

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：26201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07248

研究課題名(和文) Foxo1転写因子によるリンパ管弁形成の調節

研究課題名(英文) Regulation of lymphatic valve formation by Foxo1

研究代表者

古山 達雄 (Furuyama, Tatsuo)

香川県立保健医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：20238702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ管の弁形成を誘導する初期過程の詳細は十分には理解されていない。我々は弁形成を誘導する振動すり応力をリンパ管内皮細胞に付加することによりFoxo1の転写活性と弁形成に必須な遺伝子群の発現誘導との関係を検討し、さらにリンパ管内皮細胞特異的にFoxo1を欠損または活性型Foxo1を発現するマウスを作製して弁形成への影響を検討した。すり応力はAktキナーゼを活性化しFOXO1を核外移行させ、Foxo1転写活性の低下依存性に弁形成遺伝子群の発現が誘導されることを明らかにした。さらにFoxo1欠損マウスでは弁の数が有意に増加し、活性型マウスでは弁形成が著しく抑制されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ浮腫の患者数は10万人を超えるといわれており、その原因としてがん治療後の合併症、リンパ管弁の異常があげられるが、原因不明のものも多い。そのため根本的な治療法を開発するためにはリンパ管弁の形成過程を理解することが必須である。本研究によりリンパ管の弁形成の開始時にFOXO1蛋白の転写活性が抑制される必要があることが明らかになった。このことから弁形成異常によって生じるリンパ浮腫に対しては、FOXO1の転写活性を抑制する化合物を用いて新たな弁を誘導することにより治療できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The early process of lymphatic valve formation is remained to be fully understood. We examined whether and how Foxo1 is involved in regulating the expression of genes essential to the process (valve formation genes) applying the oscillatory shear stress on the lymphatic endothelial cells (LEC) and how the deficiency of Foxo1 or the overexpression of constitutive active FOXO1, which is not phosphorylated by Akt kinase, in a lymphatic vessel-specific manner impact on the lymphatic valve formation. We found that the shear stress on LEC induced activation of Akt kinase which translocated FOXO1 to the cytosol and inhibited the transcriptional activity resulted in the induction of valve formation genes. Moreover, we found that the number of lymphatic valves in the LEC specific Foxo1-deficient mice was significantly increased and in contrast the valve formation was remarkably inhibited in the constitutive active FOXO1 expressing mice.

研究分野：解剖生理

キーワード：リンパ管 弁形成 Foxo1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

リンパ管の弁形成異常は先天性や術後のリンパ管浮腫などの原因となる。リンパ管の弁形成過程においては、弁形成部位の内皮細胞で Prox1、FoxC2、Cx37(GJA4)などの弁形成に必要な遺伝子群(弁形成遺伝子)の発現が誘導されることが必須である。実際に、これらの遺伝子を欠損するマウスでは弁形成に異常をきたす。またこれらの遺伝子の発現が誘導されるためにはリンパ管内皮細胞(LEC)に対してリンパ液の乱流が作り出す振動性 shear stress (OSS) が付加される必要がある(Sabine 2012)。しかし OSS が、どのような機構により弁形成遺伝子の発現誘導のスイッチを入れるのかは十分に理解されていない。

### 2. 研究の目的

LEC において転写因子 FOXO1 蛋白は高い発現を示し、通常は核に局在している。一般に FOXO 1 は核内において転写活性化能を持ち、様々な刺激によって活性化した Akt キナーゼによってリン酸化をうけると核内から核外に移行して転写活性化能が抑制される。さらに OSS により Akt キナーゼが活性化されることが報告されている(Yang 2019)。これらのことから OSS 刺激は Akt キナーゼの活性化を介して FOXO1 蛋白の核外移行を引き起こし、それまで抑制されていた弁形成遺伝子の発現を誘導し弁形成を開始させる、という仮説を立て、*in vitro* および *in vivo* において検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) LEC の培養と OSS 負荷

ヒト皮膚リンパ管内皮細胞(LEC)は PromoCell 社より購入し Endothelial Cell Basal Medium MV2 kit (PromoCell 社)を用いて培養した。6 穴プレートで培養した HDLEC に、5% CO<sub>2</sub> 培養装置中にてシーソー式シェーカー(multi bio-R24、Biosan 社)を用いておよそ 0.3 dyne/cm<sup>2</sup> (振動数 18 rpm、振動角 48°) の OSS を付加した。

