

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16699

研究課題名(和文) 前立腺オルガノイドを用いた慢性前立腺炎/慢性骨盤痛症候群の病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of chronic prostatitis and chronic pelvic syndrome using prostate organoid

研究代表者

北野 弘之 (Kitano, Hiroyuki)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：60721933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性前立腺炎/慢性骨盤痛症候群の患者14例の前立腺組織を採取し、軽症4例、中等症7例、重症3例に分類した。それぞれの症例をコントロール群、エビプロスタット投与群、タダラフィル投与群に分けて薬剤添加した後にRNAを抽出し、パラフィンブロックを作成した。継代したオルガノイドは5例にコンタミを認めため、RNAシーケンスは11例で施行した。その結果、軽症、中等症、重症のそれぞれ3群で、IL-6とMAOAとSTAG2とCalbindin28Kが有意な変動を認めた。そのため、慢性前立腺炎/慢性骨盤痛症候群の患者100例の免疫染色を行い、それぞれが有意に重症患者での発現に変動を認めることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性前立腺炎/慢性骨盤痛症候群は男性の約半数が生涯に一度は経験する症状のひとつと言われている。ただし標準的治療は確立されておらず、その痛みや排尿障害に対して対処療法が一般的である。今回の研究にて、症状が顕在化しやすい慢性前立腺炎/骨盤痛症候群の中等症や重症例で有意に発現の変動を認める遺伝子が明らかになった。これらは治療標的として活用できる可能性があり、創薬に向けた展望が明らかになったと思われる。

研究成果の概要(英文)：Prostate tissues of 14 patients with chronic prostatitis / chronic pelvic pain syndrome were collected and classified into 4 mild cases, 7 moderate cases and 3 severe cases. Each case was divided into a control group, a eviprostat-administered group, and a tadalafil-administered group, and RNA was extracted after adding a drug to prepare a paraffin block. Congenital organoids were found in 5 cases, so RNA sequencing was performed in 11 cases. As a result, IL-6, MAOA, STAG2, and Calbindin 28K showed significant changes in 3 groups of mild, moderate and severe. Therefore, immunostaining of 100 patients with chronic prostatitis / chronic pelvic syndrome was performed, and it was clarified that the expression was significantly changed in severely ill patients.

研究分野：感染症

キーワード：慢性前立腺炎 慢性骨盤痛症候群 前立腺オルガノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、慢性前立腺炎/慢性骨盤痛症候群(Chronic abacterial prostatitis: CP/Chronic pelvic pain syndrome: CPPS)において、細菌感染による前立腺間質の活性化が報告されている。しかし、ヒト前立腺細胞と間質の相互作用を適切に評価できるモデルが無いため、病態は明らかでなく、標準治療法はない。

慢性前立腺炎は、細菌性と非細菌性に分類されるが、CP/CPPS は非細菌性慢性前立腺炎に分類されている疾患である。両者を鑑別するためには、前立腺マッサージ後の尿や前立腺液に細菌検出の有無が必要となるが、非細菌性である CP/CPPS に対しても抗菌薬投与が著効する症例が少なからず存在する。近年になり、非細菌性と分類される CP/CPPS に対して、抗炎症作用をもつ PDE5 阻害剤の有効性が報告されているが、その病態は明らかではない。

近年、幹細胞からオルガノイドと呼ばれる細胞培養の技術が報告されており、私たちはヒト前立腺細胞から前立腺オルガノイドの樹立に成功した。オルガノイドは、幹細胞の維持に必要な微小環境を細胞培養で再現することにより、幹細胞または前駆細胞から、生体内の組織を正確に反映した組織を構築し、長期培養できる革新的な手法である。利点として、細胞培養と同等の手技で、前立腺細胞が腺管構造を構築した組織を培養でき、細菌による外部ストレスが及ぼす影響が即座に観察できる事である。さらに、オルガノイドをセルブロックにして組織切片を作成する事で免疫染色も可能である。また、CRISPR/Cas9 等による遺伝子編集も容易であり、動物モデルの作製と比べ簡便に扱え、ヒトの生理的反応が観察できる、有用な実験手法である。

これらの理由から、CP/CPPS の解明の目的に前立腺オルガノイドを使用した計画を立案した。

2. 研究の目的

私たちは、生体の組織像を反映する培養法、オルガノイドに着目し、ヒト前立腺細胞から前立腺オルガノイドを作成した。それらに、各種薬剤を添加して、コントロール群と比較して発現が変動する遺伝子を同定し、それらの役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

