様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　５ 月 ２９ 日現在

機関番号：３２６５１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８K０９１５２

研究課題名（和文）間質性膀胱炎におけるゲノム解析を用いた膀胱内細菌叢の解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Analyses of bladder microbiota in Hunner type interstitial cystitis utilizing 16S rRNA gene sequencing

研究代表者
古田　昭（Furuta, Akira）

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：９０３４９６１３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は尿中メタ16S細菌叢解析法と拡大尿培養法を用いて、ハンナ型間質性膀胱炎（HIC）の病態を解明することを目的とした。研究開始当初は、乳酸桿菌の増加に伴って膀胱組織内が局所的に酸性化すれば、HICに特徴的な頻尿や膀胱痛が出現する可能性を強く疑っていたが、尿中メタ16S細菌叢解析の結果、ある種の細菌がHIC群で有意に増加していることが判明した（HIC関連菌）。一方、乳酸桿菌はHIC群・対照群ともに最も多い細菌であったが、HIC群と対照群の間に有意差はなく、HIC関連菌と乳酸桿菌の間にも有意な相関は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
尿中メタ16S細菌叢解析の結果、従来報告されていた細菌（乳酸桿菌）とは異なるハンナ型間質性膀胱炎（HIC）関連菌が判明したことは新規性に値する。さらに、拡大尿培養によって約40株のHIC関連菌を培養・同定・保管することに成功した。今後はこれらのHIC関連菌を用いて、尿中HIC診断キットや新規治療法を開発する予定であり、本研究には進歩性も認められる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to elucidate the pathogenesis of Hunner type interstitial cystitis (HIC) utilizing 16S rRNA gene sequencing and expanded quantitative urine culture. Although Lactobacillus was the most suspicious bacteria at the beginning due to the acidification in the bladder, resulting in urinary frequency and bladder pain, the other bacteria proved to be associated with the pathogenesis of HIC. On the other hand, Lactobacillus was the most dominant microorganism in both HIC and control groups, but there were no significant differences in the number of Lactobacillus between HIC and control groups and the relationship between the number of Lactobacillus and HIC-associated bacteria.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：間質性膀胱炎　16S細菌叢解析　ハンナ病変　膀胱内細菌叢

※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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

間質性膀胱炎とは膀胱の非特異的慢性炎症を認める疾患と定義されているが、クローン病や潰瘍性大腸炎といった腸の慢性炎症性疾患と同様に明らかな病因が未だ特定されてはいない。間質性膀胱炎のなかで、ハンナ病変を認める症例は頻尿や膀胱痛が強く、2015 年より難病に指定されている。患者数が欧米では 10 万人あたり 200-300 人程度と報告されており、わが国でも増加傾向にある [Leppilahiti M, J Urol 174:581, 2005; Clemens JQ, J Urol 173: 98, 2005]。

近年、腸内や口腔内細菌叢のゲノム解析が可能となった。同様に、尿中細菌叢のゲノムを解析した海外の報告によると、間質性膀胱炎患者では健常者と比較して、乳酸桿菌の割合が増加していた[Siddiqui H, BMC Microbio 12:205 2012]。実際、当院の治療前尿サンプル（78 症例）においても乳酸桿菌の可能性を示唆するグラム陽性桿菌が間質性膀胱炎患者で多く検出された(図 1)。また、尿中 D-Lactate が健常者と比較して間質性膀胱炎患者で有意に増加していた (図 2)。乳酸桿菌は通常人体に対する病原性はなく、乳酸を産生することにより周囲の環境を酸性化して、病原性のある菌から人体を守る働きをしている。しかし、乳酸桿菌の増加に伴って膀胱組織内が局所的に酸性化すれば、頻尿や膀胱痛が出現する可能性が示唆される。

