

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 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：24592422

研究課題名(和文) 間質性膀胱炎の病態解明と脂肪幹細胞による治療の試み

研究課題名(英文) Creation of chronic cystitis animal model which mimics interstitial cystitis and evaluation of intravesical instillation of adipose derived stem cell to IC model bladder

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：原因不明の難治性疾患である間質性膀胱炎に対して、今だ作成されていない疾患モデルを作成し、それに対して脂肪幹細胞の膀胱内注入を行い、膀胱機能が再生可能かどうか、また疼痛の改善が可能かどうかの検証を行うことが本研究の目的であった。初めに疾患モデルである慢性膀胱炎ラットおよびマウスの作成を試みた。粘膜面を破壊するプロタミン硫酸塩および大腸菌由来のリポポリサッカライドを注入し、膀胱粘膜に炎症を惹起させることを平成25年に確認した。翌年の平成26年に実際の間質性膀胱炎と同様の症状を引き起こすかの機能実験を行った。結果、頻尿になるものの、1回排尿量の低下がなく間質性膀胱炎と類似した病態とならなかった。

研究成果の概要(英文)：Interstitial cystitis are refractory disease with unknown etiology. There is no radical treatment so far. The aim of our study is to create disease model animal of chronic inflammation and investigate the effectiveness of intravesical infusion of adipose stem cells on the disease model animal.

First, we have tried to create a chronic cystitis rats and mice model in the beginning. Lipopolysaccharide derived from E. coli and protamine sulfate was instilled into mourine bladder to destroy the mucosal surface, and inflammation was identified histologically, in 2013. Next year, we performed the functional study by bladder cystometry. A result, although the model showed frequent urination, voided volume did not decreased and failed to show similarity with interstitial cystitis in functional study.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：泌尿器科学 排尿機能学 間質性膀胱炎

1. 研究開始当初の背景

間質性膀胱炎(以下 Interstitial Cystitis: IC と略す)は頻尿・尿意切迫感・膀胱痛・骨盤痛を伴う原因不明の慢性炎症性疾患であり、その強い自覚症状により日常生活に支障をきたす難治性疾患である。米国では女性 120 万人、男性 8 万人の患者がおり、本邦でも 20 万人が罹患していると推定されている。診断法が確立されていなかったため泌尿器専門医ですら見逃しやすく、また難治性であるがゆえに放置されやすい疾患であったが、2009 年に共同研究者の本間らが作成した診療ガイドラインの普及などにより泌尿器科専門医だけでなく、家庭医および一般市民にも広く認知され始めてきている。2010 年にはアジア地域の泌尿器科学会においても Interstitial cystitis/Hypersensitive bladder syndrome(HBS)の概念でガイドラインが作成されている。

しかし、患者数が増加するだけ治療に難渋する症例も増えてきており、病態の解明および治療方法の確立が急務と考えられる。また、泌尿器科医であっても IC の専門家が少ないため、我々の教室には他の高次医療機関からの紹介患者が集中し、国内では有数の IC の診断、治療機関となっている。その点、IC の病態や治療方法の研究を行うことで、難治性疾患に苦しむ患者達に「病因の解明と根治療法の確立」という形で還元することが、我々の教室の責務でもあると考えている。

1) IC の病態

IC は 1914 年 Hunner による膀胱痛、頻尿、尿意切迫を伴う 8 例の症例報告に始まる。1978 年 Messing & Stamey らが特異的な膀胱鏡所見であるハンナー潰瘍と水圧拡張時の点状出血を報告した。病理学的には、潰瘍型 IC では炎症細胞浸潤や間質の浮腫や線維化、肥満細胞およびマクロファージの浸潤が目立つ。分子としては、血管内皮増殖因子(以下 VEGF と略す)、ケモカインである CXCR3 binding chemokine や TNF ligand の発現が亢進していることが近年報告されている。これらの炎症細胞や VEGF の連関を担う機構の一つとして、ストレスによる CRH の放出や膀胱内の局所的な低酸素状態の関与が想定される。ストレスにより局所性 CRH の上昇が認められ、これにより炎症細胞の活性化やサイトカイン放出が認められ、これが IC の増悪の機序の一端を担うと考えられる。

