

研究種目：基盤研究(A)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19209029
 研究課題名(和文)循環代謝免疫コンティニウムによる負荷応答と組織再構築の基盤的分子機構の解明
 研究課題名(英文)Molecular mechanisms that control stress response and tissue remodeling by cardiometabolic and immune systems
 研究代表者
 永井 良三 (NAGAI RYOZO)
 東京大学・医学部附属病院・教授
 研究者番号：60207975

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームと心血管疾患の発症・進展メカニズムを明らかにするために、細胞のストレス受容と、それに対して、遺伝子の発現を制御する分子機構を鍵として、心血管系・代謝系・免疫系をストレス応答の一つの連続体(コンティニウム continuum)として解析することを目的とする。そのため、心血管系と代謝系の両方で、Toll-like 受容体(TLR)などによる代謝ストレスの受容機構とその情報伝達機構を解析するとともに、Krüppel 型転写因子ファミリーを中心としたストレス応答と組織リモデリングの遺伝子発現制御プログラムに関して検討を進めた。まず遊離脂質が心血管系と代謝系の両方でストレス要因となること、その情報伝達に小胞体ストレス、TLR、および酸化ストレスが重要であることを見いだした。また、線維芽細胞組織特異的 KLF5 ノックアウトマウスを作成することにより、KLF5 が心臓間質の機能制御を担い、線維芽細胞と心筋細胞の相互作用が心臓へのストレス応答に必須であることを示した。この時、線維芽細胞で IGF-1 の発現を制御することが重要である。代謝系に関しても、KLF5 が膵β細胞の機能障害に重要であることを明らかとした。さらに、KLF5 が摂食を調整している可能性を見いだした。

研究成果の概要(英文)：To elucidate pathogenic mechanisms underlying metabolic syndrome and cardiovascular diseases, we analyzed molecular control mechanisms of cellular stress response and gene transcription by cardiovascular, metabolic and immune systems. We focused on Toll-like receptor (TLR) signaling in metabolic stress response and Krüppel-like factor (KLF) family transcription factors in stress response and tissue remodeling in cardiovascular and metabolic tissues. We found that free fatty acids induce pathologies in both cardiovascular and metabolic systems. Moreover, we found that signaling mechanisms for ER stress, TLR, and reactive oxygen species play a role in the response to free fatty acids. We also showed that cardiac fibroblasts play a pivotal role in cardiac response to pressure overload by generating cardiac fibroblast-specific *Klf5* knockout mice. Furthermore, we identified IGF-1 as an essential mediator produced by cardiac fibroblasts in the cardiac response to pressure overload. In metabolic systems, we found that KLF5 is also important for β cell dysfunction and the control of appetite.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	13,000,000	3,900,000	16,900,000
2008年度	11,800,000	3,540,000	15,340,000
2009年度	11,800,000	3,540,000	15,340,000
年度			

年度			
総計	36,600,000	10,980,000	47,580,000

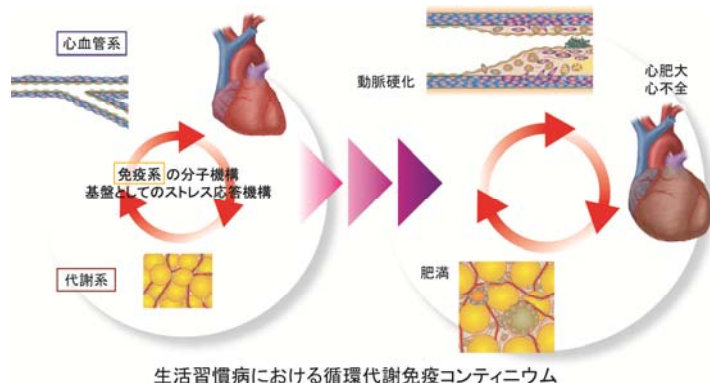
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心不全、心肥大、メタボリックシンドローム、転写因子、炎症

