

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792237

研究課題名(和文) 転写因子 Foxo1 の血管形成の制御機構における役割の解明

研究課題名(英文) The role of Foxo1 transcription factor in the regulation of vascular formation

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：マウスES細胞による血管形成系を用いてFoxo1の役割を検討した。野生型の血管内皮細胞は血管構造を形成する【血管新生】。一方Foxo1欠損細胞では血管構造は見られない。また野生型では内皮細胞と壁細胞が結合する【血管成熟】の過程が見られるが、Foxo1欠損細胞では見られない。野生型とFoxo1欠損細胞について遺伝子発現解析と機能回復実験を行った。その結果、Foxo1の標的遺伝子の候補として、タンパク質ホスファターゼ1結合タンパク質のあるサブタイプを見いだした。また血管内皮細胞特異的Foxo1発現ES細胞の解析によって、【血管成熟】過程でFoxo1が主に血管内皮細胞で機能することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor Forkhead box O1 (Foxo1) (-/-) mice fail to develop vascular structure and are embryonic lethal by E11. So, Foxo1 is essential for the vascular development. However the mechanism is unclear.

In vitro vessel-like structure formation of ES cells are the useful examination system for vascular formation. In this model, vascular endothelial cells (ECs) derived from wild type ES cells showed the long and thin elongated morphology, but Foxo1 (-/-) EC failed to elongate. And, wild type pericytes can associate with wild type EC. Foxo1 (-/-) cells show no-association between EC and pericytes. To identify the Foxo1 target genes that are responsible for the regulation of EC elongation, I analyzed gene expression profiles of ECs and rescue studies of putative target genes. As a result, I identified an putative target gene. Furthermore, analysis of EC specific Foxo1 expressing ES cells show that Foxo1 in EC regulates EC-pericyte association.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯科

キーワード：血管 Foxo1 胚性幹細胞(ES細胞)

1. 研究開始当初の背景

当研究開始当初の背景は以下の通りである。

(1) フォークヘッド型転写因子 Foxo1 の欠損マウスは血管形成不全により胎生致死となる (Furuyama et. al., J Biol Chem, vol. 279, p34741-34749, 2004)。この表現型解析から Foxo1 は血管形成の必須因子であることが示された。しかし Foxo1 が血管形成のどのようなプロセスを調節するのかは明らかではなかった。

(2) マウス ES 細胞を試験管内培養系で分化誘導し、セルソーターで純化した血管内皮細胞を OP9 ストローマ細胞上で培養することで (二次元培養系)、血管内皮細胞の伸長【血管新生】を誘導できる。血管内皮細胞と壁細胞は共通の前駆細胞 (血管前駆細胞) から分化することが知られており、ES 細胞由来の血管前駆細胞を 1 型コラーゲンゲル内で培養することで (三次元培養系)、血管内皮細胞が伸長する【血管新生】から血管内皮に壁細胞が結合し取り囲む【血管成熟】までの血管発生過程を誘導できる。そこで、この血管誘導系において、Foxo1 欠損マウス ES 細胞を用い、血管形成プロセスにおける Foxo1 の役割を解析した。その結果、Foxo1 欠損が【血管内皮細胞の伸長:血管新生 (発芽)】と【血管内皮細胞と壁細胞の結合:血管成熟】という 2 つの血管形成プロセスの異常を引き起こすことを見いだした (Park SH, Sakamoto H, Tsuji-Tamura K, Furuyama T, Ogawa M, Biochem Biophys Res Commun. vol. 390, p861-866, 2009)。

(3) セリン/スレオニンホスファターゼ (脱リン酸化酵素) の PP1 ファミリーは様々な細胞機能の調節に関与しており、その機能は PP1 調節蛋白質の結合によって制御される。タンパク質ホスファターゼ 1 結合タンパク質 (インヒビター):PPP1R のあるサブタイプは、PP1 調節蛋白質であり、PP1 のインヒビターとして働く因子である。Foxo1 欠損血管内皮細胞では、PPP1R の mRNA 発現が減少している。また、Foxo1 欠損による血管内皮細胞の異常 (伸長機能の消失) が、PPP1R の遺伝子導入によって回復することが明らかになった。しかし、血管発生におけるこれら PPP1R の機能の詳細はほとんど知られていない。

