

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592357

研究課題名(和文) 間質性膀胱炎モデルにおける膀胱イメージング

研究課題名(英文) Approaches of bladder imaging of interstitial cystitis model: Evaluation of effects on inflammation and treatment

研究代表者

三井 貴彦 (Mitsui, Takahiko)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：90421966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：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を行ったが、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。続いて、ルシフェラーゼアッセイによる測定法、フローサイトメトリーによるEGFPシグナルの測定法を用いたNF- κ B活性の定量を行うためにNF- κ B Tgマウスの作成を行ったが、安定した結果が得られず、十分な成果が得られなかった。一方、下部尿路閉塞モデルでは、下部尿路閉塞後の膀胱の末期の状態としての膀胱壁の線維化においてもIL-1が役割を担う可能性が考えられた。今後のさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：In the first study, using chimera rats with GFP-positive bone marrow cells, bone marrow derived stem (BMS) cells did not differentiate into the bladder tissue cells with cystitis, although many BMS migrated to the bladder. Thus, BMS cells were not directly contribute to reorganization of the bladder tissue in cystitis models. In the second study using luciferase assay and flow cytometry for EGFP in NF- κ B-Tg mice, enough data were not obtained from evaluation of NF- κ B activity in interstitial models. Further studies are necessary to establish evaluation of NF- κ B activity in interstitial models. In the third study using IL-1B $^{-/-}$ mice, we investigated whether IL-1B induced remodeling of the urinary bladder and lower urinary tract dysfunctions after partial bladder outlet obstruction (pBOO). IL-1B has the potential to induce bladder reorganization and deteriorate urodynamic parameters in pBOO. Especially, muscle hypertrophy in the bladder could occur via IGF-1 stimulation induced by IL-1B.

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 サイトカイン ラット マウス 下部尿路閉塞

1. 研究開始当初の背景

間質性膀胱炎は、頻尿、尿意切迫感、蓄尿時の恥骨上部の痛みを主症状とする症候群の原因疾患のひとつであり、膀胱の非特異的な慢性炎症を有している。間質性膀胱炎の病態は、広範にわたる科学的な取り組みが行われているにも関わらず、何らかの免疫反応が関与していることが予測されるものの、明確な病因は特定されていないため、根治的な治療法はいまだなく治療に難渋するケースも少なくない。現在、間質性膀胱炎のモデルとして、化学刺激物質をラットやマウスの膀胱内や腹腔内に注入することによって膀胱炎を誘発する方法が広く用いられており、病因や治療法の解明に寄与している。

またもう一つの病的モデルとして、前立腺肥大症や神経因性膀胱などの下部尿路閉塞状態において組織での IL-1 発現が高くなることが示されているが、どのような役割を果たしているのかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究は、間質性膀胱炎の発症機序の解明、新たな診断法の確立を目的とし、NF- κ B 活性化レベルをイメージングによって測定可能なモデルを作製し、間質性膀胱炎モデルにおける様々な薬剤効果の評価をリアルタイムに行うことを目的とした。

また、もう一つの病的モデルである下部尿路閉塞によって生じる膀胱の組織学的および機能学的変化の機序を明らかにするために、炎症性サイトカインである IL-1 の関与について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

検討 1: 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 2: NF- κ B Tg マウスの作成、膀胱上皮における NF- κ B シグナル活性の検討

膀胱上皮における生理的な細胞外からの刺激に対する NF- κ B シグナル変化の検出するために、NF- κ B Tg マウスの膀胱を摘出し膀胱上皮の培養を行った。

検討 3: 下部尿路閉塞(pB00)膀胱における炎症性サイトカイン IL-1 の関与の検討

(1) pB00 手術および sham 手術

生後 8 週齢雌性 C57/BL6 系統マウス (wild type: WT 群) と IL-1 $-/-$ mice (KO 群) を使用した。KO に対し Sham または pB00 手術を施した。さらに pB00 手術後に Insulin-like growth factor (IGF)- を腹腔内投与した群を KO- IGF- 群とした。

