

香川県立保健医療大学リポジトリ

ケモカインリガンドCXCL12による刺激がリンパ管内皮細胞において内在性FOXO1転写因子の活性に及ぼす影響の検討

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2021-06-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 新美, 健太, 古山, 達雄, Niimi, Kenta, Furuyama, Tatsuo メールアドレス: 所属:
URL	https://kagawa-puhs.repo.nii.ac.jp/records/224

ケモカインリガンドCXCL12による刺激がリンパ管内皮細胞において 内在性FOXO1転写因子の活性に及ぼす影響の検討

新美 健太^{1) 2)}*, 古山 達雄²⁾

¹⁾ 香川県立保健医療大学教養部

²⁾ 大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻神経生物学

要旨

近年, C-X-C chemokine ligand 12 (CXCL12) が腫瘍リンパ管新生を誘導する因子であることが報告され, リンパ行性転移優位な悪性腫瘍の治療標的候補分子として注目されているが, その分子機構には不明な点が多い. 我々は今回, 初代培養リンパ管内皮細胞 (LEC) を用い CXCL12 による刺激がどのような細胞内シグナル経路を活性化するかを検討し, それにより LEC に多量に発現する転写因子 FOXO1 の活性が制御されるか検討を試みた. まず LEC の培養上清中に CXCL12 を添加したところ, CXCL12 の添加濃度・時間依存的に細胞内 Akt の活性化が見られた. 一般に, 活性化 Akt は FOXO1 をリン酸化し, 細胞質へ局在制御することで転写活性を負に制御することが知られている. これに従って CXCL12 を LEC 培養上清中に添加すると, FOXO1 がリン酸化され核内局在率が減少した. さらに LEC の培養上清中に CXCL12 を添加することにより, FOXO1 の転写標的である幾つかのサイクリン依存性キナーゼインヒビターのうち *CDKN1A* および *CDKN1B* の発現がわずかに減少した. これらの結果は, LEC における FOXO1 が CXCL12 の刺激に応答してその転写活性を負に制御されていることを示唆し, CXCL12 に依存するリンパ管新生を理解するうえで重要な洞察を与えるものである.

Key Words: リンパ管新生 (lymphangiogenesis), 内皮細胞 (endothelial cell), C-X-C ケモカインリガンド 12 (CXCL12), フォークヘッドボックス転写因子 O1 (FOXO1)

はじめに

リンパ管新生 (lymphangiogenesis) は既存のリンパ管からの新規リンパ管の出芽現象であり, 個体の発生過程はもちろん, リンパ浮腫・悪性腫瘍等の進展にも関与する病理学的な観点からも重要な現象である^{1, 2)}. しかしそのような重要性にもかかわらず血管新生研究と比較して歴史が浅く, その分子機構について解明されていない部分も多い分野である. リンパ管新生は主として2つの段階からなるプロセスである²⁾. 1つ目はリンパ管内皮細胞 (lymphatic endothelial cells: LEC) が適当な遊走誘引物質の濃度勾配に従って, 既存のリンパ管網から出芽するように遊走する過程である. 2つ目は遊走した先で LEC がサイトカイン等の刺激により増殖する過程である. LEC に対して出芽遊走活性や増殖

活性を持つサイトカインとしては vascular endothelial growth factor (VEGF) -C および -D が最もよく知られており³⁻⁶⁾, 実際 *Vegfc* 遺伝子やそのレセプターである VEGF Receptor 3 をコードする *Vegfr3* 遺伝子のノックアウトマウスは著しいリンパ管網の欠失により胎生致死であることが報告されている^{7, 8)}. その他にも fibroblast growth factor-2, angiopoietin-1, insulin-like growth factor-1-2, platelet derived growth factor-BB などがリンパ管新生を誘導する因子であると報告されている⁹⁾. 近年の研究で, ケモカインリガンドの1種である C-X-C Chemokine Ligand 12 (CXCL12) は LEC に対する走化性因子であり *in vitro* の LEC 管腔形成能を亢進させる因子であることが新たに報告された¹⁰⁾. しかし実際に CXCL12 が LEC の生理学的機能を調節するにあたり, LEC 内でどのような分子メカニズムが働いているの

