

《様式B》

研究テーマ 「RNA-Seq 解析と GEO 解析を融合した間質性膀胱炎の創薬ターゲットのスクリーニング」

研究責任者	所属機関名	名古屋市立大学大学院薬学研究科
	官職又は役職	講師
	氏名	堀田祐志
	メールアドレス	yhotta@phar.nagoya-cu.ac.jp
共同研究者	所属機関名	名古屋市立大学大学院医学研究科
	官職又は役職	講師
	氏名	片岡智哉
	所属機関名	名古屋市立大学大学院医学研究科 名古屋市立大学大学院薬学研究科
	官職又は役職	教授
	氏名	木村和哲

(令和2年度募集) 第33回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1,000字程度)  
※産業技術として実用化の可能性や特許出願 (予定も含む) の有無についてもご記載ください。

2. 実施内容および成果の説明 (A4で、5ページ以内)

## 1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要（1, 000字程度）

本研究では、間質性膀胱炎（IC）の新規治療薬の開発を目指して、IC モデル動物と IC 患者の遺伝子発現解析を統合して創薬シーズのスクリーニングを行った。IC 治療法の開発における課題の一つとして、IC モデル動物の IC 患者への外挿性が必ずしも高くないことが挙げられる。本研究では、IC モデル動物での RNA-seq 解析とヒトの遺伝子発現データベース Gene Expression Omnibus（GEO）を組み合わせることで、IC モデル動物と IC 患者の膀胱組織で共通して遺伝子発現が上昇もしくは減少する遺伝子を探索した。雌性、10 週齢の F344/NSIc ラットに塩酸を膀胱内投与して IC モデルラットを作製し、1 週間後に膀胱組織を摘出して RNA-seq 解析を用いて IC 特異的な遺伝子発現変動を評価した。また GEO マイクロアレイデータベースから IC 患者の膀胱生検中の遺伝子発現データセットを取得して IC 特異的な遺伝子発現変動を評価した。IC モデルラットおよび IC 患者の膀胱組織において共通した発現変動遺伝子を抽出し、GO 解析や KEGG pathway 解析、ハブ遺伝子の解析を行い、生物学的特徴を評価した。解析を進め、IC ではタンパク質 A（特許公開前のため A と記載）に関する経路が亢進していることを見出した。次に、IC モデルラットに対してタンパク質 A 阻害剤である化合物 X（特許公開前のため X と記載）を投与し、1 週間後に膀胱機能評価および疼痛評価を行った。化合物 X の投与により、IC モデルラットの頻尿症状および疼痛症状が改善した。さらに新規 IC 治療薬としてのタンパク質 A 阻害剤の臨床応用を目指した化合物の探索を行い、別疾患に対して第Ⅲ相試験まで行われたタンパク質 A 阻害剤である化合物 Y（特許公開前のため Y と記載）に着目した。IC モデルラットに対して化合物 Y を投与することにより、頻尿症状が改善した。以上の結果から、IC の新規治療ターゲットとしてタンパク質 A を同定し、その阻害剤である化合物 Y が IC モデルラットの症状改善に有効であることを明らかにした。さらにタンパク質 A に関する経路は IC 患者においても活性化していることを確認しているため、化合物 Y は IC 患者に対しても有用である可能性が期待できる。

本研究では、IC のモデル動物および患者の遺伝子発現解析を統合することにより創薬ターゲットを探索し、新規 IC 治療薬として化合物 Y のドラッグリポジショニングの可能性を見出した。効果的な治療法の確立が急務である IC に対して、化合物 Y が有用な新規治療薬となることが期待される。

## 2. 実施内容および成果の説明（A 4 で、5 ページ以内）

### 【背景】

ハンナ型間質性膀胱炎（IC）は「膀胱の非特異的な慢性炎症を伴い、頻尿・尿意亢進・尿意切迫感・膀胱痛などの症状を呈する疾患」と定義され、難病に指定されている（指定難病 226）。IC 診療ガイドラインでは、IC の罹患率または示唆する状態の頻度は 0.01%~2.3%の範囲とされている。IC は頻回な排尿や膀胱の痛みによる苦痛から生活の質は大きく損なわれ、日常生活には多大の障害が生じる。本邦では膀胱水圧拡張術および DMSO 膀胱内注入療法が IC 治療法として保険収載されている。しかしながら、いずれも対症療法であり、確立した根治療法は存在しない。またこれらの治療法の有効性は限られており治療後の再燃も問題となっているため、有効な治療法の確立が望まれている。

