

論文の内容の要旨

論文題目 Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation
和訳 転写因子 KLF5 は脂肪細胞分化に必須である
指導教員 永井 良三教授

東京大学大学院医学系研究科
平成 14 年 4 月入学
医学博士課程
内科学専攻
氏名 大石 由美子

脂肪組織は生体におけるエネルギーホメオスタシスを担う重要な臓器である。哺乳類には白色脂肪組織と褐色脂肪組織の 2 種類の脂肪組織が存在する。白色脂肪組織は主に余剰エネルギーをトリグリセライドとして蓄積し、エネルギー不足に陥ったときに遊離脂肪酸として放出する機能を担う。一方、褐色脂肪組織は逆にエネルギーを消費し熱産生を行う。また、脂肪組織は種々のアディポサイトカインを産生し個体レベルで摂食、エネルギー代謝や炎症反応に関与する内分泌臓器でもある。このように、メタボリックシンドロームや心血管病の発症メカニズムの解明には脂肪組織の発生・分化や機能を理解することが必要不可欠である。

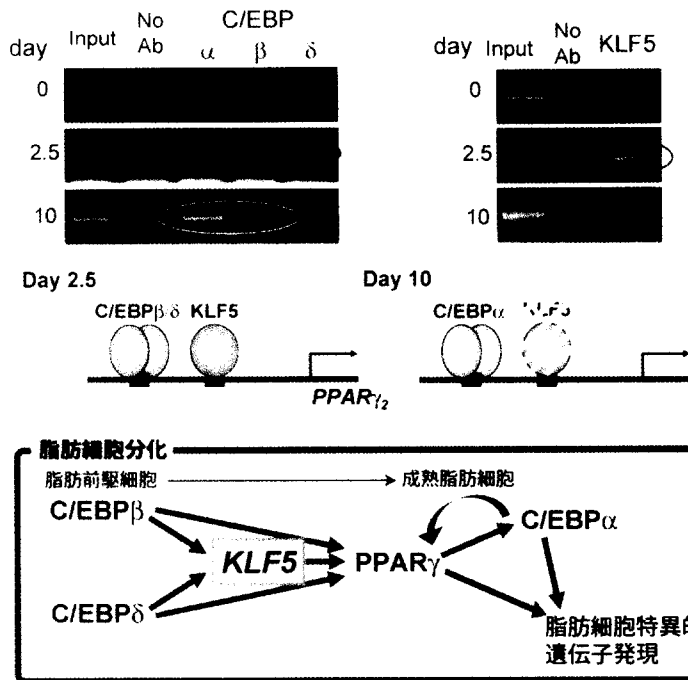
我々は、これまでに転写因子 Krüppel-like transcription factor 5(KLF5)が心血管病の発症に重要な転写因子であることを報告してきた。KLF5 は zinc-finger 型の Krüppel-like transcription family に属する転写因子である。KLF5 は当初、動脈硬化病変を形成する活性化された血管平滑筋細胞のマーカーである *SMemb* 遺伝子の活性を正に調節する転写因子として同定された。KLF5 の機能をより詳細に検討するため、我々はノックアウトマウスを作成した。*KLF5* ホモノックアウトマウスは胎生 8.5 日令以前に致死であった。KLF5 ヘテロノックアウトマウス (*KLF5*^{+/−}) は血管傷害時の新生内膜の形成が抑制されていたほか、アンジオテンシン II 持続負荷時の心肥大および心筋線維化が抑制されていた。一方、*KLF5*^{+/−}マウスは生直後の頸部脂肪組織重量が減少していた。このことより、我々は KLF5 が脂肪細胞の分化にも関与するのではないかと考え、研究を進めた。

これまで、脂肪細胞分化には PPAR γ や C/EBP ファミリーに属する転写因子

が関与することが報告されている。3T3-L1 細胞を用いた *in vitro* 脂肪細胞分化系において、C/EBP δ 、C/EBP β は分化誘導刺激開始直後に発現が一過性に亢進し、それに引き続いて C/EBP α および PPAR γ_2 が誘導される。PPAR γ_2 は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターといわれ、脂肪組織特異的遺伝子の発現を制御する。まず我々は、3T3-L1 細胞を用い脂肪細胞分化の過程で KLF5 が発現しているかどうかを検討した。その結果、KLF5 は脂肪細胞への分化誘導刺激開始 1 時間後より KLF5 の発現が上昇し、3-6 時間目をピークとした一過性の発現亢進を認めた。これは、C/EBP δ 、 β の発現に引き続いて起こり、KLF5 の発現を追うように PPAR γ_2 の発現が亢進していた。また、KLF5 のドミナントネガティブ体をレトロウイルスベクターを用いて強制発現させた 3T3-L1 細胞では脂肪細胞への分化が著しく抑制されるだけでなく、PPAR γ_2 の発現も抑制された。同様に、3T3-L1 細胞に KLF5 に対する特異的な siRNA を強制発現させた場合や、KLF5 のノックアウトマウス由来の胎児線維芽細胞を分化誘導した場合にも、脂肪細胞への分化および PPAR γ_2 の発現が抑制された。一方、KLF5 を恒常的に強制発現させた 3T3-L1 細胞では、分化誘導刺激なしに脂肪細胞へ分化してゆくことから、KLF5 は脂肪細胞分化に必須の因子であると考えられた。そこで、次に我々は、脂肪細胞分化の一連の転写ネットワークにおける KLF5 の位置づけを明らかにすることを試みた。KLF5 は転写因子としてターゲット遺伝子の発現を制御する。分化過程において、KLF5 に引き続いて PPAR γ_2 の発現を認めること、KLF5 の発現レベルと PPAR γ_2 の発現が平行であることより、KLF5 は PPAR γ_2 遺伝子の転写レベルを制御するのではないかと考えた。解析の結果、PPAR γ_2 のプロモーター領域には C/EBP の結合配列に近接して KLF の結合配列が存在した。Electrophoretic mobility shift assay(EMSA)によって、KLF5 が *in vitro* でこの配列に結合しうることを示した。3T3-L1 細胞を用いたレポーターアッセイでは、KLF5 は単独では PPAR γ_2 プロモーター活性を 2.7 倍上昇させた。しかし、KLF5 と C/EBP とを共発現させるとプロモーターは相乗的に活性化 (C/EBP β で 5 倍、C/EBP δ で 28 倍上昇) された。KLF5 の結合配列、および C/EBP の結合配列のどちらに変異を加えてもこの両者によるプロモーターの活性化は阻害された。さらに、免疫沈降法において、KLF5 は C/EBP β あるいは C/EBP δ と直接結合しうることを示された。これらのことより、KLF5 は PPAR γ_2 遺伝子のプロモーター領域に直接結合し、C/EBP とコンプレックスを形成しながら協調して PPAR γ_2 の転写活性を正に調節していると考えられた。

