

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790519

研究課題名 (和文) プロテオミクス解析法を用いた心血管リモデリング機構の解明および治療法の開発

研究課題名 (英文) Elucidation of the mechanism of cardiovascular remodeling and development of therapy by proteomic analysis

研究代表者

相澤 健一 (AIZAWA KENICHI)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：70436484

研究成果の概要 (和文)：本研究の目的はプロテオミクス解析法を用いた心血管リモデリング機構の解明および治療法の開発である。リサーチプロテオミクスを導入し、我々が過去に同定した心血管リモデリングに重要な役割を有す転写因子 **KLF5** を中心に、心血管病の病態形成に関わる遺伝子およびこれらのコ・ファクターの包括的な単離、発現抑制系による機能解析を行う。最終的には、**KLF5** をモデルとした核内転写因子ネットワークによる転写調節機構を解明し、臓器リモデリングの予防及び治療法を開発することを目標とする。

PDGF-A は平滑筋細胞の遊走・増殖を促進し、動脈硬化症の発症に重要な役割を果たす増殖因子であるが、我々の過去の検討により **KLF5** の標的遺伝子であり、-71～-55bp 領域が心血管リモデリングにおいて重要であることが判明した。本研究における具体的な計画として、まず PDGF-A 遺伝子-71～-55bp 領域に結合するタンパクを同定する。基本的には **KLF5** 結合タンパクのスクリーニングに準ずる。具体的には PDGF-A プロモータの **KLF5** 結合サイトである -71～-55bp 領域の二本鎖 DNA を合成し、その一端をビオチン化した。ストレプトアビジンとビオチンの強固な結合を利用し、メタルビーズ表面に固定した。これに細胞の核抽出液を反応させ、pull down した。その後、SDS-PAGE 展開し、特異的バンドをゲル内トリプシン消化法にて同定した。いくつかの興味深い因子が同定された。**KLF5** 結合因子の生化学的特徴をもとに、細胞から動物レベルにおける病態メカニズムを追求した。なかでも、酸化ストレスからの心血管組織の防御機構における新規メカニズムが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)： The objective of this study is to elucidate the mechanism of cardiovascular remodeling and the development of its therapy. By introducing research proteomics, and, mainly on transcription factor **KLF5** which had an important role for the cardiovascular remodeling which we identified in the past, we perform a comprehensive isolation of the co-factors of the factor which affect the pathogenic process of the cardiovascular diseases, a functional analysis by the loss of function system. This study finally elucidates transcription control mechanism by the transcription factor network in the nucleus which assumed **KLF5** a model and aims for developing the prevention of the organ remodeling and a cure. PDGF-A promotes a migration / the increase of the smooth muscle cell, and it is a growth factor playing an important role for the onset of the atherosclerosis. It was found to be a target gene of **KLF5** by the examination of our past, and it became clear that -71 to -55bp domains were important in cardiovascular remodeling. At first, as a concrete plan in this study, we identify protein which bind -71 to -55bp domains of PDGF-A gene. I follow screening of the **KLF5** binding protein basically. To be concrete, we composed the double-stranded DNA of -71 to -55bp domains that were the **KLF5** binding site of the PDGF-A promoter and biotinylated the one end. Using streptavidin and a strong bond of the biotin, we fixed it on the metal beads surface. I

reacted the nuclear extract of the cell in this, and pull down. Then, we developed SDS-PAGE and identified a specific band by in-gel trypsin digestion method. Some interesting factors were identified. Based on the biochemical characteristic of the KLF5 binding factor, I pursued the pathogenic mechanism from in the animal level to the cell level. Above all, new mechanism in the defense mechanism of the cardiovascular tissues from oxidation stress became clear.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：循環器・高血圧、ストレス、蛋白質、プロテオーム、転写因子、相互作用、病態

1. 研究開始当初の背景

我が国は昨今、未曾有の高齢化社会を迎えようとしており、心筋梗塞、脳梗塞、閉塞性動脈硬化症などの動脈硬化性疾患は増加の一途をたどっている。ゆえに、動脈硬化性疾患の予防やその効果的な治療法の確立は、活力のある社会の創出のために重要な課題である。心血管細胞は虚血、物理的、代謝的負荷などによる傷害を受けた際、適応・修復のための機転としてリモデリングを起こす。代償機構としてのリモデリングは傷害に対する適応・修復のための機転として重要である。しかし、いったん破綻を来すと悪循環に陥る。その結果、心血管組織の機能不全を来す。したがって、リモデリングのメカニズムの解明は、心血管機能を破綻させずにいかに人為的に維持するかという治療戦略にかかわる重要なテーマである。我々は過去に転写因子 KLF5 が心血管リモデリングの主要な制御因子であることを見いだした。

