., Liu F., Azami T., Hamada M., Matsumoto K., Kataoka H., Kobayashi M., Choi K., Nishikawa S, -I, Takahashi S, Ema, M、Molecular basis for Flk1 expression in hemato-cardiovascular progenitors in the mouse.、Development、138、5357-5368、2011

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Azami T, Matsumoto K, Jeon H, Takahashi S, Ema M, EMERGENCE OF PLURIPOTENT STEM CELLS CONTROLLED BY KLF5, 10th Annual Meeting, International Society for Stem Cell Research, Yokohama, Japan, 6/14, 2012
2. Ema M, Jeon H, Azami T, Takahashi S, Niwa H, Matsumoto K, Role of Klf5 in the maintenance of subpopulations of mouse ES cells, 10th Annual Meeting, International Society for Stem Cell Research, Yokohama, Japan, 6/14, 2012
3. Fujishiro S, Nakano K, Mizukami Y, Azami T, Matsunari H, Arai Y, Ishino R, Nishimura T, Watanabe M, Furukawa Y, Umeyama K, Ema M, Nagashima H, and Hanazono Y, Generation of Naïve Porcine Induced Pluripotent Stem Cells Capable of Contributing to Embryonic and Fetal Development., 10th Annual Meeting, International Society for Stem Cell Research, Yokohama, Japan, 6/14, 2012
4. Ema M, Klf5 functions in blastocyst development and ES cells, Biology and Pathology of Kruppel-Like Factors (KLFs), FASEB summer conference, Colorado, USA, 8/5, 2012(招待講演)
5. Ema M, The Role of Klf5 in Pluripotent Stem Cells and Reprogramming, Biology and Pathology of Kruppel-Like Factors (KLFs), FASEB summer conference, Colorado, USA, 8/4, 2014(招待講演)