

2. 平滑筋細胞・脂肪細胞形質変換の転写制御

真鍋 一郎*・大石 由美子**・永井 良三***

メタボリック症候群としてまとめられる肥満、耐糖能異常、脂質代謝異常、高血圧などの冠動脈疾患危険因子は相互に関連し、集積することで冠動脈疾患のリスクをさらに高める。メタボリック症候群においては、血管壁に対する直接的な物理化学的あるいは代謝的なストレスだけではなく、脂肪組織を含む多様な臓器から分泌されるさまざまな液性因子が血管壁細胞や炎症性細胞の機能・形質を変化させ、病態を惹起する。このとき平滑筋細胞は、外的ストレスに応じて形質変換を起こし、血管壁の三次元的構築の改変（リモデリング）に重要な働きをする。一方肥満においては脂肪細胞が大型化し、心血管疾患リスクを高める因子を産生するようになることが知られている。このように、メタボリック症候群においては血管壁のみならず、脂肪組織においても細胞機能・形質の変化が起こっている。各組織の変化が相互に作用しあうことによって、血管病態をさらに進展させるようにリスク病態が集積すると考えられる。このような臓器連関の背景には、細胞機能・形質の変化がある。細胞形質の変化は、主に転写因子による協調的な遺伝子発現制御によってもたらされる。転写因子 KLF5 は、血管壁における平滑筋細胞や線維芽細胞の機能制御に働くだけでなく、脂肪細胞の分化・機能制御にも重要であり、メタボリック症候群を背景とする血管病態の発生・進展に重大な役割を果たすと考えられる。転写因子 KLF5 を中心とした転写因子ネットワークの研究は、血管病態へと収束する臓器連関・細胞ストレス応答の分子機構の理解と新しい治療ターゲットの同定へと展開すると期待される。

Transcriptional regulation of adipocyte differentiation and function

ICHIRO MANABE University of Tokyo Graduate School of Medicine, Department of Cardiovascular Medicine and Department of Clinical Bioinformatics



*まなべ・いちろう：東京大学大学院クリニカルバイオインフォマティクス研究ユニット助手。平成2年鳥取大学医学部卒業。平成9年ヴァージニア大学医学部分子生理学リサーチアソシエイト。平成13年東京大学医学部附属病院循環器内科。平成14年現職。主研究領域／血管生物学。

**おおishi・ゆみこ：東京大学大学院医学系研究科循環器内科。

***ながいりょうぞう：東京大学大学院医学系研究科循環器内科教授。

Key words

形質変換
動脈硬化
組織リモデリング
KLF5

はじめに

肥満や糖尿病などを持つ患者は、同時に他の心血管疾患リスクを複数同時に持ち合わせていることが多い。このように肥満、耐糖能異常、インスリン抵抗性、高血圧、脂質異常症などの病態は一人の患者に集積し、そのことによってさらに心血管リスクを高める¹⁾。最近、これらの病態の組み合わせはメタボリック症候群という概念にまとめられるようになって²⁾。

メタボリック症候群で各病態が集積し心血管疾患リスクを増大させることは、各病態の発症メカニズムが密接に関連していること、また血管壁に対して相互に関連しあいながら作用することを強く示唆する。動脈硬化は一種の慢性炎症ととらえることができ、血管壁において内皮細胞、平滑筋細胞とともに炎症

性細胞が相互作用し、組織構築を改変（リモデリング）することによって進展する^{3,4)}。慢性炎症を惹起する要因として、血管壁に対する直接的な物理化学的あるいは代謝的ストレスとともに、各種の液性因子が重要な働きをする。メタボリック症候群では、遊離脂肪酸や高血糖状態が直接血管壁細胞に作用するとともに、さまざまな液性因子を介して全身の器官が相互作用して、血管病態やそれぞれの病態の進展を引き起こしていると考えられる。特に最近、脂肪細胞がアディポサイトカインと呼ばれる複数の液性因子を産生することが注目されている。

一方、血管壁局所では液性因子を含む外的ストレスに応じて細胞が機能を変化させ、病変形成に働く。平滑筋細胞は脱分化し、未分化な形質を再び示すようになる(図1)。このような形質変換を起こした平滑筋細胞が増

