

令和 3 年 8 月 23 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09137

研究課題名（和文）前立腺癌におけるCUL3型ユビキチンリガーゼによるPSMAの蛋白発現制御機構解析

研究課題名（英文）Analysis of the molecular mechanism of PSMA in prostate cancer cells

研究代表者

三浦 徳宣（Miura, Noriyoshi）

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80554427

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：前立腺癌細胞株由来の培養上清中に存在する、PSMA陽性MicrovesicleがHUVECに取り込まれ、HUVECをPSMA陽性に変換していることを明らかにした。また、PSMA陽性HUVECは血管新生能が亢進していた。前立腺癌がPSMAを介して、周囲の既存血管に作用して、自身の組織へと血管を引き込むことで、癌細胞自身の生存維持のみならず、高い増殖能や転移能を獲得していくメカニズムが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PSMAが前立腺癌の増殖に寄与する機能的分子メカニズム、および癌微小環境形成・腫瘍血管新生におけるその役割は不明な点が多い。今回の研究では、前立腺癌がPSMAを介して、周囲の既存血管に作用して、自身の組織へと血管を引き込むことで、癌細胞自身の生存維持のみならず、高い増殖能や転移能を獲得していく可能性が示唆された。さらに詳細に解析を進めることで、将来前立腺癌腫瘍血管特異的に標的とする血管新生阻害剤の開発に繋がると考えている。

研究成果の概要（英文）：We conclude that PSMA-positive membranes released from PSMA-expressing prostate cancer cells transform PSMA-negative endothelial cells into PSMA-positive endothelial cells. PSMA-endothelial cells acquire high angiogenic activity. PSMA-expressing epithelial prostate cancer cells in human prostate tumors may contribute to tumor angiogenesis through the transformation of PSMA-negative endothelial cells into PSMA-positive tumor endothelial cells in human prostate cancer tissues.

研究分野：Oncology

キーワード：PSMA tumor endothelial cells HUVECs LNCaP tube formation prostate cancer specimen

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は 2015 年以降、日本人男性の罹患率が第 1 位の癌種であり、加齢に伴い死亡率は上昇する。特に去勢抵抗性前立腺癌は、新規薬剤も出てきているが効果は限定的である。即ち、前立腺癌の増殖に特異的な新規分子機構を解明し、当該分子基盤を標的とした前立腺癌の新規抗癌剤の開発が急務である。

前立腺特異的膜抗原(prostate specific membrane antigen; PSMA)は transmembrane peptidase の 1 種であり、前立腺上皮に優位に発現し、前立腺癌の進行や転移に伴い上昇することが分かっている。近年このことを利用し、欧米において 68Ga-labeled PMSA PET が前立腺癌の診断に用いられるようになり、その有用性が相次いで報告されている (Afshar-Oromieh A et al., Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2012)。さらに、診断のみならず 255Ac による PSMA を標的とした α 線治療も臨床応用が期待されており、進行性前立腺癌の新たな治療標的として PSMA はひと際脚光を浴びている。また、PSMA が腫瘍血管新生に重要な働きを担っていることは過去の報告に散見されているが (Grant CL et al., PLoS One 2012)、PSMA が前立腺癌の増殖に寄与する機能的分子メカニズム、および癌微小環境形成・腫瘍血管新生におけるその役割は全く不明であることからその解明は急務であり、また、新たな治療標的分子の創出につながる可能性が大きい。

申請者らはこれまでに、血管内皮細胞の恒常性維持と血管新生に必須な新規制御分子として、ユビキチン E3 リガーゼ複合体足場タンパク質 Cullin-3 (CUL3)を同定し、その分子機構の解明に取り組んでいる。最近、PSMA の発現が CUL3 システムにより制御されている可能性を強く示唆するデータを得ており、血管内皮細胞と前立腺癌細胞株 LNCaP において、CUL3 や CUL3 システムの基質受容体である BTB ドメイン含有タンパク質 (BTBP) がいかに PSMA の発現を制御しているか詳細に解析することは癌関連血管新生特異的な阻害剤の開発研究に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

前立腺癌における CUL3 型ユビキチンリガーゼによる PSMA の蛋白発現制御機構解析

PSMA は transmembrane peptidase であり、腫瘍細胞が浸潤する際、laminin-specific integrin signaling や GTPase 依存性 p21-activated kinase (PAK1)を介し細胞外基質バリアを破壊する役割を持つことが知られている。申請者らは、転移性前立腺癌細胞において腫瘍細胞自身が PSMA を自律性に産生し、腫瘍血管新生や転移能獲得を誘導するメカニズムが存在するのではないかと考えた。より詳細に PSMA/CUL3 システムの機構を解明し、CUL3 システムをターゲットとした抗腫瘍剤開発の可能性を追求することを目的に、本研究を提案した。

