

令和元年6月3日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14976

研究課題名(和文) マウス初期胚発生における多能性細胞の発生・分化機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of establish and differentiation of pluripotent cell during pre-implantation mouse development

研究代表者

浅見 拓哉 (AZAMI, TAKUYA)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・客員助教

研究者番号：90793290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウス着床前初期胚発生過程で、内部細胞塊からは胎児へ発生するepiblast(EPI)と将来胚体外組織へ分化する原始内胚葉(PrE)が分化する。EPIとPrEの分化にはFGF-ERK経路が重要であるが、どのような細胞がFGFを発現し、どのような細胞でERK経路が活性化することでPrEへの分化が誘導されるのかは殆ど明らかにされていなかった。本研究では、転写因子Klf5が初期のFgf4の発現を抑制することによりEPIとPrEの分化バランスを維持していることを見出した。また、FGF4タンパクとリン酸化ERKの染色方法を新たに確立し、どのような細胞でFGF-ERK経路が活性化するのかを解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではKlf5がFgf4遺伝子を抑制することでエピブラスト(EPI)と原始内胚葉(PrE)の分化バランス維持していることを明らかにした。初期胚でFgf4の発現を誘導する因子はこれまで明らかにされているが、抑制する因子の報告はこれまでになく、FGF-ERK経路によるEPIとPrEの分化メカニズムの一端を明らかにする成果である。これまでは初期胚におけるリン酸化ERKの染色は安定しないため、どのような細胞でERK経路が活性化しているのかを解析することが困難だった。本研究で新たに確立した初期胚におけるリン酸化ERKの染色方法は、FGF-ERK経路による細胞分化を解析に広く応用できるものである。

研究成果の概要(英文)：In preimplantation mouse development, ICM cells generate epiblast (EPI) which differentiate embryo proper and primitive endoderm (PrE) which differentiate embryonic yolk sac. Although FGF-ERK pathway plays pivotal roles in the differentiation of EPI and PrE, it is unclear how FGF-ERK pathway is regulated. In this study, we identified that Klf5 represses Fgf4 expression at E3.25 and maintain the balance of EPI and PrE. We developed the technique to stain FGF4 protein and phosphorylated ERK in the preimplantation embryo and analysed what kind of cells activate FGF-ERK pathway.

研究分野：初期胚発生

キーワード：初期胚発生 Fgf4 FGF-ERK エピブラスト 原始内胚葉 内部細胞塊 Klf5 分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

初期胚発生過程において多能性細胞は胚盤胞期胚の内部細胞塊(ICM)に Nanog 遺伝子陽性のエピプラスト(EPI)前駆細胞として出現し、後期胚盤胞期に着床前 EPI を形成するが、どのような分子メカニズムで Nanog 陽性の多能性細胞が発生するのかは殆ど明らかになっていない。16-32 細胞期に非対称的な分裂により胚の内側に配置された細胞(inner cell)は、胚盤胞期において ICM になり、外側に配置された細胞は将来胎盤に分化する栄養外胚葉に分化する。32 細胞期の inner cell では均質な遺伝子発現が観察されているが、胚盤胞期の ICM に移行する過程で将来胎児へ発生する EPI と、卵黄嚢などの胚体外組織へ分化する原始内胚葉(PrE)の分化に重要な転写因子である Nanog と Gata6 をそれぞれ選択的に発現する。32 細胞期の inner cell は EPI と PrE の共通の前駆細胞であり、均一な遺伝子発現状態であるが、inner cell の一部の細胞では最も早い EPI に特異的な遺伝子発現として線維芽細胞増殖因子 Fgf4 の発現が観察されている。この Fgf4 の発現が周囲の前駆細胞が発現する受容体 Fgfr1 へ結合し、ERK 経路の活性化をもたらす。ERK 経路の活性化により Nanog の抑制と Gata6 の発現が増強されることにより、Gata6 陽性/Nanog 陰性の PrE 前駆細胞および Nanog 陽性/Gata6 陰性の EPI 前駆細胞がもたらされる。胚盤胞期以降の ICM では Nanog 陽性細胞が Fgf4 を発現しており、この発現は多能性因子である Nanog、Oct4 および Sox2 遺伝子の制御を受けていることが知られている。一方、32 細胞期における初期の Fgf4 の発現は、Nanog と Gata6 を同時に発現する共通の前駆細胞の一部の細胞でのみ観察されているが、どのようなメカニズムにより非対称的な遺伝子発現がもたらされ、PrE への分化が誘導されるのかは殆ど明らかにされていない。したがって、Fgf4 によるシグナルがどのような細胞に働きかけ、Fgf-ERK 経路の活性化がどのように PrE への分化を誘導するのかを明らかにすることは、多能性細胞の発生と分化のメカニズムを明らかにする上で重要である。

