

令和 6 年 6 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：2021～2023

課題番号：21K09427

研究課題名(和文) 前立腺癌関連血管内皮細胞におけるPSMAの発現制御機構及び、その分子機能の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of PSMA expression and its molecular functions in prostate cancer-associated vascular endothelial 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、前立腺癌細胞株LNCaP cellsの培養上清中の10,000 g pellet画分を、正常血管内皮細胞であるヒト臍帯血静脈血管内皮細胞 HUVECの培地中に添加する事で、PSMAの転写が誘導される事を見出した。さらに、前立腺癌の分泌するmicrovesicleが周囲の血管内皮細胞にPSMAを発現させ、血管新生能を亢進することを明らかにした。腎癌でも検討し、腎癌周囲の腫瘍血管のみPSMA陽性となっていることを確認でき、PSMAは前立腺癌以外の固形腫瘍でも腫瘍血管新生にも重要な働きを担っている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺特異的膜抗原 (prostate specific membrane antigen; PSMA)は前立腺癌マーカーとしては確立されているものの、その分子機能や前立腺癌組織形成における機能は殆ど不明である。本研究では、前立腺癌細胞由来microvesicle(MV)による正常血管内皮細胞でのPSMA発現誘導機構とPSMA陽性血管内皮細胞の質的变化を解明することで前立腺癌増殖の新しい知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：We found that the addition of a 10,000 g pellet fraction of the culture supernatant of a prostate cancer cell line, LNCaP cells, to the medium of normal vascular endothelial cells, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), induces PSMA transcription. Furthermore, we found that microvesicles secreted by prostate cancer cells induce PSMA expression in surrounding vascular endothelial cells and enhance their angiogenic potential. In addition, we found that only tumor vessels around renal carcinoma were positive for PSMA, suggesting that PSMA may also play an important role in tumor angiogenesis in solid tumors other than prostate cancer.

研究分野：泌尿器癌

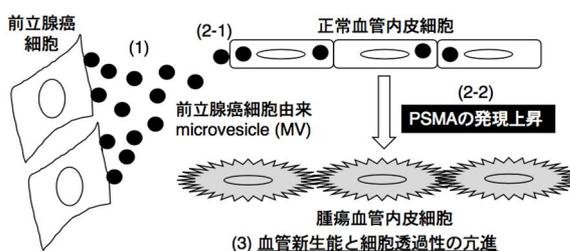
キーワード：前立腺癌 PSMA 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

本邦においても罹患数の増加が続いている進行前立腺癌治療において、アンドロゲン受容体の機能を阻害する内分泌療法に耐性化した去勢抵抗性前立腺癌には有効な治療法はほとんどない。従って、前立腺腫瘍形成の新規分子基盤を解明に基づいた効果的な前立腺癌治療の開発は喫緊の課題である。我々は今までに、1) 前立腺特異的膜抗原 (prostate specific membrane antigen; PSMA)が前立腺癌組織内の血管内皮細胞に発現する事、2) 前立腺癌細胞が細胞外に放出する microvesicle (MV)に正常血管内皮細胞で PSMA を発現させる活性がある事、を独自に見出している。この結果は、前立腺癌細胞が細胞外に分泌する自身の細胞膜由来の microvesicle (MV)に PSMA 発現誘導活性がある事を強く示す。しかしながら、前立腺癌関連血管内皮細胞での PSMA の発現がどのように誘されるのか、また PSMA 陽性血管内皮細胞が正常血管内皮細胞とどのような機能的差異を示すのかは殆ど不明である。

2. 研究の目的

本研究は、前立腺癌細胞 LNCaP cells 由来の MV 中の PSMA 発現誘導因子の分子実体を同定し、正常血管内皮細胞が前立腺癌関連血管内皮細胞へと質的に変化する分子機構の解明を目的としている。



【図3】本研究の構想と明らかにする事
(1) LNCaP細胞由来MV中の血管内皮細胞のPSMAを発現誘導する分子実体の同定
(2-1) LNCaP細胞由来MVの血管内皮細胞における取り込み機構の解明
(2-2) LNCaP細胞由来MVによる血管内皮細胞におけるPSMAの転写制御機構の解明
(3) LNCaP細胞由来MVにより質的に変化した血管内皮細胞の性状解析

3. 研究の方法

(1) LNCaP cells 由来 MV の性状解析

コラーゲンゲル上に LNCaP cells を播種し、成長培地で1週間培養した LNCaP cells の培養上清を回収後、1,000 g で遠心し、さらにその上清を 10,000 g で遠心して、pellet 画分を無血清培地で懸濁し、MV を回収する。この MV をタンパク質抽出液で lysis して、質量分析のショットガン法による成分解析を行う

(2) LNCaP cells 由来 MV による PSMA の発現制御機構の解析

MV の血管内皮細胞におけるエンドサイトーシス機構の解析においては、各種エンドサイトーシス阻害剤 (Dyno4a, Pitstop, EIPA 等) を HUVEC に処理し、LNCaP cells 由来 MV を添加して、PSMA の発現誘導が阻害されるかを検証する

(3) LNCaP cells 由来 MV が及ぼす血管内皮細胞の質的変化解析

MV を添加した HUVEC の血管新生能をコラーゲンゲルに包埋し VEGF 刺激をかける tube formation assay で評価する

4. 研究成果

(1) 質量分析により、培養上清 (CM) 1 万 g pellet 成分には 3 種類の Growth Factor (GDF15, HDF, MYDGF) が含まれることが分かった。1 万 g pellet には通常 Growth factor は含まれないことから、MV に内包されていると考えられる。前にも質量分析を行っていたが、前回より多くの CM 1 万 g pellet を解析することで、再現性が得られた。ウェスタンブロット法で 1 万 g pellet 中に上記 GF が発現していることを確認した。さらに、LNCaP 1 万 g pellet 成分をかけた HUVEC では、血管新生亢進にかかわるシグナルパスウェイが亢進していることを RNA-seq で確認した。これらのことから、前立腺癌の分泌する microvesicle が周囲の血管内皮細胞に PSMA を発現させ、血管新生能を亢進することを明らかにした。

(2) さらに、腎癌での検討も進めた。愛媛大学泌尿器科で腎癌に対して腎摘除術を施行された症例に対し、PSMA と血管マーカー CD31 を染色したところ、腎癌周囲の腫瘍血管のみ PSMA 陽性と

っていることを確認できた。このことから PSMA は前立腺癌以外の固形腫瘍でも腫瘍血管新生にも重要な働きを担っている可能性が示唆された。過去 5 年間に腎癌に対して腎摘除術を施行された 30 症例に対し、PSMA の免疫組織化学染色を施行したところ、その染色強度に相関して、再発率が高いことを見出した。

(3) 今後の研究の推進方策として、正常血管内皮細胞が前立腺癌関連血管内皮細胞へと質的に変化する分子機構の解明にむけて、さらに研究を進めていく。また、前立腺癌、腎癌以外の泌尿器癌での検証も行っていく。得られた知見から、実臨床での前立腺癌腫瘍細胞、腎癌腫瘍細胞、尿路上皮癌腫瘍細胞での確認を行っていく。各泌尿器癌における PSMA の発現制御機構及び、その分子機能の解明をおこなっていく。

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 0件）

1. 著者名 Watanabe Ryuta, Maekawa Masashi, Kiyoi Takeshi, Kurata Mie, Miura Noriyoshi, Kikugawa Tadahiko, Higashiyama Shigeki, Saika Takashi	4. 巻 81
2. 論文標題 PSMA positive membranes secreted from prostate cancer cells have potency to transform vascular endothelial cells into an angiogenic state	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Prostate	6. 最初と最後の頁 1390 ~ 1401
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pros.24237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tadahiko Kikugawa
2. 発表標題 Prostate-specific membrane antigen expression in endothelial cells of renal tumor-associated neovasculature and risk of recurrence for renal cell carcinoma
3. 学会等名 JUA
4. 発表年 2024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)	
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・医学部附属病院・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
---------	---------