

論文の内容の要旨

論文題目 **Krüppel-like factor 6 (KLF6) regulates adipogenesis and is involved in the pathogenesis of glucose intolerance and diabetes mellitus**

和訳 **KLF6 は脂肪生成を制御し、耐糖能異常、糖尿病の病態形成に関与する**

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 19 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 石田純一

現代社会において、肥満や耐糖能異常、糖尿病は増加の一途をたどっており、心血管病発症の危険因子として非常に重要な位置を占めている。心血管病の予防と言う観点から、これらの病態の形成機序を解明し、治療、創薬につなげていくことは大きな価値がある。このような背景から近年肥満や耐糖能異常に関する研究は世界中で熱心に進められている。

今回私は転写因子群 **Krüppel like factor** (以下 **KLF**) **family** に属する **KLF6** という転写因子に着目し、**KLF6** が脂肪形成や肥満、耐糖能異常や糖尿病といった病態形成にどのような役割を果たしているかについて探究した。

KLF は細胞の分化や増殖など生体における様々な反応において重要な役割を果たす転写因子群で3つのジンクフィンガーを有することを特徴とし、現在までに **KLF1** から **KLF17** までの 17 因子がヒトで同定されている。脂肪分化においては **KLF2**、**KLF3**、**KLF4**、**KLF5**、**KLF6**、**KLF7**、**KLF9**、**KLF11**、**KLF15** の 9 因子が関与することが今までに報告されており、脂肪分化における **KLF** の重要性を窺い知ることができる。例えば **KLF5** は 3T3-L1 脂肪前駆細胞を用いた研究において、脂肪分化の初期に発現し、**CCAAT/enhancer-binding protein** (以下 **C/EBP**) β と **C/EBP** δ の 2 つの転写因子と関与しながら、脂肪分化の鍵分子

である peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 (以下 PPAR γ 2) の発現を誘導し、脂肪分化を正に制御する。ただし、それぞれの因子について培養細胞やノックアウトマウスを用いた研究が進められている一方で、KLF 全体として脂肪分化にどのような関与をしているのかについては未だに不明な部分が多い。

KLF6 は全身性に発現が認められるが、脂肪分化においても重要な役割を果たしていること示唆されている。3T3-L1 脂肪前駆細胞を用いた研究により、KLF6 が分化初期において Delta like protein 1 (以下 DLK1) の発現を抑制することによって、脂肪分化を正に制御することが報告されているが、KLF6 が生体で果たす役割や上記以外の分子学的機序については明らかにされていない。

そのため、まず KLF6 の生体での代謝系における役割を探究するために、KLF6 のノックアウトマウスを準備した。KLF6 のホモノックアウトマウスは胎生致死であるため、ヘテロノックアウトマウス (以下 KLF6^{+/-} mouse) を使用した。

まず通常食を食餌したうえで、KLF6^{+/-} mouse を野生型の対照群と比較したが、体重や各臓器の重量、組織所見、血液検査値に有意な差は認められなかった。そこで生後 6 週から高脂肪食を投与したところ、両群で摂餌量は有意な差が認められないにもかかわらず、KLF6^{+/-} mouse は野生型と比較して体重増加が有意に抑制されていた。しかし意外なことに白色脂肪組織の重量は野生型と比べて有意差を認めなかった。共焦点顕微鏡を用いて白色脂肪組織を観察したところ、KLF6^{+/-} mouse では、野生型と比較して血管の集簇を伴う小型脂肪細胞が数多く認められた。また白色脂肪組織に発現している mRNA を解析したところ、C/EBP α や PPAR γ 2 といった脂肪分化に関連する転写因子の発現に野生型と KLF6^{+/-} mouse で有意な差は認められなかったものの、Fatty acid binding protein (以下 aP2) や Lipo-protein lipase (以下 LPL) といった脂肪マーカーの発現が KLF6^{+/-} mouse において有意に低減されていた。その他の組織所見では、褐色脂肪組織や肝臓は高脂肪食負荷により野生型で著明に脂肪変性が認められる一方で、KLF6^{+/-} mouse ではその変化はより軽度であり、また肝臓の重量も KLF6^{+/-} mouse では有意に軽かった。このことから KLF6 は脂肪

分化だけでなく、褐色脂肪組織や肝臓におけるエネルギー代謝にも関与していることが示唆された。

また同様の高脂肪食負荷条件下では空腹時の血糖、インスリン値において **KLF6^{+/+} mouse** は野生型と有意差を認めなかったが、ブドウ糖負荷試験を施行してみると、**KLF6^{+/+} mouse** は野生型と比較して血糖値の上昇が有意に抑制されていた。ブドウ糖負荷後のインスリン値について比較してみると、野生型では負荷 30 分後に有意なインスリン値の上昇を認める一方、**KLF6^{+/+} mouse** ではインスリン値は負荷前と同じレベルに保たれており、**KLF6^{+/+} mouse** がインスリン抵抗性を示しにくいことが判明した。しかしインスリン負荷試験の結果は野生型と **KLF6^{+/+} mouse** で有意な差は認められなかった。血中アディポカインを比較してみると、**KLF6^{+/+} mouse** においてアディポネクチンの血中濃度は有意に高値である一方で、レプチンの血中濃度に有意な差は認めなかった。

