

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：21601  
研究種目：若手研究  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20K18120  
研究課題名（和文）補体B因子ノックアウトラットを用いた自己免疫反応による前立腺肥大症増殖機構の解明  
  
研究課題名（英文）Growth mechanism of benign prostatic hyperplasia by autoimmune reaction using complement factor B knockout rats  
  
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）：前立腺肥大症増殖過程における補体B因子の関与を評価するため、CRISPR/Casシステムを用いて、B因子単独欠損(-/-)ラットを作成した。B因子単独欠損ラット、野生型ラットに対して、ラット胎仔尿生殖洞を移植することで、前立腺肥大症モデルラットを作成し、重量や分子生物学的評価を行なった。その結果、B因子単独欠損ラットでは、野生型ラットに比較して前立腺重量が有意に減少しており、特に前立腺間質成分の増殖が抑制されていた。発現解析では、補体各成分(C1q, C3, MBL, C5b-9)の発現が、B因子欠損ラットで有意に低下しており、前立腺肥大症増殖過程における、補体B因子の促進的作用が確認された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、前立腺肥大症増殖過程における補体系の関与を確定的なものにした成果をもたらしたと考えている。補体系は本来、自然免疫系の一つとして知られているが、最近では炎症の増幅経路としての機能が注目されている。今回、補体B因子を標的とすることで、前立腺肥大症増殖促進作用及びその阻害による増殖抑制効果が示された、つまり、前立腺肥大症に対する新規治療標的となり、創薬につながる発展性を有していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To evaluate the involvement of complement factor B in the growth process of benign prostatic hyperplasia, we created factor B deficient (-/-) rats using CRISPR/Cas system. By transplanting rat fetal urogenital sinus to factor B deficient and wild-type rats, we created benign prostatic hyperplasia model rats and performed weight calculation and molecular biological evaluation. These results showed that factor B deficient rats showed significantly decreased prostate weight compared with wild-type rats, and the stromal proliferation was also decreased. Expression analysis revealed that the expression of each complement component (C1q, C3, MBL, and C5b-9) was significantly decreased in factor B-deficient rats, suggesting that complement factor B has a promoting effect on the growth process of benign prostatic hyperplasia.

研究分野：前立腺肥大症

キーワード：前立腺肥大症 補体 自己免疫

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺肥大症の発症・増殖過程において、非アンドロゲン依存性経路、特に前立腺の慢性炎症の関与が注目されている(Kramer G et al, Eur Urol 2007)。BPHにおける炎症の役割については、各種増殖因子、サイトカインなどを含めた分子生物学的な観点から解明が進んでいる。しかしながら、炎症の原因や前立腺増殖を促進する機序の解明はされていない。

私達は以前に、BPH発症機序の解明のため、新規間質優位 BPH モデルラットを作成した。このモデルラットを用いた網羅的遺伝子発現解析により、BPH 組織では有意に炎症反応経路、補体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)。さらに、BPH ラットにおける補体の発現機能解析を行った結果(Hata J et al, ICS 2017, 2018)、補体の各成分(C1q, C3, B 因子, MBL, C5b-9)の発現が、BPH 増殖過程で有意に増加していた。また補体 3 経路のうち、最初に古典的経路、レクチン経路が、続いて第二経路が順次活性化することで、炎症の増幅ループを形成することも新たに発見した(論文投稿中)。補体第二経路はこの炎症増幅ループを形成する事で、様々な病態に関与することが報告されており、BPH 発症にも同様の機序が関与している可能性が考えられる。しかしながら、補体には特異的に目的成分を阻害する薬剤がないこと、さらにモデル動物がラットであり、遺伝子改変動物を作成する事が容易ではない問題があり、補体阻害による BPH 増殖の治療・予防効果を証明するまで至っていなかった。そこで注目したのが、CRISPR/Cas システムであった。CRISPR/Cas システムは、DNA を切断する酵素 Cas9 とゲノム上の編集箇所を見つけ出す gRNA を動物の受精卵に注入する事で、特定の遺伝子をノックアウト、またはノックインする事ができる技術である (Yoshimi K et al, Nat Commun 2016)。今回私達は、補体の活性化を増幅する第二経路の補体 B 因子ノックアウトを作成し、それを用いて増殖抑制効果及び補体の発現機能解析を行うことで、BPH 増殖過程の解明及び新規治療薬の開発に向けた基礎的研究を行うこととした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、CRISPR/Cas システムを用いて補体第二経路構成分子の B 因子ノックアウトラットを作成し、補体系阻害による BPH 増殖の治療・予防効果を評価することで、補体による BPH 増殖過程の解明及び新規治療薬の開発に向けた基礎的研究を行うことである。

