

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09401

研究課題名（和文）アクネ菌による前立腺癌発生メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism underlying prostate cancer development by
Cutibacterium acnes

研究代表者

蘆田 真吾（ASHIDA, Shingo）

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師

研究者番号：80380327

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：前立腺上皮細胞にアクネ菌を感染させマイクロアレイを行ったところ、パスウェイ解析において相同組換え（HR）パスウェイが有意に変動していた。アクネ菌感染細胞を電子顕微鏡で観察したところ、アクネ菌は細胞内に侵入し核周囲明庭に存在することが分かった。一方、H2AX foci解析およびHRアッセイを行ったところ、アクネ菌感染細胞において相同組換え修復欠損を認めた。そして、HRパスウェイに含まれるBRCA2遺伝子発現がアクネ菌感染によって有意に低下することを証明した。さらに、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、アクネ菌感染前立腺上皮細胞においてBRCA2遺伝子のプロモーター活性の低下を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらの結果は、アクネ菌感染は相同組換え修復欠損を引き起こし、BRCAnessからゲノム不安定性、さらには前立腺癌発生のリスクを増加させることを示唆している。前立腺癌発生におけるアクネ菌の役割がさらに明らかになれば、前立腺癌の病態解明につながるだけでなく、除菌等により前立腺癌の予防に貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Microarray analysis revealed significant changes in homologous recombination (HR) pathway in prostate epithelial cells infected with Cutibacterium acnes (C. acnes). Electron microscopy revealed that C. acnes invaded prostate epithelial cells and localized in the perinuclear vesicles, whereas H2AX foci analysis and HR assay revealed impaired HR repair in C. acnes-infected cells. The expression of BRCA2 gene, which is included in HR pathway, was significantly down-regulated in C. acnes-infected cells. To clarify the mechanism underlying the decrease in BRCA2 gene expression, luciferase assay was performed and decreased promoter activity of BRCA2 gene was observed in C. acnes-infected prostate epithelial cells.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 アクネ菌 BRCA2

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 前立腺癌の原因は未だ不明であるが、慢性炎症が前立腺癌の発生と関連することを示す多くのエビデンスがあり、病原体 (pathogen) 感染が前立腺癌発生の原因の一つであると考えられている。

(2) 我々は、これまでに、RNA-seq の de novo アセンブリー解析によって、前立腺癌の新たな pathogen 候補を同定した。Pathogen 候補には *Cutibacterium acnes* (アクネ菌) が含まれており、検証実験にて、ほぼ全例 (19/20 例) の前立腺癌組織にアクネ菌が検出された。アクネ菌は、組織炎症と強い相関があり、癌の発生との関連が示唆されている。いくつかの研究は、前立腺癌患者の前立腺組織内に高頻度にアクネ菌の存在を示している。また、アクネ菌の前立腺上皮細胞株への感染は、強い炎症反応、形態変化を引き起こし、このことは、癌の発生あるいは進行の引き金になっている可能性を示唆している。

2. 研究の目的

(1) 我々は、これまでに RNA-seq 解析を行い、アクネ菌を前立腺癌の有力な pathogen 候補として同定した。そして、前立腺上皮細胞にアクネ菌を感染させてマイクロアレイを行ったところ、パスウェイ解析において homologous recombination (HR) パスウェイが有意に変動しており、そこに注目した。

(2) 本研究は、アクネ菌による HR パスウェイへの影響について研究を進め、前立腺癌発生の病態を解明し、予防に応用することを目的とする。胃癌においては、*Helicobacter pylori* (ピロリ菌) が pathogen として同定され、発癌メカニズム解明に関する研究が進んでいる。そして、ピロリ菌除菌により胃癌の発生予防や死亡数の減少が期待できるようになった。もし、前立腺癌発生におけるアクネ菌の役割が同定、解析されれば、病態解明につながるだけでなく、除菌等により前立腺癌の予防に貢献できると考える。

3. 研究の方法

(1) アクネ菌が前立腺上皮細胞において HR パスウェイに与える影響について調べた。

アクネ菌の前立腺上皮細胞への感染様式の形態学的検討

アクネ菌を前立腺上皮細胞に MOI 100 で感染させ、電子顕微鏡で観察した。

アクネ菌の DNA 二本鎖切断 (DSB) 修復に及ぼす影響についての検討

DSB の修復をモニターするために、H2AX foci を蛍光免疫染色で検出した。DSB の頻度は、H2AX foci を 5 個より多く含む細胞の割合を計算することによって見積もられた。また、ウエスタンブロット法で H2AX を検出した。

