

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09395

研究課題名(和文) 間質性膀胱炎の病態と制御性T細胞による免疫応答の関連性に関する研究

研究課題名(英文) Research on the relationship between the pathology of interstitial cystitis and the immune response by regulatory T cells

研究代表者

石田 昇平 (Ishida, Shohei)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90744029

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)：間質性膀胱炎の病態解明と新規治療の可能性を探求することを目的として、その病態形成における免疫応答の関連性について研究した。さらに膀胱における免疫応答(制御性T細胞の発現)に影響を及ぼす可能性がある尿中細菌叢や尿中メタボロームの解析を行い、間質性膀胱炎の発症・増悪因子の解明を行った。結果としては間質性膀胱炎患者では正常患者(コントロール)群、膀胱痛症候群症例(非ハンナ型)群(BPS群)と比較して、Foxp3陽性T細胞の割合が高い傾向が得られたが、有意な結果までは得られなかった。また尿中プロテオミクス、メタボローム解析を実施したが、特異的な尿中代謝物質やタンパクの同定には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間質性膀胱炎は、膀胱の非特異的な慢性炎症により頻尿・尿意亢進・尿意切迫感・膀胱痛などの症状を呈する疾患で、国の難病指定に登録されているが、その病因については明らかになっておらず、治療についても根治が期待できる治療法はなく、その病態の解明は、新規治療の開発につながる。今回の研究では有意差はでなかったものの、免疫応答の点から制御性T細胞の発現について着目したところ、間質性膀胱炎患者ではFoxp3陽性T細胞の割合が高い傾向があり、さらにこれも結果がでなかったものの尿中細菌叢との関連も示唆する所見は見られたため、新規治療の開発につながる可能性は見いだせたと思われる。

研究成果の概要(英文)：With the aim of elucidating the pathogenesis of interstitial cystitis and exploring the possibility of new treatments, we investigated the relationship of immune responses in the pathogenesis of interstitial cystitis. Furthermore, we analyzed the urinary bacterial flora and urinary metabolome, which may affect the immune response (regulatory T cell expression) in the bladder, and elucidated the factors that cause and exacerbate interstitial cystitis. The results showed that the proportion of Foxp3-positive T cells tended to be higher in patients with interstitial cystitis compared to normal patients (control) and bladder pain syndrome (non-Hanner type) group (BPS group). , no significant results were obtained. We also performed urinary proteomics and metabolome analysis, but were unable to identify specific urinary metabolites or proteins.

研究分野：泌尿器科学関連

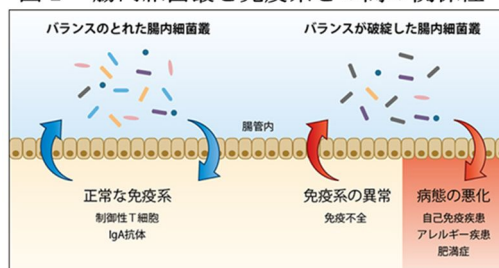
キーワード：間質性膀胱炎

### 1. 研究開始当初の背景

間質性膀胱炎は、膀胱の非特異的な慢性炎症を伴い、頻尿・尿意亢進・尿意切迫感・膀胱痛などの症状を呈する疾患で、国の難病指定に登録されている。膀胱組織において、上皮の欠落やB細胞系の浸潤などの炎症所見を特徴とするが、その病因については、膀胱粘膜の機能障害、免疫学的な異常反応、尿中の毒性物質、ストレスなどが想定されているものの、どのような機序で病態が形成され、悪化していくのかが明らかになっていない。治療についても、根治が期待できる治療法はなく、その病態の解明は、下部尿路機能障害の分野における大きな課題の一つである。

一方、ヒトの腸管内には500~1000種類、総数100兆個にも及ぶ腸内細菌が共存しており、腸内細菌叢を形成していることが知られている。これら腸内細菌が腸管免疫系を適切に制御しているが、外的、内的要因による腸内細菌叢の乱れにより、腸管における制御性T細胞の作用が減弱し、その結果として、腸管免疫系が過剰に活性化することで、自己免疫疾患、アレルギー疾患、がん、肥満症などのさまざまな疾患の発症や増悪に影響を及ぼしていることが報告されている<sup>1)</sup>(図1)。