一方、PDGF-A は平滑筋細胞の遊走・増殖を促進し、動脈硬化症の発症に重要な役割を果たす増殖因子である。申請者は過去に KLF5 遺伝子欠損マウスにおいて PDGF-A の発現が特異的に低下していることを見出し、KLF5 が PDGF-A 遺伝子を活性化するメカニズムを主に転写レベルで解明した。PDGF-A 遺伝子プロモータの欠失変異体を用いた解析により、KLF5 が PDGF-A プロモータを活性化し、さらにその反応エレメントが近位プロモータ領域・71〜55bp であるこ

とを示した。

以上の結果より、KLF5 は活性化刺激や組織リモデリングを受けて心血管障害時に細胞が反応する際の急性反応を司る主要な因子であることを位置づけた。さらに、KLF5 の転写活性化能を抑制する化合物を見出し、KLF5 活性化による心血管リモデリングを抑制する可能性を示した。

我々は次に、KLF5 の活性を人為的に制御できれば KLF5 の活性化により惹起される病態を制御し得るといふ仮説を立て、現在検証中である。KLF5 及びその相互作用因子による疾患関連遺伝子の転写制御機構を解明することで、新たな病態解明および治療法開発に展開することを目標としている。我々は細胞内の様々なストレス刺激が核内の作用因子 KLF5 を如何に制御するか解明するため、KLF5 の相互作用因子と活性化シグナルに注目した。細胞内で最終的に機能を担う分子はタンパク質である。従来、分子生物学ではノーザンブロットや RT-PCR 等による細胞内の遺伝子発現解析が主であった。しかし、細胞内のタンパク質存在量と mRNA の発現との間にはそれほど強い相関はないことも明らかにされている。また、タンパク質は切断・修飾されたことにより、あるいは他の分子（タンパク質、DNA、リガンドなど）との相互作用を通じて初めて機能する。したがって、タンパク質としての KLF5 に着目し、タンパク質化学的手法すなわちプロテオミクスを用いてこれを解析するのが最も近道と考

えられる。従来、この分野の研究は一部の先駆的な基礎生物化学研究者によりなされ、一定の発見をもたらしている。しかし、現在の先端的なプロテオミクスは、高度な熟練と知識を必要とし、誰もが簡単に利用できるものではない。2002年、ノーベル化学賞により広く知られるようになった質量分析法の技術革新、なかでも本邦の田中耕一博士を中心に開発されたMALDI-TOF/MSは最も高感度で迅速なタンパク質同定法であり、現在のプロテオミクスの中心となっている。われわれはそれ以前の2000年よりMALDI-TOF/MSに着目し、同手法を応用してきた実績がある。国内はもとより海外を見渡しても、プロテオミクスを自前で駆使できることは臨床医学教室では極めて稀であり、すなわち我々は大きなアドバンテージを有する。現在までに、申請者を中心に成果が得られてきている。

2. 研究の目的

本研究の主目的はプロテオミクスの解析法を用いた心血管リモデリング機構の解明および治療法の開発である。質量分析装置を主軸として生体の機能分子であるタンパクを直接的な対象とする研究である。近年、質量分析装置の技術開発が急速に進み生体内のタンパク質を精密かつ高感度に検出することが可能となった。プロテオミクスとは細胞の中でタンパク質が織りなす多彩な相互作用や、その結果生じる細胞内の機能性複合体を解析することで、タンパク質の機能や細胞情報ネットワークを明らかにしようとする方法論である。申請者は本研究でリサーチプロテオミクスを本格的に導入し、**KLF5**を中心に、**心血管病の病態形成に関わる遺伝子およびこれらのコ・ファクターの包括的な単離、発現抑制系による機能解析を行う予定である。最終的には、**KLF5**をモデルとした核内転写因子ネットワークによる転写調節機構を解明し、臓器リモデリングの予防及び治療法を開発することを目標とする。**一方、プロテオミクス技術を直接的に臨床に応用することも目的としている。最近、疾患の早期診断をめざす臨床医療や癌をはじめとする疾病の病因の解明、さらには創薬研究への適応など、プロテオーム解析法を高度医療技術とする試みが注目を集めている。創薬をはじめとする医科学研究では、このようなプロテオームに関する情報にDNAアレイ法などからもたらされる膨大な発現情報を加え、さらに将来は、これらすべての結果を個人のゲノム情報を加味して解釈することが求められる。申請者はリサーチプロテオミクスで培ったノウハウを東京大学循環器内科に蓄積された疾患データベースに応用し、疾患マーカーの開発を行う。さらに、疾患特異的マーカー

