

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：1 2 6 0 1

研究種目：若手研究(B)

研究期間：平成 23 年度 ～平成 24 年度

課題番号：2 3 7 9 0 8 3 9

研究課題名（和文） 大動脈疾患での転写因子 K L F 6 を軸とした病態機構解明と
治療法の開発

研究課題名（英文） KLF6 mediated mechanism as a therapeutic target in aortic diseases

研究代表者 澤城大悟 (SAWAKI DAIGO)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：4 0 4 5 6 1 3 2

研究成果の概要（和文）：

転写因子 Krüppel-like factor 6 (KLF6) の心血管系における役割はほとんど知られていない。他の KLF 因子 (KLF2, 3, 5, 15 等) の役割からは KLF6 も同領域において重要な働きをしている事が推測され、現在までの検討にて病態刺激下での大動脈壁遺伝子発現や臓器線維化に変化をもたらす因子である事が明らかとなっている。今研究ではその知見を更に展開し whole body もしくは conditional ノックアウトマウスを用いた各種病態刺激への大動脈壁を始めとしたリモデリングの検討、分子生物学的手法等を通して KLF6 の特に大動脈疾患における役割を明らかにし、大動脈解離及び大動脈瘤における新規病態マーカーや新規治療法の標的発見に至る事を目標とした。

KLF6 ヘテロノックアウトマウスは野生型に比しアンジオテンシン II 負荷（2週間）による各臓器での TGFβ-1 の mRNA 発現量も低下、また血清中 TGFβ-1 では ELISA 上 total/active 両 form において KLF6 ヘテロノックアウトマウス群での低下を認めた。刺激前では血圧は差がないもののアンジオテンシン II 負荷後の血圧上昇は野生型：150-160mmHg、ヘテロノックアウト群 100-120mmHg と差があり AII 高容量投与による血圧や心線維化が hetero 群では減弱している傾向であった。これは選択的 KLF6 阻害により高血圧等による心機能低下や血圧上昇を抑制し得る可能性を示していると考えられる。一方で、KLF6 ヘテロノックアウトマウスはアンジオテンシン II + CaCl₂ 負荷による大動脈解離・瘤形成が亢進しており、炎症細胞の浸潤や、壁全体でのマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-2 の発現亢進、壁構造の破壊が認められた。これら所見は血管壁リモデリングの変化の悪化を示しており KLF6 は 2 面的な作用をすることが示唆された。KLF6 を標的とした治療（選択的阻害薬等）では臓器特異性等につき熟慮が必要であることを示す所見と考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Previous studies suggest that Krüppel-like factors (KLFs) play important roles in the cardiovascular system. Preliminary studies indicated that KLF6 has roles in cardiovascular development and remodeling such as cardiac fibrosis. In this study, we next aimed to decipher the mechanism in which KLF6 mediates aortic pathologies such as aortic aneurysm or dissection. Continuous angiotensin II (AngII) infusion in *klf6^{+/-}* mice resulted in decreased TGFβ-1 expression levels both in aortic wall and serum in *KLF6^{+/-}* mice, and diminished blood pressure increase (wild-type 150-160 mmHg, *KLF6^{+/-}* 100-120 mmHg), which indicates possibility of blood pressure control by KLF6 inhibition. On the other hand, *KLF6^{+/-}* mice showed accelerated aortic remodeling such as inflammatory cell infiltration or MMP-2 induction and aortic wall

destruction in aortic aneurysm/dissection formation with AngII + Cacl2. These data collectively showed the biphasic mechanism in aortic pathologies, indicating the importance of meticulous decision of KLF6 targeting therapies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：分子血管病態学

1. 研究開始当初の背景

転写因子 Krüppel-like factor 6 (KLF6)の心血管系における役割はほとんど知られていない。他の KLF 因子 (KLF2,3,5,15 等) の役割からは KLF6 も同領域において重要な働きをしている事が推測され、現在までの検討にて病態刺激下での大動脈壁遺伝子発現や臓器線維化に変化をもたらす因子である事が明らかとなっている。

