様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101
研究種目：基盤研究（Ｃ）
研究期間：2010～2012
課題番号：22591785
研究課題名（和文）　NFｋB レポータシステムによる間質性膀胱炎の新たな診断方法の確立

研究課題名（英文）　Establishment of a new diagnostic tool for interstitial cystitis using NFｋB reporter system

研究代表者：田中　博　（TANAKA HIROSHI）
北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師
研究者番号：60344470

研究成果の概要（和文）：
間質性膀胱炎（IC）は膀胱内への尿の貯留に伴う強い膀胱痛を来す疾患であるが、その発生機序は不明な点が多い。最初に、女性 IC 患者と健常女性を対象に、尿中のサイトカイン濃度の測定を行った。IC 患者では IL-8 が高い傾向が見られたが、それ以外のサイトカインの有意な上昇は見られなかった。しかし、IC の重症度の指標の一つである膀胱容量は、IL-6、 IL-8、 TNF-αが高いほど膀胱容量が有意に減少する結果が得られた。次に、GFP 陽性の骨髄細胞を移植したキメララットを用いて、膀胱炎モデルにおける骨髄由来細胞の役割について検討した。膀胱炎モデルでは、骨髄由来細胞の膀胱への遊走は認めるものの、膀胱組織細胞への分化は認められなかった。NAT システムを導入した膀胱上皮における NF-κB 活性シグナル検出の検討では、安定したけ結果が得られず、さらなる検討が必要であった。

研究成果の概要（英文）：
In the first study, IL-8 in urine was higher in IC than healthy normal women. Bladder capacity of IC was smaller in IC patients with higher concentration of IL-6, IL-8, TNF-α in urine. In the second study, using chimera rats with GFP-positive bone marrow cells, bone marrow derived stem (BMS) cells did not directly contribute to the regeneration of the bladder with cystitis, although many BMS migrated to the bladder. Data was not obtained from the third study using urothelium with induction of NAT system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総　計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学
キーワード：間質性膀胱炎、NFｋB、診断、サイトカイン

１．研究開始当初の背景

間質性膀胱炎（IC: interstitial cystitis）は膀胱内への尿の貯留に伴う強い膀胱痛を来す疾患であり、患者は高度の頻尿と痛みに悩み、その結果、日常活動の制限、生活の質は大きく障害される。IC の発症機序は、何らかの原因による膀胱粘膜上皮の障害が起こり、粘膜下への尿の浸透、膀胱粘膜下のマス

ト細胞の活性化と脱顆粒、膀胱知覚神経の過敏状態の発現といった多段階の発症機序が推測されているが、なぜ膀胱粘膜の障害が起こるのか、なぜ修復機構が働かないのかなど多くのことが現時点でも不明である。IC 患者の膀胱生検から膀胱粘膜および粘膜下の非特異的炎症が認められ、IC 患者の尿中に数種類のサイトカインの存在が発見されているが、これらバイオマーカーを用いた診断システムは未だ確立されていない。

２．研究の目的

本研究は、IC の発症機序の解明、新たな診断法の確立を目的とした。

３．研究の方法

検討１：尿中サイトカインの測定

女性 IC 患者 10 名とコントロールとして健常女性 4 名を対象に、尿中のサイトカイン（IL-4, IL-1β, IL-6, IFNγ, IL-8, TNF-α）濃度の測定について ELISA を用いて行った。

検討２：膀胱炎モデルにおける骨髄由来細胞の関与

（１）GFP キメララットの作成

骨髄移植を行う前日に 12G 放射線照射を行った Wild type 雌ラットに対し、GFP 陽性トランスジェニックラットの大腿骨および脛骨から採取した骨髄細胞を尾静脈から投与する。骨髄細胞投与後、6 週間たった段階で末梢血を採取し、血球成分が GFP 陽性であること共焦点蛍光顕微鏡で観察し、GFP 陽性の骨髄細胞が生着していることを確認した。

（２）膀胱炎モデルの作製

麻酔下に経尿道的に膀胱内に PE-50 カテーテルを挿入し、膀胱内の尿を吸引した後に 0.4N 塩酸または生理食塩水(Sham)を膀胱内に注入し、膀胱炎モデルを作製した。

（３）免疫組織学的検討

膀胱炎または Sham モデル作製後 2 週目に還流固定の後に膀胱を摘出して、HE 染色・蛍光抗体法による免疫組織学的検討を行った。

検討３：NF-κB シグナル活性検出用のレポーター（NAT システム）を用いた膀胱上皮における NF-κB 活性シグナル検出

不死化ヒト尿路上皮細胞に NAT システム遺伝子を導入し、レポーター遺伝子として EGFP 遺伝子による蛍光と、ホタルルシフェラーゼ遺伝子による発光を用いて、NF-κB 活性シグナルの検出を行った。

４．研究成果

検討１

IC 患者と健常者の間に有意な差を持つサイトカインはなかった。しかし、IL-8 を 10pg/mL 未満と 10pg/mL 以上の 2 群に分けた場合、健常者は 4 例とも 10pg/mL 未満であったのに対し、IC 患者では 6 例（60%、p=0.0849）と高値である傾向を認めた。