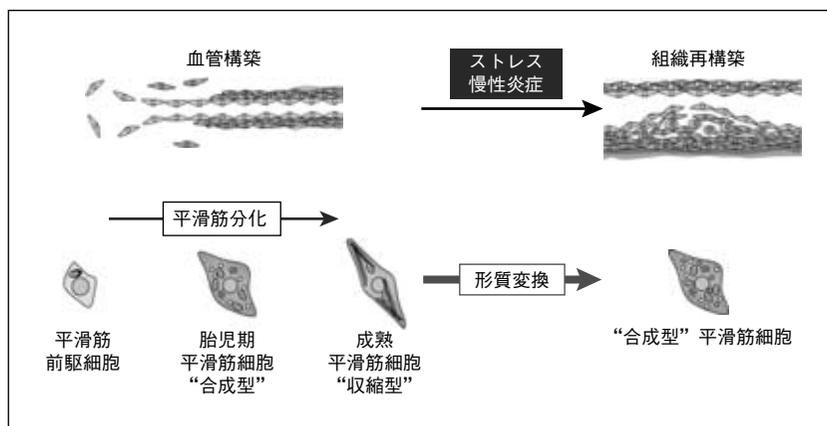


図1 血管の発生分化・病態形成と平滑筋形質変換

血管平滑筋細胞は、血管発生過程や病態において多様な機能を示す。血管発生過程においては内皮細胞によって形成された管腔を覆うようにして漏れのない血管を構築する。このような胎児期の平滑筋細胞は増殖能が高く、細胞外基質や増殖因子などを盛んに産生する。この時期の平滑筋細胞は、マーカー遺伝子としてSMembを発現する。血管の分化・成熟とともに平滑筋細胞は収縮に特化した機能を示すようになり、収縮型と呼ばれる分化した形質を示すようになる。しかし、平滑筋細胞の分化は可逆的であり、外的ストレスに応じて再び未分化な形質(合成型)を示すようになる。これを形質変換と呼ぶ。形質変換を起こした平滑筋細胞は、再び増殖・遊走子、増殖因子や細胞外基質・基質分解酵素を産生する。このような平滑筋の機能は、血管傷害に対する治癒機構として重要と考えられるが、慢性に引き続くと組織の再構築を進め、病態形成につながっていく。

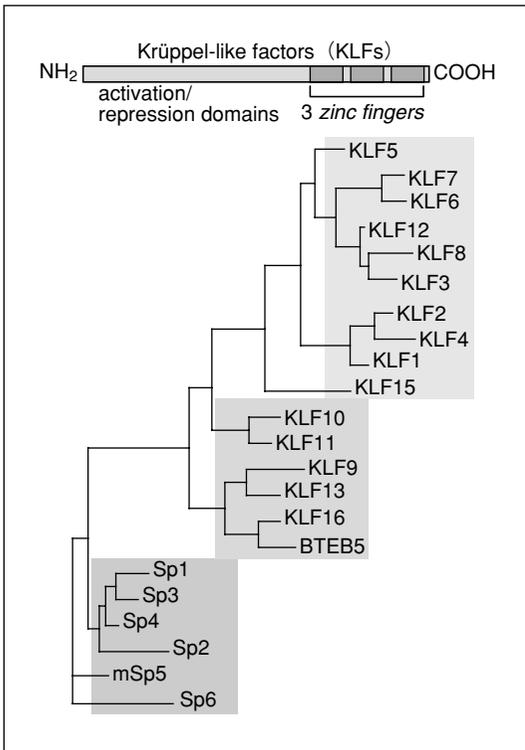


図2 Krüppel-like factor family

Krüppel-like factor family (KLF) と類縁の Sp family の転写因子の分子系統樹を示す。KLF/Sp ファミリーの転写因子は C 末端側に zinc finger を 3 回繰り返す形の DNA 結合ドメインを持つ。

殖・遊走し、また各種増殖因子や細胞外基質・基質分解酵素を産出し、血管構築の改変を進める⁶⁾。このような外的ストレスに応じた細胞形質の変化は、平滑筋細胞に限らず他の間葉系細胞由来の細胞にも広く認められる。たとえば線維芽細胞は、傷害時には筋線維芽細胞と呼ばれる細胞にその形質を変え、創傷治癒に働く。また、肝臓線維化においては、星状細胞（伊東細胞）が外的状況に応じて筋線維芽細胞様の形質を示すようになる。さらに脂肪細胞も、小型の細胞から大型の細胞へと変化し、この変化がアディポサイトカインの発現変化を伴い、メタボリック症候群の発症と血管病態進展に重要と考えられてい

