

令和 5 年 4 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18596

研究課題名（和文）間質性膀胱炎の分子生物学的観点からの病態解明

研究課題名（英文）Master transcription factors in interstitial cystitis

研究代表者

加賀 勘家（Kanya, Kaga）

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：80584812

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、原因が分かっていない間質性膀胱炎の発症に関わる尿路上皮内のマスター転写因子を同定することを目的としています。マスター転写因子とは、さまざまな遺伝子の発現を直接制御する転写因子の中でも中心的な役割を担うとされています。本研究では、間質性膀胱炎の発現に転写因子のKRT20、BATF、TP63が関与することが分かり、これらがマスター転写因子の候補になることを示しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間質性膀胱炎はいまだに原因が特定されていない病気で、そのため根治治療もなく、本邦においては指定難病とされています。

本研究ではその原因を解明するべく、分子生物学的観点から評価しました。その結果、KRT20、BATF、TP63が間質性膀胱炎の発症に関与している可能性が示唆されました。

間質性膀胱炎の遺伝子レベルでの発症メカニズムが解明できれば、遺伝子治療や再生医療など新たな治療選択肢の創出が可能になると考えます。

研究成果の概要（英文）：This study aims to identify master transcription factors in the urinary epithelium that are involved in the pathogenesis of interstitial cystitis, the cause of which is not known. Master transcription factors are considered to play a central role among transcription factors that directly regulate the expression of various genes. In this study, the transcription factors KRT20, BATF, and TP63 were found to be involved in the development of interstitial cystitis, indicating that these are candidates for master transcription factors.

研究分野：Urology

キーワード：間質性膀胱炎 膀胱痛症候群 マスター転写因子 KRT20 BATF TP63 定量RT-PCR 機械学習

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、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

間質性膀胱炎は膀胱痛を主症状とした疾患であり、診断基準は膀胱内視鏡検査におけるハンナ病変の有無や膀胱水圧拡張後の点状出血の有無にあります(2019年に間質性膀胱炎・膀胱痛症候群診療ガイドラインの改訂により、ハンナ病変の有無でハンナ型間質性膀胱炎と膀胱痛症候群に区別することになりました)。診断は専ら肉眼で確認できる臨床所見に依存しており、実臨床で使用できる客観的指標は乏しいのが現状です。したがって、疾患概念自体も研究開始当初は現在よりも不明瞭であり、原因も定かではなく、根治治療は今日まで確立されていません。そのため、本邦の指定難病となっています。

### 2. 研究の目的

本研究では、間質性膀胱炎の発症メカニズムを解明することを目的としました。

本研究開始時点で、間質性膀胱炎をマイクロアレイなどの網羅的手法でプロファイルしようとする先行研究はすでに存在していました。ところが、このようなアプローチでは炎症性細胞由来の遺伝子変化などが前面に出てしまうため、間質性膀胱炎により発生した尿路上皮の異常が読み取れないという欠点がありました。また、間質性膀胱炎を一種の自己免疫疾患と捉え、原因となるメカニズムを探索する試みもなされていました。しかしながら、そもそも炎症・尿路上皮機能不全・組織傷害・炎症という負のサイクルがどこから始まるのか、慢性炎症が収束しない理由はどこにあるのか、議論の決着はいまだ付いていません。

研究代表者の所属グループは尿路上皮に発現する転写因子をスクリーニングし、proof-of-conceptとして間質性膀胱炎生検組織での発現を定量した実績があります(Kaga, et al. Int. J. Urol., 2017)。そこで、このアプローチを用いて、間質性膀胱炎の発症に強く関与する転写因子(マスター転写因子)を同定し、間質性膀胱炎の発症メカニズムを解明しようと考えました。

### 3. 研究の方法

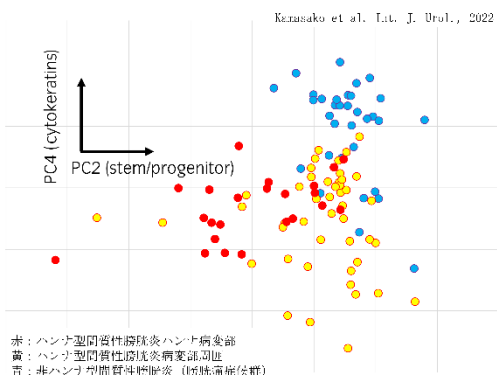
まず始めにマスター転写因子とは、さまざまな遺伝子の発現を直接制御する転写因子の中でも中心的な役割を担うとされています。マスター転写因子は該当臓器で高発現していることが分かっているため、RT-PCRを用いて間質性膀胱炎組織で高発現する転写因子を同定することが、この難病の原因を解明するための重要な一歩になると考えました。

そこで、間質性膀胱炎患者の膀胱生検を行い、その生検組織に発現する転写因子をRT-PCRで定量します。そして、統計学的解析から間質性膀胱炎の発症に関わるマスター転写因子を同定するという研究計画を立てました。

次いで、同定したマスター転写因子の中で、特に間質性膀胱炎の発症に関わっているものを見つけるため、実験動物を用いた機能阻害実験を計画しました。具体的には、レンチウイルスベクターを用いたRNA干渉法により、転写因子ノックダウンを実施します。そして、そのウイルスを実験動物の膀胱内に感染させ、間質性膀胱炎のような慢性炎症が惹起されるかを組織学的に観察するという方法です。

