

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：26201  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2015～2017  
課題番号：15K08142  
研究課題名(和文)リンパ管形成におけるFoxO1の機能解析

研究課題名(英文)function of FoxO1 in lymphangiogenesis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：リンパ管形成過程はがんの転移や炎症への関与など多くの病気の進展に深くかかわっている。本研究ではFoxO1転写因子の欠損がリンパ管形成にどのような影響を与えるかを、尾のリンパ管形成過程のマウスモデルを用いて解析を行った。内皮細胞特異的にFoxO1を欠損したところ、内皮細胞の移動および増殖異常によるリンパ管網の形成異常が認められた。その原因遺伝子として、FoxO1欠損により最も発現が低下する遺伝子であるCXCR4を新たに見いだした。これらのことからリンパ管形成過程においてFoxO1遺伝子とその下流の遺伝子が重要な寄与をしていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Lymphangiogenesis is involved in many pathophysiology; cancer metastasis, inflammation and lymphedema. In this study, we carried out examination of lymphangiogenesis in tail dermis after birth using mouse model. The specific deletion of FoxO1 in endothelial cells lead to impaired formation of lymphatic vessel network through defects in migration and proliferation of endothelial cells. Moreover, we identified CXCR4 as a candidate of causative gene of this defective phenotype, which was most significantly decreased by reduction of FOXO1 in lymphatic endothelial cells. These findings suggested that Foxo1 and target genes play important roles in lymphangiogenesis.

研究分野：形態形成

キーワード：リンパ管形成 CXCR4 Foxo1

## 1. 研究開始当初の背景

リンパ管形成はがん転移、炎症、浮腫などの過程において重要なプロセスである。腫瘍細胞の転移を抑制するためにはリンパ管形成を阻害することが有効な方法の一つであると考えられる。その基礎として生理的なリンパ管形成に関わる分子の同定が必須であり、これまでも多くの分子の関与が明らかになっている。リンパ管の形成過程は、胎生11日頃に主静脈の血管内皮細胞の一部がリンパ管内皮前駆細胞となり、それがリンパ管内皮細胞に分化し、主静脈から出芽してやがてリンパ管網へと進んでいく。このことから血管と深い関係を持ち、血管形成関連分子の多くはリンパ管形成にも強く関与している。たとえば VEGFR3、Notch シグナル経路、Ang2 などは両者の形成過程に必須である。実際にこれらの遺伝子を欠失するマウスでは血管、リンパ管形成異常が生じることが報告されている。またリンパ管系は、その形成過程と構造において血管系といくつかの点で大きく異なる。たとえばリンパ管は末端が盲端になっている、弁が存在する、動静脈に分かれていない、静脈から出芽してくる、などの特徴を有する。そのためこれらの過程に必要な遺伝子がリンパ管形成過程では特異的に発現してくる。たとえば Prox-1 や FoxC2 などが知られている。実際にこれらの遺伝子を欠失するマウスではリンパ管形成や弁形成に異常が生じることが知られている。

Foxo1 は、インシュリンシグナル経路の末端で作用する転写因子であり、細胞増殖、細胞分化、細胞死、代謝調節、酸化ストレス、オートファジーなどのさまざまな生理現象の調節に関与する。さらに Foxo1 は、さまざまなシグナル経路を介して活性化した Akt キナーゼによりリン酸化されることにより核から細胞質に移動して転写活性化能を失う。これ以外にもヒストン脱アセチル化酵素 Sirt1 タンパクにより脱アセチル化されることで転写活性が調節されている。

われわれは Foxo1 遺伝子欠失マウスの作成を行い、血管形成の異常により胎生10日頃に致死となることを明らかにした。さらに Tie2-CreER を用いて血管内皮細胞特異的 Foxo1 欠損マウスの作成をおこない、生後に血管形成が進行するモデルである網膜血管形成過程にも異常が生じることが明らかにした。

## 2. 研究の目的

血管形成に必須の遺伝子はリンパ管形成過程にも関与する可能性が高いことから、Foxo1 はリンパ管形成過程においても生理的な機能を持つ可能性が高い。Tie2-CreER ないし VE-cadherinCreER のタモキシフェン投与によりリンパ管内皮細胞において Foxo1 を欠失したマウスを用いてリンパ管形成過程における Foxo1 欠失の影響を調べる。リンパ管形成に異常が見つかった場合には、その原因

遺伝子の同定を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) Tie2-CreER or VE-cadherinCreER ; Foxo1flox/flox マウスに生後1, 2, 3日にタモキシフェン 0.2mg を連続腹腔内投与することにより、尾のリンパ管内皮細胞の Foxo1 を欠損させた。マウスの尾の表在リンパ管網の形成は生後すぐに始まり、日を追うごとに網の目状の形態をとって進行していく。この過程をリンパ管内皮細胞のマーカーである LYVE-1 抗体を用いた免疫組織化学法にて経時的に追跡した。タモキシフェン処理後、生後3, 5, 7日で尾を回収し、20mMEDTA を含んだ PBS に37、16時間漬けた後、表皮を取り除き、3mm 四方に切ったものを、2%PFA にて5分反応後、PBS で洗い、100%メタノールに入れて -20 にて保存する。以降は通常の免疫組織化学法にしたがって行った。

