

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592420

研究課題名(和文) 間質性膀胱炎における虚血が及ぼす病態の探索的研究

研究課題名(英文) Ischemic factors in pathogenesis of interstitial cystitis

研究代表者

野宮 明(Nomiya, Akira)

東京大学・医学部附属病院・臨床登録医

研究者番号：30372379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：原因不明の膀胱粘膜の慢性炎症疾患である間質性膀胱炎における虚血に着目し、ヒト間質性膀胱炎患者の膀胱粘膜における虚血関連因子の変化についてmRNAの発現を調べた。

その結果、VEGFAやeNOSといった虚血関連因子のほか、TRPM2などの慢性炎症にかかわる因子の発現増加を認めた。また並行して、本研究では虚血に着目した動物モデルの作成を試みた。血流遮断と膀胱内薬物投与による膀胱粘膜障害でモデル作成後3か月時点でも持続する頻尿と、組織学的な慢性炎症を認めたが、経過中の致死率が高くまた尿流動態検査では対照との差を認めなかったため、より再現性の高い動物モデルの確立が今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：Focusing on ischemic factors, we examined change in mRNA expressions in bladder mucosa of patients with interstitial cystitis and produce a rat model of chronic cystitis.

研究分野：間質性膀胱炎

キーワード：間質性膀胱炎 慢性炎症 動物モデル 虚血

## 1. 研究開始当初の背景

(1)間質性膀胱炎(IC)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[1]によると、ICはわが国でも決して稀ではなく、患者は重い症状に悩まされ、そのQOLは著しく損なわれる。しかし、診断方法は確立しておらず、治療効果は限定的で、そのエビデンスレベルは低いのが現状である。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。

(2)病態の一つとして注目されているのは、膀胱における血管内皮細胞の障害である。ICの特徴的な内視鏡所見には、ハンナ潰瘍と呼ばれる易出血性の病変や水圧拡張時の広範な粘膜出血が挙げられる。これらは、いずれも血管の内皮細胞の障害の表現型とみなされる。事実、IC患者の膀胱組織では、毛細血管内皮細胞のapoptosisの増加[2]、および、その反応としての血管内皮増殖因子(Vascular Endothelium Growth Factor: VEGF)の過剰発現[3]が報告されている。しかし、これらの研究での症例数は限られており、より多数の症例を用いた検証が必要である。当科はIC患者が多数受診しており、100例を越す症例の生検検体を保有している

(3)一方、病態の解明には動物モデルが必要である。現在利用されているモデルでは、cyclophosphamide [5]やprotamine [6]が用いられている。しかし、これらのモデルは薬剤性膀胱炎モデルであり、症状や血管の障害は一過性である。そこで、われわれは、血行障害を利用したIC動物モデル(ラット)を新規に作成してきた(未発表)。このモデルでは、頻尿とあわせて血管内皮の障害も長期間に及ぶことを確認している。

(4)また、共同研究者である西松らは、脂肪由来幹細胞(adipose tissue-derived

stem cells: ASC)の精製に成功している。そして、このASCを用いて、糖尿病ラットにみられる陰茎海綿体の内皮機能障害を改善させることを示している[4]。つまり、ASCは上述のICモデルにおいて治療効果を有する可能性がある。更にASCは比較的容易に作成することができるので、臨床応用の実現性も高い。

(6)以上から、ICの病態における内皮細胞障害の関与を臨床検体と動物モデルで検討し、その動物モデルを用いてASCによる治療を試みる研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、ICの臨床例から得られた検体・臨床データを用いて、膀胱における虚血や内皮細胞障害の関連物質、およびその関連遺伝子を定量するし、併せて虚血を利用して作成したIC動物モデルを用いて、ヒトICとの相似性を確認することを第一の目的とした。続いて、モデル確立ののちにASCを用いて動物モデルの治療を試み、これらの実験を通して、ICの病態における血行障害や内皮障害の関与を明らかにし、血管新生を主体とした組織再生による治療の可能性を探索することを最終的な目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)ヒトサンプルの検討

倫理委員会承認のもと、文書による説明で同意が得られた膀胱水圧拡張術を行うIC症例と対照として経尿道的膀胱腫瘍切除術を行う筋層非浸潤性膀胱癌症例(上皮内癌を伴わず、かつ過去にBCG膀胱内注入療法の既往が無いもの)を対象とした。なお、登録時に臨床指標としてO'Leary & Santの間質性膀胱炎症状スコア、問題スコア、疼痛スケールを記録した。検体はそれぞれ鉗子を用い、IC症例では膀胱水圧拡張術時に潰瘍型ICの場合、潰瘍部ならびに非潰瘍

部から、非潰瘍型 IC の場合、後三角部から採取、対照では非癌部の膀胱粘膜を採取した。検体は採取後、RNA later に浸漬され、-80 にて凍結保管した。その後解凍の上で RNA を抽出し、rtPCR 法にて増幅し、TRP チャンネル、ASIC1、nerve growth factor (NGF)、chemokine ligand9 (CXCL9)、uroplakin3A (UPK3A)、eNOS、VEGFA の mRNA 発現量を測定し、臨床指標と比較した。

