

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790743

研究課題名(和文) 転写因子KLF6による肥満と2型糖尿病の発症機序の解明

研究課題名(英文) The Role of Transcription Factor KLF6 in the Pathogenesis of Obesity and Type 2 Diabetes

研究代表者

石田 純一(Ishida, Junichi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10625536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肥満と2型糖尿病は心血管疾患のリスク因子であり、発症機序の解明が急務である。転写因子KLF6は脂肪細胞分化を促進し、また高脂肪食を投与したKLF6ノックアウトマウスは体重増加や脂肪肝の形成が抑制されたため、肥満や2型糖尿病の病態形成におけるKLF6の関与が示唆された。高脂肪食を投与した肝細胞、脂肪細胞、マクロファージそれぞれにおける特異的KLF6ノックアウトマウスの検討から、肝細胞と脂肪細胞におけるKLF6の関与が示唆された。特に肝細胞においてKLF6がPPARαの発現を間接的に促進する、という作用機序が示された。肥満と2型糖尿病の治療開発にもつながる興味深い知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Obesity and type 2 diabetes are the major risk factors of cardiovascular disease, and it is essential to elucidate the underlying mechanism. Transcription factor KLF6 promotes adipocyte differentiation, and heterozygote KLF6 knockout mice were resistant to high fat-induced obesity and fatty liver. These findings indicate that KLF6 is involved in the pathomechanism of obesity and type 2 diabetes. Hepatocyte-specific, adipocyte-specific and macrophage-specific KLF6 knockout mice were fed high-fat diet. Hepatocyte-specific and adipocyte-specific KLF6 deletion resulted in suppressed weight gain and reduced hepatic fatty change compared with control group. KLF6 indirectly promoted the expression of PPAR alpha in hepatocyte. These results could also provide a new insight for the treatment of obesity and type 2 diabetes.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肥満 2型糖尿病 小型脂肪細胞 KLF6

1. 研究開始当初の背景

(1) 転写因子 KLF 群の脂肪分化における役割

KLF は C 末端に 3 つの C2H2 型 zinc-finger モティーフを有することを特徴とする転写因子群でありこれまで 17 種が同定・解析されている (Suzuki et al. *Trend Cardiovasc Med.* 2005)。昨今細胞増殖、アポトーシス、発生、癌化のプロセスにおける KLF の役割が次々と明らかになり、注目をあびている。また脂肪前駆細胞を用いた培養細胞実験から、脂肪分化においても複数の KLF が分化を促進あるいは抑制することが明らかになっており、脂肪細胞の分化調節における KLF の重要性が示唆される。

(2) KLF6 の機能について

KLF6 (GBF, Zf9, COPEB) は我々のグループが HIV の転写制御の解明の道程にて単離・同定を行った因子である (Suzuki et al. *J. Biochem.* 1998)。当初より癌抑制遺伝子としての機能に注目が置かれていた (Narla et al. *Science* 2001) が、細胞増殖・アポトーシスにおける機能や肝臓線維化でのサテライト細胞での活性化 (Ratziu et al. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 1998) といった多彩な役割が徐々に明らかになっている。血管内皮細胞においてはエンドグリン (Bottella et al. *Blood* 2002) やウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (uPA) 等を介し形質転換成長因子 (TGF) β の生理活性作用を増強することが知られている他 (Kojima et al. *Blood* 2000)、KLF6 のホモノックアウトマウスは受精後 12.5 日で胎児死亡し、高度の造血組織や卵黄嚢血管網の低形成を示す事が報告されている (Matsumoto et al. *Blood* 2006)。また KLF6 は成体においても全身性に発現することが知られており、発生時期だけでなく恒常性の維持にも重要な働きを担っていることが示唆される。

また前駆脂肪細胞において KLF6 が脂肪分化を正に制御する因子であること (Dan et al. *JBC* 2005) が明らかになっており、生体内で脂肪組織において何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。KLF6 は全身性に発現しており、肝臓や骨格筋においても何らかの役割を果たしている可能性が高く、これらの臓器組織における KLF6 の役割が加味されて、代謝系の表現型を形成すると考えられる。

2. 研究の目的

まず KLF6 ヘテロノックアウト (KLF6^{+/-}) マウスを用いて、同マウスの代謝系表現型の予備的検討を行う。続いて代謝疾患に関与すると考えられる脂肪細胞、肝細胞、マクロファージのそれぞれにおいて選択的に KLF6 をノックアウトしたマウスを作成し、肥満や 2 型糖尿病の病態形成時に、各組織・細胞において KLF6 が果たす役割について追及し、解

明することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

KLF6 の肥満や 2 型糖尿病の病態形成における役割を同定し、治療標的の発見に繋げるため、主に高脂肪食負荷条件下での組織応答の差異について、ノックアウトマウスを用いて in vivo における検討を行う。

KLF6^{+/-}マウスによる予備的検討から、KLF6 は特に肝臓、脂肪組織で重要な働きをしていることが示唆された。また近年肥満や糖尿病にマクロファージが関与するという知見も蓄積しているため、Cre-loxP システムを利用し、肝細胞、脂肪細胞、マクロファージで KLF6 を選択的にノックアウトするコンディショナルノックアウトマウスを作成し、実験に使用する。

本研究は KLF6 研究についての先駆的ラボであるマウント・サイナイ大学のフリードマン研究室と共同して進められた。

<実験の具体的な内容>

(1) 組織・細胞特異的 KLF6 ノックアウトマウスの準備

それぞれの組織・細胞特異的 KLF6 ノックアウトマウスは以下のようにして準備される。肝細胞特異的 KLF6 ノックアウトマウスは、KLF6 flox マウスと肝臓で特異的に Cre recombinase を発現する Alb-Cre マウスの交配により獲得される。脂肪細胞特異的 KLF6 ノックアウトマウスは、KLF6 flox マウスと脂肪細胞に特異的に Cre recombinase を発現する aP2-Cre マウスの交配により得られる。マクロファージ特異的 KLF6 ノックアウトマウスは、KLF6 flox マウスとマクロファージに特異的に Cre recombinase を発現する LysM-Cre マウスの交配により得られる。

(2) 高脂肪食負荷条件下における評価項目

KLF6^{+/-}マウスおよび上記のように作成されたコンディショナルノックアウトマウスに対して高脂肪食を投与し、主に以下の項目を評価する。

- ・体重の変化
- ・脂肪組織、肝臓の重量
- ・脂肪組織、肝臓の組織所見
- ・血清学的検査 (耐糖能、インスリン感受性、アディポネクチン濃度、サイトカイン濃度などを含む)
- ・脂肪組織、肝臓における脂肪分化に関与する因子の発現レベル (RNA 解析、タンパク解析)

(3) 肝細胞における KLF6 の役割

HepG2 細胞を使用。アデノウイルス導入 (Ad-KLF6) による gain-of-function、siRNA (siKLF6) による loss-of-function の実験を行い、KLF6 の下流因子を同定する。

(4) 脂肪前駆細胞における KLF6 の役割
 脂肪前駆細胞を用いて KLF6 の転写制御システムの詳細な検討を行う。脂肪前駆細胞の一種である 3T3-L1 細胞を用いた脂肪分化誘導において、KLF6 は早期(分化誘導直後)と晩期(5 日目頃)の二峰性の発現パターンを示すことが知られている。早期において KLF6 は間接的に脂肪分化を促進することが知られている一方で、晩期における役割は不明である。分化誘導 5 日目の脂肪前駆細胞において RNA 干渉を利用した KLF6 ノックダウンの効果を脂肪染色や RT-PCR により検討し、同時に KLF6 の下流因子を同定する。なお既報論文より分化早期の標的因子は DLK1 であるが、晩期には DLK1 の発現は認められず、KLF6 の下流因子として DLK1 以外の因子、具体的には PPARgamma2 を想定している。

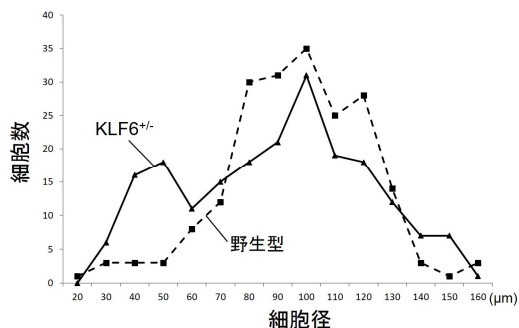
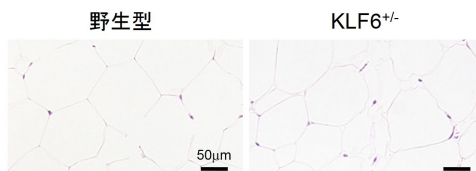
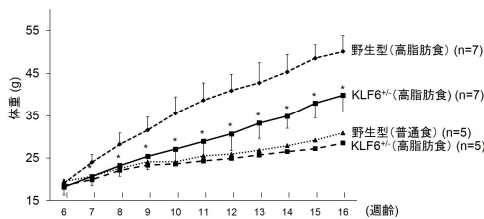
4. 研究成果