転写因子 *Klf5* は、体細胞から iPS 細胞の樹立に用いられる山中因子の一つである *Klf4* と同じ *Krüppel-like factor*(*Klf*)転写因子群に属している。マウス ES 細胞の未分化性維持では *Klf2/Klf4/Klf5* が協調して機能していることが報告されており、重複した機能を持つと考えられている。一方、初期胚発生過程では *Klf5* KO マウス胚のみ着床前に致死に至ることから、初期胚発生では *Klf5* が重要であることが示唆されていたが、その機能は不明だった。先行研究において、研究代表者は転写因子 *Klf5* を欠損した胚では、*Fgf4* の発現が上昇しており、ICM における *Nanog* 陽性細胞の消失と、PrE 細胞が増加していることを見出している。しかし、どのように *Klf5* が *Fgf4* の発現を制御し、EPI と PrE の分化バランスを制御しているのかは不明だった。これまでに *Fgf4* の発現を誘導する因子は明らかにされているが、*Fgf4* の発現を抑制する因子の報告はない。そのため、*Klf5* がどのように *Fgf4* の発現を制御しているのかを明らかにすることは、EPI と PrE の分化メカニズムを明らかにする上で重要である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、初期胚発生過程において多能性細胞である EPI 細胞の発生と分化メカニズムを明らかにすることである。本研究では、(1)*Klf5* がどのように *Fgf4* の発現を制御するのかを明らかにし、初期胚における *Fgf4* 遺伝子の発現制御メカニズムを明らかにする。また、EPI と PrE の分化に重要な FGF4-ERK 経路がどのような細胞で活性化するのかを明らかにするため、(2)*Fgf4* を発現する細胞の可視化と、(3)リン酸化 ERK の可視化方法の開発を行う。

## 3. 研究の方法

### (1)初期胚発生過程における転写因子 *Klf5* の機能解析

がどのように *Fgf4* の発現を制御するのかを明らかにするため、E3.25 野生型胚、*Klf5* KO 胚および *Klf5* 過剰発現(OE)胚を用いて単一遺伝子発現解析を行った。E3.25 胚の inner cell を免疫手術法を用いて単離し、酵素処理によって個々の inner cell を単離した。個々の細胞から cDNA を増幅し、qPCR により遺伝子発現を解析した。

ES 細胞においても *Klf5* が同様の機能を持つかどうかを明らかにするために、*Klf2*、*Klf4*、*Klf5* のそれぞれのノックアウト ES 細胞を用いて Fgf-ERK 経路関連遺伝子やリン酸化 ERK の発現を解析した。

### (2)*Fgf4* を最初期に発現する細胞の可視化

*Fgf4* タンパクを発現する細胞を可視化するため、抗 *Fgf4* 抗体を用いて染色を行い、E3.25 から E4.5 までの *Fgf4* の発現を解析した。また、*Fgf4* を発現する細胞を経時的に追跡するため、*Fgf4* 蛍光レポーター ES 細胞およびマウスの作製を試みた。

