

令和 4 年 6 月 12 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09714

研究課題名（和文）NLRP3インフラマソームからみた前立腺炎症の病態解明と新規治療薬の開発

研究課題名（英文）Short term effects of cernitin pollen extracts in rats with non-bacterial prostatitis model

研究代表者

森 健一（Mori, Kenichi）

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：00579013

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）：本研究は前立腺組織における炎症の病態をインフラマソームの観点から解析し、前立腺肥大症の新規治療薬開発のための研究基盤を確立することを目的とする。NLRP3 阻害薬であるセルニチンポーレンエキスを経口投与したホルマリン誘発性前立腺炎モデル(投与群)では非投与群と比較し頻尿の改善を認め、NLRP3とIL-1 mRNAの発現も抑制する。セルニチンポーレンエキスはセルニチンT-60とセルニチンGBXで構成され、いずれもNLRP3とIL-1 mRNA発現を有意に低下させるが、膀胱機能障害の改善には両者が必要であった。これらの研究結果は炎症誘発性の前立腺肥大症の治療薬開発の研究基盤となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、男性下部尿路症状に対する治療薬としてセルニチンポーレンエキスが臨床応用されている。抗炎症作用を持つことから慢性前立腺炎や前立腺肥大症に有効とされるものの、その詳細な機序は明らかにされていない。本研究ではセルニチンポーレンエキスがNLRP3インフラマソーム抑制によって、抗炎症作用を発揮することを解明できた。超高齢化社会において前立腺肥大症の罹患患者数は増え続けているが、その詳細な病態はいまだに明らかではなく炎症をターゲットとした前立腺肥大症の病態解明および治療法の開発は非常に限られている。したがって、本研究の役割は非常に大きく臨床応用へと発展させる基礎研究となり得る。

研究成果の概要（英文）：It is well known that prostatic inflammation causes male lower urinary tract symptoms (LUTS). However, the treatment of non-bacterial prostatic inflammation still has not been established. Cernitin pollen extract (composed of Cernitin T60 and Cernitin GBX) improves human male LUTS of prostatic inflammation, nevertheless the detailed mechanism of that is unknown. Therefore, we investigated the effect of Cernitin pollen extract in a rat model with nonbacterial prostatic inflammation. Cernitin T60 or Cernitin GBX respectively improved prostatic inflammation evidenced by decreased expression of IL-1 and NLRP3 mRNA. However, for improved overactive bladder conditions of prostatic inflammation rats in short term, both Cernitin T60 of Cernitin GBX should be needed evidenced by non-invasive voiding assessment in conscious. Cernitin pollen extract could improve prostatic inflammation and overactive bladder conditions in short term.

研究分野：排尿機能

キーワード：前立腺肥大症 インフラマソーム NLRP3 IL1 非細菌性前立腺炎 セルニチンポーレンエキス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺肥大症は代表的な加齢性疾患の一つであり、80歳までに日本人の80%が罹患すると言われている。また、前立腺肥大症における頻尿や尿失禁などの下部尿路症状は生活の質(QOL)の低下させるため、QOL疾患として位置づけられている。特にQOLを損なう原因となる夜間頻尿などの蓄尿症状や病状の悪化に、前立腺組織内における無菌性の炎症が関連することが報告されている(Prostate. 2018 Sep;78(13):970-980)。しかしながら、前立腺肥大症に関連する炎症の原因や機序に対する報告は少ない。近年、炎症のメディエーターとして、自己炎症性疾患等に関連するインフラマソームが注目されている。インフラマソームは様々な炎症刺激で形成される細胞内分子複合体でありカスパーゼ-1を活性化する。活性化されたカスパーゼ-1は炎症性サイトカインであるインターロイキン1(IL1)の成熟化を促し、炎症を惹起するが前立腺における働きは明らかではない。現在、男性下部尿路症状に対する治療薬としてセルニチンポーレンエキスが臨床応用されている。抗炎症作用を持つことから慢性前立腺炎や前立腺肥大症に有効とされるものの、その詳細な機序は明らかにされていない。そのため、広く臨床で使用されているプロロッカー、5-還元酵素阻害剤さらにPDE5阻害剤などの前立腺肥大症治療薬に比べると使用例は限られている。しかしながら、前立腺肥大症における下部尿路症状については、前立腺の炎症との関連も指摘されており(Prostate. 2018 Sep;78(13):970-980)、プロロッカー、5-還元酵素阻害薬、PDE5阻害剤による薬物療法では症状改善が不十分な症例にも、セルニチンポーレンエキスは効果を発揮する可能性がある。セルニチンポーレンエキスがインフラマソーム抑制によって、抗炎症作用を発揮することが解明できれば炎症をターゲットとした前立腺肥大症の新しい治療法の開発へ発展する基礎研究となる。