## (2) 動物モデル作成の試み

膀胱炎モデルの一つとしてラットの膀胱内にプロタミンを投与することによって膀胱粘膜上のグリコサミノグリカン(GAG)層を破壊することで膀胱粘膜に炎症を引き起こすモデルが存在していたが、炎症は2週間程度で治癒することが我々の予備実験で判明した。そこで、間質性膀胱炎の一つの病態として説明されている虚血に着目し、また、膀胱粘膜損傷の治癒過程を障害する目的で膀胱動脈を焼灼することで虚血状態にすることで慢性炎症を引き起こし、モデルとして確立することを試みた。

6週齢の雌性SDラットに麻酔下で下腹部に切開を置き、左右の膀胱動脈を同定し、それを焼灼し、さらに経尿道的に硫酸プロタミン溶液を膀胱内注入した。その後7, 14日後にも麻酔下で硫酸プロタミン溶液を膀胱内注入し、定期的にメタボリックケージに収納して排尿状態の評価、尿流動態評価、膀胱の組織学的評価を行った。

なお、本モデルの作成にあたってコントロール、膀胱動脈焼灼のみのモデル、硫酸プロタミン溶液膀胱内注入のみのモデルも併せて作成し、本モデルと比較検討した。

## 4. 研究成果

### (1) ヒトサンプルにおける検討

50 症例 (非潰瘍型 IC 17 例、潰瘍型 IC 22 例、対照 11 例) が解析され、非潰瘍型 IC では TRPV2 と NGF の発現が有意に増加して

いた。潰瘍型 IC の非潰瘍部では TRPA1, TRPM2, TRPM8, TRPV1, TRPV2, ASIC1, NGF, CXCL9 の発現増加 ( $P > 0.05$ )、UPK3A と TRPV4 の発現減少 ( $P > 0.05$ ) を認め、潰瘍部でも同様の傾向を認めた。これらのうち、TRPM2 の発現変化が最も顕著で、TRPM2 と TRPV2 の発現は IC の臨床指標とそれぞれ関連した。VEGFA、eNOS といった虚血関連因子の発現上昇も認めたが、有意な差を認めなかった。また、同じく患者から採取した尿サンプルの検証も行ったが、測定条件の設定が難しく、研究期間中に測定系の確立をすることができなかった。

### (2) 動物モデル作成の試み

麻酔、導尿などの手術手技を適宜調整のうえで、モデル作成のプロトコルを確立した。モデルの生存率はモデル完成時点 (最終処置後 4 週間) で 60% であった。完成したモデルでは暗周期における 1 回尿量が有意に減少し、組織学的にも明らかに強い炎症像を認め、24 時間排尿回数では増加の傾向を認めた。しかし、膀胱内圧測定においては対照との間に明らかな差異を認めなかった。以上より、本モデルは現時点では種々の実験に持ちうるに堪える慢性炎症モデルとなるには課題が残されている。また、モデル作成にあたっての致死率の高さも解決すべき問題であり、今後の研究課題と考える。

## 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 17 件)

Aizawa N, Homma Y, Igawa Y.  
Effects of mirabegron, a novel 3-adrenoceptor agonist, on primary bladder afferent activity and bladder microcontractions in rats compared with the effects of oxybutynin.

Eur Urol. 2012 Dec;62(6):1165-73.  
doi: 10.1016/j.eururo.2012.08.056.

Aizawa N, Wyndaele JJ, Homma Y, Igawa Y.

Effects of TRPV4 cation channel activation on the primary bladder afferent activities of the rat.

Neurourol Urodyn. 2012 Jan;31(1):148-55.  
doi: 10.1002/nau.21212.

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. 2012 Jan;19(1):86-9.  
doi: 10.1111/j.1442-2042.2011.02883.x.

Homma Y, Nomiya A, Tagaya M, Oyama T, Takagaki K, Nishimatsu H, Igawa Y.

Increased mRNA expression of genes involved in pronociceptive inflammatory reactions in bladder tissue of interstitial cystitis.

J Urol. 2013 Nov;190(5):1925-31.  
doi: 10.1016/j.juro.2013.05.049.

Homma Y.

Hypersensitive bladder: towards clear taxonomy surrounding interstitial cystitis.

Int J Urol. 2013 Aug;20(8):742-3.  
doi: 10.1111/iju.12143.

Aizawa N, Homma Y, Igawa Y.  
Characteristics of lower urinary tract

dysfunction and bladder afferent nerve properties in type 2 diabetic goto-kakizaki rats.

J Urol. 2013 Apr;189(4):1580-7.  
doi: 10.1016/j.juro.2012.10.060.

Nomiya A, Naruse T, Niimi A, Nishimatsu H, Kume H, Igawa Y, Homma Y.

On- and post-treatment symptom relief by repeated instillations of heparin and alkalized lidocaine in interstitial cystitis.

Int J Urol. 2013 Nov;20(11):1118-22.  
doi: 10.1111/iju.12120.

Aizawa N, Ogawa S, Sugiyama R, Homma Y, Igawa Y.

Influence of urethane-anesthesia on the effect of resiniferatoxin treatment on bladder function in rats with spinal cord injury.

