

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670196

研究課題名(和文) Super-SCIDマウスを用いたヒト前立腺肥大症モデルの確立と病態解析

研究課題名(英文) Establishment of human benign prostatic hyperplasia model in super-SCID mice and its pathological analysis

研究代表者

野村 大成 (Nomura, Taisei)

独立行政法人医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部・プロジェクトリーダー

研究者番号：90089871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：独自に開拓したヒト臓器・組織長期維持システム(Super-SCIDマウス)を用い、人体実験を避けて、基礎研究及び治療研究に資する世界初のヒト前立腺肥大症疾患モデルの確立を試みた。移植前、移植後の経時的変化(2、6、12カ月)では、H&E染色、p63、CK8、AR、PSA染色で、形態、機能はよく維持されており、さらに肥大症の経過がマウス血中ヒトPSAの測定により可能となった。市販医薬品Dutasterideの投与実験では、増殖能の抑制とアポトーシスの増加がみられた。以上より、患者由来ヒト前立腺肥大症モデルを確立できた。

研究成果の概要(英文)：Benign prostatic hyperplasia (BPH) is a very common disease over the age of 50. Since there is no suitable human model for BPH, however, we aimed to establish human model, using our super-SCID mouse system which can maintain human organs/tissues for long period. In this model, morphology and function of original BPH examined by H&E staining and immuno-histochemical staining (p63, CK8, AR, PSA, etc.) were well maintained in the biopsy tissues taken at 2, 6 and 12 month after BPH transplantation. In the mouse serum, furthermore, we can measure human PSA secreted from the xenograft by our micro-detection system. To evaluate this human BPH model, Dutasteride was given to SCID mouse with BPH xenograft. It suppressed BPH volume and cell proliferation (Ki 63), and enhanced apoptosis (TUNEL). Thus, our new human BPH-PDX model in Super-SCID mice is very useful and valuable for medical research and drug development.

研究分野：実験病理学

キーワード：ヒト前立腺肥大症 ヒト疾患移植モデル Super-SCIDマウス 病態解析 PSA 機能測定 ヒト前立腺肥大症PDX 抑制効果

1. 研究開始当初の背景

男性の平均寿命の延長とともに我が国においても前立腺肥大症に罹患する患者が欧米並みに増加してきている。しかし、ヒト前立腺肥大症の研究に用いられてきた正常前立腺由来のPrECやPrSC等の培養細胞、LNCaPやPC3等の前立腺癌細胞、あるいはラットやマウス等の動物は、あらゆる観点からヒト前立腺肥大症モデルとは言い難く、適切な前立腺肥大症モデルがない。研究代表者は、独自に開拓した正常ヒト組織の形態と機能を、生きたまま数年にわたり超重度複合免疫不全マウス (Super-SCID) に継代維持することができる専有のシステムを用い、ヒト前立腺肥大症組織を長期間維持することに世界で初めて成功した。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト前立腺肥大症疾患モデルを世界に先んじて完成させることにより、人体実験を避けて、基礎研究、病態及び治療研究に資する我が国発の新たなヒト前立腺肥大疾患モデルを確立することを目的とする。

(1) 前立腺肥大症患者より外科的に摘出されたヒト前立腺肥大組織を Super-SCID マウス皮下に移植し、形態学的観察や PSA 分泌等を指標にした前立腺機能の観察システム、即ち、ヒト前立腺肥大症 PDX (Patient-Derived Xenograft) モデルを樹立する。

(2) 移植した前立腺組織の大きさを毎週測定するとともに、1ヶ月後、2ヶ月後、6ヶ月後、12ヶ月後に麻酔下にてバイオプシーを行い、H&E 染色、免疫組織染色など組織学的な検討を行い、移植前立腺組織が、移植後も移植前患者組織の形態・機能をよく維持していることを証明する。

(3) 医薬品 (5 α -reductase inhibitor) で実証試験を行う。

(検討項目は上皮の増殖は Ki67 による免疫組織染色で、アポトーシスは TUNEL 染色や Cleaved caspase3 による免疫組織染色で行う。また、血管の評価は CD34 で免疫染色することにより行う。)