2) IC の治療

膀胱水圧拡張術や、抗ヒスタミン剤・抗アレルギー剤の経口投与や DMSO やヘパリンの膀胱内注入、ボツリヌス毒素の膀胱壁注入や最終手段としての膀胱全摘まで行われているが、低侵襲でなおかつ根治的治療法は未だない。今までは病態モデルで確立したものがなく in vivo での実験が困難であったが、共同研究者らが膀胱虚血およびプロタミン注入による膀胱潰瘍モデルラットを既に作製

しており、IC に対する治療効果をもモデルで検討する。

IC の治療には尿路上皮や平滑筋組織の変性・潰瘍形成を誘発する微小循環の改善が必要と考えられる。これらの病態は、幹細胞の臨床応用が既に検討されている閉塞性動脈硬化症、急性心筋梗塞などと類似しており、幹細胞導入が適した治療となる可能性がある。共同研究者の西松らは、皮下脂肪から誘導した幹細胞を用いてラット下肢動脈障害モデルでの細胞導入や糖尿病ラット ED モデルで先行的に報告している。

2. 研究の目的

a) IC の病因として、全身疾患である動脈硬化と pro-inflammatory cytokines の関係とストレスによる症状の増悪に着目し、動脈硬化モデルマウスにストレスをかけ、より組織低酸素が助長されるかどうかを検討する。

b) 未だ、確立されていない間質性膀胱炎のモデルラットおよびモデルマウスを作成する。
c) 幹細胞を IC の治療として利用可能か検討する。自分の皮下脂肪から数週間で幹細胞を誘導し投与することで繰り返す炎症により不可逆的に変性した膀胱壁の修復・治療が可能となれば、本研究が臨床応用できた暁には難治性炎症性疾患治療の breakthrough となるであろう。今回使用を検討している Adipose tissue-derived stem cells (ASC) は皮下脂肪から誘導が可能で低侵襲である。ASC は血管内皮、血管平滑筋、心筋細胞の他、脂肪細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、肝細胞、神経細胞、膵島細胞、骨格筋細胞へ分化することが示されておりその効果が期待される。

3. 研究の方法

1) ラット間質性膀胱炎モデル(潰瘍モデル)の解析およびマウス間質性膀胱炎モデルの作製とヒト検体および IC マウスモデル、コントロールでの形態学的な比較を行う。

間質性膀胱炎発生機序の解明には、vivo モデルの樹立が必須である。非可逆的な膀胱変性にも着目すれば、膀胱内プロタミンの短期連続注入モデルや塩酸膀胱内注入の併用、もしくは膀胱平滑筋局所注入モデルを用いると、非可逆的な膀胱尿路上皮や平滑筋の障害を作成できる。共同研究者らは病理学的に再現性の高い動物実験モデルを既に作成している。本モデルで頻尿となることは確認されているため、今回はより精密なメタボリックケージで測定を行い、モデルのバリデーションを行う。また、動脈硬化および炎症性変化がベースにある ApoE ノックアウトマウスを用いて、その膀胱に粘膜障害する薬剤であるプロタミンを投与し、間質性膀胱炎症状の再現が可能かどうかの検証を行う。

2) 1) で IC モデルが実際に IC の病態を反映したモデルであることを確認したのち、脂肪幹細胞を IC モデルに投与し、未治療群と治療過程の比較する(平成 25-26 年度予定)。

GFP 遺伝子をアデノウイルスベクターで前述の脂肪幹細胞 (ASC) に導入した細胞を用い、注入後経時的な誘導変化を形態学的に検討。自家蛍光を有するラット組織には蛍光顕微鏡だけでなく GFP 抗体を用いた免疫染色でどの様に誘導されていくのか、どのように膀胱組織に分化するかを、組織と生理実験と併せて解析する。また、どの様な投与形態が効率よく、脂肪幹細胞が移行するのかを検討する。実際には 1) 膀胱内注入、2) 膀胱粘膜下注入、3) 膀胱筋層局所注入、4) 内腸骨動脈からの動脈系への投与の 4 群で評価を行う。本研究で使用する共同研究者の西松らが誘導した脂肪幹細胞は特に内皮誘導した段階で高率に adrenomedullin (AM) を産生している。AM は強力な血管作動性ペプチドであり、これによる血管内皮細胞での NO 産生は phosphatidylinositol 3-kinase / Akt による eNOS 活性化を介することを共同研究者らが報告済みである。(Nishimatsu H et al. Circ Res. 2001; 89: 63-70, Hypertens Res 2003; 26 Suppl:S79-84)。AM は抗炎症作用と組織修復作用があり、近年では炎症性腸疾患の治療薬として期待されているが、本幹細胞をもちいることの副次的効果として間質性膀胱炎に対しても抗炎症作用を期待できると考えられる。

