

論文の内容の要旨

論文題目 Molecular Mechanisms of PDGF-A Chain Gene Activation by the
Transcription Factor KLF5

和訳 転写因子 KLF5 による PDGF-A 鎖遺伝子活性化の分子機構

指導教官 循環器内科学 永井良三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成13年4月入学（3年次転入学）

医学博士過程

循環器内科学専攻

氏名 相澤 健一

我が国は現在、未曾有の高齢化社会を迎えようとしており、動脈硬化性疾患は増加の一途をたどっている。その予防や効果的な治療法の確立は、活力のある社会の創出のために重要な課題である。心血管細胞は虚血、感染、物理的負荷などによる傷害を受けた際、適応・修復のための機転としてリモデリングを起こす。代償機構としてのリモデリングは傷害に対する適応・修復のための機転として重要であるものの、いったん破綻を来すと悪循環に陥り、その結果、心血管組織の機能不全を来す。すなわち、リモデリングのメカニズムの解明は、心血管機能を破綻させずにいかに人為的に維持するかという治療戦略にかかわる重要なテーマである。我々はいままで心血管リモデリング機構を解明することを目的とし、平滑筋ミオシン重鎖遺伝子の解析を通じて、平滑筋細胞の形質変換の制御機構を分子レベルで追求して来た。そして、転写因子 KLF5/IKLF/BTEB2（以下、KLF5 と表記する）が形質変換の主要な制御因子であることを見いだした。KLF5 は正常な成人の血管には発現せず、動脈硬化巣や冠動脈拡張術の再狭窄病変で発現し、血管の病的狭窄部位の平滑筋増殖に

関わる因子であると考えられた。最近, *in vivo*での KLF5 の役割を明らかにするために, 私たちは KLF5 ノックアウトマウスを樹立した。KLF5 ノックアウトマウスの解析を通じて, KLF5 はアンジオテンシン II による心血管リモデリングのパスウェイにおける重要な制御因子であることを見いだした。興味深いことに, KLF5 ノックアウトマウスの表現型は血小板由来増殖因子 Platelet-derived growth factor-A (PDGF-A) ノックアウトマウスの表現型と酷似していた。実際, KLF5 ノックアウトマウスでは PDGF-A の発現が低下しており, このことがリモデリング破綻の主要な原因と考えられた。すなわち PDGF-A は KLF5 の主要な標的遺伝子であることが示された。

PDGF-A は平滑筋細胞の遊走・増殖を促進し動脈硬化症の発症に重要な役割を果たす増殖因子である。PDGF-A に刺激された平滑筋細胞は増殖・遊走反応, あるいは細胞外マトリックスの産生・分解などの反応を惹起し, 障害血管リモデリングないしは内皮肥厚病変の形成に深く関与していることが知られている。我々は約 10 年前より PDGF-A が Angiotensin II による平滑筋増殖に重要であることを見出し, PDGF-A に注目してきた。

今回私は KLF5 が PDGF-A 遺伝子を活性化するメカニズムを分子生物学的手法を用いて転写レベルで解明することを最初の目標とした。PDGF-A 遺伝子は現在までにその近位プロモータ-71~-55 の領域に種々の活性化刺激に反応する重要な領域があることが知られている。私は, まず始めに KLF5 が PDGF-A プロモータを活性化することをレポーターアッセイにより初めて見出した。さらに, PDGF-A プロモータの欠失変異体を用いた解析により, KLF5 反応領域が PDGF-A 近位プロモータ-71~-55 の領域に一致することを見いだした。この領域をプローブとし, ゲルシフトアッセイを行うと確かに KLF5 が結合した。私はクロマチン免疫沈降アッセイ (ChIP アッセイ) により PDGF-A プロモータに KLF5 が結合することを確認した。したがって, *in vitro* の人工的な系でのみならず, 細胞内で DNA がクロマチン構造を形成している状態の PDGF-A 遺伝子に対して KLF5 が結合していることが示された。細胞レベルでの KLF5 の作用を確認するため, アデノウイルス発現ベクターを作成して KLF5 を培養細胞に過剰発現させたところ, PDGF-A mRNA の発現が誘導された。KLF5 が細

