

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462404

研究課題名(和文) 前立腺癌の高リスクファクターとしてのアクネ菌感染と前立腺発癌に関する研究

研究課題名(英文) Intracellular *Propionibacterium acnes* infection in prostate glands is an independent risk factor for prostate cancer

研究代表者

江石 義信 (Eishi, Yoshinobu)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：70151959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年前立腺癌患者の組織よりアクネ菌が高頻度に検出されており、本菌の感染が前立腺癌の危険因子であることが示唆されている。また、針生検を用いた診断においては偽陰性となることがあり診断精度の向上が望まれている。当研究室にて作成したモノクローナル抗体を用いて前立腺針生検に対する免疫組織学的検討を行うと癌群にて有意に高い感染率を示し、本手法は前立腺癌診断の精度向上に寄与するものである。マウス感染モデルにおいては尿道カテーテル法にてマウス前立腺にアクネ菌を感染させることで炎症反応および制御異常が発癌に深く関わりとされる転写因子STAT3の活性化を誘導した。今後更なる長期的な感染実験により発癌が期待される。

研究成果の概要(英文)：Propionibacterium acnes has recently been implicated as a cause of chronic prostatitis and this commensal bacterium may be linked to prostate carcinogenesis. The frequency of P. acnes-positive glands in prostate biopsy samples was higher in PCa samples than in control samples. These results suggested that the frequency of P. acnes-positive glands can be supportive information for urologists in planning repeated biopsy or follow-up strategies. Furthermore, intracellular P. acnes infection of prostate induced in mice by transurethral inoculation of viable P. acnes induced chronic prostatitis and activates STAT3 in epithelial cells of the P. acnes-infected prostate glands, suggesting that deregulation and inappropriate activation of STAT3 may play a central role in prostate carcinogenesis by P. acnes infection. Further experiments with mice infected in prostate by P. acnes are now in progress and long-term infection may be able to induce prostate cancer in the experimental animals.

研究分野：病理学

キーワード：アクネ菌 前立腺癌 持続感染 前立腺炎 新規診断マーカー 発癌モデル

1. 研究開始当初の背景

(1) 前立腺癌は世界の男性において 2 番目に罹患者の多い悪性腫瘍である¹⁾。危険因子として人種、家族歴、食生活、加齢などが挙げられるが明確な病因は不明である²⁾。最近の研究では、前立腺組織における慢性炎症が前立腺癌の発生に深く関わっていることが報告されている^{3),4)}。また、嫌気性グラム陽性桿菌である *Propionibacterium acnes*(アクネ菌)が前立腺炎及び前立腺癌患者の組織から高頻度に検出されており、これらの疾患の危険因子である可能性が示唆されている⁵⁾。

前立腺は辺縁領域(PZ)、移行領域(TZ)、中心領域(CZ)、前葉線維筋性間質の 4 領域に大別され、前立腺癌は PZ に好発することが知られている。本教室で以前に行った前立腺全摘出検体(手術検体)での検討では、非前立腺癌症例に比べ前立腺癌症例でアクネ菌陽性腺管率がが高く、癌の好発部位の PZ にアクネ菌が多く認められた⁶⁾。

2. 研究の目的

(1) 前立腺癌のスクリーニングには、血清前立腺特異抗原(PSA)値の測定や MRI などの画像検査が用いられる。これらの検査で前立腺癌の存在が疑われた場合、針生検による組織学的評価が行われる。PSA は前立腺特異的物質であり、4 ng/mL 以上が異常値とされる。前立腺癌のスクリーニングには有用であるが、癌以外の良性疾患においても上昇することが知られており、とりわけ 4~10 ng/mL(グレーゾーン)ではその傾向が顕著である。また針生検においても癌の偽陰性率が 30 %に達するとされており⁷⁾、さらなる有用な検査法の出現が待たれている。

本研究では、我々の教室で作製されたアクネ菌に特異的なモノクローナル抗体(PAL 抗体)を用いて前立腺針生検検体に対する免疫染色を施行し、アクネ菌の局在を明らかにすることでアクネ菌感染と前立腺癌との関連を示すとともに、アクネ菌特異的モノクローナル抗体を用いた免疫染色が前立腺癌の診断に有用となり得るか検討することを目的とした。