KLF6 が脂肪分化に深く関与する因子であることをさらに追及するために、**KLF6^{+/+} mouse** と野生型のマウス胎児繊維芽細胞（以下 **MEF**）を準備し、これらに対して脂肪分化誘導をかけ、比較検討した。**KLF6 mRNA** の発現は野生型と比較して **KLF6^{+/+} MEF** では終始半分程度であった。分化誘導開始後 8 日時点でオイルレッド O 染色にて脂肪分化の程度を比較したところ、**KLF6^{+/+} MEF** で脂肪分化が有意に抑制されていた。さらにオイルレッド O を溶出し、細胞内脂質を定量化したところ、**KLF6^{+/+} MEF** では野生型と比較して 70% 抑制されていることが判明し、**KLF6** の脂肪分化における重要性が再認識された。

さらに 3T3 L1 脂肪前駆細胞を用いて培養細胞における **KLF6** の転写制御システムを検討した。3T3 L1 脂肪前駆細胞の脂肪分化誘導において、**KLF6** は早期(分化誘導直後)と晚期(day5 近辺)の二峰性の発現パターンを示すことが知られている。既出の論文から、早期において **KLF6** は **DLK1** の抑制を介して間接的に脂肪分化を促進する。が、一方で晚期における役割は明らかにされていなかった。この役割を検討するために分化誘導 day5 の 3T3 L1 脂肪前駆細胞において **siKLF6** による **KLF6 knockdown** の効果を検討した。RT-PCR による mRNA 発現レベルの解析を行ったところ、**KLF6** は 60%程度の knockdown 効果が得ら

れていた。PPAR γ 2 mRNA の発現レベルはコントロール群と比較して有意な差は認めないものの軽度低下していた。一方で CEBP α などの転写因子や aP2、LPL などの脂肪特異的遺伝子の発現には影響が見られなかった。オイルレッド O 染色にても脂肪分化の程度に有意な差は認められなかった。今回の検討からは KLF6 は 3T3-L1 前駆脂肪細胞の脂肪分化過程後期において PPAR γ 2 の発現を促進もしくは維持する可能性があるものの、脂肪分化に与える影響は軽微であった。

以上の結果から、KLF6 は培養細胞レベルでは脂肪分化を正に制御し、生体レベルでは高カロリーなどの負荷がかかった際に肥満形成、さらには耐糖能異常、糖尿病の発症や増悪にも関与することが示唆された。

今回検討した高脂肪食を負荷した KLF6^{+/-} mouse の解析からそれぞれの組織における KLF6 の関与は以下のように考察された。KLF6^{+/-} mouse の白色脂肪組織では野生型と比較して小型脂肪細胞がより多く観察され、同細胞の周囲に血管の集簇を認めており、新たな脂肪細胞が産生されている場所である可能性が想定された。KLF6^{+/-} mouse の血中アディポネクチン濃度が高値であったことや耐糖能が保持されていたこともこの仮説と矛盾しない。また高脂肪食を投与した KLF6^{+/-} mouse の褐色脂肪組織においては、野生型と比較して脂肪変性が有意に抑制されており、同組織で熱産生が亢進している可能性、さらには褐色脂肪組織における熱産生亢進によって KLF6^{+/-} mouse は野生型と同等量の摂餌をするにもかかわらず、体重増加が抑制された可能性が示唆された。また KLF6^{+/-} mouse においては肝臓も褐色脂肪組織と同様に脂肪変性が抑制されており、原因として KLF6 の肝臓における未知の機能、もしくは熱産生が亢進した褐色脂肪組織の間接的な作用が想定された。筋肉については今回詳細に検討していないが、脂肪組織や肝臓と同様に糖代謝に関与する重要な臓器であり、KLF6 ヘテロマウスを用いた今後の検討が必要であると考えられた。

今回は KLF6 の代謝系における機能について探究したが、さらに心血管系の病態形成における KLF6 の関与も検討中である。

心血管系の病態形成においては KLF6^{+/-} mice を用いて頸動脈結紮実験を行い、平滑筋増殖

における KLF6 の関与を検討中である。本モデルでは KLF6^{+/+} mice は野生型と比較して内膜増殖や血管径の増大が著明であり、血管リモデリングが亢進していた。

心疾患の病態モデルとして、アンジオテンシン II を持続的に投与するモデルを検討している。本モデルでは KLF6^{+/+} mice において野生型と比較して心臓の線維化及び肥大化が有意に抑制されていた。

上記から KLF6 の心血管系の病態形成における関与も示唆されている。このような病態形成における KLF の機能に関する研究はノックアウトマウスを用いて精力的に進められており、一例として KLF5 をあげる。KLF6 同様 KLF5^{+/+} mice は胎生致死であるため、KLF5^{+/+} mice が用いられる。興味深いことに KLF5^{+/+} mice は代謝系や心臓の疾患モデルにおいて KLF6^{+/+} mice と同様の表現型、すなわち代謝系においては耐肥満性や良好な耐糖能を有し、心臓においては肥大や繊維化が抑制されるのに対し、血管系の疾患モデルにおいては KLF6^{+/+} mice と異なる表現型、すなわち内膜増殖が抑制されていた。これらのことから KLF6 はその機能において互いに類似性を有する一方で多様性も有していることが改めて確認された。また KLF6 に着目すると、KLF6 は代謝疾患や心疾患のモデルにおいては病態の形成、進展に対して生体に保護的に働く一方で、血管障害モデルにおいては病態の進展に寄与していると考えられ、KLF6 の機能の複雑性が示唆される。

今回の検討からは KLF6 が脂肪分化において重要な因子であることが改めて確認され、また耐糖能異常、糖尿病といった代謝障害の発症にも関与することが示唆された。今後さらに詳細な機構の解明が期待される。