1. 研究開始当初の背景

心血管系、代謝系、免疫系は常に変動する生体の内的・外的環境に应答してホメオスタシスを維持している。各システムは一見独立した機能を有するため、個別に研究されてきた。しかしながら実際はこれらのシステムは相互に連携協調し、個体に対する物理的・代謝的負荷に対応している。生活習慣病に代表される各種慢性疾患では、これらの連携協調するシステムの負荷応答の破綻が、臓器機能障害をもたらす。この典型的な例がメタボリックシンドロームとその臨床的帰結である動脈硬化性心血管疾患である。メタボリックシンドロームは代謝異常だけでなく全身的な炎症状態を惹起することによって、易動脈硬化性をもたらす。ここでは、心血管系・免疫系・代謝系の密接な相互連関が、全身的な変化をもたらし、その帰結として臨床的に最重要となるのが動脈硬化をもととする心血管疾患であるが、癌や腎疾患など様々な病態を引き起こすことも知られている。また、メタボリックシンドロームの発症過程において、心血管系・代謝系・免疫系の密接な連関が絶えず引き起こされていることも明らかとなっている。このように、高齢化、運動不足と過栄養による肥満に伴い急速に増加している各種慢性疾患の病態を理解するためには、各々のシステムを個別に研究するのではなく、関連するシステムをひとつの複合体としてとらえ、これを調整する内的・外的因子を解明することがきわめて重要である。



本研究計画提案の基盤として、転写因子 **KLF5** が心血管系と代謝系の両方でストレス等々に機能するという我々の従来の研究成果がある。我々は、転写因子 **KLF5** を心血管系リモデリングに重要な転写因子として同定、解析してきた (*Nat Med* 2002, *Circ Res* 2005)。臨床的にも、**KLF5** 発現がヒトの再狭窄と関連すること (*Circulation* 2000)、さらに **KLF5** プロモーター領域の SNP が高血圧や動脈硬化重症度と関連することも明らかとしている。一方で、**KLF5** が心血管系に限らず、代謝系でも重要な機能を担うことを明らかとした (*Cell Metab*, 2005)。**KLF5** は脂肪細胞分化に必須だけでなく、**KLF5** ノックアウトマウスは高脂肪食負荷に対して太りにくく、メタボリックシンドロームを呈しにくい。この結果は、心血管系ストレス応答・組織リモデリングを制御する転写因子が、代謝臓器のストレス応答にも必須であることを初めて明確に示すものである。さらに、**KLF5** の代謝ストレス応答に、自然免疫を制御する **TLR** のシグナルが重要であることを見いだした。これらの成果は、肥満を背景とする各種疾患では、心血管系と代謝系の両方で **KLF5** などの共通したストレス応答因子が機能していること、また、代謝ストレスや傷害ストレス応答に **TLR** や **IRF** といった免疫応答の分子機構が必須であることを明確に示すものである。

2. 研究の目的

メタボリックシンドロームと心血管疾患の分子機構を明らかにするために、細胞のストレス受容と、それに対する遺伝子発現制御による応答の分子機構を鍵として、心血管系・代謝系・免疫系をストレス応答の一つの連続体(コンティニウム continuum)として解析することを目的とする。具体的には、心血管系と代謝系の両方で、**Toll-like** 受容体 (**TLR**) などによる代謝ストレスの受容機構とその情報伝達機構を解析するとともに、**Krüppel** 型転写因子ファミリーを中心としたストレス応答と組織リモデリングの遺伝子発現制御プログラムを研究することにより、