一に至ってはその因子の同定を行い、診断および治療への糸口とする。いずれも病態における鍵分子を同定し、その分子制御メカニズムの解明に迫ることを目的とする。さらに鍵分子の活性制御による病態修飾を試みる。最終的には低分子化合物のデザインよおよびその作製、そして心血管疾患における診断から治療まで応用可能なシステムの構築を目指す。

3. 研究の方法

(1)細胞内における**KLF5**結合タンパクの包括的単離・同定

我々は今までにアフィニティー精製および質量分析装置(MALDI-TOF/MS)を用いて**KLF5**の相互作用因子(クロマチン変換因子SET、転写コ・アクチベータp300、等)を単離・同定してきた方法論を持つ。今回、**Bio-Rad**社の**Protein chip**®システムを利用し、包括的な**KLF5**相互作用因子の同定を目指す。**Protein chip**®システムは、様々に表面加工(順相・逆相、陰イオン・陽イオン交換、等)されたチップと専用質量分析装置**SELDI-TOF/MS**(チップ表面に直接レーザーを当て、MALDI同様、飛行時間から質量分析する装置)を組み合わせることにより、ハイ・スループットで相互作用(核酸-タンパク、タンパク-タンパク)、翻訳後修飾等、機能解析が可能である。具体的には年次計画に後述するが、細胞内エピトープ融合タンパクのプルダウン解析を行う。予備的であるが、いままでに単離された**KLF5**の相互作用因子のひとつは170kDaであり、DNA複製に重要である。DNA複製因子と転写因子**KLF5**との相互作用、すなわち複製と転写のカップリングによる新規の調節機構が示せれば非常に興味深い新規知見となることが期待される。単離された因子について発現ベクターの構築、細胞内におけるタンパク-タンパク結合をみるための免疫沈降アッセイ等の結合アッセイおよび**KLF5**転写への影響をみるためのレポーターアッセイなどの機能アッセイを行う。

(2)PDGF-A 遺伝子プロモータ上のタンパク複合体の包括的単離・同定

タンパク複合体による遺伝子プロモータ制御機構を明らかにする。**KLF5**の標的遺伝子のうち、心血管リモデリングに重要な**PDGF-A**をモデルとして用いる。**PDGF-A**遺伝子のコア・プロモータ-71~55bp領域は物理・代謝・酸化・化学的ストレス等の様々な細胞活性化刺激に反応し、同遺伝子の発現に重要な役割を果たしていることが知られている。この領域にはいくつかの転写因子が結合し、同遺伝子の発現調節をしている。他のグループにより**Egr-1**、**Sp1**、**Sp3**は活性化し、**WT-1**、**GCF-2**、**NF1/X**は抑制すること

が報告された。我々も KLF5 が同領域に結合し、同遺伝子を活性化することを報告した。しかし、これら複数因子の相互作用については不明であり、今後はそれらのタンパク（複合体）の包括的理解が重要と考えられる。したがって、申請者は PDGF-A 遺伝子のコア・プロモータ領域-71~-55bp に結合するタンパクの包括的固定を試みる。予備的だが、いくつかの興味深い因子が同定された。それらは主に DNA 修復因子および、DNA 複製因子にまとめられた。そのうちひとつである 70kDa のタンパクは、DNA 修復因子以外に老化（テロメア長維持）、転写、アポトーシス、腫瘍生成、虚血、酸化ストレス・レドックスに寄与している。KLF5 結合因子の生化学的特徴をもとに、細胞レベルにおける現象まで展開していく予定である。なかでも、酸化ストレスからの防御機構における KLF5 の役割を優先して解析する。

(3)病態刺激におけるタンパク複合体変換様式の解明

プロテオームを構成するタンパク質の集団は、細胞の種類によって異なるだけでなく、時間的にも空間的にもめまぐるしく変動する。病態においても、そうである。例えば、担癌患者では発病前に血液中のタンパク発現分布が正常時に比べて変化することが知られている。(2)の PDGF-A 遺伝子の-71~-55bp 領域の結合タンパクを包括的に同定した後、これらのタンパクが病態においていかに変換あるいは修飾されるか検討する。具体的には細胞にアンジオテンシン II やフォルボールエステル等の活性化刺激、H₂O₂ などの酸化ストレス、あるいは TNF- α 等のアポトーシス誘導刺激を行う。抽出した核抽出液を、(2)の系に同様に添加し通常培養状態との差をみる。病態刺激に特異的タンパクが同定されたら、この因子を追求する。

