

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07234

研究課題名(和文)新規CUL3複合体による血管新生ブレーキ解除機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of novel CUL3 complex-mediated angiogenesis regulatory pathway

研究代表者

坂上 倫久 (Sakaue, Tomohisa)

愛媛大学・医学系研究科・講師(特定教員)

研究者番号：20709266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：最近我々は血管内皮細胞に発現するCUL3型E3ユビキチンリガーゼが血管新生制御において重要な役割を果たすことを発見してきた。しかし、どのような細胞内シグナル伝達機構を制御するのか不明であった。今回、血管内皮細胞においてCUL3型E3ユビキチンリガーゼ複合体を機能阻害させることで表れる表現型について細胞レベル及び個体レベルで詳細に解析した。その結果、CUL3型E3ユビキチンリガーゼはRhoBを介したアクチン脱重合により血管新生を加速させる機構があることを新たに見出した。CUL3型E3ユビキチンリガーゼの機能的阻害は新たな血管新生阻害剤の開発の標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん進展に対してはがん細胞が血管新生を呼び込み、酸素や栄養を獲得することが腫瘍増大や転移を招くことがよく知られている。また虚血性疾患においては血管新生の誘導を介した組織への酸素や栄養の供給が不可欠である。このような血管新生の促進や阻害を人為的に可能とする疾患治療開発の標的としてCUL3型E3ユビキチンリガーゼを見出し、その血管新生の分子メカニズムの一端を明らかにできたことは非常に有意義であり、今後の創薬へとつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Clarification of the molecular mechanisms underlying angiogenesis can lead to a better understanding of various pathological conditions such as cancer and ischemic diseases. Recently, we found that CUL3-based E3 ubiquitin ligase expressed in vascular endothelial cells plays an important role in the progression of angiogenesis. However, intracellular mechanisms of CUL3-induced angiogenesis remained unclear. In the present study, we analyzed the phenotypes that are expressed by functional inhibition of the CUL3-based E3 ubiquitin ligase complex in vascular endothelial cells in vivo and in vitro. Our findings suggest that the CUL3-based E3 ubiquitin ligase is involved in RhoB-mediated actin depolymerization to accelerate angiogenesis. Functional inhibition of the CUL3-based E3 ubiquitin ligase may be a good target for the development of therapeutic drugs.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管新生 ユビキチンリガーゼ CUL3 がん 心疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

既存の血管から新しい血管ができる血管新生は、がん細胞が増殖するための栄養や酸素を供給するために重要な役割を担っている。一方で、血管機能破綻により組織が虚血に陥る病態では血管新生を促進させることが重要である。このような血管新生の主役を担っているのが毛細血管を構成する血管内皮細胞であるが、血管内皮細胞の活性化・不活性化を制御する細胞内シグナルについては未だにわかっていない。最近我々は、血管内皮細胞活性化の on/off を制御する分子として、Cullin-3 (CUL3) 型 E3 ユビキチンリガーゼを発見した。CUL3 は E2 酵素及び標的基質の受容体として機能する Broad-Complex, Tramtrack and Bric a brac ドメインタンパク質 (BTBP) とともに E3 ユビキチン化酵素複合体を形成し、標的基質の分解や機能変換を担っている。これまでの研究から、血管内皮細胞において CUL3 を発現抑制すると血管新生が強く阻害されることから、標的となる基質の分解や機能変換が血管新生の重要であることが分かっているが、in vivo における役割、また CUL3 依存的な血管新生制御機構については不明である。

2. 研究の目的

本研究では、CUL3 が血管内皮細胞において制御する分子シグナルネットワークの全体像を解明するとともに、in vivo における CUL3 複合体の役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

CUL3 型 E3 ユビキチンリガーゼ複合体による血管新生制御メカニズムの解明

血管新生過程における CUL3 が司る細胞内シグナルを解明するため、CUL3 を発現抑制したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC を用いて血管新生過程における血管内皮細胞の形態解析、遺伝子発現プロファイル解析、タンパク質発現解析を実施した。CUL3 を発現抑制した HUVEC の血管新生過程における細胞動態解析には、各種細胞内小器官を可視化できる蛍光プローブやアクチン骨格の重合をリアルタイムに可視化できる蛍光プローブを用いて行った。また、CUL3 が制御する細胞内下流シグナル伝達経路を明らかにするために、コムギ無細胞タンパク質系と AlphaScreen assay 系を組み合わせたスクリーニングによってその候補分子を絞り込んだ。さらに CUL3 型 E3 ユビキチンリガーゼ複合体の形成阻害剤についても化合物ライブラリーよりスクリーニングを行った。

In vivo 血管新生制御における CUL3 型 E3 ユビキチンリガーゼ複合体の役割解明

血管内皮細胞特異的に CUL3 型 E3 ユビキチンリガーゼ複合体を機能阻害するコンディショナルノックアウトマウスを用いて生体内における本複合体の役割を解析した。本プロジェクトでは特に出生直後に起こる網膜血管新生をモデルとして解析した。

