

平成 23 年 5 月 31 日現在

機関番号 : 13601

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008 年 ~ 2010 年

課題番号 : 20591876

研究課題名 (和文) 間質性膀胱炎の遺伝子発現解析とバイオマーカーの検討

研究課題名 (英文) Gene expression as possible biomarker in bladder urothelium of patients with ulcerative interstitial cystitis

研究代表者 西沢 理 (NISHIZAWA OSAMU)

信州大学・医学部・教授

研究者番号 : 60091815

研究成果の概要 (和文) :

対象は潰瘍型間質性膀胱炎 (IC) 患者の 9 例と対照群の 9 例とし、採取した膀胱粘膜から Total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いて、遺伝子発現を検討した。IC 患者群と対照群と比べると 389 遺伝子が対照群で発現量が多く、175 遺伝子が IC 患者群で発現量が多かった。Ingenuity Pathway Analysis によるネットワーク解析では細胞間の情報伝達・相互作用が優位に認められた。定量的 RT-PCR による検討では IC において CXCR3 関連ケモカイン遺伝子の増加を認められ、バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) :

We investigated the genes responsible for ulcerative interstitial cystitis by DNA microarray analysis and quantitative real-time polymerase chain reaction. Bladder urothelial tissues were taken from a site apart from the ulcerative lesion in 9 patients with ulcerative interstitial cystitis and from a normal-looking area in 9 controls, including 7 with bladder carcinoma and 2 with benign prostatic hyperplasia. Total RNA was extracted from bladder samples and gene expression was compared between these 2 groups using Whole Human Genome DNA microarray 44K (Agilent Technologies, Santa Clara, California). Microarray data were analyzed by GeneSpring GX software and Ingenuity Pathway Analysis. Chosen genes were confirmed for altered transcription by quantitative real-time polymerase chain reaction. We identified 564 probes that were significantly expressed in mRNA more than 4-fold vs those in controls using volcano plot analysis ($p < 0.001$). Further network Ingenuity Pathway Analysis of these genes showed the top 3 functions, including 1) cell-to-cell signaling and interaction, and hematological system development and function, 2) inflammatory disease and 3) cellular development. Quantitative real-time polymerase chain reaction confirmed increased mRNA expression of several genes in the bladder samples of patients with ulcerative interstitial cystitis, including CXCR3 binding chemokines (CXCL9, 10 and 11) and tumor necrosis factor ligand superfamily member 14. Our study using DNA microarray analysis followed by quantitative real-time polymerase chain reaction reveals over expression of genes related to immune and inflammatory responses, including T-helper type 1 related chemokines, and cytokines such as CXCR3 binding chemokines and tumor necrosis factor ligand superfamily member 14. These genes may be potential interstitial cystitis biomarkers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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 遺伝子発現 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

間質性膀胱炎とは耐え難い恥骨上部痛や昼夜を問わない頻尿・尿意切迫感を生じる症候群で未だ共通の診断基準や決定的な治療法がない疾患である。米国では比較的ありふれた病気であり、100万人以上の患者（そのうち約90%が女性）がいると言われている。求心性知覚神経系（C-fiber）の異常、膀胱粘膜の異常などが指摘されているが、病因、病態ともに不明な点が多い。本邦でもこの疾患は年々増加傾向にあり診断治療が難しいため臨床的にも問題となっている。疾患の定義自体が曖昧なため間質性膀胱炎の診断は専門医においても難しく、間質性膀胱炎でありながら見過ごされている例や医療機関をたらい回しにされている例も少なくない。これは間質性膀胱炎の診断に有用なバイオマーカーがないためその診断が臨床症状、水圧下膀胱鏡所見などの主観的な指標に基づいてのみ行われるからである。近年膀胱粘膜（尿路上皮）の透過性の異常が指摘されていることから注目を浴びているのが、間質性膀胱炎患者の尿路上皮および尿中に特異的に発現してくるバイオマーカーの検索である。Antiproliferative factor (APF), heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) などが報告されているが、今のところ確定的なものはない。

2. 研究の目的

間質性膀胱炎患者の生検粘膜および尿を分子生物学的に解析することにより特異的バイオマーカーを探索する。

まず間質性膀胱炎患者の膀胱粘膜における遺伝子発現を包括的に検索する。膀胱粘膜から total RNA の抽出・精製を行い、得られた total RNA から DNA マイクロアレイに供するサンプルを調製する。本研究ではアジレントテクノロジー社のヒト全ゲノム DNA マイク

