

機関番号：26201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590292

研究課題名 (和文) 新生血管における FOXO1 の機能解析

研究課題名 (英文) functions of FOXO1 in the angiogenesis

研究代表者

古山 達雄 (FURUYAMA TATSUO)

香川県立保健医療大学・教養部・教授

研究者番号：20238702

研究成果の概要 (和文)：フォークヘッド型転写因子のサブファミリーである FOXO は広範な生理作用を有することが知られている。このファミリーに属する FOXO1 は FOXO ファミリーの中でエネルギー代謝調節に中心的な役割を果たしているメンバーである。また FOXO1 欠損マウスでは血管形成異常により胎生致死となることから血管形成においても必須の役割を果たしている。しかし FOXO1 の血管形成に対する機能に関しては虚血による新生血管形成時には抑制、発達過程においては促進の両方の効果が報告されている。本研究では血管形成での役割を、血管内皮細胞特異的に FOXO1 を欠損したマウス網膜の血管形成過程を追うことにより検討した。この過程で血管内皮細胞での FOXO1 の欠損が pericyte の内皮細胞への誘導異常を引き起こし、結果として血管の安定性が失われることから脳内出血死に至ることを見いだした。この原因として PDGF-B の発現低下が関与することを明らかにした。本研究の結果は新生血管形成時において FOXO1 は新生血管の安定性に大きな関与をしている可能性を示唆する。

研究成果の概要 (英文)：The FOXO, a subfamily of forkhead type transcription factors, plays important roles in many physiological functions. FOXO1 is a member to be most important in energy metabolism. Moreover, it is also essential in angiogenesis during embryo. However, the function of FOXO1 in angiogenesis is controversial in detail. We studied angiogenesis in the retina of endothelium-specific deficient FOXO1 mice. The deficiency resulted in an impaired recruitment of pericytes to endothelial cells leading to death due to hemorrhage in the brain. The defect was mainly derived from a reduction of PDGF-B in the retina. The results suggest that FOXO1 play an important role in a stabilization of newly developed vessels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般

キーワード：血管、網膜、内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) forkhead 型転写因子のサブファミリーである FOXO は線虫の DAF-16 哺乳類ホモログ

であり、酸化ストレスの制御、細胞周期の制御、傷害 DNA の修復、アポトーシスの制御、糖新生の制御などの生理機能に寄与するこ

とが知られている。この中で FOXO1 はエネルギー代謝に中心的な役割を果たしている。さらに FOXO1 遺伝子を欠損したマウスは血管系の発達不全により胎生 11 日目には致死となることから FOXO1 は血管形成過程にも必須である。

(2) FOXO1 と血管形成との関連についていくつかの報告が有る。しかし成熟マウスを用いた虚血後の新生血管形成過程に対して FOXO1 は抑制的に働いていることが示されているが、FOXO1 の欠損により発達過程で見られる血管形成不全による胎生致死と矛盾しており詳細は議論のあるところである。また血管内皮細胞において FOXO1 が Tie2 受容体の antagonist である Ang2 の転写調節をおこなっていることが明らかにされている。

2. 研究の目的

(1) 血管内皮特異的 FOXO1 欠損マウスの網膜の血管形成過程を詳細に追うことにより、FOXO1 の血管形成過程における関与を検討する。

(2) (1) の結果、何らかの表現型が観察された場合にはその原因を検討する。特に FOXO1 が転写因子であることから、発現量の変動する遺伝子の同定を試みる。

3. 研究の方法

(1) 血管内皮特異的 FOXO1 ノックアウトマウスの作製 FOXO1 flox (FOXO1f/+) マウス(翻訳領域を有する exon2 を挟む形で、intron1 と intron2 に loxP を導入し、さらに exon2 内の 3' UTR 領域に IRES- β geo カセットを挿入するコンストラクトにより作製された FOXO1 コンディショナルノックアウトマウス)を、タモキシフェン投与により、血管内皮細胞特異的に Cre の発現可能な Tie2Cre-ER マウスと交配を行い、Tie2Cre-ER-FOXO1f/f マウスを作製した。タモキシフェン(Sigma)を Corn oil にて 10mg/ml の濃度で溶解し、マウスの体重 1g に対して 50 μ g となるように腹腔内投与した。P5 回収のマウスは生後 2 日目に、生存率を追うマウスは生後 2、4、6 日目にそれぞれタモキシフェンを投与した。

