

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 3月31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究B

研究期間：2011～2012

課題番号：23791072

研究課題名（和文）

血球細胞における転写因子KLF5の機能解析と臨床応用へむけた基礎的分子機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of the function of KLF5 in blood cells and elucidation of its underlying molecular mechanism which leads to clinical application

研究代表者

松村 貴由 (Matsumura, Takayoshi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80436485

研究成果の概要（和文）：

血球細胞全般における転写因子 KLF5 の機能を解析した結果、特に血小板の正常な機能の維持に KLF5 が重要な働きをすることを見出した。巨核球・血小板特異的に KLF5 を欠失させたマウスにおいては生体内での血栓形成能および血管新生能が減弱していることを見出し、その分子生物学的機序についても一部明らかにした。これらの成果は、血小板機能に関わる多くの循環器系疾患、悪性腫瘍などの治療法につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

With a broad analysis of the function of KLF5 in blood cells, I found that KLF5 is critical especially to normal functions of platelets. Platelet lineage-specific *Klf5*-knockout mice showed impaired *in vivo* thrombus formation and angiogenesis activity, and I investigated the underlying molecular mechanisms. Our results can lead to future therapeutic interventions for various cardiovascular and cancer diseases.

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	3200000	960000	4160000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、血液内科学

キーワード：血球細胞 巨核球 血小板 血管新生 転写因子

1. 研究開始当初の背景

Krüppel-like factor (KLF) 転写因子群はこれまで少なくとも15個が同定、解析され、種々の生体内外からの刺激に応答して細胞増殖・分化、腫瘍形成、代謝、炎症、組織リモデリングなどの生理的および病理的応答に寄与することが知られている。特に最近では、胚性幹細胞及びiPS細胞におけるKLF2、KLF4、KLF5の重要性が報告され、各種幹細胞における役割についても注目が集まっている。

申請者の所属する研究室は、約10年前に血管平滑筋細胞脱分化の鍵因子としてKLF5

を同定し、その後KLF5が心血管系のリモデリングに中心的役割を果たすことを発見した。その後も分子レベルおよび個体レベルでの種々の解析を通してKLF5が心血管系病態のみならず、脂肪組織、骨格筋組織などにおいても、各種ストレスに対する応答において基軸的役割を果たすことを確立してきた。

それと並行して、KLF5の転写活性調節機構についても特にそのアセチル化を中心に解析を進め、申請者自身も、脱アセチル化酵素HDAC1がKLF5の直接相互作用因子であることを見出し、両者の結合がKLF5の転写活性を抑制的に制御すること、アセチル化酵素p300とは競合的に作用することを見出し

た (Matsumura et al. J Biol Chem 2005)。

申請者は予備的検討にて、骨髄においても一部の血球系統で KLF5 が発現していることを確認していたため、骨髄において KLF5 が血液細胞の分化やその機能維持に重要な役割を果たしている可能性があると考えた。このような学術的背景をもとに、転写因子 KLF5 の機能解析を通し、いまだ解明されていない骨髄細胞の分化制御機構および末梢血球の機能調整機構を明らかにし、各種病態に対する治療への臨床応用に展開しうる基盤的研究を行うこととした。

2. 研究の目的

血球細胞の分化・機能発現の詳細な分子生物学的機構については不明の点もいまだ多く残されている。申請者は予備的検討をもとに、骨髄において転写因子 KLF5 が血球細胞の分化に重要な役割を果たしている可能性があることを見出していた。このため、本研究は、骨髄における転写因子 KLF5 の機能解析を通し、いまだ解明されていない血球細胞の分化制御機構および末梢血球の機能発現機構を明らかにし、臨床応用へむけた基礎的分子機構の解明をめざした。