次に、我々は KLF5 の上流因子について検索を行った。脂肪細胞の分化過程で KLF5 以前に発現が上昇する転写因子として、C/EBP δ/β が知られている。また、KLF5 の発現レベルを変化させても、C/EBP δ/β の発現レベルは変化しないことより、KLF5 の上流に C/EBP が存在するのではないかと考えた。解析の結

果、KLF5 遺伝子のプロモーター領域には C/EBP の結合配列が存在した。EMSA 法により、in vitro でこの領域の配列に C/EBPβあるいは C/EBPδが結合した。プロモーターアッセイの結果、C/EBPβ あるいは C/EBPδは KLF5 プロモーター活性を上昇させた。この活性化は C/EBP 結合配列に変異を加えると消失することより、KLF5 のプロモーター領域へ C/EBP の結合が KLF5 の転写活性の上昇に必要であることが証明された。さらに、内因性の KLF5 の発現上昇に C/EBPβあるいは C/EBPδが必要であることを証明するために、我々は C/EBPβ^{-/-}・C/EBPδ^{+/+}および C/EBPβ^{+/-}・C/EBPδ^{+/-}マウス由来の胎児線維芽細胞を用いた分化誘導実験を行った。その結果、C/EBPβ^{-/-}・C/EBPδ^{+/+}および C/EBPβ^{+/-}・C/EBPδ^{+/-}マウス由来の胎児線維芽細胞はいずれも C/EBPβ^{+/-}・C/EBPδ^{+/+}由来の胎児線維芽細胞より脂肪細胞への分化能が低く、分化過程における KLF5 の発現が減少していた。このことより、脂肪細胞分化において、C/EBPβおよび C/EBPδが KLF5 の発現を直接制御していると考えられた。



最後に、我々は内因性の *PPARγ₂* 遺伝子における C/EBP や KLF5 の結合をクロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) を用いて確認した(左図)。3T3-L1 細胞の分化誘導刺激前、分化初期(day 2.5)および分化後期(day 10)の3点でクロマチンサンプルを回収し、KLF5、C/EBPβあるいは C/EBPδ特異的抗体を用いて免疫沈降後、沈降産物中にターゲット遺伝子の結合配列を含む領域が含まれるかどうかを PCR 法により検出した。その結果、分化誘導

刺激前、*PPARγ₂* 遺伝子のプロモーター領域には C/EBP や KLF5 の結合を認めないが、分化初期には C/EBPβ, δ, および KLF5 の結合が観察された。分化後期にはいると C/EBPβ/δ, KLF5 の結合は減弱し、代わりに C/EBPαの結合が優位となっていた。これは、分化誘導初期と分化後期において、*PPARγ₂* 遺伝子上に異なる転写因子が結合していることを明確に示すものである。KLF5 と C/EBP が直接相互作用しうること(免疫沈降法)、KLF5 と C/EBP を共発現させたときに *PPARγ₂* プロモーターは相乗的に活性化されること (プロモーターアッセイ) を考え合わせると、KLF5 と C/EBP は *PPARγ₂* プロモーター上でエンハンソ

ームを形成していると推測される。形成されるエンハンソームは分化の各段階において異なり、結果として分化の過程で刻々と変化するシグナルを反映してターゲット遺伝子である *PPAR* γ ₂ 遺伝子の転写が制御されると考えられた。

本研究では、*in vitro* および *in vivo* における脂肪細胞の分化において転写因子 KLF5 が重要な役割を果たすこと、分化初期過程で KLF5 は C/EBP β / δ によって誘導され、発現した KLF5 は C/EBP と協調して *PPAR* γ ₂ のプロモーター活性を正に調節することを明らかにした。さらに、KLF5 と C/EBP がプロモーター上でエンハンソームを形成しながら *PPAR* γ ₂ 遺伝子の転写を制御していることが強く示唆された。KLF5 は、心血管病の発症に関与するだけでなく、代謝臓器としての脂肪細胞の分化、さらには成熟脂肪細胞からなる脂肪組織の機能にも深く関与する可能性がある。つまり、KLF5 はメタボリックシンドロームの発症の基盤である脂肪組織と、その臨床的帰結としての心血管病の発症の両者に関与する転写因子として位置づけられる可能性が示唆される。今後、KLF5 のこれら代謝臓器における機能をさらに明らかにしてゆくことは、メタボリックシンドロームの発症・進展の分子メカニズムそのものの解明、さらには創薬を含めた新たな治療戦略の開発につながるものと考えられる。