* 連絡先: 〒761-0123 香川県高松市牟礼町原281-1 香川県立保健医療大学教養部 新美健太

E-mail: niimi-k@chs.pref.kagawa.jp

<受付日 2018年9月21日> <受理日 2018年11月8日>

かに関して詳細は不明のままである。

Forkhead Box (FOX) transcription factor O (FOXO) family は FOXO1, FOXO3a, FOXO4, FOXO6 からなる転写因子群で、線虫における寿命調節遺伝子 *DAF-16* の哺乳類ホモログである¹¹⁾。FOXO が転写標的とする遺伝子はアポトーシスエフェクター (*BCL2L1*, *FASLG*)、サイクリン依存性キナーゼインヒビター (*CDKN1A*, *CDKN1B*)、酸化ストレス除去酵素 (*CAT*, *SOD2*)、糖代謝関連酵素 (*G6PD*) など多岐に渡り、多彩な生理機能を調節する転写因子である¹¹⁻¹³⁾。このうち FOXO1 は内皮細胞に豊富に発現しており、我々は FOXO1 の欠失マウスは著しい血管形成不全により胎生致死であることを報告している¹⁴⁾。また我々および Wilhelm らのグループは個体発生期に内皮細胞において特異的に FOXO1 を欠失することによって網膜の血管新生異常が見られることを過去に報告している^{15,16)}。しかし LEC における FOXO1 の機能については、我々が *in vitro* において ATP 依存的に遊走の調節に関与していることを報告した¹⁷⁾ものの、現在までのところ報告が少なく興味深い分野である。FOXO1 の転写活性は核内において発揮されるため、核内・核外の移行により動的に調節される。一般的な理解として、例えばインスリン様増殖因子がその受容体に受容されるなど細胞に何らかの刺激が入り PI3K/Akt 経路が活性化されると、リン酸化された Akt が核内において FOXO1 の定められた部位をリン酸化し、それにより細胞質の 14-3-3 タンパク質にトラップされることにより FOXO1 は核外へ移行し結果的に転写活性は負に調節され標的遺伝子の発現減少に至る^{11,12,18)}。この転写活性調節は FOXO1 を発現する多くの細胞種において共通の機構である。

今回我々は、CXCL12 が LEC における FOXO1 の転写活性を調節することによりリンパ管新生活性をもたらしている可能性について検討するため、初代培養 LEC に CXCL12 リコンビナントタンパク質を添加し、LEC における細胞内シグナルの変化とそれに伴う FOXO1 転写活性の変化の観察を試みた。

方 法

1) 細胞培養

初代培養ヒト皮膚リンパ管内皮細胞 (Human Dermal Lymphatic Endothelial Cell: HDLEC) は PromoCell 社 (Germany) より購入し 5% FCS を含む Endothelial Basal Medium MV2 (PromoCell, Germany) を用いて 5%CO₂ 37℃ 環境下で培養した。継代回数 5 回までのものを実験に使用した。

2) 試薬

ヒトリコンビナント CXCL12 タンパク質は Peprotech 社 (USA) より購入し、0.1% ウシ血清アルブミン (BSA) に溶解して使用した。CXCR4 アンタゴニストである AMD3100 は Sigma Aldrich 社 (USA) より購入し、精

製水で溶解し終濃度 5μM で使用した。PI3K/Akt 経路阻害剤である LY294002 は Cell Signaling Technology 社 (USA) より購入し、終濃度 50μM で使用した。

3) 免疫細胞化学

培養細胞は 4% パラホルムアルデヒドで 10 分間固定し、0.5% Triron X-100 により 5 分間膜の透過処理を施した。BSA を含むブロッキングバッファーにより室温で 30 分間ブロッキング後、ウサギ抗 FOXO1 抗体 (Cell Signaling Technology, USA, 1:1000) を滴下し 4℃ で一晚反応させた。PBS による洗浄後、Cy3 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham, UK, 1:1000) を滴下し室温で 1 時間反応させ、PBS による洗浄後封入し観察した。核染色には DAPI を用いた。

4) ウェスタンブロット

培養細胞を 2% ドデシル硫酸ナトリウムおよびプロテアーゼ阻害剤、ホスファターゼ阻害剤を含むバッファーで溶解し SDS-PAGE に供した。ゲル上のタンパク質はポリフッ化ビニリデンメンブレンに転写し、ブロッキングワンプ (ナカライテスク、京都) を用いて室温で 30 分間ブロッキングした。その後メンブレンを希釈した 1 次抗体と 4℃ で一晚反応させた。使用した 1 次抗体は以下の通りである。ウサギ抗リン酸化 Akt 抗体 (Cell Signaling Technology, USA, 1:1000)、ウサギ抗 Akt 抗体 (Cell Signaling Technology, USA, 1:1000)、ウサギ抗リン酸化 ERK1/2 抗体 (Cell Signaling Technology, USA, 1:1000)、ウサギ抗 ERK1/2 抗体 (Cell Signaling Technology, USA, 1:1000)、ウサギ抗リン酸化 JNK 抗体 (Cell Signaling Technology, USA, 1:1000)、ウサギ抗 JNK1 抗体 (BioLegend, USA, 1:100)、ウサギ抗リン酸化 p38 抗体 (Cell Signaling Technology, USA, 1:1000)、ウサギ抗 p38 抗体 (Cell Signaling Technology, USA, 1:1000)、ウサギ抗リン酸化 FOXO1 抗体 (Cell Signaling Technology, USA, 1:1000)、ウサギ抗 FOXO1 抗体 (Cell Signaling Technology, USA, 1:1000)、ウサギ抗 beta actin 抗体 (Cell Signaling Technology, USA, 1:1000)。