同様に IL-6 を 5.0pg/mL 未満と 5.0pg/mL 以上で、TNF-α を感度（0.5pg/mL）未満と感度以上に分けた場合、IC 患者において膀胱水圧拡張術時の膀胱容量 BC: ml)に有意差を認めた（表１）。

表１

BC	基準未満	基準以上	P 値
IL-6	636.0+/-87.1	225.0+/-97.4	0.0163
IL-8	665.0+/-104.7	316.7+/-85.8	0.0327
TNF-α	567.1+/-79.5	196.7+/-121.4	0.0340

また、BC が 400ml 未満と 400ml 以上の 2 群に分けた場合、400ml 未満で IL-6(pg/mL), IL-8（pg/mL）, TNF-α（pg/mL）が高値を示した（表２）。

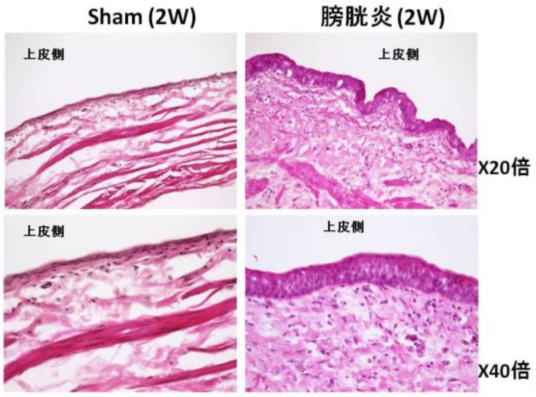
表２

サイトカイン	400ml 未満	400ml 以上	P 値
IL-6	91.9+/-24.3	1.98+/-21.8	0.0284
IL-8	214.9+/-74.1	9.7+/-60.5	0.0642
TNF-α	0.59+/-0.07	0.25+/-0.06	0.0073

以上より、IC の診断および重症度に尿中サイトカインが関与しており、診断に有用であると考えられた。

検討２

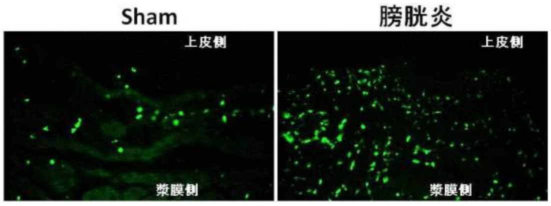
図１：膀胱組織像（HE 染色）



HE 染色では、膀胱炎モデルにおいて Sham に比べて膀胱上皮は重層化していた。膀胱上皮下の間質組織は肥厚して浮腫が見あれた。さらに、炎症性細胞の浸潤も認めた（図１）。

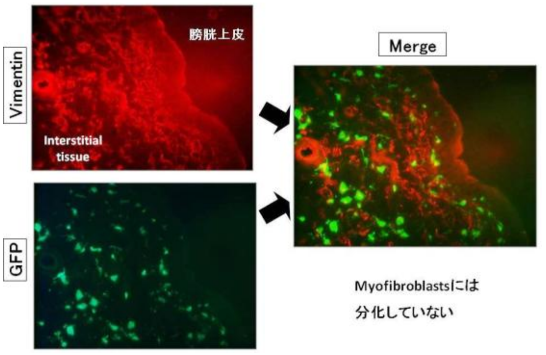
抗 GFP 抗体を用いて蛍光免疫染色を行ったが、膀胱炎モデルでより多くの骨髄由来細胞を認めた（図２）。骨髄由来細胞は、膀胱全体にみとめるものの、主に上皮下の間質組織により多く認めた。

図２：骨髄由来細胞の膀胱への遊走



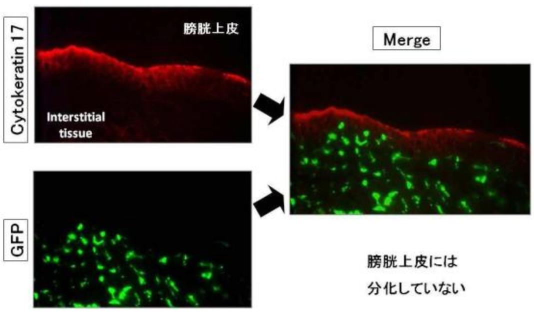
骨髄由来細胞が主に膀胱上皮下の間質組織に存在したが、Vimentin 陰性であった（図３）。のことから、骨髄由来細胞が、膀胱上皮下の間質組織における myofibroblasts への分化は示唆されなかった。

図３：骨髄由来細胞と myofibroblasts



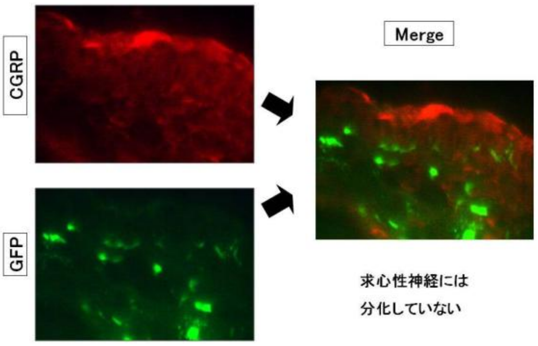
膀胱上皮にも骨髄由来細胞が存在したが、膀胱上皮に郵送している骨髄由来細胞はわずかであった。また、いずれの細胞も Cytokeratin 陰性であり、膀胱上皮には、分化していないものと考えられた（図４）。

