

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570229

研究課題名（和文） FOXO転写因子による血管新生の制御メカニズム

研究課題名（英文） Regulation of angiogenesis by FOXO transcription factors

研究代表者

小川 峰太郎 (OGAWA MINETARO)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：70194454

研究成果の概要（和文）：血管が正常に発生するために必要なタンパクである Foxo1 の機能について胚性幹細胞の培養を用いて解析した。Foxo1 が血管内皮細胞の「かたち」を調節し、さらに血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の接着を促すことによって血管を正常に発生させることを明らかにした。Foxo1 は他の遺伝子の発現を制御するタンパクであるが、どの遺伝子を制御することが血管の発生に必要なのか探索を行い、その候補となる遺伝子を同定した。

研究成果の概要（英文）：The function of Foxo1, a transcription factor which is essential for vascular development, was investigated by using an ES cell culture system. We found that Foxo1 modulates the morphological response of vascular endothelial cells to various angiogenic stimuli and the recruitment of vascular smooth muscle cells to the endothelium, thereby regulating angiogenesis and vascular maturation. A candidate of the Foxo1 target gene which might be involved in the morphological regulation of endothelial cells has been identified by using a functional screening analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011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：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：器官形成・血管新生

1. 研究開始当初の背景

血管の発生は、血管芽細胞から分化した血管内皮細胞が原始的な血管叢を形成する脈管形成過程、既存の血管から新たな血管が出芽して階層性のある血管網へ発達する血管新生過程、血管平滑筋細胞が付随する血管成熟過程等の各段階を経て進行する。血管新生のメカニズムを解明することは、血管の個体発生機序を理解するだけでなく、病的・治

療的な血管新生を制御する方法の確立につながる重要な課題である。血管新生は血管内皮細胞において多くの細胞生物学的プロセスが協調的に作用することにより進行する。ノックアウトマウスの表現型解析から、VEGF（血管内皮増殖因子）に代表される多くのシグナル分子が血管新生に必要なことが示された。しかし、これらのシグナルがどのように血管新生の細胞生物学的プロセスを

調節するのか、殆ど理解されていない。

研究代表者らは、マウス ES 細胞の試験管内分化系を用いて血管内皮細胞の細胞生物学的解析を行ってきた。ES 細胞から分化誘導した血管内皮細胞は、発生過程にある血管内皮細胞が VEGF などの血管新生刺激に応答して起こす細胞伸長などの形態変化、接着様態の変化、細胞運動などを解析するのに有用な材料である。

本研究で着目するフォークヘッドボックス転写因子 Foxo ファミリーは、代謝ストレスに応答して糖新生を促進し、細胞を休止状態にする転写因子として知られている。一方、*Foxo1* ノックアウトマウスは血管新生の不全のため胎生致死となることが研究代表者及び他の研究グループにより見いだされており (Furuyama *et al.*, J. Biol. Chem. 2004; Hosaka *et al.*, PNAS 2004)、血管内皮細胞において Foxo 転写因子が未知の役割を担っていることが示唆された。マウス ES 細胞分化系を利用して血管新生における Foxo 転写因子の機能を明らかにすることにより、血管新生の細胞生物学的制御機構の解明に繋がると考えられた。

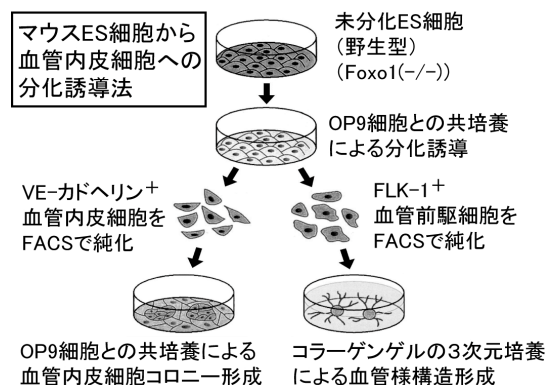
2. 研究の目的

本研究は、以下の項目について明らかにすることを目的とした。

- (1) Foxo 転写因子が血管内皮細胞の伸長反応を調節する分子メカニズム
- (2) 血管新生刺激が Foxo 転写因子の機能を調節する分子メカニズム
- (3) Foxo 転写因子による細胞形態調節機能が生体の血管新生を制御するメカニズム

