

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2010～2014

課題番号：22229006

研究課題名(和文) KLF転写因子による生活習慣病・癌の病態分子機構解明と治療応用

研究課題名(英文) KLF network in chronic diseases and cancer

研究代表者

永井 良三 (Nagai, Ryozo)

東京大学・医学部附属病院・名誉教授

研究者番号：60207975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 167,400,000円

研究成果の概要(和文)：KLFファミリーはzincフィンガー型転写因子であり、現在17種類が知られている。本研究では、KLF5とKLF6に着目し、生活習慣病とがんにおける機能の解明をめざした。心臓においては心筋細胞ではKLF6が、線維芽細胞ではKLF5が働き、心臓肥大や線維化を制御している。また、KLF6は大動脈瘤と解離の病態に重要である。腎臓においては、KLF5が腎傷害に対する炎症を制御しており、慢性腎臓病に寄与することを見いだした。またKLF5が大腸癌と関連することを明らかとした。本研究で明らかにされたメカニズムは、新しい治療法や診断法開発の標的となる。

研究成果の概要(英文)：The Kruppel-like factor family consists of 17 zinc-finger-type transcription factors. This project aimed to elucidate pathological roles of KLF5 and KLF6 in cardiovascular, metabolic, and renal diseases and cancer. We found that KLF6 expressed in cardiomyocytes and KLF5 expressed in cardiac fibroblasts control cardiac responses to stress, such as cardiac hypertrophy and fibrosis. KLF6 is also important for controlling aortic inflammation. In kidneys KLF5 controls renal inflammation, which underlies chronic kidney disease. KLF5 also control intestinal stem cell function and associates with colon cancer. The mechanisms and pathways identified in this project would be attractive targets for the development of new therapeutic and diagnostic strategies.

研究分野：内科学

キーワード：転写因子 動脈硬化 糖尿病 慢性腎臓病 心不全 メタボリックシンドローム がん

## 1. 研究開始当初の背景

Krüppel-like factor (KLF) ファミリーは zinc フィンガー型転写因子であり、現在 17 種類が知られている。KLF は発生・分化や幹細胞機能の制御に重要なだけでなく、多様な疾患においても重大な機能を有することが報告されており、近年急激に論文数が増加している。各々の KLF メンバーは大きく異なる機能を有し、これまで報告されているノックアウトマウスの形質は全く異なっている。一方で、細胞分化・増殖、ストレス応答、細胞内代謝などについて機能的な共通性があり、KLF メンバー間での相互作用が強く示唆されている。

我々は KLF5 を平滑筋細胞の形質変換を制御する転写因子として同定し(*Circ Res* 1999)、ノックアウトマウスの解析から、KLF5 が心血管系の組織構築の改変(リモデリング)に必須であることを明らかにした(*Nat Med* 2002, *Circ Res* 2005)。KLF5 は外的傷害ストレスへの細胞応答制御の鍵分子であると考えられる。ところが、その後我々は KLF5 が脂肪細胞分化に必須である(*Cell Metab* 2005)とともに、骨格筋での脂肪酸燃焼も制御する(*Nat Med* 2008)ことを見いだした(図 1)。KLF5 ヘテロ接合体ノックアウトマウスは高脂肪食負荷に対してメタボリックシンドロームを呈しにくい。つまり KLF5 は心血管系に加えて代謝疾患においても重要な役割を担うことが明らかとなった。また、ES 細胞の幹細胞性(stemness)の維持に必須であること(*J Cell Sci* 2008)を見いだしている。

肥満やメタボリックシンドロームでは、代謝ストレスへの応答が長期化し、さらには慢性炎症による臓器機能障害をもたらすと考えられる。動脈硬化が慢性炎症性疾患であることはよく知られているが、我々は代謝疾患が慢性炎症性疾患であることを明らかにしている(*Diabetes* 2007, *J Clin Invest* 2008, *Nat Med* 2009)。