ロアレイ（約 41,000 プローブを搭載）を使用する。正常者との比較を行うことにより、間質性膀胱炎に特異的に発現の低下あるいは増強を認める遺伝子を特定する。さらに定量的 RT-PCR によってマイクロアレイ解析で得られた結果の検証実験を行い、特異的な遺伝子が特定できた場合、その最終産物であるタンパク質を尿中に求める。

3. 研究の方法

間質性膀胱炎患者の膀胱粘膜における遺伝子発現を包括的に検索する。膀胱粘膜から total RNA の抽出・精製を行い、得られた total RNA から DNA マイクロアレイに供するサンプルを調製する。本研究ではアジレントテクノロジー社のヒト全ゲノム DNA マイクロアレイ（約 41,000 プローブを搭載）を使用する。

対象は (i) 間質性膀胱炎と診断された症例もしくは間質性膀胱炎の罹患が疑われる症例で麻酔下膀胱拡張術および膀胱粘膜生検を受ける患者。(ii) 膀胱癌患者で根治的膀胱全摘出術もしくは内視鏡的膀胱腫瘍切除術を受ける患者（正常コントロールとして健常部分を採取）とする。間質性膀胱炎患者の選択にあたっては間質性膀胱炎診断ガイドラインに沿って行う。すでに間質性膀胱炎の治療を受けている患者および治療が終了している患者。骨盤に放射線療法を実施した患者。慢性細菌性前立腺炎あるいは活動性の尿路感染症を有する患者、間欠的自己導尿を実施している患者。その他、研究者が不相当と判断した患者は除外する。

各疾患に対して行われる手術時に標本を採取する。膀胱粘膜から total RNA の抽出・精製を行い、得られた total RNA から DNA マイクロアレイに供するサンプルを調製する。

1. 200 ng~1000 ng の total RNA から cDNA を調整する。

2. cDNA 溶液に Cy-3 CTP を加え、T7 RNA polymerase による in vitro transcription (IVT) を行う。
3. 得られた cRNA を精製し、cRNA を断片化した後にハイブリダイゼーションに用いる。
(使用する DNA マイクロアレイ:アジレント社 Whole Genome Array シリーズ)
4. 17 時間のハイブリダイゼーション後、洗浄のステップを経て、アジレントマイクロアレイスキャナを用いて画像データを取得する。
5. 画像データをアジレント社のソフト (Feature Extraction) にて解析し、個々の遺伝子の発現データを算出する。アジレントテクノロジー社のヒト全ゲノム DNA マイクロアレイ (約 41,000 プローブを搭載) および遺伝子解析ソフト Geen Spring を使用し、公共のデータベース (RefSeq, Ensemble, UniGene Build33 等) を元にデザインされた約 41,000 個のヒト遺伝子転写産物に対応する網羅的発現解析を行う。

さらに定量的 RT-PCR を用いて網羅的遺伝子解析で得られた結果の検証実験を行う。
(検出感度:両方法において、数十ナノグラムの total RNA に含まれる、一桁オーダーのコピー数の遺伝子を検出することが可能である。)

特異的な遺伝子が特定できた場合、その最終産物であるタンパク質を尿中に求める。

4. 研究成果

対象は潰瘍型間質性膀胱炎患者の 9 例と前立腺肥大症または膀胱癌患者 9 例の対照群とした。膀胱鏡で観察し、肉眼的に正常な膀胱粘膜を採取した。膀胱粘膜組織より Total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いて、潰瘍型間質性膀胱炎患者群と対照群における遺伝子発現様式を取得した。潰瘍型間質性膀胱炎患者群と対照群と比べると 41094 遺伝子中 564 遺伝子が有意に変動した。その内訳は 389 遺伝子が対照群で発現量が多く、175 遺伝子が潰瘍型間質性膀胱炎患者群で発現量が多かった。有意に変動した遺伝子の関わりについて、IPA (Ingenuity Pathway Analysis) によるネットワーク解析を行った。ネットワークの有意差についてはスコア化で表示し、ネットワークの有意差が $P < 0.01$ であれば 2 点、 $P < 0.001$ であれば 3 点とした。細胞間の情報伝達・相互作用、血液系の発達・機能、免疫リンパ系の発達機能に関わる遺伝子ネットワークが 30 点以上のスコアであった。続いて、DNA マイクロアレイまたネットワーク解析において、遺伝子の発現増加を認めたものについて定量的 RT-PCR で追加検討を行った。潰瘍型 IC で DNA マイクロアレイの結果と同様に CXCR3, CXCR9, CXCR10,

CXCR11, および関連遺伝子 (IFN γ , TNF α) の増加を認めた。CXCR3 関連ケモカインに関する遺伝子は潰瘍型間質性膀胱炎におけるバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