3. 研究の方法

本研究では、マウス ES 細胞の試験管内分化誘導による血管内皮形成を主たる実験系として用いた。



野生型もしくは *Foxo1*(-/-) ES 細胞から VE-カドヘリン⁺血管内皮細胞を分化誘導し、これをフローサイトメトリーで純化して OP9 ストロマ細胞と共培養することにより血管内

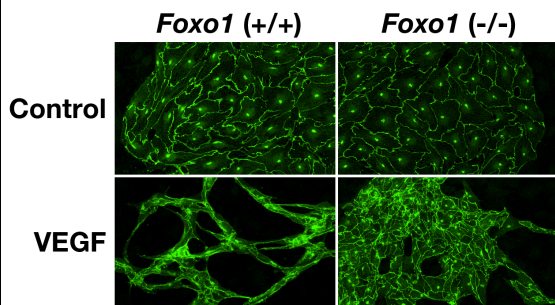
皮細胞コロニーを得た。共焦点顕微鏡等を用いて血管内皮細胞の形態変化を詳細に観察・比較した。また、ES 細胞から Flk-1⁺血管前駆細胞を分化誘導し、これをフローサイトメトリーで純化してコラーゲンゲル内で 3 次元培養を行い血管様構造を形成させた。血管内皮細胞の形態と血管内皮・平滑筋細胞の接着様態を共焦点顕微鏡等を用いて詳細に検討した。

ES 細胞は遺伝子導入が容易である点で非常に優れている。本研究では、CAG プロモーターによる恒常的遺伝子発現系、Tet-off システムによる誘導的遺伝子発現系、VE-カドヘリン遺伝子プロモーターによる血管内皮細胞特異的遺伝子発現系、*Mef2c* 遺伝子エンハンサーによる血管前駆・内皮細胞特異的遺伝子発現系を駆使して、遺伝子機能の探索を行った。

4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞の形態的応答と血管新生

マウス ES 細胞から分化誘導した血管内皮細胞を OP9 ストロマ細胞と共培養することにより得られる血管内皮細胞コロニーの解析から、低濃度の VEGF 存在下では血管内皮細胞は平板状のコロニーを形成するが、高濃度の VEGF 存在下では紐状のコロニーを形成することが報告されていた (Hirashiwa *et al.*, Blood 1999)。本研究では最初に、VEGF の強いシグナルが血管内皮細胞に引き起こす形態変化として、細胞重層と細胞伸長の二つの反応を定義付けた。その上で、*Foxo1*(-/-) ES 細胞から分化誘導した血管内皮細胞は高濃度の VEGF 存在下で重層化するものの伸長反応を示さないことを明らかにし、血管内皮細胞の VEGF 依存的細胞伸長応答に *Foxo1* 転写因子が関与することを示唆した。



TGF- β は、VEGF と並んで血管新生を制御する因子として知られているが、本研究では、VEGF と同様に TGF- β の添加が血管内皮細胞の伸長を引き起こすことを見いだした。TGF- β による細胞伸長誘導は低濃度の VEGF に依存していること、*Foxo1*(-/-) 血管内皮細胞は TGF- β に対する細胞伸長応答も示さないことを明らかにし、VEGF シグナルと TGF- β シグナルが相乗的且つ *Foxo1* 依存的に血管内皮

細胞の伸長を誘導することを示唆した (Matsukawa *et al.*, Genes Cells 2009)。

以上の結果は、血管新生因子が血管内皮細胞の形態調節を行うことによって血管新生を制御しており、Foxo1 転写因子が血管内皮細胞の形態調節に必須の役割を持つことを示唆している。今後は、血管内皮細胞の形態応答がどのようなシグナル伝達経路によって調節されるのか明らかにする必要がある。