代謝ストレスや傷害ストレスがいかにして免疫応答機構を含むストレス応答機構を惹起するのか、また、ストレス応答機構がどのように組織の高次構築改変を伴う不可逆的な臓器機能障害をもたらすのかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究計画はストレス受容の分子機構とストレス応答の遺伝子発現制御プログラムについて、心血管系・代謝系・免疫系を一つの連続体と捉えて解析することにより、メタボリックシンドロームと心血管疾患の分子機構を明らかにすることを主な目的とする。そこで、(1)ストレス受容の分子機序、(2)遺伝子転写調節プログラムを解析するとともに、(3)解明された分子機構の臨床的意義を明らかにするために、SNP解析や臨床病理サンプルの解析を行う。さらに、(4)研究成果を基盤として、新規治療法・診断法の新しい標的を探索・同定する。

4. 研究成果

代謝ストレスとして遊離脂肪酸に着目して解析を進めた。その結果、遊離脂肪酸が心血管系と代謝系の両方で病態を惹起すること、また、その作用にTLRのシグナル機構が必須であることを見いだした。血管においては平滑筋細胞の形質変換を引き起こすこと、膵臓においてはβ細胞機能障害を惹起すること、また、その分子機構を解明した。重要なことに、心血管系と代謝系の両者において、炎症プロセスの活性化が引き起こされることを見いだした。遊離脂肪酸の血中濃度は肥満により増加していることが知られている。従って、我々の結果は、遊離脂肪酸が肥満における心血管系と代謝系の両者に共通する病態惹起因子である可能性を強く示唆する。今後さらに分子機構を解析することにより、新たな治療標的の同定に発展することが期待できる。

KLF5の代謝系及び心血管系における機能の解析を行った。心臓においては心筋細胞特異的なKLF5ノックアウトマウスと心臓線維芽細胞特異的なKLF5ノックアウトマウスを作製することにより、圧負荷に対する心肥大と線維化に、心臓線維芽細胞に発現するKLF5が重要であることを見いだした。特に、心臓線維芽細胞特異的KLF5ノックアウトマウスにおいては、強い圧負荷に対して心不全を来してしまうことがわかり、心臓線維芽細胞が圧負荷に対する適応応答に必須であることが明確に示された(図1)。このことは、心

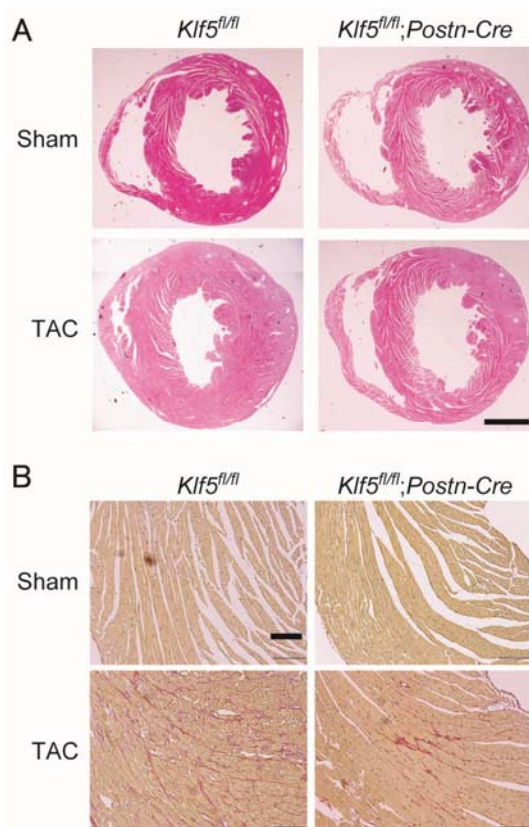


図1 線維芽細胞特異的KLF5ノックアウトマウス
線維芽細胞特異的KLF5ノックアウトマウス(*Klf5^{fl/fl};Postn-Cre*)では、大動脈結紮による圧負荷(TAC)に対して心筋肥大が抑制される(A)とともに、線維化が抑制される。

臓線維芽細胞が治療の標的になり得ることを示す者である。また、新たなイメージング法を開発することによって、圧負荷による組織リモデリングの三次元的構築の変化を可視化することに成功した。

