

平成30年6月4日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10619

研究課題名(和文) 間質性膀胱炎の尿中マーカーの探索

研究課題名(英文) Interstitial cystitis and possible urine biomarkers

研究代表者

新美 文彩 (Niimi, Aya)

東京大学・医学部附属病院・登録診療員

研究者番号：00376451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：間質性膀胱炎は頻尿や膀胱痛をきたす原因不明の指定難病であるが、近年病型分類が着目されている。組織学的には炎症をベースとして、粘膜糜爛が著明なハンナ型と、非炎症性で粘膜変化のない非ハンナ型の2型に分類されるが、いずれも診断には生検や膀胱鏡が必須である。本研究では非侵襲的な尿中バイオマーカーを探索した。当初microRNAに着目し、組織中のmiRNA発現について網羅的解析およびISHを行った。解析中にハンナ型と非ハンナ型ではケモカイン関連遺伝子の発現量に有意差があることがわかった。尿中ではCXCL10やNGFが有意に上昇しており、非侵襲的にハンナ型と非ハンナ型が鑑別できることを論文にて報告した。

研究成果の概要(英文)：Interstitial cystitis are refractory disease with unknown etiology. There is no radical treatment so far. The aim of our study is to investigate microRNA, chemokines and cytokines elevated in the bladder tissue of Hunner type interstitial cystitis (HIC) as urinary markers for distinguishing HIC from non Hunner type interstitial cystitis (NHIC). In the first and second year, microarray analysis of miRNA was performed and found miR200 families were elevated in NHIC, compared to HIC and the control groups. It was validated by real-time PCR. Additionally, in situ hybridization of miR200 family was performed. It showed miR-200b was localized in urothelium of NHIC whereas no miR-200b was detected in HIC. Through these analysis, we found that genes related to chemokine are elevated in both HIC. In third year, ELISA was performed to evaluate feasibility of those markers found in the second year. The CXCL10 and NGF was elevated in HIC and CXCL10 can be used as arpossible biomarker

研究分野：排尿機能学

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(以下 Interstitial Cystitis: IC と略す)は頻尿・尿意切迫感・膀胱痛・骨盤痛を伴う原因不明の慢性炎症性疾患であり、その強い自覚症状により日常生活に支障をきたす難治性疾患である。米国では女性 120 万人、男性 8 万人の患者がおり、本邦でも 20 万人が罹患していると推定されている。診断法が確立されていなかったため泌尿器専門医ですら見逃しやすく、また難治性であるがゆえに放置されやすい疾患であったが、2009 年に共同研究者の本間らが作成した診療ガイドラインの普及などにより泌尿器科専門医だけでなく、家庭医および一般市民にも広く認知され始めてきている。2010 年にはアジア地域の泌尿器科学会においても Interstitial cystitis/ Hypersensitive bladder syndrome (HBS)の概念でガイドラインが作成されている。しかし、患者数が増加するだけ治療に難渋する症例も増えてきており、病態の解明および治療方法の確立が急務と考えられる。また、泌尿器科医であっても IC の専門家が少ないため、我々の教室には他の高次医療機関からの紹介患者が集中し、国内ではトップ 3 に入る IC の診断・治療機関となっている。

間質性膀胱炎の専門機関の中で基礎研究を行っている施設は非常に少なく、おそらく本邦では我々の教室が最も豊富に基礎実験で使用可能な間質性膀胱炎患者の膀胱サンプルを所有していると考えられる。その点より、IC の病態や治療方法の研究を行い、難治性疾患に苦しむ患者達に「病因の解明と根治療法の確立」という形で還元することが、我々の教室の責務でもあると考えている。

### 2. 研究の目的

・間質性膀胱炎は原因不明の強い膀胱痛を呈する難治性炎症性疾患で、診断方法も確立していない。唯一、Hunner's Lesion と呼ばれる粘膜変化があるのみで、生化学的なバイオマーカーは未だない。

・我々は間質性膀胱炎の患者組織を用いて mRNA と miRNA の発現をマイクロアレイを用いて網羅的解析を行い、報告してきたが、miRNA のなかでは miR-200 ファミリーに変化を認めていた。この知見を元に miRNA 標的遺伝子の同定および定量、ルシフェラーゼアッセイで標的とする mRNA に結合するかの機能評価および In Situ Hybridization による局在評価を行う。