これまでに多くの IC モデル動物を用いた基礎研究で有効な治療法が報告されているものの、IC 患者に対する有効性や安全性が認められない例が多い。この原因として、IC モデル動物がヒト IC の病態を部分的にしか反映できていないことが挙げられる。そこで本研究では、RNA-seq 技術を用いた IC モデル動物の遺伝子発現解析に加えて、ヒトの遺伝子発現データベース Gene Expression Omnibus（GEO）を用いた解析を組み合わせることにより、ヒトへの外挿性が高い新規 IC 治療ターゲットを探索した。さらに IC モデル動物を用いて、同定した新規 IC 治療ターゲットの有用性を検討した。

### (1) 新規 IC 治療ターゲットの探索

### 【方法】

IC モデルとして、汎用されている塩酸誘発性 IC モデルを用いた。雌性、10 週齢の F344/NSIc ラットに塩酸を膀胱内投与し、IC モデルラットを作製した。対照群として生理食塩水を膀胱内投与したコントロールラットを作製した。1 週間後に膀胱組織を摘出し、RNA-seq 解析を用いて IC 特異的な遺伝子発現変動を評価した。また GEO マイクロアレイデータベースから 5 名の IC 患者および 6 名のコントロール患者の膀胱生検中の遺伝子発現データセットである GSE11783 を取得し、GEO2R を用いて IC 特異的な遺伝子発現変動を評価した。IC モデルラットおよび IC 患者の膀胱組織において共通して発現変動がみられた遺伝子を抽出した。共通発現変動遺伝子に対して Gene Ontology（GO）解析を行い、生物学的プロセス（Biological Process; BP）、細胞の構成要素

(Cellular Component; CC) 、分子機能 (Molecular Function; MF) について詳細な検討を行った。また KEGG pathway 解析によりシグナル伝達系を、タンパク質間相互作用 (PPI) 解析により多くの遺伝子に影響を及ぼすハブ遺伝子の同定を行った。解析結果を総合的に考慮して、新規 IC 治療ターゲット候補を抽出した。Real-time PCR を用いて、抽出した治療ターゲットの IC モデルラットの膀胱組織における遺伝子発現量を確認した。

## 【結果】

IC モデルラットの膀胱組織ではコントロールラットの膀胱組織と比較して 324 個の発現変動遺伝子 (251 個の発現上昇遺伝子および 73 個の発現減少遺伝子) が観察された。IC 患者の膀胱組織ではコントロール患者の膀胱組織と比較して 4262 個の発現変動遺伝子 (1552 個の発現上昇遺伝子および 2710 個の発現減少遺伝子) が観察された。IC モデルラットおよび IC 患者の膀胱組織では共通して 59 個の発現変動遺伝子 (49 個の発現上昇遺伝子および 10 個の発現減少遺伝子) が観察された。共通した発現上昇遺伝子における GO 解析および KEGG pathway 解析より、IC の病態に関与する可能性のあるシグナルやパスウェイを同定した。さらに PPI 解析により、40 個のノードと 135 個のエッジからなる相互作用ネットワークを作成し、5 個のハブ遺伝子を抽出した。GO 解析や KEGG pathway 解析、ハブ遺伝子の解析結果から、IC ではタンパク質 A (特許公開前のため A と記載) に関する経路が亢進していることを見出した。また IC モデルラットの膀胱組織においてタンパク質 A の遺伝子発現が上昇していることを確認した。

## 【考察】

IC モデルラットと IC 患者の遺伝子発現解析を統合することにより、共通して発現変動する遺伝子を抽出することに成功した。さらに解析を進めることにより、新規 IC 治療ターゲットの候補遺伝子を複数同定した。この治療ターゲットはモデル動物を用いた薬効評価や作用メカニズム解明が可能であり、かつヒトへの外挿性が高いことが期待できる。

