

令和 3 年 5 月 4 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15718

研究課題名(和文) ユビキチンE3リガーゼ複合体を標的とした乳児血管腫の新規治療薬の探索

研究課題名(英文) Drug development for infantile hemangioma through manipulation of the ubiquitin E3 ligase complex

研究代表者

加賀城 真理(手束)(Kagajo, Mari)

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40527511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では研究代表者の所属する研究チームが同定してきたユビキチンリガーゼ足場タンパク質CUL3の制御剤による新しい血管新生阻害剤を開発する事を目的とした。CUL3は、血管新生誘導刺激により、CBF1をポリユビキチン化し分解に導き、血管新生を促進する。従って、CBF1に結合する制御剤は血管新生阻害活性を有すると考えた。そこで、愛媛大学プロテオサイエンスセンター小川敦司らと共同で、CBF1に結合する1本鎖DNAアプタマーをSELEX法により開発した。そのうち、Apt-3と命名したDNAアプタマーが細胞レベルにおいて、Hey2の発現を上昇させ血管新生を阻害する活性を有する事を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管腫(ヘマンジオーマ)は、血管内皮細胞の異常増殖が原因で乳幼児期に発症する。肝臓等の臓器に腫瘍形成が見られる重症例では、外科的手術や肝移植などが必要となる。また、皮膚に腫瘍が形成される軽症例では容姿に影響を与え、患者のQuality of Lifeを低下させる。しかし、その特異的な薬物治療法は確立されていない。本研究が開発した血管新生阻害活性を有するCBF1結合DNAアプタマーはヘマンジオーマを含めた血管新生関連疾患の新しい治療薬のシーズとなる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Excessive cell proliferation of endothelial cells as well as abnormal angiogenesis cause hemangioma. The inhibition of angiogenesis, thus, would be a therapeutic option of hemangioma. To date, most anti-angiogenic drugs only target vascular endothelial growth factor (VEGF) or its receptors. In this study, making use of the exponential enrichment (SELEX), we developed 15 single-stranded deoxyribonucleic acid (ssDNA) aptamers capable of binding to CBF1 with high affinity (K_d; 10-300 nM), named as Apt-1 to Apt-15. Among them, Apt-3, inhibited angiogenesis through the activation of Notch signaling in vitro. Apt-3 may contribute to the development of a novel angiogenic inhibitor.

研究分野：小児科学

キーワード：血管腫 血管新生阻害剤 アプタマー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞の異常増殖を主因とし、乳児や幼児期に発症する血管腫（ヘマンジオーマ）の特異的治療薬は未だに確立されていない。重症例では手術が必要であり、乳児や幼児期に対する負担は大きく、軽症例であっても容姿に影響を与えるので、患者に対する社会的影響は大きい。従って、ヘマンジオーマに対する治療薬の開発は非常に重要な課題である。ヘマンジオーマは、血管内皮細胞の異常増殖により発症すると考えられるため、血管内皮細胞の増殖及び、血管新生の阻害剤は、ヘマンジオーマに対する有効な治療薬になると考えられる。

研究代表者の所属する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では、血管新生に必須な分子機構として、cullin-3 (CUL3)型ユビキチンリガーゼ複合体を同定している。CUL3はその基質認識受容体である BTB タンパク質 (BTBP)を介して、基質タンパク質と複合体を形成し、基質タンパク質をユビキチン化 (Ub 化)する。Ub 化された基質タンパク質は分解もしくは、局在変化等の新規機能が付加される。ヒトには 183 種類の BTBP が存在し、各 BTBP が Ub 化する基質タンパク質も複数あると予想され、多種多様な CUL3 の生理機能が発揮される。実際に、血管内皮細胞の細胞増殖と血管新生を強く誘導する vascular endothelial growth factor (VEGF)の刺激により、CUL3 の基質認識受容体である BAZF の mRNA 発現が安定化し、BAZF のタンパク質が発現し、CUL3 は BAZF と複合体を形成し、Notch シグナル転写因子である CBF1 をポリユビキチン化して分解に導く。これにより、血管内皮細胞の増殖を抑制する Notch シグナルが解除され、血管内皮細胞の増殖と血管新生が強く駆動される。即ち、CUL3/BAZF/CBF1 の複合体形成阻害剤や、CBF1 の機能活性化剤は、血管新生を阻害する事ができると想定された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CBF1 に対する制御剤を新しい血管新生阻害剤のシーズとして導出する事を目的とした。具体的なモダリティとして、CBF1 に結合する 1 本鎖 DNA アプタマーを開発し、その中から、CUL3/BAZF/CBF1 の複合体形成阻害剤または、CBF1 の機能活性化剤の導出を試みた。活性評価系としては、血管内皮細胞の増殖と、in vitro での血管新生能を評価した。

