

令和元年5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06639

研究課題名（和文）免疫性炎症と尿路上皮剥離の遺伝学的変化探索によるハンナ型間質性膀胱炎の病態解明

研究課題名（英文）Elucidation of pathogenesis of Hunner type interstitial cystitis based on genomic exploration for immunological inflammation and epithelial denudation

研究代表者

秋山 佳之（Akiyama, Yoshiyuki）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20529135

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000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、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の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を同定した。本成果は新規バイオマーカーや治療戦略の開発に寄与する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IC/BPSの疾患概念確立及び病態解明に向けた分子生物学的エビデンスの創出を行い、IC/BPSは大きく2群に区別される症状症候群であることを明らかにした。また、一部の病型では、病態の背景に特定の免疫学的機序またはB細胞増殖性疾患の存在が示唆されること、VEGFとBAFF蛋白の発現が特異的に上昇していることを同定した。これらの成果はIC/BPSの疾患概念・病型分類を確立させるとも、新規治療戦略の開発にも大きく寄与する可能性が高く学術的意義が高い。また、原因不明の難病に対して新規治療法の開発がなされればその社会的意義も極めて高いものとなる。本研究結果はこれらに繋がる可能性を持つものである。

研究成果の概要（英文）：We performed whole-transcriptome sequencing of interstitial cystitis and bladder pain syndrome (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：網羅的遺伝子発現解析 慢性疼痛 免疫性炎症

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。特有の症状により QOL は著明に低下するが、病因は不明で客観的診断基準を欠き、確立した治療もない。2015 年には泌尿器科領域の成人疾患として初の指定難病となった。

IC には膀胱内に「ハンナ病変 (潰瘍)」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、私たちは多数症例を用いた解析の結果、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、膀胱組織のリンパ球・形質細胞浸潤や膀胱上皮の剥離が顕著であることを、最新の画像解析ソフトを用いて定量的に明確に示した (Maeda D, Akiyama Y et al., 2015)。更に浸潤しているリンパ球のレパートリー解析を行い、T 細胞、B 細胞が共にクローナル増殖を起こしていることを突き止めた。なかでも、一部の症例では特定の B 細胞が圧倒的なドミナンスで増殖していることが判明した。また、浸潤形質細胞では免疫細胞の炎症部位への遊走に関与するケモカインレセプターである CXCR3 受容体の発現が亢進していることを同定した (図 1C) (Akiyama Y et al., 2016)。以上から、ハンナ型 IC では間質の免疫性炎症と上皮の広範な剥離がみられることを明らかにした。しかしながら、この特徴的な免疫性炎症と尿路上皮剥離の関連性やその遺伝学的背景には不明な点が多く残されている。

尿路上皮剥離と間質の免疫反応との関連性を明らかにすることは、IC の病態解明に必須である。すなわち、尿路上皮の機能異常によって上皮バリア効果が破綻し、間質に尿が浸透して免疫反応が惹起されるのか、内因性または外因性の物質に対する免疫反応が生じて、その結果として上皮剥離が惹起されるのか、この点を明確にすることが必要である。その点が明らかになれば、IC の病態の本質的な解明が可能となり、診断や治療での breakthrough が期待される。

そこで本研究では、ハンナ型 IC 及び対照 (非 IC 膀胱) のヒト組織検体に最新のゲノミクス解析手法を応用し、免疫反応と上皮剥離の病態をさらに解明することを考えた。すなわち、1) リンパ球のレパートリー解析 (抗原受容体遺伝子の網羅的解読) によって B 細胞 dominant clone の塩基配列を解読してモノクローナル抗体を作成し、免疫組織学的手法を用いてその分布を検討することで抗原の局在を明らかにすること、および 2) 膀胱生検検体よりマイクロダイセクションにより尿路上皮と上皮間質を分取し、トランスクリプトーム解析やエクソーム解析による網羅的遺伝子解析を行い、ハンナ型 IC の尿路上皮またはリンパ球における特異的遺伝子発現や変異を探索する。

現時点でハンナ型 IC 患者 15 症例に対してリンパ球レパートリー解析は終了しており、全症例において dominant clone の塩基配列を同定している。また、当教室自己予算を投じて組織バンクの確立も完了させており、研究対象症例の膀胱生検検体を単純凍結、コンパウンド包埋凍結、RNA-later 浸漬の各方式にて保存が完了している。

2. 研究の目的

1) 抗原探索

浸潤リンパ球 Dominant clone が認識している抗原の局在同定を目的として病理組織学的検討を行う。具体的には、ハンナ型 IC 病理組織検体内における T cell、B cell clone の分布形式を免疫組織化学、in situ hybridization によって把握し、ゲノム解析 (レパートリー解析) の結果をふまえて絞り込まれた各種抗体 (dominant clone) の局在を免疫組織化学的に評価する。これにより免疫反応の原因となっている 抗原の局在を明らかにする。

2) 尿路上皮特異的疾患関連遺伝子の解析

ハンナ型 IC 膀胱組織検体よりマイクロダイセクションによって尿路上皮と間質を分取し、各々に対してトランスクリプトーム (RNA シーケンス) 解析、エクソーム解析を行う。