#### (2) 定量 PCR

培養した LEC より ISOGEN 試薬(WAKO 社)を用いて RNA を抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO 社)を用いて逆転写したのち、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO 社)を用いて StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems 社)で定量 PCR を行った。delta-delta Ct 法を用い *-actin* を基準にとって定量を行った。

#### (3) 免疫組織化学とウエスタンブロット

組織は回収後 100%メタノール中で -25℃ で使用まで保存した。使用時に 4%PFA にて 5min 固定後、通常の免疫組織化学法のプロトコールに従って処理を行った。ウエスタンブロットは通常のプロトコールに従って行った。

#### (4) 遺伝子導入

FOXO1 および PRDM1 に対する siRNA (SMART pool siGENOME siRNA、Dharmacon)を RNAimax reagent (Invitrogen)を用いて行った。FOXO1-3A は Adenovirus 系にて、また PRDM1 は AAV6 (Takara) を用いて行った。

#### (5) ChIP アッセイ

ChIP-IT Express Kit (Active Motif)を用いて行った。

#### (6) モデル動物の作成

リンパ管内皮細胞特異的 Prox1 CreERT2 mice と Foxo1 floxed mice もしくは Foxo1 CA mutant mice を交配させ Prox1 CreERT2/ Foxo1 floxed mice と Prox1 CreERT2/ Foxo1 CA mice を作成した。Tamoxifen (Sigma Aldrich) を生後 1、2、3 日に 50 μg/g 体重で腹腔内投与し、生後 6 日目に腸間膜を回収した。

#### (7) 使用した抗体と試薬

Rabbit monoclonal anti-FOXO1 (C29H4)、Rabbit monoclonal anti-phospho Akt (Ser473) (D9E)、Rabbit monoclonal anti-Akt (C67E7)、Rabbit polyclonal anti-phospho FOXO1 (Ser256) (Cell Signaling Technology)、Rabbit polyclonal anti-FOXO1、Rabbit monoclonal anti-ITGA9 (EPR9722)(Abcam)、Rat monoclonal anti-CD31 (MEC13.3)(BD)、Rabbit polyclonal anti-PROX1 (Sigma Aldrich)、Rat monoclonal anti-PRDM1 (6D3) (Invitrogen)、Rabbit polyclonal anti-Cx37(Alpha Diagnostics)、Sheep polyclonal anti-FOXC2(R&D)、LY294002(Cell Signaling Technology)、Akt Inhibitor (Akti-1/2) (Abcam) を用いた。2 次抗体には各 1 次抗体に対応する蛍光標識抗体を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) OSS による FOXO1 蛋白のリンパ管内皮細胞内局在の変化の検討

免疫細胞化学法により、LEC に対して OSS を付加しないときには FOXO1 蛋白は核内にほぼ局在していることが確認された。一方リンパ管弁形成を誘導できる強度の OSS を 30min 負荷すると FOXO 1 蛋白は核から細胞質へと移行することが明らかとなった。同時に FOXO1 蛋白は細胞質

中に多数の点状分布することが見いだされた。これは蛋白分解の過程を表している可能性が考えられた。

#### (2) OSS による FOXO1 蛋白の細胞内局在変化の調節機構の検討

免疫細胞化学法で検討したところ、Akt キナーゼ阻害剤 (Akti-1/2) で処理した状態で OSS を付加しても FOXO1 蛋白の細胞外への移行は見られなかった。このことから OSS による FOXO1 の核外移行には Akt キナーゼの活性化が必要であることが示唆された。さらに Akt1pSer473 に対する抗体を用いたウエスタンブロット法により OSS 負荷後の Akt キナーゼの活性化の時間依存性を調べたところ 5min ですでに有意に上昇し、10min でピークを迎え、30min では元のレベルに戻っていた。また Akt によってリン酸化された FOXO1pSer256 は OSS 負荷後 10min から有意に上昇し、30min でもリン酸化レベルは保たれていた。このリン酸化 FOXO1 は一般に細胞質に局在することから、FOXO1 の細胞染色の結果を支持するものであった。また OSS 負荷により FOXO1 の蛋白レベルはおよそ 30%まで減少していることから、OSS により観察された FOXO1 陽性の点状物は分解途中の現象を見ている可能性が支持された。