(4)創薬への応用可能性の探求、遺伝子改変マウスの作成

細胞内結合の確認できた因子については、siRNA を作成し個々にノックダウンして loss of function 法によりそれぞれの機能を同定する。また、可能であれば動物モデル（トランスジェニックおよびノックアウトマウス）作成し、in vivo での相互作用および機能アッセイを行う。さらに、創薬のターゲットすべく、タンパクの結晶構造解析も目標する。

4. 研究成果

KLF5 結合タンパクのスクリーニング

KLF5 結合タンパクの検索に際してはまず条件検討として Protein chip®システムを用いたハイスループットのスクリーニングを行った。Flag タグの付いた KLF5 を細胞内に恒常的に発現させた細胞を用いた。チップ

上に Flag 抗体を固定化後、KLF5 細胞抽出液を添加し、リガンドに結合したタンパク質分画を直接 MALDI-TOF/MS で測定し、スペクトルを得た。Protein chip®システムで得られた結合条件・溶出条件をもとに、Flag 抗体ビーズを用いて KLF5 発現細胞抽出液と反応させ、結合タンパクを SDS-PAGE 展開した。差分解析より、KLF5 に特異的なバンドを切り出し、ゲル内トリプシン消化法を用いて、MALDI-TOF/MS にて高精度のスペクトルを得た。PMF (Peptide Mass Fingerprinting) 法によりタンパク同定を行った。

PDGF-A プロモータ結合タンパクのスクリーニング

PDGF-A 遺伝子-71~-55bp 領域に結合するタンパクを同定した。基本的には KLF5 結合タンパクのスクリーニングに準じた。最初に Protein chip システムを用いたハイスループットのスクリーニングを行った。具体的には PDGF-A プロモータの KLF5 結合サイトである-71~-55bp 領域の二本鎖 DNA を合成し、その一端をビオチン化した。ストレプトアビジンとビオチンの強固な結合を利用し、チップ表面に固定した。すなわち DNA-pull down 法を用いた。これに HeLa 細胞の核抽出液を反応させ、pull down した。結合条件・溶出条件を決めた。得られた条件をもとに DNA をビーズに固定した。SDS-PAGE 展開し、特異的バンドをゲル内トリプシン消化法にて同定した。その結果、いくつかの興味深い因子が同定された。KLF5 結合因子の生化学的特徴をもとに、細胞から動物レベルにおける病態メカニズムを追求した。なかでも、酸化ストレスからの心血管組織の防御機構における新規メカニズムが明らかになった。

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 5 件)

- ① Regulation of transforming growth factor- β -dependent cyclooxygenase-2 expression in fibroblasts. Matsumura T, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Munemasa Y, Ishida J, Nagai R. **Journal of Biological Chemistry**. 査読有. 284, 2009, 35861-35871.
- ② Kruppel-like factor 5 shows proliferation-specific roles in vascular remodeling, direct stimulation of cell growth and inhibition of apoptosis. Suzuki T, Sawaki D, Aizawa K, Munemasa Y, Matsumura T, Ishida J, Nagai R. **Journal of Biological**

- Chemistry.** 査読有. 284, 2009, 9549-57.
- ③ Promotor region-specific histone incorporation by the novel histone chaperone ANP32B and DNA-binding factor KLF5. Munemasa Y, Suzuki T, Aizawa K, Miyamoto S, Imai Y, Matsumura T, Horikoshi M, Nagai R. **Molecular and Cellular Biology.** 査読有. 28, 2008, 1171-1181.
- ④ Acyclic retinoid inhibits functional interaction of transcription factors Krüppel-like factor 5 and retinoic acid receptor-alpha. Kada N, Suzuki T, Aizawa K, Munemasa Y, Matsumura T, Sawaki D, Nagai R. **FEBS Lett.** 査読有. 582, 2008, 1755-60.
- ⑤ 心血管病態のプロテオミクス解析. 相澤健一、鈴木亨. **循環器専門医.** 査読無. 16, 2008, 43-49.
- ⑥ [学会発表] (計13件)
- ⑦ Aizawa K, Suzuki T, Zhan H, Kada N, Sawaki D, Matsumura T, Nagai R: Proteome analysis of a novel pathogenic pathway of DNA damage response as mediated by KLF5 and its transcriptional complexes in the cardiovascular. 15th International Vascular Biology Meeting (Poster Presenter) (June 2 2008, Sydney, Australia)
- ⑧ Sawaki D, Suzuki T, Aizawa K, Matsumura T, Kada N, Mizuno Y, Munemasa Y, Nagai R. American Heart Association 80th Scientific Sessions (Orlando, FL, USA: November 4-7, 2007) Krüppel-like factor 5 promotes vascular remodeling in biphasic ways; inhibition of vascular smooth muscle cell (VSMC) apoptosis and stimulation of cell growth.
- ⑨ Aizawa K, Suzuki T, Matsumura T, Kada N, Sawaki D, Zhan H, Nagai R: Proteome analysis of a regulatory pathway of pathologic vascular injury as mediated by KLF5 and its transcriptional complexes. American Heart Association, Scientific Session 2007 (November 4-7, 2007, Orlando, Florida, U.S.)
- ⑩ 田伏洋、宮崎賢司、寺本礼仁、藤田真知子、服部渉、川浦久雄、宗政歎子、村松貴由、相澤健一、永井良三、鈴木亨：等電点電気泳動チップによる翻訳後等電点電気泳動チップによる翻訳後修飾されたタンパク質の検出. 第6回大会（大阪：2008年7月29～30日）
- ⑪ 宮崎賢司、田伏洋、寺本礼仁、藤田真知子、服部渉、川浦久雄、宗政歎子、村松貴由、相澤健一、永井良三、鈴木亨：抗oxLDL抗体を用いた免沈回収産物の迅速プロファイリング. 日本ヒトプロテオーム機構. 第6回大会（大阪：2008年7月29～30日）
- ⑫ Aizawa K, Suzuki T, Hong A, Kada N, Sawaki D, Matsumura T, Nagai R. A novel pathogenic pathway of DNA damage response as mediated by KLF5 and its transcriptional complexes in the cardiovascular. 第72回日本循環器学会総会・学術集会（2008年3月28～30日） ←
- ⑬ Aizawa K, Suzuki T, Matsumura T, Sawaki D, Kada N, Nagai R. Angiotensin II activates the DNA damage response through nitric oxide in vascular endothelial cells. 第71回日本循環器学会総会・学術集会（神戸：2007年3月15～17日）
- ⑭ Aizawa K, Suzuki T, Matsumura T, Sawaki D, Kada N, Nagai R. A novel regulatory pathway of DNA damage response to pathologic vascular injury as mediated by KLF5 and its transcriptional complexes. 第71回日本循環器学会総会・学術集会（神戸：2007年3月15～17日）
- ⑮ Sawaki D, Suzuki T, Aizawa K, Matsumura T, Kada N, Mizuno Y, Munemasa Y, Nagai R. Krüppel-like factor 5 directly stimulates cell growth in vascular lesions. 第71回日本循環器学会総会・学術集会（神戸：2007年3月15～17日）
- ⑯ Sawaki D, Suzuki T, Aizawa K, Matsumura T, Kada N, Mizuno Y, Munemasa Y, Nagai R. Modulation of ubiquitin-proteasomal degradation of KLF5 influences vascular remodeling. 第71回日本循環器学会総会・学術集会（神戸：2007年3月15～

17日)

- ⑰ Kada N, Suzuki T, Aizawa K, Matsumura T, Takeda N, Sawaki D, Nagai R. Acyclic retinoid inhibits neointima formation through retinoic acid receptor beta-induced apoptosis. 第71回日本循環器学会総会・学術集会 (神戸: 2007年3月15~17日)
- ⑱ 加田奈々絵、鈴木亨、相澤健一、松村貴由、澤城大悟、宗政歆子、永井良三: 非環式レチノイドはRARbetaを介してアポトーシスを生じ新生内膜形成を抑制する. 東京大学臨床展開研究シンポジウム (東京: 2007年3月2日)
- ⑲ 宗政歆子、鈴木亨、相澤健一、宮本素、今井靖、松村貴由、水野由子、加田奈々枝、澤城大悟、永井良三. 新規ヒストンシヤペロンp32と転写因子KLF5によるプロモーター領域特異的ヒストン量増加. Promoter region-specific histone incorporation by histone chaperone p32 and DNA-binding factor KLF5. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 (東京: 2007年12月11~14日)

〔図書〕(計2件)

新しい酸化LDLの測定法. 清野精彦監修「心血管マルチバイオマーカー・ストラテジー」、相澤健一、鈴木亨、2009、医歯薬出版、pp91-94

DNA損傷と修復. 山口徹、高本眞一、中澤誠、小室一成監修「Annual Review 2008 循環器」、相澤健一、鈴木亨、2008、中外医学社、pp23-27

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等:
ユビキタス予防医学講座ホームページ
<http://plaza.umin.ac.jp/upm/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

相澤 健一 (AIZAWA KENICHI)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号: 70436484

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし