

令和元年6月19日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05463

研究課題名(和文) 関連遺伝子群のゲノム解析による間質性膀胱炎の病態解明

研究課題名(英文) Investigation of pathophysiology by genomic analyses in interstitial cystitis

研究代表者

本間 之夫 (Homma, Yukio)

東京大学・医学部附属病院・登録診療員

研究者番号：40165626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：間質性膀胱炎/膀胱痛症候群に対して、浸潤リンパ球のレパートリー解析、トランスクリプトーム解析による網羅的遺伝子発現プロファイリング、エクソーム解析による背景遺伝子異常の探索(既知の腫瘍原性遺伝子変異の検索を含む)といった網羅的ゲノム解析手法を応用した解析を行い、ハンナ型間質性膀胱炎では浸潤リンパ球、とくにB細胞のクローナル増殖が特徴的な現象であることを突き止めた。病因に關与する特異的な生物学的経路として、VEGF及びBAFFシグナル伝達系遺伝子群によって構成される経路が關与している可能性が高いことを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原因不明の指定難病であるハンナ型間質性膀胱炎において、その病態に特定の免疫応答が關与している可能性を突き止めるとともに、病態特異的な変動遺伝子及び生物学的経路としてVEGF, BAFFシグナル伝達系遺伝子群/経路を同定した本研究成果は病態解明はもとより、治療標的やバイオマーカーの創出につながる可能性があり、難治性疾患の治療・診断の向上に寄与する可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：We performed immune repertoire analyses and whole-transcriptome sequencing for interstitial cystitis and bladder pain syndrome (IC/BPS). Clonal expansion of infiltrating T and B lymphocytes was confirmed. Especially, B cell clonal expansion was characteristic feature of IC/BPS. Hierarchical clustering analysis identified a distinct gene expression profile in samples from patients with IC/BPS with Hunner lesions, and subsequent pathway analysis revealed up-regulation of biological processes involving immune responses and infection in these cases. Overexpression of VEGF and BAFF in IC/BPS with Hunner lesions was confirmed by quantitative PCR and immunohistochemistry. VEGF and BAFF could serve as potential disease biomarkers or therapeutic targets for IC/BPS with Hunner lesions.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：間質性膀胱炎 膀胱痛症候群 RNA-seq レパートリー解析 マイクロRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

間質性膀胱炎（IC）は、膀胱痛や頻尿などの症状をきたす膀胱の慢性炎症性疾患である。ICには膀胱内に「ハンナ病変」がある症例とない症例があるとされながら、両者の差異は明確ではなかった。この点に関し、私たちはハンナ病変を有するIC（ハンナ型IC）は、ハンナ病変を有しないIC（非ハンナ型IC）と比べて、膀胱組織の形質細胞浸潤や膀胱上皮の剥離が顕著であることを明らかにした。更に浸潤している形質細胞を精査し、特定のB細胞のクローン増殖が起きていることを突き止めた。すなわち、ハンナ型では強い炎症がみられ、その炎症の惹起・維持には特定の抗原刺激が関与していることが示唆される。一方、非ハンナ型の膀胱では、上皮細胞の接着分子の合成を抑制するmiRNA 200 familyの過剰発現を確認している。これは、ICの病因として膀胱上皮の透過性亢進が想定されていることと符合する。これらの成果を踏まえ、ICの成因や治療標的を更に追及するためには、病型別に異なるアプローチで、最新のゲノミクス解析手法を応用した研究が必要と考えた。即ち、ハンナ型では、次世代シーケンサーによる浸潤リンパ球のレパートリー解析を行い、特異的クローンの同定や認識される抗原の探索を行う。非ハンナ型ではEpigeneticな病態を仮定し、miRNA 200 familyの発現と機能を検討する。

2. 研究の目的

【ハンナ型ICに関する研究】

1) 次世代シーケンサーによる浸潤リンパ球のレパートリー解析

次世代シーケンサーを用いてT細胞、B細胞のレパートリー解析を行う。ドミナントなB細胞クローンの同定とその特性を評価し、コードする抗体が認識する抗原を探索して原因物質の同定を目指す。

2) 炎症関連遺伝子に関する検討

ハンナ型IC、非ハンナ型IC、IC類縁疾患である過覚膀胱、非IC対象群（膀胱癌正常部）に対して、網羅的遺伝子発現解析（RNA-seq）を行い、ハンナ型IC特異的炎症特性（炎症像の特徴や炎症の持続する機序）を明らかにする。

