

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13601
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2015～2016
 課題番号：15K20081
 研究課題名(和文)頻尿に対する新しいアプローチ：単純ヘルペスウイルスベクターを使用した遺伝子治療

 研究課題名(英文)New approach for lower urinary tract symptoms using gene therapy of Herpes simplex virus

 研究代表者
 横山 仁(YOKOYAMA, Hitoshi)

 信州大学・医学部附属病院・特任研究員

 研究者番号：00596372
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：冷えストレス頻尿モデルにおける求心路(L6 dorsal root)におけるc-fosの発現を調査し、その役割と治療ターゲットにした場合の意義を検討する。冷えストレス頻尿のモデルとして、SD雌ラットを冷蔵庫(6℃)に移動させ、冷えストレスをかける。膀胱内圧測定を行って、頻尿になっていることを確認する。誘発された頻尿において、脊髄L6 dorsal rootにおけるc-fosの発現を、RT-PCRと免疫染色を用いて評価を行う。結果として、冷えにより誘発された頻尿により、c-fosの発現は強まっていた。C-fosをターゲットとした頻尿治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the role of C-fos expression in dorsal L6 roots associating with cold-stress-induced urinary frequency in rats. Cold stress was done using freezer (6℃) for each rat. First, we evaluated the functional study of cold-stress-induced urinary frequency in rat using cystometrogram (CMG). Later, we compared the L6 dorsal root comparing control using RT-PCR and immunohistopathological evaluation. Moreover, we used TRP channel agonist and antagonist, such as TRPM8 and TRPV1. The mechanism of cold-stress-induced urinary frequency was assessed. In our results, c-fos was more expressed in dorsal L6 root after cold stress than control. And, TRPM8 and TRPV1 may induce similar pathological stimulation for rat urinary function via skin to dorsal L6 root. Therefore, c-fos may influence on urinary function not only cold stress situation but also pathological condition. C-fos may be a therapeutic target for urinary frequency, even in human.

研究分野：泌尿器科

キーワード：下部尿路症状 遺伝子治療 寒冷刺激 c-fos TRPチャンネル

1. 研究開始当初の背景

冷えと頻尿の関連は強く実感される現象だが、科学的な根拠がある現象ではない。しかし、冬季に症状が増悪する過活動膀胱患者に対する具体的な治療戦略がないことは、多くの患者の QOL に影響を及ぼす状況である。

当科では、冷えと頻尿の動物モデル“冷えストレスモデル”の作成に成功し、多数の論文を報告している。ラットでは4度に外気温を下げると、頻尿が誘発される。高血圧ラットではその減少が顕著に観察され、人間におけるエイジングのモデルにも近いことが示されている。幾つかの治療的介入を行った研究により、正常あるいは高血圧をとまうラットにおける実験系で興味深い知見を得た。また、寒冷刺激に対する受容体である TRP チャンネルファミリーは、近年注目される下部尿路の治療ターゲットである。なかでも、TRPM8, TRPA1, TRPV1 など、寒冷知覚に関わるとされているサブタイプが尿路で発現し、尿意(求心性神経刺激)に関わるとされている。深部体温が一定であるにも関わらず、寒冷受容体が尿路に存在していることは大変興味深く、冷え・頻尿の関連を示す重要な知見と思われる。

一方、痛み、寒冷における神経的伝達系として c-fos が注目されている。C-fos の過剰な発現により、痛みが増幅されるという動物実験がある。C-fos が求心路でいかに発現しているかが、知覚のメカニズムで重要であることは示されているが、尿路・尿意での役割は不明である。今回我々は、寒冷刺激に誘発された膀胱の知覚神経伝達系における c-fos の発現を研究し、c-fos を抑制する過活動膀胱の新治療開発を行った。(→実験 1, 2)

そして、我々は予備実験として、漢方薬(大建中湯)による神経伝達路に対する役割の検討を行っている。中間結果によると、大建中湯は TRPA1, TRPM8 の発現を抑制する可能性がある。大建中湯の TRP チャンネルを介した排尿機能の役割の検討を併せて行うこととした。(→実験 3)