・尿中の miRNA 分泌を解析し、最終的には間質性膀胱炎のバイオマーカーを発見することが目的である。

### 3. 研究の方法

平成 27-28 年度計画

miRNA の定量、標的 mRNA の同定および発現の評価、miRNA 阻害 (Loss of Function) および過剰発現 (Gain of Function) による機能評価

IC の病因の一つとして考えられている膀胱

上皮の透過性亢進には tight junction の異常が関与していると考えられる。

我々がすでに行ってきたマイクロアレイによる解析ではこの tight junction を構成するタンパクの messenger RNA を調節すると考えられている miR-205-5p と miR200 Family の発現が亢進しており、検体数を増やして qRT-PCR でも再評価を行った後に、機能解析を行う。

具体的には下記の内容の実験を行う。

IC 膀胱標本とコントロール膀胱標本の両者を用いて miRNA (200 Family) の qRT-PCR による発現の評価

miRNA の標的遺伝子の同定(標的遺伝子の予測アルゴリズム Target Scan などを用いての解析)

miRNA 阻害 (Loss of Function) の検証

miRNA 過剰発現 (Gain of Function) の検証

- はヒトの 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) の qPCR および標的タンパクの Western Blotting による解析する。

平成 28 年度計画

ルシフェラーゼアッセイによる miRNA の 3' UTR への結合の証明 (相互作用の証明)

レポーター、エフェクタープラスミドの複製、細胞のプレATING およびトランスフェクション

細胞抽出液の調整

ルシフェラーゼ活性の測定: 細胞溶解液を 96well プレートへ写しプレートと発光基質液をマルチラベルカウンタへセットしルシフェラーゼ活性を測定する。

2. In Situ Hybridization による組織内 miRNA の局在の評価 (平成 28 年度)

IC 患者の膀胱標本とコントロールのヒト膀胱標本を用いて miRNA の局在を評価する。

すでに作成されている患者標本 (FFPE) を用いる。脱パラシプロテナーゼ K で incubation した後に標本の脱水

ハイブリダイゼーション: 標本にハイブリダイゼーション液 (microRNA ISH Buffer +LNA Detection Probe) を乗せ 1 時間ハイブリダイズ。SSC 溶液での洗浄

ブロッキング後に anti-DIG 溶液を投与し、洗浄後に AP Substrate を投与し、incubation

KTBT で再度 incubation し、反応を停止。カウンターステインし、洗浄後脱水・固定。

平成 29 年度計画

3. 尿中 miRNA の解析および患者プロフィールとの突合 (平成 29 年度)

1-2 で解析を行った結果で今回評価する

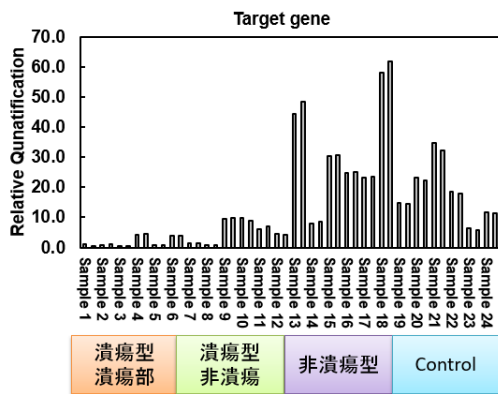
miRNA と疾患の関連性が立証された場合は、上皮から尿中に miRNA が分泌されている可能性が考えられる。すでに当院で多数保存されている患者とコントロール症例の尿のサンプルを用いて、尿中の miRNA の測定を行う。これらの尿中 miRNA をコントロール症例や患者の症状および内視鏡所見・病理標本と突合し、相関性があるかどうか解析を行う。

#### 4. 研究成果

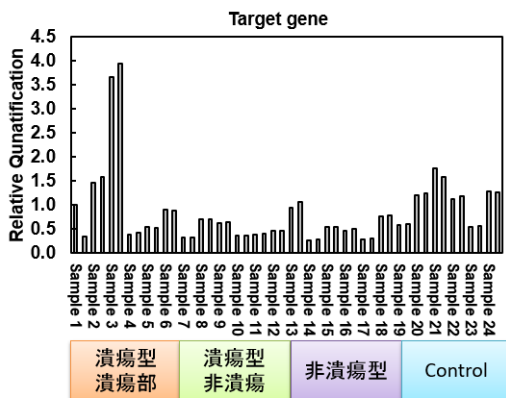
micro RNA 網羅的解析

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。

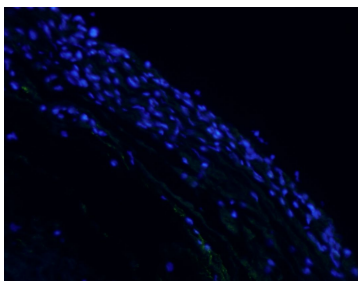
Has-miR200 family については下図のごとく、NHIC にて著明な上昇、HIC では有意な低下を認めた。



