

論文の内容の要旨

論文題目 **Krüppel-like transcription factor KLF5**

in the regulation of food intake

和文 転写因子 **KLF5** と摂食調節

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18年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

小島敏弥

Krüppel-like factor 5 (KLF5) は、**KLF** ファミリーに属する転写因子であり、我々のグループは **KLF5** を胎児型ミオシン重鎖 **SMemb** 遺伝子の転写を調節する **Zn finger** 型転写因子として同定し、血管病態形成に関与していること、心肥大と線維化に関与していること、脂肪分化や脂肪酸燃焼に関与していることを報告してきた。

Klf5^{+/-} は体重が増加しにくいにもかかわらず、摂食量はむしろ増加していた。摂食量は末梢からの情報に応じて中枢で精密にコントロールされており、**Klf5^{+/-}** が過食を示す理由として、末梢でのエネルギー消費の亢進に加えて中枢での摂

食コントロールも寄与している可能性を示唆する。

視床下部は体内の恒常性維持に重要な中枢である。その中でも弓状核は視床下部において摂食調節に関わる要所とされている。弓状核には摂食調節に関わる2つの主要な神経細胞が存在している。1つは摂食促進に働き、neuropeptide Y (NPY)と agouti-related protein (AgRP)を発現する AgRP/NPY ニューロンである。他方は摂食抑制に働き、cocaine- and amphetamine-related transcript (CART)と pro-opiomelanocortin (POMC)を発現する CART/POMC ニューロンである。これら2種のニューロンから室傍核、背内側核、外側野といった他の視床下部領域に放射がある。視床下部が摂食調節で中心的な役割を果たすことから、私は KLF5 が視床下部において機能を持つと仮説を立てて検討した。

摂食中枢として視床下部に注目し、抗 KLF5 特異抗体 (KM1784)、Tyramide Signal Amplification (TSA) 法を用いて KLF5 に対する免疫組織化学を施行した。視床下部弓状核において多数の KLF5 陽性細胞を認めた。一方で室傍核、腹内側核、背内側核、新皮質において KLF5 陽性細胞は殆ど認めなかった。さらに興味深いことに、KLF5 陽性細胞は再摂食時と比較して絶食時に有意に多く認めた。続いて抗 KLF5 抗体と抗 POMC 抗体を用いて免疫二重染色を施行したところ、KLF5 陽性細胞と POMC 陽性細胞が一致しないことを確認した。抗 KLF5 抗体と抗 AgRP 抗体を用いた免疫二重染色では一部の同一細胞において KLF5 と AgRP

が陽性を呈し、KLF5 と AgRP の共在が示唆された。以上より、少なくとも一部の KLF5 陽性ニューロンが AgRP を発現すること、また、AgRP 陽性細胞が増加する絶食時に KLF5 陽性細胞も増加することから、KLF5 と AgRP に関連があることが示唆された。

Klf5^{+/-}マウスは野生型と比較し、有意に摂餌量が増大する。そこで、KLF5 には摂食促進機構において抑制的な役割がある可能性を考えた。AgRP は摂食促進作用を持つことから、KLF5 が AgRP 発現を阻害する可能性を考え、これらの発現の時間的変化を検討した。C57BL/6 マウスに 12 時間の絶食負荷をかけ、続いて 9 時間の再摂食負荷を行った。3 時間毎に視床下部を含む脳組織を採取し、KLF5 と AgRP に対する免疫二重染色を行ったところ、KLF5 陽性細胞は絶食負荷から 3~6 時間と早期に多く認められ、AgRP 陽性細胞はその後増加していた。

野生型マウスの視床下部において *Klf5* mRNA の発現レベルを RT-PCR により評価した。再摂食時と比較し、絶食時に有意に増加を認めた。尚、絶食時には *Agrp* mRNA が、再摂食時には *Pomc* mRNA がそれぞれ増加しており、免疫組織化学とも一致する結果であった。野生型マウスと *Klf5*^{+/-}マウスの視床下部における *Klf5*、*Agrp*、*Pomc* mRNA 発現レベルについて比較を行った。*Agrp* mRNA は自由食事下よりも絶食時に発現レベルが増加する。一方で *Pomc* mRNA は絶食時よりも自由食事下で発現レベルが高いが、野生型と *Klf5*^{+/-}マウスの間で発現レ