(2) 網膜の単離と免疫染色、レクチン染色および whole mount in situ hybridization マウスから眼球を摘出し、2%PFA にて 4°C で 30 分固定したのち、角膜をリング状に切り抜

き、中の硝子体を取り出した。単離後、4%PFA にて 4°C で一晩固定した。目的により PBS、メタノールに移し 4°C または -20°C にて保存した。免疫染色はブロッキングが必要な場合は 1% NGS/ PBST を用いた。1 次抗体は anti-FOXO1 (CST), anti-SMA (Sigma), anti-collagen type IV (Millipore), anti-NG2 (Chemicon), anti-CD31 (Pharmingen), anti-laminin α 2,4,5 and β 1(大阪大学関口清俊先生より寄贈)を使用した。2 次抗体は一次抗体にあわせて biotin 化 anti-rabbit IgG, biotin 化 anti-goat/sheep IgG, biotin 化 anti-rat IgG, FITC-anti-rat IgG, alexa488 anti-mouse IgG, alexa 546 anti-rabbit IgG を用いた。Biotin は avidin texas red または ABC 法により検出した。レクチン染色は GS lectin (Vector lab) を使用した。Whole mount in situ は 37°C で 5 分 Proteinase K 処理(1.3% SDS, 5 μ g/ml PK / PBT)を行った後、RNA probe を 1mg/ml を加えた hybridization buffer 中で 65°C、48 時間反応した。wash した後 AP 標識 anti-DIG 抗体(Roche)で反応した。NBT/BCIP(Roche)で検出した。RNA プロブは E10.5 マウス cDNA を template として KOD-plus (TOYOBO)を用いて PCR を行い、得られた PDGF-B, PDGFR- β , Dll4, ang1, ang2 に特異的な PCR 産物を pBluescriptII (Stratagene)にサブクローニング後、T3 または T7 RNAPolimerase (TOYOBO) と DIG RNA labeling mix (Roche) を用いて DIG 標識 RNA プロブを作製した。

(3) RNA 抽出と定量 PCR P5 マウスより眼球を摘出し、DEPC 処理した PBS 中に網膜を単離した。High Pure RNA Tissue Kit (Roche) を用いて RNA を抽出し、Total RNA 1 μ g から Random primer を用い Rever Tra Ace (TOYOBO)を使用し、逆転写反応を行った。PCR 反応は THUNDERBIRD SYBR qPCRmix (TOYOBO) を用いた。PCR 装置は iQcycler (BioRad) を用いた。内部標準は 36B4 を用いた。以下の配列の Primer を用いた。

FOXO1: 5-agcctgacaccagctgtgtg-3, 5-gtcctgggcaaaatgtaatg -3,

Dll4: 5- gttgcccttcaatttcacct-3, 5-agccttgatgatgatttg-3

ang1: 5- tcagcacgaaggatgctgataa-3, 5-

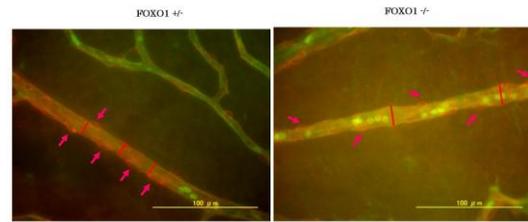
gtccccgagtgtagaacattcc-3,
ang2: 5- aagaatgttccgtgggagttca-3, 5-
aacctgtgccaccacttagaa-3,
PDGF-B: 5- ggcttcttttcgcacaatctc-3, 5-
gatctctcggaacctcatcg-3

