

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10030

研究課題名(和文) ユビキチンE3複合体を標的とした血管奇形の新規治療戦略の創出

研究課題名(英文) Creation of new therapeutic strategies for vascular malformations by targeting the ubiquitin E3 complex

研究代表者

中岡 啓喜 (Nakaoka, Hiroki)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30172266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞は血管の内側を覆う細胞で、直接、血流と接し、多種多様なシグナルを受容しその性状を大きく変化させる。特に新しい血管の構築である血管新生は多様な病態に関与し、過剰な血管新生は様々な血管奇形を引き起こす。現在までに、血管奇形に対する治療手段は外科的治療が中心で、治療薬の開発は発展途上である。本研究では、申請者らが独自に見出してきた血管新生のマスター制御因子CUL3ユビキチンリガーゼ複合体の足場タンパク質が、血管奇形の血管内皮細胞に高発現することを明らかにした。さらに、アルファスクリーンを利用して、当該タンパク質の機能阻害剤の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管奇形は異常/過剰な血管新生が原因となる疾患と考えられている。外見・容姿・機能面への影響に加え、重篤化すると心不全などの病態を引き起こすものも見られる。本研究で見出した血管奇形で発現するユビキチンリガーゼに対する阻害剤は今後新たな血管奇形の治療薬のシーズとして期待される。

研究成果の概要(英文)：The dysregulation of angiogenesis, new vascular vessel formation, causes some vascular malformations. The disease leads to not only the decrease of patients' quality of life but also the critical health issues such as heart failure. To date, pharmaceuticals for vascular malformations is not well established because of the lack of molecular mechanisms underlying the formation of malformations. In this study, we found that a BTBP for the cullin-3/RING ubiquitin ligase complex highly expressed in endothelial cells of vascular malformations. We also screened compounds which inhibit the BTBP function using the AlphaScreen system. As a result, a set of compounds were identified as an inhibitor of the cullin-3/BTBP interaction.

研究分野：血管生物学、形成外科

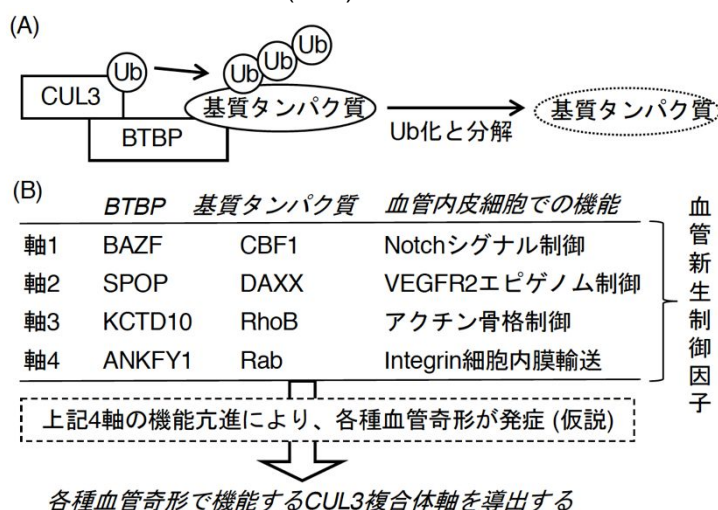
キーワード：血管奇形 血管新生 ユビキチンリガーゼ

1. 研究開始当初の背景

新しい血管の構築である血管新生が生じる際、血管を構築する血管内皮細胞は外部からの刺激に応答し、その性状をダイナミックに変化させる。この血管内皮細胞自身の増殖/移動/透過性/形態の制御異常により、血管同士が複雑に絡み合うことで血管奇形が発症する。血管奇形は、血管の増殖/退縮/形態異常に起因する疾患であり、毛細血管奇形、静脈奇形、動静脈奇形に大別される。各種血管奇形を発症すると整容面の問題に加え、出血、高血圧、心不全等の重大疾患を誘発するため、治療が必要になる。既存の血管奇形の治療には外科治療が必須であるので、新規の薬物治療を開発できれば、患者の利益に加え、医療経済にも大きく貢献できる。近年、プロプラノロールやラパマイシンなどの有効性が提唱されているが、その効果は限定的である。また、現行の血管奇形に対する治療法は外科治療が中心で、血管奇形発病の詳細な分子基盤が殆ど不明である為、その薬物治療は確立されていないのが現状である。

