

〔総説〕

## 下垂体幹・前駆細胞にも発現している腫瘍抑制と分化に機能する Kruppel-like 型転写因子 KLF6 について

上春 浩貴<sup>1\*</sup>・加藤たか子<sup>2,3)</sup>・加藤 幸雄<sup>1,3,4)</sup>

(2014年3月23日受理)

### Expressing Kruppel-like transcription factor KLF6 in the pituitary stem/progenitor cells

Hiroki UEHARU, Takako KATO and Yukio KATO

#### Abstract

KLF6 is a member of Kruppel-like factor (KLF) family that contains three highly conserved Cys2/His2-type zinc finger domains in the C-terminal region. KLF6 regulates a number of target genes as an activator and a repressor by binding to cognate GC-boxes or CACCC elements of the TATA-less gene promoters. It is known to play a role in tumor suppression, cell proliferation and differentiation, among others. Recently, we found that KLF6 appears in the postnatal rat pituitary stem/progenitor cells that express *Sox2* and *Prrx2*. This finding led us to the novel role of KLF6 in maintenance and/or resource of the pituitary cells. In this paper, we review recent studies on KLF6 to better understanding the role of KLF6 in pituitary organogenesis.

**要旨** KLF6は、ショウジョウバエの形態形成遺伝子 *Kruppel* に相同性を持つ遺伝子ファミリーのメンバーで、C末端領域に3つの良く保存された Cys2-His2 型の Zn フィンガードメインを有する転写因子である。KLF6は、多くの遺伝子を標的として発現制御に関与しており、TATA-box を欠いた遺伝子のプロモーター上の GC ボックスあるいは CACCC 配列に結合する。KLF6は転写の活性化因子としても抑制因子としても働き、がん抑制、細胞増殖、分化などに機能することが知られている。最近、我々は、*Sox2* と *Prrx2* を発現する生後のラット下垂体の幹・前駆細胞に、KLF6 が出現することを発見した。この結果は、KLF6 が下垂体を構成する細胞の維持管理や供給に関わるという下垂体研究の新たな展開になると期待している。本総説では、下垂体も含めた最近の KLF6 の研究を概説し、今後の下垂体における KLF6 の研究を展望したい。

#### 1. はじめに

下垂体は多くのホルモンを合成・分泌する組織として、全ての脊椎動物に備わっている重要な内分泌組織であり、個体の一生を通じてその機能を維持している。この組織は、前葉、中葉、後葉から構成されており、出生直前までにほぼ全てのホルモン産生細胞が出現する。こうした分化の過程に関わる分子レベルの出

<sup>1)</sup> 明治大学大学院農学研究科 214-8571 神奈川県川崎市東三田 1-1-1

<sup>2)</sup> 明治大学研究知財戦略機構 214-8571 神奈川県川崎市東三田 1-1-1

<sup>3)</sup> 明治大学生殖内分泌研究所 214-8571 神奈川県川崎市東三田 1-1-1

<sup>4)</sup> 明治大学農学部 214-8571 神奈川県川崎市東三田 1-1-1

\* E-mail: hueharu0113@gmail.com; TEL: 044-934-7035; Fax: 044-934-7035

来事は、本誌に述べてきた総説を参照されたい (大砂 まるみら. 2010; 加藤幸雄ら. 2009; 菅野尚子ら. 2013; 諏佐崇生ら. 2007; 陳黙ら. 2012; 中山美智 枝ら. 2008; 八子英司ら. 2013; 吉田彩舟ら. 2013)。我々の最近の主要な関心は、どの様にホルモン産生細胞が分化するのか、下垂体という組織が生涯を通じてどの様に維持されているのかということである。他の組織で相次いで報告されている幹・前駆細胞と同じで、この組織独特の下垂体幹・前駆細胞がその中心にあることには間違いない。このことは、これまでに幾つかの報告をしてきた (Chen *et al.* 2013a; Higuchi *et al.* 2013; Higuchi *et al.* 2014; Susa *et al.* 2012; Yako *et al.* 2013; Yoshida *et al.* 2009; Yoshida *et al.* 2011; Yoshida *et al.* 2013)。最近、我々は、下垂体で同定した PRRX1 (以降、タンパク質は正体で、遺伝子は斜体で示す) と PRRX2, そして幹・前駆細胞との解析から、Kruppel-like factor family に属する KLF6 が、生後に PRRX2 陽性の下垂体幹・前駆細胞に存在することを発見した (Ueharu *et al.* 2014)。同族の KLF4 が、iPS 細胞へのリプログラミングに重要な因子として良く知られているが (Takahashi & Yamanaka 2006), これまで、主に Tumor suppressor として取り上げられてきた KLF6 では、幹・前駆細胞での役割に関する報告はない。本総説では、KLF6 がどのような分子で、どのような機能を担っているのかを述べ、その中で、我々の研究による新知見を紹介したい。

## 2. KLF6 の遺伝子とタンパク質

### 1) KLF ファミリーと KLF6 の同定

KLF6 は、ショウジョウバエの体節形成の制御遺伝子として同定された転写因子 Kruppel に相同性を持つ遺伝子ファミリー (KLF ファミリー) (Schuh *et al.* 1986) の一つとして発見された。KLF ファミリーは、マウスとヒトでは17の遺伝子群から構成されている (Andreoli *et al.* 2010; Suske *et al.* 2005; van Vliet *et al.* 2006)。

KLF6 は 6 番目に発見された因子で、胎盤細胞において、Pregnancy-specific glycoprotein (*Psg*) の制御

因子として発見された (Koritschoner *et al.* 1997)。Klf6 の発現は、ヒトやマウスの胎盤で非常に高いことから、妊娠期に胎盤の栄養膜の発達と免疫特権に関する研究や胎性がん抗原に関連する研究が行われてきた。その他、がん組織での発現も多く認められ、腫瘍抑制遺伝子としての研究も多い (Andreoli *et al.* 2010)。

### 2) 遺伝子とタンパク質の構造

Klf6 は、ヒトでは10番染色体に位置している。プロモーター領域には TATA-box がなく、4つのエクソンと3つのイントロンから構成される (図 1A)。この遺伝子は、選択的スプライシングにより、9つのアイソフォームが生成するが、ヒトの生体内ではスプライシングがない全長のものと、3種類のスプライシングバリエント (それぞれ、SV1, SV2, SV3) のタンパク質が合成される (図 1B) (Narla *et al.* 2005)。このスプライシングバリエントは、現在のところマウスやラットには確認されていない。

