

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15354

研究課題名(和文)血管内皮細胞における翻訳後修飾依存的なFoxO1標的遺伝子の同定と医学応用

研究課題名(英文) Posttranslational modification-dependent FoxO1 target genes in endothelial cells and its medical application

研究代表者

小川 佳宏(Ogawa, Yoshihiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：70291424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では活性型FoxO1変異体を用いた血管内皮細胞(EC)におけるFoxO1標的遺伝子の網羅的解析を施行するとともに、その発現制御機構を解明し、インスリン抵抗性を基盤とする耐糖能異常に伴う血管障害における病態生理的意義を明らかにすることを目的とした。マウス血管内皮細胞株においてFoxO1の恒常活性型変異体を過剰発現することにより、リポカリン2の遺伝子発現がAkt/NF- $\kappa$ B系依存的に増加した。2型糖尿病におけるインスリン抵抗性と高血糖が、FoxO1の活性化によりリポカリン2/NGALの発現を増加させ、血管におけるインスリン抵抗性と血管機能障害を誘導する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Insulin resistance and hyperglycemia activate transcription factor FoxO1 by dephosphorylation and deacetylation, respectively. We aimed to elucidate the pathophysiological roles of FoxO1 in diabetes-associated vascular injury, by identifying target genes of FoxO1 in endothelial cells and examining the regulatory mechanisms by FoxO1. Constitutive active FoxO1 mutant significantly induced Lcn2 (lipocalin-2/NGAL) gene in endothelial cells via Akt/NF- $\kappa$ B-dependent manner. It suggests that FoxO1 promotes type 2 diabetes-associated vascular dysfunction by induction of Lcn2 (lipocalin-2/NGAL) in endothelial cells.

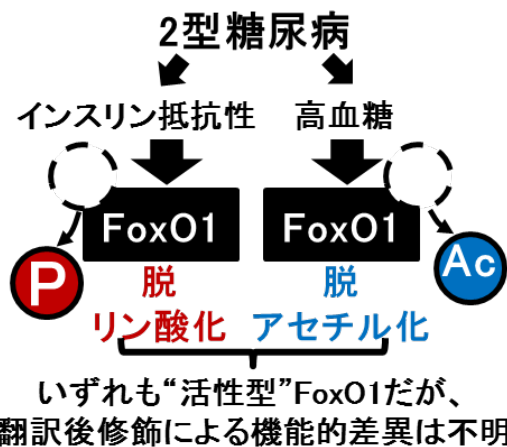
研究分野：内分泌代謝学、糖尿病学

キーワード：インスリン抵抗性 リポカリン2

1. 研究開始当初の背景

FoxO (forkhead transcription factors) は 1, 3a, 4 のサブファミリーを有する転写因子であり、インスリンによるリン酸化やグルコースによる脱アセチル化などの翻訳後修飾により制御されている。リン酸化と脱アセチル化により FoxO の核外移行が促進するため、脱リン酸化 FoxO と脱アセチル化 FoxO はいずれも転写因子として“活性型 FoxO”と考えられている。

2 型糖尿病では血管内皮細胞 (EC) の機能障害を契機として動脈硬化症を発症する。インスリン抵抗性と高血糖は 2 型糖尿病の主要な病態であるが、EC 機能障害における病態生理的意義には不明の点が多い。EC では FoxO サブファミリーのうち FoxO1 が最も高発現すること、EC においてインスリン抵抗性と高血糖がそれぞれ FoxO1 の脱リン酸化と脱アセチル化を促進することが明らかにされている (Cell Metab. 15: 372-381, 2012; Diabetes 58: 2344-2354, 2009)。更に、FoxO は一酸化窒素産生や炎症反応を制御する EC 機能のマスターレギュレーターであり、EC 特異的に FoxO1, 3a, 4 全てを欠損させたマウス (EC-FoxO 欠損マウス) ではインスリン抵抗性と高血糖による動脈硬化が著しく抑制されることが示されている (Cell Metab. 15: 372-381, 2012)。以上により、FoxO1 は 2 型糖尿病と EC 機能障害をリンクする鍵分子であると考えられるが、EC における FoxO1 標的遺伝子の網羅的解析は未施行であり、FoxO1 標的遺伝子の発現調節における脱リン酸化 FoxO1 と脱アセチル化 FoxO1 の機能的差異も不明である (図 1)。



2. 研究の目的

図 1: 研究の背景

本研究では、活性型 FoxO1 変異体を用いた EC における FoxO1 標的遺伝子の網羅的解析を施行するとともに、標的遺伝子の FoxO1 の翻訳後修飾による発現制御の差異を検討する。加えて、FoxO1 による標的遺伝子の発現制御機構を解明し、インスリン抵抗性を基盤とする耐糖能異常に伴う血管障害における病態

