

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16802

研究課題名(和文) 前立腺肥大症における自己抗原認識による補体活性化機構の解明

研究課題名(英文) Complement activation mechanism by autoantigen recognition in benign prostatic hyperplasia

研究代表者

秦 淳也 (Hata, Junya)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00769606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺肥大症(BPH)は高齢男性に多い疾患で、排尿困難、頻尿など、様々な排尿に関係する症状を呈する。しかしながらその発症機序は明らかとなっていない。本研究では、BPHの増殖過程において、自然免疫系の一つである「補体」の活性化が関係していることを新たに証明した。さらに、補体の活性化には自身の前立腺組織内の4分子の存在が関与していることも分かった。この分子を標的とした新規治療薬の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺肥大症(BPH)の発症機序については、今まで男性ホルモンであるアンドロゲン、炎症、虚血などの関与が報告されてきたが、本研究は免疫系の一つである補体の関与を示した点で、独創性に満ちた研究と考えられる。現在、臨床の場では、既存の内服薬に抵抗性を示すBPH患者も多く存在する。そのような患者にとって、本研究の結果は、新たな治療標的の発見及び治療薬の開発に寄与するものであり、一つの光明を呈する成果と言える。

研究成果の概要(英文)：Benign prostatic hyperplasia (BPH) is a common disease for elderly men and have various lower urinary tract symptoms such as dysuria and frequent urination. However, the mechanism of BPH remained unclear. In this study, we demonstrated that the activation of "complement component" which is one of the innate immune systems, is involved in the growth process of BPH. We also found that complement activation was associated with the presence of four molecules in the BPH tissues. Development of new therapeutic agents targeting this molecule is expected.

研究分野：前立腺肥大症

キーワード：前立腺肥大症 補体 自己抗原

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

前立腺肥大症(BPH)の発症・増殖過程において、炎症との関連が最近報告されている。しかしながら、サイトカイン、増殖因子等の分子が相互に作用し合うことでネットワークを形成しており、病態として複雑化している。一方、炎症は感染、自己免疫等様々な原因で起こる二次的な現象と言える。つまり、詳細な BPH 発症のメカニズムの解明には、炎症の原因も含めた、より根源に迫った病態の解明が重要になる。Kramer らは、前立腺の炎症の原因として、感染、自己免疫、機械的刺激の可能性について論じている。これらの原因の探索は、BPH 発症機序を考慮する上で重要な視点を与えてくれるものと思われる。

本研究に先立ち、私達は新規間質優位 BPH モデルラットの作成し、その BPH 組織、正常前立腺組織を用いて網羅的遺伝子発現解析を行なった。その結果、BPH 組織では、アンドロゲン受容体経路、アポトーシス経路、TGF- $\beta$  シグナル経路、アポトーシス経路、細胞接着因子経路、炎症性経路等が活性化していたが、その中で私達は、補体経路(特に古典的経路)が活性化していることを新たに見出した(Hata J et al, Int J Urol 2016)。

補体とは、生体に侵入した微生物を排除するために働く蛋白群の総称である。一般的に補体は外来病原体の排除に働く免疫機構であるが、最近では、補体は炎症の活性化・増幅機構としての働きがあることが、多くの疾患について報告されている。例えば、特発性肺線維症、肝硬変、網膜色素変性症、虚血性心疾患(虚血再灌流障害)などの疾患が、補体による炎症の活性化が病態の根幹を担っていることが明らかにされつつある。

以上より、何らかの抗原を標的とした免疫複合体が補体の古典的経路を活性化し、二次的に炎症を活性化・増幅することが、BPH 発症を引き起こすと仮説を立て、本実験にてその検証を行うこととした。

### 2. 研究の目的

前立腺の炎症が、BPH の発症・増殖に関与する一つの原因として最近注目されている。私達は、新規間質優位 BPH モデルラットを用いた網羅的遺伝子発現解析を行ない、炎症系経路と同時に、補体古典的経路が活性化していることを新たに発見した。補体古典的経路は、自己抗原を標的とする免疫複合体により活性化され、炎症の活性化・増幅機構として、あらゆる疾患の根幹を担っていることが、明らかにされつつある。そこで今回、免疫複合体による補体の活性化が前立腺肥大症の発症・増殖に関与すると仮説を立て、BPH における補体分子の発現機能解析と免疫複合体の原因抗原同定を行い、BPH 発症メカニズムの解明及び治療法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

