

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25年 5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591786

研究課題名（和文）

間質性膀胱炎の病態における膀胱上皮由来伝達物質に関する研究

研究課題名（英文）

Transmitters derived from vesical urothelium - in association with the pathogenesis of Interstitial Cystitis

研究代表者

本間 之夫（HOMMA YUKIO）

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：40165626

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、難治性疾患である間質性膀胱炎の病態に上皮由来の各種伝達物質が如何に関与しているかを解明することであり、そのために、患者の尿と膀胱組織を用いて伝達物質の測定と遺伝子発現の定量を行い、治療後の変化も検討してきた。また、併せて間質性膀胱炎の動物モデルを作成してその排尿生理学的・分子細胞学的な特徴の評価を行ってきた。

臨床症例を用いた研究では、尿中マーカーの測定系の条件設定を検討してきた。尿中の NGF、CXCL10、TNFSF の測定の至適条件を適宜調整し、間質性膀胱炎に対する治療前後での評価、自覚症状との相関について検討してきた。結果、症状との有意な相関を認めていないのが現状である。膀胱組織を用いた検討では、サンプルの収集と免疫組織染色を行い、データを検討してきた。その結果、間質性膀胱炎の中でも潰瘍の有無で CD11b 陽性細胞、VEGF-A などに違いを認め、また Sjogren 症候群に合併した間質性膀胱炎では CD4 ならびに CD8 陽性細胞の増加をみとめ、それぞれ病態解明の鍵となることが期待される。

動物モデルを用いた研究では、アクロレインを用いた動物モデルの膀胱粘膜組織における TRPM8 の発現を検討したが、現時点では投与前後でその発現に差を認めていない。また、ケタミン乱用者における間質性膀胱炎様症状を参考に、ケタミンを用いた動物モデルの作成を試みたが、頻尿や潰瘍形成を認めず、現時点では間質性膀胱炎モデルとは言いがたい。

今後も、さらに研究を進め、病態解明を目指していく。

研究成果の概要（英文）：

This study was conducted to elucidate the pathogenesis of interstitial cystitis (IC), chronic inflammatory disease of the urinary bladder with unidentified cause. To achieve this purpose, we've focused on the transmitters expressed on urothelium or secreted into urine of human IC patients. Also, we've assessed bladder histology immuno-histochemically.

Unfortunately, no significant correlation between urine markers and IC symptoms has been identified so far. However, histochemistry analysis indicated that immune cells expressing CD11b and VEGF-A significantly increased in ulcer type IC. In addition, in bladder tissue of IC with Sjogren's syndrome showed significant appearance of both CD4 and CD8 positive immune cells, all of which indicating different pathogenesis in each type of IC.

In animal model experiments, we tried to produce ketamine induced cystitis rat model, however, at the moment, IC symptoms of findings were not produced. Also we've produced rat IC model using acrolein, the bladder tissue of which was assessed for TRPM8 expression. The rats showed dynamic change in urinary frequency and voided volume, but no significant change in TRPM8 expression was observed.

The pathogenesis and pathophysiology of IC are still undefined and need further investigations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	1,800,000	540,000	2,340,000
平成23年度	900,000	270,000	1,170,000
平成24年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：排尿学

1. 研究開始当初の背景

間質性膀胱炎は、頻尿・尿意亢進・尿意切迫感・膀胱痛・骨盤痛などの症状症候群を呈する原因不明の難治性疾患である。間質性膀胱炎診療ガイドラインによると、間質性膀胱炎はわが国でも決して稀ではなく、患者は強い症状に悩まされ、そのQOLは著しく低いにもかかわらず、行われている治療のエビデンスレベルは低く、保険適応のある治療もないのが現状である。より適切な診断・治療のためには、その病態の解明が切に必要とされている。

病態として最近特に注目されているのは、膀胱上皮の関与である。膀胱上皮は単なる膀胱と尿との障壁ではなく、各種の刺激により種々の伝達物質を放出するとともに、それらの伝達物質に対する受容体も有することが知られるようになった。なわち、acetylcholine (ACh)、adenosine triphosphate (ATP)、一酸化窒素 (nitric oxide: NO)、prostaglandine E₂ (PG E₂)、noradrenaline (NA)、nerve growth factor (NGF) などである。これらの伝達物質が局所に炎症や神経刺激を誘発し、尿意切迫感や頻尿や膀胱痛を引き起こし、間質性膀胱炎の重要な病態となっていることが考えられる。

我々は既に摘出ヒト膀胱条片や種々の病態モデル(脊髄損傷、下部尿路閉塞、膀胱虚血など)の動物を用いて、膀胱上皮由来のACh、ATP、PGなどの放出量をマイクロダイアリシス法で測定しその排尿機能や膀胱平滑筋への影響について検討を加えてきた。そこで、この方法を用いて、間質性膀胱炎の病態について検討を加えることを着想した。

