

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09733

研究課題名（和文）前立腺肥大症における自己免疫応答と微生物感染によるインフラマソーム制御機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of Inflammasome Regulation by Autoimmune Responses and Microbial Infection in Benign Prostatic Hyperplasia

研究代表者

小島 祥敬 (Kojima, Yoshiyuki)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60305539

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：BPHモデルラットを用いて、補体の発現機能解析及び自己抗原の同定を行なった。その結果、Annexin, Hsp90, -SMA, -actinを自己抗原とする免疫複合体が、古典的経路を中心とした補体系全体を活性化し炎症を増幅することを明らかにし、自己免疫反応がBPHの発症に関与する可能性を示唆した。また factor BノックアウトBPHラットの作成と補体分子の発現機能解析を行った。さらにヒト前立腺における細菌の存在を証明し、前立腺の腺上皮過形成との相関を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺肥大症（BPH）は、性ホルモンによって様々な増殖因子・サイトカイン・神経伝達物質が刺激され、上皮-間質相互作用の中で誘導されると考えられている。私達は前立腺増殖過程において、炎症や増殖因子・サイトカイン・各種シグナル伝達系が関与することを報告してきたが、それらを誘導する発症要因に関してはほとんど明らかになっていない。私たちは、前立腺肥大症が自己免疫疾患のひとつであるという仮説を立て、研究を進めていたが、細菌感染がそれを誘導する可能性、抗原抗体反応による免疫複合体が補体経路を活性化する可能性を突き止め、その機序を明確にしつつある。

研究成果の概要（英文）：Functional analysis of complement expression and identification of autoantigens were performed using a rat model of BPH. We found that immune complexes with annexin, Hsp90, -SMA, and -actin as autoantigens activate the entire complement system, mainly the classical pathway, and amplify inflammation, suggesting that autoimmune reactions may be involved in the pathogenesis of BPH. We also generated factor B knockout BPH rats and analyzed the functional expression of complement molecules. Furthermore, we demonstrated the presence of bacteria in the human prostate gland and correlated this with glandular epithelial hyperplasia in the prostate gland.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺肥大症 自己免疫疾患 補体 細菌

1. 研究開始当初の背景

BPHの発症は、性ステロイドホルモン特にアンドロゲンの作用によって、様々な増殖因子・サイトカイン・神経伝達物質が分泌され、上皮-間質相互作用の中で誘導されると考えられている。しかし、前立腺の増殖はホルモン依存的機構のみでは説明がつかない。従って、ホルモン非依存性の増殖メカニズムの解明が必要とされている。私たちは前立腺増殖過程において、炎症・虚血、増殖因子・サイトカイン・各種シグナル伝達系の関与を報告してきたが、それらを誘導する根本的な発症要因に関しては明らかになっていない。近年、BPH発症と炎症の関係が注目されている。しかしながらその詳細については明らかにされていない。前立腺において炎症を惹起する原因はいくつか考えられるが、私達は自己抗原に対する自己免疫応答システムおよび病原体侵入によって惹起されるという可能性を考えた。

私たちは以下の国内外の研究成果を加味して立案した研究である。

1) BPHと前立腺胎生化仮説・病原体仮説・前立腺幹細胞仮説：BPHの発症メカニズムは、ほとんどわかっていない。一般的に性ステロイドの関与のほかに、以下の3つのホルモン非依存性発症メカニズムの仮説が提唱されているが、実証は全くされていない。

前立腺胎生化仮説：前立腺は、胎生期後期に泌尿生殖洞(UGS)から発生する。前立腺胎生期化仮説は、胎生期と中高年期の前立腺増殖の二相性に着目して、中高年期の前立腺の増殖すなわちBPHの発症が、前立腺の胎生化により発症するのではないかと考えられてきた。その発想をもとに、私たちは、胎生期のUGSを成人前立腺に移植することにより、新規間質優位BPHモデルラットの作成に成功した。

病原体仮説：BPH発症に炎症が強く関与していることから、前立腺への病原体感染が、前立腺の上皮および間質を刺激し細胞増殖を誘導するという仮説である。

前立腺幹細胞仮説：前立腺にも増殖起点となる幹細胞が存在し、これらの細胞の異常増殖やtransient amplifying cellのクローン性増殖が関与しているとの仮説である。

2) BPHと炎症：BPHの発症機序解明に関する基礎的研究は国内外を見ても少ない。最近ではBPHと炎症の関連がより注目されてきており、それに関する研究が増えてきている。その大半は、IL-4、IL-6、IL-8、IL-13、IGF、KGF、TGF- β 等のサイトカイン、増殖因子の発現などを評価した研究であり、これらが前立腺のリモデリング、上皮-間質相互作用を通して、BPHの発症・増殖につながるとされている。しかしながら、それらの分子は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。また、炎症の原因、BPH発症に繋がる機序についても明らかにされていない。