2. 研究の目的

申請者の研究チームは今までに、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC)における血管新生の多面的制御機構として、4つの CUL3 型ユビキチン E3 複合体の同定に成功している (図 1; CUL3/BAZF/CBF1, CUL3/SPOP/DAXX, CUL3/KCTD10/RhoB, CUL3/ANKFY1/Rab)。ユビキチン (Ub)E3 足場タンパク質である CUL3 は BTBP アダプター分子 BTBP を介して基質タンパク質と三者複合体を形成し、基質タンパク質の Ub 化を促進する。CUL3 は異なる BTBP を介して、異なる基質タンパク質が Ub 化を受け、分解に導くことで増殖、エピゲノム、細胞骨格、細胞内膜輸送を多彩に制御し、血管新生の複雑な過程の各プロセスを制御する (図 1)。申請者が所属する研究チームは、図 1 で示した 4 つの CUL3 型ユビキチン E3 は全て血管新生に必須であることを見出している。従って、これらの軸の制御異常により、血管奇形などの血管関連疾患が発症することが想定された。そこで申請者は、この 4 つの CUL3 複合体軸の発現プロファイルが変動し、血管機能制御が異常になることで種々のサブタイプの血管奇形を発症すると仮説を立てた (図 1)。そこで本研究では、各種血管奇形において高発現する CUL3 複合体軸、特にその中心をなす BTBP を同定し、当該分子基盤を血管奇形の治療薬の開発標的として導出することを目的として、実験を実施した。



【図1】本研究の概要。(A) CUL3はBTBPを介して基質タンパク質と三者複合体を形成し、基質タンパク質をUb化し、分解に導く。(B) 各種血管奇形の血管内皮細胞で高発現するBTBPを同定し、当該BTBPに対する制御剤を導出する。

3. 研究の方法

(1) 血管奇形組織における BTBP の発現解析

血管奇形中の血管内皮細胞における BTBP の発現を免疫組織化学により観察した。具体的には、愛媛大学医学部附属病院形成外科で、外科的に切除された血管奇形の組織をパラフィン切片にし、市販されている各種 BTBP の抗体を用いて、組織染色を行った。最終的な発色は DAB 染色を行った。尚、本実験においてヒトの血管奇形組織の使用にあたっては、愛媛大学医学部附属病院臨床研究支援センターの承認を受けた上で実施した。

(2) CUL3/BTBP の結合を阻害する低分子化合物の探索

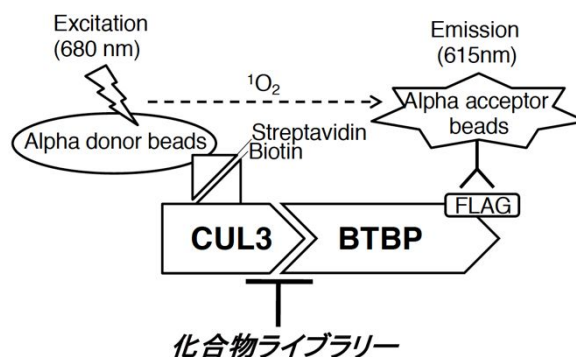
実験(1)で同定した血管奇形の血管内皮細胞において高発現している BTBP について、CUL3 との結合阻害剤の探索を行った。CUL3 と BTBP が複合体を作ることによって、血管新生が強く駆動され、血管奇形が形成される可能性があるため、CUL3/BTBP 結合阻害剤は血管奇形の発症を抑制できると想定される。具体的には、Avi タグを付加した CUL3 及び、FLAG タグを付加した BTBP を pEU ベクターにクローニングし、コムギ無細胞タンパク質合成系により、リコンビナントタンパク質の合成を行った。この時、ビオチンリガーゼである BirA と d-ビオチンを添加することで、ビオチン

化も同時に行った。タンパク質の発現はウェスタンブロッティングにより確認した。次に、アルファスクリーンシステムを用いて、両者のタンパク質の結合検出系を構築した。ハイスループット性を担保するために、n=30-50のアッセイを行い、実験間の誤差が少ないアッセイ系を構築した。系の構築後は、当該アルファスクリーンの系に対して、1,000種のコア化合物ライブラリーを供して、結合シグナルが negative control の 10 倍以下に低下させる化合物の探索を実施した (図 2)。