4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞特異的 FOXO1 欠損マウスの作成 Tie2Cre-ER-FOXO1^{f/f} のオスと Tie2Cre-ER-FOXO1^{f/+} のメスのかけあわせで行い、得られたマウスにタモキシフェンを投与することで血管内皮細胞特異的 FOXO1 欠損マウス (FOXO1^{-/-}) と血管内皮細胞特異的 FOXO1 ヘテロマウス (FOXO1^{+/-}) を作製した。確認のため、タモキシフェン処理をした P5 マウス網膜を単離し、FOXO1 の免疫染色を行った。その結果、FOXO1^{+/-} マウスでは血管に沿って FOXO1 の発現が見られたが、FOXO1^{-/-} マウスではその発現が完全に消失していた。また、wild type と FOXO1^{+/-} を比較すると、FOXO1 の発現量はほとんど変わらなかった。さらに、今回使用した FOXO1^{f/f} マウスの FOXO1 の発現は免疫染色法では検出できなかった。次に、FOXO1 の発現量を定量的に調べるため、P5 マウス網膜の定量 RT-PCR を行った。wild type、FOXO1^{f/+}、FOXO1^{f/f}、FOXO1^{+/-}、FOXO1^{-/-} の 5 群及び、Cre (-) の FOXO1^{f/+}、FOXO1^{f/f} マウスにタモキシフェンを投与した 2 群の計 7 群で定量を行った。その結果、FOXO1^{-/-} マウスは FOXO1^{+/-} と比較して約 37% まで FOXO1 の発現低下が見られ、wild と比較すると約 28% まで低下していた。また、Cre(-) のマウスにタモキシフェンを投与しても FOXO1 の発現低下は認められなかった。このことから、タモキシフェン投与による血管内皮細胞特異的 FOXO1 欠損マウスの作製はうまく機能していると考えられた。なお、以降は FOXO1^{+/-} をコントロールとして用いることでタモキシフェンの毒性による影響を排除して FOXO1^{-/-} との比較を行った。

(2) pericyte の異常 FOXO1^{-/-} (図右) では血管の走行に沿った NG2 陽性または SMA 陽性 pericyte (赤矢印) の血管長さあたりの密度が FOXO1^{+/-} (図左) に比べて低下していた。そのため FOXO1^{-/-} の血管は pericyte の付着している部分の血管と付着し

ていない部分の血管では明らかな太さの違いが認められた。このことから血管の最も太い部分を FOXO1^{-/-} と FOXO1^{+/-} と比較したところ有為に FOXO1^{-/-} では太くなっていた。



次に、別の壁細胞のマーカーとして知られる PDGFR β の発現を *in situ* にて検討したところ FOXO1^{+/-} では FOXO1^{-/-} と比較して明らかな発現の低下が認められた。これらのことから FOXO1 を血管内皮細胞で欠損させることにより pericyte の内皮細胞への誘導に異常が起こることが示唆された。

(3) 基底膜タンパクの発現変化 基底膜タンパクは壁細胞の分化に不可欠であり、脳血管内皮の基底膜タンパクの laminin $\alpha 2$ は pericyte の減少によってその発現が低下するとの報告がある。laminin $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ の免疫染色を FOXO1^{+/-} と FOXO1^{-/-} で比較した。その結果 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ においては発現の差が確認できなかったが、 $\alpha 2$ の発現は確かに FOXO1^{-/-} で低下していた。これは (2) の pericyte の内皮細胞への誘導に異常が起こっていることを裏付ける結果であると考えられた。