3. 研究の方法

(1) Super-SCID マウスは、従来の SCID マウス (T 細胞、B 細胞の機能欠如) を研究代表者が改良した LPS 無反応の C3H/HeJ/N0s-scid;LPS マウスを増産し、研究に用いる (2) 前立腺肥大患者で治療上前立腺肥大症組織の切除が不可欠な症例に対し、倫理委員会の承認の下、ホルミウムレーザー前立腺摘出術 (HoLEP) により得られた前立腺組織を滅菌済み保存液に入れ、大阪大学から医薬基盤研究所に移動する。約 5mm の大きさに細切し、高濃度抗生物質入り保存液の中で 15 分浸した後、麻酔下にて Super-SCID マウスの皮下に移植した (研究協力者、大阪大学医学系研究科・野々村祝夫)

(3) 移植した前立腺組織の大きさを毎週測定するとともに、1ヶ月後、2ヶ月後、6ヶ月後、12ヶ月後に麻酔下にてバイオプシーを行い、組織学的な検討を行う。検討項目は、腺管基底細胞を p63、内腔細胞を CK8、AD、PSA、等である。上皮の増殖は Ki67 による免疫組織染色で、アポトーシスは TUNEL 染色や Cleaved caspase3 による免疫組織染色で行う。また、血管の評価は SMA で免疫染色することにより行う。

(4) マウス血中のヒト PSA の定量も行う。ヒト前立腺組織移植マウス血中のヒト PSA の微量測定法を開発した。マウス末梢血 20 ~ 100 μ l を採取し測定する。

(5) 得られた結果を基に、移植ヒト前立腺肥大症組織の組織構造及び機能がヒト体内における状態を完璧に維持しているかを検討し、ヒト前立腺肥大症モデルとして完成させる。その成果を、新規の 5 還元酵素阻害剤 Dutasteride (0.5 mg/g 体重) を投与し実証を試みる。

4. 研究成果

前立腺肥大症は、我が国に於いて欧米並みに増加し、50歳を過ぎると男性の半数近くにみられる。本症は、QOLを著しく損ねる疾患であるにもかかわらず適切なヒト前立腺肥大症モデルがなく、対症療法に留まっている。研究代表者が開拓したヒト正常・がん組織長期維持Super-SCIDマウスシステムを用い、ヒト前立腺肥大症疾患モデルを世界に先んじて完成させることにより、ヒト前立腺肥大症疾患モデルを確立した。

(1) ホルミウムレーザー前立腺摘出術

(HoLEP) により得られた前立腺肥大症組織の約5mmの細切組織をSuper-SCIDマウスの皮下に移植し、移植前立腺組織の大きさを毎週測定するとともに、1ヶ月後、2ヶ月後、6ヶ月後、12ヶ月後に麻酔下にてバイオプシーを行い、腺管基底細胞をp63、内腔細胞をCK8、AR、PSAの免疫組織染色、また、血管の評価はSMAで免疫染色することにより行ったところ、移植前立腺肥大組織は徐々に大きくなり (Fig. 1)、H&E染色、腺管基底細胞をp63、内腔細胞をCK8、AR染色、PSA染色では、移植前立腺組織の形態と機能は移植前患者前立腺組織に比べよく維持されていた (Fig. 1、Fig. 2)。

Fig. 1. Suppressive Effect of 5 α -reductase inhibitor (Dutasteride) on the size of BPH tissues