ペントバルビタールの腹腔内投与により麻酔を行い、下腹部正中切開後に膀胱および尿道を露出した後に、傍尿道血管の損傷に注意しつつ腔壁より尿道を注意深く剥離した。直径 0.55mm の金属ロッドを近位部尿道に沿わせ、4-0 絹糸にて尿道とロッドを共に結紮した。

(2) 膀胱重量測定

摘出した膀胱の重量を測定した。

(3) 組織学的検討

膀胱は 4% paraformaldehyde (PFA) 溶液で固定し、ミクロトームにて 3 μ m の厚さに薄切片し、組織学的検討のため Hematoxylin and eosin(HE) 染色を行った。

(4) 膀胱機能学的検討

膀胱内にカテーテル留置しカテーテルを圧モニターおよび生理食塩水注入用ラインとして使用して尿流動態測定システムにて下部尿路機能検査を行った。下部尿路機能では以下の尿流動態検査の項目を測定した: 膀胱容量 bladder capacity (BC); 排尿時圧 micturition pressure (MP); 無抑制収縮の回数 non-voiding contraction (NVC); 残尿量 post-void residual urine volume (PVR)。

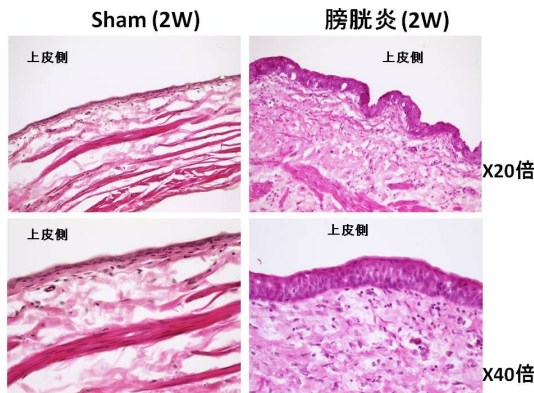
(5) RNA抽出、Quantitative real-time PCRs

膀胱中のサイトカイン (IL-1, IGF-1, TGF-) の mRNA 発現を測定するために RT-PCR を施行した。

4. 研究成果

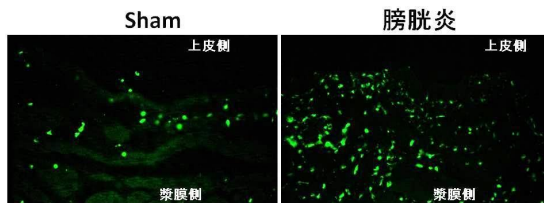
検討 1

図 1 : 膀胱組織像 (HE 染色)



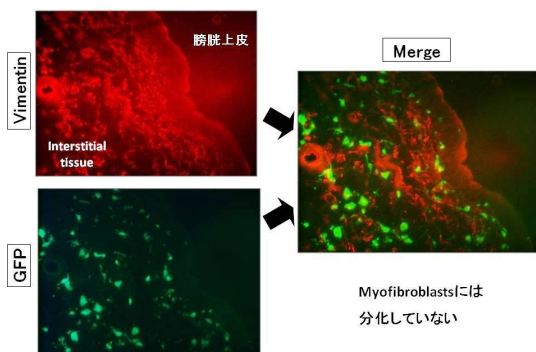
HE 染色では、膀胱炎モデルにおいて Sham に比べて膀胱上皮は重層化していた。膀胱上皮下の間質組織は肥厚して浮腫が見られた。さらに、炎症性細胞の浸潤も認められた (図 1)。