4. 研究成果

(1) 血管奇形組織における BTBP の発現解析

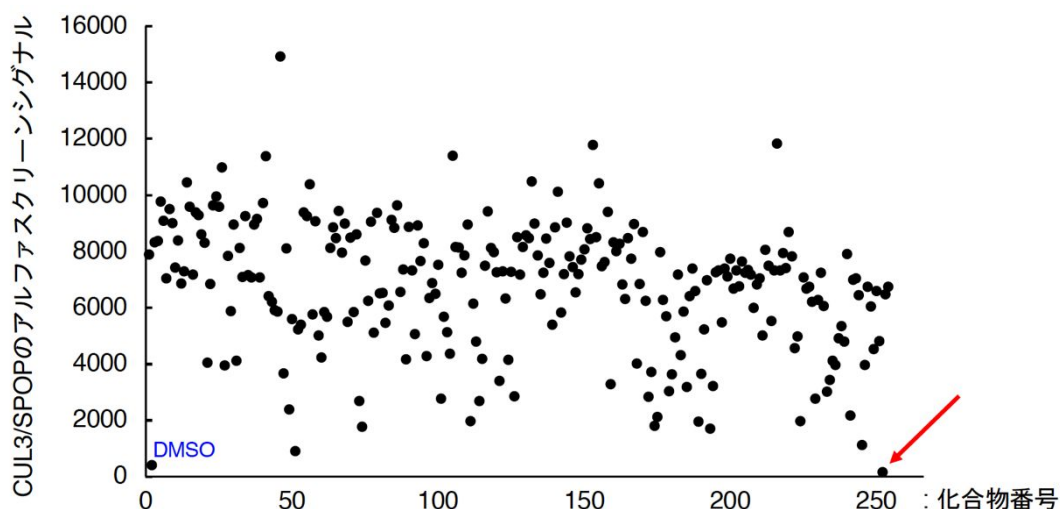
動静脈血管奇形の組織切片を BAZF、SPOP、KCTD10、ANKFY1 の抗体を用いて、免疫組織染色を行った。その結果、BAZF、ANKFY1 については明らかな染色シグナルを検出することはできなかった。これら 2 つの市販の抗体が免疫組織染色に適していなかった可能性が考えられた。今後、リコンビナントタンパク質を合成し、ラットやマウスに免疫してモノクローナル抗体を自作する必要がある。一方で、SPOP と KCTD10 については、動静脈血管奇形中の血管内皮細胞における発現を確認できた。特に、SPOP は、KCTD10 と比較して、再現性良く強い染色が観察された。興味深いことに、SPOP は血管内皮細胞だけでなく、皮膚の角化細胞などにも強い発現が認められた。SPOP の血管内皮細胞以外の細胞における重要な機能が示唆された。以上より、以降の実験(2)では SPOP に対する制御剤の探索を行うこととした。



【図2】 コア化合物ライブラリー (約1,000種類) から、CUL3/BTBP のアルファスクリーンの値を低下させる阻害剤を探索する。

(2) CUL3/BTBP の結合を阻害する低分子化合物の探索

コムギ無細胞タンパク質合成系で合成したビオチン化 SPOP と FLAG-BTBP を用いて構築した CUL3/SPOP の結合検出アルファスクリーン系に対して、コア化合物ライブラリー (1,000 化合物) を供した。その結果、CUL3/SPOP の結合を阻害する化合物を複数同定することに成功した (図 3)。今回、見出したヒット化合物を HUVEC に処理した結果、細胞増殖と血管新生を阻害することも確認した。今後は、これらのヒット化合物の類縁体ライブラリーを構築し、構造最適化を行う。併せて、SPOP に対する特異性を担保するためのカウンターアッセイとして、CUL3/KCTD10 の相互作用を阻害する化合物探索も同様のコア化合物ライブラリーを用いて実施した。その結果、SPOP に直接結合して、CUL3 との結合を阻害していると想定される化合物を同定することに成功した。今後は、当該化合物の最適化のために、SPOP とヒット化合物の共結晶解析を進めていく計画である。また、ピアコアなどにより結合解離定数も算出していく必要がある。



【図3】 化合物スクリーニング結果の一部。
矢印で示した化合物はCUL3/SPOPの結合を著しく阻害する化合物候補である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mimura Hidefumi, Akita Sadanori, Fujino Akihiro, Jinnin Masatoshi, Ozaki Mine, Osuga Keigo, Nakaoka Hiroki, et.al	4. 巻 47
2. 論文標題 Japanese Clinical Practice Guidelines for Vascular Anomalies 2017	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e138-e183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.15189	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 -

1. 著者名 Mimura Hidefumi, Akita Sadanori, Fujino Akihiro, Jinnin Masatoshi, Ozaki Mine, Osuga Keigo, Nakaoka Hiroki, et.al	4. 巻 38
2. 論文標題 Japanese clinical practice guidelines for vascular anomalies 2017	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Radiology	6. 最初と最後の頁 287～342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11604-019-00885-5	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 -

1. 著者名 Mimura Hidefumi, Akita Sadanori, Fujino Akihiro, Jinnin Masatoshi, Ozaki Mine, Osuga Keigo, Nakaoka Hiroki, et.al	4. 巻 62
2. 論文標題 Japanese clinical practice guidelines for vascular anomalies 2017	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 260～307
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.14077	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0件

〔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
研究分担者	東山 繁樹 (Higashiyama Shigeki) (60202272)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授 (16301)	

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
---------	---------