

## 心血管系リモデリングとメタボリックシンドロームにおける 転写因子KLF5の意義

永井 良三

**要 旨：**心臓や血管は物理的、代謝的、免疫学的負荷に反応して、肥大、過形成、線維化などの変化を来す。われわれは血管平滑筋の活性化を促す転写因子としてKLF5を同定し、これが物理的負荷に対する心血管リモデリングや臓器線維化、脂肪細胞分化、骨格筋における脂肪酸代謝に重要な役割を担っていることを明らかにした。KLF5と結合するレンチノイド受容体(RAR)のアゴニストや骨格筋におけるKLF5のSUMO化を促すPPAR $\delta$ アゴニストは、心血管病やメタボリックシンドロームの治療薬になると考えられる。(J Jpn Coll Angiol, 2008, 48: 179-183)

**Key words:** KLF5, cardiovascular remodeling, metabolic syndrome

### はじめに

生体は常に変動する物理的あるいは代謝的ストレスに対応しつつ、個体のホメオスタシスを維持している。長期のストレスによって、細胞のシグナル伝達系や遺伝子転写がリセットされ、細胞肥大や増殖、さらに臓器の高次構造の変化が生ずる。心血管系でみられる動脈硬化、血管再狭窄、心肥大はそのような例であるが、過剰なエネルギー摂取による肥満もある意味では脂肪細胞に対するストレス応答ととらえることができる。心血管系と脂肪組織の高次構造の変化と機能異常は、臨床的にメタボリックシンドロームの基本的な病態と考えられるために、両者にどのような共通の分子メカニズムが存在するかは、細胞のストレス応答メカニズムの解明だけでなく、心臓血管病の予防と治療にも重要な課題と考えられる。

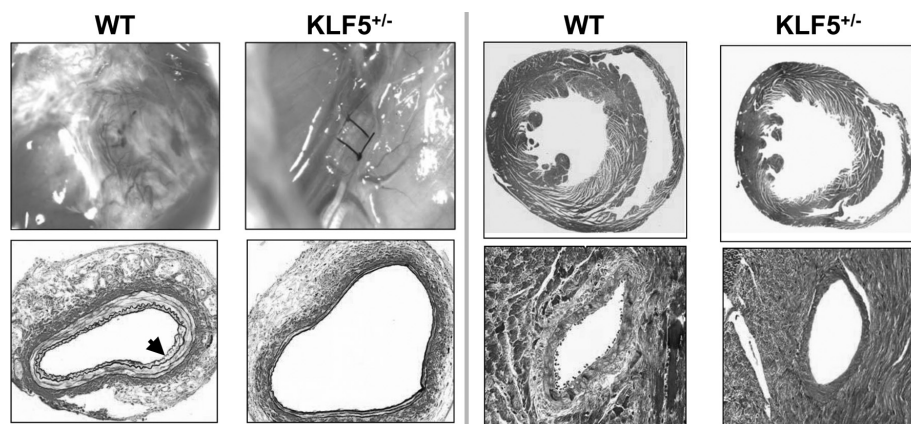
### 心血管リモデリングにおける 転写因子KLF5の意義

骨格筋や心筋細胞は、発生分化の過程や病的ストレスに応じて遺伝子の発現が大きく変化する。特に収縮蛋白ミオシンのアイソフォームの変換が起こるが、これは筋の発生分化や病態の分子マーカーとなるとも

に、筋の収縮能を規定する。われわれは血管平滑筋においても骨格筋や心筋のようにミオシンアイソフォームが存在し、これが血管の発生分化や病態のマーカーになることを明らかにした<sup>1-5)</sup>。このなかで、SM1とSM2ミオシンは平滑筋細胞に極めて特異性が高く、平滑筋同定の最も優れたマーカーとして位置づけられている。また胎児型ミオシンであるSMembは、増殖因子や酸化ストレスなどで誘導されるストレス応答蛋白であることが明らかとなった。またSMembは、粥状動脈硬化病変や血管再狭窄病変で増殖する平滑筋細胞だけでなく、心肥大、糸球体腎炎や間質性腎炎、間質性肺炎などの臓器の再構築過程においても誘導される<sup>6-10)</sup>。

これらの研究を背景に、われわれはSMemb遺伝子の発現を正に制御する転写因子としてKrüppel-like factor 5 (KLF5, またはBTEB2, IKLF)を同定した<sup>11)</sup>。Krüppelとは、ショウジョウバエの体節形成にかかわる重要な転写因子で、KLFは哺乳動物におけるそのホモログである。