る⁶⁾。これも外的状況に応じた脂肪細胞の形質変換ととらえることもできる。このように、間葉系細胞由来の細胞の形質が変化することが、広く組織のストレス応答と組織の再構築の背景にあり、慢性炎症を背景として進展する疾患の解明に重要である。細胞の形質変換は、一群の遺伝子の協調的な変化によってもたらされるため、転写因子による遺伝子発現調節機構の研究が必須となる。

1. 平滑筋形質変換と転写因子 KLF5

血管発生分化あるいは病態において、平滑筋細胞はその性質を大きく変化させる（図1）。われわれは、このような平滑筋の変化をとらえるマーカー遺伝子として、ミオシン重鎖遺伝子に着目した。特に胎児型平滑筋ミオシン重鎖 SMemb の発現は、血管病態における平滑筋形質変換の鋭敏なマーカーとなる^{7,8)}。この SMemb の転写制御機構の研究より、平滑筋形質変換に重要な転写因子 KLF5/BTEB2 を同定した（図2）^{9,10)}。血管において、KLF5 は胎児期に強く発現し、その発現は血管の分化成熟に伴って低下する¹⁰⁾。その結果、成体の動脈壁平滑筋細胞では KLF5 の発現はほとんど認められない。しかし冠動脈形成術などの血管傷害時、あるいは動脈硬化病変では KLF5 の発現が再び誘導される¹¹⁾。

KLF5 の発現パターンは、血管病態における平滑筋機能制御に重要であることを示唆する。そこでわれわれは、KLF5 の機能を直接に *in vivo* で検討するために、KLF5 ノックアウトマウスを作成した¹²⁾。KLF5 のホモ接合体ノックアウトマウスは、胎生の非常に早期に致死となる。そこで一対の KLF5 遺伝子のうち一方が残存しているヘテロノックアウトマウスを用いて解析を行った。ヘテロノックアウトマウスは一見正常に発育する。血管に関しても、肉眼的に明らかな異常は認めなかつ