#### (3) OSS による弁形成遺伝子の発現誘導における Foxo1 の関与の検討

LEC において siRNA を用いて FOXO1 を発現抑制したところ、弁形成遺伝子のうち FoxC2、Gja4、ITGA9 の mRNA の発現が上昇し、転写活性型 FOXO1-3A の強制発現により Prox1、FoxC2、Gja4、ITGA9 の mRNA の発現が抑制されることが定量 PCR 法により確認された。さらにウエスタンブロット解析から、siRNA により FOXO1 の発現を抑制すると FOXC2、CX37 (Gja4 の蛋白産物) ITGA9 の蛋白量が上昇し、FOXO1-3A の強制発現により PROX1、FOXC2、CX37 の蛋白量が減少することが確認された。これらの結果から FoxC2 と Gja4 は共通の FoxO1 のシグナル経路を介して発現調節を受けている可能性が示唆された。Prox1 や ITGA9 は FoxC2 や Gja4 とは異なる経路を介している可能性がある。次に LEC に OSS を付加する際に PI3 阻害剤 (LY294002) Akt 阻害剤 (Akti1/2) による処理をしておいた場合には、FOXO1-3A を強制発現させたときとほぼ同様の弁形成遺伝子群の発現抑制が認められた。さらに FOXO1-3A を強制発現させた LEC に OSS を付加させた場合には、通常の LEC で認められる弁形成遺伝子の発現誘導はおこらなかった。これらのことから OSS-Akt-FOXO1 の経路を介して FOXO1 が核外に移行し転写活性が抑制されることにより弁形成遺伝子の発現が誘導されてくると推測された。

#### (4) Foxo1 の弁形成遺伝子の発現抑制機構の検討

以上の知見より FOXO1 により発現調整される転写抑制因子が弁形成遺伝子の発現に関与している可能性が高いと推測された。これまでに FOXO1 の標的として知られており、かつ FOXO1 を発現抑制した LEC を用いた DNA アレイの結果を用いて発現抑制される転写抑制因子、を探索したところ PRDM1 が候補として同定された。実際に、LEC において siRNA により FoxO1 を発現抑制すると PRDM1 の mRNA と蛋白の発現が抑制され、FOXO1-3A を強制発現すると逆に発現が促進された。さらに LEC において FOXO1 抗体を用いた ChIP-PCR を行ったところ PRDM1 のプロモーター領域の転写開始点の上流-549bp の部分に FOXO1 が結合することが明らかになった。このことから PRDM1 は LEC における FOXO1 の直接の転写標的であると考えられた。次に、PRDM1 が弁形成遺伝子を転写抑制していることを確認するため、LEC において siRNA を用いて PRDM1 を発現抑制したところ、FOXO1 を発現抑制した時と同様に弁形成遺伝子の mRNA および蛋白の発現が促進された。また逆に PRDM1 を強制発現すると FOXO1-3A を強制発現した時と同様に弁形成遺伝子の発現が抑制された。また siRNA により FOXO1 を発現抑制すると同時に PRDM1 を強制発現させたところ、FOXO1 の発現抑制による弁形成遺伝子の発現誘導が抑制されることが確認された。最後に、LEC に OSS を負荷すると PRDM1 の発現が抑制され、さらに PRDM1 を強制発現しておくとも OSS による弁形成遺伝子の発現誘導が抑制されることも確認された。これらのことから OSS による弁形成遺伝子の発現誘導は Akt を介して FOXO1 が核外移行し、その結果 PRDM1 の発現が抑制されることにより弁形成遺伝子の発現抑制が解除されて転写が上昇してくると推測された。

#### (5) リンパ管内皮細胞特異的 Foxo1 欠損マウスと活性型 FOXO1 蛋白の過剰発現マウスにおけるリンパ管弁形成異常の検討 図 1

上記の経路が LEC を用いた解析から推定されたのでマウスのリンパ管弁形成過程においても作動しているかを生後 6 日の腸間膜リンパ管において検討した。最初に、免疫組織化学法によりリンパ管の弁形成部位において FOXO1 蛋白はリンパ管内皮細胞の核外に主に局在しており、弁以外の部位では核に局在することが確認された。同時にリン酸化 Akt (AktpSer473) は弁形成部においてのみ検出された。次に、生後 1 - 3 日にタモキシフェンを投与し FOXO1 を Prox1 プロモーターの下でリンパ管内皮細胞特異的に FOXO1 を欠損させたマウス (Foxo1<sup>-/-</sup> LEC) ではリンパ管弁の数が有意に増加していた (図 1A)。逆に、生後 1 - 3 日にタモキシフェンを投与し FOXO1-3A をリンパ管内皮細胞に発現させたマウス (Foxo1Caf/+ ) では有意にリンパ管弁の数が減少していた (図 1B)。次に、この FOXO1-3A でみられたリンパ管弁形成抑制は、PRDM1 の発現を低下させる