KLF5は増殖因子によって活性化され、PDGF-AやPDGF-Bなどの増殖因子、増殖因子の転写因子であるEgr-1, PAI-1や組織因子などの血栓関連遺伝子などの血管病変の形成にかかわる遺伝子群を誘導する<sup>12,13)</sup>。さらにKLF5はNF $\kappa$ Bのp50サブユニットと結合し、PDGF遺伝子の活性化を増強する<sup>14)</sup>。また、KLF5には抗アポ



**Figure 1** Reduced vascular injury and angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in heterozygous KLF5 knockout mouse.

A: Cuff-injury in mouse.

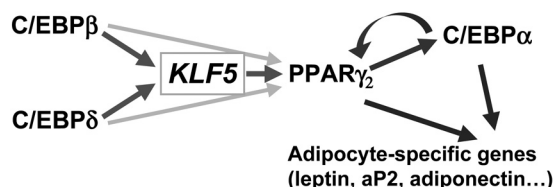
B: Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy.

トース作用があるが、その作用にはDNA結合部近傍のリジン残基がアセチル化されることが重要である<sup>15)</sup>。さらにKLF5の転写活性には、レチノイド受容体、PPAR $\gamma$ 、C/EBPなどと複合体を構成することも明らかとなった<sup>16,17)</sup>。

KLFファミリーは、さまざまなシステムにおいて発生分化およびストレス応答の新しい分子機構として重要である。例えば、KLF2, 4, 6 は心血管系の機能維持や動脈硬化に、KLF2, 5 はT細胞分化と細胞免疫に重要である。KLF5, 15は脂肪細胞分化と肥満、脂肪肝の形成にかかわる。KLFは遺伝子転写を正に制御することもあれば、抑制因子ともなる。同一因子が組織によって正と負の作用をすることもあるが、その詳細なメカニズムは不明である。

KLF5の心血管病態における意義は、遺伝子ノックアウトによって明らかになった。両アレルを欠損したマウスは胎生の極早期に死亡するため解析を行うことができなかった。ホモマウスの死因は不明であるが、最近、KLF5がES細胞の維持に重要であることも明らかにされており、恐らく発生の初期段階における異常によるものと推測される。

一方、KLF5遺伝子のヘテロ欠損マウスは一見正常であるが、アンジオテンシンII負荷による心肥大と心筋線維化、大動脈への機械的損傷における内膜肥厚が著明に減弱した(**Fig. 1**)。このことからKLF5が心血管系へのストレスによって引き起こされる組織構築改変に



**Figure 2** Role of KLF5 in adipocyte differentiation. KLF5 is induced by C/EBP, and induces PPAR $\gamma$  during adipocyte differentiation.

重要な転写因子であることが示された<sup>17)</sup>。

またKLF5は血管新生因子でもある。実際にKLF5のヘテロ欠損個体に癌を移植すると癌の成長が遅延する。恐らく悪性腫瘍の増殖には血管新生などの正常組織側の反応が必須で、KLF5は間葉系細胞の活性化に関与しているものと考えられる。

### 脂肪細胞分化とメタボリックシンドローム 発症要因としてのKLF5

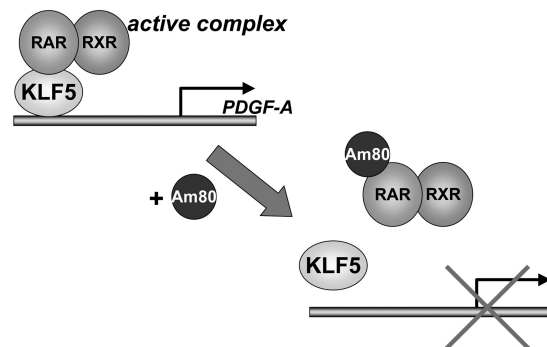
KLF5は心血管系の発生やストレス応答だけではなく、脂肪細胞の分化においても重要な役割を担っている。KLF5の全長cDNAを3T3L1細胞に導入すると脂肪前駆細胞から脂肪細胞へ分化誘導が可能である。また、脂肪細胞への分化条件下で、KLF5に対するsiRNAを3T3L1細胞に導入すると、脂肪細胞への分化は阻止される。実際、KLF5はC/EBPの下流でPPAR $\gamma$ の上流に位置することが示された(**Fig. 2**)<sup>18)</sup>。