3. 研究の方法

(1) 前立腺癌摘出組織を使用した免疫組織染色による前立腺癌腫瘍血管での PSMA 発現解析

HE 染色による癌部の確認

2019 年 1 月～2019 年 12 月までに愛媛大学にて外科切除した 33 例の前立腺癌組織切片を HE 染色し、癌部の確認を行った。

PSMA/CD31 染色 2 重蛍光染色

血管内皮マーカーである CD31 を PSMA と同時に蛍光 2 重染色し、腫瘍周囲の血管内皮に発現する PSMA を検出した。

データ解析

腫瘍血管における PSMA 発現と Clinical background との相関を解析した。

(2)HUVEC(ヒト臍帯静脈内皮細胞)を用いた前立腺癌細胞株由来培養上清による PSMA 発現実験

前立腺癌細胞株由来培養上清の作成

前立腺癌細胞株を様々な条件下で培養し、培養上清を作成し、比較検討した。

HUVEC に培養上清を添加することで、HUVEC に PSMA が発現するかどうか、免疫染色法、ウェスタンブロット法、RT-PCR 法にて解析した。

(3) 前立腺癌細胞株由来培養上清中の成分解析

培養上清の遠心分離

前立腺癌細胞株由来培養上清を遠心分離し、10,000 x g ppt, 100,000 x g ppt, 100,000g sup それぞれの分画を HUVEC に添加し、免疫染色法で PSMA の発現を検出した。

Microvesicle が前立腺癌細胞株由来であることの証明

Membrane dye を使用し、HUVEC 内に取り込まれた PSMA 陽性 vesicle が、培養上清を作成した前立腺癌細胞株由来であることを確認した。

前立腺癌細胞株中の PSMA の役割の解析

PC3 (PSMA 陰性前立腺癌細胞株) に PSMA を過剰発現し、作成した培養上清が HUVEC を PSMA 陽性とする能力があるかを解析する。

質量分析による Microvesicle のプロテオミクス解析

(4) PSMA 陽性 HUVEC の質的变化の確認

HUVEC Tube formation 能の変化

培養上清 10,000 x g ppt 添加した HUVEC の Tube formation 能を調べる。

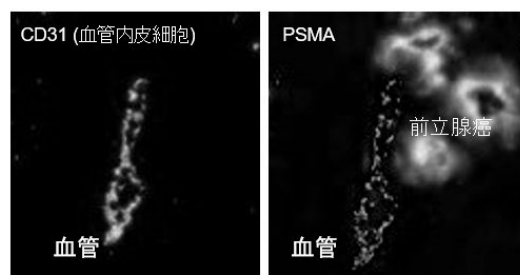
(5) PSMA 発現に関連する BTBP の同定

BTBP siRNA ライブラリーを用いて、LNCaP 細胞での PSMA タンパク質発現増幅を指標に、責任 BTBP をスクリーニングする。

4 . 研究成果

(1) 前立腺癌周囲の腫瘍血管にも PSMA 陽性血管が存在する。

これまで PSMA は正常血管内皮細胞にはほとんど発現しないが、多くのがん組織内血管内皮細胞において高発現することが示されていた。一方で、前立腺癌組織においては PSMA は前立腺癌細胞においてのみ発現し、前立腺癌関連血管内皮細胞には発現しない

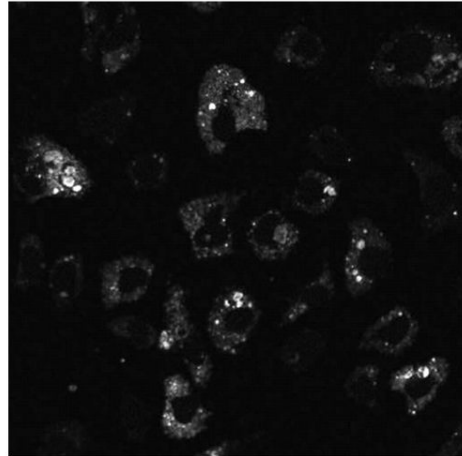


【図1】 前立腺癌腫瘍周囲血管もPSMA陽性となる症例が散見される。

とされてきた。しかし申請者らは、外科的に摘出されたヒト前立腺癌組織の免疫組織染色切片を注意深く観察した結果、前立腺癌関連血管内皮にも PSMA が高発現している症例を複数見出した。Clinical background との相関関係は見いだせなかった。

(2) 前立腺癌細胞株由来の培養上清は、HUVEC を PSMA 陽性に転換させる。

申請者らは前立腺癌細胞の培養条件を調整し、より効率的・安定的に HUVEC を PSMA 陽性に転換させる培養上清を作成することに成功した。HUVEC 内の PSMA 発現を免疫染色法、ウェスタンブロット法、RT-PCR 法にて確認した。



【図2】前立腺癌細胞株由来培養上清を添加すると、HUVECがPSMA陽性に転換する。

(3) 培養上清中の PSMA 陽性 Microvesicle が HUVEC に入り込み、HUVEC を PSMA 陽性に転換している。

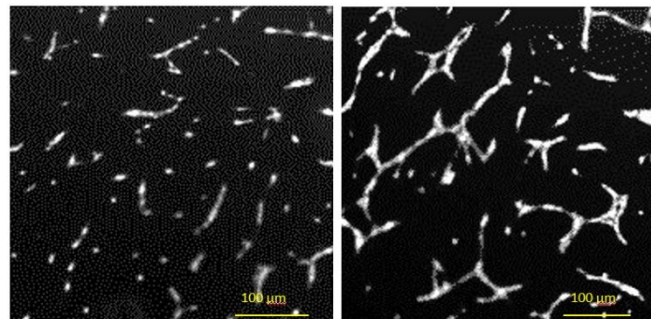
培養上清の 10,000 x g ppt 分画のみ HUVEC を

PSMA に転換する能力があった。また、PSMA 陽性前立腺癌細胞株由来の培養上清のみ HUVEC を PSMA に転換する能力があった。

10,000 x g ppt 成分のプロテオミクス解析から、ある種の液性成長因子タンパク質、膜癒合に必須な膜タンパク質が検出され、その役割を現在解析中である。

(4) PSMA 陽性 HUVEC は血管新生能が亢進する。

培養上清 10,000 x g ppt を添加し PSMA 陽性に転換した HUVEC は、PSMA 陰性 HUVEC と比較して血管新生能が亢進することを明らかにした。



HUVEC (培養上清添加なし)

HUVEC (培養上清添加あり)

(5) PSMA を制御している可能性のある BTBP に注目しており、現在解析を行っている。

【図3】前立腺癌細胞株由来培養上清を添加すると、HUVECのtube formation能が亢進する。

(6) まとめ

前立腺癌細胞株由来の培養上清中に存在する、PSMA 陽性 Microvesicle が HUVEC に取り込まれ、HUVEC を PSMA 陽性に転換していることを明らかにした。また、PSMA 陽性 HUVEC は血管新生能が亢進していた。

前立腺癌が PSMA を介して、周囲の既存血管に作用して、自身の組織へと血管を引き込むことで、癌細胞自身の生存維持のみならず、高い増殖能や転移能を獲得していくメカニズムを解明してきた。さらに詳細に解析を進めることで、将来前立腺癌腫瘍血管特異的に標的とする血管新生阻害剤の開発に繋がる。

これらの成果の一部を、The Prostate に論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺隆太、前川大志、三浦徳宣、菊川忠彦、雑賀隆史、東山繁樹
2. 発表標題 前立腺癌細胞株LNCaP cellsから放出されるPSMA陽性microvesicleが及ぼす血管内皮細胞の質的变化
3. 学会等名 第28回 泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺隆太、前川大志、三浦徳宣、菊川忠彦、雑賀隆史、東山繁樹
2. 発表標題 前立腺癌細胞株LNCaP cellsから放出されるPSMA陽性microvesicleが及ぼす血管内皮細胞の質的变化
3. 学会等名 第60回 日本生化学会 中国四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺隆太 前川大志 三浦徳宣 菊川忠彦 東山繁樹 雑賀隆史
2. 発表標題 LNCaP cellから放出されるPSMA陽性microvesicleが及ぼす血管内皮細胞の質的变化
3. 学会等名 第28回 泌尿器科分子細胞研究会
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
研究分担者	雑賀 隆史 (Saika Takashi) (10314676)	愛媛大学・医学系研究科・教授 (16301)	

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	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)	
研究分担者	菊川 忠彦 (Kikugawa Tadahiko) (70444734)	愛媛大学・医学系研究科・准教授 (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