

令和元年6月18日現在

機関番号：16301
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2016～2018
課題番号：16H04698
研究課題名(和文) 血管新生におけるCUL3システムネットワークの解明

研究課題名(英文) CUL3 network system in angiogenesis

研究代表者

東山 繁樹 (HIGASHIYAMA, SHIGEKI)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：60202272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：血管新生は、組織損傷時の修復過程や固形腫瘍増殖、さらには臓器再生に必須であり、その制御は血管内皮細胞の増殖促進と抑制のバランス制御で成立している。申請者らは、これまでに血管新生のバランスを制御する分子を探索し、その中心的役割を担うと考えられる分子機構として、CUL3型ユビキチンリガーゼを見出し、特に、VEGFR2遺伝子発現制御におけるCUL3-SPOP-DAXX軸、beta1Integrin 細胞内膜輸送におけるCUL3-ANKFY1-基質軸、アクチンダイナミクス制御におけるCUL3-KCTD10-RhoB軸を同定し、各軸の機能的役割を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管内皮細胞の増殖促進と抑制のシグナルバランス分子機構をタンパク質代謝回転の側面から深く解明することは、これまでの血管内皮細胞増殖シグナル経路以外の血管新生の新たな分子制御機構を解明できる。このことは、これまでのVEGF-VEGFRシステムを中心とした血管内皮細胞増殖シグナル伝達経路とは全く異なる新たな標的分子創薬の側面を作る事が期待でき、今までに無い治療戦略を提案することで社会貢献が可能となり、その意義は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：New blood vessel formation, termed angiogenesis, is an essential process in normal physiology, including tissue development and wound healing, as well as in many pathological conditions such as cancer and diabetes, among other. Endothelial cells play a central role in angiogenesis which is homeostatically regulated on the balance between angiogenic and angiostatic force. We found that CUL3-based ubiquitin E3 ligases play a crucial role of not only sensing this balance, but also regulating multiple steps of angiogenesis, such as endothelial cell growth, spreading and network formation. In this study, we revealed that CUL3-SPOP-DAXX axis positively regulated VEGFR2 mRNA expression, CUL3-ANKFY1-substrate (unidentified yet) axis positively did intracellular membrane trafficking of beta1-Integrin to cell surface, and CUL3-KCTD10-RhoB axis did cell spreading and network formation through the actin dynamics, suggesting that these would be potent targets of anti-angiogenic therapy.

研究分野：血管生物学、分子腫瘍学、生化学

キーワード：血管新生 ユビキチンリガーゼ cullin3 BTBドメインタンパク質 SPOP ANKFY1 KCTD10 VEGFR2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成体における血管新生は、妊娠時の胎盤形成や組織損傷時の修復・再生等の生理的反應のみならず、固形がんの増殖・転移、糖尿病性網膜症、加齢性黄斑変性等、70種以上の疾患に深く関与する。血管新生が、血管内皮細胞の増殖促進と抑制のバランス制御の上で成立していることは、ゼブラフィッシュ個体を用いた実験から明らかにされている (*PLoS ONE 2008*)。しかし、この血管新生バランスがいかなる分子機構によって成り立っているのか、不明のままである。申請者は、血管新生バランスの分子制御機構の全貌解明に挑んでおり、これまでに、血管内皮細胞の増殖促進シグナル (VEGF シグナル) と抑制シグナル (Notch シグナル) のバランス制御分子として、ユビキチンリガーゼ複合体 CUL3-BAZF-CBF1 軸を同定してきた (*Blood 2012, Angiogenesis 2013*) (図1)。すなわち、VEGF 刺激を受けた血管内皮細胞は BAZF 分子の産生を誘導し、この BAZF 分子がユビキチン E3 リガーゼの本体である CUL3 に結合すると同時に、Notch シグナルの下流転写因子である CBF1 とも結合し、CUL3-BAZF-CBF1 複合体を形成する。これにより、CBF1 はポリユビキチン化され、分解に導かれる。このシステムの起動により、Notch シグナル優位の血管新生抑制から VEGF シグナル優位の血管新生促進に向けてバランスが傾く。また、血管内皮細胞における BAZF ノックアウトマウス個体では、Notch シグナル優位が持続し、血管新生抑制の状態が維持されることを確認している (*Blood 2012*)。さらに申請者は、マウス網膜での CUL3 ノックダウン下では、極めて強い血管崩壊の表現系が現れることを明らかにしている。この表現型は、BAZF ノックダウンでは決して認められない (図2、未発表)。この実験結果は、CUL3 は BAZF-CBF1 以外にも複合体パートナーを持ち、血管内皮細胞の機能制御ならびに血管新生制御に幅広く、かつ重要な役割を果たすことを示唆している。図1に示す様に、CUL3 は BAZF の様な BTB ドメインタンパク質 (BTBP) をリンカーとして結合し、これに基質を結合させる。すなわち、CUL3 は BTBP を組み替えることで、幅広く基質を認識し制御するプラットフォームタンパク質である。このことは、血管新生に複数の CUL3-BTBP-基質軸が関わることを示唆する。

