

令和 4 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：2017～2021

課題番号：17K09390

研究課題名(和文) CUL3依存的なコレステロール輸送に着目した抗腫瘍血管新生医薬品の開発

研究課題名(英文) Development of novel inhibitor of tumor angiogenesis focusing on CUL3-dependent cholesterol transport

研究代表者

鹿野 美千子 (Shikano, Michiko)

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：70405190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌等の固形癌は、周囲の組織から血管を自身の腫瘍組織に引き込み、血管新生を促す事で増殖と転移を図る。従って、血管新生を抑制する医薬品は極めて効果的な抗癌剤と考えられており、実際に血管新生誘導の主役であるvascular endothelial growth factor (VEGF)とその受容体 (VEGFR)の阻害剤が、抗癌剤として臨床応用されている。一方で、VEGFシグナル以外を作用点とする次世代の新規抗血管新生医薬品は未開発のままである。本研究では、血管新生に必須な血管内皮細胞の細胞内コレステロール制御機構の一端を解明する事に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見出したユビキチンリガーゼ複合体依存的な細胞内コレステロール局在制御は今まで無い新しい血管新生阻害剤のシーズ開発標的として強く期待される。コレステロールの可視化技術の発展と相乗的に研究開発が進んでいくと思われる。

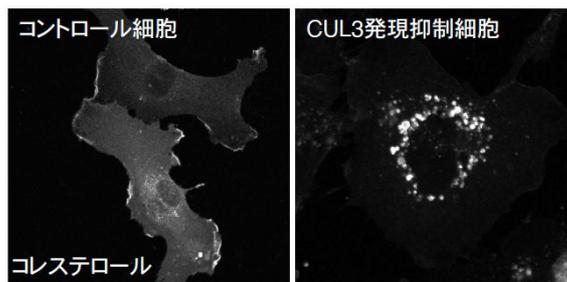
研究成果の概要(英文)：To expand the repertoires of anti-angiogenic inhibitors, we focused on intracellular trafficking of cholesterol in endothelial cells. In this research project, we found that cullin-3 (CUL3)/BTBP/substrates axes were essential for proper distribution of cholesterol in endothelial cells as well as angiogenesis. Our results suggest the possibility of the protein complex as a promising target for the development of new anti-angiogenic inhibitors.

研究分野：消化器内科

キーワード：大腸癌 血管新生 コレステロール

1. 研究開始当初の背景

Cullin-3 (CUL3)型ユビキチンE3リガーゼは、その基質認識受容体であるBTB domain containing protein (BTBP)を介して、基質タンパク質と複合体を形成する事で、基質タンパク質をユビキチン化 (Ub 化)するユニークな分子である。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。現在までに、研究代表者を含めた複数の研究チームが、CUL3の発現抑制によりマウス個体レベル及び、細胞レベルで血管新生が強く阻害される事を見出しているものの、その分子機構の全貌は未解明な点が多く残されている。血管内皮細胞の細胞膜上のコレステロールの正常な局在は、血管新生に必須であることが知られている。研究代表者らは最近、CUL3を発現抑制した血管内皮細胞では、血管新生の重要な制御因子であるコレステロールが、細胞全体の量は変わらないものの、細胞膜における存在量が激減し、細胞内に蓄積してしまう事を見出した (図1)。この結果は、CUL3がコレステロールの細胞内輸送の制御を介して血管新生を制御している事を強く示唆している。



【図1】血管内皮細胞においてCUL3を発現抑制すると、コレステロールが細胞内小胞に蓄積する。

2. 研究の目的

本研究では、コレステロールの細胞内輸送を制御するCUL3/BTBP/基質タンパク質のユビキチンE3リガーゼ複合体を同定し、その分子基盤と血管新生における機能を解明する事を目的とした。また、大腸癌治療のための新しい血管新生阻害剤開発を志向して、CUL3/BTBP/基質タンパク質のタンパク質複合体の形成阻害剤の探索も実施した。

3. 研究の方法

(1) 細胞内コレステロール局在を規定するBTBPの同定

ヒトのBTBP siRNA library (183遺伝子)を構築し、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC)に対して、個別にトランスフェクションし、183遺伝子の発現抑制を行なった。コレステロールの可視化はコレステロールプローブであるmCherry-D4Hをレンチウイルスにより遺伝子導入する事で可視化した。CUL3発現抑制と同様にコレステロールの細胞膜局在が消失する遺伝子をピックアップした。当該遺伝子に関しては、その発現抑制により、細胞内のコレステロール量が変化していないかどうかをAmplex Cholesterol assay kitにより生化学的に定量した。さらに、当該遺伝子をHUVECに対して、発現抑制し、血管新生の阻害活性を検討した。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。