1 次抗体の洗浄後、HRP (Horse Radish Peroxidase) 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling Technology, 1:10000) と室温で 1 時間反応させ、洗浄しケミルミワンスーパー (ナカライテスク、京都) で化学発光させ化学発光イメージャーで観察した。

5) RNA の回収および逆転写定量 PCR (qRT-PCR)

培養 LEC からの総 RNA の回収は RNA iso (TaKaRa Bio, 滋賀) により行い、ReverTraAce qPCR RT master mix with gDNA remover (TOYOBO, 大阪) を用いて逆転写した。定量 PCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR mix (TOYOBO, 大阪) を用いて行った。解析には CFX Connect Real Time System (BioRad, USA) を用いた。使用したプライマーは以下の通りである。Human *CDKN1A* 5'-GCAGACCAGCATGACAGATTT-3' (forward), 5'-GGATTAGGGCTTCCTCTTGGA-3' (reverse), Human *CDKN1B* 5'-

-TGCCCTCCCCAGTCTCTCTTA-3' (forward), 5'-CCCAAGCACCTCGGATTTTGTG-3' (reverse), Human *CDKN2A* 5'-CCCTCGTGCTGATGCTACTG-3' (forward), 5'-ACCTGGTCTTCTAGGAAGCGG-3' (reverse), Human *CDKN2B* 5'-TAATGAAGCTGAGCCCAGGTCT-3' (forward), 5'-CACCGTTGGCCGTAACTTAAC-3' (reverse), Human *RBL2* 5'-CAGGCCCGGAGCCAGGTGTA-3' (forward), 5'-GGAGCACTGCTGGGCTGTGG-3' (reverse), Human *GADD45A* 5'-CGAAAGGATGGATAAGGTGGG-3' (forward), 5'-CCTGGATCAGGGTGAAGTGG-3' (reverse), Human *ACTB* 5'-CGGGAAATCGTGCGTGACAT-3' (forward), 5'-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3' (reverse).

結 果

1) CXCL12の添加によるLECの細胞内シグナルタンパクのリン酸化

第一に初代培養LECにおいて培養上清中にリコンビナントCXCL12タンパク質(以下単にCXCL12と記述する)を添加することにより, 主たる細胞内シグナル伝達タンパク質(ERK1/2, Akt, p38, JNK1/2など)のリン酸化レベルに変動があるか否かについて検討した. 16時間の血清飢餓の後, LECの培養上清中にCXCL12を終濃度0, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/mLで添加し, 1時間後タンパク質を回収しSDS-PAGE, ウェスタンブロットに供した. 結果, Aktのリン酸化が濃度依存性に見られ500-1000 ng/mLにそのピークが見られた(図1A). ERK1/2はベースラインのリン酸化レベルが高く, 16時間の血清飢餓では解析不可能であった(データ掲載略). JNK1/2やp38のリン酸化レベルはCXCL12の添加により変化しなかった(データ掲載略). 次いでCXCL12によるAktのリン酸化にCXCL12を添加してからの時間依存性があるか検証を試みた. 同様に血清飢餓の後, 終濃度1000 ng/mLでCXCL12を培養上清中に添加し, 0, 5, 10, 30, 60分後にタンパク質を回収しSDS-PAGE, ウェスタンブロットに供した. 結果, CXCL12添加後30分でリン酸化のピークが見られた(図1B). またいずれにおいてもLECをCXCL12の受容体であるCXCR4のアンタゴニストAMD3100で前処理した場合CXCL12によるAktのリン酸化は観察されず(図1A, B), CXCR4を介したシグナル伝達であることが推察された.

2) LECへのCXCL12の添加によるFOXO1のリン酸化および核外移行

一般にリン酸化されたAktはFOXO1をリン酸化し, その局在を核外へ移行させる. 上記の通りCXCL12をLECの培養上清中に添加することでAktのリン酸化が起こることが分かったので, それに引き続いてFOXO1

