

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790518

研究課題名（和文）KLF5 の細胞特異的機能の解明と KLF5 作動薬の新規開発.

研究課題名（英文）Elucidation of cell type-specific KLF5 function
and identification of novel mediators of KLF5 activity.

研究代表者

武田 憲文 (TAKEDA NORIFUMI)

東京大学・医学部附属病院・特任教員

研究者番号：60436483

研究成果の概要：

心筋リモデリングにおける非心筋細胞（線維芽細胞や内皮細胞）の役割が注目されている。転写因子 KLF5 は線維芽細胞に多く発現し、*KLF5*^{-/-} マウスでは圧負荷後の心肥大・線維化が抑制された。線維芽細胞特異的に KLF5 を欠損させた遺伝子改変動物を新たに樹立した所、同様に心筋リモデリングが抑制された。*in vivo* 心筋細胞肥大に線維芽細胞が関与する初めての知見であり、線維芽細胞内 KLF5 が肥大促進・分泌因子を制御することが想定される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	1,600,000	0	1,600,000
20 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	450,000	3,550,000

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：転写因子、心肥大、線維芽細胞、KLF5

1. 研究開始当初の背景

心肥大や心不全などの基本病態は、心筋細胞肥大や血管新生、線維化などの心組織の三次元構築の変化（リモデリング）であるが、そこに関わる細胞の起源や活性化機構、中でも遺伝子転写制御機構については、研究が必ずしも大きく発展していない。遺伝子転写制御は細胞機能を根本的に制御するものであり、リモデリングを理解するためには、転写因子ネットワークの機能を *in vivo* で解析することが必須である。また転写ネットワークを標的とする治療法は高い有効性が期待さ

れる。

我々は心血管系リモデリングの分子機構に注目し、心肥大、血管狭窄、臓器線維化、炎症反応、血管新生等の臓器リモデリングに関与する転写因子 KLF5 を分離同定し、KLF5 遺伝子欠損マウス (*KLF5*^{-/-}) や KLF5 機能を修飾する薬剤 (合成レチノイド Am80) 投与実験において、心肥大や線維化を含む臓器リモデリングが著明に軽減されることを見出した。

以上のように、KLF5 を中心とする転写因子のネットワークが心血管系の組織リモデリングに重要であること、この転写因子ネット

ワークに介入することにより新しい治療戦略が開発出来ることが示された。しかしながら、心血管疾患における各細胞で、特に *in vivo* で KLF5 がどのように情報を受容し、どのような遺伝子群を制御するか、その分子機構の詳細は明らかではない。

2. 研究の目的

KLF5 の細胞種特異的な機能の解明は、組織リモデリングを制御する分子機構や細胞間相互作用を理解するためにも、また特異性が高く有効な治療薬開発のためにも重要である。そこで本研究では、Cre-loxP システムを用いて、従来の *KLF5*^{-/-} マウスの解析にくわえて、心筋リモデリングに関わる細胞種（心筋細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞など）で特異的に *KLF5* を欠損させる遺伝子改変動物（*KLF5*^{fl/fl}）を作成し、心肥大や心不全における KLF5 分子ネットワークの機能を明らかとする。また、細胞種特異的な *KLF5* 欠損マウスや培養細胞モデルを用いて、各病態における KLF5 標的遺伝子をゲノムワイドに明らかとしたい。

3. 研究の方法

- (1) マウス新生児心組織の初代培養系を用いて、心筋細胞と線維芽細胞における KLF5 発現を検討する。大動脈収縮・心圧負荷モデル(TAC)を作成し、遺伝子発現や免疫組織染色法により心組織における KLF5 発現を検討する。
- (2) *KLF5*^{-/-} マウスに対して TAC モデルを作成し、心機能解析や（免疫）組織学的検討、遺伝子発現の差違（マイクロアレイ）などを検証することで、肥大心モデルでの KLF5 転写調節機構を明らかとする。
- (3) Cre-loxP システムを用いた細胞種特異的な *KLF5* 欠損マウスを作成するため、*KLF5* エクソン 2 両端に、*loxP* 配列を導入したトランスジェニックマウス（*KLF5*^{fl/fl}）を作成する。
- (4) 心筋細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス（*αMHC-Cre*）との交配により、心筋細胞特異的な *KLF5* 欠損マウス（*KLF5*^{fl/fl};*αMHC-Cre*）を作成し、TAC モデル後の心筋リモデリングの変化を検討する。
- (5) 遺伝子 X プロモーターを用いて、線維芽細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスを作成し、線維芽細胞特異的な *KLF5* 欠損マウス（*KLF5*^{fl/fl};*X-Cre*）に対して TAC モデルを作成・解析する。
- (6) siRNA によって KLF5 をノックダウンした培養細胞系を用いて、標的遺伝子の探索及び KLF5 分子ネットワークの役割を明らかとする。

