

エクソソームを用いた間質性膀胱炎の 新規診断マーカーの確立と分子機構の解明

東京慈恵会医科大学泌尿器科 助教 占部 文彦

要 約

間質性膀胱炎は頻尿・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。特に、ハンナ型間質性膀胱炎は難病(226)に指定されている。ハンナ型間質性膀胱炎の重症例においては、排尿間隔が昼夜問わず30分未満という極度の頻尿と常時生じる尿意切迫感により睡眠が著しく阻害され、更にはえぐるような強烈な膀胱痛のため仕事や家事に集中できないなど、QOLが極度に損なわれる疾患である。一方で間質性膀胱炎には有効な診断マーカーが存在しておらず、その診断に苦慮するケースが多い。本研究では、リキッドバイオプシーとしてその有効性が期待されている、エクソソームに内包されるマイクロRNAに着目し、新規診断マーカーの確立を目指した。間質性膀胱炎(N=8)及び膀胱痛症候群患者(N=2)と健常コントロール(N=10)の尿から、マイクロ流路内にナノサイズの針状構造体(ナノワイヤ)を有するナノワイヤデバイスを用いて、エクソソームを分離し、マイクロRNAを抽出した。得られたマイクロRNAの発現解析を網羅的に行うことで、miR-373-5pとmiR-6766-5pの2つのマイクロRNAが間質性膀胱炎の診断に有用となり得ることを示した。今後、さらなる検討を要するが、将来的に、泌尿器科の日常診療において有益なものになることを期待している。

緒 言

エクソソームと呼ばれる細胞外小胞は、あらゆる細胞から分泌される小胞であり、マイクロRNAなどの核酸や蛋白質などを内包している。最近の研究によりこれらの内包物は、分泌細胞の情報を反映しバイオマーカーに使用できる可能性が示されている。さらにエクソソームを介してこれらの内包物が細胞間で受け渡されており、エクソソームが細胞間情報伝達に寄与し、がん微小環境や遠隔転移などに大きく関わっていることが明らかにされ、疾患の治療抵抗性の原因の一つと考えられている。そのため、エクソソーム研究は新たな診断マーカーの確立および病態解明につながることを期待されている。

間質性膀胱炎は頻尿・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。特に、ハンナ型間質性膀胱炎は難病(226)に指定されている。本邦では現在までに約1万人が罹患していると報告されており、患者の約90%は中高年女性である。また近年、患者数が増加するに伴い、治療に難渋する症例も増加しており、病態の解明および治療法の確立は喫緊の課題である。さらに間質性膀胱炎は明確な診断マーカーがなく、泌尿器科医

であってもその診断に難渋するケースが多いため、診断法の確立も待望されている。尿や血液を対象とした分子マーカーによる非侵襲的診断(リキッドバイオプシー)は大いに期待される場所であるが、間質性膀胱炎においてはまだ確立したものはない。

そこで本研究を通して、エクソソームを間質性膀胱炎の診断マーカーの確立や病態解明に応用したいと考えた。間質性膀胱炎とエクソソームに関する研究成果は現在までに報告はなく、本研究では間質性膀胱炎患者の尿中に含まれるエクソソームを解析し、周囲の細胞とのエクソソームを介した分子基盤を解明することで、エクソソームを利用した間質性膀胱炎における新たな治療戦略の確立を目指した。

方 法

間質性膀胱炎・膀胱痛症候群・健常コントロールの尿の採取

東京慈恵会医科大学の臨床研究倫理委員会で承認を受けた後、インフォームドコンセントを得て間質性膀胱炎(N=8)及び膀胱痛症候群患者(N=2)と健常コントロール(N=10)の尿を東京慈恵会医科大学附属病院で採取した。間質性膀胱炎と膀胱痛症候群の定義は直近の日本のガイドラインに従った¹。尿は

採取後、直ちに1,500 rpmで5分間遠心分離し、上清を-80度で凍結保存した。

尿中エクソソームの捕捉とmiRNAの精製

マイクロ流路内にナノサイズの針状構造体(ナノワイヤ)を有するナノワイヤデバイスを用いて、上記尿500 μ lからエクソソームを抽出した。本デバイスは、表面電位のことなる酸化ナノワイヤ(直径数10-100nm)を剣山のように密集してガラス基板上に溶液成長させたナノ構造体を試料液流路に設けたナノワイヤマイクロ流体デバイスを使用し、流れる尿中のエクソソームをナノワイヤの表面電荷により捕捉する方法である^{2,3}。捕捉されたエクソソームに溶解バッファーを加えて抽出したmiRNA含有溶液を、Wako microRNA Extractor SP Kit(FUJIFILM Wako Chemical Corporation)を用いて精製した。