(1) KLF6^{+/-}マウスを用いた検討

体重の変化、組織重量・所見・解析

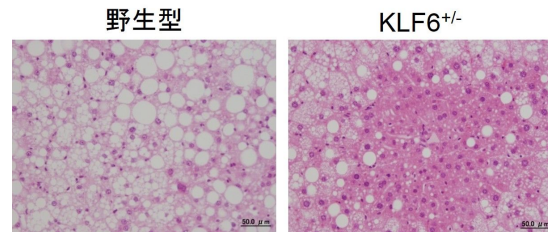
まず野生型、KLF6^{+/-}マウスから網羅的に臓器及び組織を採取し、KLF6 の発現を調べたところ、KLF6 は全身性に発現しており、また KLF6 mRNA の発現レベルはどの臓器組織においても KLF6^{+/-}マウス由来のものが野生型由来のもの半程度と予想された結果であった。野生型と KLF6^{+/-}マウスの間にはどの週齢においても体重や臓器重量に有意な差は認められず、肝機能、脂質代謝、糖代謝等の血液検査所見に関しても両者で有意な差を認めなかった。

高脂肪食負荷条件下で同様の評価を行ったところ、KLF6^{+/-}マウスは野生型と比較して摂餌量に有意な差は認めないものの、体重増加はより顕著に抑制されていた(下図)。



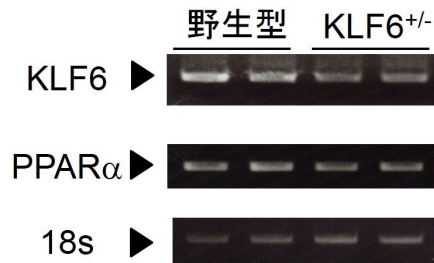
白色脂肪組織の重量に関しては両者で有意な差を認めなかったが、組織所見を詳細に検討すると、KLF6^{+/-}マウスにおいて血管の集簇を伴う小型脂肪細胞を数多く認めた(左下図)。また KLF6^{+/-}マウスの白色脂肪組織において脂肪分化マーカーの mRNA 発現レベルも有意に低下していた。

肝臓の重量は KLF6^{+/-}マウスの方が有意に軽く、組織所見に関して顕著に脂肪変性が少ないという所見が得られた(下図)。

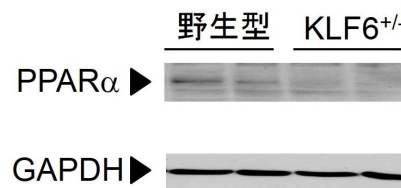


肝臓における RNA 解析、タンパク解析では PPARalpha に関して mRNA の発現が両者においてほぼ同程度である一方で、タンパクの発現は KLF6^{+/-}マウスにおいて高度に低下していた(下図)。

<RNA解析>



<タンパク解析>



なお骨格筋の解析も行ったが、重量や組織所見、代謝に関与すると考えられる因子の発現レベルに有意な差を認めず、骨格筋における KLF6 の病態形成への寄与度は低いと判断し、骨格筋特異的 KLF6 ノックアウトマウスの作成は予定しないこととした。

耐糖能その他血清学的な検討

次に耐糖能への KLF6 の関与を調べた。KLF6^{+/-}、野生型マウスにおいて空腹時血糖、インスリンレベルは有意な差を認めなかったが、ブドウ糖負荷試験では KLF6^{+/-}マウスにおいて血糖上昇が有意に抑制されており、またブドウ糖負荷後のインスリン血中濃度も野生型と比較して低いレベルに維持されていた。インスリン感受性試験でも有意差は

認めないものの良好な感受性を示した。血中アディポネクチン濃度は KLF6^{+/+}マウスにおいて有意に高値であったが、一方でレプチン濃度やコレステロールのプロファイルに関しては有意な差を認めなかった。

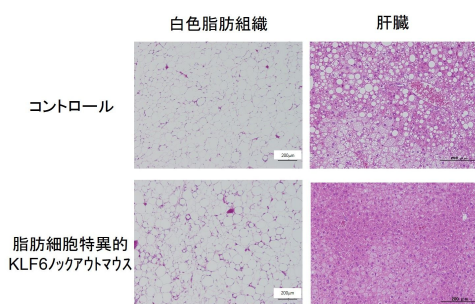
(2) 肝細胞特異的 KLF6 ノックアウトマウスを用いた検討

主に共同研究グループにより我々の研究と並行して行われた。簡単に結果を記載する。肝臓特異的 KLF6 ノックアウトマウスは高脂肪食負荷条件下では、体重増加が対照群と比較して有意に低減され、インスリン抵抗性を呈しにくく、耐糖能はより保持される、という表現型を呈した。In vitro 実験からは KLF6 が肝細胞において miRNA 10b の発現抑制を介して PPARα の発現を間接的に促進する、という作用機序が確認された。

