

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09415

研究課題名（和文）間質性膀胱炎に対する創薬を目指した幹細胞濾過液の有効性の検討

研究課題名（英文）The effects of filtered stem cell lysates on interstitial cystitis

研究代表者

松本 成史（Seiji, Matsumoto）

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：10288912

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：塩酸誘発性間質性膀胱炎モデルラットを用いて脂肪由来幹細胞濾液（FADSCL）の有効性を検討した。FADSCLが間質性膀胱炎の既存治療薬である50%DMSO膀胱内投与に比べて効果が高いことを明らかにした。またFADSCLによる間質性膀胱炎の改善メカニズムについて検討した結果、膀胱組織自体への顕著な影響は見られないこと、組織中の遺伝子を解析した結果、免疫系、炎症系に關与するシグナル伝達の遺伝子群が動いていることを明らかにした。本研究の成果からは、FADSCL内に含まれる間質性膀胱炎治療効果に対する活性成分の同定には至らなかったが、改善メカニズムの一端を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間質性膀胱炎は、膀胱痛や頻尿症状を主訴とする難治性膀胱炎であり、難病指定されている。現在の治療は、膀胱水圧拡張術、焼灼術、50%DMSOの膀胱内投与などがあげられるが、いずれも効果は限定的であり、症状の再燃も問題となっている。本研究では、脂肪由来幹細胞濾液（FADSCL）の間質性膀胱炎への治療効果を検討した結果、FADSCLは50%DMSOよりも効果が高いことが塩酸誘発性膀胱炎モデルにより明らかになった。また改善メカニズムの一端も明らかにすることができた。これらの研究成果は、今後の間質性膀胱炎治療薬の開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effects of filtered adipose-derived stem cell lysate (FADSCL) using a hydrochloric acid-induced interstitial cystitis rat model. It was found that FADSCL was more effective than the existing drug, 50% DMSO intravesical administration. This study also examined the mechanism of improvement of interstitial cystitis by the treatment of FADSCL. We found that there was no significant effect on the bladder tissue itself. However, analysis of the genes in the tissue revealed that a group of genes involved in signal transduction related to the immune and inflammatory systems were moving. Although the results of this study did not lead to the identification of the active component within FADSCL for the therapeutic effect of interstitial cystitis, they did reveal one aspect of the improvement mechanism.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：間質性膀胱炎 脂肪由来幹細胞濾液 50%DMSO

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 間質性膀胱炎について

間質性膀胱炎は、膀胱痛や頻尿、尿意亢進、尿意切迫感などを主訴とする原因不明の難治性膀胱炎であり、本邦の指定難病対象疾病である。最近では、国内にも数十万人の潜在患者が存在すると推定されており、見逃すことのできない疾患となっている。現在は膀胱水圧拡張術や経尿道的血管焼灼術、50%DMSOの膀胱内投与などが治療として行われる。治療効果は必ずしも良いわけではなく、新規薬剤の開発が望まれている。

#### (2) 間質性膀胱炎と幹細胞治療

近年の基礎研究から、間質性膀胱炎モデルに幹細胞を移植することで症状改善効果が見られることが報告されている。しかしながら、幹細胞治療は細胞自体を身体に投与するため、目的の細胞以外への分化、他家移植時の拒絶反応、保存・管理の煩雑さなどの解決すべき課題を抱えている。また、自家移植でも、患者が高齢な場合は幹細胞自体が老化しており十分な効果が得られない可能性もある。一方で、幹細胞による治療効果に関する報告の多くは、幹細胞自体の分化ではなく、幹細胞から放出される液性因子の効果（パラクライン効果）であることが、近年通説となりつつある。

#### (3) 幹細胞濾液

上記のような背景から、我々はこれまでに液性因子を含んだ非細胞性製剤「幹細胞濾液 (Filtrated Stem Cell Lysate; FSCL)」を独自に開発し検討を進めてきた。これまでの一連の研究から、塩酸誘発性の間質性膀胱炎モデルを用いて、脂肪幹細胞濾液 (Filtrated Adipose-Derived Stem Cell Lysate; FADSCL) の膀胱内投与により頻尿症状が有意に改善することを明らかにした (特願 2020-10461)。FADSCL の投与経路が膀胱内投与であることから、全身への副作用を避けた臨床応用が期待される。つまり、FADSCL 中に間質性膀胱炎症状を改善するための活性因子が少なくとも1つ以上含まれていること、薬物動態学的に利点のある局所投与での効果が十分期待されることが示唆された。

### 2. 研究の目的

研究開始当初、(1) FADSCL 中に含まれる間質性膀胱炎症状の改善因子を明らかにすること、(2) FADSCL による間質性膀胱炎症状の改善効果のメカニズムを明らかにすること、(3) FADSCL は既存薬 50%DMSO 膀胱内投与に比べて治療効果の優位性があることを明らかにすること、の3点を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 間質性膀胱炎モデルの作製