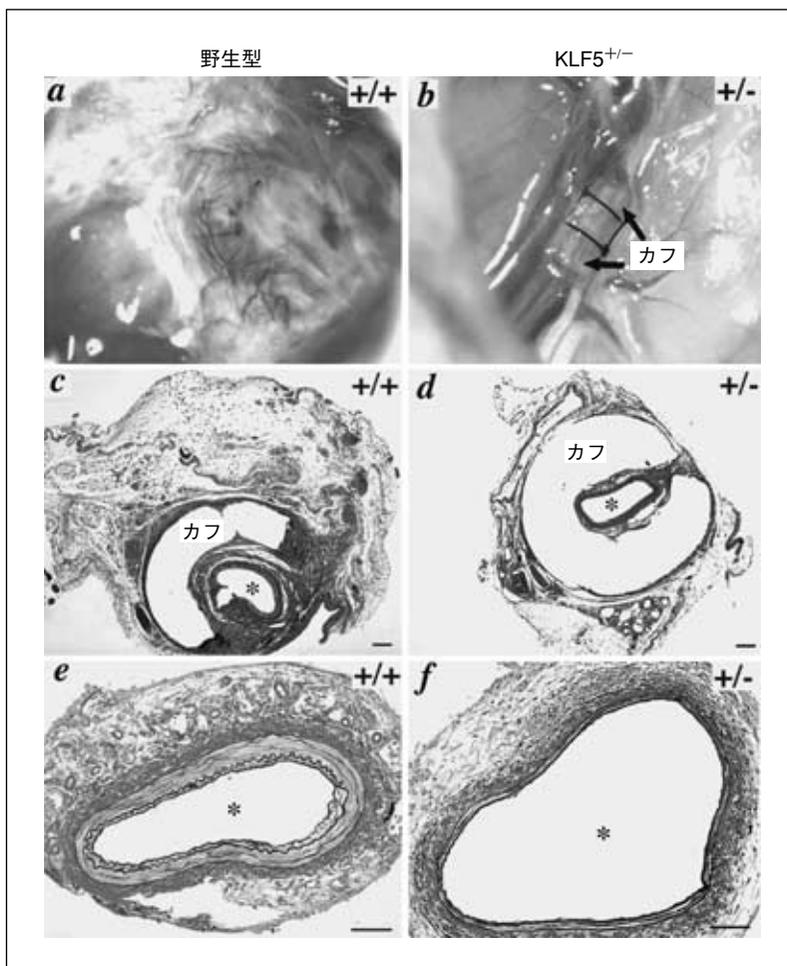


図3 KLF5 は外的ストレスによって引き起こされる血管病態形成に必要である
 1対のKLF5遺伝子のうち一つを欠損するヘテロノックアウトマウスを用いて、KLF5遺伝子の血管病態における役割を検討した(文献¹²⁾より引用)。マウスの大腿動脈にポリエチレンチューブのカフを巻き付けると野生型マウスでは厚い肉芽組織が生じたが(a, c), KLF5ヘテロノックアウトマウスでは肉芽組織がほとんど形成されず、カフがはっきりと見える状態であった(b, d)。カフの内部の血管では、野生型で明らかな新生内膜が形成されておりカフによる傷害に対する反応が認められたが(e)、ヘテロノックアウトマウスでは新生内膜は認められず、血管壁(中膜)はむしろ菲薄化していた(f)。アスタリスク(*)は血管内腔を示す(c-f)。

た。しかし、いったん血管に傷害を与えると、傷害に対する組織反応が著明に減弱していた(図3)。この結果は、外的ストレスによって惹起される血管病態の形成にKLF5が重要であることを直接的に示すものである。

2. KLF5を中心とした転写制御と心血管病態

KLF5がどのように心血管系の病態形成を制御しているのか、そのメカニズムをさらに検討した。KLF5は、アンジオテンシンIIや

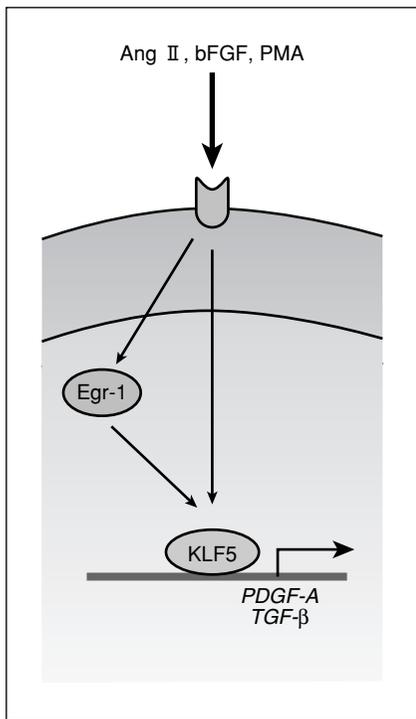


図4 KLF5はパラクライン因子の発現を制御する

血管傷害に対する組織再構築においてKLF5が外的ストレスによって誘導され、PDGF-Aなどのパラクライン因子を制御することが重要であると考えられる。

bBFGFなどの刺激によって、MAPキナーゼを介した経路によって発現誘導される^{13,14}。また最近、リン酸化によるKLF5活性化の可能性も報告されている。誘導・活性化されたKLF5は、SMembや心血管病態形成に重要なパラクライン因子であるPDGF-AやTGF-βの転写を直接に制御する(図4)。実際、KLF5ヘテロノックアウトマウスとPDGF-Aノックアウトマウスの腸管における表現型は非常によく似ている。

KLF5はPDGF-Aなどの転写制御を行う際に、他の転写因子や転写コレギュレーターと相互作用することも明らかとなった。たとえば、KLF5はレチノイン酸受容体RARと相互

作用する¹²。われわれはこの点に着目して、合成レチノイドがKLF5の転写活性化能を阻害することを見いだした。この薬剤Am80をマウスに投与したところ、血管傷害モデルで血管病変の形成が著明に抑制された。今後、KLF5の阻害薬の心血管疾患を中心とした臨床応用への展開が期待される。