図 2 : 骨髄由来細胞の膀胱への遊走



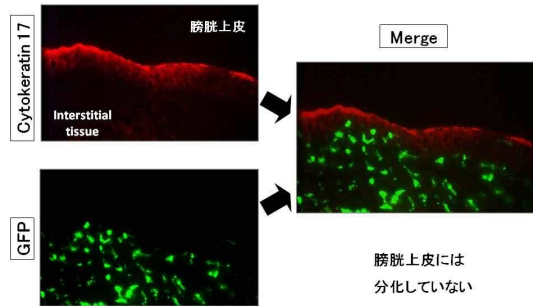
抗 GFP 抗体を用いて蛍光免疫染色を行ったが、膀胱炎モデルでより多くの骨髄由来細胞を認められた (図 2)。骨髄由来細胞は、膀胱全体にみとめるものの、主に上皮下の間質組織により多く認められた。

図 3 : 骨髄由来細胞と myofibroblasts



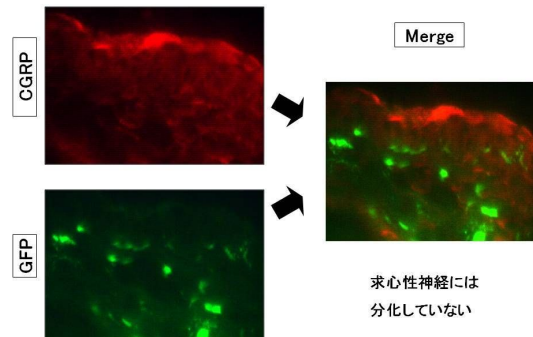
骨髄由来細胞が主に膀胱上皮下の間質組織に存在したが、Vimentin 陰性であった (図 3)。このことから、骨髄由来細胞が、膀胱上皮下の間質組織における myofibroblasts への分化は示唆されなかった。

図 4 : 骨髄由来細胞と膀胱上皮



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 5 : 骨髄由来細胞と求心性神経線維



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)。

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。

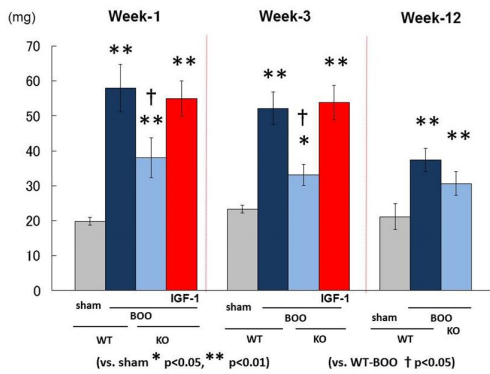
以前の我々の検討では、膀胱の傷害モデルのひとつである下部尿路閉塞モデルでは、GFP 陽性細胞は下部尿路閉塞膀胱の筋層で平滑筋様 phenotype へ分化しているもの、膀胱上皮下層で myofibroblasts への分化を示唆するものや、尿路膀胱上皮へ分化しているものが観察された。今回の膀胱炎モデルでは、下部尿路閉塞モデルと同様に骨髄由来細胞の膀胱への遊走が確認できたので、Stromal cell-derived factor 1 (SDF1) などのサイトカインの発現が生じていることが予想される。しかし、膀胱炎モデルでは膀胱組織への分化は観察されず、その理由としてはモデルの違いや観察時期が 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 2

ルシフェラーゼアッセイによる測定法、フローサイトメトリーによる EGFP シグナルの測定法を用いた NF-KB 活性の定量を行うために NF-KB Tg マウスの作成を行ったが、安定した結果が得られず、十分な成果が得られなかった。今後の更なる検討が必要であると考えられた。