### (2) タンパク質 A をターゲットとした新規 IC 治療薬の開発

#### (2-1) モデル動物を用いたタンパク質 A 阻害剤の IC 改善効果の検討

## 【方法】

実験 (1) で同定したタンパク質 A の IC 治療ターゲットとしての有用性について、IC モデル動物を用いて検討した。IC モデルはこれまでと同様に塩酸誘発性 IC モデルを用いた。塩酸の膀胱内投与の直後にタンパク質 A 阻害剤である化合物 X (特許公開前のため X と記載) を腹腔内投与し、コントロールには等量の生理食塩水を腹腔内投与した。1 週間後に膀胱内圧測定による膀胱機能評価および Von Frey テストによる疼痛評価を行った。膀胱内圧測定では、膀胱の頭頂部からポリエチレンカテーテルを挿入・留置し、圧トランスデューサーおよび Power Lab に接続した。圧トランスデューサーにシリンジポンプを接続し、40 $\mu$ L/min の生理食塩水を膀胱内に連続的に注入しながら、膀胱内圧および排尿量を測定した。膀胱内圧曲線上の排尿ピーク直後の圧を基礎膀胱内圧、排尿ピーク直前の圧を排尿閾値、排尿ピークの圧を最大膀胱内圧、排尿ピーク間隔を排尿間隔、排尿ピーク時の排尿量を 1 回排尿量とした。Von Frey テストでは、ラットを底面が金網の代謝ケージ内に入れ、10 分間馴化した。Electronic von Frey filament を用いて下腹部へ圧力を漸増させながら刺激し、逃避反応がみられた圧力を疼痛閾値として測定した。測定は 5 分の間隔を空けて 3 回行い、平均値を算出した。

## 【結果】

IC モデルラットでは、コントロールラットと比較して排尿間隔の短縮および疼痛閾値の低下が観察された。化合物 X を投与することにより、IC モデルラットの排尿間隔の短縮および疼痛閾値の低下が改善され、1 回排尿量はコントロールラットと同程度となった (Fig.1)。基礎膀胱内圧、排尿閾値、最大膀胱内圧については、全ての群で変化が見られなかった。

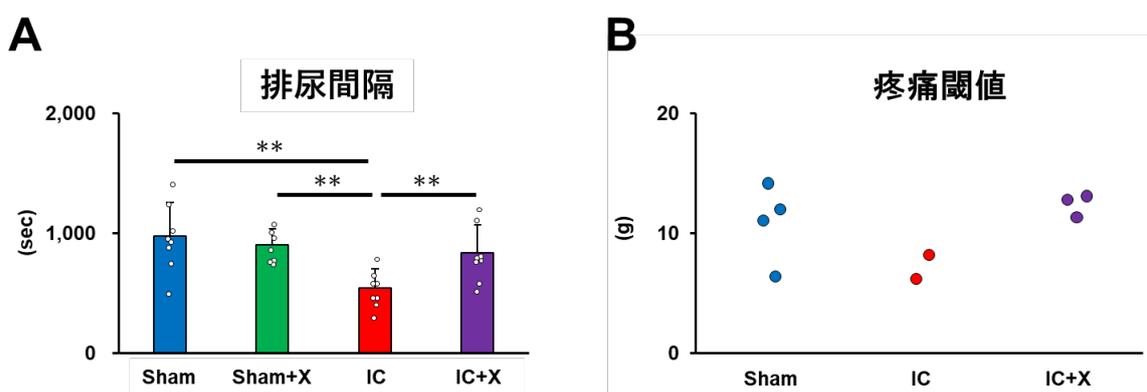


Fig.1 膀胱機能評価および疼痛評価

A. 排尿間隔 B. 疼痛閾値

Mean±S.D. n=7-8. two-way ANOVA. \*\*P<0.01

### 【考察】

化合物 X の投与により IC モデルラットの頻尿症状および疼痛症状が改善され、一方で他の排尿パラメータには影響を及ぼさなかった。以上の結果から、タンパク質 A は新規 IC 治療ターゲットとして有用であることが示唆された。またタンパク質 A に関する経路は IC 患者においても亢進しているため、この治療ターゲットはヒトへの外挿性が高いことが期待される。