KLF5ノックアウトマウスにおける血管病態や心肥大・線維化の減弱には、平滑筋・線維芽細胞以外の細胞がかかわっている可能性も高い。実際、KLF5ノックアウトマウスでは大動脈内皮下のIV型コラーゲンが減少していること、また血管新生に異常があることより、内皮細胞における機能が考えられる。

3. 脂肪細胞におけるKLF5と細胞種特異的な遺伝子調節をもたらす転写因子ネットワーク

われわれは、心血管系細胞に加えて脂肪細胞においてもKLF5が機能することを見いだした。KLF5ノックアウトマウスのフェノタイプの一つとして、若年時に体重が野生型マウスより軽い点がある。KLF5ノックアウトマウスの脂肪組織を調べてみたところ、野生型マウスに比較して明らかに皮下の脂肪組織が薄いことがわかった。これまでに、脂肪細胞の分化にKLF2やKLF15が重要であることが報告されている^{15,16}。KLF5も、これらのKLFとともに脂肪細胞分化に重要な役割を果たしていると考えられる。また、脂肪細胞分化に重要なPPARγがメタボリック症候群における脂肪細胞機能・形質の変化にも重要なように¹⁷、KLF5をはじめとするKrüppel型転写因子群が、脂肪細胞分化のみならず脂肪細胞形質変換にも重要である可能性がある。

KLF5のターゲット遺伝子は、細胞種によって異なる可能性が高い。このような

KLF5の細胞種特異的な機能を考えるとき、他の因子との相互作用が重要であると考えられる。上述したように、われわれはKLF5がレチノイン酸受容体RARと相互作用することを見いだしているが、RAR以外の転写因子やコレグレーターとの相互作用も存在する。このような蛋白間相互作用、あるいはクロマチン構造の修飾を介した転写制御因子のネットワークがあり、KLF5は外的状況に応じた細胞形質や細胞間相互作用の制御に重要な役割を果たしているのだろう。今後、KLF5と他の因子との相互作用の研究を進めることによって、各細胞種に特異的な新しい治療ターゲットが同定されると期待される。

〔文献〕

- 1) Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, *et al* : Cardiovascular Morbidity and Mortality Associated With the Metabolic Syndrome. *Diabetes Care* 2001 ; 24 : 683—689.
- 2) Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001 ; 285 : 2486—2497.
- 3) Ross R : Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999 ; 340 : 115—126.
- 4) Libby P : Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002 ; 420 : 868—874.
- 5) Manabe I, Nagai R : Regulation of smooth muscle phenotype. *Curr Atheroscler Rep* 2003 ; 5 : 214—222.
- 6) Kubota N, Terauchi Y, Miki H, *et al* : PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 1999 ; 4 : 597—609.
- 7) Kuro-o M, Nagai R, Tsuchimochi H, *et al* : Developmentally regulated expression of vascular smooth muscle myosin heavy chain isoforms. *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 18272—18275.
- 8) Aikawa M, Sivam PN, Kuro-o M, *et al* : Human smooth muscle myosin heavy chain isoforms as molecular markers for vascular development and atherosclerosis. *Circ Res* 1993 ; 73 : 1000—1012.
- 9) Manabe I, Kurabayashi M, Shimomura Y, *et al* : Isolation of the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb/NMHC-B) gene and characterization of its 5'-flanking region. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 ; 239 : 598—605.
- 10) Watanabe N, Kurabayashi M, Shimomura Y, *et al* : BTEB 2, a Kruppel-like transcription factor, regulates expression of the SMemb/Nonmuscle myosin heavy chain B (SMemb/NMHC-B) gene. *Circ Res* 1999 ; 85 : 182—191.
- 11) Hoshino Y, Kurabayashi M, Kanda T, *et al* : Regulated Expression of the BTEB 2 Transcription Factor in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation* 2000 ; 102 : 2528—2534.
- 12) Shindo T, Manabe I, Fukushima Y, *et al* : Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF 5/BTEB 2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling. *Nat Med* 2002 ; 8 : 856—863.
- 13) Kawai-Kowase K, Kurabayashi M, Hoshino Y, *et al* : Transcriptional activation of the zinc finger transcription factor BTEB 2 gene by Egr-1 through mitogen-activated protein kinase pathways in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1999 ; 85 : 787—795.
- 14) Manabe I, Shindo T, Nagai R : Gene Expression in Fibroblasts and Fibrosis : Involvement in Cardiac Hypertrophy. *Circ Res* 2002 ; 91 : 1103—1113.
- 15) Banerjee SS, Feinberg MW, Watanabe M, *et al* : The Kruppel-like Factor KLF 2 Inhibits Peroxisome Proliferator-activated Receptor-gamma Expression and Adipogenesis. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 2581—2584.
- 16) Gray S, Feinberg MW, Hull S, *et al* : The Kruppel-like Factor KLF 15 Regulates the Insulin-sensitive Glucose Transporter GLUT 4. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 34322—34328.
- 17) Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, *et al* : Disruption of Adiponectin Causes Insulin Resistance and Neointimal Formation. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 25863—25866.