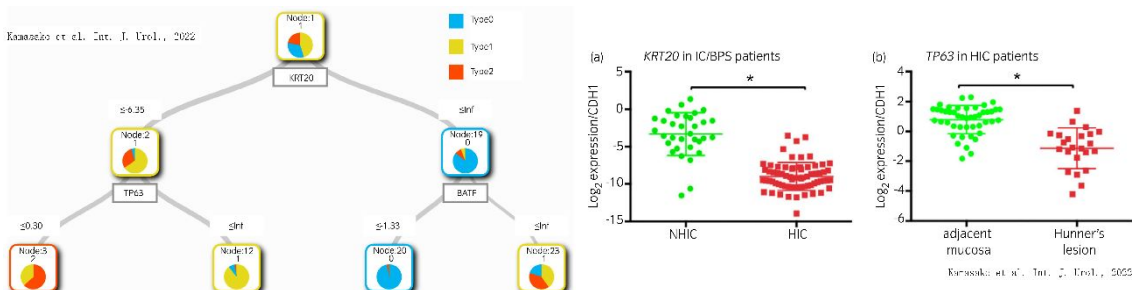
### 4. 研究成果

本研究では、間質性膀胱炎患者(膀胱痛症候群患者も一部含まれる)34例102検体を採取しました。その生検組織を定量RT-PCRを用いてさまざまな転写因子の発現を定量しました。その結果を用いて主成分分析を行い、次元削減により得られた第2軸には尿路上皮幹細胞・前駆細胞特異的な転写因子(例えば、TP63は尿路上皮幹細胞のマーカー、FOXA1は膀胱発生に関わる前駆細胞マーカー)、第4軸には尿路上皮内の局在と関連すると考えられる転写因子(例えば、KRTは基底細胞のマーカー、UPKは尿路上皮のマーカー)が含まれていました。この第2軸と第4軸を用いて間質性膀胱炎の病型分類を試みました。

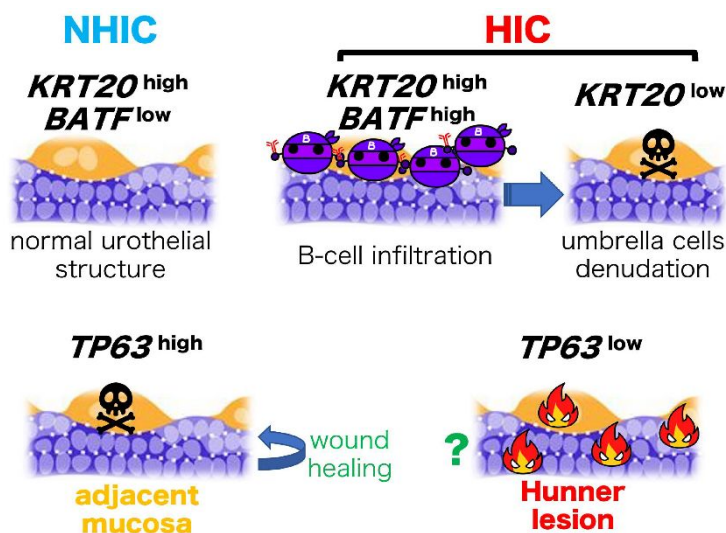


次いで、教師付き機械学習の決定木を用いて、KRT20、BATF、TP63がハンナ型間質性膀胱炎のハンナ病変部とその周辺部、非ハンナ型間質性膀胱炎(膀胱痛症候群)を分類する重要な転写因

子であることが推察されました。



本研究で KRT20 高発現、BATF 低発現であった非ハンナ型間質性膀胱炎（膀胱痛症候群）は、最新の知見では病理組織学的に正常な尿路上皮と同様であると報告されています。それと比較し、ハンナ型間質性膀胱炎では B 細胞と関連した BATF が病変部で高発現していたことは、病変部に B 細胞系優位の組織浸潤が認められたという他の研究グループからの報告と一致すると考えます。また、KRT20 は尿路上皮の上層に存在しており、病変部で KRT20 が低発現であったことは、病変部の尿路上皮が脱落しているという報告と合致していると考えます。さらに、TP63 は尿路上皮の幹細胞マーカーであり、脱落した尿路上皮の再生に関与して病変部周囲の一見尿路上皮が正常に見える部位に高発現したものと考えました。



Kamasako et al. Int. J. Urol., 2022

以上より、今回の研究成果は、ハンナ型間質性膀胱炎と非ハンナ型間質性膀胱炎（膀胱痛症候群）を単に分類できるというだけでなく、これまで曖昧だった間質性膀胱炎/膀胱痛症候群の疾患定義における病因の統一概念となる可能性があるという意味を持つと考えます。

この研究成果は英文誌 International Journal of Urology に投稿し掲載されました (Kamasako, et al. Int. J. Urol., 2022)。

当初順調に進捗していましたが、コロナ禍の影響で間質性膀胱炎患者の募集と手術の実施に難航するようになり、当初計画していた実験動物を用いた機能阻害実験は本研究期間中に実施できませんでした。

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 Kamasako Tomohiko, Kaga Kanya, Inoue Ken ichi, Hariyama Masanori, Yamanishi Tomonori	4. 巻 29
2. 論文標題 Supervised machine learning algorithm identified<i>KRT20</i>,<i>BATF</i>and<i>TP63</i>as biologically relevant biomarkers for bladder biopsy specimens from interstitial cystitis/bladder pain syndrome patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 406 - 412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iju.14795	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 0件）

1. 発表者名 鎌迫智彦、井上健一、張山昌論、加賀勘家、加賀麻祐子、布施美樹、石塚満、山西友典
2. 発表標題 教師付き機械学習アルゴリズムによる間質性膀胱炎/膀胱痛症候群患者の膀胱生検組織の新規バイオマーカーの同定
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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