マイクロアレイ

精製されたマイクロRNAはマイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を実施した。3D Gene miRNA Labeling Kitと3D-Gen Human miRNA Oligo Chip(東レ株式会社)を用いて網羅的なmiRNA発現解析を実施した。マイクロアレイ上の各スポットの蛍光シグナルは、3D-Gen Microarray Scanner(東レ株式会社)を用いて取得し、デジタル化アプリケーション

「Extraction」を用いてデジタル化した。バックグラウンドシグナルは正規分布し、真のシグナル値は指数分布することを仮定して、真のシグナル値を統計学的に推測するために、Rawシグナル値からバックグラウンドを差し引いて使用した⁴。50%以上のサンプルでこの値が2⁶を上回ったmiRNAを選択した。バックグラウンドを差し引いたシグナル値をlog2変換して使用した。本研究で得られたマイクロアレイデータは、GEOデータベースにGSE196156で寄託されている。

解析

HIC/BPSと対照群を分類できる上位20のmiRNAをLeave-one-out cross validation法を用いて検討し、AUC値 \geq 0.85、cross-validated accuracy \geq 0.85のmiRNAを選択した。患者特性のカテゴリ変数と連続変数は、それぞれカイ二乗検定とマン・ホイットニーのU検定を用いて比較した。すべての解析において、両側P値が0.05未満を統計的に有意とみなした。

結果

マイクロRNAによる疾患分類の可能性

対象患者の特徴を図1に示す。男性患者は3例、女性患者は17例であり、平均年齢は53.3歳であった。Quality checkを通過した485種類のmiRNAを用いて教師なしのクラスタリング解析を行ったところ、間質性膀胱炎/膀胱痛症候群と健常コントロールを大まかに分類することが出来た(図1)。

a)

	HIC (n=8)	BPS (n=2)	Control (n=10)	p-value (HIC/BPS vs Control)
Female	6 (75.0%)	1 (50%)	10 (100%)	0.06
Age years	59.9 (10.7)	49 (5.7)	48.9 (18.4)	0.325
BMI	22.3 (2.2)	19.2 (1.1)	25.7 (3.9)	0.041
OSPI	11.5 (4)	10 (0)	NA	NA
OSSI	13.3 (3.8)	8.5 (0.7)	NA	NA
VAS score	7.7 (3.1)	7 (0)	NA	NA

Values are n (%) or mean (SD)

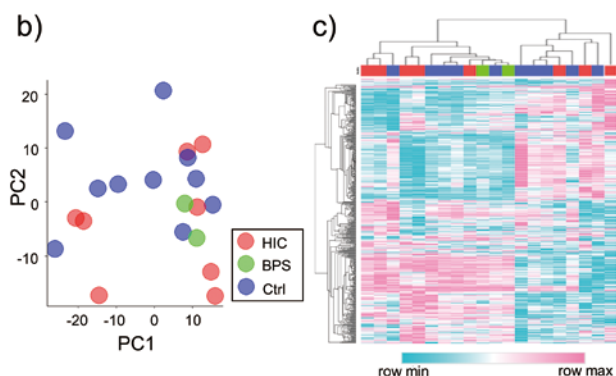


図1 (a)患者背景 (b)PCA mapおよび(c)Heatmapによる各症例におけるmiRNA発現量の違い

診断に有用なmiRNAの選定

これらのmiRNAの中で、miRNA-375-5pはAUC: 0.89、cross-validated accuracy: 0.90であり、miR-6766-5pはAUC: 0.86、cross-validated accuracy: 0.85を示した(図2)(表1)。特にこれらのmiRNAは間質性膀胱炎患者において、有意にシグナル値が上昇(miR-6766-5p)または低下(miR-373-5p)していた(図2)。

スコアとの比較

間質性膀胱炎の自覚症状の評価としてOSSI, OSPI, VASスコアを評価した。選定したmiRNAとスコアの値に相関関係があるかを評価したが、miR-373-5pでは若干の傾向を認めたが、有意な関連は認められなかった(図3)。