(A) 尿路上皮機能異常の探索: 尿路上皮組織の RNA シーケンスを行い、発現プロファイリングだけではなく、特異的スプライスバリエントの検索やメチル化シーケンス、さらには miRNA や siRNA などのノンコーディング RNA の構造多型の検出などエピジェネティックな機構にまで踏み込んで解析し、尿路上皮機能異常の原因となる特異的な遺伝子発現変化を明らかにする。

(B) 浸潤 B 細胞背景遺伝子異常 (特に腫瘍原性遺伝子変異/融合遺伝子) の探索: 先行研究で我々が明らかにした特定の B 細胞クローンの圧倒的な増殖は、B 細胞系の腫瘍性増殖として捉えることもできる。そこで、浸潤細胞の背景遺伝子異常を探索し、特に 腫瘍原性遺伝子変異/融合遺伝子に変化がないかを明らかにする。

3. 研究の方法

ハンナ型 IC 膀胱組織の上皮及び間質それぞれにおける遺伝子異常の探索及び遺伝子発現変化/制御の探索と、ハンナ型 IC 組織浸潤 dominant B cell clone の塩基配列に基づいた自作抗体の作成による免疫組織化学的検討を行った。

<平成 29 年度計>

(1) 対象症例の選定・追加

東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会より本研究に関する倫理承認を得た 2013 年以降に当施設で膀胱水圧拡張術（膀胱生検）または膀胱全摘除術を施行されたハンナ型 IC 症例に対して組織学的評価を行い、上皮剥離及び上皮下組織への B 細胞浸潤が豊富な症例を選出する。これらの症例に対して、浸潤リンパ球のレパトリー解析（リンパ球抗原受容体遺伝子の網羅的解読）を行い、B cell clonal expansion を認める症例を研究対象とする。先行研究により、申請現時点ですでに 15 症例を確定しているが、今年度中に更なる症例の蓄積を行い、全体でハンナ型 IC 30 症例を目標とする。一方、対照群は非 IC 慢性膀胱炎、膀胱癌（の非癌部）、過活動膀胱各々 10 症例とする。

(2) レーザーマイクロダイセクションによる分取

東京大学大学院医学系研究科泌尿器外科学教室が保有するレーザーマイクロダイセクション装置を用いて、上記症例のコンパウンド包埋された凍結切片より尿路上皮と上皮下組織を分取する。

(3) エクソームシーケンス解析

レーザーマイクロダイセクションによって分取した各症例の上皮及び上皮下から DNA を抽出し次世代シーケンサーにて全エクソームシーケンス解析を行い、ハンナ型 IC 特異的遺伝子異常の検索を行う。上皮においては、特に尿路上皮構造異常に関する遺伝子変異を、上皮下においては浸潤 B 細胞の背景遺伝子異常を探求する。

(4) トランスクリプトーム（RNA シーケンス）解析

同様に、分取した上皮と上皮下に対して別個に次世代シーケンサーによる RNA シーケンス解析を行う。上皮に関しては RNA の発現変化のみならず発現制御異常も想定されるため従来の RNA マイクロアレイではなく、RNA シーケンスが適当であると考えた。上皮下組織に関しては主にサイトカインなどの特徴的遺伝子発現変化を探索し、免疫反応の解析に応用する。

(5) 抗原の局在の同定

浸潤リンパ球のレパトリー解析によって同定した B cell dominant clone のアミノ酸配列をもとに自作した抗体を用いた免疫組織学的検討を行い、ハンナ型 IC の病因となりうる抗原の局在同定を評価する。

<平成 30 年度>

(1) ハンナ型 IC 特異的遺伝子変異の生物学的意義の検証

次世代エクソーム/RNA シーケンスによって同定した遺伝子変異・融合遺伝子については、これまでバンキングしてきた多数症例のハンナ型 IC 試料を用いて Sanger sequence 法、FISH 法、RT-PCR 法による詳細な検討を行い、その頻度や治療効果等の臨床因子との相関を解析し、臨床病理学的検討を行う。

(2) ハンナ型 IC 特異的異常発現 RNA の生物学的意義の検証

RNA シーケンスによって絞り込まれた遺伝子群に対して、上皮及び上皮下を各々別個に 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 等による検証及びターゲット候補に対応するタンパクの western blotting 法による同定や、免疫組織化学法による局在の検討を行う。マイクロ RNA などの non-coding RNA の発現異常が想定された場合には、ヒト尿路上皮細胞株を用いた in vitro での強制発現・発現抑制実験を行い、細胞生物学的検索を行う。これらの成果により新規バイオマーカー発見に繋がる可能性がある。

(3) 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) 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。