### (3)リン酸化 ERK の染色による PrE 分化機序の解析

リン酸化 ERK の染色による可視化は、着床前胚における ERK 経路の活性化が微弱で一過性であるために、これまでは再現性高く観察することが困難であった。そこで、着床前胚におけるリン酸化 ERK を可視化する染色方法を新たに確立し、E3.25 から E4.5 までの発生における ERK の活性化と PrE 分化を観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 初期胚発生過程における転写因子 Klf5 の機能解析

E3.25 野生型、Klf5 KO、Klf5 OE 胚の inner-cell を単離し、cDNA を増幅し単一細胞 qPCR を行った。どの様な細胞で Fgf4 の発現が変化しているのかを解析した結果、野生型胚と比較して、Klf5 KO 胚の inner-cell では Fgf4 を発現する細胞数が増加しており、その発現量も増加していた。一方、Klf5 OE 胚の inner-cell では Fgf4 を発現する細胞数が減少しており、発現量も低下していることが明らかになった。Fgf4 以外の inner-cell で発現する、Nanog、Gata6、Sox2、Fgfr1/2 等の発現は Klf5 KO および Klf5 OE 胚において野生型胚と変化がなかった。これらの結果から、E3.25 の inner-cell において Klf5 は Fgf4 の発現を抑制することにより正常な EPI と PrE の分化バランスを制御していることが明らかになった。

さらに、Klf5 が ES 細胞においても FGF-ERK 経路を制御しているかどうか解析した。その結果、Klf5 KO ES 細胞ではリン酸化 ERK のシグナルが高く、FGF-ERK 経路が過剰に活性化していることが明らかになった。興味深いことに、Klf2 および Klf4 KO ES 細胞ではリン酸化 ERK の亢進が確認されなかったことから、FGF-ERK 経路の抑制は Klf5 に特異的な機能であることが考えられる。以上から、Klf5 はマウス ES 細胞においても ERK 経路の抑制することにより、未分化性維持に機能していることが示唆された。しかし、Klf5 KO ES 細胞における Fgf4 の発現に変化がないため、初期胚とは異なるメカニズムが考えられる。

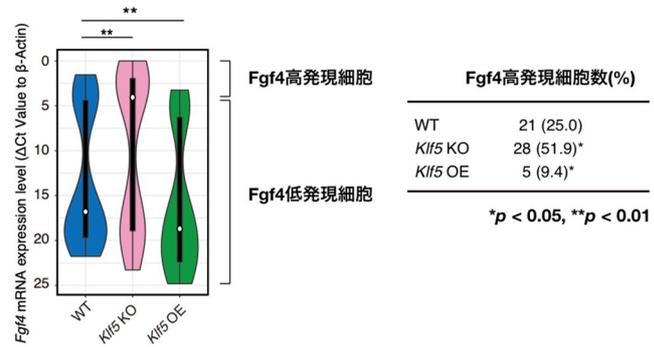


図1: Klf5 KO胚におけるFgf4の発現とFgf4陽性細胞数

##### (2) Fgf4 を最初期に発現する細胞の可視化

Fgf4 タンパクを発現する細胞を可視化するため、抗 Fgf4 抗体を用いて染色を行い、E3.25 から E4.5 までの Fgf4 タンパクの発現を、抗 Fgf4 抗体を用いた免疫染色により解析した。その結果、これまでの単一細胞レベルでの解析結果と一致して、E3.25 における Fgf4 を発現する細胞は inner-cell の一部であることが確認された。E4.5 における Fgf4 タンパクの発現は、Nanog 陽性の EPI よりも Gata6 陽性の PrE 側で高い傾向が観察された。これは、Fgf4 が分泌性タンパクであるため、Fgf4 mRNA を発現する細胞と、Fgf4 タンパクが局在する細胞が異なるためであることが考えられる。先行研究では、着床後胚において同様に Fgf4 の mRNA を発現する細胞とタンパクが検出される細胞が異なることが報告されている。