申請者は、新規 CUL3-BTBP-基質軸の探索・同定に向けて、CUL3 ノックダウン培養血管内皮細胞を用いてタイムラプスイメージング解析を行った。その結果、細胞接着と細胞増殖、さらに、ネットワーク形成に必須の細胞伸展・管腔形成にも関わることを示唆する知見をすでに得ている。

2. 研究の目的

本研究では、CUL3 ノックダウン培養血管内皮細胞の解析から見出した、細胞接着と細胞増殖の鍵となる血管新生因子 $\beta 1$ Integrin と VEGFR2、及び細胞伸展・管腔形成の鍵となる血管新生因子低分子量 G タンパク質 Rho ファミリー を指標として、これらを制御する新規 CUL3-BTBP-基質軸を解明し、新たな血管新生制御分子機構の解明と、治療へ向けた標的分子の提案を目指す。

3. 研究の方法

研究は以下の3項目に沿って進める。

- (1) 血管内皮細胞における CUL3 パートナー-BTBP の探索・同定：CUL3 は、BTBP を介して基質を選択する (図1参照)。これまでの解析から、ヒト BTBP 遺伝子は 183 種が同定されており、内皮細胞では約 60 種の BTBP 遺伝子の発現を確認している。しかし、CUL3 と結合するパートナー-BTBP は十数種しか明らかになっていない。そこでまず、申請者が既に作成を完了している 183 種の FLAG タグ BTBP ライブラリーを用いて、タンパク質試験管内相互作用解析法 (アルファスクリーン法) により、CUL3 のパートナー-BTBP を決定する。
- (2) CUL3 パートナー-BTBP の血管新生制御機能解析：(1) で同定するパートナー-BTBP の血管内皮細胞での機能評価を、遺伝子ノックダウン下での *in vivo* および *in vitro* 血管新生活性を測定するとともに、鍵となる血管新生因子 $\beta 1$ Integrin、VEGFR2、低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーのタンパク質量変動を、ウエスタンブロット解析と免疫染色法にて行い、これら因子の制御に直接関わる BTBP を同定する。
- (3) CUL3-BTBP の基質探索・同定と新規 CUL3-BTBP-基質軸の同定と機能解析：(2) で同定する新規 CUL3-BTBP 軸の基質を、当センターが有する 20000 タンパク質アレイを用いたスクリーニン

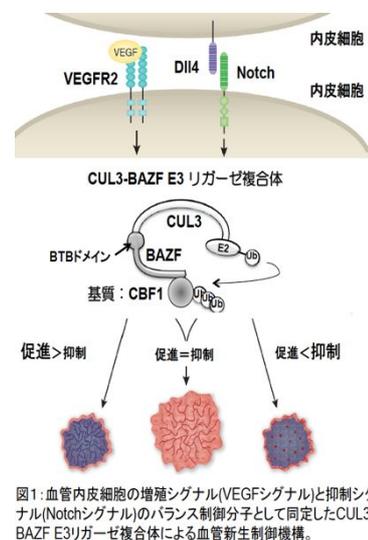


図1: 血管内皮細胞の増殖シグナル (VEGFシグナル) と抑制シグナル (Notchシグナル) のバランス制御分子として同定した CUL3-BAZF E3リガーゼ複合体による血管新生制御機構。

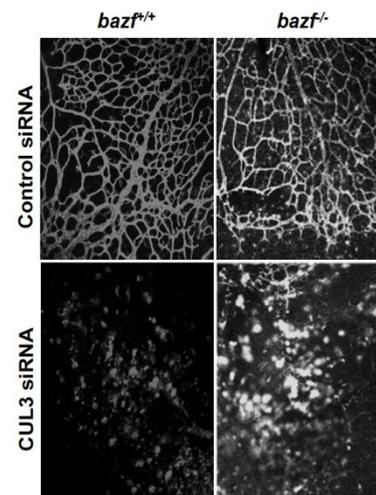


図2: 生後5日目のマウス網膜で、CUL3をノックダウンした時の血管形成の様子。野生型、BAZFノックアウトマウスともに、CUL3ノックダウンによって、極めて強い血管崩壊の表現型が見られた。