(2) 細胞内コレステロール局在を規定するUb化基質タンパク質の同定

上述の実験で同定したBTBPに関して、当該BTBP依存的にUb化を受け、細胞内コレステロール輸送と血管新生に機能的なUb化基質タンパク質の同定を試みた。具体的には、Halo-BTBPを293T細胞に発現させ、細胞抽出液をHalo-resin beadsと混合し、Halo-BTBP 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-BTBP 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-BTBP 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。同時に、BTBPに直接結合するタンパク質を愛媛大学プロテオサイエンスセンターが保有するヒトプロテインアレイ (約20,000タンパク質)の中から、アルファスクリーンを用いて探索した。候補タンパク質に対しては、細胞に過剰発現させて、Ub化の有無と、そのBTBP依存性を検討した。また、HUVECにおいて、発現抑制または、過剰発現し、血管新生に対する影響をtube formation assayにより検証した。

(3) CUL3/BTBP/基質タンパク質複合体の形成阻害剤の探索

本研究で見出されるBTBPと基質タンパク質は血管新生に機能的である。従って、CUL3/BTBP/基質タンパク質複合体の形成阻害剤は血管新生を抑制する活性を有する事が期待される。そこで、CUL3/BTBP/基質タンパク質をそれぞれ、コムギ無細胞タンパク質合成系で合成し、CUL3/BTBP、BTBP/基質タンパク質の結合をアルファスクリーンにより検出する系を構築した。当該系に対して、共同研究先企業が保有するコア構造化合物ライブラリー (1000化合物)を供してCUL3/BTBP、

BTBP/基質タンパク質の結合を阻害する化合物の探索を行なった。

4. 研究成果

(1) 細胞内コレステロール局在を規定する BTBP の同定

BTBP siRNA library を用いて、HUVEC の細胞内コレステロールの局在を規定する遺伝子の探索を行なった結果、その発現抑制により、D4H の細胞膜局在が消失する複数の BTBP 遺伝子を同定する事に成功した。さらに当該 BTBP の発現抑制によって、血管新生が顕著に阻害される BTBP 遺伝子を 1 つ同定した。本研究は現在、論文作成中であるので、本報告書では当該 BTBP は分子 X と記載し、データに関しても掲載を控えさせて頂く事をご理解願いたい。分子 X の発現抑制によって、細胞内コレステロールの全体量は変わらなかった。以上の結果より、分子 X の発現抑制時の表現型は、CUL3 を発現抑制した時と完全にフェノコピーした。従って、CUL3/分子 X 軸が血管内皮細胞においてコレステロールの細胞膜局在を規定し、血管新生を正に制御している分子実体である事が示唆された。

(2) 細胞内コレステロール局在を規定する Ub 化基質タンパク質の同定

次に、分子 X に結合し、CUL3/分子 X 依存的に Ub 化を受ける基質タンパク質の同定を試みた。質量分析を用いた方法では、HUVEC の細胞抽出液から明らかな分子 X の結合タンパク質を同定する事はできなかった。この結果は、分子 X と基質タンパク質との結合が極めて弱いものである事を示唆している。一方で、ヒトプロテインアレイから分子 X の結合タンパク質を探索した結果、複数の直接的結合タンパク質を同定した。この時、分子 X の基質タンパク質結合ドメインに変異を入れた分子 X 変異体を比較対象として、用意し、分子 X 変異体には結合しないが、野生型分子 X には結合するタンパク質を CUL3/分子 X 依存的に Ub 化を受ける基質タンパク質の候補として選定した。過去の報告などを考慮して、細胞内輸送に関連があると予想される 3 分子に関して、Ub assay を行い、CUL3/分子 X 依存的な Ub 化を検討した。その結果、3 分子とも、CUL3/分子 X 依存的に Ub 化を受ける事と明らかにした。一方で、これらの 3 分子の Ub 化基質タンパク質に関して、HUVEC において発現抑制または、過剰発現をしても、顕著な血管新生の阻害は観察されなかった。3 分子の Ub 化基質タンパク質はお互いに相補的に血管新生を正に制御している可能性が考えられる。

(3) CUL3/BTBP/基質タンパク質複合体の形成阻害剤の探索

基質タンパク質に関しては、3 分子の候補からどのタンパク質を阻害剤探索のプロープとして用いるべきか決定するに至らなかったため、CUL3/BTBP (分子 X) との結合を阻害する化合物の探索を試みた。コムギ無細胞タンパク質合成系でビオチン化 CUL3 と FLAG-分子 X を合成し、アルファスクリーンの系に供したところ、negative control の 10 倍以上の結合陽性シグナルを安定的に発生する事を見出した。当該スクリーニング系は 96 well plate のスケールで構築しており、1000 化合物をこの系に供した結果、CUL3/分子 X の結合を特異的に阻害する化合物として、9 つの化合物を同定した。共同研究先企業との契約上の問題で、スクリーニング結果は非公表とさせて頂く事をご理解願いたい。今後は、当該ヒット化合物の類縁体ライブラリーを更に構築し、化合物の validation を進めていく。また、実際に HUVEC に処理し、血管新生が阻害されるかを検証していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	前川 大志 (Maekawa Masashi) (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	城 卓志 (Joh Takashi) (30231369)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・名誉教授 (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