次に、胚発生過程で Fgf4 mRNA を発現する細胞を経時的に観察するため、Fgf4-P2A-H2B-GFP レポーターマウスの作製を試みた。CRISPR-Cas9 によるゲノム編集により ES 細胞を用いて Fgf4 遺伝子座への H2B-GFP 遺伝子のノックインを試みた結果、GFP 蛍光が微弱であり、ライブイメージングに適さないことが判明した。そこで、GFP の代替として HaloTag をノックインした ES 細胞を樹立して、HaloTag Ligand を添加する事により蛍光を観察した結果、内在性 Fgf4 遺伝子の発現を追跡可能であることが確認された。

現在、マウス受精卵にノックインを行い、得られた産仔からノックインラインの選別を行っている。

##### (3) リン酸化 ERK の染色による PrE 分化機序の解析

着床前胚における微弱なリン酸化 ERK を検出するため、透過処理条件およびブロッキング条件を検討した結果、着床前胚におけるリン酸化 ERK を再現性高く検出する手法を確立した。この手法を用いて 16 細胞期から胚盤胞期までの ERK のリン酸化を解析した結果、リン酸化 ERK は Fgf4 の発現が開始する E3.25 で初めて検出され、胚盤胞期では Gata6 陽性/Nanog 陰性である PrE 前駆細胞で主に検出された。また、E4.5 後期胚盤胞では PrE で検出された。FGF を添加した培地で発生した胚では胚全体でリン酸化 ERK が検出された。一方、MEK 阻害剤を添加した培地で発生した胚ではリン酸化 ERK が検出されなかったことから、初期胚におけるリン酸化 ERK を再現性高く検出可能であると考えられる。また、この手法を用いることにより、着床後胚とマウス ES 細胞におけるリン酸化 ERK も検出可能であった。

以上より、着床前胚におけるリン酸化 ERK の染色手法を新たに確立したことで、これまで明らかにされていなかった PrE への分化に重要な FGF-ERK 経路の活性化機序の一旦が明らかになった。今後、FGF4 の染色および Fgf4 レポーターマウス胚とリン酸化 ERK の染色を組み合わせることにより、EPI と PrE の分化メカニズムをより詳細に解析することが可能となり、初期胚における細胞分化メカニズムの理解が進展することが期待される。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. **Azami T**, Matsumoto K, Jeon H, Waku T, Muratani M, Niwa H, Takahashi S, and Ema M. *Klf5* suppresses ERK signaling in mouse pluripotent stem cells. *PLoS One*, Public Library of Science, 13, e0207321, 2018.
2. **Azami T**, Waku T, Matsumoto K, Jeon H, Muratani M, Kawashima A, Yanagisawa J, Manabe I, Nagai R, Kunath T, Nakamura T, Kurimoto K, Saitou M, Takahashi S, and Ema M. *Klf5* maintains the balance of primitive endoderm to epiblast specification during mouse embryonic development by suppression of *Fgf4*. *Development*, The Company of Biologists, 144(20) :3706–3718, 2017.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. **Azami T** and Ema M. Lineage specification during mouse preimplantation development controlled by *Klf5* and FGF-ERK pathway. *The 6<sup>th</sup> International Conference on Biology and Pathobiology of KLF/Sp Transcription Factors*. Kyoto, Japan. October, 2018. (口頭発表、招待講演)
2. **浅見 拓哉**, 和久 剛, 全 孝静, 松本 健, 高橋 智, 依馬 正次 “*Klf5* は *Fgf4* を抑制することにより EPI と PrE の分化バランスを維持する ” 第 40 回日本分子生物学会 (ConBio2017), 3P-0788, 神戸 2017 年 12 月 (ポスター発表)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

滋賀医科大学 動物生命科学研究センター 幹細胞・ヒト疾患モデル研究部門

<http://lab.rcals.jp/>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。