同意を得られた潰瘍性間質性膀胱炎患者 13 名を対象として膀胱膀胱生検組織を用いて免疫組織学的検討を行った。膀胱生検組織を 4%パラフォルムアルデヒド・4%スクロースリン酸緩衝液に浸漬し、4°C で一晩浸漬固定した。その固定した組織をパラフィン包埋し、厚さ 3 μm の薄切組織標本を作製した。組織標本に対して、脱パラフィン処理、抗体賦活化、ブロッキングを行った。この膀胱粘膜組織に IP10 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., rabbit polyclonal, FL-98) を一次抗体とし、4°C で一晩、抗体反応を行った。引き続き、Donkey anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) を二次抗体として、4°C で 1 時間、抗体反応を行った。DAPI による核染色を行い、組織標本を封入した。続いて、蛍光顕微鏡下観察を行い、IP10 陽性部位を確認し、その発現の局在部位について検討した。また、5 観察視野 (400 倍レンズ) から CXCL10 陽性部位の表面面積を画像解析ソフトにより解析した。免疫組織学解析において、間質性膀胱炎患者の膀胱上皮には、IP10 抗体に陽性な細胞の存在が確認された。さらに、IP10 発現の局在部位は、尿路上皮細胞内および、粘膜下層と確認された。

さらに、潰瘍性間質性膀胱炎患者 13 名と対照群 8 名の尿を用いて、ELISA (酵素結合吸着法: RayBio® Human IP-10 ELISA Kit) により尿中 IP10 濃度の定量を行った。潰瘍群の尿中に含まれる IP10 濃度は、対照群と比較して有意に高値を示した。以上の結果から、膀胱組織での CXCL10 mRNA 発現、あるいは、蛋白レベルでの IP10 発現、および、尿中 IP10 濃度増加は、間質性膀胱炎の診断のバイオマーカーとして有用であると考えられた。

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 1 件)

- ① Ogawa T, Homma T, Igawa Y, Seki S, Ishizuka O, Imamura T, Akabane S, Homma Y, Nishizawa O: CXCR3 binding chemokine and TNFSF14 over expression in bladder urothelium of patients with ulcerative interstitial cystitis. J Urol 2010 March 183(3): 853-855. 査読あり

〔学会発表〕(計 6 件)

- ① 小川輝之, 今村哲也, 関 聡, 井川靖彦, 西沢 理, 本間俊樹, 赤羽 敏, 本間之夫: 間質性膀胱炎 診断治療の新展開 潰瘍型間質性膀胱炎患者の膀胱尿路上皮における遺伝子解析. 第 98 回日本泌尿器科学会総会, 盛岡市, 2010/4/29
- ② 小川輝之, 今村哲也, 関 聡, 本間俊樹, 赤羽 敏, 井川靖彦, 本間之夫, 西沢理: 間質性膀胱炎における診断バイオマーカーとしてのCXCL10 の可能性についての検討. 第 98 回日本泌尿器科学会総会, 盛岡市, 2010/4/27
- ③ Ogawa T, Seki S, Imamura T, Igawa Y, Nishizawa O, Homma T, Akabane S, Homma Y: CXCR3 and related chemokines as possible biomarker for ulcerative interstitial cystitis. 39th Annual Meeting of International Continence Society, San Francisco, 2009/10/3
- ④ Ogawa T, Seki S, Imamura T, Igawa Y, Nishizawa O, Homma T, Akabane S, Homma Y: Gene expression profiles of bladder epithelium from patients with interstitial cystitis. Annual Meeting of American Urological Association, Chicago, 2009/4/25
- ⑤ 小川輝之, 今村哲也, 関 聡, 井川靖彦, 西沢 理, 本間俊樹, 赤羽 敏, 本間之夫: 間質性膀胱炎患者の膀胱尿路上皮における遺伝子発現プロファイルの検討. 第 97 回日本泌尿器科学会総会, 岡山市, 2009/4/17
- ⑥ 小川輝之, 今村哲也, 関 聡, 井川靖彦, 西沢 理, 本間俊樹, 赤羽 敏, 本間之夫: 潰瘍型間質性膀胱炎患者の膀胱尿路上皮における遺伝子発現プロファイルの検討. 第 18 回泌尿器科・分子細胞研究会, 鹿児島市, 2009/2/14

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西沢 理 (NISHIZAWA OSAMU)
信州大学・医学部・教授
研究者番号: 60091815

(2) 研究分担者

田辺智明 (TANABE TOMOAKI)
信州大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 30293525

今村哲也 (IMAMURA TETSUYA)
信州大学・医学部・研究員
研究者番号: 00467143

井川靖彦 (IGAWA YASUHIKO)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号: 40159588