Neurourol Urodyn. 34;274 - 279,2015.  
doi: 10.1002/nau.22549.

野宮明、後期研修医が押さえておきたい泌尿器科疾患 TOP30、間質性膀胱炎 泌尿器外科 26;246 - 260、2013

野宮明、過活動膀胱と紛らわしい疾患・病態 鑑別疾患のポイント、膀胱の異常、間質性膀胱炎 臨床泌尿器科、67;493 - 501、2013

野宮明、実践マニュアル 膀胱のボツリヌス毒素療法 Urology Today、20;147 - 151 . 2013

野宮明、Bladder pain syndrome(膀胱痛症候群) 間質性膀胱炎の治療とその限界、排尿障害プラクティス、21;221 - 228、2013 .

Homma Y.

Hypersensitive bladder: a solution to confused terminology and ignorance concerning interstitial cystitis.  
Int J Urol. 2014 Apr;21 Suppl 1:43-7.  
doi: 10.1111/iju.12314.

Aizawa N, Hedlund P, Füllhase C, Ito H,  
Homma Y, Igawa Y.

Inhibition of Peripheral FAAH Depresses Activities of Bladder Mechanosensitive Nerve Fibers of the Rat.  
J Urol. 2014 Apr 16.  
doi: 10.1016/j.juro.2014.04.008.

Aizawa N, Homma Y, Igawa Y.  
Effects of L-arginine, mirabegron, and oxybutynin on the primary bladder afferent nerve activities synchronized with reflexic, rhythmic bladder contractions in the rat.  
Neurourol Urodyn. 2014 Feb 14.  
doi: 10.1002/nau.22571.

Nishimatsu H, Kitamura T, Yamada D, Nomiya A, Niimi A, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Nakagawa T, Enomoto Y, Kume H, Igawa Y, Homma Y.  
Improvement of symptoms of aging in males by a preparation LEOPIN ROYAL containing aged garlic extract and other five of natural medicines - comparison with traditional herbal medicines (Kampo).  
Aging Male. 2014 Jun;17(2):112-6.  
doi: 10.3109/13685538.2013.771328.

Igawa Y, Kumano S, Aizawa N, Saito Y, Ito H, Watanabe S, Takahashi N, Tajimi M, Nishimatsu H, Homma Y.

Changes in the function and expression of T-type and N-type calcium channels in the rat bladder after bladder outlet obstruction.

J Urol. 2014 Apr;191(4):1159-67.  
doi: 10.1016/j.juro.2013.10.027.

[学会発表](計11件)

Akira Nomiya, Interstitial cystitis associated with Sjogren syndrome. 42<sup>nd</sup> Annual meeting of the International Continence Society. 2012.10.18, Beijing, China.

野宮明、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 (招待講演) 第100回日本泌尿器科学会総会、2012.4.22 パシフィコ横浜、横浜

野宮明、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、2012.4.23 パシフィコ横浜、横浜

野宮明、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安全性・有効性に関する検討、第19回日本排尿機能学会総会、2012.8.30 名古屋国際会議場、名古屋

Akira Nomiya, Differently increased mRNA expression pattern of genes involved in pronociceptive inflammatory reactions in bladder tissue of classic and non-classic interstitial cystitis. 43<sup>rd</sup> Annual meeting of International Continence Society. 2013.8.29 Barcelona, Spain.

野宮明、間質性膀胱炎に対するミラベグロンの有効性と安全性、第 20 回日本排尿機能学会総会、2013.9.19 グランシップ、静岡

野宮明、膀胱内注入療法 - ヘパリン、リドカイン、メイロンカクテルの使用経験、第 78 回日本泌尿器科学会東部総会(招待講演)、2013 年 10 月 18 日、朱鷺メッセ、新潟

Akira Nomiya, Gene expression pattern of transient receptor potential C in patients with interstitial cystitis. 44<sup>th</sup> annual meeting of the International Continence Society. 2014.10.22 Rio de Janeiro, Brazil.

野宮明、間質性膀胱炎粘膜における TRPV2, TRPM2, NGF, CXCL9 の発現に関する検討、第 13 回日本間質性膀胱炎研究会、2014.1.19 東京ステーションカンファレンス、東京

野宮明 間質性膀胱炎の膀胱粘膜における親侵害受容作用に関連した遺伝子発現の検討、第 102 回日本泌尿器科学会総会、2014.4.25、神戸国際会議場、神戸

野宮明、間質性膀胱炎膀胱における TPC の発現の検討  
第 21 回日本排尿機能学会総会、2014.9.18、岡山コンベンションセンター、岡山

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野宮 明 (NOMIYA AKIRA)  
東京大学医学部附属病院・臨床研究医  
研究者番号：30372379

### (2) 研究分担者

新美文彩 (NIIMI AYA)  
東京大学医学部附属病院・助教  
研究者番号：00376451

井川靖彦 (IGAWA YASUHIKO)  
東京大学医学部附属病院・特任教授  
研究者番号：40159588

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

西松寛明 (NISHIMATSU HIROAKI)  
東京大学医学部附属病院・臨床研究医  
研究者番号：60251295

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：