3. 研究の方法

KLF5 の血球系における役割を同定し治療標的の発見に繋げるため、具体的には、

- (1) 血球の各系統の増殖・分化・刺激応答の過程における KLF5 の発現変化を観察する。
- (2) 薬剤誘導性に KLF5 発現を血球系細胞全般で抑制できる遺伝子改変マウスを用い、KLF5 の後天的欠失の影響を解析する。
- (3) 各血球系統特異的に KLF5 発現が欠失された遺伝子改変マウスを用い、各血球系固有の KLF5 の役割を解明する。
- (4) 生体内での解析結果をもとに、その分子生物学的機序を生体外の血球細胞の培養系にて明らかにする。
- (5) 以上により、血球系の増殖・分化、病態における KLF5 の役割を明らかにし、最終的に、各種疾患における臨床応用に向けた基礎的分子機構の解明をめざした。

4. 研究成果

本研究は、転写因子 KLF5 の機能解析を通し、血球細胞全般の分化制御機構・機能調整機構を明らかにすることが目的であり、研究内容は多岐にわたった。その中で巨核球分化・血小板生成における KLF5 の機能解析において、最も臨床的に有意義な成果が得られたと考えられるため、その成果について中心

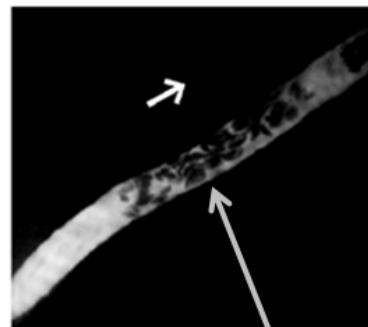
に記載する。

まず、申請者は、造血幹細胞から巨核球分化の過程で KLF5 が発現することをみいだした。さらに、KLF5 の発現を全身の細胞で減弱させた KLF5 ヘテロノックアウトマウスを用い、生体内イメージングシステムにて腸管の毛細血管にレーザーをあて、それに伴う血小板の凝集を観察したところ、レーザー照射後の血小板の血管壁への付着も、その後の血小板凝集塊の形成も、有意に抑制されていることがわかった。

このため、骨髄巨核球から正常な血小板が形成される過程において、KLF5 が重要な働きをしている可能性は極めて高いと考えられた。しかし、KLF5 ヘテロノックアウトマウスで観察された生体内の血栓形成能減弱については、血小板のみならず、内皮細胞その他血管側の機能異常も関与している可能性があった。このため、上記のように観察された現象が血小板の機能異常に由来することを確実に証明するために、巨核球・血小板特異的に KLF5 を欠失させた *Pf4-Cre;Klf5^{fllox/fllox}* マウスを作成し、その解析を行った。

その結果、当初予想された通り、このマウスにおいても、末梢血中の血小板数に著変ない一方で、生体内イメージングシステムにて、レーザー照射後の血小板の血管壁への付着や、その後の血小板凝集塊の形成が抑制されていることが確認された。

通常マウス
傷害20秒後



血栓形成

血小板特異的にKLF5を欠失させたマウス
傷害20秒後



血栓形成の抑制

また、この結果と一致して、これらのマウスにおいては、マウス尾を切断することにより測定する出血時間が延長し、さらに、止血後の再出血（二次出血）の頻度も増加していた。すなわち、個体レベルでの止血機能の低下、および、一旦形成された血栓の脆弱性も証明された。

動脈硬化の初期過程において、傷害された内皮細胞への白血球の付着が重要であることは古くから知られている。最近、この過程において、内皮細胞へ付着した活性化血小板が白血球の内皮への付着・活性化・内皮下への遊走を誘導させることが明らかになりつつある。臨床の場合においても、動脈硬化疾患の予防に抗血小板薬が有用であることのエビデンスは枚挙にいとまなく、動脈硬化の新規予防法の開発には、血小板の内皮への付着・活性化の機序を解明することが重要と考えられる。