患者を用いた研究では、潰瘍型および非潰瘍型の間質性膀胱炎症例において、尿と手術時に得られた膀胱検体を用いて伝達物質の測定を行い、組織中の関連遺伝子の発現量の定量を行う。また、各種治療によるそれらの

測定値の変化を検討する。

動物モデルとしては、cyclophosphamide、protamine、ketamineを用いたものがあり、cyclophosphamideとprotamineでは非潰瘍型の間質性膀胱炎動物モデルが作成可能とされている。Ketamineは、近年その常用者における潰瘍型の間質性膀胱炎の報告があり、当施設での探索的検討でもketamineでラットの頻尿モデルが作成された(図1)。これらのモデルに対してresiniferatoxinの膀胱内注入やA型botulinum toxinの膀胱壁内注入を行い、その効果と治療後の病態の変化について、臨床例では行えないような詳細な検討を行うことを目標に本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、間質性膀胱炎の臨床例と動物モデルを用いて、膀胱上皮から放出される伝達物質とその関連遺伝子を定量し、間質性膀胱炎の病態における膀胱上皮由来伝達物質の役割を明らかにしようとしている。

3. 研究の方法

1) 尿中マーカーの測定

間質性膀胱炎患者の尿、およびモデル動物の尿を適宜採取し、保管の上でELISA法にて尿中のNGF、8OHdG、BDNF、CXCL10の測定を行い、ヒト症例と症状との関係、動物モデルでは組織像との比較検討を行った。

2) 潰瘍の有無での膀胱粘膜組織の検討

膀胱水圧拡張術に際して採取した膀胱粘膜組織を、間質性膀胱炎の潰瘍の有無で免疫組織学的に検討した。具体的には遊走している免疫細胞の差異を表面抗原の検討にておこなった。

3) 膀胱炎モデルラットの作成およびTRPM8チャンネル阻害剤の効果判定

9週齢のSDラットに麻酔下に下腹部に皮膚切開を行い、膀胱前面を露出。膀胱壁に1mm

の切開をし、そこから特殊な加工をしたポリエチレンチューブを挿入し、膀胱瘻とする。この膀胱瘻は皮下トンネルを経由して、ラット頭頂部に脱出させる。また内頸静脈にも同様にカテーテルを挿入し、同部位から皮下トンネルを経由して脱出させる。この手術にて作成した膀胱瘻を用いて後に膀胱内圧測定を行う。また内頸静脈のカテーテルを用いて薬剤の投与を行う。

ラットの膀胱内に生理食塩水を持続投与し、膀胱内圧測定を行い、その後に膀胱炎惹起物質であるアクロレインの持続膀胱注入を行いながら排尿の頻度および内圧の経時的变化を連続測定した。また頻尿に関連しているとの報告がある TRPM8 チャンネルのアンタゴニストを経静脈的に投与し、膀胱炎による頻尿がどの程度抑制されたかを同様の手順で検討した。

4) 慢性膀胱炎モデルとしてのケタミンモデルの排尿機能評価

9週齢のSDラットを用いる。25mg/kgケタミン連日腹腔内投与を行い、投与後28日、35日、42日で排尿機能をメタボリックゲージで評価した。

4. 研究成果

1) 国内外での尿中マーカーの測定結果の報告を受け、有用な診断ツール・症状の客観的指標となることを期待してこれまでに報告のあった尿中のNGF, 8OHdG, BDNF, CXCL10をそれぞれ測定し、ヒト症例においては症状との相関を含めて検討したが、現時点では明らかな相関を認めていないのが現状である。当初は、測定系のエラーを想定し、測定系の調整を行ってきたが、他研究施設でも同様の傾向を認めており、現時点では、尿中マーカーは症状との相関が無いものと想定されている。今後は、膀胱の尿路上皮における各種TRPチャンネルやNGF, BDNFなどの発現を組織で検討し、マーカーとしての可能性、病態の検討に改めて生かしていく予定である。

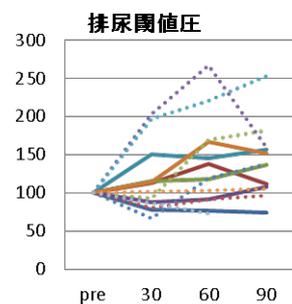
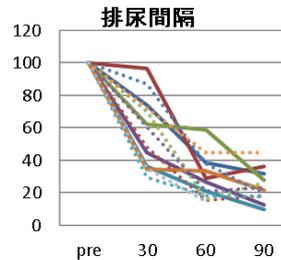
2) 膀胱水圧拡張に際して採取した膀胱粘膜組織の病理組織学的検討では、採取できる組織の範囲に限られる、という制約があったが、評価を行った範囲では潰瘍型におけるCD11b陽性細胞の有意な増加、またVEGF-Aの有意な発現増加を認めた。また、このCD11bとVEGF-Aの二重染色の結果、CD11b陽性細胞がVEGF-Aを発現している可能性が示唆された。