グで探索・同定する。さらにここで同定する CUL3-BTBP-基質軸の血管内皮細胞でのタンパク質代謝回転ネットワークを、イメージング解析等により時空間的に明らかにする。

4. 研究成果

上記3項目に沿って解析を進め、以下の結果を得た。

(1) CUL3 パートナーBTBP (基質受容体) の探索・同定: まず、すでに作成済みのヒト BTBP 183 種の FLAG タグ BTBP ライブラリーを用いて、タンパク質試験管内相互作用解析法(アルファスクリーン法)により CUL3 のパートナーBTBP を探索した。その結果、少なくとも 116 種の BTBP が CUL3 に結合可能であることを明らかにした。このうち血管内皮細胞に発現が認められる約 60 種の BTBP から約 40 種の BTBP が CUL3 と結合しうることを確認した。

まず、CUL3 ノックダウン下で、血管新生活性の鍵となる因子β1Integrin、VEGFR2、及び低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーのタンパク質量変動を、ウエスタンブロット法にて解析した。その結果、CUL3 ノックダウン下で VEGFR2 と β1Integrin のタンパク質発現量が低下すること、一方で RhoA, B, C のタンパク質発現量が增大することを見出し(図3)、これらタンパク質の変動を指標として、機能的 BTBP の探索が可能であることを示した。また、(1)で同定した約 40 種の BTBP に対する siRNA を作成し、これを用いた遺伝子ノックダウン法により血管内皮細胞のインビトロ血管形成能を評価することで、まず血管新生を制御する BTBP を絞り込んだ。さらに、絞り込んだ BTBP の siRNA を用いて、VEGFR2、β1Integrin、RhoA/B/C のタンパク質発現量を、CUL3 ノックダウン時と同様に变化させる siRNA を選別した。その結果、VEGFR2 に対して SPOP を(図4)、β1Integrin に対して ANKFY1 を、RhoB に対して KCTD10 を同定することに成功した。

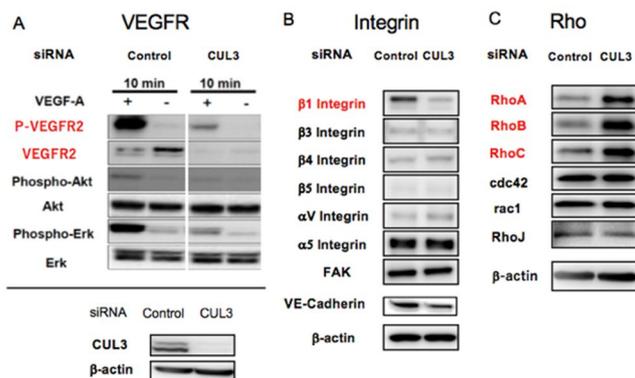
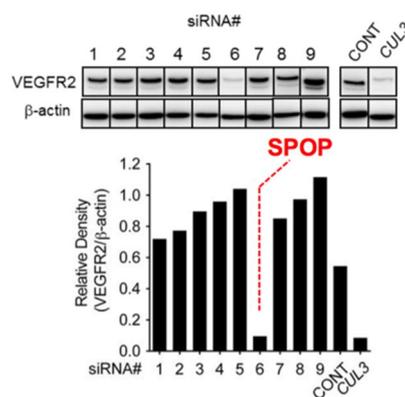


図3:培養ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞でCUL3遺伝子ノックダウン処理時の VEGFR2, Integrin, Rhoの各タンパク質の発現量をウエスタンブロット法で解析した。



(図4)BTBP siRNAを用いてVEGFR2の発現を制御するBTBP をウエスタンブロット法にてスクリーニングした結果SPOPを同定した。

(2) CUL3 パートナーBTBP の血管新生制御解析: 血管内皮細胞増殖因子 VEGF の受容体である VEGFR2 の遺伝子発現を制御する SPOP の基質探索を、ヒト 20000 タンパク質アレイを用いたアルファスクリーン法と siRNA ノックダウン法の組み合わせにより同定を試みた。その結果、候補基質の1つとして DAXX を同定した。さらに DAXX の機能解析を、DAXX ノックダウン下で解析した結果、CUL3-SPOP-DAXX 軸の解析から VEGFR2 の遺伝子発現をエピゲノムレベルで制御することを明らかにした。また、CUL3-SPOP-DAXX 軸は、VEGFR2 のみならず、Notch, Dll4, NRP1 などの重要な血管新生因子遺伝子をも制御することを明らかにした(Sakaue et al., Sci. Rep. 2017)。

