

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592074

研究課題名（和文） ウロプラキンⅢ-delta 4を分子マーカーとした間質性膀胱炎の新規診断法の開発

研究課題名（英文） Uroplakin III-delta 4 as a new molecular marker for interstitial cystitis

研究代表者

笥 善行 (KAKEHI YOSHIYUKI)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：20214273

研究成果の概要（和文）：

尿路上皮細胞特異的膜蛋白で、尿路上皮粘膜 Barrier 分子として膀胱粘膜の保護に重要な役割を果たしている uroplakin の分子種の一つである uroplakin III（以下UPIII）の exon 4 を欠く splicing variant である uroplakin III-delta 4（以下UPIII-d4）の間質性膀胱炎（interstitial cystitis、以下 IC）における病因論的意義を明らかにし、診断マーカーとしての有用性を明らかにする目的で本研究は計画された。患者膀胱粘膜を含む組織サンプルにおける mRNA レベルでの解析では、UPIII とともにUPIII-d4 の高い発現がみられた。UPIII-d4 は正常膀胱粘膜には発現していなかった。組織サンプルを採取した IC 患者を膀胱内視鏡所見から潰瘍型と非潰瘍型に分けて解析すると、非潰瘍型に有意に発現が高かった。そこで、UPIII-d4 特異的配列を使用して複数種類のラット、およびマウス抗体を作成し、その中からUPIII-d4 特異性が高く、検出感度の高かったマウスモノクローナル抗体を用いて、タンパクレベルでの解析を行った。その結果、膀胱組織サンプルでは全体の陽性率が 26/46（57%）、潰瘍型 43%、非潰瘍型 80%とやはり非潰瘍型 IC に有意に高率に発現がみられた。しかし、潰瘍型 IC 患者から採取した膀胱組織サンプルでは、粘膜の剥脱が目立ったため組織学的評価に供せないサンプルが数多く見られたことから、サンプリングバイアスの可能性があった。次に、IC 患者尿中の剥離細胞を採取し、RT-PCR 法を用いてUPIII-d4 mRNA の検出を試みた。RT-PCR の感度の問題から陽性率は 8/33 と低かったが、陽性例は潰瘍型 5 例、非潰瘍型 3 例とむしろ潰瘍型で多い結果となった。

以上の結果から、UPIII-d4 の発現は非潰瘍型 IC に特化した現象ではないことが明らかになった。UPIII-d4 は IC の診断マーカーとして有用である可能性が高いが、組織学的診断への応用の際、潰瘍型 IC では偽陰性の可能性が高いことに留意する必要があると考えられた。尿サンプルによる非侵襲的診断の確立のためには、診断感度をさらに上昇させる必要がある。

研究成果の概要（英文）：

Interstitial cystitis (IC) is a chronic bladder disorder affecting approximately one million people in the United States, of whom some 90% are women. IC is characterized by urinary frequency, urinary urgency, bladder discomfort or bladder pain in the absence of any identifiable cause, such as bacterial infection. Due to lacking in a reliably objective diagnostic test, IC remains a diagnosis based on symptoms and exclusion criteria.

The apical surface of mammalian urothelium is covered by numerous rigid-appearing plaques that contribute to the permeability barrier. Uroplakins (UPs) Ia, Ib, II, and III consist of these plaques by forming heterodimer pairs (UPIa/UII and UIIb/UIII). UPIII-delta 4 (UP3d4) is a splicing variant of UPIII that can be distinguished from UPIII by lacking exon 4. The whole cDNA fragment for human UP3d4 was molecularly cloned by us from a cDNA library constructed from bladder mucosa samples of a patient with vesicoureteral reflux. We investigated gene expression profile of UPs including UP3d4 in bladder mucosa of patients with IC. One of the major findings of the study was that UP3d4 gene was significantly up-regulated in IC samples. What was more striking was that up-regulation of UP3d4 was specifically observed in non-ulcerative type IC bladder

samples.