KLF6 と KLF7 は、DNA 結合ドメインの47アミノ酸残基が共通していることから、同じサブグループとして分類されているが、活性化領域内のセリン/スレオニンに富むドメイン (Thr/Ser ドメイン) 領域のアミノ酸配列はかなり異なっている。両者は、*p21* の転写を活性化するなど同じ活性を示す。しかし、両者の最も違う点は発現する組織である。胎盤で高い発現を示す *Klf6* に対して、*Klf7* は神経組織に限定した発現を示している (Pearson *et al.* 2008)。

KLF6 は、283のアミノ酸からなり、N 末端領域には酸性アミノ酸に富むドメイン (酸性ドメイン)、中央部に Ser/Thr ドメイン、C 末端領域には3つのジンクフィンガードメイン (ZF ドメイン: ZF1, ZF2, ZF3) が存在する (図 1B)。それぞれのドメインは、転写活性化、リン酸化修飾、DNA 結合の役割を担っている。中央に存在する Ser/Thr ドメインはリン酸化の標的となり、S6K1 キナーゼが関わったリン酸化修飾により、*Tgfb* の転写促進に関与している (Lee *et al.* 2006)。上述の3種のバリエントの構造は、SV1 では Ser/Thr ドメインの一部、核移行シグナル (nuclear localization signal: NSL), ZF1-3 が、SV2 では NLS と ZF1 が、SV3 では ZF2 と ZF3 が欠落し

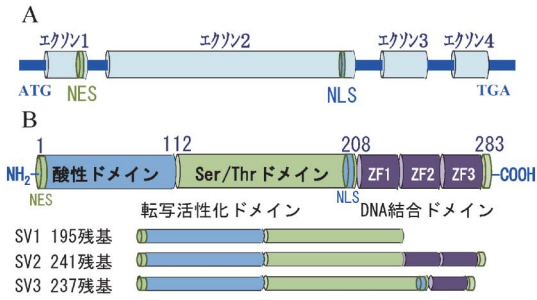


図1 KLF6の遺伝子とタンパク質構造の模式図。(A) *Klf6* 遺伝子が4つのエクソンからなる。(B) KLF6タンパク質の機能ドメインの分布を示した。NESはNuclear export signalで、NLSはNuclear localization signalである。C末端側には3つのZFドメイン(ZF1, ZF2, ZF3)が存在する。KLF6には、3種のスプライシングバリエーション(SV1, SV2, SV3)が存在する。文献(Andreoli *et al.* 2010)の図を改変した。

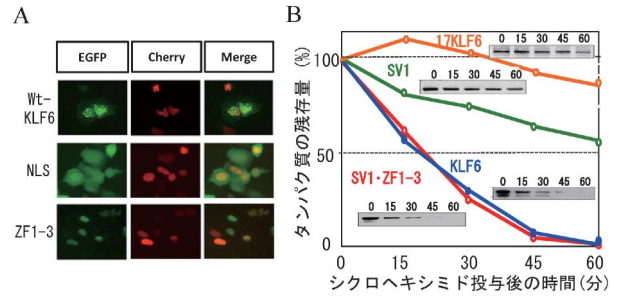


図2 KLF6の新たな核移行シグナル(NLS)の同定とタンパク質安定性。(A) 蛍光タンパク質融合KLF6を用いて、ZFドメイン内に新たな核移行シグナルを同定した。上から、蛍光標識ワイルドタイプKLF6、蛍光標識NLS、蛍光標識ZF1-3(図1のZF1, ZF2, ZF3の領域)の発現ベクターを細胞に導入して調べている。KLF6とその誘導体(左)、核に存在するCherry H2Aタンパク質の蛍光(中)、両者を重ね合わせた像(右)。(B) KLF6(青)、SV1(緑)、SV1-ZF1-3(赤)およびNESを欠失した17KLF6(橙)の細胞内での安定性を調べたもの。シクロヘキシミドでタンパク質合成を停止させた後に、残存量を調べている。文献(Rodriguez *et al.* 2010)の図を改変した。

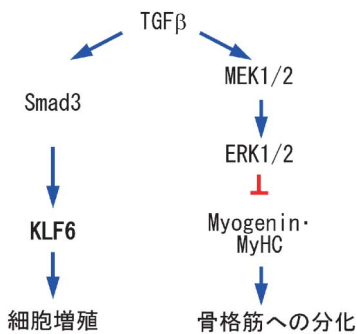


図3 TGFβシグナルによる細胞増殖と骨格筋への分化阻害。TGFβはMEK1/2とERK1/2を介して骨格筋への分化を抑制する一方で、SMAD3とKLF6を増加させて細胞増殖を促進する。文献(Dionyssiou *et al.* 2013)の図を改変した。

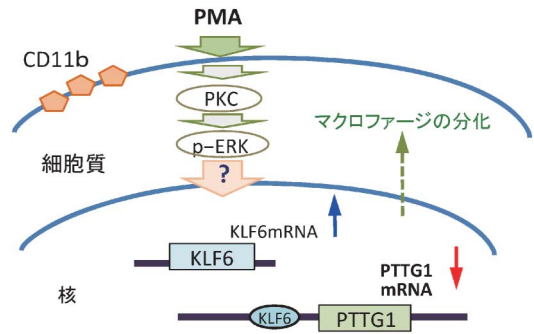


図4 PMA刺激によるマクロファージ分化の細胞内機構。ホルボールエステルPMAの刺激により *Klf6* の転写が促進され、増加したKLF6が *Pttg1* のプロモーター上の結合部位に作用して、*Pttg1* mRNA量を低下させることで、マクロファージへの分化が進行することが分かった。図中の↑と↓はそれぞれ増加と低下を示している。文献(Chen *et al.* 2013b)の図を改変した。

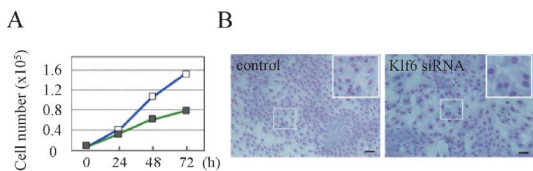


図5 KLF6による *Prrx2* の発現促進を介する細胞増殖促進。(A) 下垂体由来の株化細胞TtT/GFを用いて、*Klf6* mRNAのsiRNA処理(■)のものと、コントロール(□)について細胞増殖速度を計測した。*Klf6* mRNAのsiRNAによるノックダウンにより、細胞増殖速度が有意に低下した。(B) 72時間培養後培養開始後の細胞について、コントロール(左)と *Klf6* siRNA処理(右)の核をDiffQuikで染色した後、明視野の光学顕微鏡像を観察した。枠で囲った一部を図中に拡大して示してある。スケールバーは100 μm。日本繁殖生物学会の許諾のもと、文献(Ueharu *et al.* 2014)より転載した。