図1 腸内細菌叢と免疫系との関係性



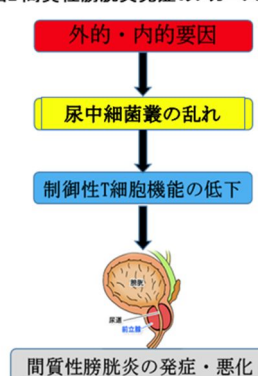
間質性膀胱炎に、シェーグレン症候群、線維筋痛症、過敏性腸症候群などの免疫に関与する疾患の合併が多い背景を考えれば、その病態には、全身における過剰な免疫反応が根底にあると考えられる。今回、我々は、間質性膀胱炎患者の尿中細菌叢および腸内細菌叢、尿中代謝物質に注目し、その細菌叢の構成変化(乱れ)などにより、制御性T細胞活性を低下、B細胞系の発現が亢進することで引き起こされる膀胱組織での免疫系の過剰発現が、間質性膀胱炎の病態に関与していると考え検討を行うことにした。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、間質性膀胱炎の病態形成において、免疫抑制細胞である制御性T細胞(Treg)の関与を解明することに加えて、Tregの発現に影響を及ぼす因子について検討を行い、その病態の解明ならびに新規治療の可能性を探求することである(図2)。

これまで間質性膀胱炎の病態について、免疫学的視点から検討を行った研究は散見されるが、尿中細菌叢に注目して、その細菌叢構成変化による免疫系の亢進という観点から行った検討はみられず、独自性の高い研究であると考えられる。また当研究では、間質性膀胱炎症例の尿内細菌叢を、次世代シーケンサーを用いて、網羅的に解析を行うため、特異的な尿内細菌クラスター群を見出すことが可能であると考えられる。さらに、これまで間質性膀胱炎の最適な動物モデルは存在していないが、今回の解析により、動物モデルの確立にもつながると考えられ、モデルを用いることで、詳細な免疫系の賦活化が評価可能であり、発症メカニズムの解明だけでなく、新しい治療選択肢につながることも予想され、創造性の高い研究であると考えている。

図2 間質性膀胱炎発症のメカニズム(仮説)



### 3. 研究の方法

#### 間質性膀胱炎症例における制御性T細胞の測定

正常患者群(コントロール群、10名)、非ハンナ型間質性膀胱炎症例群(軽症群、20名)、ハンナ型間質性膀胱炎症例群(重症群、20名)に分けて、それぞれの膀胱組織(間質性膀胱炎症例は病変部位に加え、粘膜正常部分も含む)におけるTregの発現について、細胞表面抗原マーカーのCD4、CD25、CD45RAと核内転写因子のFoxp3を、フローサイトメトリーを用いて測定し、Foxp3陽性T細胞の割合の比較だけでなく、強い免疫抑制活性を有すると考えられるTreg(CD45RA:陰性、Foxp3:強陽性、CD4:陽性)の評価を行うことで、局所、病変部位における免疫応答の評価を行う。

#### 間質性膀胱炎患者の尿中細菌叢(腔内細菌叢)尿中メタボロームの網羅的解析

近年、腸内細菌叢は、腸管における免疫抑制細胞であるTregの発現、活性に影響を及ぼし、大腸の炎症性疾患との関連性が報告されているが、膀胱におけるTregの活性についても、尿中の細菌叢(あるいは腔内の細菌叢)や代謝物質が、影響を及ぼしていると考えられ、間質性膀胱炎症例における尿中細菌叢(腔内細菌叢)、尿中代謝物質の検討を行う。具体的には、実臨床で通院中の間質性膀胱炎症例(ハンナ型、非ハンナ型)の尿検体から、DNAを抽出し、16S rRNA 領

域を増幅した PCR 産物等を対象に、次世代シーケンサーを用いて大量に配列解析を行い、得られた配列を用いて 16S rRNA データベースに対する相同性検索および系統分類解析により、間質性膀胱炎症例で特異的にみられる尿中細菌群を同定する。尿中細菌同定が困難な場合は、腔分泌液で同様の検討を行う。さらに、尿検体を用いて、液体クロマトグラフィー質量分析計による代謝物質の網羅的解析を行い、代謝パスウェイの解析ならびに多変量解析、部分的最小二乗回帰から、間質性膀胱炎症例でみられる特異的な代謝物質の同定を行う。