The next step of this study project is to investigate protein expression of UP3d4 in bladder urothelial cells of IC patients. For this purpose, we have raised murine monoclonal antibodies against purified UP3d4 protein which was produced by the recombinant DNA technique. Protein expression of UP3d4 was evaluable in 46 IC patients while 27 were not due to epithelial exfoliation. UP3d4 was immunohistochemically positive in 29 of 46 samples (63%). The positive rate was 80% (20/ 25) in non-ulcer type and 43% (9/ 21) in ulcer type IC (p=0.014). UP3d4 was not detected in any of non-IC bladder mucosa. Patients with positive UP3d4 staining was younger than those with negative staining (mean age: 51.5 vs 62.0, p=0.029). UP3d4 mRNA expression was identified in urine sediment cells from 24% (8/33) IC patients; 18% (3/17) in non-ulcer type and 31% (5/16) ulcer type.

In conclusion, a high UP3d4 protein expression was demonstrated in urothelium of IC, especially non-ulcer type IC. Detection of UP3d4 mRNA was feasible for urine sediment cells. Further exploration is warranted to investigate the potential role of UP3d4 in pathogenesis and diagnosis of IC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：

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、ウロプラキシン、非潰瘍型、ウロプラキシンデルタ 4、分子診断

1. 研究開始当初の背景

(1) 間質性膀胱炎(IC)は恥骨上部の痛み、頻尿、尿意切迫感などを伴い、中高年女性に多い難治性疾患である。米国では百万人以上のIC患者がいると推定されているが、成因については自己免疫疾患説などがあるものの未だ不明である。本邦におけるICの罹患率は伊藤らの調査では、泌尿器科患者10万人に対して1.2人、女性泌尿器科患者10万人に対しては4.5人であった。しかしICの診断方法は確立されておらず、羞恥心などから受診していない潜在患者もかなりの数に上る可能性がある。1987年にNIHの主催するワークショップで提示された診断基準はあくまでも成因を解明する研究に用いるものとして公表されたが、萎縮膀胱をきたしていない症例や膀胱水圧拡張術時に膀胱粘膜に潰瘍所見のない非潰瘍型ICの診断には適していない。

(2) 一方、1990年ごろSun博士らにより同定されたウロプラキシン(UP)は、尿路移行上皮細胞特異的膜蛋白で、尿路上皮粘膜Barrier分子として膀胱粘膜の保護に重要な役割を果たしている。ICでは膀胱粘膜の

透過性の亢進が本疾患特有の症状を惹起していると考えられる。我々は、膀胱粘膜におけるBarrier分子であるUP分子種の異常が本疾患に関与する可能性があるとの仮説を立て、2006年よりIC患者の膀胱粘膜におけるUP分子種の発現解析を開始した。その結果、UPの中ではUP IIIの発現が正常対照と比べ有意に亢進していることを発見した。さらにIC患者膀胱粘膜よりmRNAを抽出しクローニングした結果、UP IIIのエクソン4が完全脱落したUP III-delta 4(以下UPIII-d4)と呼ばれるバリエーション型のmRNAが著明に増加していることが判明した。

2. 研究の目的

- (1) IC患者の膀胱組織サンプルにおけるUPIII-d4タンパクの発現を解析し、臨床像との関連を検討
- (2) UPIII-d4のIC診断マーカーとしての有用性の検討

3. 研究の方法

- (1) 膀胱組織サンプルにおけるUPIII-d4タンパクの発現解析

①UPIII-d4 特異的抗体作製：UPIII-d4 特異的な反応性を示す抗体産生ハイブリドーマについて免疫沈降による反応性を確認し、マウス3種、ラット21種について陽性であると判断した。これらのうち、murine Mo-Ab-6 と murine Mo-Ab-14 が良好な染色性と識別性を有する可能性が高いことが判明した。最終的に muMo-Ab-6 を用いて免疫組織化学的解析を行った。

②水圧拡張前の間質性膀胱炎患者73名の膀胱粘膜組織を生検鉗子で採取し、ホルマリン固定後に免疫組織化学的解析を行った。陰性コントロールは膀胱がんで膀胱全摘を施行された患者の非腫瘍部膀胱粘膜とした。