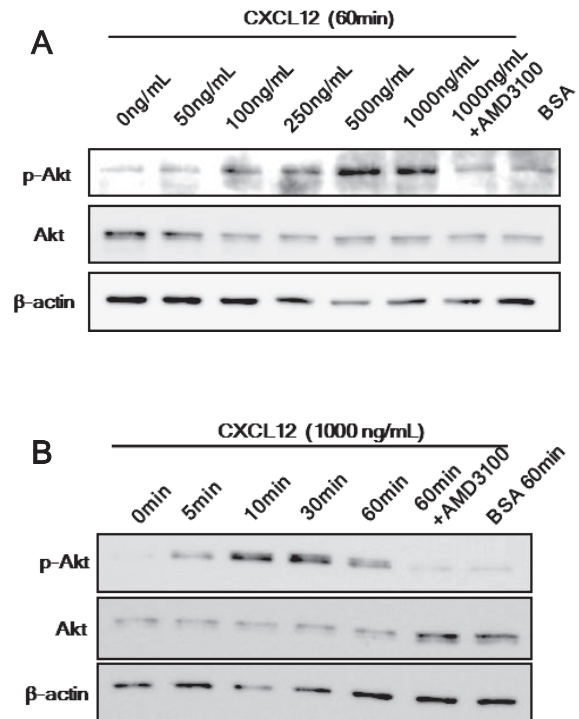


図1 LECへのCXCL12添加によるAktリン酸化

A. ウェスタンブロットによるCXCL12濃度依存性の検討. 添加時間は60分.

B. ウェスタンブロットによるCXCL12添加時間依存性の検討. 添加終濃度は1000 ng/mL.

のリン酸化および核外移行が観察されるかどうかを検証した. 血清飢餓の後, CXCL12を終濃度1000 ng/mLで60分間LEC培養上清中に添加しタンパク質を回収しSDS-PAGE, ウェスタンブロットに供した. 結果, FOXO1のリン酸化レベルがCXCL12の添加によりわずかに上昇した(図2A). またこの上昇はAMD3100やPI3K/Akt阻害剤であるLY294002でLECを前処理することによりベースラインレベルとなった(図2A). 次いで血清飢餓を施したLECに様々な濃度(終濃度0, 100, 500, 1000 ng/mL)でCXCL12を培養上清中に添加し, 1時間後固定し抗FOXO1抗体による免疫組織化学を行った. 結果, CXCL12を添加しない場合ほとんどのFOXO1は核内に局在していたが(図2B, C), 500-1000 ng/mLのCXCL12によりFOXO1の有意な核外移行が見られた(図2B, C). 時間依存性についても同様に調べたが, 1000 ng/mLのCXCL12添加後30分からFOXO1の核外移行が観察された(図2D). またいずれもAMD3100による前処理でFOXO1の核外移行は抑制された(図2B-D).

3) LECへのCXCL12の添加によるFOXO1標的遺伝子の発現変動

FOXO1の転写活性は核内のクロマチン上で発揮されるものであるため, 核外移行によりその活性は減弱すると考えられる. よってLEC培養上清中にCXCL12を添加することによるFOXO1の核外移行が, 実際に