## 2. 研究の目的

本研究計画では、生活習慣病と癌における転写因子 KLF5 の機能を組織特異的遺伝子改変マウス等を用いて明らかにするとともに、その分子機構を解明する。特に、心肥大・心不全、慢性腎臓病、代謝疾患と癌に注目して解析を進める。心肥大・心不全においては、KLF5 による炎症プロセス制御の解明を進める。また、心不全における KLF5 による臓器連関の制御を明らかにする。代謝疾患においては、KLF5 の脂肪細胞、膵細胞、骨格筋細胞における機能がメタボリックシンドロームを呈する分子機構について検討するとともに、視床下部における KLF5 による摂食調節機構を解明する。腎臓においては、KLF5

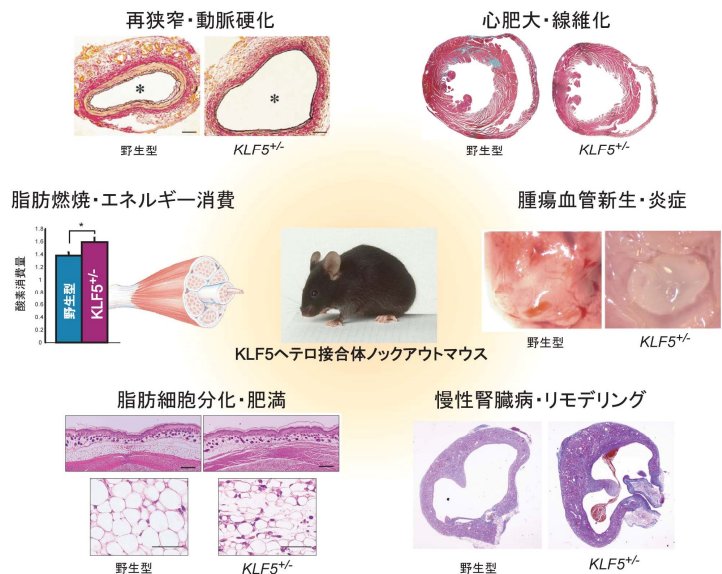


図 1 KLF5 は多様な生活習慣病・癌に重要である

による傷害への適応応答と慢性炎症惹起のメカニズムを明らかとする。癌においては、癌幹細胞における KLF5 の役割と、癌の発症・進展に関わる慢性炎症の制御との関わりを解析する。一方で、KLF5 がどのように外的シグナルに応じて、機能制御されているかを解析する。さらに、他の転写因子との相互作用を解析する。類似した機能を持つ他の KLF メンバー、特に KLF6 について、心血管代謝疾患を中心とした機能解析を進める。これらの解析を統合して、長期に続く低レベルのストレスが、生活習慣病と癌を引き起こす分子機構を解明する。

## 3. 研究の方法

生活習慣病及び癌における KLF5 機能の解明を目的とし、組織特異的遺伝子改変マウスなどを用いて各種病態モデルにおける KLF5 機能の解析を進める。

KLF 転写因子群の機能的な相違や相互作用に着目し、特に KLF6 の機能解析を進める。心血管疾患と代謝疾患に着目する。

新規治療法へのトランスレーションとして KLF5/6 へのシグナルと相互作用分子・下流分子を標的とした治療法の可能性について、細胞から疾患モデルで検討する。

## 4. 研究成果

(1)心肥大・心不全、動脈硬化、大動脈瘤における KLF

先に心臓線維芽細胞で発現する KLF5 がパラクリン因子の発現を制御し、圧負荷に対する心肥大や線維化を制御することを明らかにしていたが(*J Clin Invest* 2010)。さらに高血圧による大動脈肥大においても線維芽細胞 KLF5 が重要な役割を果たすことを見いだした。また、KLF6 の心血管リモデリングにおける意義の解析を進め、心筋細胞に発現する KLF6 がアンジオテンシン II 刺激による線維化に必須であることを明らかにした。この反応では線維芽細胞に発現する KLF6 は関