4. 研究成果

10 週の SD Rat を用いて、まずは PS10mg/ml 1ml と LPS2mg/ml 1ml 全麻下 5 日間連続膀胱注を行った。下記のごとく 3 群に分け、薬効の判定を行った。

Group 1:

PS 10mg/ml 注入 + LPS2mg/ml 注入

Group 2:

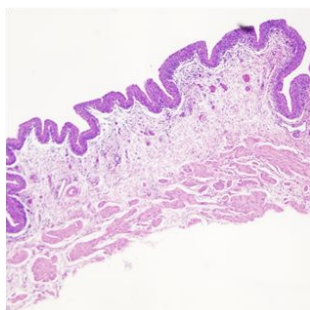
PS 10mg/ml 注入 + Vehicle (NS) 注入

Group 3:

Vehicle(NS) 注入 + LPS 2mg/ml 注入

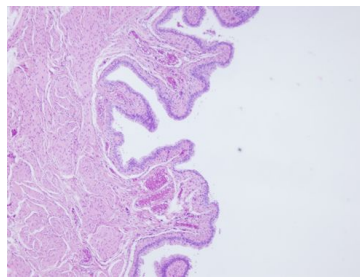
(各 n=10)

これによる組織所見は両者を注入した Group1 では粘膜下に炎症細胞浸潤を認めた。しかしながら、IC に特異的な上皮の剥離は認められなかった。



Group1

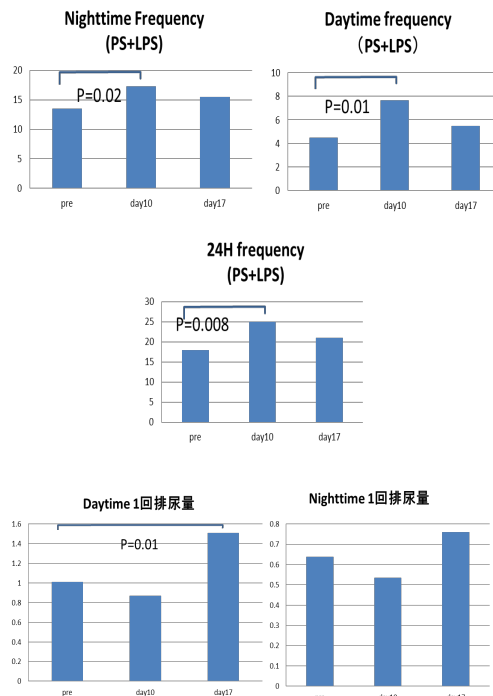
Group2 および Group3 では炎症は軽微であり、カテーテル挿入による影響が考えられた。



Group2

膀胱機能の評価としてメタボリックケージを用いて排尿状態を観察した。

Group1 Frequency volume chart



FVC 上は頻尿になっているものの、1 回排尿量が増加しており、多飲多尿になっていると考え、間質性膀胱炎の症状である、1 回排尿量の減少や萎縮膀胱などは認められなかった。

また、pro-inflammatory cytokines が高値となる ApoE ノックアウトマウスを用いて同様に FVC 所見の評価を行ったが、やはり頻尿は認められず、病理学的にも炎症細胞浸潤の増悪などは認められなかった。

共同研究者らによって既に先行研究として行い、特許出願なども行っていた膀胱動脈の部分焼灼とプロタミン塩酸塩の膀胱内注入による虚血 + 粘膜障害を反映したモデルでは、逆に膀胱収縮不全が出現したのか、膀胱内に高度の結石形成が起き、間質性膀胱炎モデルとしては不適切であると判断された。また、アクロレイン膀胱内注入による旧制膀胱炎モデルについても慢性化するかどうかの評価を行ったが、開始 1 週間ではほぼ正常の状態に戻ってしまった。