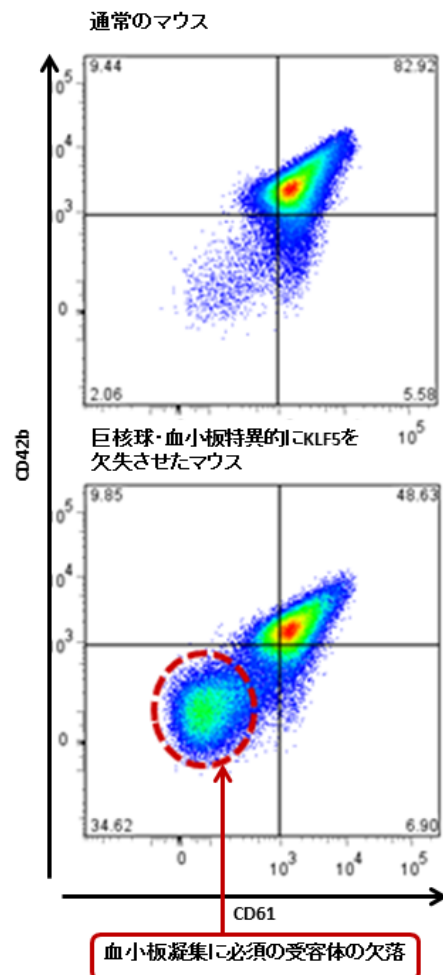
また、かつて止血・血栓形成のためのみにあると考えられていた血小板は実際には、動脈硬化、炎症、血管新生、免疫、組織修復、腫瘍転移など多くの過程で重要な役割を果たしていることが知られるようになった。その治療介入の対象としての可能性に多くの期待が集まり、特に悪性腫瘍に対する従来の抗がん剤の限界をふまえ、腫瘍関連血管新生を抑える新規薬剤の開発に対するニーズは強い。

これらの臨床的背景を踏まえると、KLF5 欠失マウスにおける血小板機能異常の機序を明らかにすることは、血液疾患、心血管系疾患のみならず、悪性腫瘍の治療に対しても、有用な知見を得られる可能性が高いと判断し、さらに、その分子生物学的機序の解明をすすめることとした。

まず、KLF5 欠失マウスの血小板をフローサイトメトリーを用いて解析したところ、このマウスの血小板の一部において CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, GPVI, CD61 などの血小板の凝集に必須の表面抗原が欠失していることがわかった。

動脈硬化の初期段階において、傷害された内皮細胞下のヴォン・ヴィレブランド因子 (vWF) に血小板表面の GPIIb/IIIa 複合体 (CD42a/CD42b/CD42c/CD42d 複合体) が結合することが血小板の血管壁への接着の始まりであり、その後、GPVI を含むコラーゲン受容体が細胞外基質であるコラーゲンと結合することで、血小板の結合はより強固なものとなり、また、血小板は活性化される。活性化された血小板は GPIIb/IIIa 複合体 (CD41/CD61 複合体) を通じてフィブリンノーゲン、vWF、フィブロネクチンなどに結合し、強固な凝血塊になっていくと同時に、各

種サイトカインを分泌し動脈硬化巣における炎症を惹起していく。すでに明らかになっている、このような血小板の血栓形成能発現機構を考慮したとき、KLF5 を欠失させたマウスの血小板では、この血小板凝集・活性化に必須の受容体の発現が全般的に低下していることが生体内で観察された機能異常の原因であることが十分に想定された。



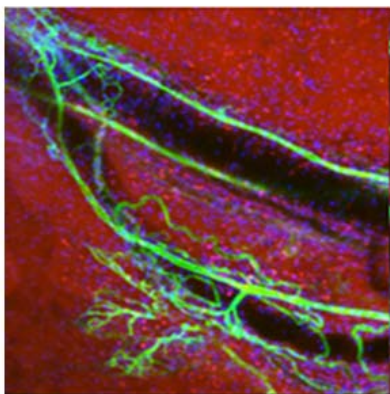
生体外における各種血小板機能評価においても、KLF5 を欠失させた血小板では、その接着能その他が低下していることが証明され、KLF5 は血小板の基本的機能である凝集能を包括的に制御する重要な因子であることが見いだされた。