生理的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 活性型 FoxO1 変異体を用いた EC における FoxO1 標的遺伝子の同定

培養 EC に恒常的脱リン酸化 FoxO1 変異体 (FoxO1-ADA) を導入し、マイクロアレイ解析により EC における FoxO1 標的遺伝子の網羅的解析を行う。発現変化が顕著であり、かつ FoxO1 との関連が未知な遺伝子については候補的アプローチにより蛋白レベルでの発現変化を検討する。

2) 血管内皮細胞における FoxO1 標的遺伝子の制御機構の解明

1) で明らかにした遺伝子について、FoxO1 による制御機構を明らかにする。恒常的脱アセチル化 FoxO1 変異体 (FoxO1-KR) 導入 EC においても発現変化を評価し、翻訳後修飾依存的な制御機構の可能性についても検討する。

4. 研究成果

FoxO1-ADA をマウス EC 株 (MS-1 細胞) に導入し、DNA マイクロアレイ解析を施行した。FoxO1-ADA (100MOI) の導入により FoxO1 mRNA は約 30 倍に上昇することを確認した。DNA マイクロアレイ解析により、14 の遺伝子の発現

遺伝子名	Gene ID	Fold change
<i>S100g</i>	NM_009789	19.67
<i>Mmp13</i>	NM_008607	12.03
<i>Lcn2</i>	NM_008491	5.80
<i>Apod</i>	NM_007470	5.79
<i>Slpi</i>	NM_011414	4.99
<i>Sema3c</i>	NM_013657	4.05
<i>Serpina3h</i>	NM_001034870	3.82
<i>LOC100048386</i>	XM_001480393	3.68
<i>Il1f6</i>	NM_019450	3.65
<i>Fbxo15</i>	NM_015798	3.33
<i>Irg1</i>	NM_008392	3.30
<i>Ccl2</i>	NM_011333	3.20
<i>Dkk2</i>	NM_020265	3.17
<i>Cp</i>	NM_007752	3.03

表: MS-1 細胞において FoxO1-ADA 導入 (100MOI) により 3 倍以上発現が増加した遺伝子

が FoxO1-ADA により 3 倍以上に増加していた (表)。このうち、*Lcn2* (lipocalin-2/NGAL) は定量的 RT-PCR 及び ELISA 法において遺伝子発現及び蛋白分泌の増加が確認された (図

2) MS-1 細胞においてアデノウイルスを用いて FoxO1-KR を導入したことによっても *Lcn2* の有意な発現増加が認められ、*Lcn2* は 2 型糖尿病に伴うインスリン抵抗性 (FoxO1 脱リン酸化促進) および高血糖 (FoxO1 脱アセチル化促進) いずれの病態においても FoxO1 依存性に発現が誘導される可能性が考えられた。*Lcn2* の既知の発現誘導機構として Akt/NF- $\kappa$ B 系を介した機序が報告されている (*Clin. Cancer Res.* 20: 688-700, 2014)。MS-1 細胞に FoxO1-ADA および FoxO1-KR を導入すると Akt のリン酸化が亢進し、これらの変異体による *Lcn2* の発現誘導は NF- $\kappa$ B 阻害剤 (Bay11-7085) の前処置により有意に抑制された。このことから、FoxO1 は Akt/NF- $\kappa$ B の活性化を介して *Lcn2* の発現を誘導することが示唆された。lipocalin-2/NGAL はグラム陰性菌に対する鉄イオン封鎖効果による強力な静菌作用を有する分子として同定され (*Nature* 432:917-921, 2004)、血管内皮機能との関連では、ラットに対する lipocalin-2/NGAL 投与により血管組織の血管型 NO 産生酵素 (eNOS) の機能不全 (eNOS

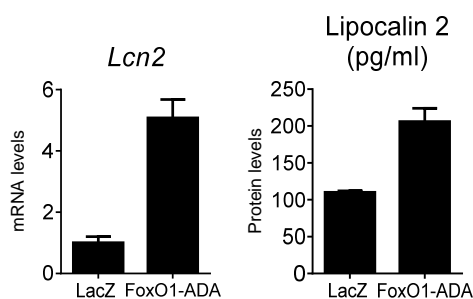


図 2: MS-1 細胞における FoxO1-ADA 導入 (100MOI) による (左) *Lcn2* 遺伝子及び (右) 培養上清中 Lipocalin-2 蛋白濃度

アンカップリング) 酸化ストレス産生の増加を伴い、血管機能障害が惹起されることが報告されている (*Br. J. Pharmacol.* 165: 520-531, 2012)。lipocalin-2/NGAL 欠損マウスにおいては大動脈のインスリンシグナルが増強することが報告されており (*Br. J. Pharmacol.* 165: 520-531, 2012)、2 型糖尿病におけるインスリン抵抗性と高血糖が、FoxO1 の活性化により Akt/NF- $\kappa$ B を介して lipocalin-2/NGAL の発現を増加させ、血管におけるインスリン抵抗性と血管機能障害を誘導する可能性が考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Tsuchiya K, Ogawa Y. Forkhead box class O family member proteins: The biology and pathophysiological roles in diabetes. *J. Diabetes. Investig. In*

press, 2017.