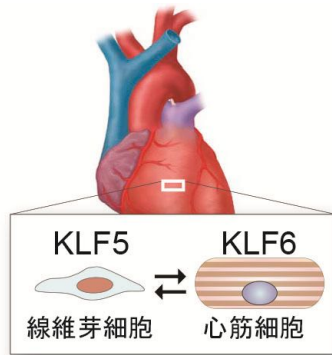


図2 心臓における KLF5 と KLF6 の連携

は線維芽細胞での機能が心肥大に重要であることを示した。即ち、KLF5 と KLF6 は各々心臓線維芽細胞と心筋細胞で機能して、心臓ストレスへの応答を制御していると考えられる(図2)。また、

これらの結果は、心臓のストレス応答においては、心筋細胞と線維芽細胞といった実質細胞と間質細胞の相互作用が鍵となることを明確に示す。従来、心肥大や心不全の研究は心筋細胞を中心として行われてきたが、これらの研究成果は、細胞間相互作用の重要性を明確に示すものであり、循環器領域において大きなインパクトを与えるものである。

また、大動脈瘤モデルにおいてはマクロファージに発現する KLF6 が組織炎症とリモデリングを制御することを見いだした。マクロファージを含む骨髄系細胞での *Klf6* のノックアウトは、大動脈への塩化カルシウム塗布とアンジオテンシン II 負荷による大動脈炎症と大動脈瘤形成を著明に悪化させ、大動脈解離を引き起こす(図3)。この背景では、マクロファージの大動脈への集積とリモデリングの顕著な増強がみられた。この作用において KLF6 の欠損によりマクロファージで GM-CSF の発現が著明に亢進することが重要であることを見いだした。GM-CSF の発現はヒトの大動脈瘤でも認められ、GM-CSF のシグナルは新たな診断・治療標的になる可能性がある。

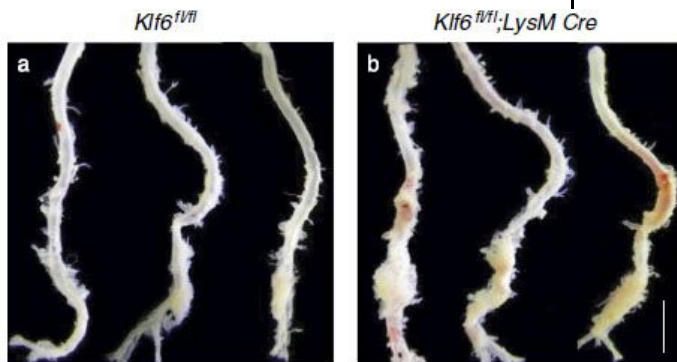


図3 マクロファージ *Klf6* 欠損は大動脈炎症を著明に亢進させる

与しない。この心筋細胞線維芽細胞相互作用は、トロンプスポンジを介する。興味深いことに、我々は以前 KLF5 について

## (2)慢性腎臓病と心腎連関

KLF5 は腎臓内では集合管上皮細胞に特異的に発現する。この KLF5 が腎傷害に応じて、S100A8/A9 発現を制御することにより M1 炎症性マクロファージを誘導することを見いだした。そのため、*Klf5*<sup>-/-</sup>では、腎臓の組織障害が軽減するが、一方で線維化は亢進する。この点に着目し、腎障害の後期には M2 型マクロファージが集積し、線維化を促進することを見いだした。これらの成果はマクロファージが病態時期に応じて全く異なる機能を獲得し、炎症の促進から収束まで機能することを明確に示すものである(図4)。

