

令和 6 年 9 月 27 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09382

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Development of a urinary diagnostic kit for Hunner type interstitial cystitis targeting the bladder microbiome

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：L-トリプトファンとIFN γ は膀胱上皮細胞の増殖を抑制したが、プロテインLによる膀胱上皮細胞の増殖抑制作用は認められなかった。また、IFN γ はCXCL10を誘導したが、L-トリプトファンとプロテインLは誘導しなかった。一方、GPACの病原因子のひとつと考えていたプロテインLの発現を購入株ならびに臨床分離株で検討したが、発現は認められなかった。患者の尿中より分離・培養・同定したAnaerococcusとPeptoniphilusの薬剤感受性を検討した結果、ABPCに感受性が高いことが判明した。そこで、IC患者に対してABPCを2週間投与したが、明らかな症状の改善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

ハンナ型間質性膀胱炎（HIC）とは膀胱に非特異的な慢性炎症を認める疾患と定義されているが、明らかな病因は未だ特定されていない。そこで、本研究では1）HICの病態を解明するため、臨床より分離したGPAC株を用いてHICが誘発されるかをin vitro、in vivoで検証し、2）HICの早期診断に寄与する新規診断バイオマーカーを開発することが目的であった。しかしながら、代表的GPACであるAnaerococcusとPeptoniphilusあるいはプロテインLがHICの病因である可能性は否定され、HICの尿中診断キットの開発は達成できなかった。

研究成果の概要（英文）：L-Tryptophan and IFN γ inhibited the proliferation of bladder epithelial cells, but no inhibitory effect of protein L on the bladder epithelial cell proliferation was observed. Additionally, IFN γ induced CXCL10, but neither L-tryptophan nor protein L did. On the other hand, the expression of protein L, considered one of the virulence factors of GPAC, was investigated in both purchased strains and clinical isolates, but no expression was detected. The drug susceptibility of Anaerococcus and Peptoniphilus isolated, cultured, and identified from patient urine was examined, and they were found to be highly susceptible to ABPC. Therefore, ABPC was administered to the patients with Hunner type interstitial cystitis for two weeks, but no clear improvement in symptoms was observed.

研究分野：泌尿器科

キーワード：間質性膀胱炎 ハンナ病変 膀胱内細菌叢 グラム陽性嫌気性球菌

1. 研究開始当初の背景

われわれは2018年より膀胱内細菌叢に着目してHICの病態に関する研究を進めており、HICで健常者と比較してGPAC (*Anaerococcus*, *Peptoniphilus*) が有意に増加していることを発見した。しかし、GPACは加齢や閉経とともに増加し、健常者でも認められる。GPACは皮膚軟部組織感染症の重症例から高頻度に分離される弱毒菌であるが、遅発育・難同定菌であり、病原因子の研究も少ないことなどから、病原的意義が過少評価されている。近年、菌体表層にもつ複数のタンパク(プロテインLなど)が皮膚における本菌の常在性と感染症における病態(慢性化・難治化)と密に関連していることが明らかとなってきた [Murphy EC, FEMS Microbil Rev 37: 520-53, 2013]。そこで、われわれはわれわれは図1に示すようにGPAC感染のトリガーとして、加齢と過度のストレスによるトリプトファン(セロトニンの原料)摂取量の増加が原因ではないかと仮定した。実際、HICは過度のストレスに暴露される閉経後の女性に多く、女性は男性の約5倍と報告されている[Yamada Y, Transl Androl Urol 4: 486-90, 2015]。また、尿中トリプトファンやその代謝産物は膀胱上皮細胞の増殖障害性陽イオン(バリア機能を破綻: leaky bladder)であり、間質性膀胱炎患者の尿中に多く認められている [Parsons CL, BJU Int 114: 286-93, 2014]。

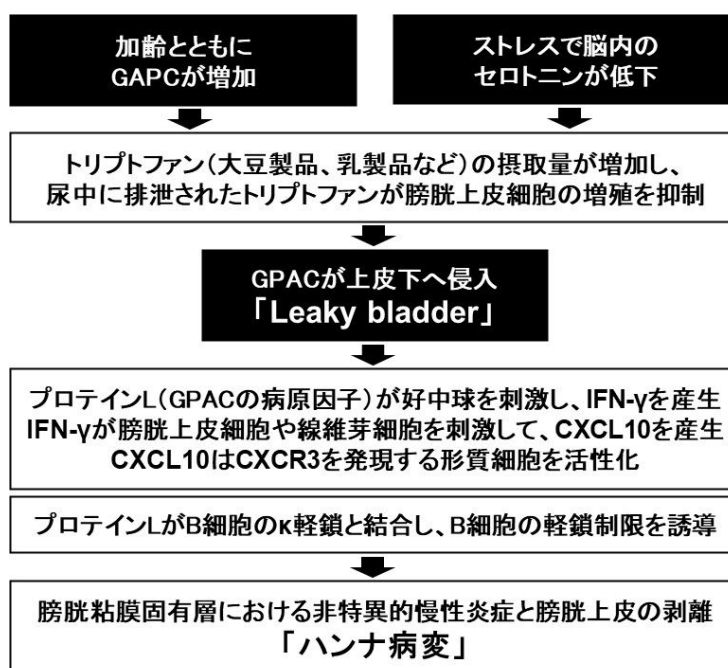


図1 ハンナ型間質性膀胱炎(HIC)の病態(仮説)