(2) また、動物実験にてアクネ菌の接種により慢性炎症を誘導した報告が存在する⁸⁾。転写因子である NF- κ B の制御異常が炎症反応や細胞増殖に影響を与え、細胞の悪性化を引き起こすことが知られている。また NF- κ B により引き起こされる STAT3 の活性化もまた発癌に深く関わるとされる。しかし生体内においてアクネ菌の感染が前立腺癌の発生にどのように関わっているのかは詳細が不明である。そこで我々は、マウス前立腺におけるアクネ菌感染モデルを作製し、アクネ菌を起因とした発癌モデルの作製を目指すとともに、そのメカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 東京医科歯科大学医学部附属病院にて 1997 年から 2014 年に針生検を施行された検体のうち、初回生検が癌陰性であり再度施行された後に癌が認められた前立腺癌症例(PCa)44 例と、初回生検から 3 年以上癌が認められなかった非前立腺癌症例(Control)36 例、合計 80 例のホルマリン固定パラフィンブロック切片を用いた(図 1)。

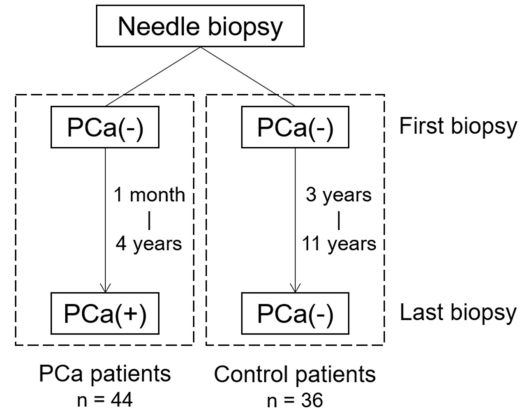


図 1 使用した検体

これらの症例について PAL 抗体を用いた免疫染色を行い、癌腺管を除く全腺管について PAL 抗体陽性像の有無を観察した。1 腺管あたり陽性像が 1 個以上観察されれば腺管陽性と判定し、陽性腺管数を総腺管数で除して陽性腺管率を算出した。また、間質の PAL 抗体陽性マクロファージ数を測定し検体コア数で除した。さらに慢性炎症の程度を 4 段階評価した。

(2) 12 週齢雄の C57BL/6N を吸引麻酔下にて経尿道カテーテル法を用いてアクネ菌ヒト前立腺分離株をマウス前立腺へ感染させた。感染 1、2、4、12 週後にそれぞれ 4 個体ずつ屠殺し前立腺組織をホルマリン固定した。Dorsolateral-Prostate を切り出しパラフィン包埋した後に 3 μ m 厚で薄切し、HE 染色および PAL 抗体または抗リン酸化 STAT3 抗体を用いた免疫染色を行った。光学顕微鏡下にてアクネ菌感染、炎症反応、STAT3 活性化それぞれの有無を観察した。

4. 研究成果

(1) アクネ菌陽性腺管およびアクネ菌陽性マクロファージの HE 染色像(図 2A,C)ならびに免疫染色像(図 2B,D)を示す。

アクネ菌陽性腺管率(図 3)は初回生検、最終生検ともに Control に比較して PCa の方が優位に高値であった(P 's < 0.001, Mann-Whitney U test)。対してアクネ菌陽性マクロファージ数(図 4)、血清 PSA 値(図 5)、慢性炎症の程度(図 6)は有意な差が認められなかった。また、アクネ菌陽性腺管率は初回生検と最終生検の間に有意な差が認められず

(Wilcoxon signed-rank test)、PCa 群では発癌以前もしくは偽陰性の段階より長期に渡り多量のアクネ菌が感染していると考えられる(図 3)。