(4) アクチン-ミオシン系は、細胞形態の維持、細胞移動、細胞分裂、細胞収縮・張力などの細胞骨格の調節に関与している。特に筋細胞では、Myosin light chane (MLC) の活性化によってアクチン-ミオシン相互作用が開始されるとされており、血管内皮細胞においても、MLC の活性化が血管透過性や張力の維持の調節に機能することが報告されている。MLC の活性化はリン酸化によって制御されており、MLC kinase (MLCK) によりリン酸化され、MLC phosphatase (MLCP) によって脱リン酸化され

る。本研究で着目している PPP1R は MLCP に結合し、その脱リン酸化機能を阻害する因子である。

2. 研究の目的

研究開始当時の背景と、これまでの結果から、Foxo1 は【血管新生】と【血管成熟】の 2 つのプロセスを制御することで血管形成を調節していると考えられる。また、この調節機構には PPP1R が関係することが示唆されている。しかしこれらは従来知られている Foxo1 の機能では説明することが出来ない。本研究では、PPP1R に着目して Foxo1 の分子メカニズムを解析することで、血管形成の新たな調節機構の解明を試みた。以下により具体的な個別目的を示す。

(1) 二次元培養系において、野生型血管内皮細胞は血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の刺激により伸長する。しかし、Foxo1 欠損型では伸長反応が消失し異常な形態となる。この結果から【血管新生】の制御に Foxo1 が関与することが示された。この Foxo1 欠損による血管内皮細胞の伸張機能の消失が、Foxo1 が機能しないことが原因で起こるのか、又は、二次的な細胞機能の変異が原因なのか調べるために、Foxo1 欠損 ES 細胞に Foxo1 遺伝子を導入して、伸張機能が回復するかどうかを検討する、レスキュー実験を行う。

(2) 野生型と Foxo1 欠損血管内皮細胞の遺伝子発現を DAN マイクロアレイで比較したところ、Foxo1 欠損血管内皮細胞では、PPP1R の発現が減少していることが明らかになった。さらに、発現変化を定量的に解析するため、real time PCR を行う。

(3) PPP1R を遺伝子導入された Foxo1 欠損細胞は、血管内皮細胞の伸長機能の消失が回復する。そこで、三次元培養系でも同様に伸張機能の回復が見られるかどうかを解析する。

(4) PPP1R が Foxo1 の転写標的遺伝子ある可能性を検討する。いくつかの核酸のモチーフ検索ツールを用い、転写因子結合部位予測を行う。検索ツールを用いて PPP1R の「推定 Foxo1 結合部位」を選定した後、生化学的方法で Foxo1 による直接的な転写調節の有無を検討する。

(5) PPP1R は MLCP を阻害する因子であることから、PPP1R は MLCP による MLC の脱リン酸化を抑制すると考えられる。そこで、野生型と Foxo1 欠損血管内皮細胞におけるリン酸化 MLC の発現レベルや局在を解析する。また、HUVEC 等の血管内皮細胞では、血清刺激等により、リン酸化 MLC とアクチンとの共局在が増強することが報告されている。よって、野生型と Foxo1 欠損血管内皮細胞における pMLC

とアクチンとの相互作用について解析する。

(6) 三次元培養系において、Foxo1 欠損血管内皮細胞と Foxo1 欠損壁細胞は結合を示さない。よって、Foxo1 は【血管成熟】の調節にも関与することが示された。Foxo1 の欠損によるこの現象は、血管内皮細胞と壁細胞のどちらか一方での Foxo1 欠損に依存するのか、又は両方の細胞での Foxo1 欠損に依存するのかを検討する。

3. 研究の方法

Foxo1は【血管新生】と【血管成熟】を調節する重要な転写因子であるが、その分子機構の詳細は不明である。現在、【血管伸張】におけるFoxo1の転写標的因子としてタンパク質ホスファターゼ1結合タンパク質(インヒビター):PPP1Rのあるサブタイプに着目しており、本研究では、主に、ES細胞による血管誘導系を用いて、Foxo1によるPPP1Rの調節機構、またPPP1Rが調節するアクチン-ミオシン系の関与について解析する。さらに、【血管成熟】における、血管内皮細胞と壁細胞の相互作用については、Foxo1がどちらの細胞に必要なのかを明らかにする。研究の方法を以下に示す。

