

機関番号 : 12601

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21790706

研究課題名 (和文) 生活習慣病の原因としての組織慢性炎症の発生機序の解明と新規治療法の開発

研究課題名 (英文) Analysis of tissue chronic inflammation in adult lifestyle-related diseases and its clinical application

研究代表者

藤生 克仁 (FUJII KATSUHITO)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号 : 30422306

研究成果の概要 (和文) :

慢性組織炎症における転写因子 KLF5 の機能について、腎障害モデルを用いて検討した。まず、一側尿管結紮モデルを用いて、腎臓の炎症惹起時の KLF5 の役割を検討したところ、KLF5 は CEBPa, S100A8, S100A9 遺伝子の誘導を通じて、炎症性単球を腎臓に遊走させていた。また、S100A8, S100A9 は炎症性単球を M1 マクロファージに分化させていた。腎臓の炎症においては、M1 マクロファージは IL1b を分泌し、組織炎症を惹起し、M2 マクロファージは、IL10, TGFb を分泌し、組織炎症の抑制、繊維化促進に働いていると思われた。KLF5 は腎臓の炎症時に M1 マクロファージ有意に誘導し、腎臓炎症惹起に関与していることが明らかとなった。

また、メタボリック症候群に関する検討においては、肥満脂肪組織で S100A8 の発現上昇が認められた。このため、脂肪細胞と炎症性細胞との相互作用における S100A8, S100A9 の作用を検討した。脂肪細胞から分泌された S100A8, S100A9 は脂肪細胞および炎症性細胞間のさらなる炎症を惹起していることが明らかとなった。つぎに、脂肪組織においても、S100A8, S100A9 が炎症を惹起していることを明らかにするために、脂肪組織特異的 S100A8 過剰発現マウスを作成した。また、新規治療薬の開発については、S100A8, S100A9 よりも有望な KLF5 の下流遺伝子を同定したが、本研究期間では、その同定までにとどまった。

研究成果の概要 (英文) :

To analyze the function of transcription factor KLF5 in chronic tissue inflammation, we used the inflammation model of mouse kidney. First, we analyzed the phenotype of haploinsufficiency of KLF5 in unilateral ureteral obstruction model (UUO). Haploinsufficiency of KLF5 showed reduced infiltration of inflammatory monocyte after UUO. In this model, KLF5 controlled transcription factor CEBPa and KLF5 and induced CEBPa cooperatively regulated secretion protein S100A8 and S100A9. S100A8 and S100A9 were effector molecules of KLF5 to recruit inflammatory monocyte into kidney. Moreover, S100A8, S100A9 could induce M1 macrophage activation after UUO. These results indicated KLF5 controlled macrophage polarity in kidney and provoked renal inflammation after renal injury.

Next, we analyzed KLF5-S100A8, S100A9 axis in metabolic syndrome. We found KLF5, S100A8 and S100A9 were up-regulated in adipose tissue of obese mice. S100A8 and S100A9 secreted from adipocyte changed macrophage phenotype into more inflammatory phenotype. From these observations, we concluded S100A8 and S100A9 were newly adipocytokine which could induce inflammation of adipose tissue. To further analysis of S100A8 in adipose tissue in vivo, we generated adipocyte specific S100A8 overexpression transgenic mice using AP2 promoter sequence and we have already several lines of transgenic mice.

We tried to address the clinical application from these results. First we thought to handle S100A8 and S100A9 as new target genes in kidney disease and metabolic syndrome. But we isolated more promising candidate genes in these experiments. However, we had to settle the isolation of these candidate genes within this occasion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：循環器学、分子生物学

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：転写因子、炎症

1. 研究開始当初の背景

本研究計画では、心血管疾患、メタボリックシンドローム、慢性腎臓病 (CKD) に共通した炎症・組織リモデリングを制御する分子機構について、転写因子 KLF5 とそのエフェクター分子である S100A8、S100A9 を軸にして解析を進めるとともに、解明された分子機構に介入することにより、動脈硬化、肥満、腎疾患の改善を目的とした新規治療法を開発する事を目的とする。