一方、慢性腎臓病が心疾患の重大なリスク要因となることから、心臓と腎臓との連関(心腎連関)が注目されているが、その機序はほとんど分かっていない。我々は、心腎連関においても腎臓集合管上皮細胞が重要な役割を果たすという仮説を立てた。大変興味深いことに、集合管上皮特異的 *Klf5* ノックアウトマウスに心臓圧負荷を与えると、心不全を呈することを見いだした。心臓の圧負荷は、心臓の組織マクロファージを増加・活性化する。集合管上皮 *Klf5* ノックアウトマウスでは組織マクロファージの増加がみられないことから、マクロファージの心臓保護的な作用が示唆された。さらに、集合管上皮の KLF5 は腎臓由来サイトカインの発現を制御することを見いだした。一方、心臓から腎臓へは自律神経系を介して情報が伝達される。このように、心臓への圧負荷というストレスに対しては、心臓-脳-腎臓のネットワークが対応していることを初めて明らかにした。このネットワークは、神経系と免疫系、腎臓由来サイトカインを介して密接に連携している。ネットワークの主要分子や仲介分子は、今後の全く新しい治療標的となると考えられる。実際、腎臓由来サイトカインが心臓圧負荷に対して保護的に作用することを見いだしている。

## (3)代謝疾患

先に KLF5 が脂肪細胞分化に必須であることを報告したが、KLF6 も脂肪細胞分化に必須であることを見いだした。

一方、*Klf5*<sup>-/-</sup>が過食にもかかわらず肥満しにくいことから、骨格筋における脂肪酸燃焼を制御することを以前報告している(*Nat Med* 2008)。さらにこの過食の分子機序を検討し、KLF5 が視床下部弓状核の接触調節ニューロンに発現し、摂食を負に調整していることを見いだした。これは KLF 因子が摂食を調節することを示す初めての知見である。



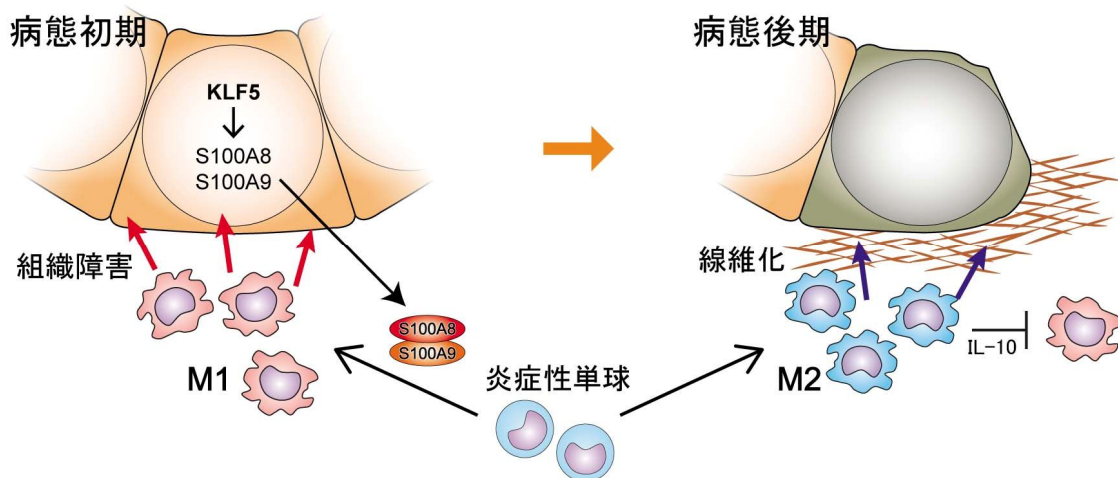


図4 腎障害・線維化における KLF5 とマクロファージ

#### (4) 消化管癌

KLF5 は ES 細胞の stemness を制御する。そのため、消化管においても幹細胞の制御に関わるのではないかと考え検討を進めた。KLF5 は幹細胞の多い crypt に高く発現しており、分化が進んだ絨毛上皮細胞での発現は低下する。興味深いことに KLF4 は高分化の細胞で発現が増加するという KLF5 とは逆のパターンを示し、相補的な機能が示唆された。