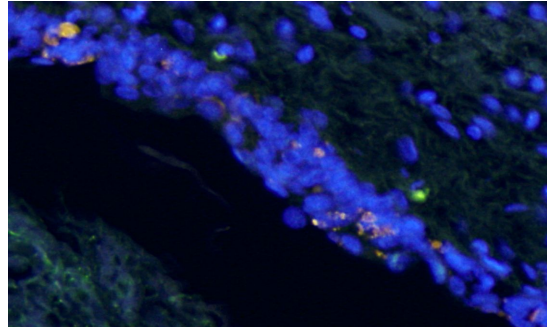
miR223 についてはHICにて著明な発現の更新を認めた。



In situ hybridization  
Control



#### NHIC

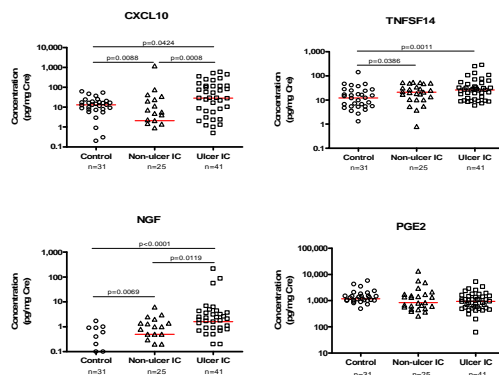


Control と比較して、NHIC では上皮内に散在性に発現の亢進を認めている。

NHIC では real time PCR で miR200 family の発現亢進を指摘されたが、in situ hybridizaion ではその局在上皮であることが突き止められた。これについては現在論文化を行っている。

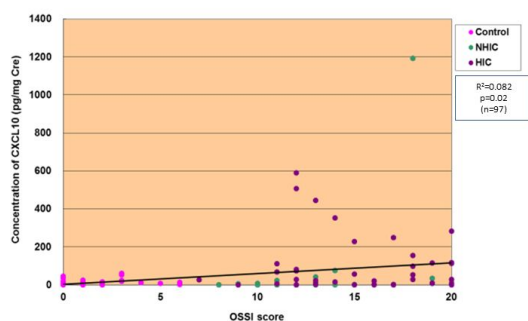
#### 尿中バイオマーカーの模索

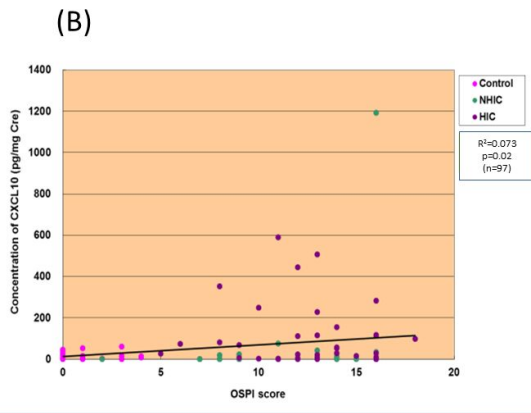
潰瘍型間質性膀胱炎では強い炎症反応がみられることから、CXCL3 およびその結合ケモカイン (CXCL9、10、11)、helper T cell 関連サイトカイン (TNFSF14)、NGF、PGE2 などについて、その尿中濃度を測定した。



間質性膀胱炎群では尿中 CXCL10 と TNFSF14 と NGF が有意に上昇していたが、そのうち症状との相関を示したものは CXCL10 のみであった。この結果については Neurology and Urodynamics で論文報告した。