2. 研究の目的

われわれは膀胱内に常在する弱毒菌(GPAC)が加齢や閉経とともに増加し、そこに過度のストレスが加わることによってHICが発症するのではないかと考えている。これまでに、HICの病理所見でκ軽鎖を発現するB細胞のmonoclonalな増生(軽鎖制限)が報告されている [Maeda D, PLoS ONE, 2015]。 *Fingoldia magna* (GPACの一種)の病原因子のひとつであるプロテインLは抗体結合タンパク質として知られおり、κ軽鎖との親和性が高い。これは抗貪食作用であり、GPACの常在性と難治性を示している。また、HICの尿中診断バイオマーカーとして、T細胞やNK細胞に対する化学誘導、T細胞の内皮細胞への接着、血管形成などにおいて重要な役割を果たすCXCL10の有用性がいくつか報告されている [Niimi A, Neurouro Urodyn: 1-7, 2017] [Furuta A, Int Urogynecol J 29: 961-6, 2018]。CXCL10はCXCR3のリガンドであり、HICの病理組織でCXCR3を発現する形質細胞の増加も報告されている[Akiyama Y, Sci Rep, 2016]。但し、CXCL10はHICに特異的なバイオマーカーではない。

そこで、本研究では尿中GPACやその病原因子であるプロテインLを標的として、HICに特異的な尿中診断キットの開発を目指す。

3. 研究の方法

1) HICの病態解明

・In vitro 実験: トリプトファンによる膀胱上皮細胞の増殖抑制を評価(MTTアッセイ)。プロテインLによる膀胱上皮細胞の増殖抑制を評価(MTTアッセイ)。トリプトファンによる膀胱

膀胱上皮透過性の亢進を評価(Migration アッセイ)、プロテイン L、GPAC 臨床分離菌による IFN- γ 産生能を評価 (好中球刺激試験)。

・ In vivo 実験：無菌マウスに GPAC 臨床分離菌 (L-トリプトファン) を経口投与し、メタボリックケージで排尿回数を評価し、膀胱組織 (HE 染色)、尿中 CXCL10 を測定する。

2) GPAC 検出キットの開発

- ・プロテイン L 定量 PCR 用プライマーを作製。
- ・プロテイン L 発現の有無が判明している *Fingoldia magna* 株でプライマーの精度を確認。
- ・GPAC 臨床分離株 (*Anaerococcus*, *Peptoniphilus*) におけるプロテイン L の発現を探索。
- ・GPAC 臨床分離株を網羅的に検出可能な定量 PCR 用プライマーを作製。

4 . 研究成果

L-トリプトファンと IFN γ は膀胱上皮細胞の増殖を抑制したが、プロテイン L による膀胱上皮細胞の増殖抑制作用は認められなかった。また、IFN γ は CXCL10 を誘導したが、L-トリプトファンとプロテイン L は誘導しなかった。一方、GPAC の病原因子のひとつと考えていたプロテイン L の発現を購入株ならびに臨床分離株で検討したが、発現は認められなかった。患者の尿中より分離・培養・同定した *Anaerococcus* と *Peptoniphilus* の薬剤感受性を検討した結果、ABPC に感受性が高いことが判明した。そこで、HIC 患者に対して ABPC を 2 週間投与したが、明らかな症状の改善は認められなかった。以上より、HIC の病因として、GPAC の可能性は低いと判断した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 古田 昭, 五十嵐太郎, 鈴木康之	4. 巻 110
2. 論文標題 膀胱内マイクロバイオームと下部尿路機能障害	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 診断と治療	6. 最初と最後の頁 35-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 古田 昭, 占部文彦, 五十嵐太郎, 鈴木康之, 木村高弘	4. 巻 16
2. 論文標題 新ガイドラインに基づいた間質性膀胱炎の臨床	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 泌尿器科	6. 最初と最後の頁 610-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 古田 昭, 木村高弘	4. 巻 285
2. 論文標題 間質性膀胱炎・膀胱痛症候群と慢性前立腺炎・慢性骨盤痛症候群	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 212-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Furuta A, Suzuki Y, Igarashi T, Kimura T, Egawa S, Yoshimura N	4. 巻 26
2. 論文標題 Reduction of Bladder Capacity Under Anesthesia Following Multiple Recurrences and Repeated Surgeries of Hunner Lesions in Patients with Interstitial Cystitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int Neurourol J	6. 最初と最後の頁 45-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5213/inj.2142102.051.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Furuta A, Kuroda Y, Yamamoto T, Egawa S, Dezawa M, Yoshimura N	4. 巻 None
2. 論文標題 Effects of human Muse cells on bladder inflammation, overactivity and nociception in a chemically induced Hunner type interstitial cystitis-like rat model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int Urogynecol J	6. 最初と最後の頁 None
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00192-022-05166-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 3件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 古田 昭、丸山智子、五十嵐太郎、鈴木康之、木村高弘
2. 発表標題 膀胱内に共生している細菌叢に関する加齢と性差の検討
3. 学会等名 第35回日本老年泌尿器科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古田 昭
2. 発表標題 膀胱内細菌叢と下部尿路機能障害
3. 学会等名 第24回日本女性骨盤底医学会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古田 昭
2. 発表標題 常在菌としての膀胱内細菌叢と過活動膀胱との関連
3. 学会等名 第29回日本排尿機能学会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古田 昭、鈴木康之、五十嵐太郎、木村高弘
2. 発表標題 自己導尿を施行している神経因性膀胱患者における膀胱内マイクロバイオームの検討
3. 学会等名 第57回日本脊髄障害医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Furuta A
2. 発表標題 Role of gut and urinary microbiome in pelvic pain
3. 学会等名 38th KOREA-JAPAN Urological Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	政木 隆博 (Masaki Takahiro) (60535657)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	

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
---------	---------