4. 研究成果

(1) マウス新生児心組織を用いて心筋細胞と線維芽細胞を初代培養し、KLF5 の発現を比較したところ (realtime PCR 法)、線維芽細胞で約 3 倍量の発現を認めた。また TAC 心での発現は、負荷後 3 日目で最大値（約 7 倍）となり、免疫組織学的検討では、心筋細胞を取り囲む間質細胞（特に線維芽細胞）での発現が強かった。

(2) *KLF5*^{-/-} マウスに対して TAC モデルを作成したところ、心重量や心体重比、心筋細胞径の増大が部分的に抑制され、肥大関連マーカー (ANP, βMHC) の発現も抑制された。さらに間質線維化や線維化関連マーカーの発現 (Collagen1) も低下した。KLF5 は細胞増殖にも強く関与するが、負荷後初期の間質細胞増殖も著しく抑制されていた (*in vivo* BrdU assay)。

これらから、KLF5 は圧負荷後の心筋リモデリングに重要な役割を果たすことが示唆される。

(3) *KLF5* は線維芽細胞で多く発現するが、心筋細胞でも少量の発現がある。心筋リモデリングにおいて、何れの細胞種での *KLF5* が主要な機能を担うのか？

次に Cre-loxP システムを用いた細胞種特異的な *KLF5* 欠損マウスの樹立に着手した。*KLF5* エクソン 2 両端に、*loxP* 配列を導入したトランスジェニックマウス（*KLF5*^{fl/fl}）では、Cre リコンビナーゼが発現する細胞種内において、エクソン 2 は欠落して機能的 *KLF5* 発現量が低下する。細胞種特異的な発現プロモーターを用いて、Cre リコンビナーゼを発現することができるトランスジェニックマウスとの交配で、細胞種特異的な *KLF5* 欠損マウスを順次作成した。

(4) 心筋細胞特異的に *KLF5* を欠損させる効果を検討するため、*αMHC* プロモーターを用いて心筋細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス（*αMHC-Cre* マウス）との交配を行い、心筋細胞特異的な *KLF5* 欠損マウスを樹立した（*KLF5*^{fl/fl};*αMHC-Cre*）。心筋細胞における *KLF5* 欠落効率は良好、発生・発達過程、心機能には影響がなかった。

KLF5^{fl/fl};*αMHC-Cre* マウスに TAC モデルを作成したところ、心肥大や間質線維化は *KLF5*^{fl/fl} マウスと同等の反応であり、圧負荷肥大心モデルにおいて、心筋細胞での *KLF5* 機能は軽微である可能性が示唆された。

(5) 心線維芽細胞特異的に *KLF5* を欠損させる効果を検討するため、遺伝子 X プロモーターを用いて心線維芽細胞特異的に Cre リコンビ

ナーゼを発現するマウス (*X-Cre* マウス) を樹立した。遺伝子 *X* は、心負荷後に線維芽細胞で特異的に発現が増加することが報告されており、本新規樹立動物においても、*R26RstoplacZ* 指標マウスとの交配後の負荷心において、心臓組織での線維芽細胞特異的な Cre リコンビナーゼの発現を確認した。

KLF5^{fl/fl}; X-Cre マウスに対して TAC モデルを作成したところ、線維芽細胞での *KLF5* 欠落効率は負荷後に増大した。その結果、*KLF5^{fl/fl}* マウスと同様に心重量や心体重比、心筋細胞径の増大が部分的に抑制され、肥大関連マーカーの発現が抑制された。さらに間質線維化や線維化関連マーカーの発現も低下し、負荷後初期の間質細胞増殖も著しく抑制していた。

そのほか、血管内皮細胞特異的な *KLF5* 機能を検討するため、*Tie2* プロモーターを用いて血管内皮細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス (*Tie2-Cre* マウス) との交配を行い、内皮細胞特異的 *KLF5* 欠損マウス (*KLF5^{fl/fl}; Tie2-Cre*) を樹立・解析中である。