続けて、β1Integrin を制御する BTBP として同定した ANKFY1、およびアクチンダイナミクスを制御する BTBP として同定した KCTD10 に焦点を絞って解析した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC で ANKFY1 ノックダウンでは、β1Integrin の細胞膜表面での局在が減少し、β1Integrin が細胞内に内在化すること、β1Integrin のリサイクリングが抑制されることでエンドゾーム内に蓄積することを明らかにした。このことは、CUL3-ANKFY1 軸がβ1Integrin の細胞膜輸送系を制御されている可能性を強く示唆しており、CUL3-ANKFY1 軸が新たな血管新生制御の標的分子になりうる(Maekawa et al., Biol. Open 2017)。

一方、HUVEC における KCTD10 ノックダウンでは CUL3 ノックダウン時に観察される細胞伸展や管腔形成の顕著な抑制、ならびにアクチン繊維形成の増大が観察された。さらに、この CUL3-KCTD10 軸の基質探索を、ヒト 20K プロテインアレイを用いて、Biotin-KCTD10 をプローブとして AlphaScreen を行なった。その結果、RhoB を基質候補分子として検出することに成功した。また、RhoB の強制発現が、CUL3 または KCTD10 のノックダウンと同等の表現型を示すことを確認した(Kovačević, Sakaue et al., J. Cell Biol 2018)。

以上の結果より、CUL3 を基盤とした新たな血管新生制御軸として、VEGFR2 の遺伝子発現をエピゲノムレベルで制御する CUL3-SPOP-DAXX 軸を、β1Integrin のタンパク質細胞内輸送を制御する CUL3-ANKFY1-基質軸、さらに、RhoB のタンパク質代謝を直接制御する、CUL3-KCTD10-RhoB 軸を同定した。これら CUL3-BTBP-基質軸による血管内皮細胞でのタンパク質代謝回転ネットワークが新たな血管新生治療標的になりうることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Tanigawa K, Maekawa M, Kiyoi T, Nakayama J, Kitazawa R, Kitazawa K, Senmba K, Taguchi T, Akita S, Yoshida M, Ishimura K, Watanabe Y, Higashiyama S. SNX9 determines the surface levels of integrin $\beta 1$ in vascular endothelial cells: Implication in poor prognosis of human colorectal cancers overexpressing SNX9. *J Cell Physiol*. 2019 Feb 19. doi: 10.1002/jcp.28346. in press [査読 有]
2. Murakami A, Maekawa M, Kawai K, Nakayama J, Araki N, Semba K, Taguchi T, Kamei Y, Takada Y, Higashiyama S. Cullin-3/KCTD10 E3 complex is essential for Rac1 activation through RhoB degradation in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer cells. *Cancer Sci*. 2019 Feb;110(2):650-661. doi: 10.1111/cas.13899. [査読 有]
3. Kovačević I, Sakaue T, Majoleć J, Pronk MC, Maekawa M, Geerts D, Fernandez-Borja M, Higashiyama S, Hordijk PL. The RING ligase complex Cullin-3-Rbx1-KCTD10 controls endothelial barrier function through K63-specific ubiquitination of RhoB. *J Cell Biol*. 2018 Mar 5;217(3):1015-1032. doi: 10.1083/jcb.201606055. [査読 有]
4. Sakaue T, Fujisaki A, Nakayama H, Maekawa M, Hiyoshi H, Kubota E, Joh T, Izutani H, Higashiyama S. Neddylated Cullin 3 is required for vascular endothelial-cadherin-mediated endothelial barrier function. *Cancer Sci*. 2017, 108, 208-215. doi: 10.1111/cas.13133. [査読 有]
5. Sakaue T, Sakakibara I, Uesugi T, Fujisaki A, Nakashiro KI, Hamakawa H, Kubota E, Joh T, Imai Y, Izutani H, Higashiyama S. The CUL3-SPOP-DAXX axis is a novel regulator of VEGFR2 expression in vascular endothelial cells. *Sci Rep*. 2017, 20, 7. doi: 10.1038/srep42845. [査読 有]
6. Sakaue T, Maekawa M, Nakayama H, Higashiyama S. Prospect of divergent roles for the CUL3 system in vascular endothelial cell function and angiogenesis. *J Biochem*. 2017 Oct 1;162(4):237-245. doi: 10.1093/jb/mvx051. [査読 有]
7. Maekawa M, Tanigawa K, Sakaue T, Hiyoshi H, Kubota E, Joh T, Watanabe Y, Taguchi T, Higashiyama S. Cullin-3 and its adaptor protein ANKFY1 determine the surface level of integrin $\beta 1$ in endothelial cells. *Biol Open*. 2017 Nov 15;6(11):1707-1719. doi: 10.1242/bio.029579. [査読 有]