【非ハンナ型ICに関する研究】

1) マイクロアレイを用いた膀胱上皮のmiRNAの網羅的解析の再現性の確認

既に、非ハンナ型ICでmiR205など200ファミリーの発現亢進をマイクロアレイで検出している。検体数を更に増やすとともに、quantitative RT-PCRでその発現を確認する。あわせて、臨床検体を用いて、関連する多数の接着分子の発現を免疫組織学的手法で確認する。

2) 膀胱上皮の培養細胞におけるmiRNAの機能解析

培養細胞を用いて、miRNAによるタンパク発現の変化や細胞の機能障害（増殖性、透過性など）を検討する。

3) 有力なmiRNAの尿中濃度測定と診断マーカーとしての検討

上記の検討結果から有力なmiRNAが特定できれば、その尿中濃度を測定し、診断や治療経過観察のマーカーとしての有用性を検討する。

3. 研究の方法

【ハンナ型ICに関する研究】

① 次世代シーケンサーによる浸潤リンパ球のレパートリー解析

ハンナ型IC30例の生検で得られた膀胱組織を用いて浸潤しているT細胞、B細胞のレパートリー解析を行う。ドミナントなB細胞クローンの同定とそのICにおける特性の評価、コードする抗体が認識する抗原の探索によるICの原因物質の同定を目指す。対照群（膀胱癌組織、過活動膀胱各々10例）についても解析を行い、特定のB細胞のクローン性増殖がハンナ型間質性膀胱炎に特異的な現象であることを立証し、上記の包括的アプローチにより抗原の同定を目指す。

② 炎症の特性に関する検討

(A) RNA-seqによるハンナ型IC特異的炎症特性因子の探索

RNA-seqで絞り込まれた遺伝子群に対して、network/functional analysisを行い、その生物学的意義を検討する。候補遺伝子群が病態と関連性のあるものであった場合はRT-PCR等による検証や、免疫組織化学法による局在の検討を行う。(B) 臨床病理学的因子との対比

本研究に用いる検体に関しては患者背景、年齢、性別、病歴、症状スコアなどの臨床的因子を完備している。ゲノミクス解析の結果とこれら臨床的因子とを対比して臨床病理学的検討を行い、重症進展例や治療抵抗性について遺伝子変異、発現異常の観点から検証する。

4. 研究成果

① 次世代シーケンサーによる浸潤リンパ球のレパートリー解析

ハンナ型IC16症例、対照6症例（慢性膀胱炎3症例、膀胱癌3症例）でT細胞、B細胞抗原受容体遺伝子の網羅的解読に成功し、レパートリー解析を行った。ハンナ型ICでは対照群よりも浸潤リンパ球のクローナリティが有意に高かった（図1A、B）。とりわけB細胞のクローン性増殖は際立っており、同疾患に特徴的な現象であることが示唆された（図2）。

図1 (A (左) : T細胞レパートリー解析、B (右) : B細胞レパートリー解析)

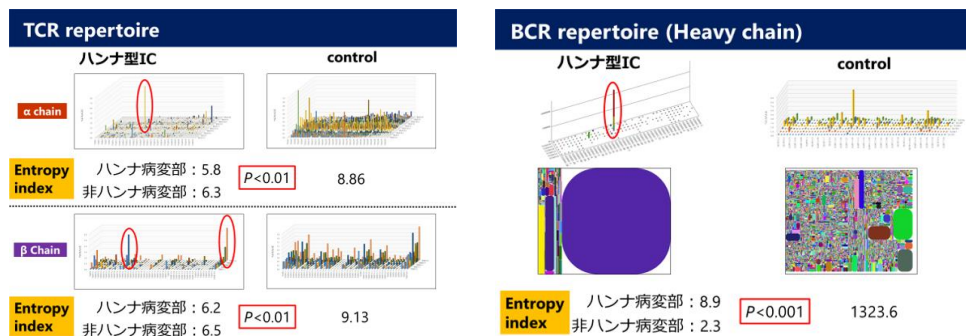
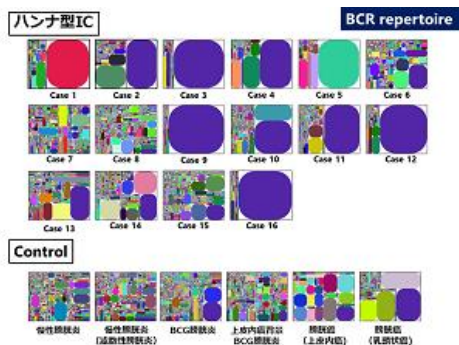