図４：骨髄由来細胞と膀胱上皮



求心性神経線維のマーカーである CGRP についても CGRP 陰性であり求心性神経への分化は示唆されなかった（図５）。

図５：骨髄由来細胞と求心性神経線維



以上より、膀胱の傷害モデルである膀胱炎では骨髄由来細胞の膀胱組織へのリモデルリングは確認できなかった。

以前の我々の検討では、膀胱の傷害モデルのひとつである下部尿路閉塞モデルでは、GFP 陽性細胞は下部尿路閉塞膀胱の筋層で平滑筋様 phenotype へ分化しているもの、膀胱上皮下層で myofibroblasts への分化を示唆するものや、尿路膀胱上皮へ分化しているものが観察された。今回の膀胱炎モデルでは、下部尿路閉塞モデルと同様に骨髄由来細胞の膀胱への遊走が確認できたので、Stromal cell-derived factor 1α（SDF1α）などのサイトカインの発現が生じていることが予想される。しかし、膀胱炎モデルでは膀胱組織への分化は観察されず、その理由としてはモデルの違いや観察時期が２週目であったことなどが原因と考えられた。また、関与しているサイトカインも違う可能でも考えられる。今後の検討が必要であると考えられた

検討３

不死化ヒト尿路上皮細胞に NAT システム遺伝子を導入では、安定した導入が得られなかった。そのため、レポーター遺伝子として EGFP 遺伝子による蛍光と、ホタルルシフェラーゼ遺伝子による発光を用いて、NF-κB 活性シグナルの検出について、検討に値する喧嘩が得られなかったため、今後の更なる検討が必要であると考えられた。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計５件）

1．Mitsui T, Tanaka H, Harabayashi T, Moriya K, Maruyama S, Abe T, Sazawa A, Shinohara N, Nnonomura K: Changes in Urodynamics and Lower Urinary Tract Symptoms after Radical Prostatectomy: Implications of Preoperative Detrusor Contractility. LUTS 4:82-86 (2012)査読有

2．Sano H, Mitsui T, Kanno Y, Moriya K, Tanaka H, Kitta T, Nonomura K: Stromal Cell-Derived Factor 1α Induces Accumulation of Intraveneously Administered Marrow-Derived Stromal Cells in the Partially Obstructed Rat Bladder. LUTS 4:154-160 (2012)査読有

3．Mitsui T, Neuhuber B, Fischer I: Acute administration of AMPA/Kainate blocker combined with delayed transplantation of neural precursors improves lower urinary tract function in spinal injured rats. Brain Res, 1418:23-31 (2011)査読有

4．Moriya K, Mitsui T, Tanaka H, Nakamura M, Nonomura K. Long-term outcome of pituitary-gonadal axis and gonadal growth in patients with hypospadias at puberty. J Urol. 184:1610-1614 (2010) 査読有

5．Mitsui T, Tanaka T, Moriya K, Suzuki H, Mouri G, Hashimoto A, Nonomura K: Construction of neourethra using flipped anterior bladder wall tube in a prepubertal girl with complete disruption of urethra. Urology, 76:112-4 (2010)査読有

〔学会発表〕（計４件）

1．三井貴彦、菅野由岐子、佐野　洋、守屋仁彦、橘田岳也、田中　博、野々村克也. 膀胱炎モデルラットにおける骨髄由来細胞の役割:第9回泌尿器科再建再生研究会（2012年6月16日　ゆふいん山水館）

2．三井貴彦、菅野由岐子、佐野　洋、守屋仁彦、橘田岳也、田中　博、野々村克也. GFP キメララット空の骨髄移植により作製した GFP キメララットの有用性：第 4 回排尿障害モデル研究会(2011年11月25日　グランディエールブケトーカイ)

3．Kanno Y, Mitsui T, Sano H, Moriya K, Tanaka H, Nonomura K. Contribution of bone marrow derived stromal cells to the regeneration of the bladder after partial outlet obstruction: 106th AUA annual meeting (2011年5月16日　ワシントンコンベンションセンター)

4．橘田岳也、田中　博、三井貴彦、守屋仁彦、野々村克也. 当院における潰瘍型間質性膀胱炎に対する経尿道的潰瘍切除術の臨床的検討：第75回日本泌尿器科学会東部総会（2010年9月16日　栃木県総合文化センター）

６．研究組織

(1)研究代表者

田中　博（TANAKA HIRISHI）
北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師
研究者番号：60344470

(2)研究分担者

野々村　克也（NONOMURA KATSUYA）
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60113750

三井　貴彦（MITSUI TAKAHIKO）
北海道大学病院・泌尿器科・助教
研究者番号：90421966

(3)連携研究者

なし