本来であれば平成 25 年までの時点でモデル作成を終了し、実際の幹細胞注入を行う予定であったが、前述のとおり、間質性膀胱炎モデルラットの作成に難渋したため、脂肪幹細胞の膀胱内注入実験についてはいまだ到

達できていない。今後慢性炎症モデルの研究は継続し、疾患モデルが確立した時点で、幹細胞投与の効果判定を行いたいと考えている。

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9件)

1. Nishimatsu H, Suzuki E, Saito Y, Niimi A, Nomiya A, Fukuhara H, Homma Y. Senescent Cells Impair Erectile Function through Induction of Endothelial Dysfunction and Nerve Injury in Mice. e0124129, 2015
2. Homma Y. Hypersensitive bladder: A solution to confused terminology and ignorance concerning interstitial cystitis. International Journal of Urology, 21(S1), 43-47, 2014
3. Homma Y. OAB symptoms: assessment and discriminator for etiopathology. Current opinion in urology, 24(4), 345-351, 2014
4. Homma Y. Hypersensitive bladder - towards clear taxonomy surrounding interstitial cystitis: Int J Urol. 20: 742-3, 2013
5. 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 190: 1925-31, 2013
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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

[学会発表](計14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 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、野宮 明、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. 難治性間質性膀胱炎に対して施行した膀胱拡大術と膀胱全摘除術の検討 第78回日本泌尿器科学会東部総会、2013年10月、新美文彩、新潟
7. 難治性間質性膀胱炎に対するトラマドール塩酸塩の有効性の検討、第101回日本泌尿器科学会総会、2013年4月、新美文彩、札幌
8. 間質性膀胱炎症例の併存疾患の検討、第101回日本泌尿器科学会総会、2013年4月、野宮 明、新美文彩、札幌
10. 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、2013年9月、野宮明、静岡
11. 間質性膀胱炎とその類似疾患、第100回山形泌尿器科研究会、2013年6月、本間之夫、山形
12. Differently increased mRNA expression pattern of genes involved in pronociceptive inflammatory reactions in bladder tissue of classic and non-classic

- interstitial cystitis. 43rd Annual Meeting of the International Continence Society, October 2013, Akira Nomiya, Barcelona, Spain
13. Expression of and Localization of Estrogen Receptor Beta in IC/PBS bladder. 43rd Annual Meeting of the International Continence Society, October 2013, Aya Niimi, Barcelona, Spain
14. EFFECTS OF RETIGABINE, A KV7 CHANNEL ACTIVATOR, ON NOCICEPTIVE BEHAVIOUR AND BLADDER OVERACTIVITY INDUCED BY INTRAVESICAL CHEMICAL IRRITATION IN CONSCIOUS RATS. 43rd Annual Meeting of the International Continence Society, October 2013, Yasuhiko Igawa, Yukio Homma, Barcelona, Spain
15. 間質性膀胱炎における治療抵抗性を予測する因子の検討、第 13 回日本間質性膀胱炎研究会、2014 年 1 月、新美文彩、東京
16. 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 年 4 月、野宮明、神戸
17. 間質性膀胱炎に対するヘパリン・リドカイン膀胱内注入療法の維持療法、第 102 回日本泌尿器科学会総会ワークショップ 2014 年 4 月、新美文彩、神戸

〔図書〕(計 1 件)

LUTS 診療ロードマップ 2015 年 新美文彩
ISBN978-4-7583-1261-5

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
該当なし

取得状況 (計 0 件)
該当なし

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新美文彩 (NIIMI, Aya)

東京大学医学部泌尿器外科学 助教

研究者番号 : 00376451

(2) 研究分担者

野宮 明 (NOMIYA, Akira)

東京大学医学部泌尿器外科学 助教
研究者番号 : 30372379

西松寛明 (NISHIMATUS, Hiroaki)

東京大学医学部泌尿器外科学 准教授
研究者番号 : 60251295

井川靖彦 (IGAWA, Yasuhiko)

東京大学医学部コンチネンス医学講座 特任教授
研究者番号 : 40159588

本間之夫 (HOMMA, Yukio)

東京大学医学部泌尿器外科学 教授
研究者番号 : 40165626

(3) 連携研究者

鈴木 越 (SUZUKI, Etsu)

聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 講師

研究者番号 : 40313134