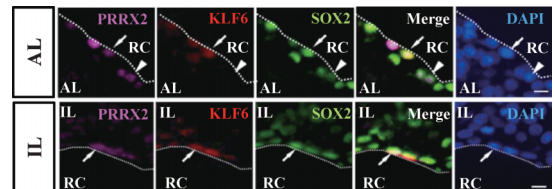


図6 生後のラット下垂体のKLF6の免疫組織化学像。KLF6(赤)と、幹・前駆細胞マーカーであるSOX2(緑)およびPRRX2(紫)の抗体を用いた3重染色を行っている。右端には、核の染色像(DAPI)を示してある。前葉(AL)、中葉(IL)を挟んで存在する、ラトケの遺残腔との境(Marginal Cell Layer)を点線で示した。矢頭はSOX2とPRRX2の二者にのみ陽性の細胞を、矢印はKLF6, SOX2とPRRX2の三者に陽性の細胞を指している。スケールバーは10 μm。日本繁殖生物学会の許諾のもと、文献(Ueharu *et al.* 2014)より転載した。

た構造である。

蛍光タンパク質 EGFP を融合させた KLF6 を用いて、各ドメインの役割を調べた実験がある (Rodriguez *et al.* 2010)。核-細胞質間分子輸送に関わる核エクスポートシグナル (nuclear export signal; NES) が酸性ドメインの N 末端側 16 アミノ酸残基に存在し、核内への蓄積がトランスポータータンパク質エクスポート依存的に促進された。一方、核への移行には、従来に報告されていた核移行シグナル NLS に加えて、ZF ドメインの中にも存在するというを示している (図 2A)。KLF6 は、標的遺伝子であるサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 *p21* や、細胞間の接着に関わる E-カドヘリン (*Cdh1*) の転写を促進するが、ZF1-3 を欠く SV1 はその能力がない。このことは、核移行能の欠除によると説明できる。KLF6 は NES や ZF ドメイン領域の欠失によりその安定性が増すことから (図 2B)、2 つのドメインが KLF6 の不安定化に寄与していることも分かった。

### 3) KLF6 の相互作用因子

KLF ファミリーは、コリプレッサー分子との相互作用を介して転写制御を行っていることが知られている。KLF6 では、以前から知られている転写因子 SP1, KLF4, p53 など (Andreoli *et al.* 2010) に加えて、ここ数年、c-SRC (Liu *et al.* 2010), LCOR (Calderon *et al.* 2012), GSK3 $\beta$  (Lang *et al.* 2013), RUNX1-ETO9a (DeKolver *et al.* 2013) などと相互作用することが報告されている。こうした多様な因子との相互作用を通じて、ユビキタスに存在するとされる KLF6 が、それぞれの組織や細胞で必要とされる機能を担っているのかも知れない。最近、Vetter らは、KLF6 のバリエーション SV1 が、全長の KLF6 と相互作用して、KLF6 の分解を促進することを報告している (Vetter *et al.* 2012)。後述する、がん細胞で発現が認められている SV1 の機能の分子機序を考える上で興味深い。

## 3. KLF6 の機能

KLF6 の機能については、総説 (Andreoli *et al.* 2010) に多くがまとめられており、ここではその後報告されたものについて紹介していく。

### 1) KLF6 の標的遺伝子

KLF6 は、プロモーター領域に TATA-box が無い遺伝子上の、CCNCCCN をコンセンサス配列とする GC-box や CACCC など、GC に富む配列に結合して、各種の遺伝子の発現を制御している。その制御因子としてこれまでに、*Psg*, *p21*, *Tgfb*, *TgfbR1* および *2*, *Dlk1* などが知られている (総説 (Andreoli *et al.* 2010) を参照)。最近では、神経系の分化に関わる *Tuba1a* (チューブリン  $\alpha 1a$ ) (Veldman *et al.* 2010)、がん組織で発現している *Pttg1* (Lee *et al.* 2010)、*p21* (Calderon *et al.* 2012)、急性白血病における *Alox5* (DeKolver *et al.* 2013)、脈管損傷に関与する *Alk1* (Garrido-Martin *et al.* 2013) などの発現制御に関する報告がある。

### 2) 腫瘍抑制遺伝子としての KLF6

これまでの研究から、*Klf6* の変異がヒトの悪性腫瘍様の前立腺がん、神経膠芽腫、結腸がん、肝細胞がんに関与するということから、KLF6 は Tumor suppressor と考えられている (Andreoli *et al.*, 2010)。KLF6 は *p21* プロモーターに直接結合して活性化し、p53 非依存的に細胞周期の抑制を行う機能を持つために、*Klf6* の変異は増殖を引き起こすことになり、がん細胞の増殖となる。一方、フォルボールエステルなど、発がんや細胞増殖の引き金となる物質によっても、*Klf6* の転写は活性化される。KLF6 は c-Jun のプロテアソーム依存的分解を促進し、結果として細胞増殖の速度は減速される。そのため、*Klf6* 発現細胞では、フォルボールエステルによる細胞増殖作用は打ち消されることになる。こうした KLF6 の役割について、Andreoli らは総説 (Andreoli *et al.* 2010) の中で、「KLF6 の増加は、がん細胞の増殖に導く刺激に対する、一種の警告信号である」と表現している。この増殖と Tumor suppression に関しては総説に譲るが、バリエーション SV1 に関する最近の報告は興味深い。

バリエーション SV1 は Ser/Thr-ドメインの一部と ZF ドメインを欠くために、同じく DNA 結合領域が欠落した SV3 とともに、核への移行ができない。一方、SV2 では核移行シグナルが残っている (図 1B)。SV1 と SV2 は細胞質に存在しており、*p21* の活性化