HR アッセイ

HR アッセイキットを用いて HR 効率を調べた。

(2) アクネ菌が HR パスウェイに含まれる BRCA2 遺伝子発現に与える影響について調べた。

定量的リアルタイム PCR 法およびウエスタンブロット法

前立腺上皮細胞にアクネ菌を MOI 100 で感染させて、定量的リアルタイム PCR 法およびウエスタンブロット法を用いて BRCA2 遺伝子発現の変化を調べた。

DNA メチル化解析

アクネ菌感染によるエピジェネティックな変化の有無を調べるため、methylation specific PCR 法を用いて DNA メチル化解析を行った。

レポーター・プラスミドの作製

BRCA2 遺伝子のプロモーター領域を PCR で増幅し、ベクターにクローニングしてレポーター・プラスミドを作製した。

ルシフェラーゼアッセイ

レポーター・プラスミドをトランスフェクションした前立腺上皮細胞にアクネ菌を MOI 100 で感染させ、ルシフェラーゼアッセイを行った。

4. 研究成果

(1) アクネ菌が遺伝子発現にどのように影響するかを検討するために、アクネ菌を前立腺上皮細胞に感染させ、電子顕微鏡で観察したところ、アクネ菌は、前立腺上皮細胞内に侵入し、核周囲明庭に存在することが分かった (図 1A-D)。図 A および C の四角の拡大を図 B および D にそれぞれ示す。細胞あたりのアクネ菌の感染数は、アクネ菌感染の 24 時間後と比べて 48 時間後に有意に増加していた (図 1E)。

一方、アクネ菌が HR を実際に阻害するかどうかを調べるために、前立腺上皮細胞にアクネ菌を感染させ、蛍光免疫染色を用いて、DSB マーカーである H2AX foci を定量した。蛍光二重免疫染色では、H2AX foci は、アクネ菌感染量に比例して誘導された (図 2A)。H2AX foci を 5 個より多く含む前立腺上皮細胞の割合は、コントロールと比較して、アクネ菌を感染させた細胞において有意に高かった (図 2B)。ウエスタンブロット解析においても、アクネ菌感染は、著明に H2AX の発現を亢進させた (図 2C)。さらに、HR 効率を HR アッセイキットを用いて調べたところ、アクネ菌は、コントロールに比べて、有意に HR 効率を減少させることが分かった (図 2D)。つまり、アクネ菌を感染させた前立腺上皮細胞において高頻度に相同組換え修復欠損を認めたと。NI は non-infected、HI は heat-inactivated アクネ菌を示す。

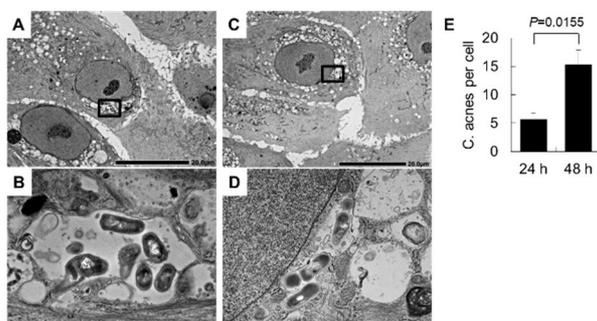


図1 電子顕微鏡による形態学的観察

(2) 次に、アクネ菌感染は、DNA 修復遺伝子の発現を阻害することによって DSB の増加、HR の減少を引き起こすのかもしれないと考えた。実際、マイクロアレイ解析で HR およびファンコニ貧血パスウェイと関連のあるいくつかの遺伝子の発現が、アクネ菌感染前立腺上皮細胞において時間とともに減少していた (図 3A)。BRCA2 遺伝子は、両方のパスウェイに含まれていたため、さらに解析を進めた。定量的リアルタイム PCR は、BRCA2 遺伝子発現がアクネ菌感染前立腺上皮細胞において、時間とともに有意に低下することを示した (図 3B)。ウエスタンブロット解析も BRCA2 の発現がアクネ菌感染後、時間とともに減少することを証明した (図 3C)。

