

[別紙 1]

論文内容の要旨

論文題目 Krüppel-like factor 5 directly stimulates cell growth in vascular lesions.

血管リモデリングにおける心血管系転写因子 KLF5 の細胞増殖促進効果とそのメカニズムの検討

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 13 年 4 月 入学

医学博士課程  
内科学専攻

氏名 澤城 大悟

**背景：** 狭心症等虚血性心疾患は合成型平滑筋細胞の増殖や変性マクロファージ（泡沫化細胞）やその他の細胞外基質からなる動脈硬化性プラークや冠インターベンション後に見られる新生内膜等による急性・慢性の血管内腔狭窄として特徴付けられる。KLF5 は Sp/KLF 因子として知られる zinc finger 型転写因子群に属し、これまで数々の研究より冠動脈病変における血管平滑筋の増殖にその発現が関与する事が知られている。また非心血管系細胞に於いては細胞増殖を引き起こし、特に癌化に関連する因子として多く報告されている。同様に KLF5 は病的刺激（アンジオテンシン II や phorbol ester）により誘導される因子であり血管バルーン障害モデル等により新生内膜内に発現が引き起こされる事が知られている。しかし現在までの所、実際に KLF5 が心血管病変や平滑筋等動脈硬化変化の主体をになう細胞群において直接的に細胞増殖を促進させているのか、また KLF5 の直接的抑制は細胞増殖を減弱させ今後の動脈硬化促進抑制の治療ターゲットとなり得るかについては報告されていない。本研究においてはまず KLF5 の血管病変に於ける細胞増殖への直接的な作用に焦点をおき、血管障害モデル及び血管平滑筋細胞へと強制導入を行い血管リモデリングに於ける影響とそのメカニズムを Sp1 群との比較も含め *in vivo&vitro* にて評価した。

**方法および結果：** アデノウイルスを用いて KLF5 及び zinc finger 型転写因子である Sp1 をラットバールーン血管障害後に強制導入し新生内膜の増生について免疫染色・新生内膜形成についての形態計測を行った。新生内膜の形成は empty 群や Sp1 群に比して有意に KLF5 導入群にて増生していた(KLF5 group: intima/media ratio 1.39+/-0.23SD, empty/Sp1 group: I/M ratio 0.70+/-0.23SD)。また KLF5 群では PCNA 染色を用いた増殖細胞比率がやはり有意に empty 群、Sp1 群に比して増加していた。初代継代細胞ラット大動脈平滑筋細胞への導入・強制発現でも KLF5 群で顕著に細胞増殖促進効果を認め、またチミジンアナログである BrdU の取り込み率も著明に上昇しており DNA 合成促進が示された。フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析では KLF5 導入群において S 期 (DNA 合成期) に存在する細胞比率が飛躍的に上昇しており KLF5 強制導入により細胞周期が促進される事が伺われた。加えて KLF5 強制導入を行った細胞群では細胞周期を S 期へと進行させる事により促進することが知られている cyclin D1 の発現上昇が蛋白・mRNA 双方にて確認された。ルンフェラーゼを用いたレポーターアッセイでは KLF5 の用量依存的な cyclin D1 への発現増強効果が確認された。Cyclin D1 プロモーター領域の欠失変異体を用いた検討では Sp1 モチーフ部位でのレポーター活性に有意差を認め Sp1 モチーフを *cis*-element ととして KLF5 は cyclin D1 への転写活性を増強すると判断された。更にラット血管平滑筋細胞において血清刺激の有無を条件として KLF5 によるクロマチン免疫沈降を行った所、KLF5 は cyclin D1 プロモーターと増殖刺激がある場合に相互作用する事が想定された。RNA 干渉を用いた gene silencing の検討では細胞増殖、細胞周期促進ともに KLF5 の knock down によりコントロール群に比して低下、減少を認めた。

**考察：** 上記の結果から以下の 3 点が挙げられる。

- ① 血管平滑筋細胞は収縮型(contractile type)として存在するが新生内膜等病的状態では増殖・遊走を特徴とする合成型へと形質変換(脱分化)を行うとされている。形質転換における KLF/Sp1 ファミリー転写因子群の関与の重要性は既に報告されている通りで

あるが **exogenous** な強制発現においても各転写因子特異的な変化が観察され血管リモデリングにおける重要性が確認された。**KLF5** の強制発現はバルーン障害等病的刺激下において平滑筋等新生内膜の細胞増殖を促進し、結果として血管リモデリングを増悪させる。同じ **Zn finger** 型転写因子である **Sp1** の強制発現では **Empty** 群と同程度の新生内膜形成であった点から考えると **KLF5** の心血管病変に於ける特異性が伺える。

- ② これまでの特に癌腫での検討では **KLF5** は細胞腫、また刺激等の状況により増殖促進、抑制双方に働き得ると報告されていた。しかし血管平滑筋・筋線維芽細胞を使用した今回の検討では血清刺激下の **KLF5** は強力に細胞増殖を促進し、またその作用の一端は直接、プロモーター上の **Sp1** モティーフを介して **cyclin D1** の発現増強による事が明らかになった。以上の結果より **KLF5** は **SMemb** や **PDGF-A** を介した血管平滑筋の形質転換及び **cyclin D1** の直接的な転写増強による細胞増殖効果の両面より血管リモデリング促進を行うと想定された。
- ③ **KLF5** は血管リモデリングにおいて **SMemb**、**PDGF-A** 等形質転換に関わる因子を始め、**PAI-1**、**iNOS** 等種々の **autocrine**・**paracrine** 因子を産生し病態の促進に関わることが知られている。また **hetero-knockout** マウスを用いた検討で血管障害への新生内膜・肉芽組織の形成やアンジオテンシン II 刺激への心肥大形成が抑制されることが証明されている。本研究ではプラスミドを担体とした **KLF5** の **RNA** 干渉を行い効率的に **KLF5** の発現抑制を行った結果、細胞増殖・細胞周期促進効果減弱効果が認められた。以上より **RNA** 干渉による **KLF5** を標的とした治療的介入は血管平滑筋等の増殖が主体となる病態において有効である可能性が高い事が示された。