さらに、Sjogren症候群に伴う間質性膀胱炎では、CD4ならびにCD8陽性細胞が他の間質性膀胱炎に比べて有意に多く認められ、Sjogren症候群に伴う間質性膀胱炎では、CD4ならびにCD8陽性細胞がその病態に関わっている可能性が示唆された。

3) アクロレイン投与によって、強力な膀胱

炎および頻尿が誘発されることが確認された。TRPM8アンタゴニストによる頻尿の抑制が期待されたが、今回の研究ではアクロレイン誘発の炎症を抑制するには至らなかった。今後は炎症誘発物質を変更し更なる検討を行う予定である。

アクロレイン投与およびTRPM8投与前後での排尿間隔および排尿閾値圧の変化



TRPM8群およびVehicle群で有意差を認めない。

3) 25mg/kgケタミンの腹腔内投与を行ったが、メタボリックゲージでの評価では明らかな頻尿は認められなかった。追加実験で投与量を100mg, 75mgに増量すると、ラットが50%程度の確率で死亡に至ったことから、投与量を50mgに増量し、再度検討を行った。しかしながら頻尿の形成が認められず、また投与後の病理標本では組織学的にヒトで認められる潰瘍形成がほとんど認められず、間質性膀胱炎の類似モデルとして使用することは困難であると考えられた。

今後は、これらの成果をまとめて、論文として発表していく予定である。

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13件)

- 野宮 明、本間之夫：後期研修医がおさえておきたい泌尿器疾患TOP30 間質性膀胱炎 女性泌尿器科的な視点から 泌尿器外科 26:246-260、2013

2. Nomiya A, Naruse T, Niimi A, Nishimatsu H and Homma Y. On- and post-treatment symptom relief by repeated instillations of heparin and alkalized lidocaine in interstitial cystitis. *Int J Urol*. 2013 Epub
 3. Sugihara T, Yasunaga H, Horiguchi H, Nakamura M, Nomiya A, Nishimatsu H, Matsuda S, Homma Y: Admissions related to interstitial cystitis in Japan: an estimation based on the Japanese diagnosis procedure combination database. *Int J Urol*. 19: 86-9. 2012
 4. Aizawa N, Wyndaele JJ, Homma Y, Igawa Y: Effects of TRPV4 cation channel activation on the primary afferent activities of the rat. *NeuroUrol Urodyn*. 31: 148-155, 2012
 5. Homma Y, Kakizaki H, Yamaguchi O, Yamanishi T, Nishizawa O, Yokoyama O, Takeda M, Seki N and Yoshida M: Assessment of overactive bladder symptoms: comparison of 3-day bladder diary and the overactive bladder symptoms score. *Urology*. 77: 60-4, 2011.
 6. Nomiya A, Nishimatsu H and Homma Y: Interstitial cystitis symptoms associated with ketamine abuse: The first Japanese case. *Int J Urol*. 18: 735, 2011.
 7. 野宮 明、本間之夫: 【女性泌尿器科入門】 間質性膀胱炎 女性泌尿器科的な視点から泌尿器外科 24 : 983-994、2011
 8. Suzuki M, Liu M, Kurosaki T, Suzuki M, Arai T, Sawave M, Kusuya Y, Kato M, Fujimura T, Fukuhara H, Enomoto Y, Nishimatsu H, Ishikawa A, Kume H, Homma Y and Kitamura T: Association of rs6983561 polymorphism at 8q24 with prostate cancer mortality in a Japanese population. *Clin Genitourin Cancer* 9: 46-52, 2011
 9. Okamura K, Nojiri Y, Ameda K, Namima T, Suzuki M, Inoue K, Ogawa T, Gotoh M and Homma Y: Botulinum toxin A submucosal injection for refractory non-neurogenic overactive bladder: Early outcomes. *Int J Urol*. 18: 483-487, 2011.
 10. Nishimatsu H, Suzuki E, Kumano S, Nomiya A, Liu M, Kume H and Homma Y. Adrenomedullin mediates adipose tissue-derived stem cell-induced restoration of erectile function in diabetic rats. *J Sex Med*, 2011 Epub
 11. Ogawa T, Homma T, Igawa Y, Seki S, Ishizuka O, Imamura T, Akahane S, Homma Y and Nishizawa O: CXCR3 binding chemokine and TNFSF14 over expression in bladder urothelium of patients with ulcerative interstitial cystitis. *J Urol*. 183: 1206-12, 2010.
 12. 野宮 明、本間之夫: 【Annual Review 2010 腎臓】 間質性膀胱炎 : 最新の知見. 御手洗哲也ら編集. 東京:中外医学社; 2010
 13. Michel MC, Homma Y, et al. β -adrenoceptor agonist effects in experimental models of bladder dysfunction. *Pharmacol Ther*. 131: 40-49, 2011
- [学会発表] (計 16 件)
- 1) 間質性膀胱炎の病態に迫る 間質性膀胱炎に対するボツリヌス毒素膀胱壁内注入療法治療を通じて見えてきたもの (シンポジウム) 第 100 回日本泌尿器科学会総会、2012 年 4 月、野宮明、横浜
 - 2) 間質性膀胱炎に対する A 型ボツリヌス毒素膀胱壁内注入療法の治療成績 第 100 回日本泌尿器科学会総会、2012 年 4 月、野宮明、横浜