#### 間質性膀胱炎患者の膀胱組織でみられる B 細胞と制御性 T 細胞の関連性の検討

自己免疫疾患である実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルで、急性期からの自然回復に、B 細胞が制御性 T 細胞を誘導することが重要であることがわかっている。ハンナ型の間質性膀胱炎の組織像において、B 細胞系の浸潤が優位に増加していることは先行研究で報告されているが、慢性炎症が遷延することを考えれば、B 細胞が Treg を誘導しない、あるいは Treg が誘導されても浸潤しない、などが考えられる。これら B 細胞の制御性 T 細胞に対する誘導機能を評価するために、間質性膀胱炎症例（ハンナ型、非ハンナ型）の生検検体から、セルソーターを用いて浸潤している B 細胞を選別し、同患者の末梢血単核細胞中のナイーブ制御性 T 細胞と共培養を行い、抑制機能をもつ制御性 T 細胞に分化する割合を評価する。また、誘導された制御性 T 細胞の抑制機能を、組織に浸潤している形質細胞などの炎症性細胞の増殖能を測定することで評価する。

#### 4. 研究成果

##### 間質性膀胱炎症例における制御性 T 細胞の測定

正常患者群（コントロール群、10 名）、非ハンナ型間質性膀胱炎症例群（軽症群、12 名）、ハンナ型間質性膀胱炎症例群（重症群、11 名）の症例について、膀胱組織（間質性膀胱炎症例は病変部位に加え、粘膜正常部分も含む）における Treg の発現を調べた。Foxp3 陽性 T 細胞の割合については、ハンナ型間質性膀胱炎症例群（重症群、11 名）において発現が多い傾向が見られたものの、有意差はでなかった。一方、一般的に強い免疫抑制活性を有すると考えられる他の Treg については、CD45RA 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞ともに 3 群間で差は見られなかった。

##### 間質性膀胱炎患者の尿中細菌叢（腔内細菌叢）、尿中メタボロームの網羅的解析

通院中の非ハンナ型間質性膀胱炎症例群（軽症群）、ハンナ型間質性膀胱炎症例群（重症群）、それぞれ 12 症例の計 24 症例の尿検体から DNA を抽出し、16S rRNA 領域を増幅した PCR 産物等を対象に、次世代シーケンサーを用いて大量に配列解析を行い、得られた配列を用いて 16S rRNA データベースに対する相同性検索および系統分類解析により、間質性膀胱炎症例で特異的にみられる尿中細菌群の同定を試みたが、両群で特異的な尿中細菌叢は得られなかった。また正常患者群の 10 症例とも比較したものの、非ハンナ型間質性膀胱炎症例群（軽症群）、ハンナ型間質性膀胱炎症例群（重症群）との差異は見いだせなかった。さらにこれらの尿検体を用いて、液体クロマトグラフィー質量分析計による代謝物質の網羅的解析を行い、間質性膀胱炎症例でみられる特異的な代謝物質の同定を試みたが、非ハンナ型間質性膀胱炎症例群（軽症群）、ハンナ型間質性膀胱炎症例群（重症群）ともに、正常患者群と比較して特異的な代謝物質の同定には至らなかった。

##### 間質性膀胱炎患者の膀胱組織でみられる B 細胞と制御性 T 細胞の関連性の検討

正常患者群（コントロール群、10 名）、非ハンナ型間質性膀胱炎症例群（軽症群、12 名）、ハンナ型間質性膀胱炎症例群（重症群、11 名）の症例について、膀胱組織（間質性膀胱炎症例は病変部位に加え、粘膜正常部分も含む）を確認したところ、先行研究で報告されているような B 細胞系の浸潤が優位に増加していることは非ハンナ型間質性膀胱炎症例群（軽症群）、ハンナ型間質性膀胱炎症例群（重症群）においてともに確認できたが、B 細胞の制御性 T 細胞に対する誘導機能、および抑制にどう働くかについては特異的な反応が検出できず、作用機序の解明にまでは至らなかった。

#### 【参考文献】

1) Kawamoto S, Tran TH, Maruya M, et al. The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. *Science*. 2012; 336: 485-9.

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	松川 宜久  (Matsukawa Yoshihisa)  (30378145)	名古屋大学・医学系研究科・准教授    (13901)	

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