2. 研究の目的

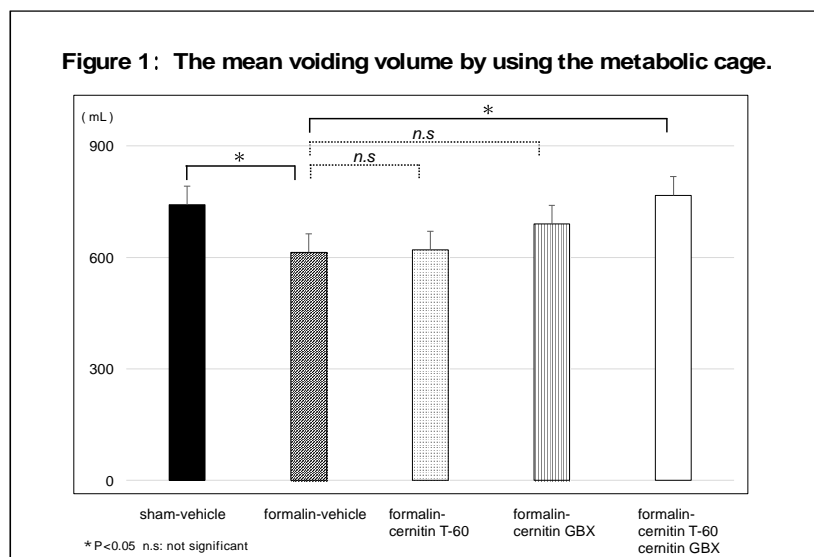
前立腺組織における炎症の病態をインフラマソームの観点から解析し、セルニチンポーレンエキスのNLRP3阻害薬としての有効性を明らかにし、前立腺肥大症患者の新規治療薬としてNLRP3阻害薬を臨床応用へ発展させることを目的とする。

3. 研究の方法

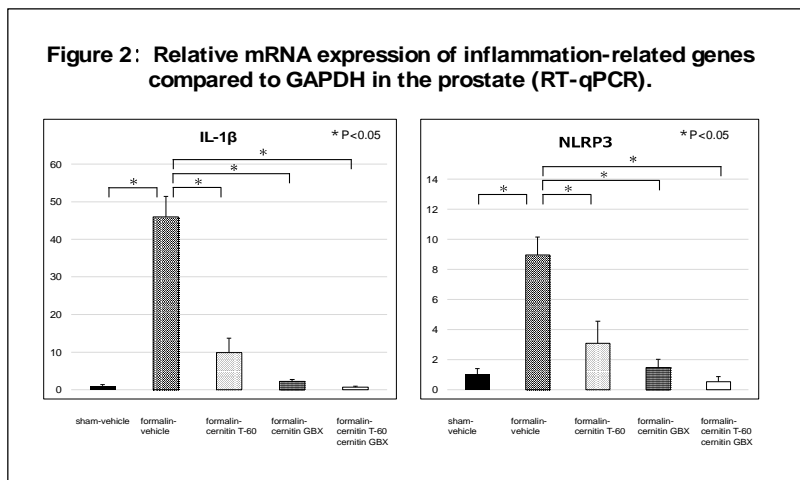
8週齢雄S-Dラットの前立腺前葉被膜下にマイクロシリンジを用いて5%ホルマリン液(50uL)を注入しホルマリン誘発性慢性前立腺炎モデルを作成した。同様に生理食塩液50uLを注入したものをShamモデルとした。非細菌性前立腺炎ラットを用いてセルニチンT-60(1,200mg/kg/day)をオリーブオイルで溶解し経口投与したformalin-cernitinT60群(n=4)、セルニチンGBX(60mg/kg/day)をオリーブオイルで溶解し経口投与したformalin-cernitinGBX群(n=4)、セルニチンT-60+GBX(1260mg/kg/day)をオリーブオイルで溶解し経口投与したformalin-cernitinT60+GBX群(n=4)、さらにオリーブオイルのみを経口投与したformalin-vehicle群(n=4)の4群を作成した。また、Shamラットにオリーブオイルのみを経口投与した群をsham-vehicle群(n=4)とした。胃ゾンデを用いて経口投与を行い、投与開始時期はモデル作製2日前より開始した。それぞれの群はモデル作成7日後に代謝ケージで24時間排尿回数と排尿量を測定し膀胱機能評価を行った後、前立腺組織を採取した。その前立腺組織を用いてH-E染色とマツソトリクローム染色による組織学的評価を行なった。さらにIL-1、NLRP3のmRNAの発現量を測定し各群における比較検討を行った。セルニチンGBXは液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS)にて解析を行った。統計解析はMann-Whitney U-testを用いて行い、P値が0.05未満を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