#### (A)





## 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 24 件)  
英文原著

- Kamei, J., Furuta, A., Akiyama, Y., Niimi, A., Ichihara, K., Fujimura, T., Fukuhara H, Homma Y, Igawa, Y. Video urodynamic effects of mirabegron, a 3 adrenoceptor agonist, in patients with low compliance bladder. *International Journal of Urology*, 22(10), 956-961.2015
- Akiyama Y, Nomiya A, Niimi A, Yamada Y, Fujimura T, Nakagawa T, Fukuhara H, Kume H, Igawa Y, Homma Y. Botulinum toxin type A injection for refractory interstitial cystitis: A randomized comparative study and predictors of treatment response. *Int J Urol.* 2015 Sep;22(9):835-41.
- Yamada Y, Nomiya A, Niimi A, Igawa Y, Ito T, Tomoe H, Takei M, Ueda T, Homma Y. A survey on clinical practice of interstitial cystitis in Japan. *Transl Androl Urol.* 4(5): 486-90, 2015.
- Nishimatsu, H., Suzuki, E., Saito, Y., Niimi, A., Nomiya, A., Fukuhara, H., ... & Homma, Y. (2015). Senescent cells impair erectile function through induction of endothelial dysfunction and nerve injury in mice. *PloS one*, 10(4), e0124129.
- Nishimatsu, H., Suzuki, E., Saito, Y., Niimi, A., Nomiya, A., Yamada, D., & Homma, Y. (2015). Neuromedin B restores erectile function by protecting the cavernous body and the nitrergic nerves from injury in a diabetic rat model. *PloS one*, 10(7), e0133874.
- Maeda D, Akiyama Y, Morikawa T, Kunita A, Ota Y, Katoh H, Niimi A, Nomiya A, Ishikawa S, Goto A, Igawa Y, Fukayama M, Homma Y. Hunner-type (classic) interstitial cystitis: a distinct inflammatory disorder characterized by pancystitis, with frequent expansion of clonal B-cells and epithelial denudation. *PloS one*, 2015, 10.11: e0143316.
- Fujimura, T., Menon, M., Fukuhara, H., Kume, H., Suzuki, M., Yamada, Y., Niimi, A., Nakagawa, T., Igawa, Y. and Homma, Y. (2016), Validation of an educational program balancing surgeon training and surgical quality control during robot-assisted radical prostatectomy. *Int. J. Urol.*, 23: 160-166. doi:10.1111/iju.12993
- Niimi A, Nomiya A, Homma Y et al. Hydrodistension with or without fulguration of Hunner lesions for interstitial cystitis ; long term outcomes and prognostic predictors. *Neurouro Urodyn* 2016, 35.8: 965-969.
- Akiyama Y, Morikawa T, Maeda D, Shintani Y, Niimi A, Nomiya A, Igawa Y, Homma Y. Increased CXCR3 Expression of infiltrating plasma cells in hunner type interstitial cystitis. *Scientific reports*, 2016, 6, 28652.
- Niimi A, Suzuki M, Yamaguchi Y, Ishii M, Fujimura T, Nakagawa T, Igawa Y, Homma Y. Sleep apnea and circadian extracellular fluid change as an independent factor for nocturnal polyuria. *J Urol* 2016
- Niimi A, Nomiya A, Homma Y et al. Diagnostic value of urinary CXCL10 as a biomarker for predicting Hunner type interstitial cystitis. *Neurouro Urodyn*, 2017, accepted
- Yoshida, M., Igawa, Y., Higashimura, S., Suzuki, M., Niimi, A., & Sanada, H. (2017). Translation and reliability and validity testing of a Japanese version of the Intermittent Self Catheterization Questionnaire among disposable and reusable catheter users. *Neurourology and urodynamics*, 36(5), 1356-1362.
- Fujimura T, Fukuhara H, Taguchi S, Yamada Y, Sugihara T, Nakagawa T, Niimi A, Kume H, Igawa Y, Homma Y. Robot-assisted radical prostatectomy significantly reduced biochemical recurrence compared to retro pubic radical prostatectomy *BMC Cancer* 2017;17:454
- Akiyama, Y., Maeda, D., Morikawa, T., Niimi, A., Nomiya, A., Yamada, Y., ... & Homma, Y. (2017). Digital quantitative analysis of mast cell infiltration in interstitial cystitis. *Neurourology and*

- Urodynamics in press
15. Fujimura, T., Fukuhara, H., Taguchi, S., Yamada, Y., Sugihara, T., Nakagawa, T., Niimi, A., Homma, Y. (2017). Robot-assisted radical prostatectomy significantly reduced biochemical recurrence compared to retro pubic radical prostatectomy. BMC cancer, 17(1), 454.
  16. Akiyama Y, Niimi A, Nomiya A, Yamada Y, Nakagawa T, Fujimura T, Fukuhara H, Igawa Y, Homma Y. (2018). Extent of Hunner lesions: The relationships with symptom severity and clinical parameters in Hunner type interstitial cystitis patients. Neurourology and urodynamics.in press