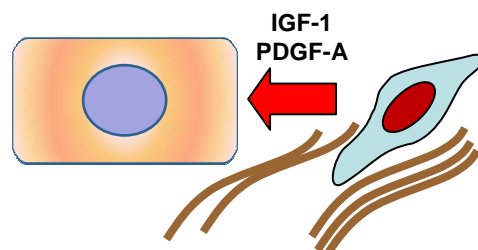


図2 心筋細胞—心臓線維芽細胞相互作用
KLF5は圧負荷に応じて線維芽細胞でIGF-1やPDGF-A等の発現を制御し、心筋細胞肥大や心筋保護作用を示す。

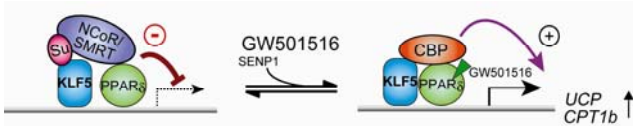


図3 KLF5のSUMO化と脂肪酸燃焼

SUMO化されたKLF5は脂肪酸燃焼に関わる遺伝子群の発現を抑制する。PPAR δ アゴニストによりKLF5の脱SUMO化が生じ、脱SUMO化したKLF5は今度は、脂肪酸燃焼遺伝子の発現を活性化させる。

KLF5の代謝組織での機能については、脂肪、骨格筋及び β 細胞について組織特異的過剰発現・ノックアウトマウスを作製して解析を進めた。骨格筋においては、KLF5がSUMO化されることが脂肪酸燃焼の制御に重要であることを見いだした。また、KLF5のSUMO化がPPAR δ のアゴニストによって制御され得ることを示した(図3)。この結果は、KLF5が代謝疾患の治療標的としても重要であることを示す。また、KLF5が摂食を調節していることを見いだした。以上の結果は、KLF5及びPPAR δ やSUMO化に関わる蛋白を含めた脂肪酸燃焼のネットワークが有用なメタボリックシンドロームの治療標的となることを示すものである。

KLF6についても解析を進め、ノックアウトマウスのデータから、心血管疾患とメタボリックシンドロームの両方で重要であることを見いだした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計28件)

- ① Oishi Y, Manabe I, Imai Y, Hara K, Horikoshi M, Fujiu K, Tanaka T, Aizawa T, Kadowaki T, Nagai R. Regulatory polymorphism in transcription factor KLF5 at the MEF2 element alters the response to angiotensin II and is associated with human hypertension. *FASEB J*, in press.
- ② Takeda N, Manabe I, Uchino Y, Eguchi K, Matsumoto S, Nishimura S, Shindo T, Sano M, Otsu K, Snider P, Conway SJ, Nagai R. Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload. *J Clin Invest* 120:254-265, 2010.
- ③ Yagi N, Manabe I, Tottori T, Ishihara A, Ogata F, Kim JH, Nishimura S, Fujiu K, Oishi Y, Itaka K, Kato Y, Yamauchi M, Nagai R. A Nanoparticle System Specifically Designed to Deliver Short Interfering RNA Inhibits Tumor Growth In vivo. *Cancer Res* 69:6531-6538, 2009.
- ④ Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 15:914-920, 2009.
- ⑤ Suzuki T, Sawaki D, Aizawa K, Munemasa Y, Matsumura T, Ishida J, Nagai R. Kruppel-like factor 5 shows proliferation-specific roles in vascular remodeling, direct stimulation of cell growth, and inhibition of apoptosis. *J Biol Chem* 284:9549-9557, 2009.
- ⑥ Oishi Y, Manabe I, Tobe K, Ohsugi M, Kubota T, Fujiu K, Maemura K, Kubota N, Kadowaki T, Nagai R. SUMOylation of Kruppel-like transcription factor 5 acts as a molecular switch in transcriptional programs of lipid metabolism involving PPAR-delta. *Nat Med* 14:656-666, 2008.
- ⑦ Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Seo K, Yamashita H, Hosoya Y, Ohsugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S. In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. *J Clin Invest* 118:710-721, 2008.
- ⑧ Shinoda Y, Ogata N, Higashikawa A, Manabe I, Shindo T, Yamada T, Kugimiya F, Ikeda T, Kawamura N, Kawasaki Y, Tsushima K, Takeda N, Nagai R, Hoshi K, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Kruppel-like factor 5 causes cartilage degradation through transactivation of matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 283:24682-24689, 2008.
- ⑨ Parisi S, Passaro F, Aloia L, Manabe I, Nagai R, Pastore L, Russo T. Klf5 is involved in self-renewal of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci* 121:2629-2634, 2008.
- ⑩ Munemasa Y, Suzuki T, Aizawa K, Miyamoto S, Imai Y, Matsumura T, Horikoshi M, Nagai R. Promoter region-specific histone incorporation by the novel histone chaperone ANP32B and

