

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09199

研究課題名(和文) 間質性膀胱炎に対する骨髄幹細胞移植による革新的治療法の開発

研究課題名(英文) Intravenous infusion of mesenchymal stem cells alleviates interstitial cystitis/bladder pain syndrome in a Toll-like receptor-7 agonist-induced rat model

研究代表者

田端 秀敏 (Tabata, Hidetoshi)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：40810586

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)：ハンナ型間質性膀胱炎を想定したToll-like receptor7 (TLR7)刺激ラットモデルを作製した。TLR7刺激薬 (Loxisolivin; LX) を膀胱内注入した24時間後に骨髄幹細胞もしくは細胞なしの培養液をラットに経静脈的に投与した。投与3日後に間質性膀胱炎症状(疼痛行動、排尿行動)と病理組織学的に炎症所見を評価した。骨髄幹細胞投与群は培養液投与群と比較して、疼痛、排尿回数、1回排尿量の悪化が抑制された。また、浮腫、出血、好中球浸潤などの炎症所見の悪化も有意に抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間質性膀胱炎に対する治療には、膀胱水圧拡張術や膀胱内薬物注入療法があるが、効果は一時的であり、しばしば治療に難渋する。本研究では、TLR7刺激ラット膀胱炎モデルに対して間葉系骨髄幹細胞を移植し、生理行動学的・病理組織学的に効果を確認することができた。本研究結果より骨髄幹細胞移植は間質性膀胱炎に対する新規治療となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Loxoribine (LX), a TLR7 agonist, was instilled transurethrally into the bladders of female Sprague-Dawley rats. Then, intravenous infusion of MSCs or vehicle was conducted. Freezing behavior, voiding behaviors, and histological changes in the bladder were investigated. Quantitative real-time polymerase chain reaction was performed to analyze the mRNA expression levels of inflammatory cytokines. Green fluorescent protein (GFP)-positive MSCs were used for cell tracking. Freezing behavior was reduced in the MSC group, and voiding behaviors in the MSC group did not deteriorate. Hematoxylin-eosin staining showed that mucosal edema, leukocyte infiltration, and hemorrhage were suppressed in the MSC group. The relative expression of interferon- β -mRNA in the bladder of the MSC group was inhibited. Numerous GFP-positive MSCs were extensively distributed, mainly in the submucosal and mucosal layers of the inflammatory bladder wall.

研究分野：排尿障害

キーワード：間質性膀胱炎 骨髄幹細胞 移植 Toll like receptor

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間質性膀胱炎 (interstitial cystitis: IC) は頻尿、尿意亢進/切迫感、膀胱痛/骨盤痛などの症状を呈する難治性下部尿路疾患である。いまだに病態機序が不明であり、有効な治療法がない。IC の2つのサブタイプのうち、「ハンナ病変」を認めるハンナ型 IC (Hunner type IC: HIC) は泌尿器科領域で唯一の難病指定疾患である。IC は QOL を著しく損なう疾患であり、病状が進行した場合は、症状緩和を目的に尿路変更術を要することもある。そこで、IC の病態機序の解明、および有効な治療法の開発が現在課題とされている。

2. 研究の目的

近年、HIC の病態機序として膀胱組織内で炎症が惹起・慢性化する免疫学的異常の関与が示唆されている。我々は、自然免疫機構の1つである、Toll like receptor (TLR) のうち、TLR7 と IC の関連性に着目し、HIC 患者の膀胱粘膜組織において TLR7 の発現が亢進していることを確認した。さらに、実験動物の膀胱内で TLR7 を活性化させると組織学的炎症や膀胱痛様行動が惹起され、排尿行動においては排尿回数増加・1回排尿量の低下を呈することを明らかにした (Ichihara et al., 2017)。

一方、我々はこれまでに種々の疾患動物モデルに対して骨髄幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) の頸静脈的投与を行い、治療効果が得られることを報告してきた。TLR7 刺激膀胱炎誘発モデルに対して MSC 移植を行い、IC 様症状が改善することを示すことにより、IC に対する MSC による治療メカニズムを解明し、新しい治療法を確立することを、本研究の目的とした。