図2



② 抗原の局在同定を目的とした免疫組織学的検討

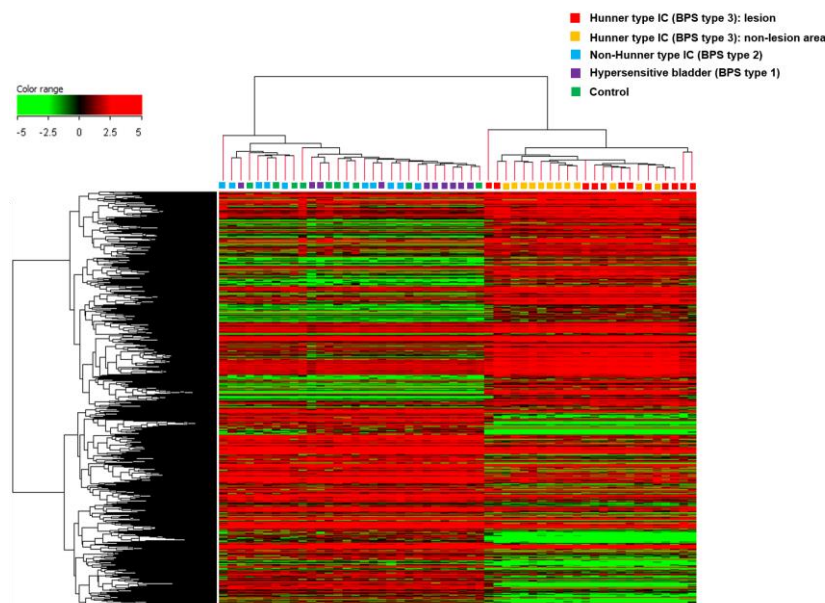
浸潤リンパ球のレパートリー解析によって同定されたB cell dominant cloneのうち、特にクローナリティの高かった2症例から抗体を再構築（自作）した。これらの自作抗体を用いて、膀胱全摘標本に対して免疫組織学的検討を行ったが、いずれの抗体からも特異的な染色結果は得られず、抗原/抗体の局在同定は困難であった。今回不成功に終わった要因として自作抗体の機能及び実験系の技術的な問題がなかったかを検証する必要がある。自作抗体の立体構造など化学的な評価や免疫組織染色の技術的プロセスの確認、および対象症例数の増加による検証を今後の検討課題とした。

③ 網羅的遺伝子発現解析：対象群間において統計学的に有意な発現変動を示す遺伝子として17,363遺伝子を同定した。

(A) 階層クラスタリング解析

変動遺伝子による階層クラスタリングでは、ハンナ型ICは非ハンナ型IC/過知覚膀胱やコントロールとは独立したクラスターを形成しており、特異的な遺伝子発現プロファイルを有することが示唆された（図3）

(図3)



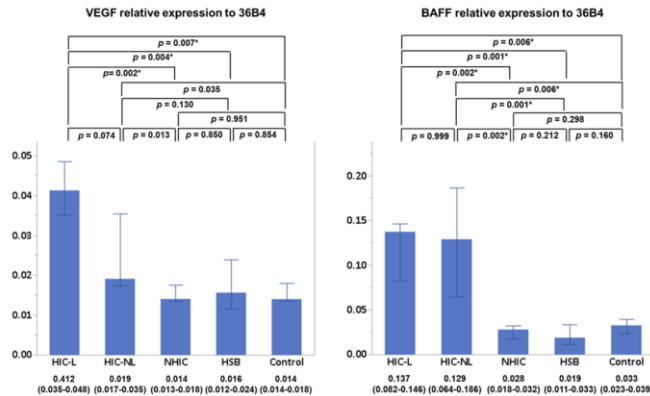
(B) 疾患特異的生物学的経路の探索：KEGG pathway解析

各群特異的な変動遺伝子を解析した結果、ハンナ型ICに特異的な発現変動遺伝子として5800遺伝子を特定した(上昇：3,004、低下：2,796)。これらに対して、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysisを施行し、特異的な変動を示す129の生物学的経路を同定した(上昇：112、低下：17)

④ ハンナ型IC特異的な変動遺伝子/生物学的経路の意義の検証

絞り込まれた経路(表1)の中から、NF-kappa B signaling pathway及びVEGF signaling pathwayに注目し、それぞれよりBAFF、VEGF遺伝子の変動についてqPCR及び免疫組織化学的解析にて検証を行った(図4、5)。ハンナ型ICではBAFF、VEGF遺伝子の発現が有意に上昇しており、疾患特異的であることを確認した。VEGF、BAFFはハンナ型ICの新規治療標的や疾患バイオマーカーとなりうる可能性がある。