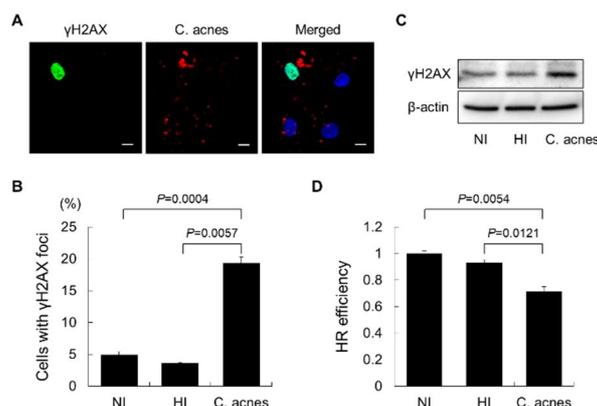


図2 アクネ菌は相同組換え修復を阻害する

アクネ菌感染の結果として起きる BRCA2 遺伝子発現低下のメカニズムとして、エピジェネティックな変化の有無を調べるために、BRCA2 のプロモーター領域のメチル化を methylation specific PCR 法で調べた。しかしながら、BRCA2 のプロモーター領域のメチル化は認められなかった。そこで、BRCA2 遺伝子のプロモーター領域を PCR で増幅し、ベクターに組み込み、レポーター・プラスミドを作製した。そして、レポーター・プラスミドをトランスフェクションした前立腺上皮細胞にアクネ菌を感染させ、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、アクネ菌感染は、有意に BRCA2 遺伝子のルシフェラーゼの発現を低下させた (図 3D)。すなわち、アクネ菌は、BRCA2 遺伝子のプロモーターに何らかの作用をもたらし、プロモーター活性を阻害することが分かった。

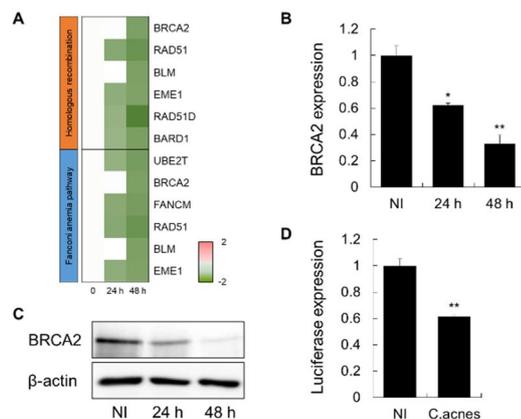


図3 アクネ菌はBRCA2の発現を低下させる

(3) これらの結果は、アクネ菌感染は相同組換え修復欠損を引き起こし、BRCAness からゲノム不安定性、さらには前立腺癌発生のリスクを増加させることを示唆している。前立腺癌発生におけるアクネ菌の役割がさらに明らかになれば、前立腺癌の病態解明につながるだけでなく、除菌等により前立腺癌の予防に貢献できると考えられる。

< 引用文献 >

Nakai Y, Nonomura N. Inflammation and prostate carcinogenesis. International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association. 2013;20(2):150-160.
 Sfanos KS, De Marzo AM. Prostate cancer and inflammation: the evidence. Histopathology. 2012;60(1):199-215.
 Bae Y, Ito T, Iida T, et al. Intracellular Propionibacterium acnes infection in glandular epithelium and stromal macrophages of the prostate with or without cancer. PloS one. 2014;9(2):e90324.

Imai S, Ooki T, Murata-Kamiya N, et al. *Helicobacter pylori* CagA elicits BRCAness to induce genome instability that may underlie bacterial gastric carcinogenesis. *Cell host & microbe*. 2021;29(6):941-958.e910.

Usui Y, Taniyama Y, Endo M, et al. *Helicobacter pylori*, Homologous-Recombination Genes, and Gastric Cancer. *The New England journal of medicine*. 2023;388(13):1181-1190.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Shingo Ashida, Chiaki Kawada, Hiroko Tanaka, Atsushi Kurabayashi, Ken-ichi Yagyu, Shuji Sakamoto, Kazuhiro Maejima, Satoru Miyano, Masanori Daibata, Hidewaki Nakagawa, Keiji Inoue	4. 巻 -
2. 論文標題 Cutibacterium acnes invades prostate epithelial cells to induce BRCAness as a possible pathogen of prostate cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Prostate	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pros.24723	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shingo Ashida, Chiaki Kawada, Hiroko Tanaka, Atsushi Kurabayashi, Ken-ichi Yagyu, Shuji Sakamoto, Kazuhiro Maejima, Satoru Miyano, Masanori Daibata, Hidewaki Nakagawa, Keiji Inoue
2. 発表標題 Cutibacterium acnes invades prostate epithelial cells to induce BRCAness as a possible pathogen of prostate cancer
3. 学会等名 American Association for Cancer Research（国際学会）
4. 発表年 2024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	大畑 雅典 (DAIBATA Masanori) (50263976)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・教授 (16401)	
研究分担者	坂本 修士 (SAKAMOTO Shuji) (80397546)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・教授 (16401)	

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