3. 研究の方法

- (1) TLR7 刺激ラット膀胱炎モデルの作製
8 週齢の雌性 SD ラットに対して麻酔下に経尿道的に TLR7 選択的的刺激薬 (Loxoribine: LX) を 60 分間注入して HIC モデルを作製する。
- (2) MSC 投与
LX 膀胱内注入 24 時間後に MSC 投与群に MSC (1.0×10^6 個) を、対照群に細胞なしの培養液 (DMEM) を経静脈的に投与する。
- (3) 生理行動学的評価
MSC 投与 3 日後に、24 時間排尿行動記録法による排尿回数、1 回排尿量の測定を行う。ラット膀胱痛様行動の指標である Freezing 行動回数の測定をする。
- (4) 病理組織学的評価
MSC 投与 3 日後に、HE 染色で浮腫、うっ血、炎症細胞浸潤などの炎症所見の変化を観察・スコアリングし、MSC 治療群と対照群との比較解析を行う。
- (5) TLR7 経路の RT-PCR
MSC 投与 3 日後に、膀胱を摘出する。TLR7 に関わるサイトカインの mRNA 発現を RT-PCR で確認し、MSC の作用機序を解析、検討する。
- (6) 投与した MSC の膀胱内における検出
GFP 発現トランスジェニックラットから採取した MSC (GFP-MSC) を経静脈投与し、24 時間後に膀胱を摘出する。GFP 免疫染色を加えて MSC を評価する。蛍光顕微鏡により、膀胱内における GFP-MSC を検出する。

4. 研究成果

MSC 投与群は、対照群に比較して優位に Freezing 行動回数、排尿回数、1 回排尿量の悪化を抑制した(fig1)。HE 染色では、浮腫、うっ血、炎症細胞浸潤などの炎症所見が、MSC 群で有意に軽度であった(fig2,3)。MSC 群と対照群で TLR7 の発現に有意差は認めなかったが、IFN- γ の発現は MSC 群で有意に低かった(fig4)。これまでの報告から MSC から分泌された TGF- β が MyD88 や IRF7 に作用し、IFN- γ の発現抑制に関わったと考えられた (fig5)。また、膀胱の粘膜層、粘膜下層で主に MSC の homing が確認された(fig6)。TLR7 刺激ラット膀胱炎モデルに対する MSC 投与が膀胱炎症状の抑制に寄与することが確認され、MSC 投与が間質性膀胱炎に対する新規治療となり得ることが示唆された。

Fig1

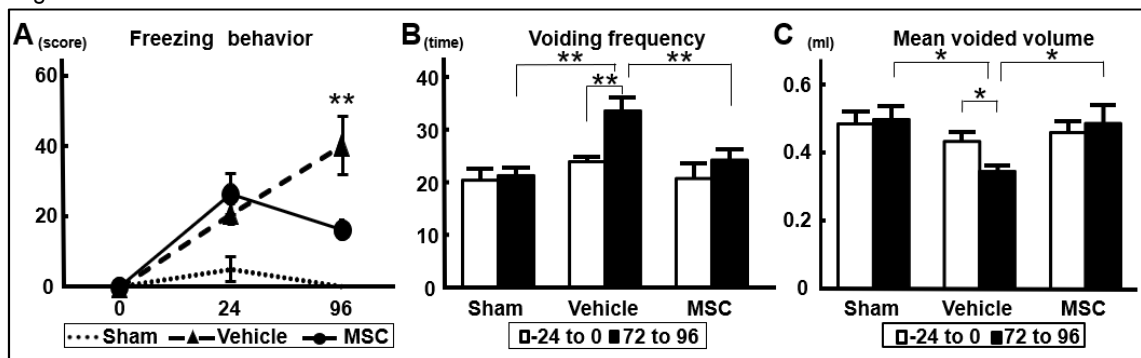


Fig1 (A) Freezing 行動、(B) 1 日排尿回数、(C) 平均 1 回排尿量 *p<0.05、**p<0.01

Fig2

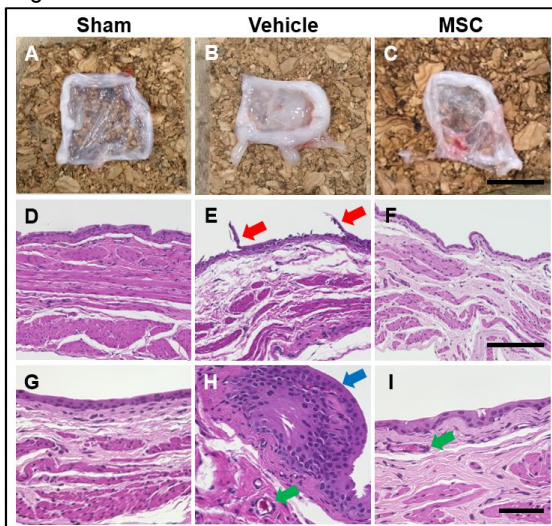


Fig2 MSC 投与 3 日後の病理組織学的所見
 赤：粘膜剥離、青：炎症細胞浸潤、緑：出血
 Scale bars= 1cm(A-C)、150 μ m(D-F)、50 μ m(G-I)