#### 和文総説

- 1) 新美文彩 本間之夫 間質性膀胱炎に対するボツリヌス毒素注入療法 泌尿器外科 2016
- 2) 新美文彩 本間之夫 JMEDJ 治療法便覧 2016～私の治療～泌尿器科領域 間質性膀胱炎
- 3) 新美文彩 本間之夫 間質性膀胱炎 成人病と生活習慣病 46(10),2016
- 4) 新美文彩 本間之夫 夜間頻尿の疫学と病態 Progress in Medicine 36:9-13,2016
- 5) 新美文彩 本間之夫 間質性膀胱炎と過活動膀胱 泌尿器外科 30, 2017
- 6) 新美文彩 深淵なる夜間頻尿 睡眠呼吸障害 臨床泌尿器科 2018 in press
- 7) 新美文彩 泌尿器科手術・周術期管理に役立つ解剖と生理 特集 10 間質性膀胱炎泌尿器  
泌尿器 Care& Cure  
Uro\_Lo 2018

#### ビデオジャーナル原著

新美文彩 日本泌尿器科学会 JUA Academy Web キャスト 間質性膀胱炎の膀胱水圧拡張術の標準化をめざして 2016

〔学会発表〕(計 7 件)

#### 招聘講演

- 1) 第日本睡眠学会第40回定期学術集会 シンポジウム「夜間多尿の疫学と病態」2015年7月(新美文彩)
- 2) 第22回日本排尿機能学会 イブニングセミナー「過活動膀胱とその類似疾患 尿意切迫か尿意亢進か」2015年9月(新美文彩、本間之夫)
- 3) 第60回日本泌尿器科学会東部総会シンポ

- ジウム「難治性OABと間質性膀胱炎の治療」2015年9月(新美文彩、本間之夫)
- 4) 第23回日本排尿機能学会 教育セミナー(日本排尿機能学会認定医申請教育講演)「Female LUTS update-間質性膀胱炎」2016年9月(新美文彩)
  - 5) 第61回日本泌尿器科学会東部総会パネルディスカッション「はじめてのFemale Urology」2016年10月(新美文彩)
  - 6) 第24回日本排尿機能学会 教育セミナー(日本排尿機能学会認定医申請教育講演)「間質性膀胱炎の膀胱鏡および病理所見」2017年10月(新美文彩)

#### 国内学会発表

- 1) 第 103 回日本泌尿器科学会総会、2015年4月、過知覚膀胱質問票(HSBSS)の初期的検討
- 2) 第 22 回排尿機能学会、札幌、2015年9月9日、新美文彩：過知覚膀胱(間質性膀胱炎ではないが、過知覚膀胱症状を呈する病態)の臨床的特徴の検討
- 3) 第 104 回日本泌尿器科学会総会、2016年、ビデオ演題、間質性膀胱炎に対する膀胱水圧拡張術およびハンナ病変焼灼術の標準化および一般泌尿器科医への普及を目指して
- 4) 第 23 回排尿機能学会、
- 5) 第 105 回日本泌尿器科学会総会、鹿児島、2017年、International Session、Atrophic bladder as an end stage interstitial cystitis
- 6) 第 24 回排尿機能学会、東京、学会賞候補演題、間質性膀胱炎の疼痛慢性化におけるリゾリン脂質の関与
- 7) 第 27 回泌尿器分子細胞研究会、東京、間質性膀胱炎の疼痛慢性化におけるリゾリン脂質の関与

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
新美 文彩 (Niimi, Aya)  
東京大学・医学部附属病院・登録診療員  
研究者番号：00376451

(2)研究分担者  
野宮 明 (Nomiya, Akira)  
東京大学・医学部附属病院・登録診療員

研究者番号：30372379  
藤田 泰典 (Fujita, Yasunori)  
東京都健康長寿医療センター研究所 研究員  
研究者番号 (30515888)

井川 靖彦 (Igawa, Yasuhiko)  
東京大学医学部附属病院 特任教授  
研究者番号：40159588

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

伊藤 雅史 (Ito, Masafumi)  
東京都健康長寿医療センター研究所 研究部長  
研究者番号：80393114

相澤 直樹 (Aizawa, Naoki)  
東京大学医学部附属病院 特任講師  
研究者番号：80595257