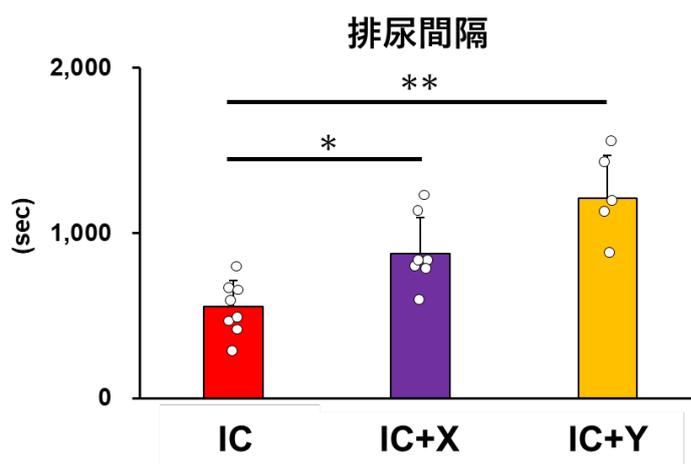
### (2-2) IC 治療薬としてのタンパク質 A 阻害剤の臨床応用を目指した化合物の探索

#### 【方法】

タンパク質 A をターゲットとした新規 IC 治療薬の臨床応用を目指して化合物の探索を行い、タンパク質 A 阻害剤である化合物 Y (特許公開前のため Y と記載) に着目した。化合物 Y は別疾患に対する治療薬として第Ⅲ相試験まで行われた化合物であり、ヒトにおける薬物動態および安全性が確認されている。このことから、化合物 Y の IC 治療薬としてのドラッグリポジショニングが期待できる。これまでと同様に作製した IC モデルラットに対して、塩酸の膀胱内投与の直後に化合物 Y を腹腔内投与し、コントロールには等量の生理食塩水を腹腔内投与した。1 週間後に膀胱内圧測定による膀胱機能評価を行った。

#### 【結果】

化合物 Y を投与することにより、IC モデルラットの排尿間隔の短縮が改善された。また化合物 Y の排尿間隔の改善効果は、化合物 X と同程度であった。



## Fig.2 排尿間隔

Mean±S.D. n=5-8. Dunnett's multiple comparisons test. \*P<0.05, \*\*P<0.01.

### 【考察】

実験 (2-1) にて、新規 IC 治療ターゲットとして有用であることを見出したタンパク質 A の臨床応用絵を目指して、タンパク質 A 阻害剤である化合物 Y に着目した。IC モデルラットに化合物 Y を投与することにより、頻尿症状が改善された。化合物 Y は別疾患に対して第Ⅲ相試験まで行われているおり、IC 治療薬としてのドラッグリポジショニングが期待できる。また化合物 Y はヒトにおける安全性が確認されているため、IC 治療薬としても有効性および安全性の高い治療薬となること期待される。

### 【今後の展望】

本研究では、新規 IC 治療薬として化合物 Y のドラッグリポジショニングの可能性を見出した。現在、化合物 Y の別疾患に対する第Ⅲ相試験までの情報取得を進めており、治療薬の開発におけるいくつかのステップを省略することが可能であると考えられる。また、化合物 Y のターゲットであるタンパク質 A に関連する経路は IC 患者においても亢進していることを確認しており、ヒトにおいても有効性の高い治療薬となることが期待される。

### 【研究成果】

特許出願

特願 2021-145762

【発明の名称】 間質性膀胱炎・膀胱痛症候群の予防又は治療用医薬組成物

【発明者】 堀田祐志、木村和哲、川田龍哉、松本成史

### 【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、多大なる研究助成を賜りました一般財団法人東海産業技術振興財団並びに関係各位に深謝致します。また、共同研究者の木村和哲教授、片岡智哉講師、大学院生の川田龍哉にも感謝申し上げます。