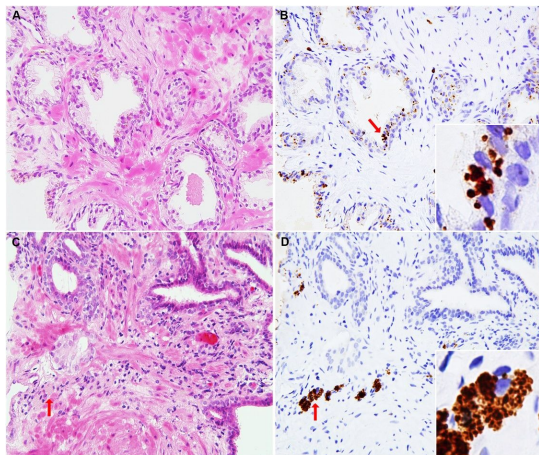


図 2 HE 染色および免疫染色像

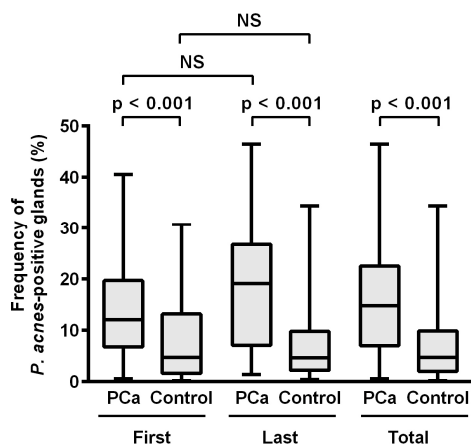


図 3 アクネ菌陽性腺管率

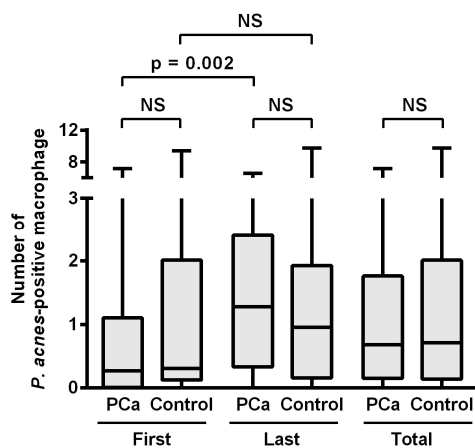


図 4 間質アクネ菌陽性マクロファージ数

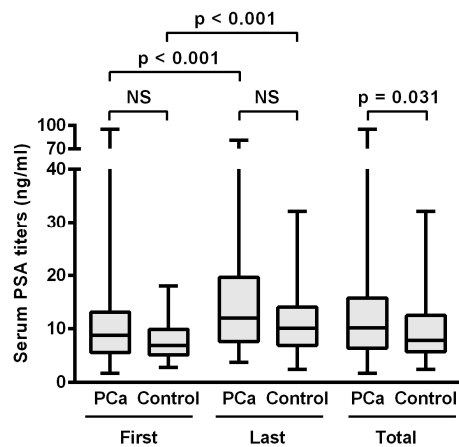


図 5 血清 PSA 値

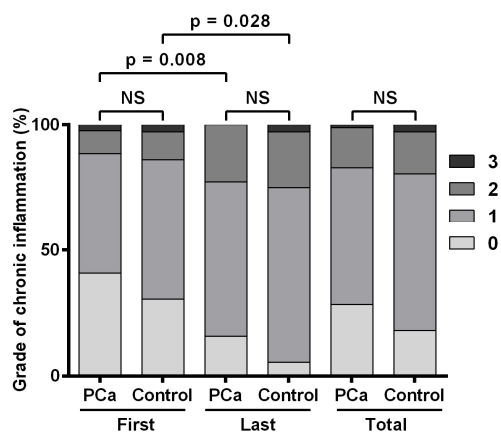


図 6 慢性炎症の程度

初回生検のアクネ菌陽性腺管率および血清 PSA 値を用いて ROC 曲線を描くとともに閾値を求めそれぞれの感度、特異度を算出した。AUC(Area Under the Curve)はアクネ菌陽性腺管率、血清 PSA 値それぞれ 0.722 と 0.605 であり、アクネ菌陽性腺管率は前立腺癌の検出法として優れていた。また感度と特異度については、アクネ菌陽性腺管率では 32%と 94%、血清 PSA 値では 57%と 69%であり、特に特異性に優れた方法である。さらに初回生検と最終生検を混合した場合においても同様の傾向が認められ、癌の検出の有無に関わらず用いることができる方法である。