図1

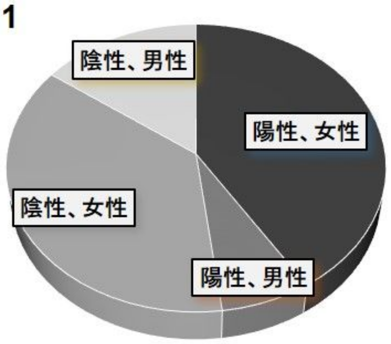


図2

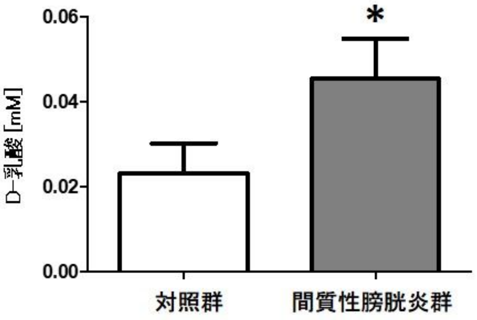


図 1：当院の間質性膀胱炎患者における術前グラム陽性桿菌陽性の割合、図 2：間質性膀胱炎患者と健常者の尿中 D-乳酸値の比較検討。

2. 研究の目的

本研究では、1）尿中メタ 16S 細菌叢解析を行い、間質性膀胱炎における乳酸桿菌を含む膀胱内細菌叢を明らかにする。また、2）乳酸桿菌を含む尿中細菌の培養・同定・保管とそれを用いた基礎実験を行い、間質性膀胱炎の病態を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

研究対象者

20 歳以上の東京慈恵会医科大学附属病院泌尿器科外来患者を対象として、間質性膀胱炎患者（30

例)、対照として腹圧性尿失禁、骨盤臓器脱、前立腺肥大症等で当科に通院中の患者のなかで、本研究の主旨に同意の得られた患者（30例）とする。

研究方法

① 尿中メタ16S細菌叢解析（平成30、令和1年度）：泌尿器科外来で尿道カテーテルを用いて採取した間質性膀胱炎患者あるいは対照患者の尿を遠心分離し、ペレットを泌尿器科学講座にて−80℃で保管する。後日、メタ16S細菌叢解析を外注し、間質性膀胱炎患者と対照患者の尿中細菌叢を比較検討する（本学の倫理委員会の承認（29-119）済)。

② 乳酸桿菌を含む尿中細菌の培養・同定・保管（平成30、令和1年度）：泌尿器科ラボにて、尿検体約1mLを遠心して通常の1000倍に濃縮したサンプル約100μLを血液寒天培地へ播種し、5日間好気・嫌気培養（通常は2日間）する「拡大尿培養法」を用いて、乳酸桿菌を含む尿中細菌を培養・分離・保管し、後日、遺伝子配列より菌を同定する（本学の病原体等安全管理委員会の承認（Ⅱ-2-35）済)。

③ 基礎実験（令和2年度）：動物実験研究施設にて、イソフルレン麻酔下に間質性膀胱炎患者より分離された乳酸桿菌を含む細菌を尿道カテーテルより10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7個でSDラットの膀胱内へ接種する（各群n=8)。メタボリックケージを用いて、頻尿が何日間持続するのかをそれぞれ検討する（in vivo)（各群n=8)。各実験終了後、ラット膀胱を摘出して病理組織学的検討を行う。また、乳酸桿菌等の細菌を10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7個でヒト膀胱上皮細胞あるいは平滑筋細胞へ接種し、細胞付着能ならびに培養液中の各種代謝産物（D-Lactate等）を測定する（in vitro)（本学の動物実験委員会の承認（2017-023）済)。

4． 研究成果

本研究を進めていくなかで、健常者における膀胱内細菌叢には性差があること[Fouts DE, J Transl Med 10:174, 2012]、女性の膀胱内細菌叢は膣内細菌叢と類似しており[Thomas-White K, Nature Commun 9:1557, 2018]、エストロゲン（閉経）の影響を強く受けること[Thomas-White K, Am J Obstet Gynecol 216:55, 2017]が徐々に解明されてきた。また、女性の場合は採尿法に関しても、中間尿はカテーテル尿と比較して約3倍の細菌が検出されることが報告された[国際禁制学会, 2019]。