2. 研究の目的

今研究ではその知見を更に展開し whole body もしくは conditional ノックアウトマウスを用いた各種病態刺激への大動脈壁を始めとしたリモデリングの検討、分子生物学的手法等を通して KLF6 の特に大動脈疾患における役割を明らかにし、大動脈解離及び大動脈瘤における新規病態マーカーや新規治療法の標的発見に至る事を目標とする。

3. 研究の方法

i) KLF6 の心血管発生・発達における役割の解明：

KLF 因子群は血球・造血・血管・心筋等の分化・発生に重要な役割を果たしている事は前述のとおりであるが、胎芽・胎児等の発生諸段階から、新生児・幼若期・成体と発達のどの時点に、どの組織、またどの細胞 (血管であれば内皮細胞・平滑筋細胞・線維芽細胞等の構成細胞群) に発現するのか、また逆に消退していくのかを具体的には KLF6 ヘテロノックアウトマウスを用いて検証・同定していく。ヘテロノックアウトマウスは KLF6 相同遺伝子の片方にネオマイシン耐性/ベータガラクトシダーゼ発現遺伝子がノックインされており X-gal 染色を行うことにより KLF6 の発現状況を間接的に検討できる。またこの方法は同様に病態刺激においての大動脈等各組織・細胞での KLF6 発現・消退の箇所・経過を明らかにすることにより、直接の KLF6 の標的臓器・器官、また組織・細胞を明らかにし細胞・分子レベルでの解析の基とする。

ii) KLF6 ヘテロノックアウトマウスを用いた

各種病態刺激に対しての大動脈リモデリングの解析：KLF6 ヘテロノックアウトマウスに対してアンジオテンシン II 持続投与 (急性・慢性)、ワイヤー障害・内頸動脈結紮術を施行し血管リモデリングの差異について通常型マウスと比較検討する。レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の中でもアンジオテンシン II は特に高血圧の助長、血管の間質増生 (線維化) の伝達因子であり持続投与は血管リモデリングや心肥大・心線維化・腎障害の一般的動物モデルとなっている。このモデルの予備的検討では前述の様に通常型マウスとの比較で心筋内血管周囲線維化に有意な減少が KLF6 には見られた。更に長期モデルでの比較を行う事により大動脈・大動脈周囲・腎臓等それぞれでの KLF6 の量的発現差異によるリモデリングの相違を検討し KLF6 の病態刺激下での大動脈壁・周囲組織に対しての確定する。討する。更に Flox/Cre システムを用いた臓器特異的 KLF6 ノックアウトマウス (conditional knockout mouse) を作成し血管構成因子特異的な KLF6 欠失モデルを構築中である。この系を用いる事により更に選択的特異的 KLF6 の働きの解析やヘテロノックアウトマウスで認められた表現型を更に明瞭化することが可能となる。

<平成 23 年度の具体的な計画>

(i) KLF6 の大動脈発生・発達における役割の解明、発生諸段階での KLF6 発現・消退の経過を確認し、(ii) KLF6 ヘテロノックアウトマウス・臓器特異的 KLF6 ノックアウトマウスを用いた各種病態刺激に対しての大動脈反応の検討を行う、具体的にはアンジオテンシン II 持続投与 (急性・慢性)・ワイヤー障害・内頸動脈結紮術・高食塩/高脂肪食負荷等、通常マウスとの反応差異の形態学的・組織病理学的検討、それぞれにおける KLF6 の発現状況の確認を行う。同時に並行して

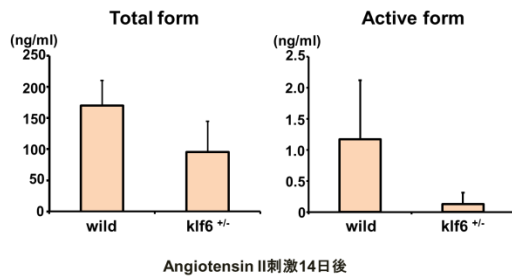
(iii) 初代継代線維芽細胞・平滑筋細胞・内皮細胞・心筋細胞・前脂肪細胞を用い KLF6 gain of function, loss of function 等 in vitro での検討、具体的にはアンジオテンシン II 等病態刺激による KLF6 発現・被転写活