は起こらない。SV1 のサイレンシングは前立腺がんでの有意な細胞増殖と関連しているのに対し、SV2 のそれでは増殖は起こらない。一方で、SV2 によって *p21* の活性化が p53 依存的に起こることが観察されている (Hanoun *et al.* 2010)。さらに興味深いことに、SV1 の発現が種々のがん組織で報告されており、SV1 が全長 KLF6 に対し、ドミナントネガティブに作用することが示唆されている (Andreoli *et al.* 2010)。では、どの様に SV1 が全長 KLF6 の機能を押さえているのかという点は、不明であった。ところが、2012年になって Vetter らは、興味深い結果を報告している (Vetter *et al.* 2012)。彼らは、ヒト胎児腎細胞由来の HEK293T 細胞株に KLF6 と SV1 を共存させることで、SV1 が KLF6 との相互作用を介して、KLF6 を分解していることを示した。SV1 が KLF6 の機能を代償的に阻害するのではなく、複合体を形成して分解系に導いていることになる。

### 3) アポトーシスと KLF6

肺上皮細胞：インフルエンザ感染では、iNO 合成酵素 (iNOS) が誘導され NO が増加し、アポトーシスを引き起こして局所的な炎症が増長され、重症の肺炎となることがある。この際の *iNos* の発現誘導が KLF6 によることを示唆した報告がある (Mgbemena *et al.* 2012; Mgbemena *et al.* 2013)。肺上皮細胞で siRNA による *Klf6* のノックダウンを行うと、急激な *iNos* 発現抑制による NO の産生低下が起こり、アポトーシスが抑制される。同じことは、iNOS 阻害剤処理や、*iNos* ノックアウトマウスでも確認された。

糸球体メサンギウム細胞：半分解性 C5b-9 は、ストレスのシグナル応答として *Atf3* の発現を促進し、Thy-1 腎炎の開始および進行に関与するアポトーシスを引き起こす。その機序は、ATF3 が、直接的に growth arrest and DNA damage-45 alpha (*Gadd45α*) の発現を、間接的に *Klf6* の発現を、それぞれ大幅に増加させることによることが報告された (Liu *et al.* 2012)。

### 4) 損傷と KLF6

シュワン細胞：損傷した座骨神経で *Klf6* の転写とタンパク質合成が促進され、KLF 陽性細胞では同時

にシュワン細胞のマーカーである *SI00* と *p75NTR* が発現していることが確認された (Gui *et al.* 2013)。初代培養シュワン細胞やその系譜の株化細胞に、アポトーシスの誘導因子である TNF $\alpha$  とシスプラチンを作用させると、*Klf6* の発現が促進された。*Klf6* の過剰発現は、アポトーシスをさらに亢進させたが、アポトーシス制御因子である *Bcl2* や *Bax* は変化しなかった。さらに、KLF6 は損傷後にアポトーシス亢進因子 *Fas*, *Tnf*, *Tnfsf12*, *Pycard* の転写を活性化させ、抗アポトーシス因子 *IL10* のそれを抑制して、アポトーシスを促進させることも示された (Gui *et al.* 2013)。

臍静脈内皮細胞：血管損傷が起こると、KLF6 は核に移行し、血管新生に関わるアクチンビン受容体様キナーゼ 1 (*Alk1*) の発現が、急激に上昇する。*Klf6* をノックダウンすると臍静脈内皮細胞の *Alk1* 発現は低下すること、また、*Klf6*<sup>+/-</sup> マウスでは *Alk1* が低レベルであることが確認された (Garrido-Martin *et al.* 2013)。その制御には、KLF6 と SP1 が協調的に *Alk1* プロモーターに作用していることも確認された。血管平滑筋細胞では、損傷によって内皮細胞から放出される IL6 の様な液性因子に応答して *Alk1* の活性化が起こることから、内皮と平滑筋細胞間の傍分泌によるコミュニケーションが存在することが示された (Garrido-Martin *et al.* 2013)。

## 4. 組織形成・細胞分化の制御因子としての KLF6

これまでに、KLF6 の示す Tumor suppressor としての機能が多く取り上げられてきたが、最近では、組織形成・細胞の分化に関わる研究が報告されており、以下に紹介する。

### 1) 細胞栄養芽層の分化

Racca らは、栄養芽層細胞融合化 (trophoblast syncytialization) の分化過程における KLF6 の機能について調べている (Racca *et al.* 2011)。その過程では、核および細胞質において、KLF6 の転写物とタンパク質量は初期に最大となっていたが、細胞局在の変化は見られなかった。栄養芽細胞由来の JEG-3 細胞で *Klf6* を過剰発現させると、KLF6 の核内移行と

共に、栄養芽層細胞融合化過程で機能しているヒト絨毛性ゴナドトロピンβ鎖およびPsgの発現促進が確認されたことから、胎盤におけるKLF6は、分化の促進に働いていることが示唆された。

## 2) 筋原細胞の分化

KLF6は、SMAD3-SP1-KLF6複合体を介してTgfβの転写を活性化させ、そのTGFβがKlf6を促進するという、相互の制御関係が知られている(Botella *et al.* 2002; Botella *et al.* 2009)。最近、筋原細胞の増殖と分化の解析から、TGFβは、SMAD3とKLF6のタンパク質レベルでの増加を引き起こすことで筋原細胞の増殖を促進する一方で、MEK/ERK (1/2) シグナル経路を活性化して、MyogeninやミオシンH鎖遺伝子の発現を押さえて分化を抑制していることが示された(図3)(Dionyssiou *et al.* 2013)。この制御系では、神経細胞の生存に重要なMEF2(Salma & McDermott 2012)が働くことが予想される。しかし、MEF2は、Klf6プロモーター上に存在するMEF2結合配列を介した制御に関与しないとされる。

## 3) 白血球の分化

ヒトのがん組織や造血組織悪性腫瘍では、オンコジーンであるPituitary Tumor-Transforming Gene 1(Pttg1)が高発現しているが、正常な白血球では発現が認められないほどに発現量が低いことが知られている。このことから、Pttg1の過剰発現による骨髄細胞の分化の修飾と、白血病誘発との観点で行われた実験の報告がある(Chen *et al.* 2013b)。未分化な白血病細胞株を、単核白血球およびマクロファージの分化誘導剤であるホルボール 12-ミリスタート 13-アセタート(Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)で処理すると、骨髄の分化マーカーであるCd11bの発現が増加し、Pttg1のそれは低下して、骨髄細胞への分化が確認された。その機序は、PMA刺激によりKlf6の転写が促進され、Pttg1プロモーターの転写開始点-247/-406bの領域にKLF6が結合し、その発現を抑制するものであった。従って、KLF6は、まさにTumor suppressorとしてPttg1の発現を抑えることで、分化の方向を維持しているということになる(図4)。