#### 研究 1. BPH モデルラットを用いた補体分子の発現機能解析

##### BPH モデルラットの作成

妊娠 20 日の雌性ラットから胎子を摘出し、その尿生殖洞(UGS)組織のみを単離する。UGS を 7 週齢雄性 SD ラットの右側腹側前立腺被膜下に移植する。移植 3 週間後に、UGS から出来た BPH 組織と、対照として左側腹側前立腺を摘出する。

##### BPH モデルラットを用いた補体分子の発現機能解析

BPH 組織の凍結標本を用いて、RT-PCR、Western blot を行なう。凍結標本より mRNA、蛋白をそれぞれ抽出し、補体分子の(C1q、C3、C5b-9、MBL、B 因子)mRNA、蛋白レベルでの発現定量を行なう。発現量については、対照の正常前立腺組織と比較を行なう。凍結切片を用いて、FITC 標識抗 C1q、C3、MBL、factorB、MASP、C5b-9 抗体で染色し、補体沈着レベルのスコア化を行う。

##### 補体分子発現の経時的変化

UGS 移植後、2 週、3 週、8 週経過させた BPH モデルラットを 6 匹ずつ作成する。それらの BPH 組織、正常前立腺組織をそれぞれ採取し、前述までの補体分子の発現解析を同様に行う。

#### 研究 2. BPH モデルラットにおける補体活性化原因抗原の同定

##### BPH モデルラットにおける免疫複合体の発現解析

古典的経路活性化の原因として、BPH 特異的な免疫複合体の存在が考えられる。モデルラットより、BPH 組織、正常前立腺組織を採取し、補体の活性化分子としての IgG の western blot、免疫組織化学染色により発現解析を行う。また、BPH モデルとともに、対照として sham (偽手術)ラットを作成し、それぞれの血清の IgG 濃度を ELISA で測定する。

##### 免疫沈降による原因抗原の同定

前述の免疫複合体の解析について、発現が亢進していた時のみ行う。BPH 組織のホモジネートを作成し、抗 IgG 抗体により免疫沈降を行う。これにより、BPH 特異的な抗体に結合している抗原を分離する。免疫沈降により得られた蛋白抽出液を使用して、SDS-PAGE を行う。それにより得られたバンドを切り出して、質量分析を行い、原因抗原のアミノ酸配列の同定を行う。

#### 研究 3. ヒト BPH における補体分子の発現機能解析

##### ヒト BPH 組織における補体分子の発現機能解析

BPH の診断で、手術加療(経尿道的前立腺切除術、被膜下前立腺摘除術等)を受けた症例の切除組織をヒト BPH 組織として採取する。また、膀胱全摘除術を受けた男性症例のうち、組織学的に正常前立腺として証明できる症例の組織を対照として採取する。これらを用いて、BPH 組織中の補体分子の発現を、RT-PCR、Western blot、免疫組織化学染色で評価する。

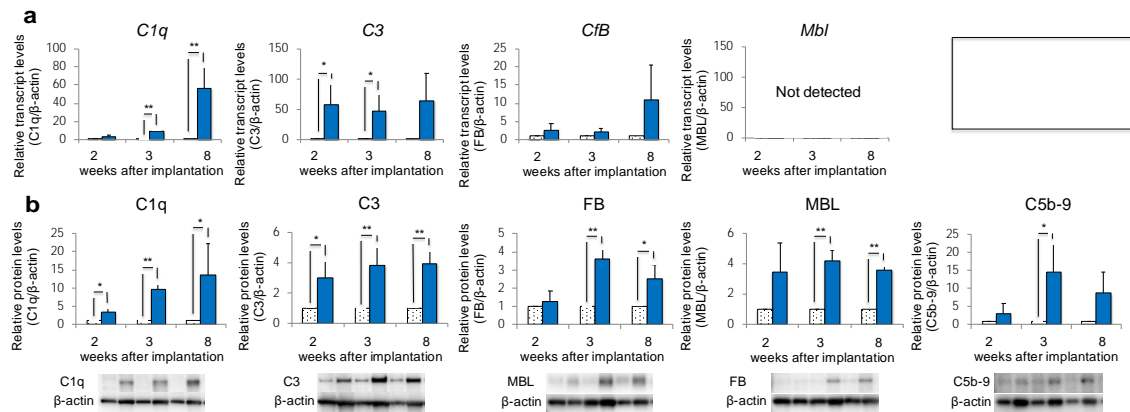
#### 4. 研究成果

##### 研究 1. BPH モデルラットを用いた補体分子の発現機能解析

BPH 組織を用いて、RT-PCR を行ったところ、経時的に各補体成分の発現が亢進していた。また、Western blotting の結果、蛋白レベルでも経時的な発現の増加が認められた。特に、B 因子以外の成分は、UGS 移植後 2 週から増加を示していたが、B 因子は移植 3 週後より増加を示した(図 1)。この結果は、補体経路を構成する、古典的経路、レクチン経路、第二経路の 3 経路のうち、古典的経路、レクチン経路の活性化が先行し、続発的に第二経路が活性化していることを示唆している。