本研究では10週齢の雌性 F344/NS1c ラット (Japan SLC, Inc) を用いたイソフルラン吸入麻酔下で、尿道から PE-50 チューブを挿入し、カニューレから尿を排出させ、塩酸を膀胱内に注入した。その後カニューレからシリンジで塩酸を抜き、続けて生理食塩水 500  $\mu$ L を注入して膀胱内を洗浄した。洗浄は2回行った。対照群には、同量の PBS を注入し、同様に生理食塩水による洗浄を2回行った。

#### (2) FADSCL の作製

ラットから皮下脂肪組織を採取し、脂肪由来幹細胞 (adipose-derived stem cells; ASC) の単離および培養を行った。ASC の培養、増殖後に回収し培地を PBS に置換し懸濁液を作成した。懸濁液を凍結し幹細胞を破碎した後、フィルター濾過し ASC 濾液 (FADSCL) を作製した。

#### (3) 薬剤投与と評価

モデル作製の24時間後に FADSCL もしくは PBS を投与した。投与は、モデル作成時と同様に、イソフルラン吸入麻酔下で、尿道から PE-50 チューブを挿入し、膀胱内注入し行った。膀胱内に各薬剤を投与した状態で1時間静置し、薬剤はカニューレを通して抜かず留置した。上述のラットを用いて、生理食塩水注入+PBS 投与 (Sham 群)、塩酸注入+PBS 投与 (HCl 群)、塩酸注入+FADSCL 投与 (FADSCL 群) の3群を作製した。さらに、膀胱内圧測定では、比較として、間質性膀胱炎に対する既存薬である 50%DMSO を投与した塩酸注入+50%DMSO 投与 (50%DMSO 群) を作製した。膀胱内圧測定は、モデル作製の1週間後に行った膀胱へのカテーテル留置の術後、イソフルラン吸入麻酔から覚醒3時間後に、シリンジポンプを用いて 80  $\mu$ L/min の速度で生理食塩水の膀胱内への還流を開始した。生理食塩水の還流開始から少なくとも1時間後に、膀胱内圧の記録を開始し、連続した3時間の膀胱内圧を解析対象とした。解析対象のデータから、排尿間隔、最大膀胱内圧、一回排尿量を算出し、評価した。膀胱内圧は、PowerLab 4/26 によって記録した本研究では、膀胱内圧の急激な上昇を排尿の瞬間と定義した。膀胱組織体部の4分の1片を用いて、マッソントリクロム染色、RNA-Seq 解析に用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 膀胱機能評価

HCl 群では、sham 群に比べて排尿間隔が有意に短縮し、IC 頻尿症状を呈していた。一方、FADSCL 群では、HCl 群に比べて排尿間隔が有意な延長が見られた。一方、50%DMSO 群では、HCl 群に比べて排尿間隔の有意な改善は見られなかった。最大膀胱内圧や一回排尿量には 4 群間で差は認められなかった。このことから FADSCL は、既存薬 50%DMSO に比べて IC 頻尿症状に対する改善効果において優位性があることが示唆された。

##### (2) 膀胱重量/体重比、組織学的評価

sham 群、HCl 群、FADSCL 群の各個体の膀胱を採取し、膀胱重量/体重比を算出したが 3 群間に有意な差は見られなかった。またマッソントリクロム染色を実施し膀胱の線維化について評価したが、3 群間で明らかな組織学的な異常所見等は見られなかった。

##### (3) RNA-Seq 解析結果

RNA-Seq 解析の結果、Sham 群と比較して HCl 群では、251 種類の遺伝子で発現上昇が見られ、73 種類の遺伝子で発現低下が確認された。また、HCl 群と比較して FADSCL 群では、99 種類の遺伝子で発現上昇、また 99 種類の別の遺伝子で発現低下が確認された。これらをさらに解析し、HCl 群で発現上昇して FADSCL 群で発現低下する遺伝子は 72 種類、HCl 群で発現低下し、ASCL 群で発現上昇する遺伝子は 36 種類認められた (下図 1)。

