

令和 3 年 4 月 20 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08013

研究課題名(和文) 血管新生制御因子CUL3によるmicroRNA制御を標的にした大腸癌治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms underlying angiogenesis is important for the development of new anti-angiogenic drugs

研究代表者

林 則之 (Hayashi, Noriyuki)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：60745404

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)：血管新生が非常に活発な大腸癌治療において、血管新生の新規分子基盤を解明することは、新しい抗血管新生医薬品の開発標的の創出の観点からも極めて重要である。本研究では、ユビキチンリガーゼ複合体cullin-3 (CUL3)/KCTD10依存性の血管新生の分子機構の解明を行なった。その結果、血管内皮細胞及び、肝癌細胞において、翻訳制御因子であるEIF3DがCUL3/KCTD10依存的にユビキチン化を受けている事を明らかにする事に成功した。EIF3Dを発現抑制する事により、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUEVC)の血管新生は劇的に阻害される事を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、臨床応用されている血管新生阻害剤は全て血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)または、VEGF受容体を標的としている。より効果的な癌治療を進めるためには、血管新生阻害剤のレパートリーを拡充する必要がある。今後、本研究で明らかにしたCUL3/KCTD10/EIF3D複合体を標的とした新しい血管新生阻害剤の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Elucidation of mechanisms underlying angiogenesis is important for the development of new anti-angiogenic drugs. Here, we found that EIF3D, a critical translational factor, is ubiquitinated by the cullin-3 (CUL3)/KCTD10 ubiquitin ligase complex in both endothelial cells and hepatocellular carcinoma cells. Knockdown of EIF3D in endothelial cells drastically inhibited tube formation of endothelial cells, that mimics angiogenesis in vitro. Our results suggest that CUL3/KCTD10/EIF3D would be a promising target for development of novel anti-angiogenic drugs.

研究分野：消化器内科学

キーワード：血管新生 ユビキチンリガーゼ 翻訳制御

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は固形癌の中でも、血管新生が極めて活発で、増殖能と転移能が高い癌種として知られている。従って、外科的手術と共に、大腸癌腫瘍組織中の血管新生の人為的制御がその治療効果を高める為に必須である。血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 及び、その受容体 (VEGFR) を標的とする既存の抗血管新生医薬品は、良い抗腫瘍効果を示すものの、皮膚障害や高血圧等の有害事象と長期投与による薬剤耐性の問題があり、VEGF や VEGFR 以外を標的とする次世代型の抗血管新生医薬品の開発が重要である。

### 2. 研究の目的

ユビキチン E3 リガーゼ複合体足場タンパク質 cullin-3 (CUL3) はアダプター分子である 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。研究代表者らの研究チームは今までに、CUL3 と、そのアダプター分子 KCTD10 をヒト血管内皮細胞において発現抑制すると、細胞の形態が異常になり、血管新生が著しく阻害される事を見出している。CUL3 は KCTD10 と複合体を形成し、基質タンパク質を Ub 化する。一方で、CUL3/KCTD10 依存的に Ub 化を受け、血管新生において機能的な Ub 化基質タンパク質は未だに同定できておらず、その分子基盤の全貌は不明のままである。そこで本研究では、CUL3/KCTD10 依存的な血管新生制御機構を Ub 化基質タンパク質の同定と、その性状解析の側面から解き明かす事を目的とした。当該分子基盤は新規抗血管新生医薬品の開発標的となると考えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 質量分析法を用いた KCTD10 複合体解析

KCTD10 で Ub 化を受ける基質タンパク質は KCTD10 と複合体を形成する可能性が極めて高い。そこで、KCTD10 複合体の分子実体を同定するために、Halo-KCTD10 を 293T 細胞に発現させ、細胞抽出液を Halo-resin beads と混合し、Halo-KCTD10 beads を調整した。当該ビーズにヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の細胞抽出液を混合し、Halo-KCTD10 beads に結合するタンパク質をプルダウンした。沈降物を SDS-PAGE 及び、CBB 染色に供し、コントロールビーズとの沈降物中のタンパク質のバンドパターンを比較した。コントロールビーズからは検出されず、Halo-KCTD10 beads から検出されたバンドを質量分析にかけて、タンパク質の同定を行なった。

#### (2) KCTD10 結合タンパク質の siRNA library を用いた血管新生制御遺伝子の探索

Halo-KCTD10 beads に特異的に結合していたタンパク質に関して、siRNA library を構築し、HUVEC に対して、発現抑制し、血管新生能を評価した。血管新生は HUVEC をコラーゲンゲルに挟み込み、VEGF で刺激をかける tube formation assay により評価した。

#### (3) EIF3D の Ub コードの解明

EIF3D に関しては、CUL3/KCTD10 依存的に Ub 化を受けるかを細胞レベルでの Ub assay で確認した。細胞は HUVEC、肝癌細胞 HepG2 cells、大腸癌細胞 HCT116 cells を用いた。更に、di-Gly 抗体と質量分析を利用する事で、Ub 化を受ける責任リジンの同定を行なった。また、様々な Ub 変異体を用いた Ub assay を行う事で、EIF3D の Ub コード (Ub chain の種類) の解明を行なった。Ub 化を受けない EIF3D の変異体 (KR 体) を細胞に発現させ、EIF3D の Ub 化の意義を検討した。