KLF6^{+/+}マウスにより得られた上記の検討結果と矛盾しない所見である。

(3) 脂肪細胞特異的 KLF6 ノックアウトマウスを用いた検討

高脂肪食負荷下で、脂肪組織特異的 KLF6 ノックアウトマウスは対照群と比較して、体重増加が軽微ではあるが有意に低減され、肝重量も軽い一方、白色、褐色脂肪組織いずれも組織重量に有意な差は認められなかった。組織所見についてはノックアウトマウスで肝臓の脂肪変性が有意に抑制されており、また白色脂肪組織では小型脂肪細胞の数やその周囲の細胞成分が数多く認められた。



一方で両群における血糖値やコレステロールのプロファイル等の血液検査所見に有意な差を認めず、mRNA 発現解析においても脂肪分化関連因子の発現に有意な差を認めなかった。

体重の変化や組織所見に関しては KLF6^{+/+}マウスと類似した所見であったが、各因子の発現プロファイルには有意な差を認めず、脂肪組織における KLF6 の下流因子の同定には至らなかった。

(4) マクロファージ選択的 KLF6 ノックアウトマウスを用いた検討

マクロファージにおける KLF6 の働きが肥満や糖尿病の病態形成に関与するか否かを検討するため、マクロファージ選択的 KLF6 ノックアウトマウスを作成し、同様に高脂肪食

を負荷した。しかしながらノックアウトマウスにおける体重増加、肝臓や脂肪組織の組織重量と組織所見はいずれも対照群と比較して有意な差異を認めず、本疾患モデルにおいて KLF6 がマクロファージにおいて果たす役割は大きくないものと考えられた。

上記3種の組織特異的 KLF6 ノックアウトマウスの高脂肪食負荷に対する表現型を検討した結果、肝臓における KLF6 の寄与が最も大きいと考えられた。一方で脂肪細胞特異的 KLF6 ノックアウトマウスの検討から、脂肪細胞における KLF6 の関与も示唆されたが、現時点ではその機序は確認できていない。

(5) 脂肪前駆細胞を用いた検討

既報より脂肪前駆細胞 (3T3-L1 細胞) に対する脂肪分化誘導においては、KLF6 は分化早期と晩期の二相性に mRNA の発現が増加すること、早期においては DLK1 の抑制を介して間接的に PPARγ の発現を促進することが報告されている。一方分化晩期における KLF6 の役割は不明であり、今回 siRNA の手法を用いて、mRNA の発現解析を行った。分化5日目に siRNA を導入し、7日目で RNA 解析を行ったところ、KLF6 の発現レベルはコントロール群と比較して 60%程度抑制されていた。PPARγ2 の発現レベルも 20%程度抑制されていたものの、有意な差を認めなかった。その他各因子の発現レベルにも有意な差を認めなかった。

今回脂肪細胞特異的ノックアウトマウス作成のために aP2-cre マウスを用いたが、その後 aP2 は脂肪組織以外にも発現していることが報告された。最近では脂肪組織特異的に遺伝子をノックアウトする場合は、より組織特異性の高い adipo-cre マウスが用いられることが多い。KLF6 の下流因子同定のためには adipo-cre マウスの使用も含めてさらなる検討が必要である。

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1件)

Bechmann L, Vetter D, Ishida J, Hannivoorta R, Lee U, Kocabayoglu P, Fiel P, Muñoz U, Patman G, Ge F, Yakar S, Li X, Agius Y, Lee Y, Zhang W, Schwartz G, LeRoith D, Berk P, Nagai R, Suzuki T, Reeves H, Friedman SL.

Post-transcriptional activation of PPAR alpha by KLF6 contributes to non-alcoholic fatty liver disease.

査読有 J Hepatology 2013; 58: 1000-6
doi: 10.1016/j.jhep.2013.01.020.

〔学会発表〕(計2件)

American Heart Association Scientific Sessions 2012 (Los Angeles, Florida, USA: 2012/11/3-7)

Ishida J, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Matsumura T, Friedman SL, Nagai R
Krüppel-like factor 6 (KLF6) regulates obesity and glucose intolerance.

第 77 回日本循環器学会・学術集会 (横浜: 2013 年 3 月 15-17 日)

Ishida J, Suzuki T, Aizawa K, Sawaki D, Matsumura T, Nagai R, Komuro I
Krüppel-like factor 6 (KLF6) promotes glucose intolerance and obesity.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石田 純一 (Ishida Junichi)
東京大学医学部附属病院循環器内科助教
研究者番号: 10625536