以上は、*in vivo* 心筋細胞肥大反応において、線維芽細胞側から心筋細胞への関連・相互作用が想定されることが示唆される初めての知見であり、この過程に線維芽細胞内の *KLF5* が重要な役割を担っている。

(6) 従来の *in vitro* 心筋細胞-非心筋細胞の関連系において、線維芽細胞からの分泌因子 (ET-1, CT-1, LIF, IL-6 など) が、心筋細胞の肥大反応を促進することが報告されてきた。線維芽細胞における *KLF5* の機能・役割を検討するため、siRNA を用いて線維芽細胞の *KLF5* をノックダウンし、この *in vitro* assay 系を用いた線維芽細胞-心筋細胞間関連に与える影響を検討した。

無血清培地で線維芽細胞を培養した培養上清で、心筋細胞を培養すると、心筋細胞は肥大反応を呈し、心筋細胞面積や ANP 産生量が増大する。しかしながら、siRNA で *KLF5* をノックダウンした線維芽細胞由来の培養上清液では、この肥大反応が部分的に抑制された。

以上より *KLF5* は、線維芽細胞から分泌され心筋細胞肥大に関与する蛋白の発現・制御に関わる可能性がある。現在、*KLF5* 標的因子および *KLF5* 分子ネットワークの解明を継続中である。

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 7 件)

Takeda N, Seko Y, Oriuchi Y, Nagai R.

Gamma-delta T-cell-mediated dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2008;125:130-132. (査読有)

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* 2008;283:24682-24689. (査読有)

Kato H, Ishida J, Nagano K, Sugaya T, Takeda N, Sugiyama F, Yagami KI, Fujita T, Nangaku M, Fukamizu A. Deterioration of atherosclerosis in mice lacking angiotensin II type 1A receptor in bone marrow-derived cells. *Lab Invest* 2008;88:731-739. (査読有)

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* 2007;27:1535-1541. (査読有)

Takeda N, Nakajima J, Yamada N, Hiroi Y, Hirata Y, Nagai R. Rupture of bronchogenic cyst in the pericardium with high carbohydrate antigen 19-9 production. *Respiratory Medicine Extra* 2007;3:76-78. (査読有)

武田憲文, 平田恭信. 心房性ナトリウム利尿ペプチド: 主要薬剤各論 特徴, 作用機序, 薬物動態, 適応・禁忌, 臨床成績, 副作用 心不全 (下) 最新の基礎・臨床研究の進歩, *日本臨床* 2007;65 増刊(5):110-114 (査読無)

武田憲文, 平田恭信, 永井良三. 後腹膜線維症の心血管病変の見方. *呼吸と循環* 2007;55:441-447 (査読無)

[学会発表] (計 6 件)

武田憲文, 真鍋一郎, 永井良三. Significance of the transcription factor *KLF5* in myocardial hypertrophy in response to pressure overload. 2009年3月20-22日、日本循環器学会学術集会、大阪

武田憲文, 真鍋一郎, 永井良三. 心筋リモデリングにおける転写因子 *KLF5* の役割、厚生労働省難治性疾患克服研究事業特発性心筋症に関する調査研究 (第2回北風班) 2009年3月3日、大阪

Norifumi Takeda, Ichiro Manabe, Ryoza Nagai. Significance of the transcription

factor KLF5 in myocardial hypertrophy in response to pressure overload. 2008年11月8-12日、米国ニューオーリンズ

武田憲文、真鍋一郎、永井良三、心筋リモデリングにおける転写因子 KLF5 の役割、厚生労働省難治性疾患克服研究事業特発性心筋症に関する調査研究(第1回北風班) 2008

武田憲文、真鍋一郎、永井良三、圧負荷肥大心モデルにおける転写因子 KLF5 の役割、2008年9月8-10日、日本心臓病学会学術集会、東京

年10月15日、東京

武田憲文、真鍋一郎、永井良三、Significance of the transcription factor KLF5 in myocardial hypertrophy in response to pressure overload、日本循環器学会総会、2008年3月29日、福岡

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 憲文 (TAKEDA NORIFUMI)
東京大学・医学部附属病院・特任教員
研究者番号：60436483

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者