

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11059

研究課題名(和文) 間質性膀胱炎における膀胱上皮再生のマスター転写因子の同定

研究課題名(英文) Identification of urothelial master transcription factors diminished in interstitial cystitis

研究代表者

山西 友典 (Yamanishi, Tomonori)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：90220425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：上皮間葉転換を起こした膀胱癌細胞株と、上皮の性質を有する膀胱癌細胞株のマイクロアレイ解析により、上皮特異的に高発現する転写因子候補を82種類挙げた。ハンナ型(23症例)、非ハンナ型(11症例)の間質性膀胱炎患者生検で発現量を定量したところ、主成分分析で5群に分類された。このうち主成分2と4がハンナ型と非ハンナ型を分離していたため、正常組織からの逸脱を示唆する因子群として同定した。これらの群には既知の膀胱上皮前駆細胞マーカーおよびリプログラミング能を有するパイオニア因子が複数含まれていた。現在これらの因子の強制発現ベクターを作成し、機能実験を実施中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難病指定された間質性膀胱炎は原因不明で根治手段がない。ハンナ型・非ハンナ型に分類される2つの病型についても、簡便な診断マーカーが存在しない。我々は特定の転写因子群がハンナ型・非ハンナ型の患者生検で発現量が異なることを発見した。この意義は、2つの病型の診断マーカーが得られたことに留まらない。転写因子を特定の組み合わせで強制発現すると、細胞の運命を転換させる現象が知られている(例：iPS細胞)。今回同定した転写因子を複数組み合わせ、膀胱上皮の前駆細胞を人工的に作成する技術開発に取り組んでいる。これが成功すれば、前駆細胞を移植するかもしくは遺伝子治療によって、間質性膀胱炎を根治できると期待する。

研究成果の概要(英文)：To comprehensively grasp the transcription factors (TFs) highly expressed in urothelial cells, we compared expression profiles between epithelial type and mesenchymal type bladder cancer cell lines by microarray. 82 TFs were newly discovered which had super enhancers in their genomic loci. We measured the expression level of each TF in bladder specimens from Hunner-type (23 cases) and non-Hunner-type (11 cases) interstitial cystitis (IC) patients. Principal component analysis (PCA) classified the 81 TFs into five groups. Notably, specimens from Hunner's and non-Hunner's types were clearly segregated among PC2-4 plane, suggesting that TFs of PC2 and 4 are deregulated in IC patients. Those PCs included the known progenitor markers and pioneer TFs which are critical for direct reprogramming. Subsequently we constructed expression vector of those TFs and are performing gain-of-function experiments.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：間質性膀胱炎 マスター転写因子 ハンナ型・非ハンナ型 主成分分析 パイオニア因子 リプログラミング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難病指定された間質性膀胱炎は原因不明で根治手段もない。内視鏡所見から診断されるハンナ型・非ハンナ型の2種類の病型があることが知られているが、同一の疾患と定義すべきかも定かではなかった。我々は間質性膀胱炎の本体が上皮前駆細胞の枯渇による組織修復異常にあるという作業仮説を立て、患者膀胱生検においてそれを支持するデータを得た。次のゴールは、細胞移植もしくは遺伝子導入によって枯渇した前駆細胞を補填することで、治療介入の可能性を開くことにあった。iPS細胞に代表されるように、マスター転写因子と呼ばれる制御タンパクは複数組み合わせることで、細胞の運命を転換することができる。膀胱上皮前駆細胞を分化転換で作成するためには、膀胱上皮に特異的に発現するマスター転写因子のリストが必要である。我々は独自に開発した *in vitro* スクリーニング系を用いて、膀胱上皮マスター転写因子の小規模スクリーニングを開始していた。

2. 研究の目的

間質性膀胱炎の根治を目指して、膀胱上皮前駆細胞に分化転換するマスター転写因子の候補リストを同定すること。

3. 研究の方法

膀胱上皮マスター転写因子の *in vitro* スクリーニングを *microarray* で網羅的に拡大し、82の候補因子を挙げた。間質性膀胱炎患者のパンチ生検から *total RNA* を抽出し、82の候補因子の遺伝子発現を定量 *RT-PCR* で測定した。ハンナ型と非ハンナ型についてそれぞれ23症例、11症例、1症例につき3箇所が生検を採取したので、合計102検体の発現プロファイルが得られた。既知のマーカー遺伝子の発現と併せて主成分分析を行ったところ、固有値のスクリープロットから5つの変数群に分類された。次に14種類の候補転写因子の発現ベクターを作成し、上皮間葉転換を起こした膀胱癌細胞株(BOY-12EとJMSU-1)に強制発現した。比較対象としてEカドヘリンを合成する上皮型の細胞株(5637とHuB-6、HuB-15)を使用し、間葉型細胞株の発現が上皮型に近づく度合いを定量 *RT-PCR* で測定した(間葉上皮転換)。