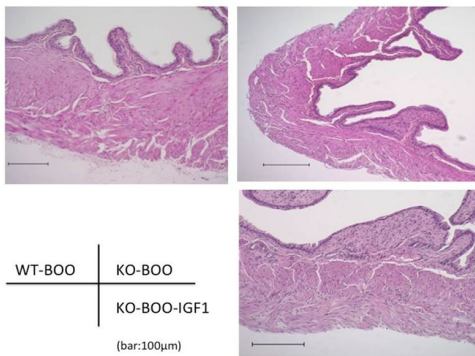
検討 3

図 1 : 膀胱重量



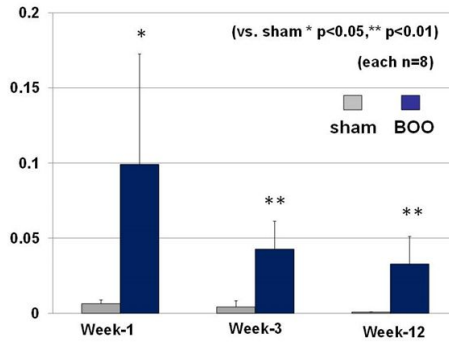
WT-pBOO 群では WT-sham 群に比べ有意に膀胱重量が高値であったが、KO-pBOO 群では、膀胱重量の増加がみられず、WT-pBOO 群に比べて有意に抑制された。一方、KO-IGF- 群では膀胱重量の増加が再現された。

図 2 : 組織学的検討



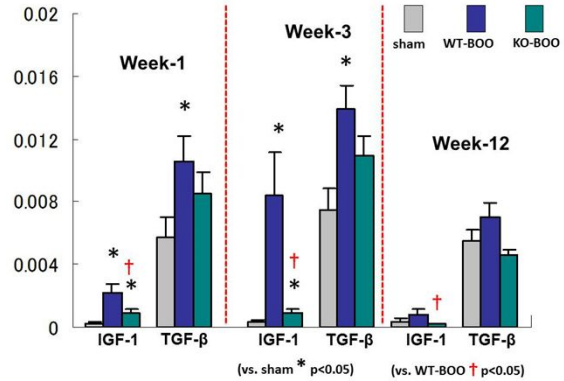
WT-pBOO 群では間質の浮腫と平滑筋の過形成が観察された。一方 KO-pBOO 群では筋過形成は軽度であった。KO-IGF- 群では、IGF- 投与により WT-pBOO 群と同等の筋過形成が再現された。

図 3 : WT における IL-1 発現量



IL-1 は、WT-pBOO 群において pBOO 手術後 1 週後に発現が WT-Sham 群群に比べて有意に上昇し、その後減少するものの、手術後 12 週後でも KO-pBOO 群に比べて有意に高い発現を示した。

図 4 : サイトカイン発現量



IGF-、TGF- 共に WT-pBOO 群において pBOO 手術後に WT-Sham 群に比べて有意に発現が亢進していた。KO-pBOO 群では、IGF- は WT-pBOO 群に比べ有意に発現が低かった。TGF- は、1 週目、3 週目において WT-Sham 群群に比べて WT-pBOO 群で有意に発現が亢進していた。KO-pBOO 群では、WT-sham 群と有意差が見られなかった。

表 : 下部尿路機能検査の各パラメータ

	WT-sham	WT-BOO	KO-BOO
Bladder capacity (μl)	51 (±11.6)	199* (55.0)	77† (±22.2)
Micturition pressure (mmH2O)	40.6 (±6.29)	54.8* (±7.0)	47.8† (±4.77)
Non-voiding contraction (times/micturition)	1.31 (±1.25)	7.19 (±4.33)	4.23 (±1.45)
Residual urine volume (μl)	0 (±0)	7.5 (±4.79)	5.0 (±2.89)

(*: p<0.05 vs. WT-sham)

(†: p<0.05 vs. WT-BOO)

WT-pB00 群では、WT-Sham 群に比べて有意に BC, MP が高値であった。KO-pB00 群では WT-pB00 群に比べ有意に BC, MP が低く、pB00 手術後の下部尿路機能の変化が抑制された。

ラットを用いた研究では、pB00 手術後 1 週後において、炎症性サイトカインである IL-1 の発現が高値となり、膀胱にも平滑筋の過形成や線維化などの形態的变化が見られたとする報告がある。しかしながら、今回の研究では術後 12 週においても IL-1 の発現が高い状態持続した。これは慢性期においても IL-1 が膀胱のリモデリングに何らかの役割があることを示唆していると考えられる。pB00 手術後において、IL-1 ノックアウトマウスでは IGF-1 の有意な発現上昇はみられず、平滑筋の過形成は野生型に比べ軽度であった。一方、IGF-1 を投与することで平滑筋の過形成が引き起こされた。このことは、pB00 膀胱の平滑筋過形成に、持続的な IL-1 の刺激およびそれによる IGF-1 分泌亢進が関わっていることを示唆している (IL-1 - IGF-1 経路)。