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 谷川和史、前川大志、藤崎亜耶子、渡部祐司、東山繁樹 血管新生を制御する細胞内膜輸送関連分子の探索 第 58 回日本生化学会中国・四国支部例会 2017
2. 藤崎亜耶子、坂上倫久、前川大志、高橋宏隆、澤崎達也、泉谷裕則、東山繁樹 ユビキチンリガーゼ CUL3-BTB 複合体解析システムの構築 第 22 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 2017 (Young Investigated Award 受賞)
3. 坂上倫久、藤崎亜耶子、前川大志、高橋宏隆、澤崎達也、泉谷裕則、東山繁樹 血管新生制御を担う Cul3-based ubiquitin ligase の機能解析 第 22 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 2017
4. 坂上倫久、東山繁樹 The roles of CUL3-based E3 ligase in vascular endothelial cells 第 2 回秋期特別日本血管生物医学会シンポジウム 2017
5. 前川大志、谷川和史、坂上倫久、渡部祐司、田口友彦、東山繁樹 血管内皮細胞におけるユビキチン E3 リガーゼ複合体依存的な細胞内膜輸送 ConBio2017 2017
6. 坂上倫久、前川大志、藤崎亜耶子、高橋宏隆、澤崎達也、泉谷裕則、東山繁樹 NEDD8 化シグナル伝達経路は血管内皮細胞運動を制御する ConBio2017 2017
7. 坂上倫久、前川大志、藤崎亜耶子、高橋宏隆、澤崎達也、泉谷裕則、東山繁樹 新規 CUL3 複合体による血管新生制御機構 第 25 回日本血管生物医学会学術集会 2017
8. 藤崎亜耶子、坂上倫久、中山寛尚、前川大志、東山繁樹 CUL3 による VE-cadherin を介した血管内皮細胞接着制御 第 57 回日本生化学会中国・四国支部例会 2016
9. 坂上倫久、藤崎亜耶子、泉谷裕則、東山繁樹 CUL3 による血管内皮細胞活性化制御機構 日本病態プロテアーゼ学会, 第 21 回学術集会 2016
10. Tomohisa Sakaue, Ayako Fujisaki, Hironori Izutani, Shigeki Higashiyama, Oral The CUL3-SPOP-DAXX axis is a novel regulator of VEGFR2 expression in vascular endothelial cells. Protein Island Matsuyama 2016 & The 14th Matsuyama International Symposium, 2016, Matsuyama, Japan.
11. 坂上倫久、藤崎亜耶子、泉谷裕則、東山繁樹 血管内皮細胞における CUL3 による VEGF-A 応答制御機構 第 89 回日本生化学会大会 2016
12. 藤崎亜耶子、坂上倫久、中山寛尚、前川大志、東山繁樹 CUL3 による VE-cadherin モジュレーションを介した血管内皮細胞接着制御機構 第 89 回日本生化学会大会 2016

13. 宇都宮果歩、深江舜也、上杉恭広、坂上倫久、中山寛尚、前川大志、泉谷裕則、東山繁樹
CUL3-KLHL20 軸による細胞内タンパク質輸送制御機構の解析 第 89 回日本生化学会大会,
2016
14. Tomohisa Sakaue, Ayako Fujisaki, Hironori Izutani, Shigeki Higashiyama, The CUL3-
SPOP-DAXX axis is a novel regulator of VEGFR2 expression in endothelial cells.
Poster, The 19th International Vascular Biology Meeting, 2016, Boston, USA,

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：坂上 倫久

ローマ字氏名：Sakaue Tomohisa

研究協力者氏名：前川 大志

ローマ字氏名：Maekawa Masashi

「 科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。

そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づく

ものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。」