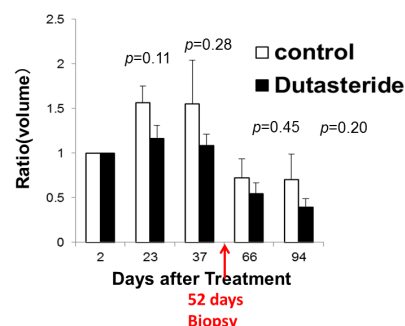
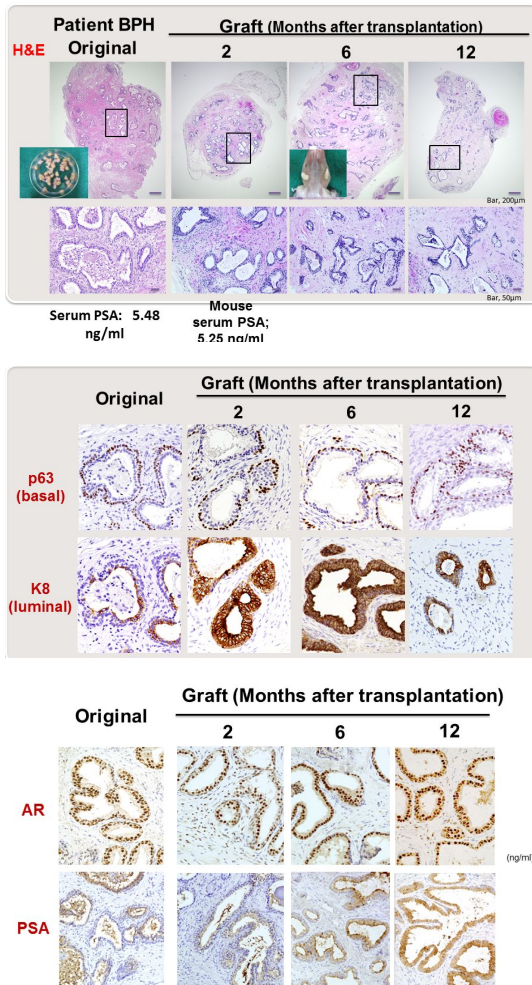
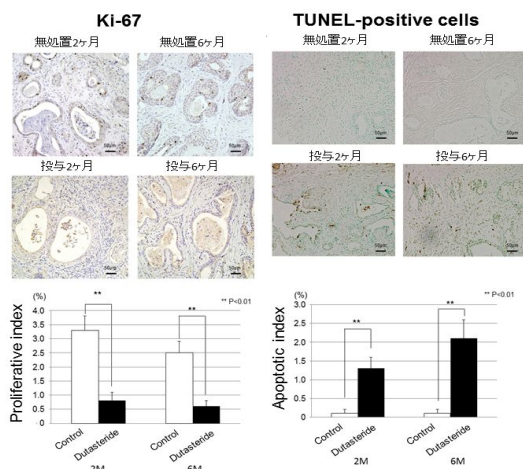


Fig. 2. Successful Maintenance of Human Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) in Super-SCID Mice



(2) ヒト前立腺組織移植マウス血中のヒト PSAの微量測定法を開発し、マウス血中PSAを検出したところ、移植2か月ではほぼ同じレベルであった。その後、徐々に減少した。
 (3) ヒト前立腺肥大組織移植SCIDマウスに市販医薬品Dutasterideの投与実験を行ったところ、移植組織の腫大の抑制 (Fig.1)と増殖能の抑制 (Ki-67) とアポトーシス(TUNEL)の増加がみられた (Fig.3)。

Fig. 3. Suppression of cell proliferation and enhancement of apoptosis



以上より、ヒト前立腺肥大組織そのものを用いたヒト前立腺肥大症の基礎研究、非臨床研究モデルを確立できた。その成果を国際会議 (米国 Orlando、6月22-24日) において、開会基調講演を行った。

<引用文献>

Taisei Nomura, Shigeki Adachi, Haruko Ryo, et al. Differential radiation sensitivity to morphological, functional and molecular changes of human thyroid tissues and bone marrow cells maintained in SCID mice. *Mutat Res.* 657(1): 68-76, 2008.