下部尿路機能検査に関しては、野生型において、pB00 手術後 3 週後で BC および MP は sham 手術を行った群に比べ有意に高かった。一方、IL-1 ノックアウトマウスでは、このような変化は見られなかった。この結果から、IL-1 が形態的变化がなりでなく、pB00 後の機能的な変化に関与していることを示唆した。

以上より、本研究では IL-1 ノックアウトマウスを用いることによって、pB00 後の膀胱における IGF-1 の発現を亢進し膀胱平滑筋の過形成を引き起こすこと、さらに下部尿路機能の面からも下部尿路機能障害に関与していることを明らかにした。

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. Kanno Y, Mitsui T, Sano H, Kitta T, Moriya K, Nonomura K. Contribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the morphological changes in the bladder after partial outlet obstruction: A preliminary study. *Int J urol*, in press, 2014, 査読有
2. Mitsui T, Moriya K, Kitta T, Kon M, Nonomura K. Preoperative renal scar as a risk factor of postoperative

metabolic acidosis following ileocystoplasty in patients with neurogenic bladder. *Spinal Cord*, 52(4), 292-294, 2014, 査読有

3. Mitsui T, Tanaka H, Harabayashi T, Moriya K, Maruyama S, Abe T, Sazawa A, Shinohara N, Nonomura N. Changes in urodynamics and lower urinary tract symptoms after radical prostatectomy: implications of preoperative detrusor contractility. *LUTS*, 4:82-86, 2012, 査読有
4. Sano H, Mitsui T, Kanno Y, Moriya K, Tanaka H, Kitta T, Nonomura K: Stromal Cell-Derived Factor 1 Induces Accumulation of Intravenously Administered Marrow-Derived Stromal Cells in the Partially Obstructed Rat Bladder. *LUTS*, 4:154-160, 2012, 査読有
5. 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

[学会発表](計 5 件)

1. Kon M, Mitsui T, Moriya K, Kitta T, Nonomura K. Impact of posterior urethral diameter / external urethral diameter ratio as a new tool to predict high detrusor pressure in voiding phase in children. ICS, 2013.8.26-30, CCIB Centre Convencions Internacional de Barcelona (Barcelona, Spain)
2. Kanno Y, Mitsui T, Kitta T, Moriya K, Tsukiyama T, Hatakeyama S, Nonomura K. An inflammatory cytokine IL-1 involved in bladder remodeling after partial bladder outlet obstruction. ICS, 2013.8.26-30, CCIB Centre Convencions Internacional de Barcelona (Barcelona, Spain)
3. Mitsui T, Kanno Y, Moriya K, Kitta T, Nonomura K. Supraspinal projection of serotonergic and noradrenergic pathways modulates nociceptive transmission in the lower urinary tract of rats. AUA, 2013.5.4-8, San Diego Convention Center (San Diego, USA)
4. Mitsui T, Moriya K, Kitta T, Kon M,

Nonomura K. The effect of descending serotonergic and noradrenergic pathways on nociception in the lower urinary tract. AUA, 2013.5.4-8, San Diego Convention Center (San Diego, USA)

5. Mitsui T, Tanaka H, Moriya K, Kitta T, Kanno Y, Nonomura K. Lower urinary tract function in spinal cord injury rats: Contusion versus transection of the spinal cord. ICS, 2011.8.29-9.2, Scottish Exhibition and Conference Center (Glasgow, United Kingdom)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(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・特任教授
研究者番号：60113750

田中 博 (TANAKA HIROSHI)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：60344470

(3) 連携研究者

なし