(1) Foxo1 欠損 ES 細胞に Foxo1 遺伝子を導入し、レスキュー実験を行った。Foxo1 欠損 ES 細胞への Foxo1 の遺伝子導入のために CAG プロモーター (pCAG) による過剰発現系を用いた。また、導入した Foxo1 の発現を確認するために Foxo1 と EGFP の融合蛋白を発現させた (Foxo1EGFP)、この pCAG/Foxo1-EGFP をエレクトロポレーションで導入後、薬剤選択を行い、Foxo1 欠損 ES 細胞由来の Foxo1 過剰発現細胞を作成した [pCAG-Foxo1EGFP/Foxo1 欠損 ES 細胞]。さらに血管内皮細胞特異的な Foxo1 の機能を解析するために、血管内皮細胞の特異的なマーカーである VE-カドヘリンのプロモーター/エンハンサー (pVACD) を用い、血管内皮細胞特異的に Foxo1 を発現させる Foxo1 欠損 ES 細胞由来の細胞を作成した [pVECD-Foxo1/Foxo1 欠損 ES 細胞]。

(2) Foxo1 欠損血管内皮細胞での PPP1R の発現が減少を real time PCR によって、定量的に解析した。野生型と Foxo1 欠損 ES 細胞を分化させ、セルソーターによって (VE-カドヘリン陽性、CD31 陽性) 血管内皮細胞を純化した。これらの細胞の Total RNA を抽出し、Reverse transcription 後、real time PCR による解析を行った。

(3) 二次元培養において、PPP1R を遺伝子導入した Foxo1 欠損細胞は、血管内皮細胞の伸長機能の異常を回復した。そこで、三次元培養でも同様に伸張機能の回復が見られるかどうかを解析した。pCAG-PPP1R プラスミドを Foxo1 欠損 ES 細胞にエレクトロポレーション

によって遺伝子導入し、薬剤選択の後、分化させ、セルソーターによって (Flk1 陽性) 血管前駆細胞を純化した。純化した血管前駆細胞を、細胞集塊 (スフェロイド) 形成用プレートで 18 時間培養して凝集塊を作成し、これを 1 型コラーゲンゲル内に包埋し三次元培養した。培養 4 日後、培養サンプルを脱水し、4%パラホルムアルデヒドで 37、15 分固定後、VE-カドヘリン抗体で染色し、共焦点顕微鏡でコロニー形態の解析を行った。

(4) PPP1R が Foxo1 の転写標的遺伝子であるかどうかを解析した。まず転写因子結合部位予測を行った。転写因子結合部位予測には、rVista 2.0, DBCLS Galaxy、又は TFSEARCH 等の核酸のモチーフ検索ツールを使用した。検索には、ヒトとマウス PPP1R の上流とイントロン配列を用い、ヒトとマウスで保存されている領域で、さらに Foxo1 のコンセンサス配列と高い相同性を持つ配列が複数存在する部分を「推定 Foxo1 結合部位」の候補として選択した。その後、レポーターアッセイ等によって、「推定 Foxo1 結合部位」による転写活性があるかどうかを解析した。

(5) 野生型と Foxo1 欠損血管内皮細胞におけるリン酸化 MLC の発現レベルや局在を解析した。血管内皮細胞の伸張部分でのリン酸化 MLC 発現を解析するため、三次元培養系で血管誘導を行い、三次元ゲルを脱水し、固定後、免疫染色を行った。染色は、VE カドヘリン (血管内皮細胞のマーカー)、リン酸化 MLC、また Total MLC を用いた三重染色を行い、血管内皮細胞での Total MLC に対するリン酸化 MLC の比を解析した。さらに、VE カドヘリン、リン酸化 MLC、phalloidin (F-actin 染色) を用いた三重染色によって、血管内皮細胞でのリン酸化 MLC とアクチンの相互作用を解析した。

(6) Foxo1 欠損細胞では、血管内皮細胞と壁細胞の結合が見られない。この原因がどちらの細胞での Foxo1 欠損にあるのかを解析するため、野生型と Foxo1 欠損細胞の混合培養を行った。混合培養には、GFP 発現陽性の Foxo1 欠損 ES 細胞と GFP 陰性の野生型 ES 細胞を用いた。それぞれの ES 細胞から分化した FLK1 陽性の血管前駆細胞をセルソーターで純化し、スフェロイド形成用プレートで 18 時間培養し、野生型と Foxo1 欠損細胞を 1:1 の割合で混和し凝集塊を作成する。これを 1 型コラーゲンゲル内に包埋し 4 日間三次元培養した後、培養サンプルを脱水し、4%パラホルムアルデヒドで 37、15 分固定後、VE-カドヘリン抗体 (血管内皮細胞マーカー) と smooth muscle actin (壁細胞マーカー) また GFP (Foxo1 欠損細胞で陽性となる) で三重染色し、血管内皮細胞と壁細胞の結合を共焦点顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