ベルに有意差を認めなかった。

視床下部における **KLF5** 機能をさらに検討するために、**AgRP** を発現する視床下部細胞株である **mHypoE-38** を用いた。グルコース濃度の変化による影響を検討した。**mHypoE-38** 細胞においては、培地中グルコース濃度の低下で *Klf5* 及び *Agrp* の発現が増加し、グルコース濃度の上昇により、発現が低下した。

末梢からのエネルギー調節における *Klf5* の反応を検討した。インスリン、レプチンは **AgRP** 神経細胞を抑制し、*Agrp* の発現を抑制することが知られている。インスリン、レプチンの投与により *Agrp* が抑制され、*Klf5* 発現についても抑制がみられた。

Klf5 発現を siRNA でノックダウンし、インスリン及びレプチンの作用を検討した。*Klf5* をノックダウンした状態でインスリン、レプチンを加えたところ、*Agrp* の発現低下がみられず、むしろ増加していた。これは **KLF5** が末梢からのシグナルに応じた *Agrp* の発現の制御に寄与していることを示唆する。

KLF5 が *Agrp* の発現を制御している可能性があることから、*Agrp* プロモーターへの作用を検討した。Forkhead box-containing protein of the O subfamily (**FoxO**)-1 は *Agrp* プロモーター活性を正に調整する。一方、レプチンは **Stat3** を活性化するが、**Stat3** は **FoxO1** の *Agrp* プロモーターへの結合を阻害することによって、*Agrp* 発現を抑制する。pGL3-**AgRP** と、恒常活性型 **FoxO1-CA** を共トラ

ンスフェクションしたところ、予想通り AgRP はルシフェラーゼ値の上昇がみられた。KLF5 の発現により、FoxO1-CA 非存在下においては、Agrp プロモーターの軽度活性化が見られたが、KLF5 は FoxO1-CA によって活性化されたプロモーターを著明に抑制した。

本研究の結果は、摂食調節を介する恒常性維持において視床下部における KLF5 機能が重要であることを強く示唆する。全体として、KLF5 は摂食を抑制するように働くと示唆される。

KLF5 は摂食を抑制する機能を持ちながら、絶食によって発現誘導されるという興味深い発現パターンを示す。視床下部では AgRP 発現に先行して、発現が上昇することから、絶食早期における AgRP 発現を抑制している可能性が高い。絶食早期における KLF5 活性化の生理学的意義に関しては、さらに今後の研究が必要である。

mHypoE-38 細胞において、KLF5 は低グルコース、インスリン、レプチン刺激によって発現が誘導された。KLF5 発現誘導へ至るシグナル経路の同定が次の課題である。転写因子では FoxO1 がインスリンによって抑制され、Stat3 がレプチンによって活性化されることが知られている。KLF5 発現へとつながるシグナル経路の同定は、これらのシグナル経路とのクロストークを明確にすると期待される。KLF5 は FoxO1 による Agrp プロモーター活性化を抑制した。FoxO1 はイ

ンスリン刺激により、核外へと移行する。KLF5 が *Agrp* プロモーターを抑制する機構については今後の検討が必要である。KLF5 は多くの遺伝子に対して転写を正に調整することが知られているが、我々は、骨格筋において KLF5 が SUMO 化を受けることによって転写抑制作用を示すことを明らかとしている。従って、SUMO 化の寄与を検討することが重要であろう。

現在、私は AgRP ニューロン特異的ノックアウトマウス(*Klf5^{fl/fl};AgRP-Cre*)を作成中である。このマウスの表現型を解析することにより、個体の摂食調節における KLF5 と AgRP の関連について、さらに明確に出来ると考えている。

現在、中枢に作用して摂食を調節する薬剤の開発が盛んに行われている。しかし、これらの薬剤が標的としているシグナルは食欲調節以外にも多彩な機能を持つため、副作用が危惧されている。また、視床下部における摂食調節は複雑であり、脳内の一つの経路にとどまらず、脳幹や報酬回路を介した末梢シグナルにも依存するため、一つの特定の回路のみを標的として長期的、臨床的に有効な体重減少をもたらすことは困難であろうと推測される。今後、さらに KLF5 の摂食調節における機能を、特に末梢からのシグナルによる制御と、摂食を調節する転写ネットワークの観点から明らかにすることにより、摂食調節へ介入するための有効な治療標的が同定できると期待される。