KLF5遺伝子ヘテロ欠損マウスは、過剰のカロリー摂取という代謝的負荷に対して肥満しにくいという興味ある表現型を示す。すなわち、同マウスは野生型と比較して2倍近い食餌を摂取するにもかかわらず、体重増加は約10%低値であった。さらに高血糖やインスリン抵抗性も軽度であった。代謝ケージで検討すると、糖の取り込みは肝臓では野生型と比較して変化がないが、骨格筋においては高度に亢進していることが判明した<sup>19)</sup>。すなわちKLF5は骨格筋においてエネルギー消費を抑制していると考えられた。実際、ヘテロアウトマウスの骨格筋では、脂肪酸の $\beta$ 酸化にかかわるacylCoA oxydase、脂肪酸のミトコンドリア輸送にかかわるPCT1b、熱産生にかかわるuncoupling protein2、3などのエネルギー消費関連遺伝子の発現が著明に亢進しており、筋細胞をもちいた解析からC/EBPによって活性化されるこれらの転写機能をKLF5は著明に抑制した。

転写因子が組織によって転写抑制因子となるメカニズムとして、最近、転写因子のSUMO化が注目されている。実際、KLF5はリジン162とリジン209においてSUMO修飾を受け、その際、コリプレッサーであるNCoRやSMRTと結合することが示された。骨格筋におけるKLF5は高脂肪食によって誘導される。これは、過剰エネルギー摂取状態では、肥満や脂肪肝、高脂血症を誘導し、さらにこれらの代謝異常が血管系におけるKLF5を誘導することによって、心臓血管病を生ずると考えられる。

### KLF5とコファクターを標的とした創薬

これらの知見は創薬に生かすことが可能である。特にKLF5は単独で病態形成にかかわる遺伝子を活性化するのはなく、核内受容体やシグナル分子と複合体を形成する。そこで、KLF5によるPDGF-A遺伝子の活性化を指標としてさまざまな薬剤のスクリーニングを行ったところ、レチノイド受容体のアゴニストであるAm80(タミバロテン)がKLF5の抑制薬であり、同受容体のアンタゴニストであるLE135が拮抗薬となることが示された<sup>17)</sup>。実際に動物にAm80を投与すると、血管損傷による動脈内膜の肥厚、アポEノックアウトマウスにおける粥状動脈硬化、アンジオテンシンIIによる心肥大と線維化、高カロリー食負荷における脂肪肝をすべて抑制した(Figs. 3, 4)<sup>17, 20)</sup>。一方LE135は、血管新生作用を有していた。

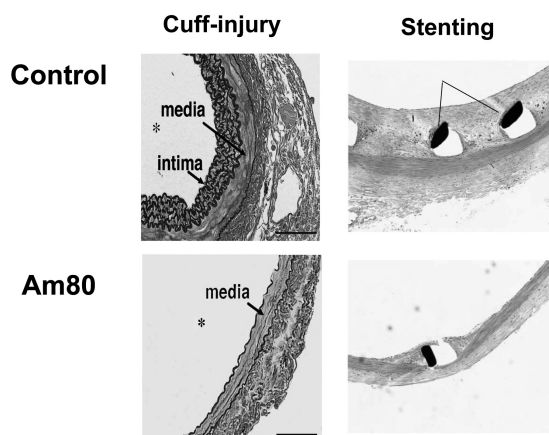


**Figure 3** When Am80 binds RAR $\alpha$ , the complex composed of KLF5, RAR $\alpha$  and RXR is detached from the DNA binding site, thus repressing gene expression of PDGF-A.