質 疑 応 答

座長(永井) ありがとうございます。ではご質問、ご討議をお願いいたします。

船橋 徹(大阪大) 先ほどKLF5とPPAR γ が結合して転写の活性に影響を与えるとおっしゃいましたが、それぞれがそれぞれのモチーフを認識して、DNAに結合しているのですね。ですからクロマチンの中のDNAの距離を縮めることが転写活性に影響を与えるという意味でしょうか。

真鍋 PDGFAのプロモーターに関していいますと、PPAR γ はDNAには結合していませんと考えています。KLF5がKLF5の結合領域に結合して、そこにPPAR γ が蛋白-蛋白相互作用で誘導されてくると考えています。まだレポーターアッセイレベルですが、PPAR γ のターゲット遺伝子と呼ばれているものもKLF5によってシナジスティックに活性がかかりますが、この場合はKLF5のバインディングサイトがない状態で、結合したPPAR γ にKLF5が誘導されてくる可能性があると考えています。

船橋 もう一つは聞き逃したのですが、アンジオテンシンIIによってKLF5が誘導される。それは転写レベルでKLF5が上がるという意味ですか。

真鍋 一つは転写レベルでKLF5が誘導されます。もう一つ、おそらくリン酸化が起こってコアクチベーターが誘導されてきて、活性化されてくるというパスウェイもあると思います。

船橋 というのは、アンジオテンシンIIは脂肪細胞の分化抑制に働くという説があるので、それだと話がややこしいかなと思いました。

杉原 甫(佐賀大) 大変おもしろい発表でした。KLF5と褐色脂肪の関係について関心を持ちましたが、生体で観察されたのは生後何カ月くらいのマウスですか。

真鍋 先ほどの写真は生後3日です。

杉原 褐色脂肪細胞は部位特異性が強いので、組織量の判断のためには、たとえば肩甲骨間の褐色脂肪組織量を指標とし、背中 of 皮膚を上手に剥がして全体の形をみるとか、面積をみるとかという判断でないと、断面で組織量を判断するのはなかなか難しいと思いました。

また、ヘテロノックアウトマウスで大動脈周囲の組織量で差異をお出しになっておられ

ましたが、本来大動脈周囲にはあんなにたくさんはないと思います。先生の図では、褐色脂肪細胞が多量に見受けられましたが、あれはどのように判断されていますか。

真鍋 マウスは結構個体差があり、個体によってはかなりの脂肪組織が大動脈周囲に採れてきます。また、採ってくる切片によってかなり脂肪組織の入ってくる量が違っていて、先ほどの写真はかなり多めに入っている分だと思います。

中尾一和(京都大) KLF5とKLF15で、春日先生が発表されたものと先生のものでは実験系が違うから発現のパターンが違ってくるのでしょうか。違っているような印象を受けます。

真鍋 3T3L1に関していえば同じ結果だと思います。

中尾 *in vivo* はあれとは違った順番になるのですか。

真鍋 私たちは*in vivo*で胎生のどの段階で脂肪細胞が発現しているかをまだ確認しておりませんので、その点に関してはお答えできません。

中尾 3T3L1が非常によく研究されていて、ディスカッションのときには非常にいいツールになると思いますが、本当にあれが*in vivo*を反映しているかどうかというと、おそらく違うだろうと思います。たとえばレプチンもほとんど発現していません。そうすると*in vivo*と3T3L1細胞における系は別に扱わなければならないのではないかという気がします。