前述の通り、生体内における血小板の機能はその血栓形成能にとどまらない。臨床的応用をめざすという観点からは、血小板機能の改変に伴う、血管新生能の解析が有用であると判断し、次にこの評価を行った。

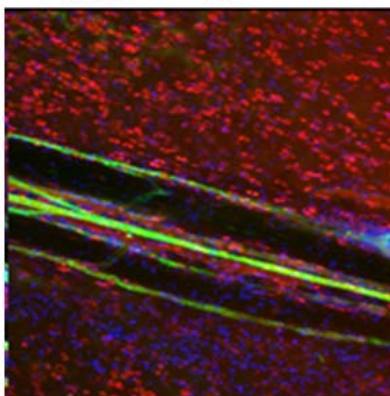
巨核球・血小板特異的に KLF5 を欠失させた *Pf4-Cre;Klf5^{fllox/fllox}* マウスの背部に、血管内皮細胞成長因子 (VEGF) および線維芽細胞成長因子 (bFGF) を添加した血管新生評価用のゲルを植え込み、ゲルに侵入する血管新

生能を検討した。すると、通常のマウスでは蛇行しよく発達した血管・リンパ管の新生が確認された一方で、**KLF5** 欠失マウスでは未発達で直線的な血管・リンパ管が散見されるのみで、血管新生能・リンパ管新生能の減弱は明らかであった。

通常のマウス



血小板特異的にKLF5を欠失させたマウス



緑の細い管:血管
黒の太い管:リンパ管

このことは血小板側の機能異常のみで体内の血管新生・リンパ管新生が影響をうけることを証明しており、血管新生における血小板機能の重要性を示している。治療的側面から言えば、血小板機能を制御するだけで腫瘍の増殖抑制が可能になることを意味しており、重要な知見と考えられた。

現在、巨核球における転写因子 **KLF5** の転写制御から、血小板表面受容体の発現調整、血小板凝集能、生体における動脈硬化・血管新生までにいたる一連のプロセスの全容解明とそれに基づく治療介入法の開発のため、具体的には、**KLF5** による血小板表面受容体発現制御機構の分析、および、血小板機能異常により動脈硬化・血管新生が抑制される機序の解明、の両面から解析を進めており、すでに一定の成果を得ている。基礎的研究としての本研究のインパクトはすでに十分あると考えており、現在、国際雑誌への投稿を準備中である。

備中である。

さらに今後の研究により、どの部分が治療介入の対象として最も妥当性があるか検討したいと考えている。具体的には、正常の止血・血栓形成、血管新生には影響をおよぼさず、動脈硬化、腫瘍などによる病的血管新生にのみ影響する作用点、また、低分子化合物による制御が可能である作用点、が治療的介入にはもっとも適しており、この観点から検討し、将来の創薬につながる成果をめざしたい。

また、血小板についてはすでに **iPS** 細胞から血小板をつくる技術が確立されつつあり、**iPS** 細胞由来血小板は大量生産が可能であること、血小板の癌化は考えにくいことから、**iPS** 関連の研究においては実用化に近いと考えられている。本研究の成果に基づき、**iPS** 細胞由来血小板に腫瘍関連血管新生を抑制する性質を付与する研究も将来的に可能になるかもしれない。

なお、その他、当初の研究計画の通り、他の血液系における **KLF5** の機能についても解析を続けている。特に、**T** 細胞の末梢での分化、顆粒球系細胞の機能発現における **KLF5** の役割についての解析が有望であると考えている。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

松村 貴由、他

Platelet surface molecules regulated by KLF5 are critical to in vivo thrombus formation and angiogenesis

第 77 回日本循環器学会

2013 年 03 月 17 日 横浜

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕 (計 0 件)

〔その他〕 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 貴由 (Matsumura, Takayoshi)

東京大学医学部附属病院 助教

研究者番号: 80436485

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし