

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16317

研究課題名(和文)効果的な大腸癌治療を志向した新規抗血管新生医薬品のシーズ化合物の探索

研究課題名(英文)Development of novel anti-angiogenic drugs for effective colorectal cancer treatment

研究代表者

谷川 和史(Tanigawa, Kazufumi)

愛媛大学・医学部附属病院・助教(病院教員)

研究者番号：20527519

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):大腸癌は血管新生が非常に盛んであり、血管新生阻害剤が薬物治療として有効である。一方で、VEGF阻害剤は薬剤耐性や副作用といった問題点を有しており、VEGF以外を標的とした新しい血管新生阻害剤の開発が重要である。本研究において我々は、血管新生の新しい制御因子として細胞内膜輸送関連分子であるSNX9を同定し、SNX9による血管新生制御機構の解明に成功した。また、大腸癌患者由来の病理組織において、腫瘍血管内皮でSNX9が高発現している事実を突き止めた。更に、SNX9を標的とする血管新生阻害剤探索のスクリーニング系をコムギ無細胞タンパク質合成系とアルファスクリーンを組み合わせることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、SNX9の血管新生における機能を細胞生物学及び、臨床組織学の観点から解明した点で学術的意義は高い。また、SNX9の機能を人為的に阻害する血管新生阻害剤のシーズ探索のためのスクリーニング系を構築した点で、創薬応用への展開が期待できる。

研究成果の概要(英文):Angiogenesis is extremely active in the colorectal cancers, and thus angiogenic inhibitors exhibit good anti-tumor efficacy in colorectal cancer therapy. In this study, we aim to identify novel molecular machinery for angiogenesis, which would be a promising target for the development of new anti-angiogenic inhibitors. We found that SNX9 is essential for angiogenesis partially through the recycling of integrin beta 1 in human endothelial cells. The protein expression of SNX9 was increased in tumor endothelium of human colorectal cancer tumors. We also established the AlphaScreen system for the screen of agents that inhibit the molecular functions of SNX9 in vitro.

研究分野：消化器外科学関連

キーワード：SNX9 血管新生 大腸癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 血管新生が極めて盛んな大腸癌治療では、外科的手術に加え、VEGF を標的とする抗血管新生医薬品の投与が一定の抗腫瘍効果を示す。しかしながら、既存の抗血管新生医薬品は高血圧等の副作用と長期投与による薬剤耐性が問題視されており、VEGF 以外を標的とする次世代型の新規抗血管新生医薬品の開発が急務である。

(2) 我々はユビキチン (Ub)E3 リガーゼ複合体の足場タンパク質である cullin-3 (CUL3) による血管新生制御機構の分子基盤を細胞生物学及び、生化学的手法を用いて解析を推進してきた。その過程で、CUL3 が血管新生に必須な接着分子 integrin beta 1 の細胞内小胞 (エンドソーム) から細胞膜への輸送において機能している事を明らかにした (Maekawa, Tanigawa et al., Biol. Open. 2017)。CUL3 は Ub 化標的基質認識受容体である BTBP (ヒトでは 183 遺伝子が保存されている) を介して、基質タンパク質を Ub 化する事が知られている。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。そこで、我々は BTBP siRNA library を構築し、血管内皮細胞において siRNA screening を実施した結果、血管新生に必須な膜タンパク質群の細胞内膜輸送に関与する BTBP として KCTD protein を同定した。更に、愛媛大学プロテオサイエンスセンターが保有する human focused protein array から、アルファスクリーンを用いて、KCTD protein と直接結合するタンパク質を探索した所、細胞内膜輸送制御分子である SNX9 を見出した。重要な事に、SNX9 も KCTD10 protein もその発現抑制によって、血管新生が著しく阻害された。また、SNX9 は Ub 化を受け、SNX9 は CUL3/KCTD protein の基質タンパク質である事が強く示唆された。即ち、CUL3/KCTD protein/SNX9 タンパク質複合体は血管新生に必須な分子軸であり、KCTD protein と SNX9 の結合を阻害する人為的制御剤は、CUL3/KCTD protein 軸による SNX9 の血管新生に必須な機能的な Ub 化を抑制し、血管新生を阻害する事に繋がると仮説を立て、本研究を立案した。

2. 研究の目的

申請者は本研究を開始する以前に、血管新生に必須なユビキチン E3 リガーゼタンパク質複合体として CUL3/KCTD protein/SNX9 複合体を同定している。この CUL3/KCTD protein/SNX9 タンパク質複合体の形成は血管新生を正に制御し、既存の血管新生阻害剤が標的とする VEGF シグナルとは異なる作用点であるので、新規抗血管新生医薬品の開発標的として大変魅力的である。そこで本研究の目的は、大腸癌への治療応用を志向して、当該複合体を抗血管新生医薬品の新規開発標的とし、(1) SNX9 による血管新生制御機構の解明し、(2) CUL3/KCTD protein/SNX9 複合体形成阻害剤を新規抗血管新生医薬品のシーズ化合物として導出する事の 2 点を目的とした。