本研究では、【血管新生】と【血管成熟】の二つの血管形成過程の調節において、Foxo1がどのような役割を果たすのかを解析した。

【血管新生】における機能の解析では、Foxo1が、PPP1Rを介してミオシン軽鎖のリン酸化を調節することで、血管内皮細胞の伸張を促進する知見が得られた。また、【血管成熟】における機能の解析では、Foxo1陽性血管内皮細胞は、Foxo1陽性又は陰性のどちらの壁細胞とも結合できることが示され、この結果からFoxo1は主に血管内皮細胞で働き、血管成熟を誘導することが示唆された。本研究成果の詳細を以下に示す。

(1) Foxo1 欠損 ES 細胞に、Foxo1 遺伝子を導入してレスキュー実験を行った。Foxo1EGFP 融合タンパク質を発現する Foxo1 欠損 ES 細胞を作成した [pCAG-Foxo1EGFP/Foxo1 欠損 ES 細胞]。この細胞から分化した血管内皮細胞をセルソーターで純化し、OP9 フィーダー細胞上で培養した。培養3日後に、2%パラホルムアルデヒドで37、15分固定後、VE-カドヘリンとGFP抗体で二重染色し、共焦点顕微鏡下でコロニー形態の解析を行った。その結果、Foxo1を導入したFoxo1欠損血管内皮細胞は、野生型と同様に伸張機能の回復が見られた。また、血管内皮細胞でのFoxo1の機能を解析するために、血管内皮細胞特異的にFoxo1を発現するFoxo1欠損ES細胞を作成した [pVECD-Foxo1/Foxo1欠損ES細胞]。この細胞から分化した血管内皮細胞を用いて、二次元培養系で血管誘導を行ったところ、野生型と同様に伸張機能の回復が見られた。よって、Foxo1欠損による血管内皮細胞の伸張機能の消失は、二次的な細胞機能の変異のためではなく、Foxo1の機能喪失に起因すると考えられる。

(2) 野生型とFoxo1欠損血管内皮細胞について、real time PCRによる定量的なPPP1Rの発現解析を行った結果、野生型に比較して、Foxo1欠損血管内皮細胞ではPPP1Rの発現が有意に減少していることが明らかになった。この結果はDNAアレイの結果と一致している。

(3) 三次元培養において、PPP1Rを遺伝子導入したFoxo1欠損血管内皮細胞が、伸長機能の異常を回復するかどうかを解析した。pCAG-PPP1Rを導入したFoxo1欠損ES細胞分化させ、セルソーターによって純化した血管前駆細胞によって凝集塊を作成し、これを1型コラーゲンゲル内に包埋し三次元培養した。培養4日後、VE-カドヘリン抗体で綿系染色し、共焦点顕微鏡でコロニー形態の解析を行った。その結果、三次元培養系においても二次元系と同様に、Foxo1欠損による血管内皮細胞の伸張機能がPPP1Rの導入によって回復することが示された。

(4) PPP1RがFoxo1の転写標的遺伝子である可能性を検討した。まず核酸のモチーフ検索ツールを使用し、「推定Foxo1結合部位」を予測した。その結果、PPP1Rにはヒトとマウスで相関性が高い領域にFoxo1の結合配列が複数存在する部分があることが明らかになった。そこでまず、この推定結合配列を含む領域についてルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、この領域のエンハンサー活性の可能性が示唆される結果を得た。

(5) 三次元培養系において野生型とFoxo1欠損血管内皮細胞におけるリン酸化MLCの発現と局在を解析した。VEカドヘリン、リン酸化MLC、またTotalMLCを用いた三重染色を行い、血管内皮細胞における、TotalMLCに対するリン酸化MLCの比を解析した結果、野生型ではリン酸化MLCが細胞辺縁に多く局在していることが明らかになった。一方、Foxo1欠損血管内皮細胞では、細胞辺縁でのリン酸化MLCが減少しており、点状に凝集した異常な局在を示した。また、野生型では細胞辺縁付近においてリン酸化MLCとアクチンの共局在が見られた。しかし、Foxo1欠損細胞では、リン酸化MLCとアクチンの共局在が減少していた。