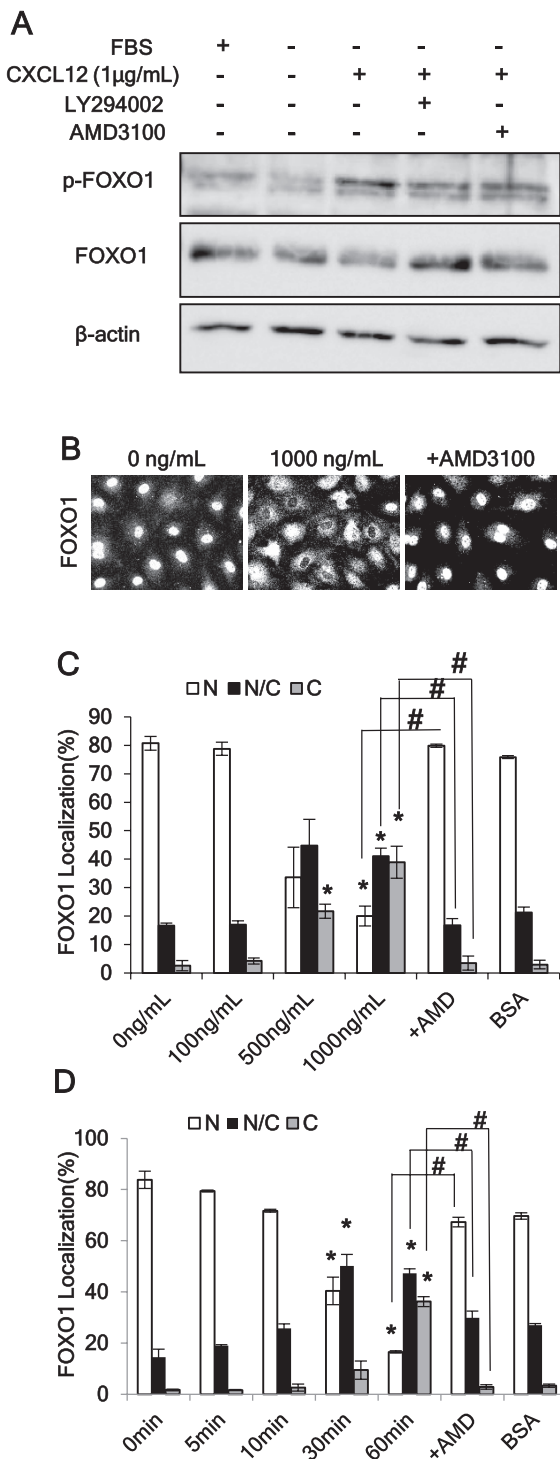


図2 LEC への CXCL12 添加による FOXO1 のリン酸化と核外移行

- A. ウェスタンブロットによるリン酸化 FOXO1 の検出.
FBS (ウシ胎児血清) は陽性対照 (終濃度 10%).
- B. CXCL12 の添加による FOXO1 の核外移行をとらえた免疫細胞化学染色.
- C. CXCL12 の添加による FOXO1 の核外移行の濃度依存性.
添加時間はいずれも 60 分.
n=4 experiments, *p<0.05 v.s. 0 ng/mL, #p<0.05 v.s. +AMD
- D. CXCL12 の添加による FOXO1 の核外移行の時間依存性.
添加濃度はいずれも 1000 ng/mL.
N: 核のみに局在, N/C: 核および細胞質に局在, C: 細胞質のみに局在.
n=4 experiments, *p<0.05 v.s. 0 min, #p<0.05 v.s. +AMD

FOXO1 の標的遺伝子の発現を減少させるかどうかについて検討した. FOXO1 の標的遺伝子は多岐にわたるが, ここでは細胞増殖を抑制するサイクリン依存性キナーゼインヒビターなど (*CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *RBL2*, *GADD45A*) について調査した. 血清飢餓を施した LEC に終濃度 1000 ng/mL で CXCL12 を培養上清中に添加し, 1 時間後総 RNA を回収, 逆転写し cDNA を得た. 上記 6 種類の遺伝子を実験的に増幅するプライマーにより定量 PCR を行い, 対照として溶媒である BSA を添加したものと比較した. 結果, *CDKN1A* および *CDKN1B* の発現量が CXCL12 の添加により有意に減少した (図 3). その他の遺伝子の発現量は CXCL12 の添加により変動が見られなかった (図 3).

考 察

1) リンパ管新生促進因子としての CXCL12

腫瘍における新生リンパ管をとりまく微小環境においてサイトカインによる LEC の生理機能の制御は重要である. 特に悪性黒色腫のようなリンパ管移行しやすい腫瘍においてはリンパ管新生を促進するようなサイトカインが豊富に発現しており, その発現量が予後に直結する⁹⁾. Zhuo らの報告によれば, LEC は VEGF-C の刺激に応じて CXCR4 を発現し細胞外の CXCL12 の濃度勾配に従って遊走能するようになる¹⁰⁾. 実際に正常組織のリンパ管上では CXCR4 の発現はほとんど見られなかったのに対し, VEGF-C が豊富に分泌されていると考えられる腫瘍組織においてはリンパ管上に CXCR4 が多量に発現していることを同グループが報告している¹⁰⁾. さらに同論文においてはヒト腫瘍組織における CXCL12 の発現量とリンパ管網の密度に正の相関があると報告している¹⁰⁾. また乳癌腫瘍細胞移植モデルにおいて CXCL12 の中和抗体によりリンパ管移行が有意に抑制されとも報告している¹⁰⁾. さらに Sugihara らは食道-胃接合部の扁平上皮癌において癌関連線維芽細胞で高いレベルの CXCL12 が発現しており, その発現量が低いほど予後が良好であると報告している¹⁹⁾. 一般的に腫瘍組織においては腫瘍内部の腫瘍細胞以外の間質系細胞 (癌関連線維芽細胞や間葉系幹細胞) が高いレベルで CXCL12 を発現し腫瘍細胞へ分泌していると考えられている²⁰⁾. これらのことから少なくとも一部の腫瘍において CXCL12 の発現はリンパ管新生を亢進させ, リンパ管移行を促進することによりリスクファクターとして働いていると考えられる. このような CXCL12 依存性のリンパ管新生が普遍的なシステムなのか, すなわち他の種類の腫瘍や病理的リンパ管新生モデル, そして発生期におけるリンパ管新生においても共通の機構であるのかは現在のところ不明であるが, Cha らによるゼブラフィッシュを用いた実験では発生期のごく限られた時期において CXCL12-CXCR4 系に依存するリンパ管新生が起こると報告されている²¹⁾.