胞レベルでも PDGF-A を正に制御していることが明らかになった。

私は次に細胞外のシグナルが核内の作用因子である KLF5 においていかなる作用を及ぼしているか検索した。リン酸化は細胞質内の反応過程である一方、アセチル化が核内の制御機構として重要であることが近年解明されつつある。私はアセチル化誘導因子である TSA (trichostatin A) を用いて細胞刺激したところ、PDGF-A プロモータは強力に活性化され、この活性化には PMA と同様に-71~-55 の領域が重要であることを見いだした。次に、KLF5 をアセチル化する酵素を検索した。p300 は転写コアクチベータとして作用する核内の転写司令塔である。その作用は多岐に渡り、細胞分化、細胞周期、アポトーシスなどに重要な役割を果たしていると考えられている。最近になり p300 は分子内にヒストンアセチル化活性を有していることが見いだされた。私は KLF5 が細胞内でアセチル化されていることを確認した。また、私は免疫沈降法を用いた解析により細胞内で KLF5 と p300 が結合することを示した。p300 が KLF5 の転写活性化能に如何に影響するか見るために、レポーター遺伝子アッセイを行った。その結果、KLF5 は p300 により相乗的に PDGF-A プロモータを活性化した。p300 単独では PDGF-A プロモータの活性化は認められないことより、この相乗効果は KLF5 依存的であると考えられた。したがって、KLF5 は p300 でアセチル化されることによりその転写活性化能を増強すると考えられた。p300 による KLF5 のアセチル化されるリジン残基は質量分析法を用いて解析された。KLF5 の 369 番目のアミノ酸であるリジンが唯一アセチル化される残基であることが明らかになった。したがって、私は KLF5 の 369 番目のアミノ酸残基をリジンからアルギニンに置換し、p300 によってアセチル化されない KLF5 の変異体を作成した。その結果、アセチル化変異型 KLF5 は野生型 KLF5 に比べ、p300 による PDGF-A プロモータの相乗的活性化作用が約 30% 低下していた。つまり、p300 は KLF5 の 369 番目のリジン残基を特異的にアセチル化することにより KLF5 の活性化を正に制御することが明らかになった。

動脈硬化は、動脈壁を反応の場として緩徐に進行する慢性の炎症性・増殖性疾患とみなすことができる。この慢性の反応には、多くの炎症性刺激や反応の場としての各種の血液構成細胞が関与する。NF- κ B は反応蛋白、炎症性サイト

カイン，組織因子，誘導型NO合成酵素（iNOS）など，炎症や免疫応答に関わる遺伝子の発現を制御する転写因子である。動脈硬化病変の形成には，平滑筋細胞，内皮細胞，単球/マクロファージが中心的な役割を持つ。また，動脈硬化には炎症応答の関与が重要であることも報告されている。私たちはKLF5ノックアウトマウスでは大腿動脈にカフ障害を生じさせてもカフ周囲の肉芽形成がほとんど認められず，新生内膜の増生も軽度である。また，血管新生，線維化も低下している。したがってKLF5は炎症を惹起する作用を有することが推察された。私は，KLF5が炎症に対し如何に作用しているか分子レベルで解析することを試みた。PDGF-Aプロモータに対するNF- κ BとKLF5の相互作用を検討したところ，NF- κ Bは単独ではPDGF-Aプロモータを活性化しなかったが，NF- κ BとKLF5を共発現させると相乗的に活性化した。また，免疫沈降法によりKLF5とNF- κ Bは細胞内で結合することが明らかになった。さらに，PDGF-Aプロモータ欠失変異体を用いた解析により，KLF5とNF- κ Bの相乗作用が生じるために重要なエレメントを検索したところ，KLF5の作用部位と一致した。実際，ゲルシフトアッセイによりKLF5とNF- κ Bの相互作用はPDGF-Aプロモータ上で起きていることが確認された。したがって，NF- κ Bによる炎症応答にはKLF5を介している可能性があると考えられた。

以上の結果よりまとめると，KLF5は活性化刺激や組織リモデリングを受けて心血管障害時に細胞が反応する際の急性反応を司る主要な因子と位置づけられる。それゆえKLF5の活性化はリモデリングをひきおこし，心血管病変を増悪させると考えられた。したがって，KLF5の転写活性化能を抑制できれば，KLF5活性化によるリモデリングを抑制することが期待できる。この仮説に基づき，私はKLF5の転写活性化能を調節する化合物を検索した。そのうちRARのアゴニストであるAm80はKLF5の転写活性化能を抑制した。さらに私は免疫沈降法によりAm80のKLF5転写抑制作用はKLF5がRARの結合を介す可能性を示した。RARのリガンドにより転写活性を抑制されるという事実はKLF5の抑制薬が心血管リモデリングを抑制する治療薬としての標的となる可能性を秘めており，KLF5を標的とした将来の薬剤開発も期待される。