## 4) 骨髄細胞の分化

Klf6<sup>-/-</sup>マウスは胎生12.5日までに致死となり、造血低下と卵黄囊の血管形成の発達が貧弱な状態を示していた。また、血管形成に関わる転写因子SclとGata1のmRNA量は80%も低下していた。Klf6<sup>-/-</sup>のES細胞を作製して調べた実験では、胎仔と同じように、Brachyury, Klf1, Gata1などの発現遅延とともに、有意な造血系分化の欠損、胚体外胚葉様細胞状態の延長、中胚葉誘導の遅延などが観察された。一方、Klf6を過剰発現すると、もとのように造血系の分化能を回復させたことから、KLF6がES細胞の分化と血管形成に機能していることが示された(Matsumoto *et al.* 2006)。

## 5) 内胚葉組織の分化

Klf6<sup>-/-</sup>マウスは、造血機能や血管新生に欠陥を生じ、肝臓が形成されないことが既に報告されているが(Matsumoto *et al.* 2006)、血管と肝臓の形成の間にある密接な関係には不明な点が残っている。マウスのKlf6<sup>-/-</sup>ES細胞を調べると、内胚葉のマーカーであるHnf3β, Gata4, Sox17, Cxcr4の発現がなく、一方、Klf6を過剰発現させたES細胞ではそれらの発現促進が認められた(Zhao *et al.* 2010)。

より短時間で、発生や分化を解析できるゼブラフィッシュを用いて、KLF6(ゼブラフィッシュではCOPEB)の内胚葉指定と肝形成に関する機能を解析した実験が行われている(Zhao *et al.* 2010)。Copebは発生過程で消化器系の組織に発現が高いが、Copebのノックダウンを行うと、肝臓、膵臓、腸の拡張は低下したが、それぞれの臓器の構成や分化には影響がなかった。肝臓での細胞増殖の低下は、細胞周期の阻害因子p21の活性化によって引き起こされていた。これらの結果は、KLF6/COPEBが内胚葉系組織の発達に重要なことを示している。

## 5. ノンコーディングRNAによるKLF6の調節

近年は、DNAのメチル化などのエピジェネティック制御や、低分子RNAによる遺伝子の発現制御などが盛んに報告されている。ノンコーディングRNA

(ncRNA) の中でも、長さ20から25塩基ほどの RNA である microRNA (miRNA) と、KLF6 が関連する報告が散見されるので、簡略に紹介する。

KLF6 が脂肪細胞の分化や、非アルコール性脂肪性肝疾患の代謝異常を促進することが知られている。後者の代謝異常では、miR-10b の転写が KLF6 によって抑制されるために、miR-10b による *Ppar $\alpha$*  mRNA の翻訳抑制が減少して、PPAR $\alpha$  タンパク質が増加することで、PPAR $\alpha$  のシグナル系が活性化されることが示された (Bechmann *et al.* 2013)。正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた糖尿病血管障害のモデル実験からは、miR-181c, miR-15a, miR-20b, miR-411, miR-659, miR-126, miR-510 の標的遺伝子の一つに *Klf6* があるという (Zitman-Gal *et al.* 2014)。また、損傷を受けた運動神経では、miR-124 が減少し、一方で *Klf6* と *Stat3* の mRNA が増加して、神経の修復が起こっているとの報告がある (Nagata *et al.* 2014)。慢性腎臓病で見られる遺伝子発現と miRNA の解析では、*Klf6* との関連が推測されている (Zawada *et al.* 2013)。その他にも、miR-122a の標的が *Klf6* mRNA であり、肝臓の恒常性維持と肝がん発症に関連するとの報告や (Tsai *et al.* 2012)、胃において、miR-181 が *Klf6* を標的として発がん因子として働くとの報告もある (Zhang *et al.* 2012)。

下垂体組織において、ノンコーディング RNA による *Klf6* の制御の報告はないが、下垂体腫瘍との関連の研究が行われており (Gadelha *et al.* 2013)、今後の展開が期待される。

## 6. 下垂体における KLF6

下垂体とは生体の恒常性の維持に関与するホルモンを分泌する内分泌器官であり、この組織の発生と分化には数多くの転写因子が関与しており、それらを発現する下垂体の幹・前駆細胞については複数の総説に詳しく述べられている (Brinkmeier *et al.* 2009; Davis *et al.* 2010; Vankelecom & Gremeaux 2010; Vankelecom 2012; Watkins-Chow & Camper 1998; Zhu & Rosenfeld 2004; Zhu *et al.* 2007)。筆者らの研究室でも、下

垂体の幹・前駆細胞の同定とその性質について報告してきた (Susa *et al.* 2012; Yoshida *et al.* 2009; Yoshida *et al.* 2013)。ごく最近では、コクサッキーウイルス・アデノウイルス受容体 (Coxsackievirus-Adenovirus Receptor; CAR) が、幹細胞ニッチを形成して、分裂しながら下垂体の細胞供給に機能していることを報告している (Chen *et al.* 2013a)。さらに、下垂体で新たに同定された転写因子 PRRX1 と PRRX2 が下垂体の幹・前駆細胞に存在することも報告している (Higuchi *et al.* 2013)。PRRX1 と PRRX2 は、間葉系組織の分化に関わる転写因子として発見され (Bergwerff *et al.* 1998)、機能は相互補完的であるとの報告があるが、機能の差異は明確になってない。しかし、下垂体で発現時期と局在を調べると、PRRX1 の出現が胎仔期からなのに対して、PRRX2 のそれは生後の幹・前駆細胞に局在することが判った (Higuchi *et al.* 2014)。筆者らは、この発現の違いを分子レベルで明らかにするべく、ラット下垂体の発生初期から成熟期に亘って発現する遺伝子のマイクロアレイ解析をもとに、種々の転写因子によるプロモーターアッセイを行った。