免疫組織化学染色で、BPH 組織の各補体成分の局在を評価したところ、C1q、C3、MBL、C5b-9 の発現は BPH 組織の間質有意に沈着していた。一方、B 因子は BPH 組織の上皮成分有意に沈着が認められた。それらの発現は経時的な発現の増加を認める一方、UGS 移 8 週後の組織は、線維化が著明に進行している影響で、相対的に補体成分の発現が低下していた。

図 1. BPH 組織における補体成分の発現(a. RT-PCR, b. Western blotting)



##### 研究 2. BPH モデルラットにおける補体活性化原因抗原の同定

BPH 組織中の免疫複合体の存在を確認するため、IgG の免疫染色を行った。その結果、BPH 組織の間質領域有意に IgG の沈着が認められた。さらに、確認された免疫複合体が、BPH 組織中の分子を自己抗原とした自己抗体である可能性を考慮し、BPH 組織に BPH モデルラットから採取した血清を反応させたところ、抗原-抗体反応が確認された。この結果により、BPH の増殖過程において、BPH 組織中の分子を自己抗原とした自己抗体の存在が予想された。

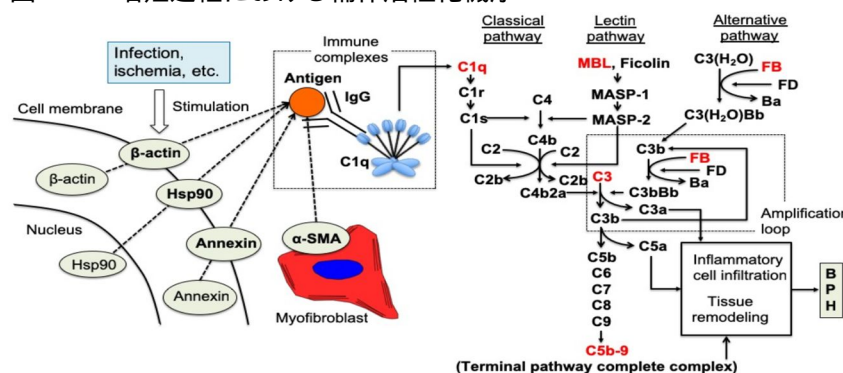
続いて、BPH 組織のホモジネートを作成し、免疫沈降、質量分析を行ったところ、 $\alpha$ -SMA, Hsp90, Annexin,  $\beta$ -actin の 4 分子が同定された。つまり、これらの 4 分子が自己抗原として抗原-抗体反応を起こし、補体活性化を促進していることが示唆された。

##### 研究 3. ヒト BPH における補体分子の発現機能解析

ヒト BPH 組織、正常前立腺組織を採取し、各補体成分の発現を免疫組織化学染色で評価した。BPH 組織において、C3、C5b-9、B 因子の発現増加が確認された。一方、C1q、MBL の発現は両組織においてほとんど確認されなかった。ヒト BPH 組織は、手術にまで至った症例の組織を採取しており、ほとんどが高度に線維化を有していたため、補体の初期活性化物質である、C1q、MBL の発現が認められなかったと考えられた。

以上の研究結果より、BPH の増殖過程において、 $\alpha$ -SMA, Hsp90, Annexin,  $\beta$ -actin の 4 分子が、虚血や機械的刺激などにより自己抗原として露出し、抗原抗体反応、補体活性化による炎症を惹起している可能性が考えられた(図 2)。

図 2 BPH 増殖過程における補体活性化機序



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 1件）

1. 発表者名 Junya Hata
2. 発表標題 Classical complement pathway activation mechanism in growth process of benign prostatic hyperplasia
3. 学会等名 International Continence Society 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秦 淳也
2. 発表標題 Classical complement pathway activation mechanism in growth process of benign prostatic hyperplasia
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秦 淳也
2. 発表標題 Classical complement pathway activation mechanism in growth process of benign prostatic hyperplasia
3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018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
研究協力者	小島 祥敬  (Kojima Yoshiyuki)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	関根 英治  (Sekine Hideharu)		
研究協力者	星 誠二  (Hoshi Seiji)		
研究協力者	平木 宏幸  (Hiraki Hiroyuki)		