Klf5 を腸管上皮幹細胞を含む Lgr5 発現細胞でタモキシフェン誘導性に欠損させると、細胞死と細胞増殖抑制を来すことを見いだした。KLF5 は Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを増強することにより幹細胞の増殖を制御していると考えられた。

さらに Lgr5 陽性細胞での Klf5 欠損は症か癌モデルで癌を著明に抑制した。重要なことに、ヒトの大腸癌でも KLF5 の発現亢進と KLF5 遺伝子の増幅がみられており、発癌に重要であることが示唆された。我々はすでに KLF5 に対する siRNA が肺癌モデルを抑制することを報告している (*Cancer Res* 2009)。KLF5 及びその相互作用因子、シグナルは癌においても新たな治療標的となる。

#### 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 21 件)

Fujiu K, Manabe I, Nagai R. Renal collecting duct epithelial cells regulate inflammation in tubulointerstitial damage in mice. *J Clin Invest* 121:3425-3441, 2011. Doi: 10.1172/JCI157582

Eguchi K, Manabe I, Oishi-Tanaka Y, Ohsugi M, Kono N, Ogata F, Yagi N, Ohto U, Kimoto M, Miyake K, Tobe K, Arai H, Kadowaki T, Nagai R. Saturated Fatty Acid and TLR Signaling Link  $\beta$  Cell Dysfunction and Islet Inflammation.

*Cell Metab* 15:518-533, 2012. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.01.023

Inoue M, Takayanagi M, Fujiu K, Manabe I, Nagai R, Taguchi T. Tamibarotene-loaded citric acid-crosslinked alkali-treated collagen matrix as a coating material for a drug-eluting stent *Sci Technol Adv Mater* 13:064208, 2012. Doi:10.1088/1468-6996/13/6/064208

Shen H, Eguchi K, Kono N, Fujiu K, Matsumoto S, Shibata M, Oishi-Tanaka Y, Komuro I, Arai H, Nagai R, Manabe I. Saturated fatty acid palmitate aggravates neointima formation by promoting smooth muscle phenotypic modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33:2596-2607, 2013. DOI: 10.1161/atvbaha.113.302099

Iwata H, Manabe I, Nagai R. Lineage of Bone Marrow-Derived Cells in Atherosclerosis. *Circ Res* 112:1634-1647, 2013. DOI: 10.1161/circresaha.113.301384

Noda S, Asano Y, Nishimura S, Taniguchi T, Fujiu K, Manabe I, Nakamura K, Yamashita T, Saigusa R, Akamata K, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Tsuruta D, Trojanowska M, Nagai R, Sato S. Simultaneous downregulation of KLF5 and Fli1 is a key feature underlying systemic sclerosis. *Nat Commun* 5:5797, 2014. DOI: 10.1038/ncomms6797

Nakaya T, Ogawa S, Manabe I, Tanaka M, Sanada M, Sato T, Taketo MM, Nakao K, Clevers H, Fukayama M, Kuroda M, Nagai R. KLF5 Regulates the Integrity and Oncogenicity of Intestinal Stem Cells.

*Cancer Res* 74:2882-2891, 2014. DOI: 10.1158/0008-5472.can-13-2574

Son BK, Sawaki D, Tomida S, Fujita D, Aizawa K, Aoki H, Akishita M, Manabe I, Komuro I, Friedman SL, Nagai R, Suzuki T. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is required for aortic dissection/intramural haematoma. *Nat Commun*. 6:6994, 2015 DOI: 10.1038/ncomms7994

Sawaki D, Hou L, Tomida S, Sun J, Zhan H, Aizawa K, Son BK, Kariya T, Takimoto E, Otsu K, Conway SJ, Manabe I, Komuro I, Friedman SL, Nagai R, Suzuki T. Modulation of Cardiac Fibrosis by Krüppel-like Factor 6 through Transcriptional Control of Thrombospondin 4 in Cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. in press. DOI: 10.1093/cvr/cvv155

[学会発表](計47件)

Eguchi K, Manabe I, Nagai R. Islet Inflammation Induced by Free Fatty Acid-TLR4 Pathway Leads to  $\beta$  Cell Dysfunction in Type 2 Diabetes. Scientific Sessions 2010 of American Heart Association. H22年11月13-17日 Chicago, USA.