4. 研究成果

(1) 間質性膀胱炎生検の候補転写因子発現プロファイルを用いて主成分分析を実施した。主成分2および4から構成される合成変数空間では、ハンナ型23症例と非ハンナ型11症例が分離できた(図1)。

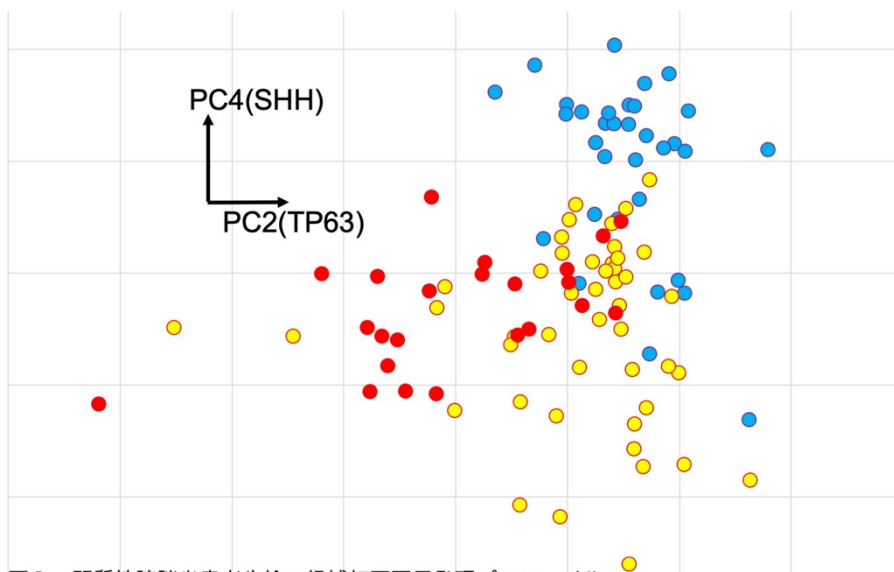


図1：間質性膀胱炎患者生検の候補転写因子発現プロファイル
主成分軸2と4が構成する変数空間でハンナ型・非ハンナ型の生検プロファイルが分離されている。
水色：非ハンナ型症例(正常粘膜)、黄色：ハンナ型症例の潰瘍部、赤：ハンナ型症例の正常粘膜

主成分2および4には、既知の前駆細胞マーカーTP63およびSHHがそれぞれ含まれていた。またFOXA1やKLF4/5、GRHL1/2/3、TFAP2A/Cのように、ヌクレオソーム構造に結合してクロマチンを開放するパイオニア因子も複数含まれていた。そこでこれらの14因子を膀胱上皮のマスター転写因子最終候補として設定し、強制発現による機能実験を実施した。

(2) 上皮間葉転換を示す膀胱癌細胞株(M type)に候補転写因子を単独あるいは組み合わせで強制発現し、既知のマーカー遺伝子に及ぼす影響を定量した。比較対象として上皮型細胞株を使用した(E type)。Eカドヘリン、ウロプラキシン1A/3Aおよびサイトケラチン14/20の発現はM typeで発現低下していたが、強制発現によって回復した(図2)。回復の度合いは使用細胞やマーカーによって異なり、前駆細胞マーカーのSHHは特定の因子にしか反応しなかった(図2)。