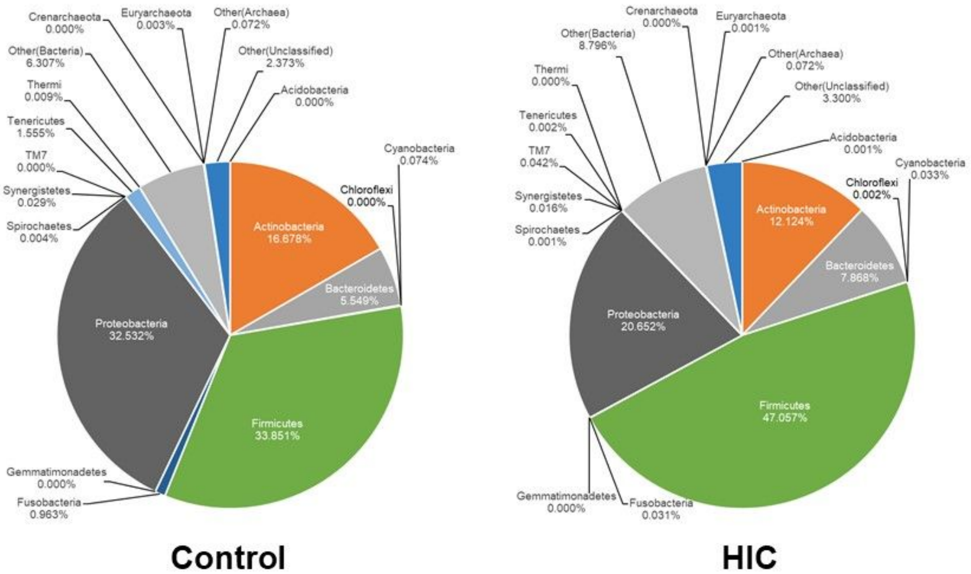
そこで、本研究では女性にターゲットを絞り、導尿で採取した尿（カテーテル尿）のみを用いて、尿中メタ16S細菌叢解析と拡大尿培養を施行した。女性のハンナ型間質性膀胱炎患者28例（平均年齢60.4歳、閉経前10例、閉経後18例）と対照群（平均年齢59.4歳、閉経前10例、閉経後13例）が本研究に組み入れられた。また、本邦では2019年に「間質性膀胱炎・膀胱痛症候群診療ガイドライン」が改訂され、ハンナ型間質性膀胱炎と膀胱痛症候群は異なる疾患として取り扱うことになったため、本研究ではハンナ型間質性膀胱炎（HIC）に関して検討した。門レベルにおけるメタ16S細菌叢解析結果を図3に示す。門レベルではHIC群と対照群の間に有意差は認められなかった。次に、属レベルで%リードの上位50の細菌について比較検討した結果、

ある種の細菌が HIC 群で有意に増加していることが判明した（HIC 関連菌）。さらに、これらの細菌は閉経前の HIC 女性において顕著に増加しており、閉経後で有意差は認められなかった。一方、乳酸桿菌は HIC 群・対照群ともに最も多い細菌であったが、HIC 群と対照群の間に有意差はなく、HIC 関連菌と乳酸桿菌の間にも有意な相関は認められなかった(r=-0.128)。また、HIC 関連菌と年齢（r=0.318)、間質性膀胱炎症状スコア（r=0.258)、膀胱疼痛スコア（r=0.261）との間に弱い相関が認められた。

また、拡大尿培養法を用いて、メタ 16S 細菌叢解析で判明した HIC 関連菌を培養・同定・保管することに成功した（約 40 株）。これら HIC 関連菌を 10^3，10^4，10^5，10^6，10^7 個で SD ラットの膀胱内へ接種したが、約 2 日で膀胱内より排除され、通常ラット（nude ラットではない）へヒト細菌の生着は困難と判断した。また、乳酸桿菌が HIC 関連菌ではなかったため、in vitro の実験は施行しなかった。

HIC 関連菌に関して、特許出願予定のため本成果報告書に詳細を記載することは出来ないが、令和 3 年度の基盤研究 C「膀胱内細菌叢を標的としたハンナ型間質性膀胱炎の尿中診断キットの開発」で本研究を継続していく予定である。

図3



5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計4件（うち査読付論文　4件／うち国際共著　1件／うちオープンアクセス　4件）

1．著者名	4．巻
Furuta A, Suzuki Y, Igarashi T, Koike Y, Kimura T, Egawa S, Yoshimura N	26
2．論文標題	5．発行年
Angiogenesis in bladder tissues is strongly correlated with urinary frequency and bladder pain in patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome	2019年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Int J Urol	35-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.1111/iju.13972	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている（また、その予定である）	－

1．著者名	4．巻
Furuta A, Yamamoto T, Suzuki Y, Gotoh M, Egawa S, Yoshimura N	29
2．論文標題	5．発行年
Comparison of inflammatory urine markers in patients with interstitial cystitis and overactive bladder	2018年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Int Urogynecol J	961-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.1007/s00192-017-3547-5	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている（また、その予定である）	－