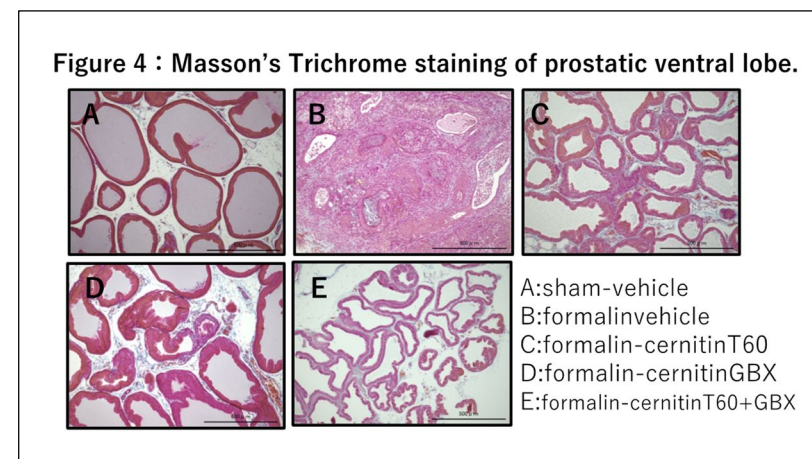
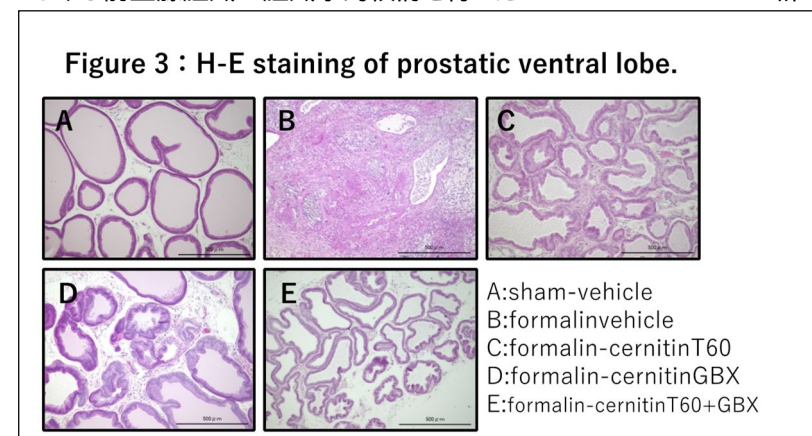
(1)代謝ケージによる24時間排尿モニタリング
formalin-vehicle群はSham-vehicle群に比べて有意に一回排尿量が減少し、排尿回数が増加していたが、formalin-cernitinT60+GBX群はformalin-vehicle群と比較し有意に一回排尿量が増加し、排尿回数が減少していた。formalin-cernitinT60群とformalin-cernitinGBX群はformalin-vehicle群と比較して一回排尿量が増加し、排尿回数が減少する傾向が見られたものの、統計学的な有意差は認められなかった(Figure 1)。



(2) IL-1、NLRP3 mRNA の発現量: formalin-vehicle 群は sham-vehicle 群に比べると前立腺組織における IL-1、NLRP3 mRNA の発現量が有意に増加していたが、セルニチン T60、セルニチン GBX、セルニチン T-60+GBX 投与によってこれらの発現量はそれぞれ非投与群と比較し有意に低下していた (Figure 2)。セルニチン T60、セルニチン GBX はそれぞれ非細菌性前立腺炎における前立腺組織の炎症状態を改善させるが、代謝ケージによる排尿モニタリングの結果も考慮すると、セルニチン T60、セルニチン GBX のそれぞれを単剤投与するよりセルニチン T60 とセルニチン GBX の 2 剤投与がより効果的であると思われた。



(3) 組織学的検討: H-E 染色における前立腺組織の組織学的検討を行ったところ formalin-vehicle 群は sham-vehicle 群と比較し前立腺組織内、特に前立腺間質において好中球やリンパ球などの炎症細胞数の増加を認めた。この formalin-vehicle 群の前立腺組織内における炎症細胞の浸潤はセルニチン T60、セルニチン GBX、セルニチン T-60+GBX 投与によってそれぞれ抑制され、前立腺間質における炎症細胞数は有意に減少した (Figure 3)。非細菌性炎症における前立腺組織内の線維化の状態を評価するためマッソントリクローム染色における組織学的検討を行った。formalin-vehicle 群で sham-vehicle 群と比較し前立腺間質における著明なコラーゲン線維の増加を認めた。しかしながら、formalin-vehicle 群へのセルニチン T60、セルニチン GBX、セルニチン T-60+GBX 投与によってそれぞれ前立腺間質におけるコラーゲン線維の発現は明らかに減少した (Figure 4)。これは、HE 染色における炎症細胞の評価と同様の結果であり、セルニチン T60、セルニチン GBX、セルニチン T-60+GBX 投与による前立腺組織内の炎症抑制とそれに伴う線維化の改善を明らかにすることができた。



