

平成 16 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (S)) 研究状況報告書

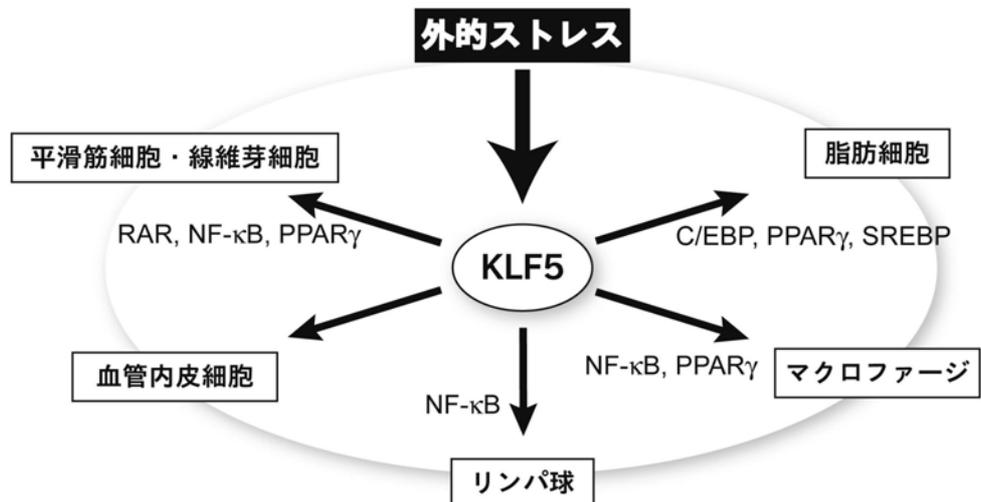
ふりがな		ながい りょうぞう		所属研究機関・部局・職		東京大学・医学部附属病院循環器内科・教授	
研究代表者氏名		永井 良三					
研究課題名	和文	臓器リモデリングの分子機構: 間葉系細胞における遺伝子転写制御と細胞間相互作用					
	英文	Molecular mechanism of organ remodeling: Gene transcription and cell-cell interaction in mesenchymal cells					
研究経費		平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	総合計
16年度以降は内約額 金額単位: 千円		18,300	17,200	17,200	17,200	12,900	82,800
研究組織 (研究代表者及び研究分担者)							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担 (研究実施計画に対する分担事項)				
永井 良三	東京大学・医学部附属病院・教授	内科学	トランスジェニック動物生理機能解析				
前村 浩二	東京大学・医学部附属病院・助手	循環器内科学	トランスジェニック動物作成				
真鍋 一郎	東京大学・医学部附属病院・科学技術振興特任教員	循環器内科学	質量分析による蛋白解析				
当初の研究目的 (交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。)							
<p>臓器に対する様々な傷害は、間葉系細胞や免疫細胞を活性化し、線維化や肥大、さらに三次元構築の改変 (リモデリング) を誘導する。その結果、心臓、腎臓、肝臓等では、心不全、腎不全、肝硬変、肝不全等の臓器不全を生ずる。臓器リモデリングに関わる分子機構を解明し、これを抑制することは臓器の機能保護を図る上で重要である。</p> <p>我々は血管狭窄、臓器線維化、心肥大、炎症反応、血管新生等の臓器リモデリングに共通に関わる Zinc-finger 型転写因子 KLF5/BTEB2 を同定した。KLF5 遺伝子ノックアウトマウスでは、アンジオテンシン II による心・腎の線維化、異物への拒絶反応としての肉芽形成、血管障害後の血管狭窄、移植腫瘍への血管新生、等が著明に抑制される。そこで本研究では 1) KLF5 の核内転写因子ネットワークによる転写調節機構の解明、とくに転写コファクターの同定と <i>in vivo</i> における機能解析、2) 発生工学により細胞特異的に KLF5 遺伝子発現を修飾したマウスの開発と、これを用いた臓器リモデリング関わる細胞間相互作用の解明、3) KLF5 の機能を抑制する化合物のスクリーニング、4) 間質細胞の活性化に関わる新たな転写因子の同定と <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> における分子機能の解明、を行う。</p> <p>一方、我々は老化抑制遺伝子 <i>klotho</i> が代謝的および機械的ストレスに対する心血管および腎臓のリモデリングを抑制することを明らかにしてきた。<i>klotho</i> は液性因子として腎尿細管細胞から分泌され、臓器傷害を軽減する作用を有する。本研究では <i>klotho</i> の細胞内シグナル伝達を中心とする分子機能を同時に解明し、臓器リモデリング抑制の新しい治療法開発を目指す。</p>							