1．著者名	4．巻
Furuta A, Yamamoto T, Igarashi T, Suzuki Y, Egawa S, Yoshimura N	29
2．論文標題	5．発行年
Bladder wall injection of mesenchymal stem cells ameliorates bladder inflammation, overactivity and nociception in a chemically induced interstitial cystitis-like rat	2018年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Int Urogynecol J	1615-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.1007/s00192-018-3592-8	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている（また、その予定である）	－

1．著者名	4．巻
Homma Y, Akiyama Y, Tomoe H, Furuta A, Ueda T, Maeda D, Lin AT, Kuo HC, Lee MH, Oh SJ, Kim JC, Lee KS	27
2．論文標題	5．発行年
Clinical guidelines for interstitial cystitis/bladder pain syndrome	2020年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Int J Urol	578-89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.1111/iju.14234	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている（また、その予定である）	該当する

〔学会発表〕　計13件（うち招待講演　9件／うち国際学会　8件）

1．発表者名 Furuta A
2．発表標題 Hunner type interstitial cystitis as a distinct disease
3．学会等名 6th The Asia-Pacific Urogynecology Association（招待講演）（国際学会）
4．発表年 2019年

1．発表者名 古田　昭
2．発表標題 間質性膀胱炎・膀胱痛症候群の内服薬治療
3．学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会（招待講演）
4．発表年 2019年

1．発表者名 古田　昭、五十嵐太郎、小池祐介、鈴木康之、穎川　晋、吉村直樹
2．発表標題 ハンナ型間質性膀胱炎患者における術前診断ならびに術後経過観察に有用な尿中マーカーの検討
3．学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4．発表年 2019年

1．発表者名 Furuta A
2．発表標題 Differences of urine markers in patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome with or without Hunner lesion
3．学会等名 14th Pan-Pacific Continence Society（招待講演）（国際学会）
4．発表年 2019年

１．発表者名
Furuta A, Igarashi T, Suzuki Y, Egawa S,Yoshimura N

２．発表標題
Distinct urine markers in patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome with or without Hunner lesion

３．学会等名
48th International Continence Society（国際学会）

４．発表年
2019年

１．発表者名
古田　昭

２．発表標題
間質性膀胱炎・膀胱痛症候群の診断・薬物療法

３．学会等名
第26回日本排尿機能学会（招待講演）（国際学会）

４．発表年
2019年

１．発表者名
Furuta A, Suzuki Y, Yamamoto T, Yoshimura N, Egawa S

２．発表標題
Pathophysiology of interstitial cystitis with or without Hunner lesion

３．学会等名
4th International Consultation on Interstitial Cystitis, Japan（招待講演）（国際学会）

４．発表年
2018年

１．発表者名
Furuta A

２．発表標題
Urine markers of IC

３．学会等名
16th Urological Association of Asia（招待講演）（国際学会）

４．発表年
2018年

１．発表者名
Furuta A, Igarashi T, Suzuki Y, Yamamoto T, Egawa S,Yoshimura N

２．発表標題
Angiogenesis in bladder tissues are strongly correlated with urinary frequency and bladder pain in patients with interstitial cystitis

３．学会等名
47th International Continence Society（国際学会）

４．発表年
2018年

１．発表者名
Furuta A, Igarashi T, Suzuki Y, Egawa S,Yoshimura N

２．発表標題
Correlation between angiogenesis in bladder tissues and urinary frequency or bladder pain in patients with interstitial cystitis

３．学会等名
13th Pan-Pacific Continence Society（国際学会）

４．発表年
2018年

１．発表者名
古田　昭

２．発表標題
新ガイドラインに基づいた間質性膀胱炎の定義・診断・治療

３．学会等名
第85回日本泌尿器科学会東部総会（招待講演）

４．発表年
2020年

１．発表者名
古田　昭、黒田康勝、山本徳則、鈴木康之、頴川晋、出澤真理

２．発表標題
ハンナ型間質性膀胱炎に対するMuse細胞治療の展望

３．学会等名
第27回日本排尿機能学会（招待講演）

４．発表年
2020年

1．発表者名 古田　昭
2．発表標題 新・間質性膀胱炎診療ガイドライン UP TO DATE　保存的治療・薬物療法
3．学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会（招待講演）
4．発表年 2020年

〔図書〕　計1件

1．著者名 本間之夫、秋山佳之、上田朋宏、高橋悟、武井実根雄、巴ひかる、古田昭、前田大地	4．発行年 2019年
2．出版社 リッチヒルメディカル	5．総ページ数 83
3．書名 間質性膀胱炎・膀胱痛症候群診療ガイドライン	

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関