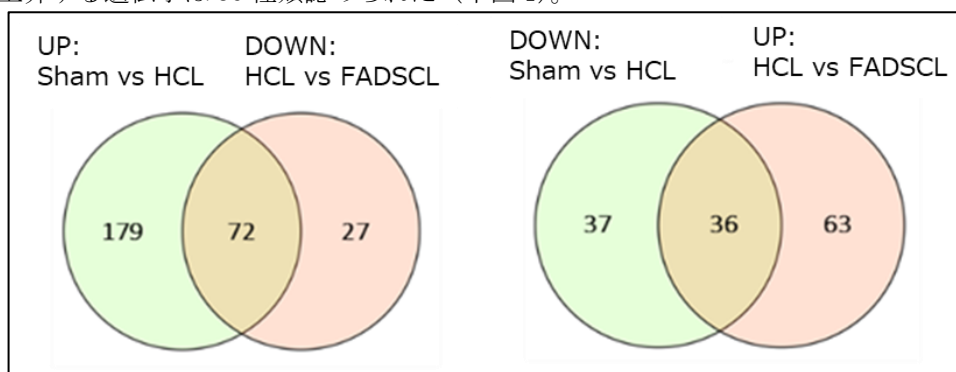


図 1. HCL 群で発現上昇し FADSCL 群で発現低下した遺伝子 (左) と HCL 群で発現減少し FADSCL で発現上昇した遺伝子 (右)

この 72 種類の共通した遺伝子について、GO 解析に使用した。その結果、Defense response to other organism、Response to virus、Adaptive immune response などの免疫系、炎症系に関するシグナル伝達経路の遺伝子群の発現が HCl 群で上昇し ASCL 群で減少していることが明らかとなった。一方で、Muscle contraction、cognition などの筋収縮に関わるグループの遺伝子発現は HCl 群で減少し、ASCL 群で上昇していた。このことから FADSCL による IC 改善機序として免疫系や炎症系に関係する可能性が示唆された (図 2)。

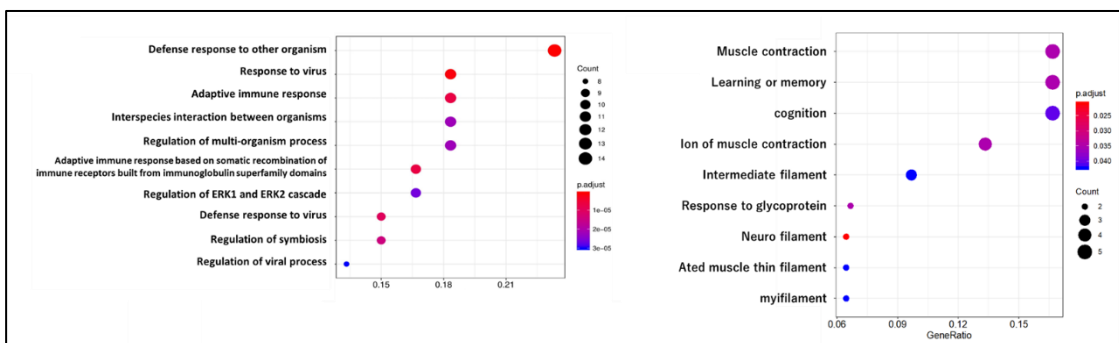


図 2. HCL 群で発現上昇し ASCL 群で発現低下した遺伝子群での GO 解析結果 (左) と HCL 群で発現減少し ASCL で発現上昇した遺伝子群での GO 解析結果 (右)

本研究では、FADSCL の間質性膀胱炎への治療効果を検討した結果、FADSCL は 50%DMSO よりも効果が高いことが塩酸誘発性膀胱炎モデルにより明らかになった。また改善メカニズムの一端も明らかにすることができた。これらの研究成果は、今後の間質性膀胱炎治療薬の開発の一助となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mori T, Hotta Y, Kataoka T, Matsumoto S, Yamamoto T, Kimura K.
2. 発表標題 Effect of Filtrated Bone Marrow-Derived Stem Cell Lysate on Erectile Function and Nerve Regeneration in Rats With Neurogenic Erectile Dysfunction
3. 学会等名 23rd Annual Fall Scientific Meeting of SMSNA/23rd ISSM Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴山真純、堀田祐志、片岡智哉、松本成史、山本徳則、木村和哲.
2. 発表標題 Efficacy of filtered bone marrow stem cell lysate for overflow urinary incontinence in model rats
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴山真純、堀田祐志、片岡智哉、松本成史、山本徳則、木村和哲
2. 発表標題 Efficacy of filtered bone marrow stem cell lysate for overflow urinary incontinence in model rats
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴山真純、堀田祐志、片岡智哉、松本成史、山本徳則、木村和哲
2. 発表標題 間質性膀胱炎に対する脂肪由来幹細胞濾液の有効性の検討
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2021
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
研究分担者	堀田 祐志  (HOTTA YUJI)  (90637563)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授   (23903)	
研究分担者	木村 和哲  (KIMURA KAZUNORI)  (00423848)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授   (23903)	
研究分担者	山本 徳則  (YAMAMOTO TOKUNORI)  (20182636)	名古屋大学・未来社会創造機構・特任教授   (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
---------	---------