2. Miyachi Y, Tsuchiya K, Komiya C, Shiba K, Shimazu N, Yamaguchi S, Deushi M, Osaka M, Inoue K, Sato Y, Matsumoto S, Kikuta J, Wake K, Yoshida M, Ishii M, Ogawa Y. Roles for cell-cell adhesion and contact in obesity-induced hepatic myeloid cell accumulation and glucose intolerance. *Cell Rep.* 18: 2766-2779, 2017.
3. 土屋 恭一郎, 小川 佳宏: 「FoxOs」 *Diabetes Frontier* 26: 765-772, 2015.

[学会発表] (計 9 件)

1. 宮地 康高, 土屋 恭一郎, 柴 久美子, 森 健太郎, 出牛 三千代, 大坂 瑞子, 吉田 雅幸, 菊田 順一, 石井 優, 小川 佳宏: 「細胞接着と接触を介した肥満に伴う糖代謝異常の惹起機構」 **第 20 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会** 2016.12 (東京、中央区、東京コンベンションホール)
2. 土屋 恭一郎, 小川 佳宏: 「血管内皮細胞の代謝シグナルを介した臓器機能調節機構」 **第 37 回日本肥満学会** 2016.10 (東京都、江東区、東京ファッションタウン)
3. 坊内 良太郎, 小川 佳宏: 「糖尿病患者における体組成評価の意義」 **第 37 回日本肥満学会** 2016.10 (東京都、江東区、東京ファッションタウン)
4. 宮地 康高, 土屋 恭一郎, 柴 久美子, 森 健太郎, 出牛 三千代, 大坂 瑞子, 吉田 雅幸, 菊田 順一, 石井 優, 小川 佳宏: 「肝臓における細胞接触・接着を介した新たな糖代謝制御機構の解明」 **第 37 回日本肥満学会** 2016.10 (東京都、江東区、東京ファッションタウン)
5. Tsuchiya K, Miyachi Y, Komiya C, Shiba K, Shimazu N, Yamaguchi S, Osaka M, Yoshida M, Inoue K, Wake K, Sato Y, Kikuta J, Ishii M, Ogawa Y. Physical cell-cell interaction regulates hepatic glucose metabolism in mice. **American Diabetes Association's 76th Scientific Sessions.** Jun. 2016 (米国、ルイジアナ州、ニューオーリンズ)
6. 小川 佳宏: 「メタボリックシンドロームの分子機構」 **第 113 回日本内科学会総会・講演会** 2016.4 (東京都、千代田区、東京国際フォーラム)
7. 土屋 恭一郎, 宮地 康高, 山口 忍, 小川 佳宏: 「糖代謝異常における内皮細胞を介した臓器機能調節機構」 **第 89 回日本内分泌学会学術総会** 2016.4 (京都府、京都市、みやこめっせ)
8. 宮地 康高, 土屋 恭一郎, 山口 忍, 柴 久美子, 小宮 力, 出牛 三千代, 大坂 瑞子, 吉田 雅幸, 小川 佳宏:

- 「細胞接着・接触を介した肝臓における糖代謝制御機構の解明」 **第36回日本肥満学会** 2015.10(愛知県、名古屋市)
9. 土屋 恭一郎、宮地 康高、山口 忍、柴 久美子、小宮 力、小川 佳宏:「肥満における細胞接着・接触を介した肝臓の代謝制御機構」 **第52回日本臨床分子医学会学術集会** 2015.4(京都府、京都市、京都大学)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

報道関連

1. 小川 佳宏 **主治医の見つかる診療所**  
「危険な場ちがい脂肪から身を守る方法」(テレビ東京)2016年9月12日

アウトリーチ活動

1. **第5回東京医科歯科大学糖尿病市民公開講座**「糖尿病とがんの意外な関係」2016年10月29日
2. **第4回東京医科歯科大学糖尿病市民公開講座**「糖尿病と『食』～知ってトクするおいしい関係～」2015年9月19日

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/grad/cme/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小川 佳宏(OGAWA, Yoshihiro)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号:70291424

(2)研究分担者

該当なし( )

研究者番号:

(3)連携研究者

該当なし( )

研究者番号:

(4)研究協力者

( )

土屋恭一郎(TSUCHIYA, Kyoichiro)  
柴 久美子(SHIBA, Kumiko)