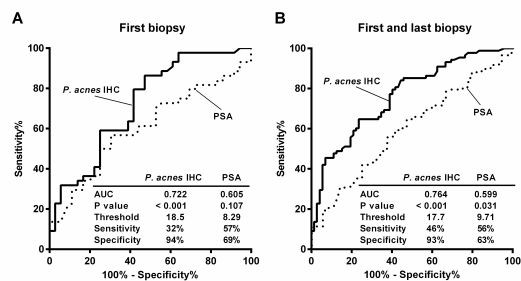


図 7 ROC 曲線

アクネ菌陽性腺管率、血清 PSA 値と同様に間質アクネ菌陽性マクロファージ数と慢性炎症の程度についても閾値を求めロジスティック回帰分析を行った。多変量解析において血清 PSA 値の初回生検および初回生検-最終生検混合の場合におけるオッズ比は、それぞれ 4.6(P = 0.006)と 2.3(P = 0.022)であった。一方アクネ菌陽性腺管率は 14.8(P = 0.003)と 13.9(P < 0.001)であり、独立した危険因子として高い値を示した。間質アクネ菌マクロファージ数と慢性炎症の程度においては有意な数値は得られなかった。

	Threshold	Univariate			Multivariate		
		OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
First biopsy							
Frequency of <i>P. acnes</i> -positive glands	18.5	7.9	1.7-37.8	0.009	14.8	2.5-86.4	0.003
Number of <i>P. acnes</i> -positive macrophage	0.36	0.8	0.4-2.1	NS	0.5	0.2-1.6	NS
Chronic inflammation grade	2	0.8	0.2-3.0	NS	0.3	0.1-2.0	NS
Serum PSA titer	8.29	3.0	1.2-7.6	0.021	4.6	1.5-13.8	0.006
Total of first and last biopsy							
Frequency of <i>P. acnes</i> -positive glands	17.7	11.2	4.1-30.3	< 0.001	13.9	4.8-40.3	< 0.001
Number of <i>P. acnes</i> -positive macrophage	0.15	1.5	0.7-3.0	NS	0.9	0.4-2.1	NS
Chronic inflammation grade	2	0.9	0.4-1.9	NS	0.4	0.2-1.2	NS
Serum PSA titer	9.71	2.1	1.1-4.0	0.023	2.3	1.1-4.8	0.022

OR, odds ratio; CI, confidence interval; NS, not significant

図 8 ロジスティック回帰分析

さらに日常病理診断への応用を考慮した簡易的な方法として、検体コア中のアクネ菌陽性腺管の有無のみを判定しアクネ菌陽性コア率を求め比較した。Control に比較して PCa は初回生検(P = 0.002)、最終生検(P < 0.001)とも有意な高値を示し、陽性腺管率の場合と同様の傾向を示した(図 9)。

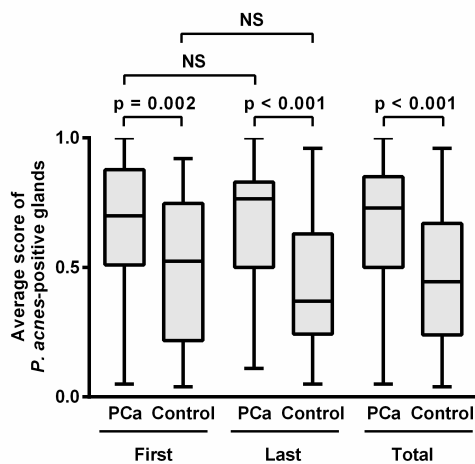


図 9 アクネ菌陽性コア率

これらの結果に関してアクネ菌陽性コア率の結果を用いてロジスティック回帰分析を行った。初回生検および初回生検-最終生検混合の場合におけるオッズ比はどちらも 14.2(P < 0.001)であり、陽性腺管率と同様に高い値を示した(図 10)。

	Threshold	Multivariate		
		OR	95%CI	P
First biopsy				
Average score of <i>P. acnes</i> -positive glands	0.46	14.2	3.5-58.5	< 0.001
Number of <i>P. acnes</i> -positive macrophage	0.36	0.5	0.2-1.6	NS
Chronic inflammation grade	2	0.7	0.1-3.8	NS
Serum PSA titer	8.29	5.8	1.7-19.9	0.005
Total of first and last biopsy				
Average score of <i>P. acnes</i> -positive glands	0.46	14.2	5.4-37.8	< 0.001
Number of <i>P. acnes</i> -positive macrophage	0.15	0.8	0.4-2.0	NS
Chronic inflammation grade	2	0.5	0.2-1.3	NS
Serum PSA titer	9.71	5.4	2.2-13.3	< 0.001