その結果、特に、*Prrx1* には影響を与えずに、*Prrx2* の発現を制御する因子として KLF6 を同定した。さらに、組換え体 KLF6 を使って *Prrx2* の転写開始点上流域に結合すること、*Prrx1*, *Prrx2*, *Klf6* が発現する細胞を使って、siRNA を導入する *Klf6* mRNA のノックダウンにより、*Prrx1* は影響を受けないが、*Prrx2* mRNA が有意に低下し、細胞の増殖速度が低下する (図5) ことを確認した (Ueharu *et al.* 2014)。さらに、KLF6 と幹・前駆細胞マーカーとの二重染色により下垂体の免疫組織化学を行ったところ、KLF6 は PRRX2 と SOX2 に陽性の細胞のみに存在する (図6) ことが確認された (Ueharu *et al.* 2014)。この KLF6 陽性細胞が、生後の下垂体幹・前駆細胞の候補の一つとして浮かび上がった。ラットでは KLF6 のアイソフォームの報告がないが、それを含めて、下垂体における発現の時期や推移、機能など、今後調べることが多い。

## 7. おわりに

本総説は、ユビキタスに存在すると言われている KLF6 が、生後の下垂体組織の幹・前駆細胞にのみ特異的に存在しているという実験結果をもとに、KLF6 に関するこれまでの研究を調べてまとめたものである。KLF6 は、細胞周期に関わる因子の調節機能を通じて腫瘍抑制遺伝子としての役割を担っていると考えられてきたが (図 3)、一方で、分化に関わる報告 (図 4) も相次いでいる。がん細胞と幹・前駆細胞といった性質の異なる細胞で KLF6 が機能するには、異なる制御因子の介在と機序が存在すると考えられる。我々の下垂体の研究では、KLF6 が、この組織の幹・前駆細胞の維持や分化に機能している可能性を示しており、今後、他の組織で報告されているような制御機構が、下垂体でどの様になっているかを明らかにすることが今後の課題である。下垂体での KLF6 の機能解析によって、そこに介在する未知の因子とそれらの機能が明らかになることを期待している。

## 文 献

Andreoli V, Gehrau RC and Bocco JL: Biology of Krüppel-like factor 6 transcriptional regulator in cell life and death. *IUBMB Life*, 79 Suppl 3: 896-905. 2010.

Bechmann LP, Vetter D, Ishida J, Hannivoort RA, Lang UE, Kocabayoglu P, Fiel MI, Munoz U, Patman GL, Ge F, Yakar S, Li X, Agius L, Lee YM, Zhang W, Hui KY, Televantou D, Schwartz GJ, LeRoith D, Berk PD, Nagai R, Suzuki T, Reeves HL and Friedman SL: Post-transcriptional activation of PPAR alpha by KLF6 in hepatic steatosis. *J Hepatol*, 58: 1000-1006. 2013.

Bergwerff M, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC, van Iperen L, Meijlink F and Poelmann RE: Patterns of paired-related homeobox genes PRX1 and PRX2 suggest involvement in matrix modulation in the developing chick vascular system. *Development and Dynamics*, 213: 59-70. 1998.

Botella LM, Sanchez-Elsner T, Sanz-Rodriguez F, Kojima S, Shimada J, Guerrero-Esteso M, Cooreman MP, Ratziu V, Langa C, Vary CP, Ramirez JR, Friedman S and Bernabeu C: Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood*, 100: 4001-4010. 2002.

Botella LM, Sanz-Rodriguez F, Komi Y, Fernandez LA, Varela E, Garrido-Martin EM, Narla G, Friedman SL and Kojima S: TGF-beta regulates the expression of transcription factor KLF6 and its splice variants and promotes co-operative trans-

activation of common target genes through a Smad3-Sp1-KLF6 interaction. *Biochemical Journal*, 419: 485-495. 2009.

Brinkmeier ML, Davis SW, Carninci P, MacDonald JW, Kawai J, Ghosh D, Hayashizaki Y, Lyons RH and Camper SA: Discovery of transcriptional regulators and signaling pathways in the developing pituitary gland by bioinformatic and genomic approaches. *Genomics*, 93: 449-460. 2009.

Calderon MR, Verway M, An BS, DiFeo A, Bismar TA, Ann DK, Martignetti JA, ShalomB-arak T and White JH: Ligand-dependent corepressor (LCoR) recruitment by Krüppel-like factor 6 (KLF6) regulates expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor CDKN1A gene. *Journal of Biological Chemistry*, 287: 8662-8674. 2012.

Chen M, Kato T, Higuchi M, Yoshida S, Yako H, Kanno N and Kato Y: Cocksackievirus and adenovirus receptor-positive cells compose the putative stem/progenitor cell niches in the marginal cell layer and parenchyma of the rat anterior pituitary. *Cell and Tissue Research*, 354: 823-836. 2013a.

Chen PY, Yen JH, Kao RH and Chen JH: Down-regulation of the oncogene PTTG1 via the KLF6 tumor suppressor during induction of myeloid differentiation. *PLoS One*, 8: e71282. 2013b.

Davis SW, Castinetti F, Carvalho LR, Ellsworth BS, Potok MA, Lyons RH, Brinkmeier ML, Raetzman LT, Carninci P, Mortensen AH, Hayashizaki Y, Arnhold IJ, Mendonca BB, Brue T and Camper SA: Molecular mechanisms of pituitary organogenesis: In search of novel regulatory genes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 323: 4-19. 2010.

DeKaveler RC, Lewin B, Lam K, Komeno Y, Yan M, Rundle C, Lo MC and Zhang DE: Cooperation between RUNX1-ETO9a and novel transcriptional partner KLF6 in upregulation of Alox5 in acute myeloid leukemia. *PLoS Genet*, 9: e1003765. 2013.

Dionysiou MG, Salma J, Bevzyuk M, Wales S, Zakharyan L and McDermott JC: Krüppel-like factor 6 (KLF6) promotes cell proliferation in skeletal myoblasts in response to TGFbeta/Smad3 signaling. *Skelet Muscle*, 3: 7. 2013.

Gadelha MR, Kasuki L, Denes J, Trivellini G and Korbonits M: MicroRNAs: Suggested role in pituitary adenoma pathogenesis. *J Endocrinol Invest*, 36: 889-895. 2013.

Garrido-Martin EM, Blanco FJ, Roque M, Novensa L, Tarocchi M, Lang UE, Suzuki T, Friedman SL, Botella LM and Bernabeu C: Vascular injury triggers Krüppel-like factor 6 mobilization and cooperation with specificity protein 1 to promote endothelial activation through upregulation of the activin receptor-like kinase 1 gene. *Circulation Research*, 112: 113-127. 2013.