性化因子の同定(マイクロアレイ・クロマチン免疫沈降)、アデノウイルスベクター等による KLF6 強制発現の影響、また RNA 干渉等を用いた選択的 KLF6 ノックダウンによる影響の検討、KLF6 下流因子の同定を行う方針とした。

4. 研究成果

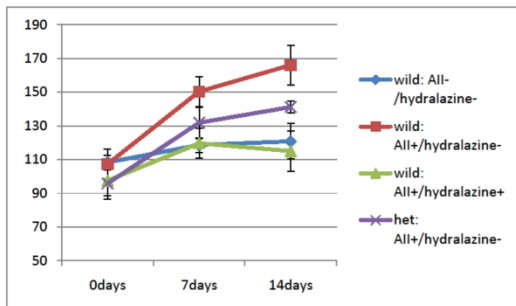
KLF6 ヘテロノックアウトマウスは野生型に比しアンジオテンシン II 負荷 (2 週間) による各臓器での TGF β -1 の mRNA 発現量も低下、また血清中 TGF β -1 では ELISA 上 total/active 両 form において KLF6 ヘテロノックアウトマウス群での低下を認めた。

klf6^{-/-} マウスでは Angiotensin II による
血中 TGF β -1 分泌が低下している



刺激前では血圧は差がないもののアンジオテンシン II 負荷後の血圧上昇は野生型: 150-160mmHg、ヘテロノックアウト群 100-120mmHg と差があり AII 高容量投与による血圧や心線維化が hetero 群では減弱している傾向であった。

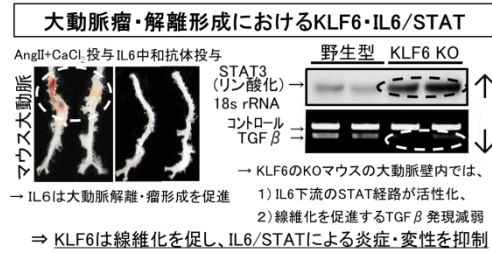
klf6^{-/-} mice shows decreased systolic blood pressure increase by Ang II administration



Oral of hydralazine successfully suppresses blood pressure increase by Ang II

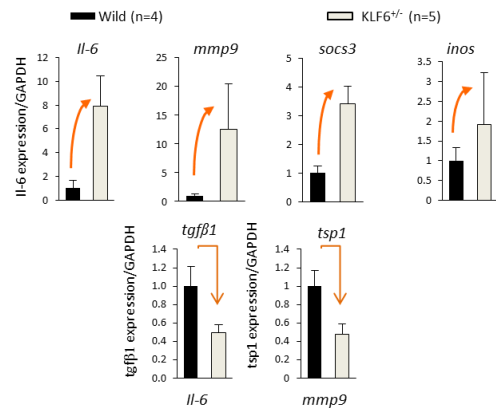
これは選択的 KLF6 阻害により高血圧等による心機能低下や血圧上昇を抑制し得る可能性を示していると考えられる。一方で、KLF6 ヘテロノックアウトマウスはアンジオテンシン II + CaCl₂ 負荷による大動脈解離・瘤形成が亢進しており、炎症細胞の浸潤や、壁全体でのマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-2 の発現亢進、壁構造の破壊が認めら

れた。



これら所見は血管壁リモデリングの変化の悪化を示しており KLF6 は 2 面的な作用をすることが示唆された。KLF6 を標的とした治療 (選択的阻害薬等) では臓器特異性等につき熟慮が必要であることを示す所見と考えられる。

KLF6^{+/-} マウスでは大動脈炎症反応が亢進している



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 4 件)