真鍋 そのとおりだと思います。あくまで3T3L1の系で見ますと、KLF5が出てそのあとKLF15です。3T3L1の発現パターンからすると、脂肪細胞分化の初期にKLF5が重要で、そのあとの成熟の段階でKLF15が作用しているように見えます。しかし実際に組織から脂肪細胞を採ってきますと、成人の脂肪組織

でも KLF5 の発現が結構認められます。おそらく 3T3L1 は *in vivo* の状態を完全に反映したものではないと思います。

岸本忠三 (日本医学会副会長) 脂肪の研究のところに来てみると、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 、どれも脂肪にかかわる転写因子として扱われるわけです。C/EBP β は別名が NFIL-6 で、 δ は NFIL-6 β で、IL-6 を誘導する転写因子、IL-6 で誘導される転写因子です。IL-6、TNF- α が脂肪細胞を分化させる過程で何らかの関与をする。脂肪にかかわるといのは、NFIL-6 をノックアウトしたネズミでは、白色脂肪組織がなくなることから、この道筋が見つかってきました。一方 C/EBP β 、NFIL-6 の大きな作用で、いまだにそのメカニズムがわからないのは、マクロファージがリステリアを食い込んだときに全く殺さないことです。そのように考えてくると、KLF 何とも腎臓などあらゆるところで働いていて、それぞれのところでそれぞれの働きをしている。これはコンピューターにデータをたくさん詰め込んでいくためには非常によいことです。

ただディスカレッジするような話をしますと、何かの転写因子があってノックアウトしてあるいはドミナントネガティブで、あるいは RNA interference でと積み重なって、そういうデータが全部寄り集まったときに、どの転写因子が、どの遺伝子がかかわって、それがまたどれを誘導する。これは大きなネットワークの一つずつのブロックをつくっていくために必要なことですが、どういうことをすれば一番中心のよいことができるのかを考えてみることも必要だと思います。

先ほどからの議論を聞いていると、この実験系ではこうなるけれども、この実験系ではこうなる。コンピューターに入れるデータとしては必要なことですが、自分は何をやればよいのか。僕はいつも言うのですが、お金が

いっぱいあるからあれもやれ、これもやれとだんだん手が広がって行って、スーパーマーケットの棚に並んでいるようなものになる可能性もある。いまの話をずっと聞いていると、そういう感じもします。

転写因子をそれぞれ違った局面でみていると、みんな違っている。それは知識としては必要なことですが、どういうことをすればエキサイティングな、みんながはっと胸を突かれるようなことができるかということも考えることも必要なのではないかと思います。

真鍋 ありがとうございます。私たちは平滑筋の分化の研究もかなり進めておりますが、平滑筋分化もたくさんの転写因子がかかわっています。脂肪細胞の C/EBP、PPAR γ の系はモデルとしては非常にきれいになっていますが、現実にはもっとたくさんの因子がかかわっています。コレギュレーターがかかわって、クロマチンの構造がかかわってというかたちで、最終的にはコンピューターでネットワーク解析しないと、全体像が見えないだろうと思います。ただ1点重要なことは、単一の転写因子を取り出してきたときの人工的な系での機能と、その転写因子が本来のネットワークの中に存在するときの機能が、質的にまったく違う可能性があることです。生物現象を理解するうえでは、ネットワークを考慮することは必要なことだと思います。

現在はコンピューター上のバイオインフォマティクスで効率よくきれいなネットワークをつくるだけの、*in silico* の手法も、*in vitro*、*in vivo* の実験系もないと思います。ネットワークといってもノーダルポイントになるようなポイントがあると思いますので、そこを中心に検討することが必要なと個人的には思っています。

座長 特に脂肪細胞分化にかかわる分子については、まだ役者が出揃っていないのだろうと思います。ネットワークをつくっている

ので、臨床の立場からは、新しい薬剤などで悪循環を絶つことで制御できる方法を考える必要があります。われわれは平滑筋もモデルとして用いていますが、共通の基本的原理を見つけていくという方向と同時に、社会への還元は考えていかなければいけないだろうと

思います。

岸本 同じ方法論で続けていってよいか、何かもう少しドラマティックなものが出てこないのかと思います。

座長 どうもありがとうございました。