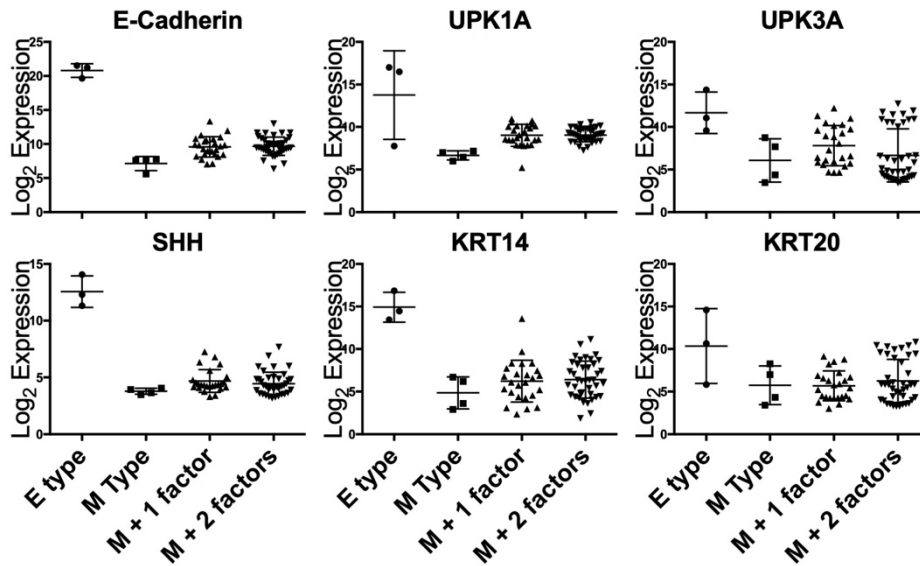


図2：候補転写因子の強制発現が既知の膀胱上皮マーカーに及ぼす影響
 上皮間葉転換を示す膀胱癌細胞株(M type)に、候補転写因子を単独あるいは組み合わせで強制発現した。

(3) 同様の実験系を活用して、候補因子が転写カスケードに及ぼす影響を定量した。間質性膀胱炎プロファイルで主成分1、3および5に属する因子の発現量を図3に示す。強制発現によって概ね発現回復を示す因子(BATF、CEBPA、ELF3、FOXQ1、HEY1、ONECUT2、SP6、SOX4、ZBTB7C)、細胞株によって反応が異なる因子(BCL11B、FOXC1)、M type で発現が大きく異なるが、強制発現によって発現が収斂する因子(FOXL1、PBX1、SNAI2)、発現が更に低下し E type から遠ざかる因子(ID1、IRF5)、特定の候補を除き殆ど反応を示さない因子(MAF、TBX3)に分類された。

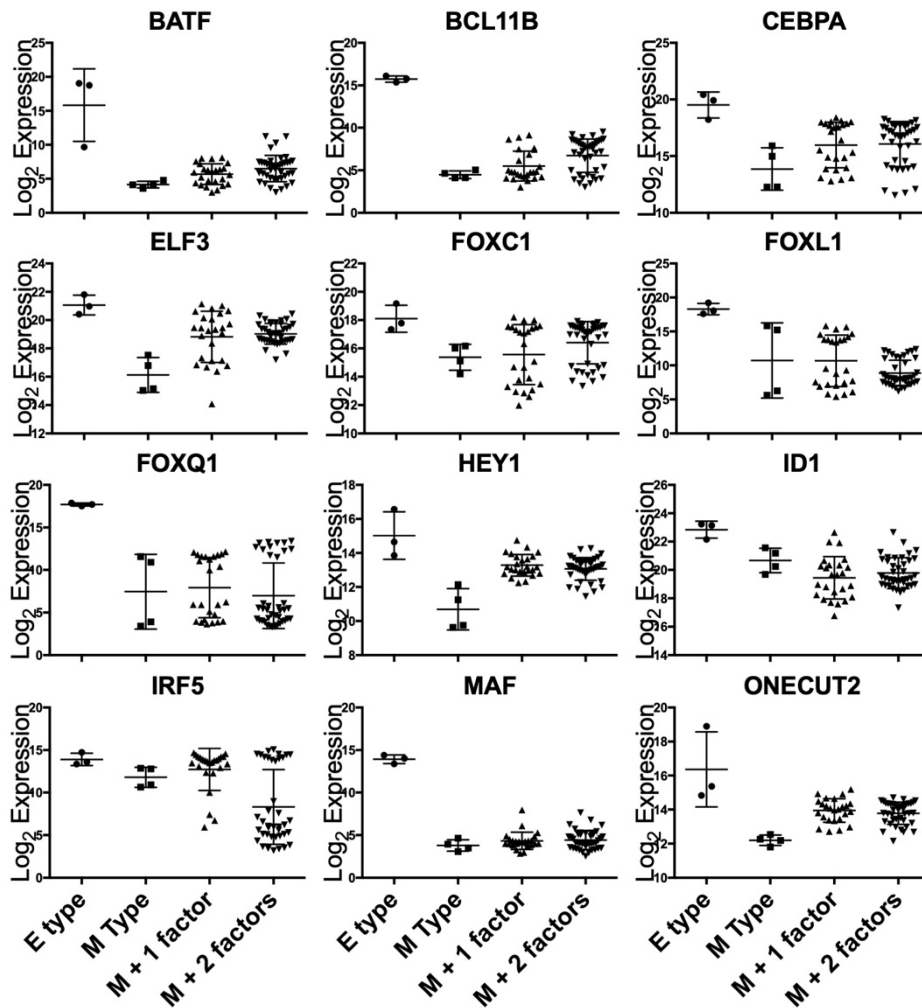


図3：候補転写因子の強制発現が他の転写因子カスケードに及ぼす影響
 上皮間葉転換を示す膀胱癌細胞株(M type)に、候補転写因子を単独あるいは組み合わせで強制発現した。