(2) Foxo ファミリー転写因子の機能的差異

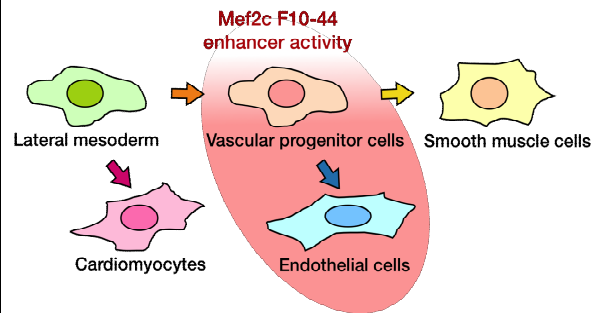
Foxo1(-/-) マウスは血管形成不全により胎生致死であるが、Foxo ファミリーの他のメンバーである Foxo3(-/-) マウスでは血管形成異常は報告されていない。Foxo1 と Foxo3 の標的遺伝子はほぼ重複していると考えられるが、ES 細胞から分化誘導した血管内皮細胞は Foxo3 を発現していない。血管内皮細胞の形態調節において Foxo1 の機能に特異性があるかどうか確かめるために、Foxo1(-/-) 血管内皮細胞の形態異常を Foxo3 が代替して回復させるかどうか検討した。Tet-Off システムにより Foxo3 を発現誘導できる Foxo1(-/-) ES 細胞を作製し、分化誘導した Foxo1(-/-) 血管内皮細胞に Foxo3 を発現させ、VEGF に対する形態的応答を観察した。その結果、早い分化段階の血管内皮細胞では Foxo3 は Foxo1 に代替して細胞形態を回復させることができないが、遅い分化段階の血管内皮細胞では Foxo1 と Foxo3 は同じ機能を持ち得ることを明らかにした (Matsukawa *et al.*, Genes Cells 2009)。この結果は、Foxo ファミリーのメンバー間で機能的な差異があることを明確に示したものであり、Foxo1 による血管内皮細胞形態調節の分子メカニズムを解明する上で重要な知見である。

(3) 血管内皮細胞特異的エンハンサー

血管内皮細胞特異的に遺伝子発現を誘導するプロモーター・エンハンサーは内皮細胞の分化過程を特異的に操作するために有用なツールである。血管内皮細胞に特異的であると報告されている Mef2c 遺伝子エンハンサー・エレメント (F10-44) の ES 細胞分化系における活性について検討したところ、F10-44 は血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の 2 分化能を持つ血管前駆細胞でまず活性化され、分化が進行すると血管内皮細胞特異的に活性が維持されることを明らかにした (Tsuji-Tamura *et al.*, 2011)。

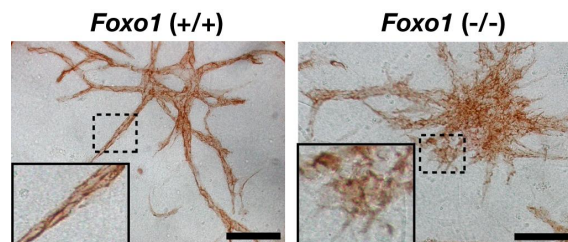
このエレメントは ETS モチーフと FOX モチーフを持つごく短いものであるため、血管前駆・内皮細胞での遺伝子発現誘導ツールとしてのみならず、血管前駆細胞から血管内皮細胞と血管平滑筋細胞が分岐するメカニズムを解明するためのツールとしても重要である。

F10-44 制御下に EGFP を発現する ES 細胞を利用したタイムラプス解析により、(1) 中胚葉における血管前駆細胞の発生、(2) 血管前駆細胞から内皮細胞への分化決定、(3) 内皮細胞の運動と接着による血管新生、までの一連の過程を試験管内で観察する実験系を確立した。今後は、この実験系を用いて、血管内皮の形成過程において Foxo1 の欠損がどのような影響を与えるのか詳細に解析する予定である。