Manabe I. Parenchymal-stromal interactions of cardiovascular, renal and metabolic diseases. Symposium 4 Biology of inflammation-related diseases: From metabolic syndrome to cancer. BMB2010. H22年12月7日神戸

Manabe I. Propagation of chronic inflammation underlies multiple tissue dysfunctions in lifestyle diseases. Symposium 2S15pl: Chronic inflammation and epigenetics in life-style disease. 第34回日本分子生物学会年会 H23年12月14日 横浜

永井良三 慢性炎症による心血管代謝系の病態形成：血管生物学からの展開 第109回日本内科学会 H24年4月13日 京都

Nagai R. Role of chronic inflammation in cardiovascular remodeling and cardiorenal syndrome. FASEB Summer Research Course: Biology & Pathobiology of Kruppel-Like Factors. H24年8月8日 Snowmass, USA

Fujiu K, Manabe I, Shibata M, Nagai R. Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor from the Kidneys is Essential for the Development of Heart Failure Through the Heart-Brain-Kidney Interaction American Heart Association Scientific Sessions 2012. H24年11月3-7日 Los Angeles, USA.

Manabe I. Homeostatic inflammation in lipotoxicity and metabolic disease. Symposium 2S17 "Homeostatic inflammation" against self-derived products. 第85回日本生化学会大会, H24年12月14-16日 福岡

Manabe I. Cell-cell Interactions in Cardiac Adaptive and Maladaptive Responses International Forum Japanese Symposia; Molecular Mechanisms in the Heart: from Development to Regeneration. BCVS2013. H25年7月22日 Las Vegas, USA.

永井良三 慢性炎症と病態形成 第117回日本眼科学会総会 H25年4月6日 東京

永井良三 心血管代謝疾患の病態形成と慢性炎症 第60回日本臨床検査医学会学術集会 H25年11月1日

Matsumura T, Nishimura S, Manabe I, Sawaki D, Nagasaki M, Ishida J, Suzuki T, Komuro I, Nagai R. KLF5 Contributes to in vivo Thrombus Formation and Cytokine-induced and Tumor-associated Angiogenesis. American Heart Association Scientific Sessions 2013, H25年11月16-20日 Dallas, USA..

永井良三 細胞間相互作用と臓器連関に基づく疾患発症メカニズム 第119回日本解剖学会総会 H26年3月28日

Manabe I. Vascular lipotoxicity and expansion of chronic inflammation in obesity. Symposium 18 Smooth Muscle Cell Biology. International Vascular Biology Meeting 2014. H26年4月16日 京都

Nakaya T, Ogawa S, Manabe I, Kuroda M, Nagai R. KLF5 regulates the integrity and oncogenicity of intestinal stem cells. FASEB Summer Research Conference Biology and Pathobiology of Kruppel-like Factors (KLFs) H26年8月3-8日 Snowmass, USA.

Manabe I. Immunometabolic regulation of

cardiometabolic disease. Symposium 8  
Immunosenescence and immunometabolism  
The 43rd Annual Meeting of The Japanese  
Society for Immunology 2014年12月11  
日 京都

〔図書〕(計1件)

Matsumoto S, Manabe I. Stromal Vascular  
Cells. In: Angiogenesis in Adipose  
Tissue. Cao Y, editors. Springer, New  
York: pp41-52. 2013.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

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・名誉教授

研究者番号: 60207975

(2)研究分担者

眞鍋 一郎 (MANABE, Ichiro)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 70359628