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

KLF5の機能解析と治療応用

1) KLF5の核内転写因子ネットワークによる転写調節機構の解明

KLF5遺伝子のノックアウトマウスの解析を進めることによって、KLF5遺伝子が動脈硬化などの血管病だけでなく心肥大、血管新生、肥満、脂肪肝などの慢性炎症を基盤とした疾患、あるいは慢性炎症状態を引き起こす病態の形成に重要であることが明らかとなった。このような病態においてKLF5は血管平滑筋細胞、内皮細胞、線維芽細胞、マクロファージ、リンパ球、脂肪細胞あるいは肝星状細胞において、これらの細胞の活性化・分化・あるいは形質変換を制御すると考えられる。我々は、各細胞におけるKLF5遺伝子の機能について解析し、図に示すようにKLF5が様々な転写因子やコファクターと相互作用することによって、各細胞において特異的な機能を制御していることを見いだした。



2) 細胞特異的KLF5遺伝子改変マウスの開発と、KLF5の*in vivo*機能解析

上記したようにKLF5は慢性炎症で重要な様々な細胞で機能する。そこで、各細胞におけるKLF5の機能を*in vivo*で検討するために、細胞種特異的、また薬剤によって誘導可能な遺伝子改変マウスの開発を進めた。平滑筋細胞、内皮細胞、心筋細胞、脂肪細胞において特異的にCre遺伝子組み換え酵素を発現するマウスと、タモキシフェンによって活性化されるCre-ERを発現するトランスジェニックマウスの系統を確立した。また、KLF5遺伝子座にCreによって組換えが起こるloxPを挿入したマウスも確立した。現在、マウスの交配を進めている。

3) KLF5の機能を抑制する化合物のスクリーニング

KLF5遺伝子が血管病態形成に重要であることから、まず平滑筋細胞においてKLF5機能を抑制するAm80と活性化するLE135を見いだした。これらの薬剤の個体における作用を検討し、Am80が動脈硬化や心臓線維化を抑制することを確認した。LE135に関しては血管新生作用を持つことを明らかとした。

また、KLF5機能を修飾する化合物を効率よくスクリーニングするために、KLF5機能をレポートする培養細胞系を確立した。現在までに約300種の化合物をスクリーニングし、5種類の化合物がKLF5機能を抑制すること、特にこのうちの1種が平滑筋細胞増殖を抑制することを見いだした。これらの化合物に関して、臨床応用を目指してモデル動物を用いた基礎検討を進めている。

4) 間質細胞の活性化に関わる新たな転写因子の同定と*in vitro*および*in vivo*における分子機能の解明

KLF5と相互作用する因子をプロテオミクスやバイオインフォマティクスの手法によって同定し、上記したような転写因子に加えて転写コファクターであるSETやp300を同定した。SETはKLF5の機能を抑制する。血管傷害に応じてSETの発現は抑制されることから、傷害時のKLF5活性化にはSETの発現低下も重要であると考えられる。

また、新規因子をバイオインフォマティクスによって検索し、Sox型転写因子が組織リモデリングにおいて平滑筋細胞や線維芽細胞の活性化に重要であることを見いだした。

Klothoの機能解析

Klotho 遺伝子の機能解析と血管保護法への応用のため、Klothoを発現するセンダイウイルスを用いて、培養細胞および動物個体へのKlotho 遺伝子導入を行った。その結果、培養内皮細胞および動物個体においてKlothoが血管保護作用を持つことを明らかとした。さらに、内皮細胞においてはこの保護作用の少なくとも一部はAktの情報伝達系路を介していることを明らかとし、また、作用因子の一つとしてeNOSを同定した。

特記事項（これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。）

1. ノックアウトマウスの解析によりKLF5が組織リモデリングの制御に必須であることを確立した

従来の研究によって血管傷害の急性期にAP-1、Egr-1やNF- κ Bが発現誘導されることが示されていたが、慢性に引き続く組織リモデリングを制御する転写因子に関しては明らかにされていなかった。我々はKLF5ノックアウトマウスを作成することにより、KLF5が*in vivo*で組織リモデリングに重要であること、またアンジオテンシンIIを含む外的ストレスによってEgr-1などの急性期因子に遅れて発現し、組織リモデリングに重要なパラクライン因子であるPDGF-AやTGF- β の発現を制御し、リモデリングをコントロールすることを初めて明らかとした。この結果はNature Medicineに掲載され、国内外で大きな反響を得た。

2. KLF5が平滑筋細胞以外にも線維芽細胞、内皮細胞、リンパ球、マクロファージなどの慢性炎症を基盤とした組織リモデリングに重要な細胞で共通して機能することを明らかとした

我々は血管病態における平滑筋形質変換に重要な転写因子としてKLF5を同定したが、ノックアウトマウスの解析により予想を超えて多数の細胞で必須の役割を果たしていることが明らかとなった。興味深いことにKLF5が機能する細胞は、何れも慢性炎症や組織リモデリングに重要な細胞であり、平滑筋のみならずこのような細胞群で機能することによってKLF5が個体における慢性炎症・組織リモデリングを制御していることが示唆された。

3. KLF5機能を修飾する薬剤を同定する方法を確立し、実際にKLF5阻害薬が動脈硬化や心肥大を抑制することを明らかとし、臨床応用への研究を展開した

KLF5が心血管疾患の病態形成に重要なことからKLF5の機能を修飾する薬剤の同定を試み、KLF5を阻害する薬剤Am80と活性化する薬剤LE135を同定した。Am80は前骨髄性白血病の治療に有効であることが報告されている薬剤であるが、我々の研究結果はAm80が心血管系でも有用な薬剤であることを初めて示した。この結果から、現在Am80の臨床応用法に関して研究を続けており、心血管系への最初の臨床応用法として薬剤溶出性冠動脈ステントの開発を進めている。このように本研究は基礎的研究によって非常に新奇性の高い知見を明らかとしただけでなく、この基礎的知見を基盤として直接臨床応用を可能とする薬剤開発に結びついている点で、トランスレーショナルリサーチの典型的な例であり、社会的にも重要なインパクトを持つものと考えられる。

4. KLF5と相互作用する因子の同定を進め、組織リモデリングを制御する転写ネットワークを研究する基盤を与えた

KLF5が多様な細胞で機能することより、他の転写因子やコファクターと相互作用してネットワークを形成していると考え、相互作用因子の同定を進めた。その結果、NF- κ B、PPAR γ 、C/EBPといった転写因子、あるいはp300やSETという転写コファクターと相互作用し、ネットワークを作っていることを示した。組織リモデリングの転写調節に関してこのような転写ネットワークの観点から研究された報告はなく、我々の研究はこの点でも独創的である。また、プロテオミクスの手法を用いることによって同定したSETが転写因子の機能を修飾することを初めて明らかにした。このような実験結果から、血管傷害におけるKLF5の機能活性化はMEKパスウェイを介した発現誘導のみならず、アセチル化による活性化、SETによる抑制の解除が重要であることを示した。さらに、活性化されたKLF5はNF- κ Bなどの転写因子やp300などのコファクターと相互作用することによって特異的な遺伝子の発現を制御すると考えられる。これまでの研究成果を基盤とし、さらにKLF5ネットワークについて検討を進めることによって、心血管疾患、メタボリック症候群などに対する新しい創薬ターゲットが明らかにできると期待される。例えば、KLF5とNF- κ Bの相互作用に対する薬剤開発によって、サイトカイン発現や細胞死を制御する化合物開発が期待される。あるいはKLF5とC/EBPとの相互作用に対する薬剤開発によってメタボリック症候群への創薬が期待される。既にこのような転写因子間相互作用に対する化合物の作用を効率よくスクリーニングできる系の開発に成功している。また、KLF5の結晶構造解析による薬剤デザインも今後、可能となり、さらに臨床応用への展開が進められる。

5. KLF5の結晶構造解析の基盤を確立した

KLF5 に対する薬剤開発に必須の情報を与える構造解析のために必要な結晶化に既に成功している。

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(発表予定のものを記入することも可能。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

発表論文

- Aizawa K, Suzuki T, Kada N, Ishihara A, Kawai-Kowase K, Matsumura T, Sasaki K, Munemasa Y, Manabe I, Kurabayashi M, Collins T, Nagai R. Regulation of platelet-derived growth factor-A chain by Krüppel-like factor 5: new pathway of cooperative activation with nuclear factor- κ B. *J Biol Chem* 279:70-76, 2004.
- Tanaka K, Sata M, Hirata Y, Nagai R. Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries. *Circ Res* 93:783-790, 2003.
- Suzuki T, Muto S, Miyamoto S, Aizawa K, Horikoshi M, Nagai R. Functional interaction of the DNA-binding transcription factor Sp1 through its DNA-binding domain with the histone chaperone TAF-I. *J Biol Chem* 278:28758-28764, 2003.
- Miyamoto S, Suzuki T, Muto S, Aizawa K, Kimura A, Mizuno Y, Nagino T, Imai Y, Adachi N, Horikoshi M, Nagai R. Positive and negative regulation of the cardiovascular transcription factor KLF5 by p300 and the oncogenic regulator SET through interaction and acetylation on the DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* 23:8528-8541, 2003.
- Manabe I, Nagai R. Regulation of smooth muscle phenotype. *Curr Atheroscler Rep* 5:214-222, 2003.
- Shindo T, Manabe I, Fukushima Y, Tobe K, Aizawa K, Miyamoto S, Kawai-Kowase K, Moriyama N, Imai Y, Kawakami H, Nishimatsu H, Ishikawa T, Suzuki T, Morita H, Maemura K, Sata M, Hirata Y, Komukai M, Kagechika H, Kadowaki T, Kurabayashi M, Nagai R. Krüppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling. *Nat Med* 8:856-863, 2002.
- Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 8:403-409, 2002.
- Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 91:1103-1113, 2002.

学会発表 国際学会

- 2002.5.14 12th International Vascular Biology Meeting “Roles of KLF5/BTEB2 in phenotypic modulation of smooth muscle cell and cardiovascular remodeling” 軽井沢
- 2002.5.30 International Congress on cardiomyopathies and heart failure “KLF5/BTEB2, a Krüppel-like zinc-finger type transcription factor, is a target gene for angiotensin II signaling and involved in cardiovascular remodeling” 京都
- 2002.11.19 75th Scientific Sessions of American Heart Association “Krüppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling” シカゴ
- 2003.1.26 Gordon Research Conference “Krüppel-like factor 5 (KLF5) controls cellular responses in vascular diseases” ベンチュラ
- 2003.9.30 第13回国際動脈硬化学会 “Potential role of Krüppel-like transcription factor5 (KLF5) in adipocyte differentiation” 京都
- 2003.10.1 第13回国際動脈硬化学会 Symposium: Proliferation and differentiation of smooth muscle cells “Role of KLF5/BTEB2, a Krüppel-like zinc-finger type transcription factor, in vascular remodeling” 京都
- 2003.11.9 77th Scientific Sessions of American Heart Association Cardiovascular Seminars “Krüppel-like zinc-fingers in cardiovascular development and remodeling” オーストラリア

学会発表 国内学会

- 2002.7.19 第34回日本動脈硬化学会 日本動脈硬化学会賞受賞講演 “平滑筋形質変換の分子機構：心血管リモデリング因子KLF5/BTEB2 の役割と意義” 神戸
- 2002.8.8分子血管リモデリング研究会 “転写因子KLF5/BTEB2による心血管リモデリング制御” 御殿場
- 2002.10.3 第6回日本心不全学会 会長講演 “KLF5/BTEB2, a Krüppel-like zinc-finger type transcription factor, both smooth muscle activation and cardiac hypertrophy” 東京
- 2002.10.28 The 4th Fujihara Seminar Molecular and cellular aspects of muscle contraction “KLF5/BTEB2, a Krüppel-like zinc-finger type transcription factor, mediates both smooth muscle cell activation and cardiac hypertrophy” 箱根
- 2003.8.30 第124回日本医学会シンポジウム 肥満の科学 “脂肪細胞形質変換の転写制御” 箱根
- 2003.10.15 第76回日本生化学会学会 シンポジウム 生活習慣病と転写調節因子 —モデル動物から創薬への模索— “Role of Krüppel-like factor 5 (KLF5) in the cardiovascular system: From pathophysiological mechanisms to therapeutic target” 横浜