(4) 血管前駆細胞による血管様構造の形成

ES 細胞の試験管内分化系において血管新生過程を再現する方法として、上記のストロマ細胞依存的血管内皮細胞コロニー形成のほかに、I 型コラーゲン・ゲルを用いた 3 次元培養による血管様構造の形成法がある。Foxo1(+/+) 血管前駆細胞を VEGF 存在下に 3 次元培養すると、伸長した血管内皮細胞による紐状の血管様構造が形成されるのに対して、Foxo1(-/-) 血管前駆細胞の 3 次元培養では、血管内皮細胞は伸長せず血管様構造が正常に形成されなかった (Park *et al.*, BBRC 2009)。これは Foxo1(-/-) マウス胎仔の異常な血管形態を模倣するものである。



細胞骨格の状態を解析したところ、正常な血管内皮細胞では繊細な微小管ネットワークが観察されるのに対して、Foxo1(-/-) 血管内皮細胞の微小管は内周付近に蓄積した太い束として観察された。この結果は Foxo1(-/-) 血管内皮細胞における微小管細胞骨格の過剰な安定化を示唆しているが、これが細胞の形態異常を説明し得るか、薬理学的手法も加えて今後検討する必要がある。

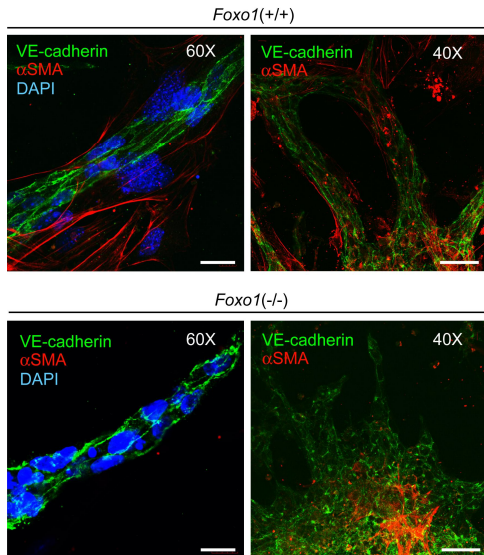
(5) Foxo1 の標的遺伝子の同定

血管内皮細胞の形態調節に関与する Foxo1 転写因子の標的遺伝子を同定するため、野生

型および *Foxo1*(-/-) ES 細胞から VEGF 存在下もしくは非存在下で分化誘導した血管内皮細胞における遺伝子発現を DNA マイクロアレイによる網羅的解析と比較した。その結果、VEGF で刺激された野生型血管内皮細胞だけで増加した遺伝子を 21 個、減少した遺伝子を 54 個同定した。候補遺伝子の中から、心血管系細胞の機能調節における関与が示唆されているものを選択し、*Foxo1*(-/-) ES 細胞に強制発現させて、血管内皮細胞の伸長反応が回復するかどうかを検討した。これまで解析した 17 種類の候補遺伝子のうち、ある種のプロテインホスファターゼ結合因子の遺伝子を導入した *Foxo1* 欠損細胞で伸長機能の回復が認められた (Tsuji-Tamura, 未発表)。この因子は、細胞運動や形態変化の制御に関与するミオシン軽鎖ホスファターゼを調節することが報告されており興味深い。今後、この因子の発現を誘導的に調節する *Foxo1* 欠損 ES 細胞を作製し、血管内皮細胞の細胞伸長における機能について詳細に検討する予定である。

(6) 血管内皮・平滑筋細胞の相互作用

Foxo1 は血管内皮細胞の形態制御による血管新生過程の調節だけでなく、血管平滑筋細胞の血管への会合による血管成熟過程にも関与する可能性を見いだした。



野生型 ES 細胞由来血管前駆細胞の 3 次元培養で形成された血管様構造は血管平滑筋細胞によって覆われているが、*Foxo1*(-/-) ES 細胞由来血管前駆細胞から形成された血管様構造では血管平滑筋細胞による被覆が観察されなかった。*Foxo1*(-/-) 血管前駆細胞も血管平滑筋細胞に分化する能力は有しており、その形態にも異常は認められないが、血管内皮細胞に付随する過程が阻害されることを明らかにした (Park *et al.*, BBRC 2009)。