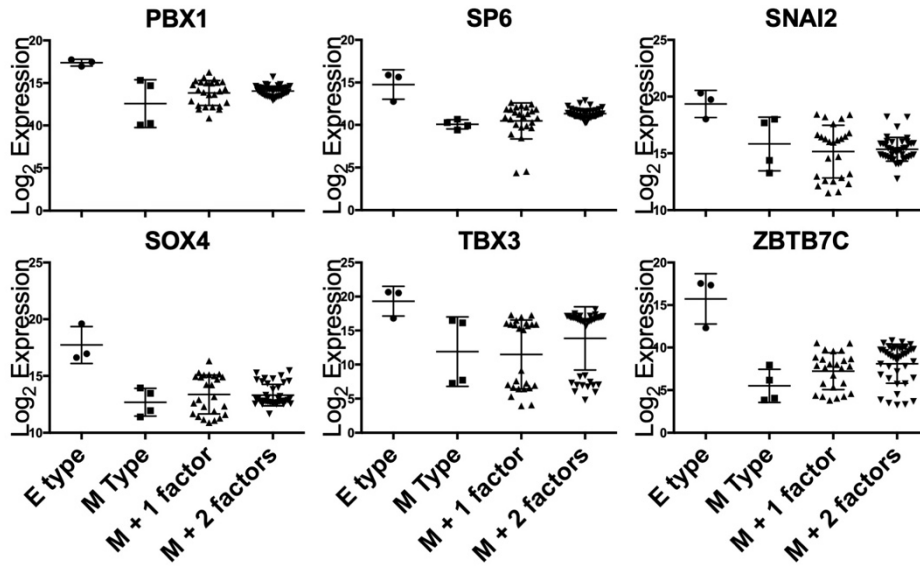


図3(続き)：候補転写因子の強制発現が他の転写因子カスケードに及ぼす影響

上皮間葉転換を示す膀胱癌細胞株(M type)に、候補転写因子を単独あるいは組み合わせで強制発現した。

5. 考察

膀胱上皮で高発現するマスター転写因子の候補を 14 種類同定した。これらの因子を上皮間葉型転換を起こした膀胱癌細胞株に強制発現することで、膀胱上皮マーカーの発現上昇を示した。今後これらの因子を分化系譜が異なる線維芽細胞で強制発現することで、膀胱上皮前駆細胞にリプログラミングする度合いを定量する。マスター転写因子の最適の組み合わせを決定することによって、*in vitro* で伸展可能な移行上皮の作成が可能となることを期待している。

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 Kanya Kaga, Ken-ichi Inoue, Mayuko Kaga, Tomohiko Ichikawa, Tomonori Yamanishi	4. 巻 24
2. 論文標題 Expression profile of urothelial transcription factors in bladder biopsies with interstitial cystitis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 632-638
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iju.13391	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 Tomonori Yamanishi	4. 巻 2019
2. 論文標題 Identification of master transcription factor for bladder epithelial regeneration in interstitial cystitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 38-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.21820/23987073.2019.7.38	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 加賀勸家、井上健一、加賀麻祐子、布施美樹、石塚満、山西友典
2. 発表標題 ハンナ型と非ハンナ型間質性膀胱炎の分子生物学的相違
3. 学会等名 第18回日本間質性膀胱炎研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanya Kaga, Ken-ichi Inoue, Mayuko Kaga, Miki Fuse, Tomonori Yamanishi
2. 発表標題 Expression profile of urothelial transcription factors in bladder biopsies with interstitial cystitis
3. 学会等名 International Continence Society 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井上健一, 山西友典, 加賀勸家, 井上晃男, 吉田謙一郎
2. 発表標題 膀胱移行上皮マスター転写因子のスクリーニング
3. 学会等名 第16回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017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	加賀 勸家 (Kaga Kanya) (80584812)	獨協医科大学・医学部・助教 (32203)	
研究 分担者	井上 健一 (Inoue Kenichi) (90587974)	獨協医科大学・医学部・准教授 (32203)	