まずは CP/CPPS オルガノイドを作成する。

尿道炎、尿道癌、尿道狭窄を除外し、NIH-CPSI の「痛みあるいは不快感について」の項目で、(1)排尿中の痛み、または灼熱感、(2)射精している時、射精後の痛みまたは不快感という質問項目をひとつ、もしくは両者を「ある」と答えた患者を慢性前立腺炎患者とする。さらに、前立腺マッサージ後の、前立腺圧出液もしくはマッサージ後尿に白血球がある場合は A(炎症性)、

B(非炎症性)と定義する。慢性前立腺患者から経直腸的前立腺生検により採取した前立腺組織から、PCR により CNS やコリネバクテリウムの有無を確認し、細菌を認めた組織を用いて、前立腺オルガノイド作製プロトコール (Nature Prot 2016) に準じて、CP/CPPS オルガノイドを作成する。

軽症・中等症・重症患者から採取した前立腺検体を用いて、軽症群と中等症群と重症群の各群においてそれぞれ3例以上は作成する。

慢性前立腺炎においては標準的な治療法が確立されていないが、現在市販されている治療薬のうち、エビプロスタットとタダラフィルを作成したオルガノイドに添加して治療反応性を確認する。さらに対象とエビプロスタット投与グループとタダラフィル投与グループを作成して、薬剤を2週間添加した後に、それぞれのオルガノイドから RNA を抽出し、セルブロックを作成する。

各オルガノイドの RNA 検体を用いて網羅的遺伝子解析を行い、軽症群と中等症群と重症群の3群間で発現に有意差を認める遺伝子を特定する。解析法は ANOVA 解析などを用いる。さらに3群間

において、IL-6などを代表とする炎症系のマーカーの Pathway に影響を及ぼしているか確認するために、パスウェイ解析を施行して炎症系マーカーの発現に関与しているか検討した。

4. 研究成果

14患者から採取した前立腺組織を用いて、14検体のオルガノイド(軽症4検体、中等症7検体、重症3検体)を作成した。しかし、オルガノイド継代中にコンタミネーションを認めた検体や、オルガノイドの形態が保てない検体が計5検体(中等症5検体)ほどあり、残りの9検体で研究を継続することにした。軽症群は4検体、中等症群は2検体、重症群は3検体を用いて研究を継続した。9検体からRNAを抽出して、網羅的遺伝子解析(マイクロアレイ)を施行した。各群の対象グループとエビプロスタット投与グループとタダラフィル投与グループとわけた9グループすべてのグループ間で発現に有意差($p < 0.05$)をみとめたのがSTAG2であった。ANOVA解析を用いて特定した。つぎに炎症性マーカーの pathway において、軽症群・中等症群・重症群のそれぞれ3グループで2倍以上の発現差を認める遺伝子を特定した。軽症群・中等症群ではMAOAという神経伝達物質に2倍以上の発現差を認めた。また、中等症・重症群ではPLA2R1に2倍以上の発現差を認めた。重症群だけに特定すれば、IL6の発現に2倍以上の有意差を認めた。また軽症と中等症を統合して重症と比較したところ炎症性マーカーのCalbindin28Kの発現に有意差を認めた。

これらの結果より患者検体を用いて、STAG2、MAOA、PLA2R、IL6、Calbindin28Kの発現について検索することとした。

当院前立腺生検患者にNIH-CPSIを問診して、また前立腺マッサージ後尿の所見から慢性前立腺炎/慢性骨盤痛症候群に該当する患者を抽出した。これらの患者検体のうち前立腺癌を検出しなかった組織検体から薄切切片を作成した。そして、STAG2、MAOA、PLA2R、IL6、Calbindin28に対する抗体を用いて免疫染色したところ、STAG2、MAOA、Calbindin28Kは重症例にて有意に発現していることを確認した。

現在は、正常前立腺細胞であるRWPE-1(ATCC CRL-11609) cellを用いて前述した遺伝子の機能解析を予定している。siRNAによりノックダウンさせたのちに、RWPE-1の細胞増殖や遊走能を確認する。その際には、対象群とエビプロスタット投与群とタダラフィル投与群にわけて、薬剤に対する反応を確認する。細胞増殖と遊走能は全自動性細胞イメージング解析(Incucyte)を用いる予定である。同機器を他実験でも使用しており、使用法は問題なく習熟している。この機器では、細胞培養用のdishそのままに細胞数の変化をリアルタイムに確認することが可能である。細胞増殖能や遊走能に関与する遺伝子を同定して、それらを抑制する薬剤をピックアップしていくことを目標としている。

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
--	---------------------------	-----------------------	----