OR, odds ratio; CI, confidence interval; NS, not significant

図 10 アクネ菌陽性コア率を用いたロジスティック回帰分析

このアクネ菌陽性コア率の評価方法は陽性腺管率の評価に比べ簡易的である上に陽性腺管率の場合と同様の傾向が認められ、代用方法として有用である。そのためより多くの施設で用いることができ、前立腺癌の診断精度向上が期待される。

(2) マウス前立腺にアクネ菌を経尿道的に移入したところ、Dorsolateral-Prostate にてヒト前立腺で認められるような腺管上皮細胞内にアクネ菌の感染が認められた(図 11B)。また炎症反応(図 11A)および上皮細胞核内の STAT3 活性化(図 11C)が認められ、これらの局在はアクネ菌陽性腺管と腺管単位での局在が高率で一致していた。対照として陰性腺管を下に示す(図 11D-F)。

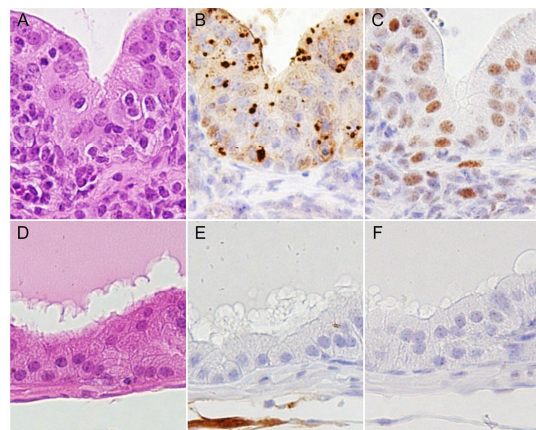


図 11 マウス組織染色像

これらの陽性所見は 1 週から 12 週まで全ての個体で認められている。STAT3 の活性化は癌化に深く関わっていることが知られており、さらなる長期的な感染実験にて発癌およびそのメカニズムの解明が期待される。

< 引用文献 >

- 1) Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*;61(2): 69
- 2) Grönberg H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet* 2003;361(9360):859-864.
- 3) De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007;7(4):256-269.
- 4) Vasto S, Carruba G, Candore G, et al. Inflammation and prostate cancer. *Future Oncol* 2008;4(5): 637-645.
- 5) Nickel JC, Downey J, Young I, et al. Asymptomatic inflammation and/or infection in benign prostatic hyperplasia. *BJU Int* 1999;84(9):976-981.

- 6) Yuan B, Takashi I, Tadatsune I, *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.)
- 7) Ian M. T, Donna PA, Chen C, *et al.* Assessing prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. J Natl Cancer Inst 2006;98(8):529-534
- 8) Shinohara DB, Vaghasia AM, Yu SH, Mak TN, Bruggemann H, *et al.* A mouse model of chronic prostatic inflammation using a human prostate cancer-derived isolate of *Propionibacterium acnes*. Prostate 2013;73: 1007–1015

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Tomoya Kakegawa, Yuan Bae, Takashi Ito, Keisuke Uchida, Masaki Sekine, Yutaka Nakajima, Asuka Furukawa, Yoshimi Suzuki, Jiro Kumagai, Takumi Akashi, Yoshinobu Eishi

Frequency of *Propionibacterium acnes* Infection in Prostate Glands with Negative Biopsy Results Is an Independent Risk Factor for Prostate Cancer in Patients with Increased Serum PSA Titers

PLOS ONE 査読有

2017

DOI:10.1371/journal.pone.0169984

January 12, 2017

〔学会発表〕(計 1 件)

掛川智也

「針生検を用いた前立腺癌診断における抗アクネ菌抗体免疫染色の有用性の検討」

第 80 回日本泌尿器科学会東部総会

平成 27 年 9 月 26 日

「京王プラザホテル(東京都新宿区)」

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

江石 義信 (EISHI, Yoshinobu)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科

人体病理学分野・教授

研究者番号: 70151959

研究者番号:

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

掛川 智也 (KAKEGAWA, Tomoya)

富井 翔平 (TOMII, Syohei)

小川 智永 (OGAWA, Tomohisa)

竹本 暁 (TAKEMOTO, Akira)

今田 安津子 (KONTA, Atsuko)