4. 研究成果

CUL3 を発現抑制した HUVEC を用いた三次元培養系によるタイムラプス解析から、CUL3 は細胞進展に重要な役割を担う事を見出した。さらに、各種細胞内小器官や細胞骨格をリアルタイムで観察する蛍光プローブを用いて、CUL3 発現抑制による表現型解析を進めたところ、アクチン重合・脱重合制御に異常があることを発見した。特に、CUL3 の発現抑制によってストレスファイ

パー形成が亢進する事が明らかとなったため、CUL3 を発現抑制した HUVEC 及び CUL3 の活性化阻害効果をもつ MLN4924 処理した HUVEC を用いて、アクチン骨格制御因子に注目して Rho ファミリータンパク質の発現レベルをウェスタンブロット法により解析した。その結果、およそ 22 kDa の分子量を持つ RhoB を見出すことに成功した(図 1)。RhoB は Rho ファミリー遺伝子の一つであるが CUL3 による発現制御メカニズムは不明であった。CUL3 を発現抑制すると内在性の RhoB が 24 時間以内に細胞内に蓄積するとともに F-actin の過形成が起こった。一方で、CUL3 と RhoB のダブルノックダウンにより F-actin の過形成がレスキューされたことから、RhoB が CUL3 型 E3 ユビキチンリガーゼ複合体の標的基質であることが明らかとなった(図 2)。一方、RhoB とともに RhoA を同時にノックダウンすることによりさらにアクチン過重合が抑制されたことから、CUL3 が RhoB を仲介して RhoA の活性化を制御する事が血管新生にとって重要である可能性が考えられた。一方、これまで血管新生制御に最も重要な CUL3 型 E3 ユビキチンリガーゼ候補分子として CUL3-KCTD 軸を見出している。この RhoB の発現亢進と F-actin の過形成としての表現型は、KCTD 発現抑制下でも同様に観察できることから、血管内皮細胞における CUL3-KCTD 軸は、血管新生ブレーキ役を担う RhoB の分解を介して F-actin の過形成を抑制し、血管新生を促進させる役割を担うものと考えられる。

これまでの研究から、CUL3-KCTD 軸は RhoB の恒常的な分解を介して血管内皮細胞の進展を可能にし、血管新生を促進させる機能を有することを明らかにしてきた。そこで、CUL3-KCTD 軸の結合を特異的に阻害する化合物を見出す事ができれば、新たな血管新生阻害剤として有望であると考えた。そこでコムギ無細胞タンパク質合成系によりリコンビナント CUL3 と KCTD10 を作製し、AlphaScreen 系により両者の結合を定量的に評価できるアッセイシステムを構築した。本アッセイ系をベースに化合物ライブラリーから両者の結合を阻害する化合物のスクリーニングを行い、複数種類の化合物を発見した。現在これらの化合物に対する血管新生阻害効果について検証しており、将来的に構造最適化などを経て血管新生阻害剤としてのリード化合物を導出する予定である。

タモキシフェン依存的に CUL3 を血管内皮細胞特異的に欠損させるコンディショナルノックアウトマウスを作製し、生後 5 日目までに起こる網膜血管新生制御における CUL3 の役割を解析した。タモキシフェン投与後 5 日目の CUL3 欠損マウス網膜血管は野生型に比べてその形態および血管長に異常を認めており、生体内に起こる血管新生においても CUL3 の機能は重要であることが分かった。また、コンディショナルノックアウトマウスと野生型マウス retina に対して F-actin を可視化させたところ、野生型に比べてノックアウトマウスでは F-actin 形態に異常を認めており、網膜血管新生過程においても CUL3 型 E3 ユビキチンリガーゼはアクチン骨格制御を介して血管新生を促進させる役割を担っているものと考えられる。現在は本遺伝子改変マウスを用いて CUL3 の下流に位置する RhoB 及び RhoA などのタンパク質代謝について詳細に解析を行っており、将来的にがんや認められる病的血管新生における CUL3 型 E3 ユビキチンリガーゼの役割解明やその阻害剤の開発を確立する予定である。



図 1. HUVEC に対して DMSO または MLN4924 にて処理し、血管新生を誘導した HUVEC の cell lysate を用いて Rho ファミリータンパク質の発現量を western blotting 解析した結果