我々は、血管平滑筋細胞の形質変換に重要な転写因子として KLF5 を同定した。KLF5 ノックアウトマウスの解析から、KLF5 が心血管リモデリングの鍵分子であること明らかにした (図1) (*Nat Med* 2002;8:856-63)。さらに、合成レチノイド Am80 が KLF5 とレチノイン酸受容体の複合体に作用して、KLF5 阻害薬として機能し、ステント留置後の再狭窄病変形成を抑制することを報告した (Fujiu K 他 *Circ Res* 2005;97:1132-41)。一方、KLF5 は心血管疾患だけでなく、その基礎病態として重要なメタボリックシンドロームの発症にも重要であることを見いだした (*Cell Metab* 2005;1:27-39, *Nat Med* 2008;8:656-666)。さらに、最近の臨床研究によってメタボリックシンドロームと心血管疾患、慢性腎疾患 (CKD) は相互に密接に関連して発症・進展することが強く示唆されていることから、KLF5 が CKD にも関与すると考え、KLF5 ノックアウトマウスに糖尿病性腎障害、尿管結紮モデルを施したところ、組織リモデリングが著明に抑制さ

れることを見いだした。つまり、KLF5 は生活習慣病の共通した病態分子基盤であることが明らかとなった。

病態における KLF5 の機能を明確にするため、KLF5 の標的遺伝子について、KLF5 過剰発現による遺伝子変化のマイクロアレイ解析と、クロマチン免疫沈降産物の高速シーケンシング (ChIP-seq) によるゲノムワイド探索を行い、S100A8、S100A9 を同定した。分泌タンパクである S100A8、A9 は炎症に関与すると考えられている。また、S100A8 は Toll-like receptor 4 (TLR4) の内因性リガンドであると報告されている。しかし、S100A8、S100A9 を介した心血管疾患、代謝疾患、腎疾患の発症メカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

生活習慣病における臓器機能障害に共通して認められる慢性炎症と組織リモデリングの発症・進展を制御する分子機構について、KLF5 と S100 蛋白に着目して解析する。同時に、KLF5、S100 蛋白を修飾する新規治療戦略を開発する。

3. 研究の方法

これまでの我々の研究によって、転写因子 KLF5 は生活習慣病の共通の鍵分子であることが示されている。また、生活習慣病には共通した病態基盤として、慢性炎症と組織リモデリングによる臓器機能障害が認められる。そこで、転写因子 KLF5 による慢性炎症と組織リモデリングの制御機構を明らかにする。そのため、(1) 同定済みの KLF5 標的遺伝子である S100A8、S100A9 の動脈硬化、メタボリックシンドローム、CKD における機能の解析を行う。KLF5 による S100 遺伝子の発現制御を解析し、

どのような刺激に応じて遺伝子発現が制御されるかを明らかとする。また、S100A8 と S100A9 が炎症のイニシエーションに果たす役割に注目して解析する。我々の予備的検討で、KLF5 は腎集合管上皮細胞や脂肪間質細胞において、代謝的あるいは傷害的ストレスに応じて S100A8、A9 の発現を誘導して、マクロファージのリクルートメントと炎症の誘発を制御している可能性が高い。この分子機構の詳細を検討する。S100A8、A9 の過剰発現による *in vivo* 作用の解析を行う。また、**(2)S100 発現調節以外の KLF5 機能について組織リモデリングの制御に着目した解析**を行う。組織リモデリングを進める線維芽細胞の起源は、組織線維芽細胞、骨髄、上皮細胞の 3 種類と考えられている。我々の予備的検討で、KLF5 は腎臓集合管上皮細胞からの上皮-間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition、EMT) による線維芽細胞の生成にも関与していることが示唆されている。また最近、EMT の一種である血管内皮細胞-間葉細胞移行 (endothelial-mesenchymal transition、EndMT) が心肥大・線維化にも重要であることが報告されている (*Nat Med* 13: 952)。そこで、KLF5 による EMT 制御機構に着目した解析を行う。*in vitro* EMT モデルを用いた KLF5 の作用解析とともに、ChIP-seq による標的遺伝子の同定を行う。また、腎臓集合管上皮細胞および線維芽細胞で特異的に KLF5 をノックアウトしたマウスを作成し、*in vivo* 機能についても明らかにする。さらに、得られた知見を **(3)新規治療法へ応用**する。我々が同定した KLF5 阻害剤 Am80 の作用について、S100 遺伝子および EMT への作用を検討する。マウスの腎臓傷害モデルおよび肥満モデルへの Am80 作用を検討する。また、S100A8、A9 の中和抗体および siRNA を用いた、炎症抑制作用の解析を行う。

4. 研究成果

KLF5 は腎臓では、集合管上皮細胞に特異的に発現しており、定常状態では、*Cdh1* 遺伝子の発現を調節し、上皮性を維持していると考えられた。KLF5 ヘテロノックアウトマウスにおいて、腎臓疾患モデル (尿管結紮モデル、

糖尿病性腎症モデル) を作製すると、野生型マウスと比較して、腎臓障害の程度は軽度であった。KLF5 ヘテロノックアウトマウスでは、IL-1b 等の炎症性サイトカインを発現する M1 マクロファージの浸潤が低下しており、この浸潤低下が腎臓上皮細胞のアポトーシスを低下させており、組織炎症、組織破壊が低下していたと考えられた。一方 TGFb、IL-10 を分泌している M2 マクロファージの浸潤には影響はなく、組織の繊維化には影響を認めなかった。次に、腎臓集合管上皮細胞特異的 KLF5 ノックアウトマウス、骨髄移植による骨髄細胞特異的 KLF5 ノックアウトマウスを用いて腎臓障害におけるマクロファージの浸潤を検討すると、腎臓集合管における KLF5 が M1 マクロファージの浸潤に重要であることが明らかとなった。

次に、腎臓集合管細胞における KLF5 の下流の検討を行うと、KLF5 は C/EBP β を誘導し、KLF5 と C/EBP α は相乗的に、S100A8 および S100A9 遺伝子を発現させていた。S100A8 と S100A9 は分泌蛋白であり、ヘテロダイマーを形成し、M1 マクロファージを選択的に誘導していた。

腎臓疾患において、KLF5-C/EBP α -S100A8/S100A9 経路は炎症の惹起に関わっており、新規診断法、新規治療法の標的経路となる可能性がある。

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 5 件)

- ① Iwata, H., Manabe, I., Fujiu, K., Yamamoto, T., Takeda, N., Eguchi, K., Furuya, A., Kuro-o, M., Sata, M., and Nagai, R. (2010). Bone Marrow-Derived Cells Contribute to Vascular Inflammation but Do Not Differentiate

Into Smooth Muscle Cell Lineages.

Circulation 122, 2048-2057. 査読あり

②Oishi, Y., Manabe, I., Imai, Y., Hara, K., Horikoshi, M., Fujiu, K., Tanaka, T., Aizawa, T., Kadowaki, T., and Nagai, R. (2010). Regulatory polymorphism in transcription factor KLF5 at the MEF2 element alters the response to angiotensin II and is associated with human hypertension. The FASEB Journal 24, 1780-1788. 査読あり

③藤生克仁、永井良三：臓器線維化とRAS-線維芽細胞の活性化におけるRASとTGF- β シグナルのクロストーク、医学のあゆみ レニン・アンギオテンシン系のすべて、2009 査読なし

④Sugiyama H, Imai Y, Fujiu K., Iwata H., Hirata Y., Nagai R., A successfully-resuscitated young case of cardiopulmonary arrest due to ventricular fibrillation during American football practice: proposing effective use of the AED, JPN J. ELECTROCARDIOLOGY 2009, 29:298-306. 査読あり

⑤Yagi, N., Manabe, I., Tottori, T., Ishihara, A., Ogata, F., Kim, J.H., Nishimura, S., Fujiu, K., Oishi, Y., Itaka, K., et al. 2009. A nanoparticle system specifically designed to deliver short interfering RNA inhibits tumor growth in vivo. Cancer Res 69:6531-6538. 査読あり

[学会発表] (計2件)

① Fujiu K., Manabe I, Nagai R, Renal collecting duct epithelial cells control tubulointerstitial inflammation in chronic kidney disease, 第75回日本循環器学会学術集会, 横浜, 2011

② Fujiu K., Manabe I, Nagai R, KLF5 Controls Macrophage Polarity in Chronic Inflammatory Diseases via S100 Proteins, Russell Ross Memorial Lecture in Vascular Biology: Inflammation in Atherosclerosis, Annual Scientific Session of American Heart Association,

Orlando, USA, 2009

[図書] (計0件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤生 克仁 (FUJIU KATSUHIRO)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：30422306

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：