

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：26201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16481

研究課題名（和文）新規抗酸化ストレス経路FOXO1-xCT系を標的としたリンパ管新生の制御

研究課題名（英文）Regulation of lymphangiogenesis targeting FOXO1-xCT anti-oxidative stress pathway

研究代表者

新美 健太（NIIMI, KENTA）

香川県立保健医療大学・教養部・助教

研究者番号：40807509

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題はリンパ管新生を制御するメカニズムの1つとしてリンパ管内皮細胞の酸化ストレス応答に注目し、その分子メカニズムの解明を試みたものである。特に、過去にリンパ管内皮細胞に多量に発現する転写因子FOXO1を欠失した際の応答の変化に注目した。結果、FOXO1を欠失することでリンパ管内皮細胞は過酸化脂質の発生に対して脆弱になることが分かった。また、これはアミノ酸輸送体xCTの発現減少、グルタチオンペルオキシダーゼGPx4の発現減少、アシルCoAシンターゼACSL4の発現増加を伴うことも分かった。これらよりリンパ管内皮細胞においてFOXO1が過酸化脂質の発生を統括的に防御していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ管は腸管から吸収した脂質の通り道であるため、その内壁であるリンパ管内皮細胞は多量の脂質に曝露される細胞であると言える。脂質への曝露は細胞内に過酸化脂質を発生させる原因になると考えられていることから考えて、リンパ管内皮細胞は過酸化脂質の発生に対して何らかの防御機構を有していると予想される。本研究課題では、転写因子であるFOXO1がリンパ管内皮細胞で過酸化脂質の蓄積を防ぐために中心的な機能を果たしていることを初めて明らかにした学術的新規性のある研究である。またこの成果はリンパ管の機能異常を伴う疾患の治療標的を提案することにつながる点で社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：I focused anti-oxidative stress pathway in lymphatic endothelial cells as a molecular mechanism regulating lymphangiogenesis, especially FOXO1 transcription factor, which is abundant in lymphatic endothelial cells.

I revealed that siRNA-mediated reduction of FOXO1 expression led to cell death caused by inhibition of glutathione peroxidase 4, accompanied with accumulation of lipid peroxide. Quantitative PCR analysis and western blot analysis also revealed that FOXO1 reduction repressed xCT/SCL7A11 expression (amino-acid antiporter, inhibitor of lipid peroxidation) and GPx4 expression (glutathione peroxidase, inhibitor of lipid peroxidation). Conversely, FOXO1 reduction increased ACSL4 expression (acyl-CoA synthetase, promoter of lipid peroxidation). These results show that FOXO1 is an integrative inhibitor of lipid peroxidation in lymphatic endothelial cells.

研究分野：解剖学

キーワード：リンパ管 内皮細胞 転写因子 酸化ストレス 過酸化脂質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病において特徴的な症状として創傷治癒が遅延することがあげられる。これにより創傷を受けた皮膚が潰瘍化し、QOLを著しく低下させる一因となる。この原因の1つとして以前より創傷部の皮膚におけるリンパ管新生が阻害されていることが挙げられており、リンパ管新生を促進することにより糖尿病マウスにおける創傷治癒の遅延が改善することができることが分かっていた(Sarristo et al., 2006)。さらにその分子メカニズムについて、高グルコースのリンパ液に曝露されたリンパ管内皮細胞に酸化ストレスが発生し、リンパ管内皮細胞に遊走、増殖シグナルを伝達する受容体である VEGF Receptor3 を分解してしまうことが近年の研究で明らかになっている(Wu et al., 2018)。これらの報告から『リンパ管内皮細胞における酸化ストレスを除去する分子メカニズム』や『リンパ管内皮細胞における酸化ストレスがリンパ管内皮細胞の機能に与える影響』についての関心が高まっている。