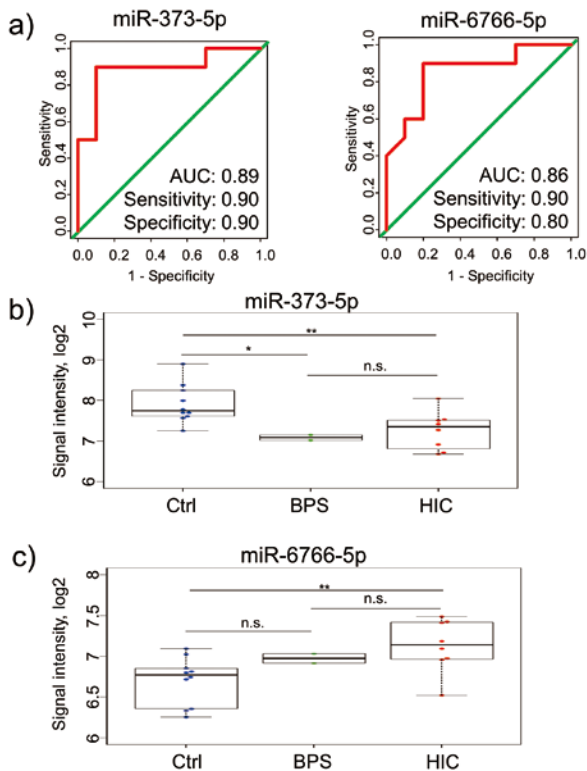


図2
 a) miR-373-5pとmiR-6766-5pの診断能の違い
 b) miR-373-5pの各症例における発現量
 c) miR-6766-5p各症例における発現量

表1. 尿中miRNAによる間質性膀胱炎の診断能

Rank	miRNA	AUC	Cross-validated accuracy
1	miR-373-5p	0.89	0.90
2	miR-6766-5p	0.86	0.85
2	miR-6813-5p	0.79	0.85
3	miR-1181-3p	0.82	0.80
3	miR-4638-5p	0.85	0.80
3	miR-4648	0.80	0.80
3	miR-4730	0.77	0.80
3	miR-4731-5p	0.84	0.80
3	miR-6090	0.81	0.80
3	miR-6778-5p	0.80	0.80
3	miR-6872-3p	0.79	0.80
4	miR-204-3p	0.76	0.75
4	miR-2392	0.73	0.75
4	miR-3188	0.74	0.75
4	miR-371a-5p	0.80	0.75
4	miR-375-5p	0.70	0.75
4	miR-4447	0.83	0.75
4	miR-4454	0.73	0.75
4	miR-4476	0.77	0.75
4	miR-4675	0.77	0.75

考察

本研究では、IC/BPS患者の診断に有用なエクソソーム中の2つのmiRNAを同定した。以前、Liuらは尿中エクソソームに含まれるmiR-19a-3pとlong noncoding RNA (MEG3)の組み合わせにおける間質性膀胱炎の診断価値を評価したが⁵、彼らは以前に報告のあったRNAに焦点を当て検討をおこなっている⁶。我々の知る限り、今回の研究は、IC/BPS患者の尿中エクソソームに含まれるmiRNAの診断価値を包括的に検討した最初の研究となる。本研究の強みは、miRbaseにより現在までに同定されたすべてのヒトmiRNAを構成する2,632のmiRNAの発現プロファイルを調べたことである。

弱点としては、診断のための候補miRNAとして選んだ2つのmiRNA (miR-373-5pとmiR-6766-5p)のIC/BPS患者における機能解析が現時点では行っていない点が挙げられる。今後、これらのmiRNAに着目して、間質性膀胱炎の病態に関与し得るかを、組織検体を用いて検討することも予定している。さらに、サンプルサイズが小さく、サンプルは1つの施設で収集されたものであり、臨床応用についてはさらなる検討が今後必要といえる。

しかしながら、我々の今回の検討は、尿中エクソソームに含まれるmiRNAが間質性膀胱炎の診断に有用である可能性を示すことが出来た。近い将来、泌尿器科の日常診療において有益なものになることを期待する。