VE-カドヘリン遺伝子プロモーターを用いて血管内皮細胞特異的に *Foxo1* の発現を回復させると、血管内皮細胞の伸長反応だけでなく血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の会合も回復することから、血管内皮細胞での *Foxo1* の発現が血管内皮・平滑筋細胞相互作用に必要であることが示唆された (Tsuji-Tamura, 未発表)。この結果は、*Foxo1* が血管成熟過程においても重要な役割を担うことを初めて示すものであり、個体レベルでの詳細な検討も含めて、分子的メカニズムの解明が急がれる。

(7) まとめ

Foxo1 は血管の発生において必須の転写因子である。本研究によって、*Foxo1* が血管新生因子シグナルに対する血管内皮細胞の形態的応答を調節することによって血管新生過程を制御することが明らかにされ、血管内皮細胞の形態調節に関与する *Foxo1* 標的候補遺伝子が同定された。さらに、*Foxo1* が血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の会合を促進することによって血管成熟過程を制御する可能性が見いだされた。

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 7 件)

- ①Ishida, M., O. El-Mounayri, S. Kattman, P. Zandstra, H. Sakamoto, M. Ogawa, G. Keller and M. Husain. Regulated expression and role of c-Myb in the cardiovascular-directed differentiation of mouse embryonic stem cells. *Circ. Res.* 110: 253-264, 2012. (査読有り)
- ②Kondo, N., M. Ogawa, H. Wada and S-I. Nishikawa. Thrombin induces rapid disassembly of claudin-5 from the tight junction of endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 315: 2879-2887, 2009. (査読有り)
- ③Park, S-H., H. Sakamoto, K. Tsuji-Tamura, T. Furuyama and M. Ogawa. Foxo1 is essential for in vitro vascular formation from embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390: 861-866, 2009. (査読有り)
- ④Matsukawa, M., H. Sakamoto, M. Kawasuji, T. Furuyama and M. Ogawa. Different roles of Foxo1 and Foxo3 in the control of endothelial cell morphology. *Genes Cells* 14: 1167-1181, 2009. (査読有り)

[学会発表] (計 5 件)

- ①田村-辻潔美, 坂本比呂志, 小川峰太郎. 血管特異的エンハンサー配列を用いた血管

前駆細胞系譜の解析. 第 32 回日本炎症・再生医学会, 2011. 6. 3, 国立京都国際会館、京都.

②田村-辻潔美, 坂本比呂志, 朴勝煥, 小川峰太郎. 転写因子 Foxo1 は血管内皮細胞における細胞形態制御に関与する. 第 31 回日本炎症・再生医学会, 2010. 8. 5, 京王プラザホテル、東京.

③Park, S-H., H. Sakamoto, K. Tsuji-Tamura, T. Furuyama, M. Ogawa. Foxo1 is essential for in vitro vascular formation from embryonic stem cells. 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists Jointly Sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network, 2010. 6. 21, 国立京都国際会館 Kyoto.

④朴勝煥, 坂本比呂志, 小川峰太郎. Role of Foxo1 in the regulation of the morphological response of endothelial cells studied by using a three-dimensional culture system. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009. 12. 10, パシフィコ横浜、神奈川.

⑤小川峰太郎. ES 細胞の試験管内分化による造血発生と血管新生について. 第 4 回日本プロテインホスファターゼ研究会, 2009. 11. 13, 熊本大学.

[図書] (計 1 件)

①Tsuji-Tamura, K., H. Sakamoto and M. Ogawa. ES cell differentiation as a model to study cell biological regulation of vascular development. 'Embryonic Stem Cells: The Hormonal Regulation of Pluripotency and Embryogenesis' ed. Craig Atwood, ISBN 978-953-307-196-1, INTECH, Vienna, Austria, 2011, pp581-606. (査読有り)

[その他]

研究室ホームページ

http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/cell_differentiation/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 峰太郎 (OGAWA MINETARO)
熊本大学・発生医学研究所・教授
研究者番号：70194454

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

坂本 比呂志 (SAKAMOTO HIROSHI)
熊本大学・発生医学研究所・助教
研究者番号：00347014

田村 潔美 (TAMURA KIYOMI)
熊本大学・発生医学研究所・助教
研究者番号：90399973