ことにより回復させることができるかどうかを検討した。PRDM1 のホモ欠損の場合にはリンパ管形成に異常が起きるためリンパ管形成に異常がみられない PRDM1 のヘテロ欠損を用いた。生後 1 - 3 日でタモキシフェンを投与しリンパ管内皮細胞特異的に FOXO1-3A を発現し、かつ PRDM1 ヘテロ欠損を持つマウス (*Foxo1CA<sup>f/+</sup>; Prdm1<sup>f/+</sup>*) を作製し、生後 6 日で検討した。その結果、リンパ管の弁の数は野生型のレベルまで回復していた (図 1 B)。これらの結果から、マウスにおいても LEC で推定された弁形成の経路が用いられている可能性が高いと考えられた。

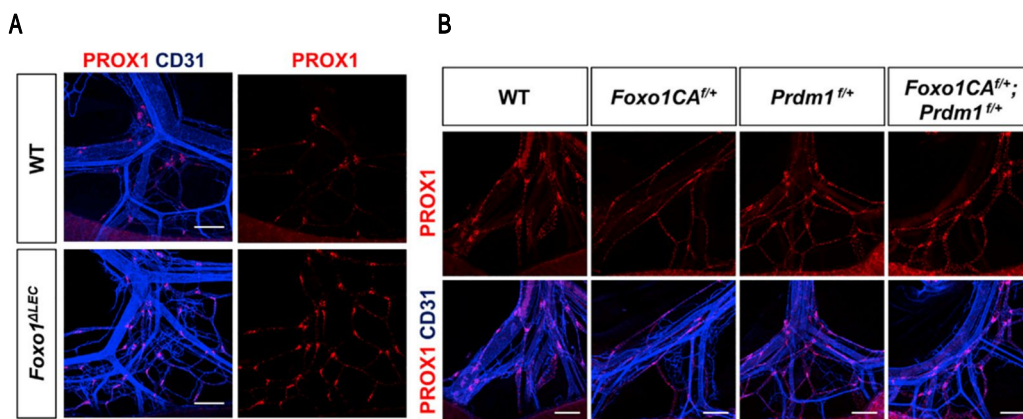


図 1 リンパ管内皮特異的 FOXO1 欠損および活性型 FOXO1 発現マウスにおけるリンパ管弁の異常 (Niimi 2021)

A: リンパ管内皮細胞特異的 FOXO1 欠損マウス (*Foxo1<sup>ΔLEC</sup>*) において弁が増加する。PROX1 が強く発現している部位が弁の位置を示す。CD31 はリンパ管および血管の走行を示す。スケールバーは 100 μm

B: リンパ管内皮細胞特異的活性型 FOXO1 発現マウス (*Foxo1CA<sup>f/+</sup>*) でみとめられる弁形成の異常と *Prdm1* ヘテロ欠損 (*Prdm1<sup>f/+</sup>*) による弁形成異常の回復を示す。スケールバーは 100 μm

以上の本研究によって得られた結果から、OSS 刺激は Akt キナーゼを活性化し FOXO1 の核外移行を介して PRDM1 の発現抑制をひき起こし、その結果、弁形成遺伝子の発現の抑制が解除される、という経路がリンパ管の弁形成の開始に重要な寄与をしていることが示された。

<引用文献>

Sabine, A., Agalarov, Y., Maby-El Hajjami, H., Jaquet, M., Hagerling, R., Pollmann, C., Bebbler, D., Pfenniger, A., Miura, N., Dormond, O., et al. (2012). Mechanotransduction, PROX1, and FOXC2 cooperate to control connexin37 and calcineurin during lymphatic-valve formation. *Dev. Cell* 22, 430-445.

Yang, Y., Cha, B., Motawe, Z.Y., Srinivasan, R.S., and Scallan, J.P. (2019). VE-cadherin is required for lymphatic valve formation and maintenance. *Cell Rep.* 28, 2397-2412.e4.

Niimi, K., Nakae, J., Inagaki, S., Furuyama, T. (2021). FOXO1 represses lymphatic valve formation and maintenance via PRDM1. *Cell Rep.* 37, 110048.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kenta, Nakae Jun, Inagaki Shinobu, Furuyama Tatsuo	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 110048 ~ 110048
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1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、中江淳、稲垣忍、古山達雄
2. 発表標題 FOXO1およびPRDM1によるリンパ管弁形成の抑制機構
3. 学会等名 日本解剖学会
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
---------	---------