(2) フォークヘッド転写因子ファミリーの1つである FOXO1 は、褐色脂肪組織、肝組織、膵組織、骨格筋等に多く発現し、エネルギー代謝や細胞増殖の抑制、アポトーシスの誘導、酸化ストレス除去など多彩な生理的プロセスを調節することで知られる。FOXO1 は血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞においても発現しており、FOXO1 をノックアウトすると著しい血管新生不全により胎生致死となることが分かっている(Furuyama et al., 2004)。また内皮細胞特異的に FOXO1 をノックアウトしたマウスにおける研究から、血管内皮細胞では FOXO1 が内皮細胞の過剰な増殖を抑制する機能があることが明らかとなっている(Wilhelm et al., 2016)。一方でリンパ管内皮細胞において FOXO1 がどのような機能を持つかについては未知の部分が多い。一般的に FOXO1 は catalase(CAT 遺伝子)や Mn-SOD(SOD2 遺伝子)の転写を正に調節することで細胞の酸化ストレスを抑制すると考えられている。しかしながら、我々の予備的な実験では、リンパ管内皮細胞においては FOXO1 をノックダウンすると酸化ストレスに対して脆弱化するにもかかわらず、catalase や MnSOD の発現に変動は見られなかった。このことはリンパ管内皮細胞においては別の FOXO1 依存的な酸化ストレス抑制機構が存在することを示唆しており、この分子メカニズムの解明が急がれる。

### 2. 研究の目的

本研究課題では以下のことを目的とした。

- (1) リンパ管内皮細胞の酸化ストレス応答に対する FOXO1 依存性を確認する。
- (2) FOXO1 が酸化ストレスを除去する詳細な分子メカニズムを解明する。

なお研究開始当初の背景としては、糖尿病における創傷治癒遅延の改善が念頭にあったため高グルコース負荷により酸化ストレスを誘導することを考えていたが、より生理的な意義を考えた際にはリンパ管内皮細胞は脂質への曝露が多いと考え、脂質曝露による過酸化脂質の蓄積に対して FOXO1 の欠失がどのように影響するかを検討することにした。

### 3. 研究の方法

#### (1) リンパ管内皮細胞について

リンパ管内皮細胞は市販の初代培養ヒト皮膚リンパ管内皮細胞(Promo Cell, Germany)を使用し、内皮細胞増殖基本培地 MV2 キット(Promo Cell)で培養した。

#### (2) FOXO1 遺伝子のノックダウンについて

リンパ管内皮細胞における FOXO1 のノックダウンは、FOXO1 に対する特異的な siRNA(siGENOME smart pool, Horizon Discovery)を Lipofectamine RNA iMAX(Invitrogen)によりトランスフェクションすることにより達成した。

#### (3) 細胞内に過酸化脂質を発生させる方法について

リンパ管内皮細胞における脂質過酸化の誘導のために、xCT 阻害剤である Erastin(cayman chemical)および GPx4 阻害剤である RSL3(cayman chemical)を培地に添加した。xCT はアミノ酸トランスポーターでありシステインを細胞内に取り込むことでグルタチオンの合成を促進する。GPx4 は過酸化脂質を還元する。したがってこれらを阻害することにより細胞内に過酸化脂質の蓄積を誘導できる。

#### (4) 生存細胞数アッセイについて

細胞生存数は細胞内脱水素酵素の活性を Cell Counting Kit-8(CCK8, Dojindo)により解析し、非刺激時の吸光度を 100%とした百分率で表現した。