2. 研究の目的

BPHにおける胎児性抗原を標的とした自己免疫応答システムおよび未知微生物の探索とオートファジーによるインフラマソーム制御機構を解明することにより、BPHの細胞増殖ネットワーク制御機構の解明すること。本研究の学術的独自性は、従来から報告されていたホルモン依存的増殖機構や既知の成長因子・サイトカインに着目した研究ではなく、発想を転換し、新たに自己免疫機構と胎児性自己抗原の同定、未知の微生物の探索とインフラマソーム制御機構の解明を行うことにより、ホルモン非依存的なBPHの増殖機構を解明しようという点である。創造性は、上記目的を達成することにより、BPHの発症メカニズムが包括的に解明され、将来のBPHの細胞増殖抑制を目標とするホルモン環境に影響しない新しい治療薬の開発につながることである。

3. 研究の方法

研究1: BPHにおける補体関連分子の発現機能解析と胎児性自己抗原を標的とした自己免疫応答システムの解明

1) BPHモデルラットの作成と補体活性化原因分子(胎児性抗原)の同定

私達が独自開発し、これまで使用してきた間質優位BPHもでる動物を使用した。顕微鏡下に胎生20日目SDラット雄胎仔のUGSを摘除し成人雄ラットの前立腺被膜下に顕微鏡下に移植した。移植後3週後に前立腺を摘除しBPH組織とした。蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動法により、BPHにおいて同定された免疫複合体からタンパク質を抽出し蛍光色素でラベルし分離。得られたペプチドを質量分析計で測定し、peptide mass fingerprinting法により補体活性化原因分子の同定を行った。

2) CRISPR/Casシステムを用いたfactor BノックアウトBPHラットの作成と補体分子の発現機能解析

factor Bは補体の第二経路の構成成分の一つであり、補体系全体の増幅機構として働く。そのため、その阻害により補体活性化を介する炎症の増幅という悪循環を改善させる可能性がある。Factor BのガイドRNA(gRNA)を設計し、その設計に基づいたgRNA、Cas発現ベクターを調製した。作成した発現ベクターをSD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ダイレクトシーケンスにより行った。これにより目的領域の塩基配列を確認する。同定された産仔ラットのうち、目的の変異の導入が確認されたものを抽出し、ノックアウトラットとして用いた。B 因子ノックアウトラット、野生型ラットをレシピエントとして、上述の BPH モデルラット作成を行い、補体成分の (C1q、C3、C5b-9、MBL、B 因子等) mRNA、蛋白レベルでの発現定量を試みた。HE 染色または FITC 標識抗 C1q、C3、MBL、B 因子、C5b-9 抗体等で染色し、補体沈着レベルのスコア化を行い、病理組織化学評価を試みた。

3) 前立腺肥大症の重症化に伴う線維化過程における活性化補体経路のシフトチェンジ
2018 年～2020 年に当科で PSA 高値により前立腺針生検を施行した、組織学的 BPH 患者 56 例を対象とした (平均年齢 68.6 ± 6.5 歳)。HE 及び EM 染色により、BPH の組織学的分類を行った。補体の発現機能解析は、C3、B 因子、C5b-9 抗体を用いた免疫組織化学染色で行い、染色領域の占有割合を算出した。

研究 II: BPH における微生物の探索とオートファジーによるインフラマソーム制御機構の解明
前立腺の微生物環境の変化が BPH 発症に関与する可能性を考え、BPH 組織における未知微生物のプロファイリングを試みた。前立腺生検を受けた患者から前立腺組織を採取し、全 DNA を抽出した。前立腺サンプル中の細菌種の検出と同定は、16SrDNA の PCR と PCR 産物の DNA シークエンスで行った。生検組織も 10%ホルムアルデヒドで固定し、細菌の存在と組織学的所見を検討した。前立腺生検の前に、IPSS (国際前立腺肥大症スコア)、IPSS-QOL (QOL スコア)、OABSS (過活動膀胱症状スコア) による主観的下部尿路症状評価、Uroflowmetry および超音波検査による客観的下部尿路機能評価を行った。

4. 研究成果

研究 I: BPH における補体関連分子の発現機能解析と胎児性自己抗原を標的とした自己免疫応答システムの解明

1) BPH モデルラットの作成と補体活性化原因分子 (胎児性抗原) の同定

補体は一般的に、病原体の排除に働く自然免疫機構として知られているが、最近では炎症の増幅機構として様々な疾患で主要な役割を果たすことが注目されている。そのうち補体古典的経路は、抗原抗体反応により生じた免疫複合体により活性化され、補体系全体を活性化することで、炎症細胞浸潤や組織リモデリングを含む炎症反応を惹起する。私達は、BPH モデルラットを用いた網羅的遺伝子解析により補体古典的経路が活性化されていることに着目し、補体の発現機能解析及び自己抗原の同定を行なった。その結果、Annexin, Hsp90, α -SMA, α -actin を自己抗原とする免疫複合体が、古典的経路を中心とした補体系全体を活性化し炎症を増幅することを明らかにし、自己免疫反応が BPH の発症に関与する可能性を示唆した。