3. 研究の方法

(1) SNX9 による血管新生制御機構の解明

SNX9 の Ub 化機構を Ub 化アッセイ及び、質量分析法で調べた。また、ヒト臍帯血静脈血管内皮細胞 (HUVEC) における SNX9 の siRNA による発現抑制系、及び、レンチウイルスによるレスキュー実験系を構築した。更に、integrin beta 1 に代表される血管新生に必須な膜タンパク質の発現量をウェスタンブロットング法で検出し、細胞内局在を細胞染色で観察した。Integrin beta 1 に関しては、細胞内局在変化を各種オルガネラマーカーとの共染色で観察した。また、transferrin と integrin beta 1 の uptake assay、recycling assay を実施した。最後に、外科的に切除された実際のヒトの大腸癌組織の腫瘍血管内皮における SNX9 の発現を組織染色法により調べた。

(2) CUL3/KCTD protein/SNX9 複合体形成阻害剤の導出

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて、ピオチン化 CUL3、ピオチン化 SNX9、FLAG-KCTD protein のリコンビナントタンパク質を合成した。次に、ピオチン化 CUL3/FLAG-KCTD protein 及び、FLAG-KCTD protein/ピオチン化 SNX9 の結合を検出するアルファスクリーンの系を構築した。SNX9 に関しては、LC domain、PX domain、BAR domain を欠損させた変異体も作成し、KCTD protein との結合領域の同定を試みた。このアルファスクリーンを技術基盤に KCTD protein と SNX9 の結合阻害剤探索を試みた。

4. 研究成果

(1) SNX9 による血管新生制御機構の解明

一般に、Ub 化を受けた基質タンパク質はプロテアソーム系で分解を受けるが、HUVEC において CUL3 及び、KCTD protein を発現抑制しても、SNX9 のタンパク質発現量には変化は見られなかった。この結果は、SNX9 は CUL3/KCTD protein 複合体により Ub 化を受ける事で局在変化等の新規機能を獲得している事を強く示唆する。実際に、293T 細胞において SNX9 の Ub 化を Ub

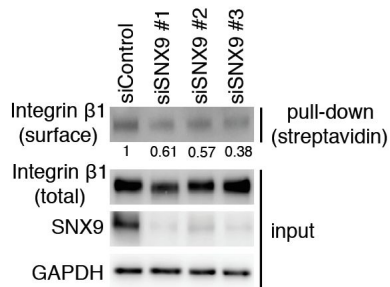
化アッセイにより調べた結果、KCTD protein の発現によりポリ Ub 化が促進される事を明らかにした。更に、di-Gly 抗体を用いた質量分析法で SNX9 の Ub 化リジンとして 3 つのリジンを同定する事に成功した。

SNX9 を発現抑制する事で、HUVEC の血管新生 (tube formation) が強く阻害されるが、我々はその分子機構を細胞生物学的手法により解析した。その結果、SNX9 の発現抑制により、血管新生に必須な integrin beta 1 の細胞全体の存在量は変わらないものの、細胞内に蓄積し、細胞膜上の存在量が著しく減少する事が分かった (図 1)。共局在解析の結果、細胞内に蓄積した integrin beta 1 は、初期エンドソーム及び、リサイクリングエンドソームに局在していた。更に、輸送アッセイを実施した結果、SNX9 の発現抑制により、integrin beta 1 及び、トランスフェリンの細胞外から細胞内への取り込みには影響が見られなかったものの、細胞内から細胞膜へのリサイクル輸送が有意に遅延していた。以上の結果から、SNX9 は血管新生に必須な integrin beta 1 の細胞内から細胞膜へのリサイクル輸送を正に制御する

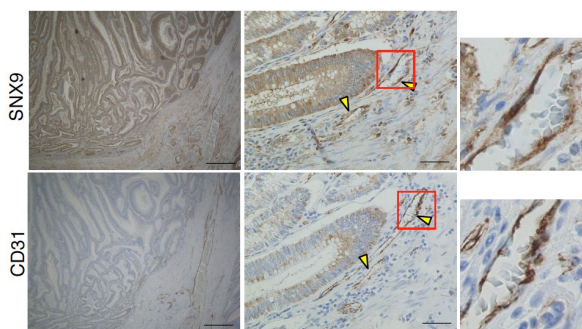
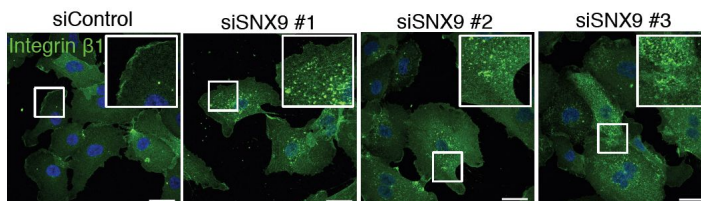
事で、血管新生を促進している事が明らかにされた。大腸癌は血管新生が盛んな固形癌である。そこで、実際の大腸癌患者の腫瘍血管内皮において SNX9 が高発現しているかどうかを組織染色法により調べた。その結果、57 例の症例でステージ、腫瘍発症部位に関わらず、すべての症例の腫瘍血管内皮細胞で SNX9 の高い染色を得た (図 2)。重要な事に、これら症例では腫瘍血管内皮だけでなく、大腸癌上皮細胞でも SNX9 が極めて高発現している事が分かった。以上の結果から、SNX9 が大腸癌の腫瘍血管内皮で高発現する事で、血管新生が促進され、大腸癌形成が促進されている事が示唆された (Tanigawa et al., J. Cell. Physiol. 2019)。また、SNX9 の大腸癌上皮細胞における oncogene としての機能も強く示唆される。今後は、大腸癌上皮細胞における SNX9 の機能解析を展開していく。

(2) CUL3/KCTD protein/SNX9 複合体形成阻害剤の導出

アルファスクリーンを実施した結果、CUL3/KCTD protein、KCTD10 protein/SNX9 の結合シグナルともに、negative control の 10 倍以上のシグナルを得る事ができた。再現性も非常に良く、96 well, 384 plate の両方の系で、阻害剤スクリーニングの系の構築に成功した。SNX9 は分子内に LC domain (タンパク質相互作用に必要)、PX domain (脂質結合ドメイン)、BAR domain (膜曲率認識ドメイン) を有する。各種ドメインを削った SNX9 を用いて、アルファスクリーンを実施した結果、KCTD protein は、SNX9 の LC-PX domain の両方にまたがる形で、SNX9 に結合している事が分かった。現在、構築したアルファスクリーンを技術基盤に KCTD protein と SNX9 の結合阻害剤探索を進めている。今後は、阻害剤スクリーニングと並行して、KCTD protein との結合に必須な SNX9 の LC-PX domain の機能解析を細胞レベルでも推進していく。



【図1】
上段: SNX9を発現抑制すると、integrin β 1の全体の発現量は変わらないが、細胞膜上の存在量(図中の数字)が減少する。
下段: SNX9を発現抑制すると、integrin β 1が細胞内に蓄積する。白い四角を右上に拡大。スケールバー: 20 μ m。



【図2】
SNX9はヒト大腸癌組織中の腫瘍血管内皮 (黄色矢頭)において、高発現している。赤い四角を右に拡大。スケールバー: 500 μ m。

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 1件）

1. 著者名 Kazufumi Tanigawa	4. 巻 in press
2. 論文標題 SNX9 determines the surface levels of integrin 1 in vascular endothelial cells: Implication in poor prognosis of human colorectal cancers overexpressing SNX9	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 journal of cellular physiology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.28346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷川和史、前川大志、清井武志、中山淳、北澤理子、北澤荘平、仙波憲太郎、田口友彦、渡部祐司、東山繁樹
2. 発表標題 大腸癌組織に高発現する新規血管新生制御因子SNX9の機能解析
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国・四国支部会例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷川和史、前川大志、清井武志、北澤理子、北澤荘平、秋田聡、吉田素平、石丸啓、渡部祐司、東山繁樹
2. 発表標題 新規に同定した血管新生因子SNX9は大腸癌組織に高発現する
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	前川 大志 (Maekawa Masashi)		

6. 研究組織（つづき）

	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	清井 武志 (Kiyoi Takeshi)		
研究協力者	中山 淳 (Nakayama Jun)		
研究協力者	北澤 理子 (Kitazawa Riko)		
研究協力者	北澤 荘平 (Kitazawa Sohei)		
研究協力者	仙波 憲太郎 (Semba kentaro)		
研究協力者	田口 友彦 (Taguchi Tomohiko)		
研究協力者	秋田 聡 (Akita Satoshi)		
研究協力者	吉田 素平 (Yoshida Motohira)		

6. 研究組織（つづき）

	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	石丸 啓 (Ishimaru Kei)		
研究協力者	渡部 祐司 (Watanabe Yuji)		
研究協力者	東山 繁樹 (Higashiyama Shigeki)		