

氏名	浅見 拓哉		
学位の種類	博士 (医学)		
学位記番号	博甲第 7839 号		
学位授与年月	平成 28 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	転写因子 <i>Klf5</i> は初期胚発生において Fgf-ERK 経路の抑制により多能性幹細胞の発生を保障する		
主査	筑波大学教授	博士 (医学)	大根田 修
副査	筑波大学准教授	博士 (農学)	中川 嘉
副査	筑波大学助教	博士 (医学)	西村 健
副査	筑波大学助教	博士 (医学)	水野 聖哉

論文の内容の要旨

(目的) Kruppel like factor (Klf) 転写因子は発生や細胞の分化、増殖、初期化等の様な生理機能に重要な機能を果たしていることが報告されている。中でも、*Klf5* は欠損 (KO) マウスが着床前に胚致死であり、*Klf5* KO 胚盤胞の内部細胞塊 (ICM) からは ES 細胞が樹立出来ないことから ES 細胞の樹立過程においても重要な機能を果たしていることが示唆されている。しかし、初期胚発生過程における *Klf5* の機能は殆ど明らかにされていない。著者は、本研究において *Klf5* KO マウスおよび *Klf5* 過剰発現 (OE) マウスを用いて、loss-of-function および gain-of-function の解析を行うことで、初期胚発生過程および多能性幹細胞の維持における *Klf5* の機能の解明を目的とした。

(対象と方法) *Klf5* KO マウスおよび *Klf5* OE マウスを用いて、初期胚発生過程における *Klf5* の loss-of-function および gain-of-function の解析を行った。初期胚発生過程で *Klf5* が制御する標的遺伝子の同定し、ES 細胞における *Klf5* の機能を、*Klf5* KO ES 細胞および *Klf5* OE ES 細胞を用いて解析した。

(結果) 著者は以下の点について明らかにした。

- 1) E3.0 後期桑実胚期において、*Klf5* KO 胚では *Fgf4* の発現が mRNA、タンパクレベルで共に上昇しており、*Klf5* 過剰発現 (OE) 胚では *Fgf4* の発現が抑制されていることが分かった。
- 2) *Fgf4* の発現上昇により *Klf5* KO 胚では *Nanog* 陽性細胞が著しく減少し、ICM は *Gata6* 陽性細胞が優

位な PrE 系列に分化が偏っていた。

- 3) 阻害剤を用いて Fgf-ERK 経路を遮断することにより表現型のレスキューを試みた結果、*Klf5* KO 胚における細胞数の減少や胚盤胞の形成が有意にレスキューされることが分かった。
- 4) PrE 系列へ分化傾向にある *Klf5* KO 胚の ICM において、*Nanog* 陽性細胞が出現し、野生型胚で Fgf-ERK 経路を遮断した場合と同様に *Gata6* の発現はほぼ完全に消失していることを見出した。
- 5) *Klf5* OE 胚では、野生型胚を Fgf-ERK 経路の阻害剤存在下で培養を行った際と同様に、*Nanog* の発現上昇と、PrE 関連遺伝子の発現の抑制が明らかとなった
- 6) マウス ES 細胞においても、*Klf5* は Fgf-ERK 経路を制御していることを見出し、さらに *Klf5* は MEK 阻害剤に置き換わり、GSK3 阻害と協調して EpiSC の naïve 状態への初期化を促進する事を見出した。

(考察) マウス初期胚発生における *Klf5* の loss-of-function および gain-of-function の解析から、E3.25 の *Klf5* KO 胚には既に PrE 系列に分化傾向にあり、一方 *Klf5* OE 胚は Epi 系列に分化傾向にあることを明らかにした。加えて著者は、*Fgf4* KO 胚では初期の *Nanog* と *Gata6* の共発現状態に影響しないことから、*Klf5* は Epi と PrE 分化を制御する上流因子であると考えた。*Klf5* KO 胚盤胞期胚における PrE 分化の歪みは、1) MEK の阻害により Epi へ分化転換可能であったこと、2) E4.5 *Klf5* OE 胚では *Gata6* の発現が維持されていたものの、PrE は形成されていなかった、以上の理由から、*Klf5* は Fgf-ERK 経路を抑制することにより、Epi と PrE の分化バランスを制御することで正常な胚発生を保障していることが示唆された。

マウス ES 細胞において、*Klf5* は Fgf-ERK 経路の抑制に機能していることを見出した。しかし、*Klf5* KO ES 細胞では *Fgf4* の発現上昇は見られなかった。先に、マウス ES 細胞は E4.25 胚のエピブラストに相当する発生段階にあることが報告されていることから、*Klf5* は E3.0-3.25 において初期の Epi と PrE 分化を制御する上流因子であることが示唆された。加えて、MEK を阻害することにより、*Klf5* KO ES 細胞の増殖能がレスキューされることから、*Klf5* は Fgf-ERK 経路を抑制することでマウス ES 細胞の多能性を維持していることが示唆された。

審査の結果の要旨

(批評) 著者は、詳細かつ論理的に解析を進め、*Klf5* が Epi と PrE 分化のバランスを制御する上流因子であり、かつ Fgf-ERK 経路を抑制することで多能性幹細胞の発生と維持を保障していることを初めて明らかにしたことは、高く評価される。

平成 28 年 1 月 18 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。