(2)(1)で異常が観察されたため、Foxo1 転写因子の欠損により発現が変動した遺伝子が原因となってリンパ管形成に異常が生じたと考えられた。そのような遺伝子を同定するため、ヒト皮膚リンパ管内皮細胞(HDLEC、Promocel)を用い Foxo1siRNA (Dharmacon) を RNAiMax (LifeTec) にてトランスフェクションしてノックダウンさせたもの、同様にコントロール siRNA を投与したもの、それぞれから RNA を抽出し、タカラバイオ社の Agilent ヒト 8x 60K DNA アレイによる受託解析を行った。得られた結果から、最も発現の低下していた CXCR4 を候補として抽出し、定量 PCR 法にて発現変化を確認した。さらにそれがリンパ管内皮細胞において Foxo1 欠損内皮細胞で発現変動していることを免疫組織化学法にて確認した。さらに CXCR4 プロモーターの解析を、レポーターアッセイおよび CHIP アッセイにより行った。同時に HDLEC において Foxo1 欠損により CXCL12 への化学走性への影響を migration アッセイにより検討した。

また Foxo1 は、細胞周期、アポトーシスの調節をすることが知られているので、リンパ管内皮細胞の増殖やアポトーシスの量に変動が無いかを検討した。そのため BrdU を尾の回収1時間前に腹腔内投与し、抗 BrdU 抗体の免疫組織化学法により BrdU 陽性細胞数をカウントし、Foxo1 欠損のリンパ管内皮細胞の増殖への影響を検討した。またアポトーシスをおこしているリンパ管内皮細胞数を検出するため、活性化型カスパーゼ3抗体により Foxo1 欠損のアポトーシスへの影響を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 内皮細胞特異的 Foxo1 欠損による尾の真皮リンパ管形成異常

Tie2-CreER or VE-cadherinCreER ; Foxo1flox/flox マウス(Foxo1ECKO)において、Tie2-CreER or VE-cadherinCreER ; Foxo1flox/+ マウス(コントロール)の生後5日の尻尾の真皮でみられる六角形のリンパ管網の形成が、LYVE-1 免疫染色によりわかるよう

に KO で明らかに不良であった(図1)。分岐数は有意に減少し、リンパ管径は有意に太くなっていた。これらに伴って BrdU の取り込み細胞数の有意な増加と、活性型 Caspase3 の有意な減少を伴っていた。これらのことから少なくともリンパ管径の増加は細胞増殖の亢進とアポトーシスの減少によることが示唆された。真皮におけるリンパ管形成過程のより詳細な検討を行った結果、正常なリンパ管形成では、通常みられる特徴的な六角形のリンパ管網が形成されたのち、さらに表層の真皮乳頭に相当する部分に、新たなリンパ管網が形成されることを見いだした。Foxo1ECKO ではこの表層のリンパ管形成にも異常があることから Foxo1 欠損内皮細胞の細胞移動が抑制されていることが示唆された。

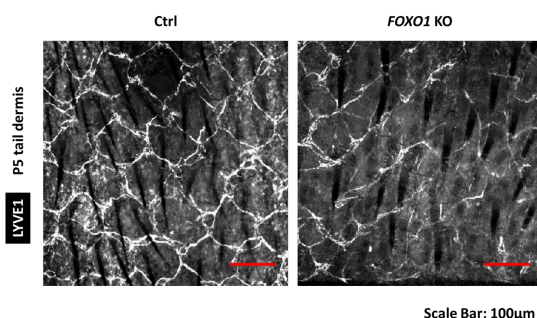


図1 内皮特異的 Foxo1 欠損マウスの生後5日の尾の真皮のリンパ管形成不全

(2)HDLECにおけるFoxo1欠損により発現変動する遺伝子の同定

マイクロアレイ解析により、HDLECにおいて siRNA による Foxo1 の発現抑制により発現低下、発現増加する遺伝子が複数同定された。発現低下する遺伝子には、これまで HUVEC で Foxo1 欠損により発現低下することが知られている ESM1 や ang2 などが含まれていた。発現低下する遺伝子のうち最も大きく発現低下するものとして CXCR4 が同定された。しかし HUVEC では発現変動が報告されていないことから、Foxo1 欠損によりリンパ管内皮細胞に特異的に CXCR4 の発現が変化する可能性が考えられた。RT-PCR、ウエスタンブロット(図2)および細胞免疫染色、さらにマウス個体のレベルでも Foxo1 欠損によりリンパ管内皮での CXCR4 の発現が低下することが確認された。

