

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09377

研究課題名(和文)ダイレクト・リプログラミングによる間質性膀胱炎のin vivo再生治療

研究課題名(英文)In vivo regenerative treatment of interstitial cystitis by direct reprogramming

研究代表者

井上 裕太 (Inoue, Yuta)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20898499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々の研究チームはFOXA1, TP63, L-MYC, KLF4を導入することでヒト皮膚線維芽細胞から尿路上皮様細胞へのダイレクト・リプログラミングが可能であったことを既に報告しており、本研究では次の段階としてウイルスベクターによる遺伝子導入に依存しない小分子化合物のみを用いた尿路上皮細胞へのダイレクト・リプログラミングを種々の方法で試みた。結果として現時点小分子化合物のみでの直接転換は得られず、今後も手法樹立に向けて引き続き検討を行う。また、H202を用いた間質性膀胱炎モデルマウスの作成には成功しており、マウス生体内での尿路上皮再生方法の検討も継続して行っていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに我々の研究室では、遺伝子導入を用いて線維芽細胞を尿路上皮細胞に直接転換させる技術を開発し報告している。遺伝子導入によるダイレクト・リプログラミングは細胞の腫瘍化リスクが高くなり、臨床応用に際しては障壁が多い手法となる。そのため、遺伝子導入に依存せず、小分子化合物のみを用いて線維芽細胞を尿路上皮細胞に直接転換させる手法を樹立し、現在根本的な治療のない間質性膀胱炎患者に対して新規治療を提供することが可能となり、膀胱再生医療に大きく寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Interstitial cystitis (Hunner type) is a disease that causes symptoms such as bladder pain and pollakiuria due to loss of urothelial cells or their functions, and is a designated intractable disease (No. 226) for which there is currently no effective treatment. Our research team has already reported that direct reprogramming from human dermal fibroblasts into urothelial cells was possible by introducing FOXA1, TP63, L-MYC, and KLF4. As the next step, we tried various methods of direct reprogramming of urothelial cells using only small molecule compounds that do not rely on gene induction by viral vectors. As a result, direct conversion using only small molecule compounds was not achieved at this time, and we will continue to investigate ways to establish a method. In addition, we have successfully created an interstitial cystitis mouse model by intravesical injection of H202, and will continue to investigate methods to regenerate the bladder urothelium in mice.

研究分野：Urology

キーワード：direct reprogramming urothelial cell human dermal fibroblast bladder interstitial cystitis Hunner type intravesical infusion

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

尿路上皮細胞は膀胱の粘膜を構成し、感染防御および排尿・蓄尿に寄与する。正常な膀胱機能の維持に欠かせない細胞である。間質性膀胱炎(ハンナ型)は尿路上皮細胞の欠損や機能が失われることで、痛みや頻尿などの症状が生じる疾患であり、現在のところ有効な治療法がない指定難病(226)である。

我々の研究グループは線維芽細胞に FOXA1, TP63, MYCL, KLF4 の 4 遺伝子を導入すると、尿路上皮細胞に変えられる(ダイレクト・リプログラミング)ことを見出しており、この技術の臨床応用に向けて研究を進めている。ダイレクト・リプログラミングとは、ある細胞種を他の細胞種に、直接変える技術である。線維芽細胞などに特定の遺伝子を導入することで、神経細胞、肝細胞、心筋細胞など種々の細胞に変えられることが報告されてきた。さらに注目すべきは、マウス心筋梗塞部に直接遺伝子を注入して生体内で心筋細胞に転換させ(生体内ダイレクト・リプログラミング)心機能を改善させた報告がある。

そこで我々は、膀胱粘膜下あるいは線維化組織に存在する線維芽細胞を直接転換することで、欠損した尿路上皮細胞の再生を促し、in vivo 法でマウスの間質性膀胱炎の治療モデル実験を行う、将来的に根治療法としての有用性を検証する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、尿路上皮細胞が欠損している間質性膀胱炎モデルマウスを作成し、「膀胱の線維芽細胞に遺伝子を直接導入し、体内で尿路上皮細胞に変える方法(in vivo reprogramming)」を用いた治療モデル実験を行い、膀胱機能の改善を検証するとともに、将来的な間質性膀胱炎(ハンナ型)の根本的治療の開発につなげることを目標とする。