2) CRISPR/Cas システムを用いた factor B ノックアウト BPH ラットの作成と補体分子の発現機能解析

factor B ノックアウト BPH ラットの作成と補体分子の発現機能解析を行った。ノックアウトラットの前立腺重量は、ワイルドタイプに比較して有意に少なく、第二補体経路の抑制が、前立腺の増殖抑制に働いたことにより、前立腺肥大には補体経路活性化が大きく関与することが証明され、インフラマソーム制御機構の関与が示唆された。今後、補体成分の (C1q、C3、C5b-9、MBL、B 因子等) mRNA、蛋白レベルでの発現定量、FITC 標識抗 C1q、C3、MBL、B 因子、C5b-9 抗体等で染色し、補体沈着レベルのスコア化を行い、詳細な検討を加える予定である。

3) 前立腺肥大症の重症化に伴う線維化過程における活性化補体経路のシフトチェンジ

ヒト前立腺組織のうち 27 例 (48.2%) が線維筋型、29 例 (51.8%) が線維型に分類された。線維成分の割合は、線維筋型が $36.0 \pm 12.9\%$ 、線維型が $61.1 \pm 11.7\%$ と有意に線維型で多かった ($p < 0.01$)。補体発現について、B 因子は 2 群間で有意な差はなかったが、C3 (線維筋型 $10.7 \pm 8.2\%$: 線維型 $16.4 \pm 12.7\%$)、C5b-9 (線維筋型 $15.9 \pm 6.2\%$: 線維型 $17.6 \pm 9.2\%$) は線維型で有意に発現が亢進していた ($p = 0.04$, $p = 0.04$)。また、線維筋型で炎症細胞の有意な浸潤を認めた ($p = 0.03$)。線維化過程のヒト BPH 組織を用いて、組織学的分類及び補体成分の発現解析を行うことで、BPH 重症化に伴う線維化過程における活性化補体経路を明らかにすることを目的とした研究を行った。BPH が線維筋型から線維型へと重症化する過程において、補体第二経路活性化による炎症増幅ループの亢進が線維化促進を促し、最終的に線維型 BPH へと移行すると考えられた。補体後期経路活性化へのシフトチェンジが BPH の重症化に関与していると推察された。

研究 II: BPH における微生物の探索とオートファジーによるインフラマソーム制御機構の解明
尿路感染症のない 101 人から採取した前立腺の 97 検体から DNA を抽出したところ、97 人中 7 人 (7%) の患者の前立腺に細菌が検出された。これらの患者の前立腺からは、5 種の細菌 (Streptococcus mitis 1.0% (1/97), Staphylococcus 1.0% (1/97), Chlamydia trachomatis 3.1% (3/97), Cutibacterium acnes 1.0% (1/97), Acidovorax sp 1.0% (1/97)) が検出された。下

部尿路症状、発熱、排尿時痛などの臨床症状がない患者でも、前立腺組織から *Chlamydia trachomatis* が検出された。

前立腺がんの有無と前立腺内細菌との間には、有意な相関は認められなかった ($p=0.098$)。細菌が存在する前立腺組織の間質管と腺管の比率は、細菌が存在しない組織よりも有意に低かった ($P=0.037$)。IPSS、IPSS-QOL、OABSS、尿流測定による最大尿流率、排尿量、超音波検査による排尿後残尿には、前立腺内の細菌の有無による有意差は認められなかった。我々の研究は、BPH や前立腺炎の臨床症状を持たない男性の 7% が前立腺内に細菌を保有していることを実証した。細菌の存在は、前立腺の腺性肥大を誘発する可能性があるが、そのメカニズムについては今後の研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hata J, Tanji R, Onagi A, Honda-Takinami R, Matsuoka K, Hoshi S, Sato Y, Akaihata H, Haga N, Kojima Y.	4. 巻 27
2. 論文標題 Morphological change and characteristics of myofibroblasts during the growth process of benign prostatic hyperplasia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Urol	6. 最初と最後の頁 676-683
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iju.14265	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hata J, Machida T, Matsuoka K, Hoshi S, Akaihata H, Hiraki H, Suzuki T, Ogawa S, Kataoka M, Haga N, Ishibashi K, Homma Y, Sekine H, Kojima Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Complement Activation by Autoantigen Recognition in the Growth Process of Benign Prostatic Hyperplasia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep .	6. 最初と最後の頁 20357
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-57001-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小島祥敬
2. 発表標題 前立腺肥大症の細胞増殖機構解明に向けた基礎的研究
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第38回学術大会（招待講演）
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
研究分担者	秦 淳也 (Hata Junya) (00769606)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	錫谷 達夫 (Suzutani Tatsuo) (40196895)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	
研究分担者	関根 英治 (Sekine Hideharu) (40363759)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	
研究分担者	羽賀 宣博 (Haga Nobuhiro) (50586617)	福岡大学・医学部・教授 (37111)	
研究分担者	赤井畑 秀則 (Akaihata Hidenori) (70644178)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	
研究分担者	石橋 啓 (Ishibashi Kei) (90347211)	福島県立医科大学・医学部・博士研究員 (21601)	

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