また骨格筋におけるKLF5の機能を抑制する薬剤は、メタボリックシンドロームと動脈硬化の治療薬として有望である<sup>19)</sup>。GW501516はLDL低下とHDL上昇をもたらす薬剤として開発されたが、これはPPAR $\delta$ アゴニストである。GW501516を動物に内服させると過剰なエネルギー摂取にもかかわらず肥満が生じない。本薬剤投与時には、骨格筋におけるacylCoA oxydase、PCT1b、uncoupling protein2などの遺伝子発現が亢進しておりKLF5ヘテロ欠損マウスと極めて類似したフェノタイプを示す。そのメカニズムを骨格筋細胞で検討すると、脂肪酸代謝関連遺伝子に結合したKLF5は、PPAR $\delta$ アゴニストであるGW501516存在下に脱SUMO化され、同時にコリプレッサーであるNCoRとSMRTがKLF5から解離することによって脂肪酸代謝関連遺伝子の発現を亢進させることが示された(Fig. 5)。

### おわりに

われわれの研究は血管平滑筋ミオシン分子の多型性の解明に始まり、胎児型ミオシンの心血管病変における誘導、胎児型ミオシン遺伝子の誘導転写因子としてのKLF5の同定、心血管病とメタボリックシンドロームなどの病態生理におけるKLF5の意義の解明、さらにこれを標的とした創薬へと展開した。一連の研究により、心血管病とメタボリックシンドロームという異なる病態の基盤に、KLF5という負荷応答システムが存在すること、骨格筋におけるKLF5の活性化はエネルギー消費の低下によるメタボリックシンドロームの発症に、脂肪組織におけるKLF5は脂肪細胞分化による肥満形成に、そして心血管系におけるKLF5は心肥大、動脈

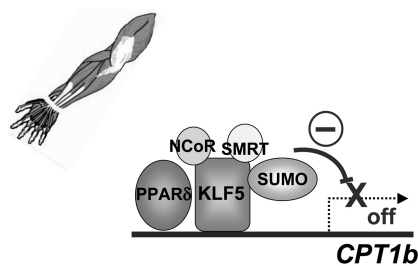


**Figure 4** Am80 inhibits neointimal formation in injured artery. A cuff-injury model in mouse aorta (A) and a stenting model in rabbit femoral artery (B).

硬化，再狭窄の形成に関与する。われわれの研究は，メタボリックシンドロームから心血管病へ至る過程，すなわち代謝異常と心血管組織再構築の分子機序を遺伝子転写の観点から解析するうえで，重要な視点を提供するものと考えられる。

## 文 献

- 1) Nagai R, Larson DM, Periasamy M: Characterization of a mammalian smooth muscle myosin heavy chain cDNA clone and its expression in various smooth muscle types. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 1047–1051.
- 2) Nagai R, Kuro-o M, Babij P et al: Identification of two types of smooth muscle myosin heavy chain isoforms by cDNA cloning and immunoblot analysis. *J Biol Chem*, 1989, **264**: 9734–9737.
- 3) Kuro-o M, Nagai R, Tsuchimochi H et al: Developmentally regulated expression of vascular smooth muscle myosin heavy chain isoforms. *J Biol Chem*, 1989, **264**: 18272–18275.
- 4) Kuro-o M, Nagai R, Nakahara K et al: cDNA cloning of a myosin heavy chain isoform in embryonic smooth muscle and its expression during vascular development and in arteriosclerosis. *J Biol Chem*, 1991, **266**: 3768–3773.
- 5) Aikawa M, Sivam PN, Kuro-o M et al: Human smooth muscle myosin heavy chain isoforms as molecular markers for vascular development and atherosclerosis. *Circ Res*, 1993, **73**: 1000–1012.
- 6) Suzuki J, Isobe M, Aikawa M et al: Nonmuscle and smooth



## Reduced $\beta$ oxidation

**Figure 5** SUMOylated KLF5 in skeletal muscle represses expression of fatty acid metabolism-related genes. However, when deSUMOylated in the presence of PPAR  $\delta$  agonist, KLF5 induces those genes.

muscle myosin heavy chain expression in rejected cardiac allografts. A study in rat and monkey models. *Circulation*, 1996, **94**: 1118–1124.