3) 間質性膀胱炎に対する A 型ボツリヌス毒素膀胱壁内注入療法の有効性・安全性に関する検討
第 19 回日本排尿機能学会総会、2012 年 8 月、名古屋

4) Interstitial cystitis associated with Sjogren syndrome
42nd Annual Meeting of the International Continence Society, October 2012, Akira Nomiya, Beijing, China

5) Relationship between penile / urethral pain and pathological change in IC/PBS male patients' urethra. 42nd Annual Meeting of the International Continence Society, October 2012, Aya Niimi, Beijing, China

6) Cyclophosphamide 誘発膀胱炎モデルラット (CYP モデル) の間質性膀胱炎モデルとしての妥当性の検討 第 99 回日本泌尿器科学会総会、2011 年 4 月、野宮 明、名古屋

7) 間質性膀胱炎に対する A 型ボツリヌス毒素膀胱壁内注入療法の初期経験 第 18 回日本排尿学会総会 2011 年 9 月、野宮 明、福井

8) 間質性膀胱炎に対するヘパリンリドカイン混合液膀胱内注入療法の短期治療成績 第 76 回日本泌尿器科学会東部総会 2011 年 10 月、野宮 明、横浜

9) INCREASED EXPRESSION OF TRPA1, TRPV2, ASIC1 and CXCL9 mRNA IN BLADDER TISSUE FROM PATIENTS WITH ULCER-TYPE INTERSTITIAL CYSTITIS.
The 6th Pan Pacific Continence Society meeting, September 2011, Akira Nomiya, Taipei, Taiwan.

10) INCREASED EXPRESSION OF TRPA1, TRPV2, ASIC1 and CXL9 mRNA IN BLADDER TISSUE FROM PATIENTS WITH INTERSTITIAL CYSTITIS.
41st Annual Meeting of the International Continence Society, August 2011, Akira Nomiya, Glasgow, United Kingdom.

11) 潰瘍型間質性膀胱炎 その頻度と臨床像
第 17 回日本排尿機能学会総会、2010 年 9 月、野宮 明、甲府

12) 間質性膀胱炎に対するステロイド経口治療の可能性、第 98 回日本泌尿器科学会総会、2010 年 4 月、本間 之夫、盛岡

13) 難治性間質性膀胱炎に対する外科治療の検討
第 98 回日本泌尿器科学会総会、2010 年 4 月、野宮 明、2010 年 4 月、盛岡

14) 間質性膀胱炎 診断治療の新展開 東京大学における間質性膀胱炎の診断・治療 (シンポジウム)
第 98 回日本泌尿器科学会総会、2010 年 4 月、野宮 明、盛岡

15) 間質性膀胱炎患者の尿中 NGF に関する検討
第 17 回日本排尿機能学会総会、2010 年 10 月、釣巻ゆずり 本間之夫、甲府

16) 間質性膀胱炎患者における尿中 8-OH dG 値と臨床所見に関する検討
第 98 回日本泌尿器科学会総会、2010 年 4 月、釣巻ゆずり 本間之夫、盛岡

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間 之夫 (HOMMA YUKIO)
東京大学医学部附属病院 教授
研究者番号：40165626

(2)研究分担者

野宮 明 (NOMIYA AKIRA)

東京大学医学部附属病院 助教

研究者番号：30372379

西松 寛明 (NISHIMATSU HIROAKI)

東京大学医学部附属病院 准教授

研究者番号：60251295

藤村 哲也 (FUJIMURA TETSUYA)

東京大学医学部附属病院 講師

研究者番号：50376448

榊永 浩一(KOUICHI MASUNAGA)

東京都健康長寿医療センター・病院 医員

研究者番号：10404352

(3)連携研究者

該当なし