#### (5) mRNA 発現量解析、タンパク質発現量解析について

リンパ管内皮細胞における特定の mRNA の発現量は qRT-PCR により、タンパク質の発現量はウェスタンブロット法により解析した。

### 4. 研究成果

(1) FOXO1 をノックダウンすることでリンパ管内皮細胞における過酸化脂質による細胞死が促進された。

まずリンパ管内皮細胞に Erastin あるいは RSL3 を添加したところ、興味深いことに Erastin では全く細胞死を誘導できず、RSL3 では 100nM 程度の添加で細胞死を誘導できた。この差異をもたらす原因は不明であるが、xCT の阻害がフィードバック的に xCT の発現を増加させることで阻害剤の効果をキャンセルしている可能性が考えられる。次に FOXO1 をノックダウンしたリンパ管内皮細胞 (siFOXO1) に RSL3 を添加したところ、図 1 に示すようにネガティブコントロールの siRNA (siNC) と比較してより低い濃度で細胞死を誘導できることが分かった。また Deferoxamine (Feイオンキレート剤) や Ferrostatin-1 (脂質過酸化阻害剤) により脂質過酸化を阻害することで、FOXO1 ノックダウンによる細胞死誘導はキャンセルされた (図 1 上)。一方で Z-VAD-FMK (アポトーシス阻害剤) や Necrostatin-1 (ネクロトーシス阻害剤) では、この細胞死は阻害できなかった (図 1 下)。このことから FOXO1 ノックダウンにより誘導されやすくなる細胞死は過酸化脂質によるものだと分かった。

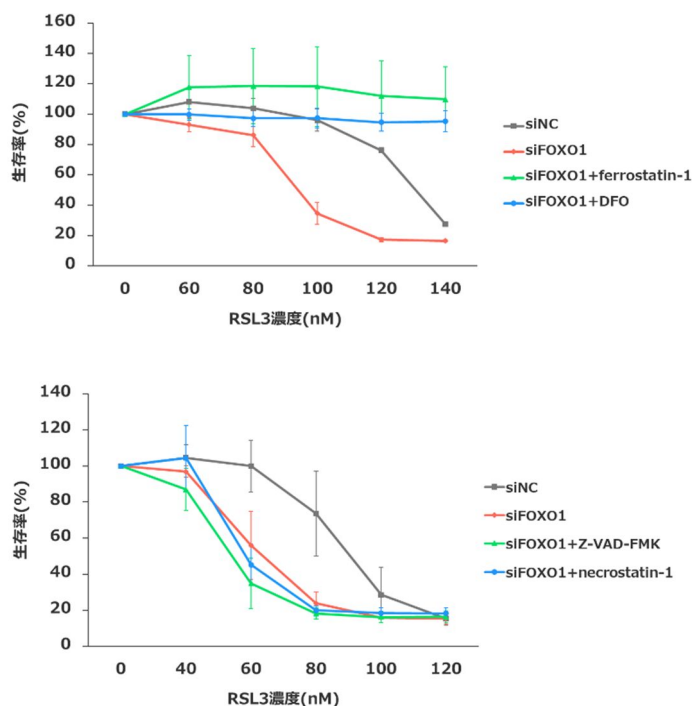


図 1 FOXO1 ノックダウンによる脂質過酸化を誘導した際の細胞生存率の変化

(2) FOXO1 をノックダウンしたリンパ管内皮細胞では脂質過酸化関連遺伝子の発現変動が見られた。

FOXO1 をノックダウンすることで過酸化脂質の発生に対して脆弱になる原因を探るため、FOXO1 をノックダウンしたリンパ管内皮細胞における脂質過酸化関連遺伝子の発現変動を qRT-PCR およびウェスタンブロットにより解析した。結果、xCT/SLC7A11 の発現が著しく減少していることが分かった。xCT はシスチンを細胞内に取り込み、グルタミン酸を放出するアミノ酸アンチポーターであり、取り込んだシスチンがグルタチオンの原料となるため脂質の過酸化に対して抑制的に作用する分子である。この発現減少は FOXO1 ノックダウンにより過酸化脂質による細胞死が誘導されることと矛盾しない。FOXO1 をノックダウンしたリンパ管内皮細胞では他には GPx4 の発現がやや減少することが確認された。GPx4 は脂質を特異的に還元するグルタチオンペルオキシダーゼであり、脂質過酸化に対して抑制的な酵素である。したがってこの発現減少もフェノタイプと矛盾しない。さらに FOXO1 のノックダウンにより ACSL4 の発現増加が見られた。ACSL4 はアシル CoA シンターゼであり、特にアラキドン酸に CoA を結合させ細胞膜の構成リン脂質として取り込むのに必要である。この作用により細胞膜の脂質過酸化が増加するため、脂質過酸化に対して促進的に作用する酵素であると言える。したがってこの発現が増加することも、FOXO1 のノックダウンで過酸化脂質による細胞死が増加することと矛盾しない。これらの結果から考えて FOXO1 は転写因子として脂質過酸化関連遺伝子の発現を、脂質過酸化を抑制する方向に統括的に制御しており、リンパ管内皮細胞が脂質過酸化に抵抗するための中心的なレギュレーターであると考えられる。