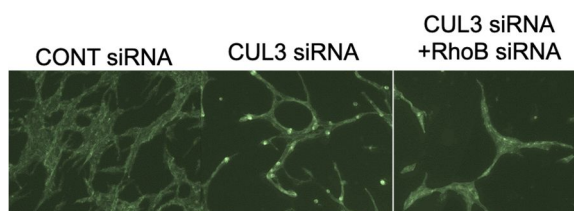


図 2. HUVEC を用いた三次元培養実験結果。Control siRNA, CUL3 siRNA, CUL3+RhoB siRNA 導入した HUVEC に対して血管新生を誘導し、フロアロイジンにて F-actin を可視化した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kovacevic Igor, Sakaue Tomohisa, Majole? Jisca, Pronk Manon C., Maekawa Masashi, Geerts Dirk, Fernandez-Borja Mar, Higashiyama Shigeki, Hordijk Peter L.	4. 巻 217
2. 論文標題 The Cullin-3-Rbx1-KCTD10 complex controls endothelial barrier function via K63 ubiquitination of RhoB	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1015 ~ 1032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201606055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakayama Hironao, Sakaue Tomohisa, Maekawa Masashi, Fujisaki Ayako, Higashiyama Shigeki	4. 巻 499
2. 論文標題 Cullin 3 regulates ADAMs-mediated ectodomain shedding of amphiregulin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 17 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.03.097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 坂上倫久
2. 発表標題 Cullin-3-based E3 ubiquitin ligases as novel regulators of angiogenesis
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会SPCシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohisa Sakaue, Hironori Izutani, Shigeki Higashiyama
2. 発表標題 CUL3-based E3 ubiquitin ligase is essential for maintaining endothelial cell functions
3. 学会等名 心血管代謝週間2020/CVMW2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂上倫久、藤崎亜耶子、竹田浩之、前川大志、高橋宏隆、澤崎龍也、泉谷裕則、東山繁樹
2. 発表標題 CUL3型 E3 コピキチンリガーゼを標的とした血管新生制御剤の開発
3. 学会等名 第4回AMEDがん若手研究者ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂上倫久、竹田浩之、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
2. 発表標題 新規血管内皮細胞活性化分子スイッチを標的とした血管新生制御剤の開発
3. 学会等名 第60回日本生化学 中国・四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂上倫久、藤崎亜耶子、泉谷裕則、東山繁樹
2. 発表標題 Neddylation活性による血管内皮細胞特性維持機構
3. 学会等名 第24回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂上 倫久、藤崎亜耶子、泉谷 裕則、東山繁樹
2. 発表標題 Nedd8-CUL3軸は血管内皮細胞の特異性維持に必須である
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂上倫久、藤崎亜耶子、泉谷裕則、東山繁樹
2. 発表標題 NEDD8修飾系によるVEGFシグナル制御機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂上倫久、藤崎亜耶子、泉谷裕則、東山繁樹
2. 発表標題 血管内皮細胞特性維持としてのCUL3型E3ユビキチンリガーゼの役割
3. 学会等名 第27回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohisa Sakaue, Ayako Fujisaki, Masashi Maekawa, Hiroataka Takahashi, Tatsuya Sawasaki, Hironori Izutani, Shigeki Higashiyama
2. 発表標題 CUL3-based E3 ubiquitin ligase complex is essential for vascular endothelial cell motility
3. 学会等名 20th International Vascular Biology Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 血管内皮細胞運動を制御する新規CUL3複合体の解析
3. 学会等名 第59回 日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂上倫久、藤崎亜耶子、竹田浩之、前川大志、高橋宏隆、澤崎達也、泉谷裕則、東山繁樹
2. 発表標題 CUL3複合体を標的とした新規血管新生阻害化合物の探索
3. 学会等名 第23回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayako Fujisaki, Tomohisa Sakaue, Hiroyuki Takeda, Masashi Maekawa, Hirotaka Takahashi, Tatsuya Sawasaki, Hironori Izutani and Shigeki Higashiyama
2. 発表標題 Screening of anti-angiogenic compounds targeting for CUL3-SPOP-DAXX axis.
3. 学会等名 Protein Island Matsuyama 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomohisa Sakaue, Ayako Fujisaki, Masashi Maekawa, Hironori Izutani Shigeki Higashiyama
2. 発表標題 Cullin-3-based E3 ubiquitin ligases as novel modulators of VEGF signal transduction
3. 学会等名 The 16th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology (K-J meeting) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂上倫久、前川大志、藤崎亜耶子、高橋宏隆、竹田浩之、中山寛尚、澤崎達也、泉谷裕則、東山繁樹
2. 発表標題 CUL3型ユビキチンリガーゼ複合体による血管新生制御機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂上倫久、藤崎亜耶子、竹田浩之、前川大志、高橋宏隆、澤崎達也、泉谷裕則、東山繁樹
2. 発表標題 ユビキチンリガーゼを標的とした新規血管新生阻害化合物の探索
3. 学会等名 第9回スクリーニング学研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 坂上倫久、前川大志、藤崎亜耶子、中山寛尚、泉谷裕則、東山 繁樹	4. 発行年 2018年
2. 出版社 ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 44
3. 書名 月刊「細胞」2018年 11月号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>愛媛大学 医学部 心臓血管呼吸器外科学HP https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/surgery2/ 愛媛大学 臨床検体から創薬へと繋ぐ循環器研究ユニットHP https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/circuit/ 愛媛大学プロテオサイエンスセンター HP http://www.pros.ehime-u.ac.jp 愛媛大学プロテオサイエンスセンター 細胞増殖・腫瘍制御部門 HP https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/biochem2/research_map https://researchmap.jp/7000014961/</p>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

オランダ	Molecular Cell Biology, Sanquin Research			
------	---	--	--	--