(4) FOXO1^{-/-} マウスの生存率 血管内皮特異的に FOXO1 を KO すると P14 までに 100% 致死となった。FOXO1^{+/-} マウスは P28 以降まで正常に成長した。また致死に至った FOXO1^{-/-} マウスは頭部に出血が認められた。FOXO1^{+/-} マウスは P28 以降まで正常に成長した。FOXO1^{f/f}、Cre(-) のマウスにタモキシフェンを投与したが P28 以降も生存しており、致死の理由はタモキシフェンの毒性によるものではないと考えられた。このことはこれまでに pericyte の内皮細胞への誘導に異常があるマウスに認められる表現型と一致しており、(2)、(3) の結果をさらに裏付けるものと考えられた。

(5) FOXO1-/-マウス網膜における PDGF-B, ang2 の発現低下 pericyte の血管への誘導に明らかな異常が認められた。その原因として PDGF receptor-beta (PDGFRβ) のリガンドであり、pericyte の誘導、分化の制御への関与が最も知られている PDGF-B の発現量に変化がないかどうかを in situ hybridization 法、定量 PCR 法により検討した。その結果、PDGF-B は血管の先端に限局して発現しており、FOXO1 +/- と比較して FOXO1 -/- では発現量に顕著な低下が見られた。また定量 PCR を行ったところ、wild type と比較して FOXO1 -/- では発現量が約 3 分の 1 まで有意に低下していた。FOXO1-/-マウスにおいて明らかな PDGF-B の発現低下が認められた。同様に FOXO1 により直接転写調節を受けることが知られている ang2 の発現もほぼ同程度低下していることが確認された。しかし ang1 の発現には差が認められなかった。PDGF-B、ang2 の発現は伸長しつつある血管の先端細胞 tip 細胞に限局していることから、tip 細胞の分化の異常がおこっている可能性を排除するため、tip 細胞の代表的なマーカーである Delta like 4 (Dll4) の発現を同様に検討した。Dll4 は文献と一致して血管の先端及び動脈沿って発現していたが、FOXO1 +/- と FOXO1 -/- の間で発現に明らかな差は見られなかった。また、定量 PCR においても wild type, FOXO1 +/-、FOXO1 -/- 間に有意な差は認められなかった。これらの結果と、PDGF-B 欠損マウスの表現型の報告ではその発現量が半分以下に低下すると pericyte の誘導に異常が現れることを考慮すると FOXO1 を血管内皮細胞で特異的に欠損させると tip 細胞での PDGF-B の発現が低下することにより pericyte の誘導異常があらわれるものと考えられる。FOXO1 はこれまで血管の伸展に関与することが主として言われてきたが、本研究により FOXO1 の血管形成時における新たな機能が明らかにされた。

今後、糖尿病性網膜症などの血管の安定性に関わる様々な病態と FOXO1 の関与を検討していくことが重要であると考えられる。

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 Park SH, Sakamoto H, Tsuji-Tamura K, Furuyama T, Ogawa M. Foxo1 is essential for in vitro vascular formation from embryonic stem cells Biochem Biophys Res Commun. 390, 861-866 (2009)
- ② Matsukawa M, Sakamoto H, Kawasuji M, Furuyama T, Ogawa M. Different roles of Foxo1 and Foxo3 in the control of endothelial cell morphology. Genes Cells 14, 1167-1181 (2009).
- ③ Yamaza H, Komatsu T, Wakita S, Kijogi C, Park S, Hayashi H, Chiba T, Mori R, Furuyama T, Mori N, Shimokawa I. FoxO1 is involved in the antineoplastic effect of calorie restriction. Aging Cell. 9(3), 372-382 (2010)

[学会発表] (計 1 件)

植田慎之介、林美記子、石黒智子、宇仁一弘、田代ふみ、宮崎純一、古山達雄、稲垣忍
網膜血管形成における FOXO1 の役割
第 116 回日本解剖学会 2011 年 3 月
(横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古山 達雄 (FURUYAMA TATSUO)
香川県立保健医療大学・教養部・教授
研究者番号：20238702

(2) 研究分担者

稲垣 忍 (INAGAKI SHINOBU)
大阪大学大学院・医学研究科・教授
研究者番号：90151571