Fig3

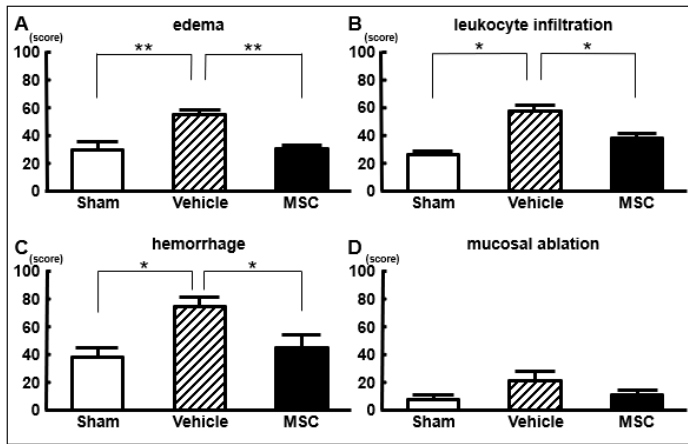


Fig3 病理組織学的所見のスコアリング

(A) 浮腫、(B) 白血球浸潤、(C) 出血、(D) 粘膜剥離 *p<0.05、**p<0.01

Fig4

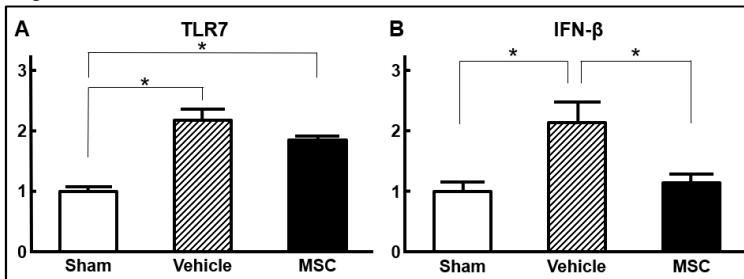


Fig4 MSC 投与 3 日後の mRNA の発現 (A) TLR7、(B) IFN-β *p<0.05

Fig5

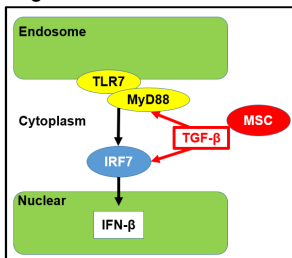


Fig5 MSC が IFN-β の発現抑制に関わる作用機序の仮説

Fig6

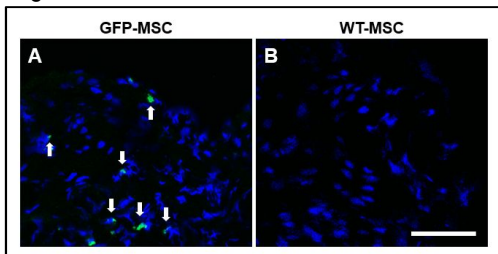


Fig6 投与した GFP-MSC の膀胱内における検出 (A) GFP-MSC、(B) MSC of wild type rats
Scale bar= 50 μm

Ichihara K, Aizawa N, Akiyama Y, Kamei J, Masumori N, Andersson KE, Homma Y, Igawa Y (2017) Toll-like receptor 7 is overexpressed in the bladder of Hunner-type interstitial cystitis, and its activation in the mouse bladder can induce cystitis and bladder pain. *Pain* 158:1538-1545.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田端秀敏
2. 発表標題 Toll-like receptor 7 刺激によるラット間質性膀胱炎モデルの開発
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020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	舂森 直哉 (MASUMORI Naoya) (20295356)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	佐々木 祐典 (SASAKI Masanori) (20538136)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	
研究分担者	本望 修 (HONMOU Osamu) (90285007)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	

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