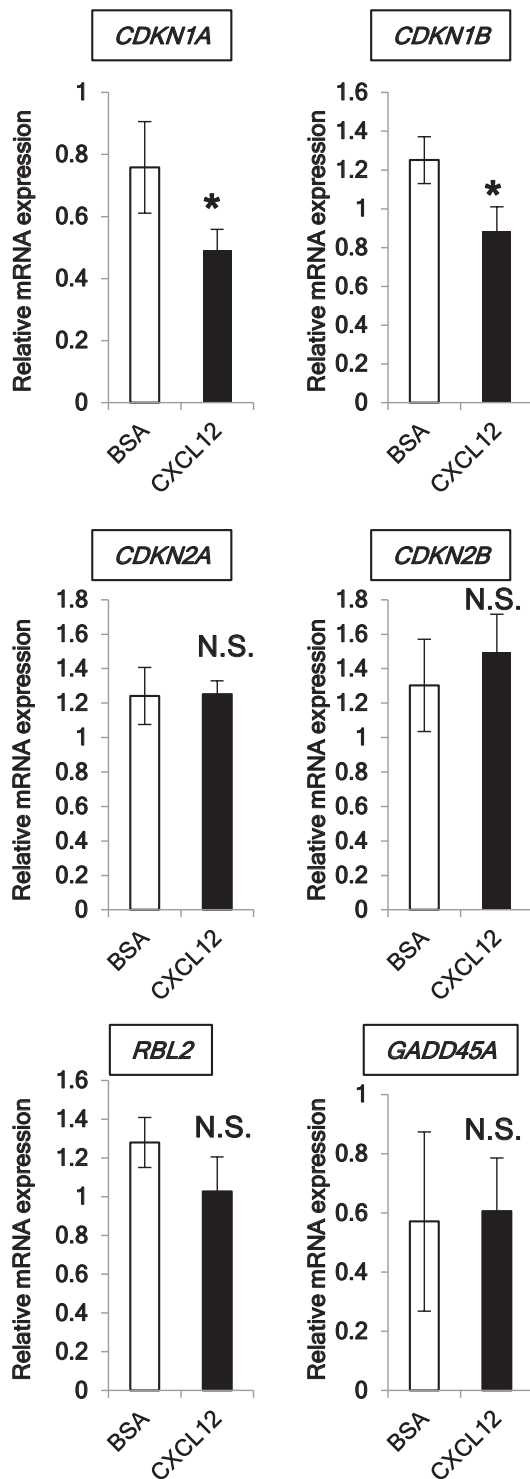


図3 LEC への CXCL12 添加による FOXO1 標的遺伝子の発現変動

CXCL12 を終濃度 1000 ng/mL で添加した際の遺伝子発現の変動を定量 PCR で検出。

n=6 experiments, * p<0.05, N.S.: not significant

2) CXCL12 による LEC のシグナル経路活性化

今回の我々の報告においてはヒトの初代培養 LEC を用いて, CXCL12 の濃度および添加時間に依存した Akt

のリン酸化が観察された。前述の Zhuo らの報告によれば, 100 ng/mL の CXCL12 で 10 分間刺激することによりヒトの初代培養 LEC で Akt, ERK1/2 のリン酸化がみられる¹⁰⁾。Akt のリン酸化に関しては我々の今回の実験と効果濃度および時間が異なる。Zhuo らの使用した LEC はヒトリンパ節より単離したものであり¹⁰⁾, 我々の使用した小児の皮膚より単離したものと性質が異なることが原因であることは十分に考えられる。また ERK1/2 のリン酸化に関しても同様のことが言えるが, Zhuo らの報告においても血清飢餓にも関わらずベースラインのリン酸化レベルが高く¹⁰⁾解析が難しい点は我々の結果と似ている。一般的に CXCL12 は CXCR4 陽性細胞(リンパ球, 造血系細胞, 内皮細胞, 上皮細胞, 腫瘍細胞など)に対するケモアトラクタントとしてよく知られているが, その効果濃度は 1-100 ng/mL と報告されているものが大部分であり²²⁻²⁶⁾, 今回我々がシグナル活性化を観察した 500-1000 ng/mL において報告している文献はない。実際健康ヒト血清中の CXCL12 濃度は 1 ng/mL 程度であるとされており²⁷⁾, 500-1000 ng/mL もの高濃度のスポットはごく局所的にしか形成されないと考えられる。なお CXCL12 の受容体は CXCR4 の他に CXCR7 が知られているが, CXCR7 はシグナルを細胞内に伝達しないデコイ受容体であること²⁸⁾と, 本実験において LEC を CXCR4 特異的アンタゴニスト AMD3100 で前処理することにより CXCL12 による Akt のリン酸化を抑制できたことから考えて, 本実験で観察されたのは CXCR4 を介したシグナル伝達であると考えられる。

3) CXCL12 による LEC における FOXO1 の核外移行とその転写標的の発現変化

PI3K/Akt 経路の活性化が FOXO1 のリン酸化および核外移行をもたらすことは周知のとおりである。今回の実験では FOXO1 の標的遺伝子としていくつかの細胞周期抑制遺伝子の発現変動を調べ, *CDKN1A*, *CDKN1B* の発現が CXCL12 の添加により抑制されるとの結果を得た。*CDKN2A*, *CDKN2B* などの他の遺伝子の発現量が変化しなかった理由としては, それらの遺伝子の転写調節における FOXO1 への依存性が比較的低いものであった可能性が考えられる。また CXCL12 による FOXO1 の核外移行は完全ではないため核内に残存した FOXO1 の活性を含めて観察していることも理由の一つとして挙げられる。Zhuo らの報告によれば CXCL12 を培養上清中に添加することにより LEC の *in vitro* 管腔形成能が向上する¹⁰⁾。管腔形成のためには LEC が増殖することが必要であるので, CXCL12 の添加により細胞増殖抑制遺伝子である *CDKN1A*, *CDKN1B* の発現が減少することは合理的であると思われる。