DNA-binding factor KLF5. *Mol Cell Biol* 28:1171-1181, 2008.

- ⑪ Wang G, Watanabe M, Imai Y, Hara K, Manabe I, Maemura K, Horikoshi M, Kohro T, Amiya E, Sugiyama T, Fujita T, Kadowaki T, Yamazaki T, Nagai R. Genetic variations of Mrf-2/ARID5B confer risk of coronary atherosclerosis in the Japanese population. *Int Heart J* 49:313-327, 2008.
- ⑫ Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Hosoya Y, Yamashita H, Fujita H, Ohsugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes* 56:1517-1526, 2007.
- ⑬ Takeda N, Maemura K, Horie S, Oishi K, Imai Y, Harada T, Saito T, Shiga T, Amiya E, Manabe I, Ishida N, Nagai R. Thrombomodulin is a clock-controlled gene in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 282:32561-32567, 2007.
- ⑭ Kada N, Suzuki T, Aizawa K, Matsumura T, Ishibashi N, Suzuki N, Takeda N, Munemasa Y, Sawaki D, Ishikawa T, Nagai R. Acyclic retinoid inhibits neointima formation through retinoic acid receptor beta-induced apoptosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1535-1541, 2007.

[学会発表] (計 70 件)

- ① Nagai R, 14th International Congress of Endocrinology “Interplay among the vascular, metabolic and immune systems in cardiovascular remodeling and metabolic syndrome”, 京都, 2010 年 3 月 28 日
- ② Nagai R, 15th International Symposium on Atherosclerosis, Workshop 4: Workshop 4.8 “Cardiovascular remodeling and energy metabolism through Krüppel-like transcription factor 5”, Boston, 2009 年 6 月 16 日
- ③ Nagai R, 15th International Vascular Biology Meeting, Plenary Session 3 “KLF5, a key transcriptional factor when regulates SMC phenotypic modulation and metabolic syndrome”, Sydney, Australia, 2008 年 6 月 2 日
- ④ Nagai R, The Joint Meeting of Vascular Biology Organization in Asia Pacific Region “Significance of Krüppel-Like Transcription Factor 5 in Cardiovascular Disease”, Taipei, Taiwan, 2007 年 10 月 20

日

[図書] (計 3 件)

- ① Nagai R, Friedman J, Kasuga M 編集 The Biology of Krüppel-like Factors, Springer 2009. 258頁
- ② Nagai R, Manabe I, Suzuki T. Krüppel-like Factors: Ingenious Three Fingers Directing Biology and Pathobiology. in The Biology of Krüppel-like Factors. 3-18, 2009.
- ③ Manabe I, Nagai R. Drug development and Krüppel-like factors. in The Biology of Krüppel-like Factors. 245-253, 2009.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://plaza.umin.ac.jp/nagai>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 良三 (NAGAI RYOZO)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：60207975

(2) 研究分担者

眞鍋 一郎 (ICHIRO MANABE)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：70359628
渡辺 昌文 (WATANABE MASAFUMI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90282649