また、臨床応用に際して遺伝子導入に依存したダイレクト・リプログラミングは細胞の腫瘍化リスクが懸念され、小分子化合物のみで線維芽細胞から尿路上皮細胞へのダイレクト・リプログラミング方法の樹立も併せて目標とする。

3. 研究の方法

間質性膀胱炎モデルマウスの作成

過酸化水素水をマウス膀胱内へ注入し、尿路上皮欠損モデルマウスを作成する。VSOP(voided stain on paper)法や代謝ケージを用いてマウスの排尿行動の観察を行い、観察後はマウスの膀胱を取り出し、total RNA の抽出と凍結切片の作成を行い、real-time RT-PCR 法、Western-blot 法、ELISA 法、免疫組織化学染色などを用いて評価を行う。

マウス生体内での遺伝子導入に使用するウイルスベクターの検討

遺伝子をレトロウイルスベクター以外のウイルスベクターに組み込み、これらを用いた fibroblasts から尿路上皮細胞への転換効率を計測する。

マウス生体内への直接遺伝子導入を行う in vivo reprogramming の検討

間質性膀胱炎モデルマウスの尿路上皮下に存在する膀胱の線維芽細胞に FOXA1, TP63, MYCL, KLF4 の 4 遺伝子(FTLK 遺伝子)を直接導入し、マウスの生体内で尿路上皮細胞に誘導(in vivo reprogramming)させる。遺伝子導入方法については、経尿道的または経腹膜の方法でベクターを注入する。

小分子化合物の検索

ウイルスベクターによる遺伝子導入に依存しないダイレクト・リプログラミングを実現するために、化合物スクリーニングを試みる方針とした。化合物スクリーニングに使用するレポーターとして尿路上皮特異的な膜蛋白の発現に伴い発光酵素を共発現する細胞株の作成を試みる。

小分子化合物を用いた線維芽細胞から内胚葉系前駆細胞へのダイレクト・リプログラミング現段階での小分子化合物のみでの尿路上皮細胞への直接転換は困難が予想され、内胚葉系マーカーを発現する内胚葉系前駆細胞へのダイレクト・リプログラミングから尿路上皮細胞への分化誘導を試みる。

4. 研究成果

間質性膀胱炎モデルマウスの作成

H2O2 の膀胱内注入による間質性膀胱炎モデルマウスを作成し、1 回排尿量の減少、排尿間隔の短縮を確認した。また、モデルマウスの膀胱組織を取り出し、HE 染色を行い、尿路上皮細胞の剥離を確認した。

マウス生体内での遺伝子導入に使用するウイルスベクターの検討

ウイルスベクターの種類(レトロウイルスやレンチウイルス)、ウイルスの濃度、注入方法を変えて実験を行ったところ、膀胱の一部は GFP の蛍光を確認することができた。しかしながら漿膜層への感染であり、目的の粘膜下層の線維芽細胞への遺伝子導入が困難であったため、注入方法の検討が必要と考えられた。

マウス生体内への直接遺伝子導入を行う in vivo reprogramming の検討

間質性膀胱炎モデルマウスへの遺伝子導入はウイルスベクター導入に伴う侵襲が大きく、また遺伝子導入方法についても確立されていないため、十分なサンプルが確保できなかった。ウイルスベクターによる遺伝子導入に依存しない方法での線維芽細胞からの直接転換が必要と考えられた。

小分子化合物の検索

尿路上皮細胞に特異的な膜蛋白をコードする遺伝子配列のプロモーター領域と発光酵素の遺伝子配列を結合したベクターを作成は可能であったが、尿路上皮細胞への直接転換で十分な発光酵素の共発現が得られず、化合物スクリーニングでのレポーターとして十分に機能できなかった。発光酵素を共発現するには単独のプロモーター配列のみの転写では不十分であったものと考えられた。

小分子化合物を用いた線維芽細胞から内胚葉系前駆細胞へのダイレクト・リプログラミング種々の小分子化合物を用いて線維芽細胞から内胚葉系前駆細胞へのダイレクト・リプログラミングを試みたが、有意な内胚葉系マーカー発現は確認できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	松田 修 (Mazda Osam) (00271164)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	
研究分担者	岸田 綱郎 (Kishida Tsunao) (00370205)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	
研究分担者	浮村 理 (Ukimura Osamu) (70275220)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	

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