4) 今後の課題

本研究は初代培養 LEC を用いた *in vitro* の研究であり, 実際に *in vivo* での CXCL12 依存性リンパ管新生に

において FOXO1 を介したメカニズムが機能していることを証明したものではない。したがって、リンパ管において FOXO1 を欠失した場合、発生期リンパ管新生あるいは病的リンパ管新生においてどのような変化が起こるのかを検討する必要がある。FOXO1 の欠失マウスは胎生致死であり¹⁴⁾ 解析できないため、リンパ管あるいは脈管系においてタモキシフェン誘導性に *Foxo1* 遺伝子を欠失させることのできるマウスモデル (*Prox1-Cre ERT2* Tg マウス²⁹⁾ や *Cdh5-Cre ERT2* Tg マウス³⁰⁾ と *Foxo1 floxed* マウス³¹⁾ の掛け合わせ) を確立し、発生期であれば胎生 13.5 日付近の背部の真皮、あるいは生後 5 日目程度までの耳や尾の真皮、腸間膜などが観察対象となる。病的なリンパ管新生のモデルとしては角膜の中心部を結紮³²⁾ あるいは化学火傷³³⁾ を起こしリンパ管新生を誘導するモデルや腫瘍細胞の移植、あるいはより人工的な方法としては VEGF-C などを含む徐放ゲルを皮下に移植する方法等が挙げられる。またどのような状況において生理的濃度を大幅に超える CXCL12 の局所的高濃度スポットが生じ得るのか検討する必要がある。

謝 辞

本研究を遂行するにあたりご指導賜りました大阪大学大学院医学系研究科の稲垣忍教授および柴田理志助教に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Kerjaschki D. The lymphatic vasculature revisited. *J Clin Invest* 124 (3) : 874-877, 2014.
- 2) Tammela T, Alitalo K. Lymphangiogenesis: molecular mechanisms and future promise. *Cell* 140 (4) : 460-476, 2010.
- 3) Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Mäkinen T, et al. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (2) : 548-553, 1998.
- 4) Enholm B, Jussila L, Karkkainen M, Alitalo K. VEGF-C: a growth factor for lymphatic and blood vascular endothelial cells. *Trends Cardiovasc Med* 8 (7) : 292-297, 1998.
- 5) Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 15 (2) : 290-298, 1996.
- 6) Yamada Y, Nezu J, Shimane M, Hirata Y. Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. *Genomics* 42 (3) : 483-488, 1997.
- 7) Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, et

- al. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 282 (5390) : 946-949, 1998.
- 8) Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 5 (1) : 74-80, 2004.
- 9) Rinderknecht M, Detmar M. Tumor lymphangiogenesis and melanoma metastasis. *J Cell Physiol* 216 (2) : 347-354, 2008.
- 10) Zhuo W, Jia L, Song N, Lu XA, et al. The CXCL12 - CXCR4 chemokine pathway: A novel axis regulates lymphangiogenesis. *Clin Cancer Res* 18 (19) : 5387-5398, 2012.
- 11) Huang H, Tindall DJ. Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci* 120 : 2479-2487, 2007.
- 12) Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 117 (4) : 421-426, 2004.
- 13) Eijkelenboom A, Burgering BMT. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14 (2) : 83-97, 2013.
- 14) Furuyama T, Kitayama K, Shimoda Y, Ogawa M, et al. Abnormal angiogenesis in *Foxo1* (*Fkhr*) -deficient mice. *J Biol Chem* 279 (33) : 34741-34749, 2004.
- 15) Fukumoto M, Kondo K, Uni K, Ishiguro T, et al. Tip-cell behavior is regulated by transcription factor FoxO1 under hypoxic conditions in developing mouse retinas. *Angiogenesis* 21 (2) : 203-214, 2018.
- 16) Wilhelm K, Happel K, Eelen G, Scoors S, et al. FOXO1 couples metabolic activity and growth state in the vascular endothelium. *Nature* 529(7585): 216-220, 2016.
- 17) Niimi K, Ueda M, Fukumoto M, Kohara M, et al. Transcription factor FOXO1 promotes cell migration toward exogenous ATP via controlling P2Y1 receptor expression in lymphatic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 489 (4) : 413-419, 2017.
- 18) Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* 96(6): 857-868, 1999.
- 19) Sugihara H, Ishimoto T, Yasuda T, Izumi D, et al. Cancer-associated fibroblast-derived CXCL12 causes tumor progression in adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *Med Oncol* 32 (6) : 618, 2015.
- 20) Meng W, Xue S, Chen Y. The role of CXCL12 in tumor microenvironment. *Gene* 641 : 105-110, 2018.