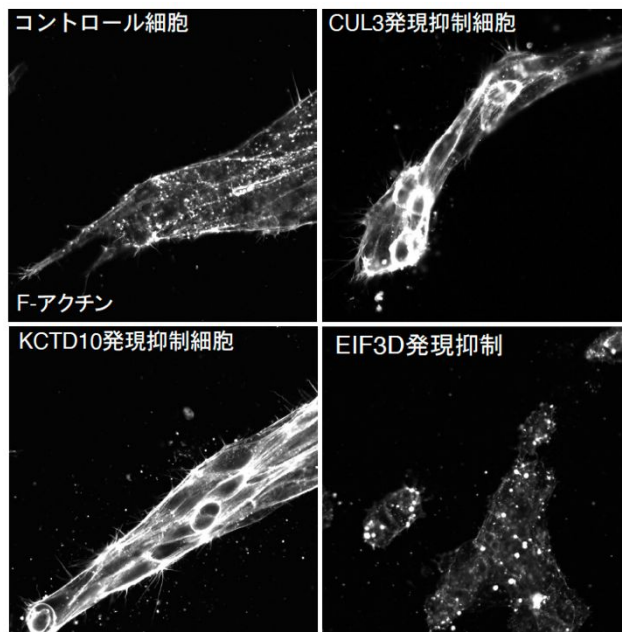
### 4. 研究成果

#### (1) 質量分析法を用いた KCTD10 複合体解析

質量分析の結果、HUVEC 由来の KCTD10 結合タンパク質として、61 分子のタンパク質を検出する事ができた。また、同時に肝癌細胞である HepG2 cells の細胞抽出液を用いても同様の実験を行ない、28 分子のタンパク質の同定に成功した。興味深いことに、両者から共通する KCTD10 結合タンパク質として、EIF3D、GNL3、NPLC4 の 3 分子を検出した。

#### (2) KCTD10 結合タンパク質の siRNA library を用いた血管新生制御遺伝子の探索

上述の質量分析から得られた 61 分子のタンパク質に関して、siRNA library を構築し、HUVEC に対して、個別に発現抑制し、tube formation assay による血管新生活性を検証した。その結果、翻訳制御因子である EIF3D を HUVEC で発現抑制する事により、3 次元的な血管新生が著しく阻害される事が分かった (図 1)。この表現型は CUL3 や KCTD10 を発現抑制した時よりも、劇的であった。CUL3/KCTD10 非依存的且つ、EIF3D 依存的な血管新生制御機構の存在が示唆される。また、重要な事に、コラーゲンゲルで挟み込まない通常の培養条件下での HUVEC に対して、EIF3D を発現抑制しても顕著な細胞増殖の阻害は見られなかった。以上の結果から、EIF3D は新規な血管新生制御因子である事が強く示唆された。



【図1】 血管内皮細胞においてCUL3、KCTD10、EIF3Dを発現抑制すると、血管新生が阻害される。

### (3) EIF3D の Ub コードの解明

EIF3D が実際に細胞内で CUL3、KCTD10

依存的に Ub 化を受けているかを調べるために、HUVEC もしくは、HepG2 cells に EIF3D と Ub を過剰発現し、EIF3D で免疫沈降し、Ub 抗体で EIF3D の Ub 化を検証した。その結果、EIF3D はポリ Ub 化を受ける事を見出した。尚、HCT116 cells は遺伝子の導入効率が非常に悪く、Ub assay を実施する事ができなかった。更に、これらの細胞に CUL3 または、KCTD10 を発現抑制すると、このポリ Ub 化は著しく消失した。以上より、EIF3D は細胞レベルでも CUL3、KCTD10 依存的に Ub 化を受けている事が示唆された。次に、EIF3D の Ub 化リジン残基を di-Gly 抗体による免疫沈降と質量分析により、調べたところ、153 番目と 275 番目のリジンが Ub 化を受けている事が分かった。また、EIF3D の Ub 化は K27-ポリ Ub 化である事も明らかにした。興味深い事に、CUL3、KCTD10 を発現抑制しても、EIF3D のタンパク質レベルでの蓄積は認められなかった。即ち、CUL3、KCTD10 により Ub 化を受けた EIF3D は分解を受けることはなく、機能変化を受けている可能性が強く示唆される。Ub 化を受けない EIF3D の KR 体を HUVEC に過剰発現させた結果、顕著な血管新生の阻害活性は見られなかった。これは、内在的に発現している EIF3D が機能しているためであると思われる。今後は、EIF3D の下流で翻訳が制御される血管新生関連遺伝子の探索を進めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 林 則之、平田 慶和、原田 貴仁、河村 逸外、服部 礼佳、山本 友輝、隈井 大介、安達 明央、小島 悠揮、池内 寛和、望月 寿人、高田 博樹、祖父江 聡
2. 発表標題 インフリキシマブ倍量投与後にIgA血管炎を発症したクローン病の2例
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 則之、平田 慶和、祖父江 聡
2. 発表標題 ダビガトラン起因性剥離性食道炎の検討
3. 学会等名 第27回日本消化器関連学会週間
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
研究分担者	前川 大志  (Maekawa Taishi)  (10771917)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・講師   (16301)	
研究分担者	田中 守  (Tanaka Mamoru)  (80617861)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教   (23903)	

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 分 担 者	片岡 洋望  (Kataoka Hiromi)  (40381785)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授     (23903)	

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