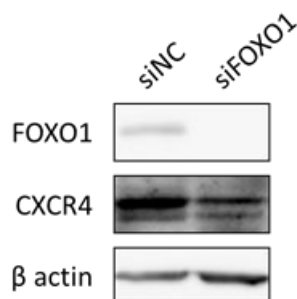


図2 HDLECにおけるFoxo1の発現抑制によるCXCR4蛋白の発現抑制

CXCR4のプロモーター領域中に Foxo1 の結合領域が同定され、レポーターアッセイでも確認されたことから、Foxo1 は CXCR4 の発現をダイレクトに調節していることが示唆された。

HDLECにおいてFoxo1を発現抑制すると、CXCL12に対する化学走性活性が失われることから少なくとも in vitro では Foxo1 は CXCR4 の発現を介してリンパ管内皮細胞の移動を調節している可能性が示唆された。

In vivo において CXCR4 がリンパ管形成過程に関与している可能性をさらに検討するため、CXCR4 の阻害剤である AMD3100 を生後の尾に投与してリンパ管形成過程に異常が生じるかを検討したところ、Foxo1ECKO に類似した異常が認められた。このことから尾の真皮におけるリンパ管形成過程には Foxo1 が必要であり、その作用の一部は CXCR4 の発現を調節することによって発揮されている可能性が強く示唆された。

(3)P2Y1 のリンパ管内皮細胞における発現と Foxo1 による発現調節

マイクロアレイの結果から、Foxo1 の標的候補遺伝子として ATP/ADP の受容体である P2Y1 が見出された。HUVEC では P2Y2 が ATP/ADP の受容体として報告されており、P2Y1 はリンパ管内皮に特異的な受容体と考えられた。HDLEC において Foxo1 依存性に ATP/ADP に対する化学走性が認められることから、リンパ管内皮細胞の ATP/ADP への応答性は Foxo1 を介した P2Y1 の発現に依存する可能性が示唆された。

以上の研究結果から、少なくとも尾の真皮でのリンパ管網形成過程に Foxo1 が必須であること、その作用の一部は CXCR4 を介していることが示された。この現象が他の器官におけるリンパ管形成過程でも見られるか興味があるところであるが、これまでのところ他のリンパ管形成過程において CXCR4 の発現がみられないことから、一部の器官・組織でのリンパ管形成過程に特異な現象であると思われる。実際に、ゼブラフィッシュの体幹側壁リンパ管の形成過程や腫瘍の新生リンパ管形成過程においても CXCR4 陽性のリンパ管内皮細胞が現れることが報告されている。今後、様々な部位におけるリンパ管形成過程を詳細に検討することにより新たな CXCR4 依存性、Foxo1 依存性のリンパ管形成過程が見つかる可能性がある。

## 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2件)

Moe Fukumoto, Kanako Kondo, Kazumasa Uni, Tomoko Ishiguro, Mikiko Hayashi, Shinnosuke Ueda, Itsuki Mori, Kenta Niimi,

Fumi Tashiro, Satsuki Miyazaki, Jun-Ichi Miyazaki, Shinobu Inagaki and Tatsuo Furuyama Tip-cell behavior is regulated by transcription factor Foxo1 under hypoxic conditions in developing mouse retinas. Angiogenesis 21(2): 203-214, 2018 査読有 DOI: 10.1007/s10456-017-9588-z

Kenta Niimi, Mizuha Ueda, Moe Fukumoto,, Misaki Kohara, Toshinori Sawano, Ryo Tsuchihashi, Satoshi Shibata, Shinobu Inagaki and Tatsuo Furuyama Transcription factor FOXO1 promotes cell migration toward exogenous ATP via controlling P2Y1 receptor expression in lymphatic endothelial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 489(4): 413-419, 2017 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.156

〔学会発表〕(計4件)

新美健太、上田瑞葉、福本萌、稲垣忍、古山達雄 FOXO1 転写因子はリンパ管内皮細胞のATP依存性遊走を調節する 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会 東京都武蔵野市 2018年

新美健太、香原美咲、福本萌、稲垣忍、古山達雄 転写因子 FOXO1 および CXCL12-CXCR4 系によるリンパ管新生の制御 2017年度生命科学系学会合同年次大会 兵庫県神戸市 2017年

新美健太、香原美咲、福本萌、稲垣忍、古山達雄 CXCL12-CXCR4 系および FOXO1 によるリンパ管内皮細胞の遊走能・増殖能調節 第122回日本解剖学会総会 長崎県長崎市 2017年

福本萌、上田瑞葉、新美健太、稲垣忍、古山達雄 血管内皮 Foxo1 欠損による pericyte への影響 第121回日本解剖学会総会 福島県郡山市 2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

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・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：90151571

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )