

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11143

研究課題名(和文) 前立腺癌における新規病原体(pathogen)の探索

研究課題名(英文) Exploration of novel pathogens for prostate cancer

研究代表者

蘆田 真吾 (ASHIDA, Shingo)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師

研究者番号：80380327

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)：前立腺癌のpathogenを同定するために、次世代シーケンズを用いて前立腺癌サンプルのトランスクリプトームを網羅的に調べた。RNA-seq解析によりpathogen候補として4つの細菌、すなわち *Moraxella osloensis*、Uncultured chroococciopsis、*Cutibacterium acnes*、*Micrococcus luteus*を同定した。そして、PCR、ダイレクトシーケンズ、免疫組織染色にて検証した。興味深いことに、*C. acnes*は免疫組織染色において、より高頻度にprostatic intraepithelial neoplasiaで見つかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌は、以前より感染症との関連が示唆されているが、実際には原因となるpathogenは見つかっていない。子宮頸癌においては、pathogenであるヒトパピローマウイルスに対するワクチンがすでに開発されており、本邦以外では、子宮頸癌罹患数は劇的に減少している。本研究成果を基に研究を発展させることにより、前立腺癌の発生メカニズムから予防まで幅広く社会に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：To identify pathogen for prostate cancer, we investigated the transcriptomes of human prostate samples using whole-genome next generation sequencing. RNA-seq analysis identified four bacteria as candidate pathogens, which included *Moraxella osloensis*, Uncultured chroococciopsis, *Cutibacterium acnes*, and *Micrococcus luteus*. We performed PCR, direct sequencing, or immunohistochemistry to validate these candidate pathogens. Interestingly, *C. acnes* were more frequently found in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN), which prompted us to hypothesize that *C. acnes* might play a critical role in the transition from normal epithelium to PIN.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 病原体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の原因は未だ不明であるが、慢性炎症が前立腺癌の発生と関連することを示す多くのエビデンスが存在する。実際に慢性炎症性浸潤は、前立腺組織検体によく見られる所見であり、病原体 (pathogen) 感染が前立腺癌発生の原因の一つであると考えられている。前立腺への細菌やウイルス感染に関しては、これまで広く研究されているが、その多くは論議を呼ぶ結果であり、現在のところ明らかな pathogen は同定されていない。これまでのほとんどの研究は、PCR を基盤としたアプローチにより pathogen を検出しようとしているが、次世代シーケンスは、全ゲノムを網羅的に調べることができる。

### 2. 研究の目的

本研究は、次世代シーケンスを用いてヒト前立腺癌サンプルのトランスクリプトーム (細胞中に存在する全ての mRNA の総体) を網羅的に解析することによって前立腺癌の pathogen を検出し、さらには前立腺癌発生の病態を解明することを目的とする。前立腺癌の pathogen が同定されれば、ワクチンの開発等に発展し、前立腺癌の予防に貢献できる可能性がある。

### 3. 研究の方法

#### (1) RNA-seq 解析および pathogen 検出

20 例の前立腺癌患者からロボット支援腹腔鏡下前立腺全摘除術によって得られた前立腺摘出標本をスライスした後、4 分割した (図 1)。そして、前立腺癌を含むセクションから高品質の RNA を抽出した。RNA-seq ライブラリーは、Illumina 社のプロトコルに従って作成し、HiSeq2000 (Illumina 社製シーケンサー) によってシーケンスを行

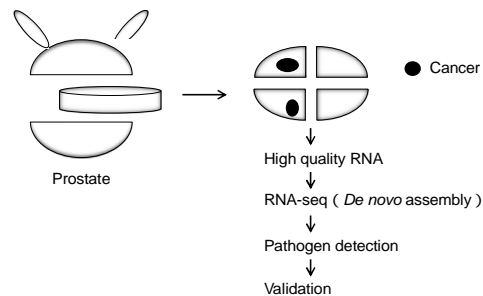


図1 研究デザイン

った。前立腺癌と関連のある pathogen 候補を探索するために、20 例の前立腺癌サンプルからの RNA-seq データからリファレンス配列にマップされないリード (unmapped read) について新たにアセンブルを行い配列決定する de novo アセンブリー解析を行った。以前の報告 (Fujimoto A, Nakagawa H et al., Nat Genet., 2016) と同様に、(i) クオリティ値が Q30 以上 (ii) マップされない、またはマッチした配列が 30 塩基以下、の条件を満たすショートリードを集めた (リード: 各断片の塩基配列の単位)。ショートリードを場所が特定されないゲノム配列をもった hg19 リファレンスゲノムに対して BLAT によって配列した。そして、50 塩基以上のマッチした塩基を持つものを除いた。残りのショートリードを ABySS (ショートリードシーケンスデータのための並行アセンブラー) によってアセンブルした。アセンブルされたコンティグ (DNA 配列断片群を重ね合わせてできるコンセンサス配列) とそれぞれのサンプルのシングルトン (アセンブルに参加しなかった配列) を混合し、スーパーコンティグを作るために、CAP3 (アセンブラー) を使ってさらにアセンブルした。作られたスーパーコンティグを BLAST を用いて NCBI ftp サイト上の微生物ゲノムに配列し、PINDENT スコアが 95 以上のものを抽出した。そして、スーパーコンティグを構成しているサンプルを調べ、抽出された微生物のシーケンス配列をもつ候補サンプルを導き出した。

#### (2) DNA 抽出、PCR、ダイレクトシーケンス

DNA は、前立腺癌サンプルからプロトコルに従って QIAamp DNA Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) を用いて抽出された。AmpliAmp Gold DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific,

Inc., Waltham, MA, USA) が PCR 反応に用いられた。PCR は、C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) で行い、条件は以下の通りとした：初期熱変性 94℃、9 分、その後、熱変性 94℃、30 秒、アニーリング 58℃、30 秒、伸長反応 72℃、60 秒を 38-45 サイクル。PCR 産物は、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzers を用いてシーケンスされた。PCR およびシーケンスに用いられたプライマーは以下の通りである：Moraxella osloensis ( forward, 5'-ccattagcctctcctccctg-3' ; reverse, 5'-accaaggcgcagatctgtaa-3' )、Uncultured chroococcidiopsis ( forward, 5'-atgaggtgtggttaggggtg-3' ; reverse, 5'-ggctctgggctgtttctctct-3' )、Micrococcus luteus ( forward, 5'-tctgcaggtaccgtcacttt-3' ; reverse, 5'-gatacggcccagactcctac-3' )。

### (3) 免疫組織染色

ホルマリン固定、パラフィン包埋された前立腺癌サンプルから組織切片が作成された。抗原賦活化のため、脱パラフィン化された組織切片は、マイクロウェーブで 5 分、熱処理され、トリプシン溶液で 37℃、10 秒、処理された。これらの切片は、15000 倍希釈されたマウス抗 C. acnes モノクローナル抗体 (D371-3; MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES, Nagoya, Japan) と一晩、4℃ でインキュベーションされ、ポリマー法で抗原抗体反応が検出された (Dako EnVision+ System; Dako, Carpinteria, CA, USA)。

## 4. 研究成果

(1) RNA-seq 解析により 4 つの細菌を pathogen 候補として同定した。これらは、Moraxella osloensis、Uncultured chroococcidiopsis、Cutibacterium acnes、および Micrococcus luteus である (表 1)。

表1 RNA-seq解析によって同定されたpathogen候補

| Candidate pathogen                  | No of contig | PC sample   | No of sample | Report on PC |
|-------------------------------------|--------------|---|--------------|--------------|
| <i>Moraxella osloensis</i>          | 5            | KP1,KP2,KP16  | 3/20         | No           |
| <i>Uncultured chroococcidiopsis</i> | 3            | KP1,KP2,KP3,KP6,KP7,KP8,KP9,KP10,KP11,KP12,KP13                   | 11/20        | No           |
| <i>Cutibacterium acnes</i>          | 3            | KP1,KP2,KP3,KP4,KP5,KP6,KP7,KP8,KP9,KP11,KP13,KP14,KP15,KP17,KP19 | 15/20        | Yes          |
| <i>Micrococcus luteus</i>           | 2            | KP1,KP5,KP7,KP19,KP20   | 5/20         | No           |

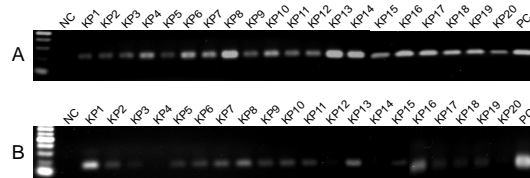


図2 Pathogen候補の検証PCR

A, M. osloensis; B, M. luteus; NC, negative control; PC, positive control.

(2) これら pathogen 候補を検証するために PCR、またはダイレクトシーケンスを行ったところ、前立腺癌サンプル 20 例中、M. osloensis は全ての症例で、Uncultured chroococcidiopsis は 14 例で、M. luteus は 13 例で検出された (図 2、表 2)。

表2 Pathogen候補感染の検証結果

| Candidate pathogen                  | KP1 | KP2 | KP3 | KP4 | KP5 | KP6 | KP7 | KP8 | KP9 | KP10 | KP11 | KP12 | KP13 | KP14 | KP15 | KP16 | KP17 | KP18 | KP19 | KP20 | No of positive |       |       |
|-------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----------------|-------|-------|
| <i>Moraxella osloensis</i>          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |                | 20/20 |       |
| <i>Uncultured chroococcidiopsis</i> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |                |       | 14/20 |
| <i>Cutibacterium acnes</i>          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |                |       | 19/20 |
| <i>Micrococcus luteus</i>           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |                |       | 13/20 |

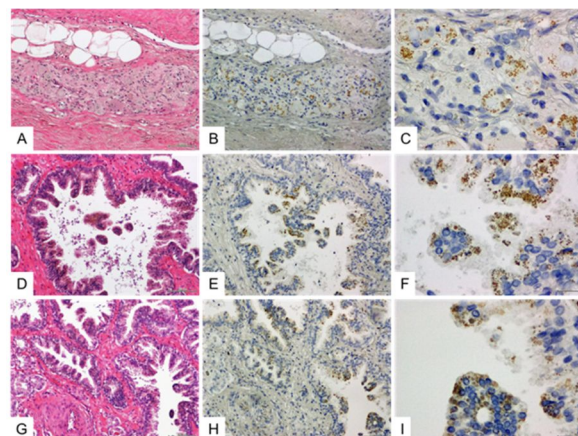


図3 免疫組織染色

C. acnesは20サンプル中19サンプルで頻度は低い前立腺癌細胞に検出された (A-C)。C. acnesはより高頻度にprostatic intraepithelial neoplasiaで検出された (D-I)。Magnification; x100 (A,B,D,E,G,H), x400 (C,F,I)。

(3) C. acnes は、免疫組織染色を行ったところ、前立腺癌組織サンプル 20 例中 19 例において癌細胞で検出された (表 2、図 3)。興味深いことに、C. acnes は、より高頻度に prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) で見つかった。これは、C. acnes が正常前立腺上皮から PIN への移行において重

要な役割を果たしているということを示唆しているかもしれない。

(4) 我々の成果は、前立腺癌における *C. acnes* 感染のさらなる証拠を提供し、*C. acnes* が前立腺癌の有望な pathogen 候補であることを示した。そして、*M. osloensis*、Uncultured chroococciopsis、および *M. luteus* が新たな前立腺癌の pathogen 候補である可能性を示唆した。前立腺癌の細菌による発癌メカニズムを解明するために、さらなる研究が必要であり、現在進行中である。

<引用文献>

Fujimoto A, Furuta M, Totoki Y, et al., Nakagawa H. Whole-genome mutational landscape and characterization of noncoding and structural mutations in liver cancer. *Nat Genet.* 2016 May;48(5):500-9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Shingo Ashida, Chiaki Kawada, Keiji Inoue, Masanori Daibata, and Hidewaki Nakagawa |
| 2. 発表標題<br>RNA-seq analysis identified candidate pathogens for prostate cancer                |
| 3. 学会等名<br>AACR Special Conference on The Microbiome, Viruses, and Cancer (国際学会)              |
| 4. 発表年<br>2020年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                                     | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 中川 英刀<br><br>(NAKAGAWA Hidewaki)<br><br>(50361621) | 国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー<br><br><br><br>(82401) |    |

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 |
|---------|---------|