1. Sawaki D, Suzuki T. Targeting Transforming Growth Factor- β Signaling in Aortopathies in Marfan Syndrome. *Circ J*. 2013 Mar 25;77(4):898-9.
2. Suzuki T, Bossone E, Sawaki D, Jánosi RA, Erbel R, Eagle K, Nagai R. Biomarkers of aortic diseases. *Am Heart J*, 2013, 165(1):15-25.
3. 澤城大悟、鈴木亨、特集『バイオマーカーupdate—診断から治療評価へ—』「急性大動脈解離」 「ICU と CCU」, 2013, vol 37(1) 21-26
4. 澤城大悟、鈴木亨、

特集「循環器病のバイオマーカー」2.
循環器疾患診療ツールとしてのバイオ
マーカー f. 大動脈解離・大動脈瘤,
Heart View, 2012, vol.16 No12(増刊号),
72-78

〔学会発表〕(計8件)

**American heart association scientific
session 2012 (Los Angeles, CA, USA:
2012/11/5-8)**

- 1). Daigo Sawaki, Toru Suzuki, Kenichi
Aizawa, Takayoshi Matsumura, Yoshiko
Munemasa, Junichi Ishida, Scott
Friedman, Ryoza Nagai, Cardiomyocyte
Regulates Cardiac Fibrosis through Cell
to Cell Interaction Mediated by KLF6
- 2). Bo Kyung Son, Toru Suzuki, Daigo
Sawaki, Kenichi Aizawa, Hong Zhan,
Junichi Ishida, Takayoshi Matsumura,
Ryoza Nagai,
KLF6 Modulates Aortic Aneurysm
Formation by Balancing Between
Inflammatory and TGFβ Signaling
Pathways

**FASEB Summer Research Conference
"Biology & Pathobiology of Kruppel-Like
Factors (KLFs)" (Snowmass, Colorado,
USA: 2012/8/5-9)**

- 3). Suzuki T
KLF6 in cardiovascular and metabolic
disease
- 4). Sawaki D
Krüppel-like Factor 6 Modulates
Recruitment and Polarization of
Inflammatory Cells through
Cardiomyocytes in Initiation of Cardiac
Fibrosis.

**第77回日本循環器学会総会・学術集会(横
浜: 2013/3/15-17)**

- 5). Daigo Sawaki, Toru Suzuki, Kenichi

Aizawa, Takayoshi Matsumura, Yoshiko
Munemasa, Junichi Ishida, Scott
Friedman, Komuro Issei, Ryoza Nagai,
Cardiomyocyte Regulates Cardiac
Fibrosis through Cell to Cell Interaction
Mediated by KLF6

- 6). Son BK, Suzuki T, Sawaki D, Aizawa K,
Matsumura T, Munemasa Y, Zhan H,
Ishida J, Scott Friedman, Komuro Issei,
Nagai R,
KLF6 modulates aortic aneurysm
formation by regulating both of
inflammatory and TGFbeta signaling
pathways

**第76回日本循環器学会総会・学術集会(福
岡: 2012/3/16-18)**

- 7). Son BK, Suzuki T, Sawaki D, Aizawa K,
Matsumura T, Munemasa Y, Zhan H,
Okamoto Y, Ishida J, Nagai R,
Aortic remodeling stimulates aneurysm
formation in apoE-/- mice through
gp130/STAT3 signaling.
- 8). Daigo Sawaki, Toru Suzuki, Kenichi
Aizawa, Takayoshi Matsumura, Yoshiko
Munemasa, Junichi Ishida, Scott L
Friedman, Ryoza Nagai
KLF6 Modulates Recruitment and
Polarization of Inflammatory Cells
through Cardiomyocytes in Initiation of
Cardiac Fibrosis.

〔その他〕
ホームページ等
東京大学大学院医学系研究科
ユビキタス予防医学講座
URL : <http://plaza.umin.ac.jp/upm/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
澤城 大悟 (SAWAKI DAIGO)
東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号 : 40456132

(2) 研究協力者

鈴木 亨 (SUZUKI TORU)

東京大学・大学院医学系研究科・特任准教授

相澤 健一 (AIZAWA KENICHI)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

松村 貴由 (MATSUMURA TAKAYOSHI)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

石田 純一 (ISHIDA ZYUNICHI)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

孫 輔卿

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員

永井 良三 (NAGAI RYOZO)

自治医科大学・学長