(3) FOXO1 が脂質過酸化関連遺伝子の発現を調節するメカニズムの検討

FOXO1 がどのような分子メカニズムにより上記の通り xCT、GPx4、ACSL4 といった脂質過酸化関連遺伝子の発現を統括的に制御しているのかについては検討中であるが、これらの遺伝子の発現変動はリンパ管内皮細胞に特異的で、他の種類の内皮細胞や内皮細胞以外の細胞種においては変動が見られないことを確認した。すなわちリンパ管内皮細胞特異的に発現する転写因子群と FOXO1 が協調して機能することで、複雑で統括的な遺伝子制御を行っている可能性がある。

以上のことを総合すると、本研究課題における研究成果は FOXO1 がリンパ管内皮細胞において脂質過酸化に対抗するために様々な遺伝子発現を調節する中心的な転写因子であることを示した点にあり、リンパ管内皮細胞の機能を正常に保つための分子機構の一端を明らかにしたと言える。この成果はリンパ管内皮細胞の機能不全を伴う種々の疾患の治療につながる可能性が考

えられる。今後、より詳細に FOXO1 が脂質過酸化に抵抗する分子メカニズムの解明を目指すとともに、生体内のリンパ管内皮細胞における生理的な脂質への曝露に対しても同様の制御機構を發揮するかについて検討を進めたい。

<引用文献>

Sarristo et al., Am. J. Pathol. 2006

Wu et al., J. Clin. Invest. 2018

Furuyama et al., J. Biol. Chem. 2004

Wilhelm et al., Nature 2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Niimi K, Adachi Y, Ishikawa H, Yamaguchi W, Kubota Y, Inagaki S, Furuyama T	4. 巻 520
2. 論文標題 Endothelial specific deletion of FOXO1 alters pericyte coverage in the developing retina	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 304-310
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.10.040.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Niimi K, Kohara M, Sedoh E, Fukumoto M, Shibata S, Sawano T, Tashiro F, Miyazaki S, Kubota Y, Miyazaki JI, Inagaki S, Furuyama T	4. 巻 147
2. 論文標題 FOXO1 regulates developmental lymphangiogenesis by upregulating CXCR4 in the mouse-tail dermis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.181545.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Niimi K, Nakae J, Inagaki S, Furuyama T.	4. 巻 37
2. 論文標題 FOXO1 represses lymphatic valve formation and maintenance via PRDM1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.110048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新美健太, 足立裕美, 石川寛子, 久保田義顕, 稲垣忍, 古山達雄
2. 発表標題 内皮細胞特異的FOXO1欠失マウスにおけるペリサイトの形態変化
3. 学会等名 第74回日本解剖学会中国・四国支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新美健太, 足立裕美, 石川寛子, 久保田義顕, 稲垣忍, 古山達雄
2. 発表標題 内皮細胞におけるFOXO1の欠失がペリサイトの形態形成に及ぼす影響
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会（誌上開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新美健太, 中江淳, 稲垣忍, 古山達雄
2. 発表標題 FOXO1によるPRDM1を介したリンパ管弁形成の抑制機構
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関