3. 研究の方法

(1) CBF1 に結合する 1 本鎖 DNA アプタマーの開発

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて、ビオチンを付加した CBF1 (Biotin-CBF1)を大量合成した。Biotin-CBF1 はストレプトアビジンビーズに対して、固相化した (CBF1-beads)。CBF1-beads に対して、1 本鎖 DNA ライブラリーを供して、SELEX 法を用いて CBF1 に結合する 1 本鎖 DNA アプタマーを開発した。SELEX は 14 ラウンド実施し、リード数の多い上位 15 配列を取得した。PCR 法 (一部はピアコアによる直接法も実施)を用いて結合解離定数 (Kd)を算出した。本項目は研究協力者の愛媛大学プロテオサイエンスセンター 生体分子工学部門の小川敦司准教授と八田佳子が実施した。

(2) CBF1 結合 DNA アプタマーの血管新生に対する阻害活性の検討

取得した 15 種類の CBF1 結合 DNA アプタマーの血管新生に対する影響を調べるために、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC)を用いて、増殖試験 (WST-1 assay)と血管新生試験 (tube formation assay)を実施した。細胞内への CBF1 結合 DNA アプタマーの導入はリポフェクション法を用いた。血管新生阻害活性を有するアプタマーに関しては、その作用点を CBF1 の機能に注目して解析を行なった。

(3) Apt-3 の性状解析

血管新生阻害活性を有する事が見出された CBF1 結合 DNA アプタマーの一つ Apt-3 に関して、CBF1 のどこのアミノ酸領域に結合しているかを調べた。コムギ無細胞タンパク質合成系により FLAG タグ付きの各種 CBF1 変異体を合成し、ビオチン化 Apt-3 との結合をアルファスクリーンにより調べた。Negative control の 10 倍以上の化学発光を結合陽性とした。

4. 研究成果

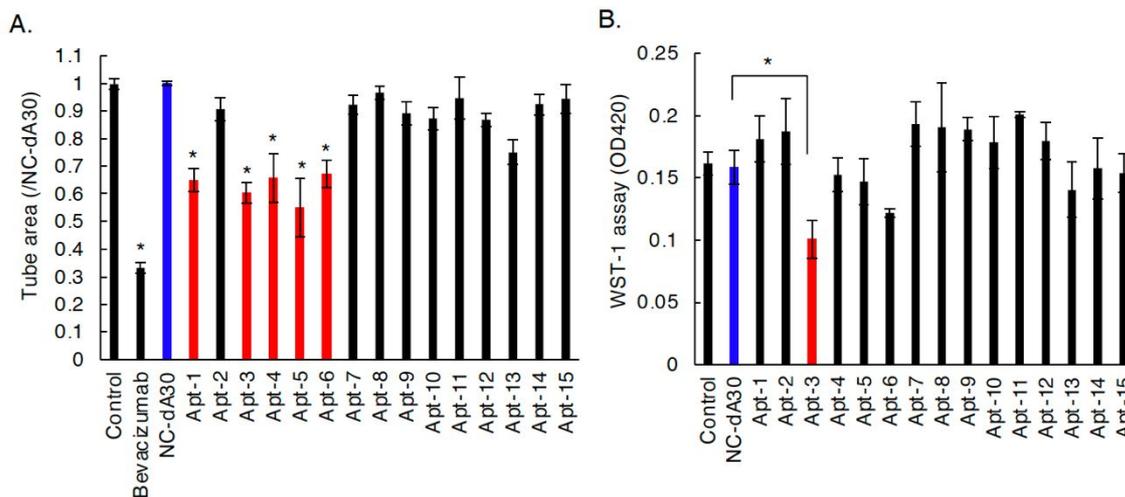
(1) CBF1 に結合する 1 本鎖 DNA アプタマーの開発

SELEX 法を用いて CBF1 に結合する 1 本鎖 DNA アプタマー (CBF1 結合 DNA アプタマー)を開発した結果、15 種類の CBF1 結合 DNA アプタマーの取得に成功した。Kd 値は約 10-300 nM の範囲であり、結合力の高い DNA アプタマーを取得できたと思われる。また、ランダム領域の配列に相同性がある CBF1 結合 DNA アプタマーが複数あり、大きくは 3 種類の family に分類できた。更に、一部の CBF1 結合 DNA アプタマーの配列には既存の CBF1 結合 DNA 配列が保存されており、今回