(6) Foxo1欠損細胞では、血管内皮細胞と壁細胞の結合が見られない。この原因がどちらの細胞でのFoxo1欠損にあるのかを解析するため、まず、野生型とGFP発現Foxo1欠損細胞の三次元系での混合培養を行った。混合培養後、VE-カドヘリン抗体(血管内皮細胞マーカー)とsmooth muscle actin(壁細胞マーカー)また、GFP(Foxo1欠損細胞で陽性となる)で三重染色し、血管内皮細胞と壁細胞の結合を共焦点顕微鏡下で観察した。その結果、Foxo1欠損壁細胞は野生型血管内皮細胞に結合することが明らかになった。興味深いことに、野生型の血管内皮細胞と隣接又は結合しているFoxo1欠損血管内皮細胞は伸張機能を示した。そのため、野生型壁細胞がFoxo1欠損血管内皮細胞に結合するかどうかを解析することは、この混合培養系では困難であることが分かった。そこで次に、研究の方法(1)で作成した、血管内皮細胞特異的にFoxo1を発現するFoxo1欠損ES細胞由来の細胞[pVECD-Foxo1/Foxo1欠損ES細胞]を三次元培養し、血管内皮細胞(Foxo1陽性)と壁細胞(Foxo1陰性)の相互作用を解析した。三次元培養系においても二次元系と同様に、Foxo1発現血管内皮細胞は伸張機能を示した。また、Foxo1欠損壁細胞は、Foxo1発現血管内皮細胞に野生型と同様に結合することが明らかになった。これらの結果から、Foxo1は主に血管内皮細胞で機能していると考えられる。

(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 1 件)

1. Tan KS, Tamura K, Lai MI, Veerakumarasivam A, Nakanishi Y, Ogawa M, Sugiyama D., Molecular pathways governing development of vascular endothelial cells from ES/iPS cells, Stem Cell Rev. 2013, vol. 9, p586-598. doi:10.1007/s12015-013-9450-7, (査読あり)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 田村-辻 潔美, 坂本 比呂志, 小川 峰太郎, Regulation of vascular morphogenesis by Foxo1 transcription factor via phospho-myosin light chain, 第 2 回 Inflammation and Regeneration Meeting, 2014.1.17-18, 品川プリンスホテル, 東京

2. Hiroshi Sakamoto¹, Naoki Takeda, Kiyomi Tsuji-Tamura, Saeka Hirota, Atsushi Hashiguchi, Tazir Ahmed and Minetaro Ogawa, 休眠状態の血液幹細胞は、転写因子 c-myb の発現レベルを低く保っている, 第 75 回日本血液学会学術集会, 2013.10.11-13, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館, 札幌

3. 田村-辻 潔美, 坂本 比呂志, 小川 峰太郎, 転写因子 Foxo1 による血管内皮細胞の形態制御メカニズムの解析, 第 34 回日本炎症・再生医学会, 2013.7.2-3, 国立京都国際会館, 京都

4. Hiroshi Sakamoto, Naoki Takeda, Kiyomi Tsuji-Tamura, Saeka Hirota and Minetaro Ogawa, Levels of the c-Myb Protein Indicate Repopulating Capacity in Long-Term Hematopoietic Stem Cells, 2012 ASH Annual Meeting and Exposition, December 8-11, 2012, Atlanta, GA, USA

5. Hiroshi Sakamoto, Naoki Takeda, Paloma Garcia, Kiyomi Tsuji-Tamura, Saeka Hirota, Jon Frampton and Minetaro Ogawa, Expression and function of c-Myb in hematopoietic stem cells, 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012.10.19-21, 国立京都国際会館, 京都

6. 田村-辻 潔美, 坂本 比呂志, 小川 峰太郎, 血管内皮細胞の形態制御に関する転写因子 Foxo1 の標的因子の探索, 第 33 回日本炎症・再生医学会, 2012.7.5-6, ホテル日航福岡, 福岡

7. Hiroshi Sakamoto, Takeda Naoki, Paloma

Garcia, Kiyomi Tsuji-Tamura, Saeka Hirota, Jon Frampton, Minetaro Ogawa, Expression and function of c-Myb in hematopoietic stem cells, 第 10 回幹細胞シンポジウム, 2012.5.31,-6.2. 淡路夢舞台国際会議場, 淡路島

〔図書〕(計 1 件)

1. 坂本比呂志, 田村潔美, 小川峰太郎, 微小環境の血液幹細胞への働きかけ 誕生から骨髄での維持まで, 実験医学増刊-臓器円環による生体恒常性のダイナミクス, 永井良三, 入来篤史/編, 羊土社, Vol.31 No.5, p222 (p38-42), 2013, ISBN 978-4-7581-0329-9

6. 研究組織

(1)研究代表者

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