謝辞

本研究に助成頂きました公益財団法人神澤医学研究振興財団に深謝致します。

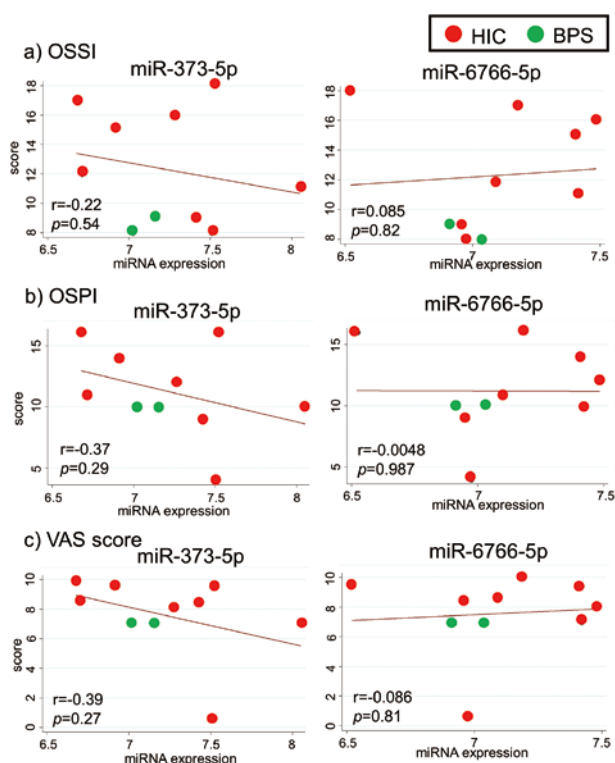


図3. miR-373-5pおよびmiR-6766-5pの発現量と
 a) OSSI, b) OSPI, and c) VAS scoreの相関図

参考文献

1. Homma Y, Akiyama Y, Tomoe H, Furuta A, Ueda T, Maeda D, et al. Clinical guidelines for interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*. 2020;27(7):578-89.
2. Yasui T, Yanagida T, Ito S, Konakade Y, Takeshita D, Naganawa T, et al. Unveiling massive numbers of cancer-related urinary-microRNA candidates via nanowires. *Science advances*. 2017;3(12):e1701133.
3. Kitano Y, Aoki K, Ohka F, Yamazaki S, Motomura K, Tanahashi K, et al. Urinary MicroRNA-Based Diagnostic Model for Central Nervous System Tumors Using Nanowire Scaffolds. *ACS applied materials & interfaces*. 2021;13(15):17316-29.
4. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics (Oxford, England)*. 2003;4(2):249-64.
5. Liu F, Chen Y, Liu R, Chen B, Liu C, Xing J. Long noncoding RNA (MEG3) in urinal exosomes functions as a biomarker for the diagnosis of Hunner-type interstitial cystitis (HIC). *Journal of cellular biochemistry*. 2020;121(2):1227-37.
6. Arai T, Fuse M, Goto Y, Kaga K, Kurozumi A, Yamada Y, et al. Molecular pathogenesis of interstitial cystitis based on microRNA expression signature: miR-320 family-regulated molecular pathways and targets. *Journal of human genetics*. 2018;63(5):543-54.

Abstract

Interstitial cystitis is characterized by pelvic pain, pressure, or discomfort related to the urinary bladder, often accompanied by urinary urgency or frequency and relieved by voiding. However, diagnosis varies widely depending on the urologist's experience. Recently, liquid biopsy using microRNA in biofluids shows promise for early cancer detection. microRNAs are small noncoding RNAs consisting of about 20 nucleotides. They can be stably present in extracellular vesicles, and the profiles of microRNA expression in extracellular vesicles make them good candidates for improving the diagnosis of a variety of diseases.

Here we comprehensively analyzed the urinary extracellular vesicle microRNA expression profile and evaluates its potential as a novel biomarker in interstitial cystitis patients. Leave-one-out cross-validation was used to identify the top 20 miRNAs by accuracy of correctly classifying interstitial cystitis/bladder pain syndrome and controls in ROC curve analysis. miR-375-5p showed an AUC of 0.89 and cross-validated accuracy of 0.90, and miR-6766-5p showed an AUC of 0.86 and cross-validated accuracy of 0.85. The signal intensity of miR-6766-5p was significantly higher, and of miR-373-5p was significantly lower, in interstitial cystitis patients than in the control patients. Further investigation of clinical applications will thus be required. However, our pilot study showed that urinary extracellular vesicle microRNAs are potentially useful for diagnosing interstitial cystitis. This point may prove beneficial to urologists in daily clinical practice in the near future.