(4) セルニチン GBX のクロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS) 解析: セルニチン T60 と比較しセルニチン GBX において IL-1、NLRP3 mRNA の発現抑制効果が強い傾向にあったためセルニチン GBX を LC-MS にて解析したところ、主に OEA (Oleoylthanoamide)、9-HOTrE (9-hydroxy-10E,12Z,15Z-octadecatrienoic acid)、13-HOTrE (13-hydroxy-9Z,11E,15Z-octadecatrienoic acid) の 3 主成分が検出された。

(5) セルニチンポーレンエキスがインフラマソーム抑制によって抗炎症作用を発揮し、それに伴い膀胱機能障害を改善させることが解明できた。セルニチンポーレンエキスの構成成分であるセルニチン T60 とセルニチン GBX についてもそれぞれ同様に抗炎症作用を認めたが、それぞれ単剤治療では膀胱

膀胱機能障害の改善は認められなかった。セルニチン GBX はセルニチン T60 より抗炎症作用が強い傾向にあり、LC-MS 解析を行ったところ OEA (Oleoylthanoilaide)、9- HOTrE (9-hydroxy-10E,12Z,15Z-octadecatrienoic acid) 、13-HOTrE (13-hydroxy-9Z,11E,15Z-octadecatrienoic acid)の 3 主成分を検出した。今後はこの 3 成分に注目し投与量や投与方法などを詳細に検討し、非細菌性前立腺炎における排尿機能障害のより効果的な治療薬を究明していきたい。これらの結果が得られれば既存の治療で十分な効果を得られない前立腺肥大症患者の新しい治療法の開発へ繋がる基礎研究とすることができると、本研究で明らかにした結果は非常に重要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 溝口 晋輔、森 健一、秦 聡孝、三股 浩光
2. 発表標題 食餌誘発性肥満モデルラットにおけるGPERを介した前立腺肥大の改善効果
3. 学会等名 第28回日本排尿機能学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinsuke M, Kenichi M, Naoyuki Y, Toshitaka S, Hiromitsu M
2. 発表標題 Involvement of autophagic dysregulation in prostatic enlargement with chronic inflammation in high fat diet induced obesity rat model
3. 学会等名 国際禁制学会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 溝口 晋輔、山中 直行、森 健一、秦 聡孝、三股 浩光
2. 発表標題 食事誘発性肥満モデルラットにおける慢性前立腺炎症と SQSTM1/p62 の発現解析
3. 学会等名 第27回日本排尿機能学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山中 直行、森 健一、溝口 晋輔、安藤忠助、秦 聡孝、三股 浩光
2. 発表標題 非細菌性前立腺炎モデルラットにおける抗炎症性脂質メディエーター(OEA, PEA) 投薬効果の検討
3. 学会等名 第27回日本排尿機能学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamanaka N, Mori K, Mizoguchi S, T. Shin, Mimata H.
2. 発表標題 SELECTIVE ESTROGEN RECEPTOR MODULATOR CAN IMPROVE BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA IN HIGH FAT INDUCED OBESITY RAT MODEL.
3. 学会等名 アメリカ泌尿器科学会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinsuke M, Kenichi M, Hiromitsu M, Jianshu Ni, Masahiro K, Tetsuichi S, Donald B. DeFranco, Zhou Wang, Naoki Y.
2. 発表標題 EFFECTS OF COX2 INHIBITION ON BLADDER OVERACTIVITY IN RAT MODEL OF CHEMICALLY INDUCED PROSTATIC INFLAMMATION.
3. 学会等名 アメリカ泌尿器科学会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamanaka N, Mori K, Mizoguchi S, T. Shin, Mimata H
2. 発表標題 The analysis of cernitin GBX ingredients; effects of cernitin pollen extract in non-bacterial prostatitis rats model.
3. 学会等名 国際禁制学会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizoguchi S, Mori K, Kurobe M, Saito T, Gotoh D, Cao N, Alexandre E, Mimata H, DeFranco D, Wang Z, Yoshimura N.
2. 発表標題 COX2 is important mediator to development of bladder overactivity after prostatic inflammation.
3. 学会等名 国際禁制学会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中 直行、森 健一、溝口晋輔、秦 聡孝、三股 浩光.
2. 発表標題 オレオイルエタノールアミド(OEA)で非細菌性前立腺炎モデルラットの前立腺炎症を改善する可能性がある.
3. 学会等名 第26回日本排尿機能学会
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
研究協力者	吉村 直樹 (Yoshimura Naoki)	米国ピッツバーグ大学・泌尿器科・教授	

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