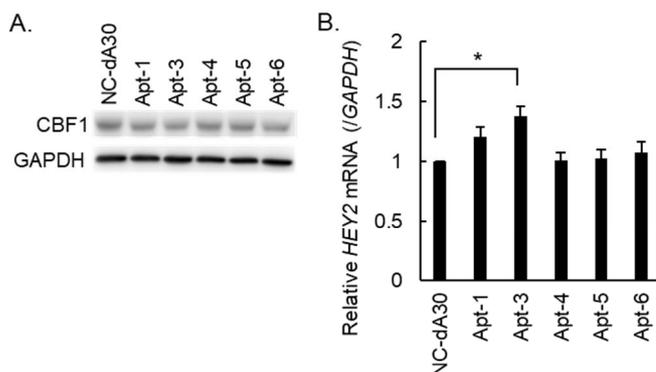
の SELEX 法の妥当性が示唆された。

(2) CBF1 結合 DNA アプタマーの血管新生に対する阻害活性の検討

取得した 15 種類の CBF1 結合 DNA アプタマー (Apt-1 から Apt-15 と命名) の細胞レベルでの機能を評価した結果、HUVEC の血管新生を優位に阻害するアプタマーとして、Apt-1, 3, 4, 5, 6 を見出した (図 1A)。このうち、Apt-3 に関しては HUVEC の細胞増殖も優位に阻害する事が分かった (図 1B)。以上より、Apt-3 は血管内皮細胞の細胞増殖を阻害し、血管新生を抑制している可能性が強く示唆された。次に HUVEC における Apt-1, 3, 4, 5, 6 の CBF1 に対する作用点の解明を試みた。その結果、これらのアプタマーは CBF1 のタンパク質量には変化を与えなかった (図 2A)。従って、Apt-1, 3, 4, 5, 6 は BAZF/CBF1 の結合を阻害して、CBF1 のタンパク質分解を阻害している可能性は極めて低い。一方で、Apt-1, 3, 4, 5, 6 の処理により、CBF1 の下流で転写活性化する HEY2 の mRNA レベルが優位に増加した (図 2B)。以上より、Apt-3 は CBF1 に結合して、CBF1 の機能を活性化することにより、HUVEC の血管新生を阻害している事が強く示唆された。



【図1】(A) HUVECを用いた血管新生アッセイ (tube formation assay, n=4, *, p<0.05)。NC-dA30: control aptamer。 (B) HUVECを用いた細胞増殖アッセイ (WST-1 assay, n=3, *, p<0.05)。NC-dA30: control aptamer。



【図2】(A) CBF1結合DNAアプタマー処理によりCBF1タンパク質の発現は変化しない (HUVEC)。NC-dA30: control aptamer。 (B) Apt-3処理により、CBF1下流のHEY2のmRNA量が増加する (HUVEC, n=3, *, p<0.05)。NC-dA30: control aptamer。

(3) Apt-3 の性状解析

Apt-3 の CBF1 結合領域を探索した結果、CBF1 は LAG1 domain の C 末側の連続した 21 アミノ酸 (SKRIKVISKPSKKKQSLKNAD) に選択的に結合している事が分かった。興味深いことにこの領域は CBF1 の標的 2 本鎖 DNA の結合領域でもあった。Apt-3 が当該領域に結合する事で、どのように HEY2 の転写を促進しているかは今後の解析が必要である。また今後、Apt-3 を新しい血管新生阻害剤として、ヘマンジオーマ等の疾患の治療薬として開発していくためには、Apt-3 の効率的且つ、無毒な細胞内導入と組織送達法を検討する必要がある。配列の最小化、安定化させるための化学修飾の検討と共に進めていく。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Tezuka-Kagajo Mari, Maekawa Masashi, Ogawa Atsushi, Hatta Yoshiko, Ishii Eiichi, Eguchi Mariko, Higashiyama Shigeki	4. 巻 30
2. 論文標題 Development of Human CBF1-Targeting Single-Stranded DNA Aptamers with Antiangiogenic Activity In Vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acid Therapeutics	6. 最初と最後の頁 365 ~ 378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/nat.2020.0875	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mari Tezuka-Kagajo, Yoshiko Hatta, Masashi Maekawa, Atsushi Ogawa, Minenori Ishimae, Mariko Eguchi and Shigeki Higashiyama
2. 発表標題 Development of human CBF1-targeting single-stranded DNA aptamers as angiogenic inhibitors.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 C B F 1 結合核酸分子およびその用途	発明者 東山繁樹・小川敦司・前川大志・八田佳子・加賀城真理	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-059546	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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
研究協力者	東山 繁樹 (HIGASHIYAMA Shigeki)		
研究協力者	小川 敦司 (OGAWA Atsushi)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	前川 大志 (MAEKAWA Masashi)		

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