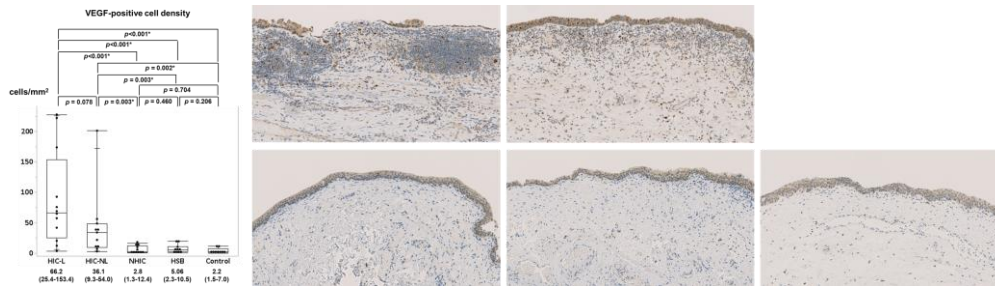
(図4) qPCR解析



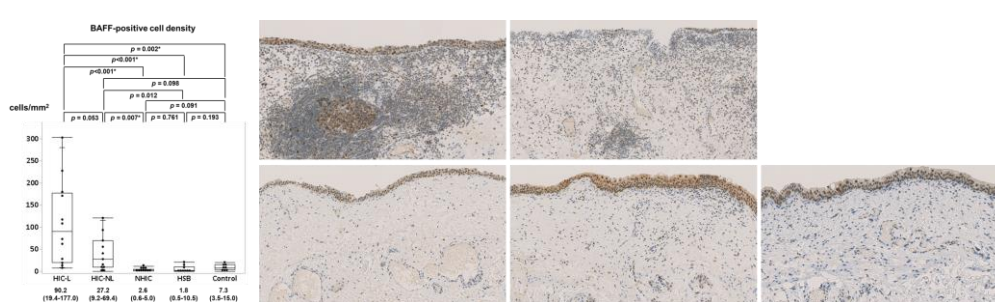
(図5) 免疫組織化学

VEGF (a) 及びBAFF (b) 発現細胞の定量解析(左)とVEGF (a) /BAFF (b) 抗体による免疫染色象(右、上段左：ハンナ型ICハンナ病変部、上段右：同非病変部、下段左：非ハンナ型IC、下段中：過知覚膀胱、下段右：コントロール)

(a) VEGF



(b) BAFF



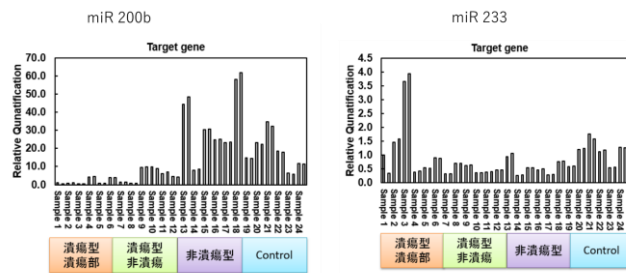
⑤ 臨床病理学的因子との相関性解析

VEGF/BAFFの発現強度は各臨床指標との間に統計学的有意な相関性を示し、疾患重症度を反映することが示唆された。これらは疾患特異的なマーカーとして有用であるばかりでなく治療効果や重症度判定にも有用なマーカーとなる可能性が示された。

⑥ 浸潤B細胞背景遺伝子異常の探索: 先行研究において特に際立ったB細胞クローン増殖が認められたハンナ型IC 3症例に対して、膀胱生検組織及び末梢血液を用いてエクソーム及びRNAシーケンスを施行し背景遺伝子異常を探索したが、既知の腫瘍原性遺伝子変異/融合遺伝子は同定できなかった。すなわち、ハンナ型ICにおける浸潤リンパ球のクローナル増殖は腫瘍性ではなく、特定の免疫応答によって惹起されていることが間接的に示された。

⑦ micro RNA 網羅的解析

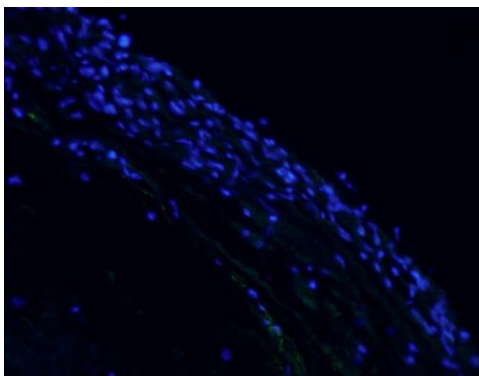
Pilot Study において、上昇が示唆されたmiRNA について、real-time PCR を行い、定量しvalidation を行った。Has-miR200 family については、NHIC にて著明な上昇、HIC では有意な低下を認めた。miR223 についてはHIC にて著明な発現の亢進を認めた(図6)。(図6)