Gui T, Wang Y, Zhang L, Wang W, Zhu H and Ding W: Krüppel-like factor 6 rendered rat Schwann cell more sensitive to apoptosis via upregulating FAS expression. *PLoS One*, 8: e82449. 2013.

Hanoun N, Bureau C, Diab T, Gayet O, Dusetti N, Selves J, Vinel JP, Buscail L, Cordelier P and Torrisani J: The SV2 variant of KLF6 is down-regulated in hepatocellular carcinoma and displays anti-proliferative and pro-apoptotic functions. *J Hepatol*, 53: 880-888. 2010.

Higuchi M, Kato T, Chen M, Yako H, Yoshida S, Kanno N and Kato Y: Temporospatial gene expression of Prx1 and Prx2 is



- involved in morphogenesis of cranial placode-derived tissues through epithelio-mesenchymal interaction during rat embryogenesis. *Cell and Tissue Research*, 353: 27–40. 2013.
- Higuchi M, Yoshida S, Ueharu H, Chen M, Kato T and Kato Y: PRRX1 and PRRX2 distinctively participate in pituitary organogenesis and cell supply system. *Cell and Tissue Research*, DOI: 10.1007/s00441-014-1861-5. 2014.
- Koritschoner NP, Bocco JL, Panzetta-Dutari GM, Dumur CI, Flury A and Patrito LC: A novel human zinc finger protein that interacts with the core promoter element of a TATA box-less gene. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 9573–9580. 1997.
- Lang UE, Kocabayoglu P, Cheng GZ, Ghiassi-Nejad Z, Munoz U, Vetter D, Eckstein DA, Hannivoort RA, Walsh MJ and Friedman SL: GSK3beta phosphorylation of the KLF6 tumor suppressor promotes its transactivation of p21. *Oncogene*, 32: 4557–4564. 2013.
- Lee SJ, Yang EK and Kim SG: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoic acid X receptor alpha represses the TGFbeta1 gene via PTEN-mediated p70 ribosomal S6 kinase-1 inhibition: role for Zf9 dephosphorylation. *Mol Pharmacol*, 70: 415–425. 2006.
- Lee UE, Ghiassi-Nejad Z, Paris AJ, Yea S, Narla G, Walsh M and Friedman SL: Tumor suppressor activity of KLF6 mediated by downregulation of the PTTG1 oncogene. *FEBS Letters*, 584: 1006–1010. 2010.
- Liu J, Du T, Yuan Y, He Y, Tan Z and Liu Z: KLF6 inhibits estrogen receptor-mediated cell growth in breast cancer via a c-Src-mediated pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 335: 29–35. 2010.
- Liu X, Gomez-Pinillos A, Loder C, Carrillo-de Santa Pau E, Qiao R, Unger PD, Kurek R, Oddoux C, Melamed J, Gallagher RE, Mandeli J and Ferrari AC: KLF6 loss of function in human prostate cancer progression is implicated in resistance to androgen deprivation. *Am J Pathol*, 181: 1007–16. 2012.
- Matsumoto N, Kubo A, Liu H, Akita K, Laub F, Ramirez F, Keller G and Friedman SL: Developmental regulation of yolk sac hematopoiesis by Krüppel-like factor 6. *Blood*, 107: 1357–65. 2006.
- Mgbemena V, Segovia JA, Chang TH, Tsai SY, Cole GT, Hung CY and Bose S: Transactivation of inducible nitric oxide synthase gene by Krüppel-like factor 6 regulates apoptosis during influenza A virus infection. *Journal of Immunology*, 189: 606–615. 2012.
- Mgbemena V, Segovia J, Chang TH and Bose S: KLF6 and iNOS regulates apoptosis during respiratory syncytial virus infection. *Cell Immunol*, 283: 1–7. 2013.
- Nagata K, Hama I, Kiryu-Seo S and Kiyama H: microRNA-124 is down regulated in nerve-injured motor neurons and it potentially targets mRNAs for KLF6 and STAT3. *Neuroscience*, 256: 426–432. 2014.
- Narla G, Karen E. Heath, Helen L. Reeves, Dan Li, Luciana E. Giono, Alec C. Kimmelman, Mark J. Glucksman, Jyothsna Narla, Francis J. Eng, Andrew M. Chen, Anna C. Ferrari, John A. Martignetti, Scotto L. Friedman: KLF6, a candidate Tumor Suppressor Gene Mutated in Prostate Cancer. *Science*, 294: 2563–2565. 2001
- Narla G, Difeo A, Reeves HL, Schaid DJ, Hirshfeld J, Hod E, Katz A, Isaacs WB, Hebbing S, Komiya A, McDonnell SK, Wiley KE, Jacobsen SJ, Isaacs SD, Walsh PC, Zheng SL, Chang BL, Friedrichsen DM, Stanford JL, Ostrander EA, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Xu J, Thibodeau SN, Friedman SL and Martignetti JA: A germline DNA polymorphism enhances alternative splicing of the KLF6 tumor suppressor gene and is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Research*, 65: 1213–1222. 2005.
- Pearson R, Fleetwood J, Eaton S, Crossley M and Bao S: Krüppel-like transcription factors: a functional family. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40: 1996–2001. 2008.
- Racca AC, Camolotto SA, Ridano ME, Bocco JL, Genti-Raimondi S and Panzetta-Dutari GM: Krüppel-like factor 6 expression changes during trophoblast syncytialization and transactivates sshCG and PSG placental genes. *PLoS One*, 6: e22438. 2011.
- Rodriguez E, Aburjania N, Priedigkeit NM, DiFeo A and Martignetti JA: Nucleo-cytoplasmic localization domains regulate Krüppel-like factor 6 (KLF6) protein stability and tumor suppressor function. *PLoS One*, 5: 2010.
- Salma J and McDermott JC: Suppression of a MEF2–KLF6 survival pathway by PKA signaling promotes apoptosis in embryonic hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, 32: 2790–2803. 2012.
- Schuh R, Aicher W, Gaul U, Cote S, Preiss A, Maier D, Seifert E, Nauber U, Schroder C, Kemler R and et al.: A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by Krüppel, a Drosophila segmentation gene. *Cell*, 47: 1025–32. 1986.
- Susa T, Kato T, Yoshida S, Yako M, Higuchi M and Kato Y: Paired-related homeodomain proteins Prx1 and Prx2 are expressed in embryonic pituitary stem/progenitor cells and may be involved in the early stage of pituitary differentiation. *Journal of Neuroendocrinology*, 24: 1201–1212. 2012.
- Suske G, Bruford E and Philipson S: Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics*, 85: 551–556. 2005.
- Takahashi K and Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663–676. 2006.
- Tsai WC, Hsu SD, Hsu CS, Lai TC, Chen SJ, Shen R, Huang Y, Chen HC, Lee CH, Tsai TF, Hsu MT, Wu JC, Huang HD, Shiao MS, Hsiao M and Tsou AP: MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *Journal of Clinical Investigations*, 122: 2884–2897. 2012.
- Ueharu H, Higuchi M, Nishimura N, Yoshida S, Shibuya S, Sensui K, Kato T and Kato Y: Krüppel-like factor 6, KLF6, is expressed in the rat pituitary stem/progenitor cells and regulates PRRX2 gene. *Journal of Reproduction and Development*, 60: in press. 2014.
- van Vliet J, Crofts LA, Quinlan KG, Czolij R, Perkins AC and Crossley M: Human KLF17 is a new member of the Sp/KLF family of transcription factors. *Genomics*, 87: 474–482. 2006.
- Vankelecom H and Gremeaux L: Stem cells in the pituitary gland: a burgeoning field. *General and Comparative Endocrinology*, 166: 478–488. 2010.
- Vankelecom H: Pituitary stem cells drop their mask. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 7: 36–71. 2012.