(2) IC患者尿中剥離細胞におけるUPIII-d4 mRNAの検出

IC患者の自然排尿100-200mlおよび、膀胱拡張術前の膀胱洗浄水から遠心分離して採取した尿中剥離細胞よりRNAを抽出し、UPIII-d4 特異的プライマーを用いてRT-PCRを行い、UPIII-d4 mRNAの検出を行う。

(3) IC患者尿中UPIII-d4タンパク検出を目的としたELISAによる測定系の開発

4. 研究成果

(1) IC患者膀胱粘膜におけるUPIII-d4の発現

73名のIC患者の膀胱組織サンプルを解析した。そのうち46症例で上皮剥脱なく判定可能であった。サンプル中の上皮が完全剥脱のため判定不能例は非潰瘍型26例中1例、潰瘍型47例中26例と明らかに潰瘍型で高率であった(潰瘍型では正常に見える粘膜にも水圧拡張後に粘膜を採取すると上皮剥脱が高頻度であった)。UPIII-d4の陽性率は非潰瘍型で20/25(80%)、潰瘍型で9/21(43%)と非潰瘍型で有意に高頻度ではあったが、非潰瘍型特異的な発現とは言えない結果であった。非潰瘍型で高頻度であることは確認されているため、UPIII-d4を発現する間質性膀胱炎は本疾患の何らかのsubpopulationを特定している可能性は残る。

(2) IC患者尿中剥離細胞におけるUPIII-d4 mRNAの検出

33例のIC患者尿より沈渣細胞を収集した。RT-PCRによりUPIII-d4 mRNA特異的バンドを検出できたのは33例中8例であった。陽性8例はすべて自然尿で検出可能であった。陽性例は潰瘍型16例中5例(31%)、非潰瘍型17例中3例(18%)と潰瘍型でむしろ高率であった。

(3) UPIII-d4 検出系の開発

これまでに精製が終了したポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を用いてサンドイッチELISAの検討を行った。その結果、固相抗体はマウスモノクローナル抗体6-16およびラットモノクローナル抗体35-4、検出

抗体がビオチン化ウサギポリクローナル抗体の組み合わせで測定可能な系を構築しえた。各種諸条件の検討を行い、数百pg/mlオーダーの感度を達成することができた。構築したUPIII-delta4 サンドイッチELISAがUPIII-delta4とUPIIIを測り分けできるかをUPIII-delta4、UPIIIのリコンビナント蛋白質を用いて確認した。その結果、swELISA系は標準物質レベルではあるが、予想される測定レンジではUPIII-delta4を特異的に測定可能であることが確認された。

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2件)

① Zeng Y, Takehi Y, et al. Uroplakin III-delta4 messenger RNA as a promising marker to identify nonulcerative interstitial cystitis. J Urol 2007; 178:1322-7

② 寛 善行. 特集 間質性膀胱炎の最前線; 病態の解明(3) - 分子マーカー・遺伝子マーカー. 排尿障害プラクティス 2007; 15: 233-237

[学会発表] (計3件)

① 寛 善行、ウロプラキシンと間質性膀胱炎、第12回UTPシンポジウム、2010.01.16、京都市

② 武田 繁雄, 平間 裕美, 寛 善行. 間質性膀胱炎 - 潰瘍型と非潰瘍型での治療戦略の違い -, 2009.02.20、岡山市

③ 寛 善行, 張 霞, 平間 裕美, 加藤 琢磨, 本間 之夫, 大橋 洋三, 影山 進, 吉貴 達寛. 間質性膀胱炎患者膀胱上皮および尿中剥離細胞におけるウロプラキシンIII-delta4の発現、第18回日本排尿機能学会、2011.09.16、福井市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寛 善行 (KAKEHI YOSHIYUKI)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：20214273

(2) 研究分担者

張 霞 (TYOU KA)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：30524061

呉 秀賢 (WU XIU-XIAN)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：10346645

乾 政志 (INUI MASASHI)

香川大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：40314918

杉元 幹史 (SUGIMOTO MIKIO)
香川大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：10243768

本間 之夫 (HONMA YUKIO)
東京大学・医学部・教授
研究者番号：40165626

吉貴 達寛 (YOSHIKI TATSUHIRO)
京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80230704

(3) 連携研究者
()

研究者番号：