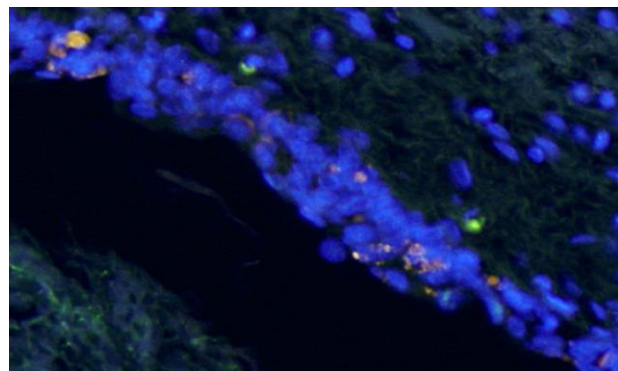
⑧ in situ hybridization

PCRにて確認されたmiRNAの局在を評価する目的で、in situ hybridizationを行った。その結果Controlと比較して、NHICでは上皮内に散在性に発現の亢進を認めた。NHICではreal time PCRでmiR200 familyの発現亢進を指摘されたが、in situ hybridizaionではその局在が上皮であることが突き止められた。miR200 familyはEMTに関与するため、上皮間葉転換の異常が間質性膀胱炎における症状の発現に関与している可能性が示唆された(図7)。これについては現在論文化を行っている。(図7)

Control



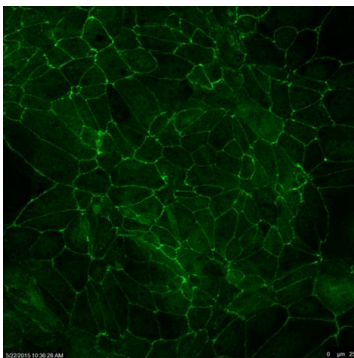
NHIC



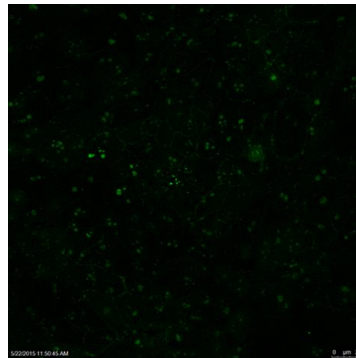
⑨SV-HUC-1細胞へのPre-miR-200b、Pre-miR-205の導入

miRNA 阻害 (Loss of Function)の検証とmiRNA 過剰発現 (Gain of Function)の検証をnon-malignant bladder cell lineであるSV-HUC-1細胞にmiRNAのprecursor/inhibitorを挿入して、候補となる標的遺伝子(mRNA)、主にZO-1やOccludin等の細胞接着に関与する遺伝子の発現解析を行った。結果としては両者とも発現の変化は認められなかった(図8)。今後他のターゲットで変動がないか検討を追加する。(図8)

ZO-1



Occludin



5. 主な発表論文等

- [雑誌論文] (計 7 件)
- [学会発表] (計 15 件)
- [図書] (計 8 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：新美 文彩
ローマ字氏名：Niimi, Aya
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部付属病院
職名：登録診療員
研究者番号（8桁）：00376451

研究分担者氏名：前田 大地
ローマ字氏名：Maeda, Daichi
所属研究機関名：大阪大学
部局名：医学系研究科
職名：特任教授
研究者番号（8桁）：30585500

研究分担者氏名：井川 靖彦
ローマ字氏名：Igawa, Yasuhiko
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名：特任教授
研究者番号（8桁）：40159588

研究分担者氏名：石川 俊平
ローマ字氏名：Ishikawa, Shumpei
所属研究機関名：東京大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：50418638

研究分担者氏名：伊藤 雅史
ローマ字氏名：Ito, Masafumi
所属研究機関名：地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）
部局名：東京都健康長寿医療センター研究所
職名：研究部長
研究者番号（8桁）：80393114

研究分担者氏名：森川 鉄平
ローマ字氏名：Morikawa, Teppei
所属研究機関名：東京大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：客員研究員
研究者番号（8桁）：80451772

研究分担者氏名：相澤 直樹
ローマ字氏名：Aizawa, Naoki
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名：特任講師
研究者番号（8桁）：80595257

※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、研究者個人に帰属されます。