## 3. 研究の方法

### 研究 1. CRISPR/Cas システムを用いた B 因子ノックアウトラットにおける増殖抑制効果及び補体の発現機能解析

#### B 因子ノックアウトラット作成

本研究においては、補体成分の阻害標的として B 因子を選択する。B 因子は補体の増幅機構を形成する第二経路の構成成分の一つであり、その阻害により補体活性化の増幅ループの悪循環を改善させる可能性がある。まず、この B 因子のガイド RNA (gRNA) を設計する。その設計に基づいた gRNA、Cas 発現ベクターを調製する。続いて作成した発現ベクターを Fisher 系ラット受精卵にマイクロインジェクションし、これを仮親の卵管へ移植する。目的の変異が起きた産仔のスクリーニングを行い、目的領域の塩基配列を確認する。目的の変異の導入が確認されたものを抽出し、繁殖を進めて B 因子単独欠損(-/-)ラットを作成する。本モデル作成にあたっては、文部科学省新学術領域研究・先端モデル動物支援プラットフォームのプロジェクトを活用して行う。

#### B 因子ノックアウトラットの妥当性評価

ノックアウトラットの作成後に、野生型 Fischer 系ラットを対照として、補体成分(C1q, C3, B 因子, MBL, C5b-9)の発現機能解析を RT-PCR により評価する。さらに補体の血清レベルを ELISA で評価する。ラットの身体的パラメータ(体重、成長曲線など)も測定し評価する。

#### 抗ラット B 因子抗体の作成

ラット B 因子 C 末端ペプチドを抗原として Fisher 系ラットに注入し免疫を行う。63 日後に血液検体(血漿、血清)を回収し、アフィニティクロマトグラフィーを用いて抗体を精製し、ポリクロナールラット型抗ラット B 因子抗体を作成する。抗体は後の研究で使用する。

#### BPH モデルラットの作成

妊娠 20 日の雌性ラットから胎仔を摘出し、その尿生殖洞(UGS)組織のみを単離する。UGS を 7 週齢雄性 Fischer 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。以上の方法で野生型及び B 因子ノックアウトラット(-/-)を用いて、モデルラットの作成を行う。

#### B 因子ノックアウトラットによる増殖抑制効果の評価及び補体の発現機能解析

野生型ラットの一部に、研究 1 で作成した抗ラット B 因子抗体の腹腔内投与を行う。他の群には対照として抗体と同量の PBS 投与を行う。移植 3 週間後の組織を採取して、PCNA 染色により細胞増殖、TUNEL 法により細胞死の程度を評価する。また、RT-PCR、Western blot により、補体各成分(C1q, C3, C5b-9, MBL, B 因子等)及び増殖因子(TGF- $\beta$ 1, IGFBP3, FGF7 等)の発現定量を行なう。FITC 標識抗 C1q, C3, MBL, B 因子, C5b-9 抗体で染色し、補体沈着レベルのスコア

化を行い、病理組織的評価を行う。加えて、前立腺重量、BPH の線維化スコアも測定し比較を行う。さらに、C3 deposition アッセイにより補体第二経路の活性抑制効果を評価する。

## 研究 2. ヒト BPH における補体成分の発現機能解析

### ヒト BPH 組織における補体成分の発現機能解析及び臨床パラメータとの比較

BPH の診断で、手術加療（経尿道的前立腺切除術等）を受けた症例の切除組織をヒト BPH 組織として、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できる組織を対照として採取する。これらを用いて、BPH 組織中の補体成分の発現を、RT-PCR、Western blot、免疫組織化学染色で評価する。また、臨床的パラメータ（前立腺重量、排尿症状スコア等）と合わせて比較を行う。また同時に対象患者の血清も採取し、B 因子の血清濃度を ELISA で評価することで、BPH の診断・重症度マーカーとしての有用性を評価する。

## 4. 研究成果

CRISPR/Cas システムを用いて、B 因子ノックアウトラット作成を行なった。まず、B 因子のガイド RNA (gRNA) を設計した。その設計に基づいた gRNA、Cas 発現ベクターを調製し、続いて作成した発現ベクターを Fisher 系ラット受精卵にマイクロインジェクションし、これを仮親の卵管へ移植した。目的の変異が起きた産仔のスクリーニングを行い、目的の変異の導入が確認されたものを抽出し、繁殖を進めて B 因子単独欠損 (-/-) ラットを作成した。スクリーニングには、産仔の耳組織を用いて、PCR もしくはシーケンスにより行なった。B 因子単独欠損 (-/-) ラット、野生型ラットに対して、ラット胎仔尿生殖洞を移植することで、前立腺肥大症モデルラットを作成した。移植 3 週間後に、肥大前立腺組織を採取して、重量や分子生物学的評価を行なった。その結果、B 因子欠損ラットでは、野生型ラットに比較して前立腺重量が有意に減少していたが、欠損ラットでは体重の減少も認められた。さらに、組織学的評価では、特に前立腺間質成分の増殖が抑制されていた。さらに、Western blotting の結果、補体各成分 (C1q, C3, MBL, C5b-9) の発現が、B 因子欠損ラットで有意に低下していることがわかった。免疫組織化学染色では、特に C1q, C3, MBL, C5b-9 は間質優位に局在しているが、欠損ラットでは C3, C5b-9 の発現が低下していた。つまり、前立腺肥大症増殖過程において、補体 B 因子が促進的作用を示していることが明らかとなった。本研究成果は、補体 B 因子を標的とした新規治療薬の開発につながる可能性があると考えられる。

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

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