- Veldman MB, Bembien MA and Goldman D: Tuba1a gene expression is regulated by KLF6/7 and is necessary for CNS development and regeneration in zebrafish. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 43: 370-383. 2010.
- Vetter D, Cohen-Naftaly M, Villanueva A, Lee YA, Kocabayoglu P, Hannivoort R, Narla G, J ML, Thung SN and Friedman SL: Enhanced hepatocarcinogenesis in mouse models and human hepatocellular carcinoma by coordinate KLF6 depletion and increased messenger RNA splicing. *Hepatology*, 56: 1361-1370. 2012.
- Watkins-Chow DE and Camper SA: How many homeobox genes does it take to make a pituitary gland? *Trends in Genetics*, 14: 284-290. 1998.
- Yako H, Kato T, Yoshida S, Higuchi M, Chen M, Kanno N, Cai L-Y, Ueharu H and Kato Y: Three-dimensional studies of Prop1-expressing cells in the rat pituitary just before birth. *Cell and Tissue Research*, 354: 837-847. 2013.
- Yoshida S, Kato T, Susa T, Cai L-Y, Nakayama M and Kato Y: PROP1 coexists with SOX2 and induces PIT1-commitment cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385: 11-15. 2009.
- Yoshida S, Kato T, Yako H, Susa T, Cai L-Y, Osuna M, Inoue K and Kato Y: Significant quantitative and qualitative transition in pituitary stem/progenitor cells occurs during the postnatal development of the rat anterior pituitary. *Journal of Neuroendocrinology*, 23: 933-943. 2011.
- Yoshida S, Kato T, Higuchi M, Yako H, Chen M, Kanno N, Ueharu H and Kato Y: Rapid transition of NESTIN-expressing dividing cells from PROP1-positive to PIT1-positive advances prenatal pituitary development. *Journal of Neuroendocrinology*, 25: 779-791. 2013.
- Zawada AM, Rogacev KS, Muller S, Rotter B, Winter P, Fliser D and Heine GH: Massive Analysis of cDNA Ends (MACE) and miRNA expression profiling identifies proatherogenic pathways in chronic kidney disease MACE and miRNA profiling in CKD. *Epigenetics*, 9. 2013.
- Zhang X, Nie Y, Du Y, Cao J, Shen B and Li Y: MicroRNA-181a promotes gastric cancer by negatively regulating tumor suppressor KLF6. *Tumour Biol*, 33: 1589-1597. 2012.
- Zhao X, Monson C, Gao C, Gouon-Evans V, Matsumoto N, Sandler KC and Friedman SL: Klf6/copeb is required for hepatic outgrowth in zebrafish and for hepatocyte specification in mouse ES cells. *Developmental Biology*, 344: 79-93. 2010.
- Zhu X and Rosenfeld MG: Transcriptional control of precursor proliferation in the early phases of pituitary development. *Current Opinions of Genetics & Development*, 14: 567-574. 2004.
- Zhu X, Gleiberman AS and Rosenfeld MG: Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiological Review*, 87: 933-963. 2007.
- Zitman-Gal T, Green J, Pasmanik-Chor M, Golan E, Bernheim J and Benchetrit S: Vitamin D manipulates miR-181c, miR-20b and miR-15a in human umbilical vein endothelial cells exposed to a diabetic-like environment. *Cardiovasc Diabetol*, 13: 8. 2014.
- 大砂まるみ, 井上金治, 加藤幸雄: 下垂体におけるホルモンを合成しない S100b 陽性細胞の分化能について. 明治大学農学部研究報告, 60: 1-6. 2010.
- 加藤幸雄, 石川晶雄, 加藤たか子: 下垂体の発生分化とホルモン遺伝子制御のシグナル・転写因子ネットワーク. 明治大学農学部研究報告, 59: 21-30. 2009.
- 菅野尚子, 加藤たか子, 加藤幸雄: 下垂体で発現するペプチド Neuronatin. 明治大学農学部研究報告, 63: 1-8. 2013.
- 諏佐崇生, 加藤たか子, 加藤幸雄: 転写調節因子による下垂体前葉ホルモン産生細胞の分化とホルモン遺伝子の発現制御—性腺刺激ホルモン遺伝子の発現制御—. 明治大学農学部研究報告, 57: 99-108. 2007.
- 陳 黙, 加藤たか子, 加藤幸雄: 下垂体の幹細胞研究の近況. 明治大学農学部研究報告, 62: 21-29. 2012.
- 中山美智枝, 加藤たか子, 加藤幸雄: 転写因子の DNA 結合特性の解析法—Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) method determination of DNA binding Specificity—. 明治大学農学部研究報告, 58: 19-23. 2008.
- 八子英司, 加藤たか子, 加藤幸雄: 胎仔期と出生直後の下垂体の発生と分化. 明治大学農学部研究報告, 63: 9-17. 2013.
- 吉田彩舟, 加藤たか子, 加藤幸雄: 下垂体の組織幹・前駆細胞で機能する組織特異的転写因子 PROP1. 明治大学農学部研究報告, 62: 79-87. 2013.