- 21) Cha YR, Fujita M, Butler M, Isogai S, et al. Chemokine signaling directs trunk lymphatic network formation along the preexisting blood vasculature. *Dev Cell* 22 (4) : 824-836, 2012.
- 22) Fernandis AZ, Cherla RP, Ganju RK. Differential regulation of CXCR4-mediated T-cell chemotaxis and mitogen-activated protein kinase activation by the membrane tyrosine phosphatase, CD45. *J Biol Chem* 278 (11) : 9536-9543, 2003.
- 23) Fernandis AZ, Prasad A, Band H, Klösel R, et al. Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells. *Oncogene* 23 (1) : 157-167, 2004.
- 24) Mirshahi F, Pourtau J, Li H, Muraine M, et al. SDF-1 activity on microvascular endothelial cells: consequences on angiogenesis in in vitro and in vivo models. *Thromb Res* 99 (6) : 587-594, 2000.
- 25) Wuchter P, Leinweber C, Saffrich R, Hanke M, et al. Plerixafor induces the rapid and transient release of stromal cell-derived factor-1 alpha from human mesenchymal stromal cells and influences the migration behavior of human hematopoietic progenitor cells. *Cell Tissue Res* 355 (2) : 315-326, 2014.
- 26) Yokohama-Tamaki T, Otsu K, Harada H, Shibata S, et al. CXCR4/CXCL12 signaling impacts enamel progenitor cell proliferation and motility in the dental stem cell niche. *Cell Tissue Res* 362 (3) : 633-642, 2015.
- 27) Lukaszewicz-Zajac M, Mroczko B, Kozłowski M, Szmitkowski M. The serum concentrations of chemokine CXCL12 and its specific receptor CXCR4 in patients with esophageal cancer. *Dis Markers* 2016:7963895, doi:10.1155/2016/7963895, 2016.
- 28) Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleswar H, et al. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One*, 5:e9175, 2010.
- 29) Bazigou E, Lyons OT, Smith A, Venn GE, et al. Genes regulating lymphangiogenesis control venous valve formation and maintenance in mice. *J Clin Invest* 121 (8) : 2984-2992, 2011.
- 30) Okabe K, Kobayashi S, Yamada T, Kurihara T, et al. Neurons limit angiogenesis by titrating VEGF in retina. *Cell* 159 (3) : 584-596, 2014.
- 31) Miyazaki S, Minamida R, Furuyama T, Tashiro F, et al. Analysis of Foxo1-regulated genes using Foxo1-deficient pancreatic β cells. *Genes to Cells* 17 (9) : 758-767, 2012.
- 32) Cursiefen C, Chen L, Borges LP, Jackson D, et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest* 113 (7) : 1040-1050, 2004.
- 33) Ling S, Lin H, Liang L, Xu J, et al. Development of new lymphatic vessels in alkali - burned corneas. *Acta Ophthalmol* 87 (3) : 315-322, 2009.

Effect of CXCL12 Stimuli on Endogenous FOXO1 Transcriptional Activity in Lymphatic Endothelial Cells

Kenta Niimi^{1) 2) *}, Tatsuo Furuyama²⁾

¹⁾*Department of Liberal Arts and Sciences, Kagawa Prefectural University of Health Sciences*

²⁾*Laboratory of Neurobiology, Faculty of Health Sciences, School of Medicine, Osaka University*

Abstract

C-X-C chemokine ligand 12 (CXCL12) has been reported to be an effective chemoattractant for tumor lymphangiogenesis and has been regarded as a therapeutic target of tumor lymphatic metastasis. However, the molecular mechanisms of CXCL12-dependent lymphangiogenesis have been poorly understood. Here, we investigated CXCL12-dependent activation of intracellular signaling pathways in primary cultured lymphatic endothelial cells (LECs). As a result, the PI3K/Akt pathway was activated in a CXCL12 dose- and time-dependent manner in LECs. Moreover, activated-Akt phosphorylated FOXO1 transcription factor and increased extranuclear localization of FOXO1 in LECs. Furthermore, extracellular CXCL12 downregulated some cyclin-dependent kinase inhibitory genes such as *CDKN1A* and *CDKN1B*, which are known transcriptional target genes of FOXO1. These results suggest that the physiological activities of CXCL12 in LECs can be partly explained by PI3K/Akt pathway-dependent FOXO1 downregulation. Our observation provides significant insights into the molecular mechanisms of CXCL12-dependent lymphangiogenesis.

Key Words : lymphangiogenesis, endothelial cell, CXCL12, FOXO1

*Correspondence to : Kenta Niimi, Department of Liberal Arts and Sciences, Kagawa Prefectural University of Health Sciences, 281-1 Hara, Mure-cho, Takamatsu, Kagawa 761-0123, Japan
E-mail : niimi-k@chs.pref.kagawa.jp