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5件)

Akira Tsujimura, Shinichiro Fukuhara, Tetsuji Soda, Kentaro Takezawa, Hiroshi Kiuchi, Tetsuya Takao, Yasushi Miyagawa, Norio Nonomura, Shigeki Adachi, Yoriko Tokita, Taisei Nomura. Histological Evaluation of Human Benign Prostatic Hyperplasia Treated by Dutasteride: A Study by Xenograft Model with Improved Severe Combined Immuno-deficient (Super-SCID) Mice. *Urology*, 2015, 85(1) 274e1274-e8. 査読有 doi:10.1016/j.urology.2014.09.24

Ayako Kumagai, Akira Fujita, Tomoki Yokoyama, Yuki Nonobe, Yasuhiro Hasaba, Tsutomu Sasaki, Yumi Itoh, Minako Koura, Osamu Suzuki, Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Arihiro Kohara Lokesh P. Tripathi, Masato Sanosaka, Toshiki Fukushima, Hiroyuki Takahashi, Kazuo Kitagawa, Yasuo Nagaoka, Hidehisa Kawahara, Kenji Mizuguchi, Taisei Nomura, Junichiro Matsuda, Toshihide Tabata and Hiroshi Takemori. Altered Actions of Memantine and NMDA-Induced Currents in a New *Grid2*-Deleted Mouse Line. *Genes*. 5 (4), 1095-1114, 2014 査読有 doi:10.3390/genes5041095

Otozai S, Ishikawa-Fujiwara T, Oda, S, Kamei Y, Ryo H, Sato A, Nomura T, Mitani H, Tsujimura T, Inohara H, and Todo T. *p53*-Dependent Suppression of Genome Instability in Germ Cells. *Mutat Res*, 760:24-32, 2014. 査読有 doi: 10.1016/j.mrfmmm.2013.12.004

Iwamori M, Iwamori Y, Iwamori M, Tanaka K, Adachi S, Aoki D, Nomura T. Absence of lactobacilli containing glycolipids with the α -galactose epitope and the enhanced fucosylation of a receptor glycolipid GA1 in the

digestive tracts of immune-deficient scid mice.
J. Biochem. 150:515-523, 2015. 査読有 doi:
10.1093/jb/mvv021

野村大成、足立成基、梁 治子、坂巻 靖、
鳥 正幸、吉留克英、野々村祝夫、古澤
佳也、鶴澤玲子。ヒトがん組織等移植 SCID
マウスを用いた重粒子線治療の有効性・
安全性の研究。放射線医学総合研究所重
粒子線がん治療装置等共同利用研究報告
書、26 : 56 - 58, 2015 査読無

〔学会発表〕(計 2 件)

Taisei Nomura, et al. Suppression of Mouse
and Human Cancer by AHCC. 22nd
ICNIM, July 27-28, 2014, Hotel Royton
Sapporo, Sapporo.

Nomura, T. Transgenerational Health
Effects of Radiation in Mice and Humans. XIII
Annual Congress “New Technologies in
Pediatrics and Children’s Surgery”
Symposium on “Mechanism of Radiation-
induced Health State in the Next Generations
after radiation exposure”Hotel “Cosmos” Oct.
21-23, 2014, Moscow, Russia.

岩森正男、足立成基、野村大成、田中京子、
青木大輔。乳酸菌の腸内共生と免疫の役割。
第 56 回日本脂質生化学会「ライフサイエ
ンスにおける脂質生化学研究」、2014 年 6 月
6-7 日、近畿大学東大阪キャンパス、東大阪
市。

〔図書〕(計 0 件) 該当なし

〔産業財産権〕 該当なし

〔その他〕 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 大成 (NOMURA, Taisei)
独立行政法人医薬基盤研究所・難病・疾患
資源研究部・プロジェクトリーダー
研究者番号： 9 0 0 8 9 8 7 1

(2) 研究分担者

梁 治子 (RYO, Haruko)
独立行政法人医薬基盤研究所・難病・疾患
資源研究部・サブプロジェクトリーダー
研究者番号： 9 0 3 0 1 2 6 7

足立 成基 (ADACHI, Shigeki)
独立行政法人医薬基盤研究所・難病・疾患
資源研究部・特任研究員
研究者番号： 6 0 3 7 9 2 6 1

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

野々村 祝夫 (NONOMURA, Norio)