(2) マイクロダイセクションによる尿路上皮と間質の分取

1mm 四方大のハンナ型 IC 膀胱粘膜より生検にて得られた凍結サンプルを用いて試みた。元々尿路上皮の剥離が疾患の特徴的所見であり、特に上皮剥離が顕著である病変部粘膜からは上皮が十分に残存している切片を得ることは不可能であった。非病変部にはある程度上皮が残存していることはこれまでの H-E 標本を用いた検討で確認しているが、サンプルサイズが小さく上皮が十分に残存している切片を得ることは出来なかった。今後はハンナ型 IC 膀胱全摘標本の非病変部より十分なサイズの検体を採取し、上皮が比較的豊富に残存しているケースを用いて同様の実験を再度行う必要がある。

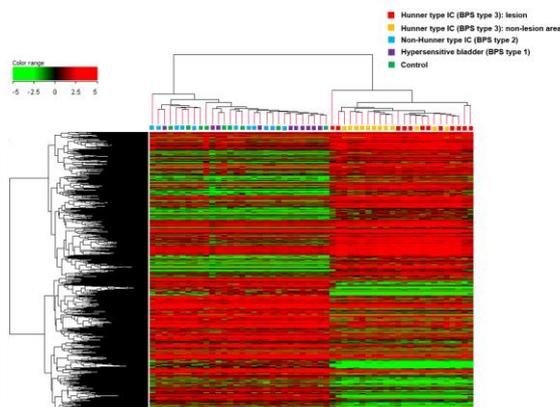
以上、ハンナ型 IC 膀胱生検サンプルを用いたマイクロダイセクションによる上皮と間質の別個の解析は本研究では困難であったため、以降の解析は上皮と間質を含む膀胱粘膜生検を用いて行った。

(3) 次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析：ハンナ型 IC、ハンナ病変を有しない非ハンナ型 IC、IC の類似病態である過知覚膀胱 (hypersensitive bladder : HSB)、及び下部尿路機能症状のない対象群より得られた膀胱粘膜生検サンプルを用いて RNA シーケンスを行い、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 はその類縁疾患 (非ハンナ型 IC と過知覚膀胱) 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示唆された (図 1)

(図 1) 間質性膀胱炎の遺伝子発現プロファイリング



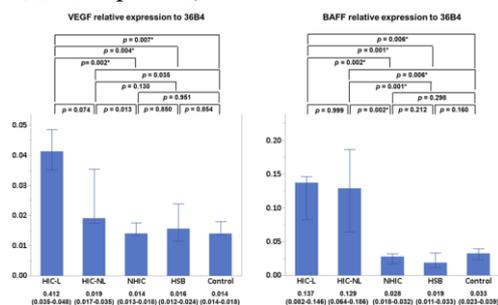
(B) 疾患特異的生物学的路の探索：KEGG pathway 解析

対象群間において統計学的に有意な発現変動を示す 17,363 遺伝子を用いて Karnaugh map を作成し、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。その他の各群間では同定された変動遺伝子数が少なく、意義のある結果は期待できないとして後につづく pathway 解析は施行しなかった。ハンナ型 IC 特異的変動遺伝子 (上昇: 3,004、低下: 2,796) 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 の生物学的路を同定した (上昇: 112、低下: 17)

(4) ハンナ型 IC 特異的変動遺伝子/生物学的路の意義の検証

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 2、3)。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。

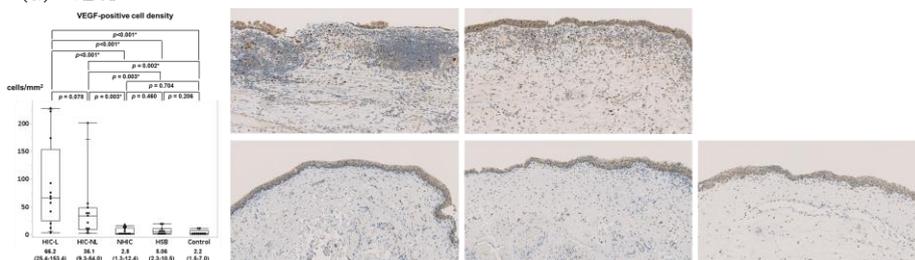
(図2) qPCR解析



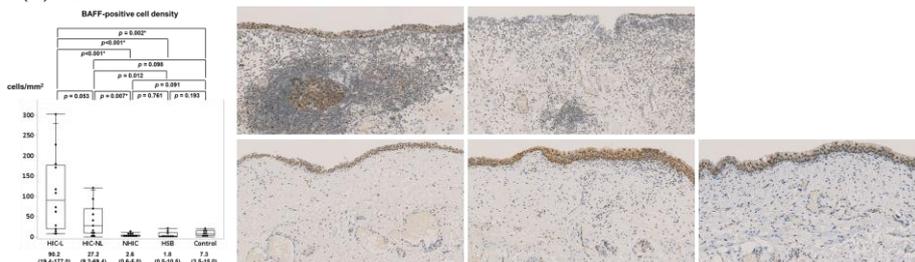
(図3) 免疫組織化学

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。

5. 主な発表論文等

- [雑誌論文] (計 7 件)
- [学会発表] (計 11 件)
- [図書] (計 8 件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
- [その他]

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者
該当なし

※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。