- 7) Hiroi J, Kimura K, Aikawa M et al: Expression of a nonmuscle myosin heavy chain in glomerular cells differentiates various types of glomerular disease in rats. *Kidney Int*, 1996, **49**: 1231–1241.
- 8) Aikawa M, Sakomura Y, Ueda M et al: Redifferentiation of smooth muscle cells after coronary angioplasty determined via myosin heavy chain expression. *Circulation*, 1997, **96**: 82–90.
- 9) Manabe I, Kurabayashi M, Shimomura Y et al: Isolation of the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb/NMHC-B) gene and characterization of its 5'-flanking region. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **239**: 598–605.
- 10) Shiojima I, Aikawa M, Suzuki J et al: Embryonic smooth muscle myosin heavy chain SMemb is expressed in pressure-overloaded cardiac fibroblasts. *Jpn Heart J*, 1999, **40**: 803–818.
- 11) Watanabe N, Kurabayashi M, Shimomura Y et al: BTEB2, a Krüppel-like transcription factor, regulates expression of the SMemb/Nonmuscle myosin heavy chain B (SMemb/NMHC-B) gene. *Circ Res*, 1999, **85**: 182–191.
- 12) Kawai-Kowase K, Kurabayashi M, Hoshino Y et al: Transcriptional activation of the zinc finger transcription factor BTEB2 gene by Egr-1 through mitogen-activated protein kinase pathways in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1999, **85**: 787–795.
- 13) Hoshino Y, Kurabayashi M, Kanda T et al: Regulated expression of the BTEB2 transcription factor in vascular

- smooth muscle cells: analysis of developmental and pathological expression profiles shows implications as a predictive factor for restenosis. *Circulation*, 2000, **102**: 2528–2534.
- 14) Shindo T, Manabe I, Fukushima Y et al: Krüppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling. *Nat Med*, 2002, **8**: 856–863.
  - 15) Miyamoto S, Suzuki T, Muto S et al: Positive and negative regulation of the cardiovascular transcription factor KLF5 by p300 and the oncogenic regulator SET through interaction and acetylation on the DNA-binding domain. *Mol Cell Biol*, 2003, **23**: 8528–8541.
  - 16) Aizawa K, Suzuki T, Kada N et al: Regulation of platelet-derived growth factor- $\alpha$  chain by Krüppel-like factor 5: new pathway of cooperative activation with nuclear factor- $\kappa$ B. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 70–76.
  - 17) Oishi Y, Manabe I, Tobe K et al: Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metab*, 2005, **1**: 27–39.
  - 18) Fujiu K, Manabe I, Ishihara A et al: Synthetic retinoid Am80 suppresses smooth muscle phenotypic modulation and instant neointima formation by inhibiting KLF5. *Circ Res*, 2005, **97**: 1132–1141.
  - 19) Oishi Y, Manabe I, Tobe K et al: SUMOylation of KLF5 acts as a molecular switch determining the activity of PPAR $\delta$ -containing transcriptional complexes that regulate lipid metabolism. *Nat Med*, 2008, **14**: 656–666.
  - 20) Takeda N, Manabe I, Shindo T et al: Synthetic retinoid Am80 reduces scavenger receptor expression and atherosclerosis in mice by inhibiting IL-6. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26**: 1177–1183.

## KLF5, a Key Transcriptional Factor that Regulates Cardiovascular Remodeling and Metabolic Syndrome

Ryozo Nagai

Department of Cardiovascular Medicine, University of Tokyo Graduate School of Medicine, Tokyo, Japan

**Key words:** KLF5, cardiovascular remodeling, metabolic syndrome

The Krüppel-like factor (KLF) family plays a critical role in cell differentiation, proliferation, oncogenesis or tissue remodeling in many diseases. We previously reported that KLF5 is an important transcription factor in cardiovascular remodeling such as cardiac hypertrophy, atherosclerosis, and restenosis that occurs following angioplasty. We analyzed the molecular function of KLF5 and its cofactors in cardiovascular and metabolic systems, both of which are continuously exposed to varieties of stress. In vascular smooth muscles, KLF5 is induced by growth factors and angiotensin II and transactivates the PDGF- $\alpha$  gene, which is coactivated by P300/CBP and RAR $\alpha$ -RXR complex or co-suppressed by histone chaperon SET. In adipose tissue, a complex of KLF5 with C/EBP induces adipocyte differentiation by activating the PPAR $\gamma$  gene. In skeletal muscle, on the other hand, KLF5 trans-suppresses genes involved in fatty acid metabolism such as UCP and CPT1b; however, this suppression is diminished when KLF5 is desumoylated. Finally KLF5+/- mice *in vivo* were attenuated in atherosclerosis induced by vascular injury and in obesity or glucose intolerance caused by a high-calorie diet. We conclude that the functional interaction of KLF5 with its cofactors and posttranslational modification of KLF5 in a tissue-dependent manner play a pivotal role in energy metabolism as well as in the pathogenesis of cardiovascular disease. We suggest that cofactors of KLF5 constitute a new therapeutic target.

(J Jpn Coll Angiol, 2008, **48**: 179–183)