また、将来的に、求心路での c-fos を抑制するようなウイルスベクターを治療介入し、新たな遺伝子治療への路を開けることを展望に見据えて、研究を行っている。

2. 研究の目的

(実験 1)メンソールと c-fos

メンソールは身近にある TRPM8 の agonist である。寒冷刺激の受容体として注目される TRPM8 であるが、本研究では、メンソール塗布による TRPM8 channel を介した刺激の中樞神経系への影響を、c-fos を解析することにより検討を行った。C-fos の影響を、脊髄 L6 後角における c-Fos の mRNA 発現を調べることにより検討した。

(実験 2) 冷えストレスと c-fos

冷えは TRPM8 や TRPA1 を介して中枢に伝達される。膀胱にも TRPM8 と TRPA1 が発現してお

り、「冷え-頻尿」の関連を示唆するものである。また、冷えストレスと c-fos との関連が分かれば、(実験 1) に於いて明らかにしたメンソール (TRPM8) と c-fos との関連に検討が深まる。本研究 (実験 2) では、冷えストレスによる脊髄 L6 における c-fos の発現を検討し、冷え・c-fos・TRP チャンネルとの関連を明らかにするものである。

(実験 3) 大建中湯と TRP チャンネル

大建中湯は、冷え・便秘に効能がある漢方薬である。作用機序は臓器血流の増加にあるとされているが、不明な点が多い。一方、我々は、冷え・便秘を伴う下部尿路症状患者に対して大建中湯を処方すると、冷え・便秘の軽快だけでなく、下部尿路症状が軽快することを報告した。(Minagawa T, et al. Int J Urol 2015) おそらく、TRPA1 や TRPM8 など寒冷に関連する受容体を介して作用すると考えられる。今回我々は、冷えに誘発された頻尿の動物モデル(ラット)を用いて、大建中湯の役割を明らかにしながら、TRPA1, TRPM8 などの神経伝達経路の発現を研究し、作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

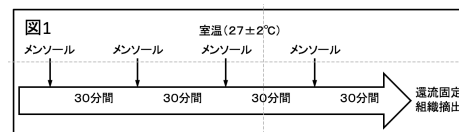
方法

(一般的な準備と方法)

SD 系雌性ラット (250-270 g) を用いた。膀胱内圧測定の準備として、測定 3 日前に膀胱頂部にカテーテルを留置した。メタボリックゲージにて膀胱内圧を測定した。組織学的検討を行う場合、膀胱内圧の測定後、膀胱組織および脊髄を摘出した。脊髄の摘出の際、還流固定した脊髄から L6 後角部を含む組織をトリミングし、パラフィン包埋をした。

(実験 1) メンソールと c-fos

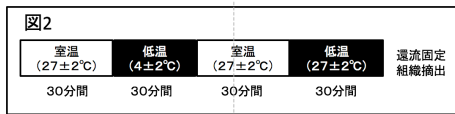
実験 3 日前に臀部の剃毛処理を行った。室温 (27 ± 2 °C) 下で、剃毛した部位に、下記のように 90%メンソール塗布した。(図 1) 対照群には生理食塩水を同様に塗布した。膀胱内圧を測定した。測定終了後に組織を摘出し、免疫組織学的に検討を行った。また、TRPM8 の antagonist である BCTC を投与し、その抑制効果を検討した。c-Fos、Substance P (SP) 抗体を用いた免疫組織染色を行い、c-Fos 陽性細胞数、および、SP の陽性面積を画像解析した。脊髄 L6 後角部を含む組織をトリミングし、c-Fos mRNA、SP mRNA の発現を解析した。



(実験 2) 冷えストレスと c-fos

実験 3 日前に臀部の剃毛処理を行った。室温 (27 ± 2 °C) から低温 (4 ± 2 °C) への移行を繰り返した (図 2) 室温に放置したラッ

トを対照群とした。膀胱内圧を測定した。測定終了後に組織を摘出し、免疫組織学的に検討を行った。



(実験3) 大建中湯と TRP チャンネル ラットを2群にわけ、それぞれ control と大建中湯投与群とした。(実験2)と同様に、冷えストレスによる膀胱機能への影響を検討し、膀胱に発現した神経伝達物質である TRPA1, TRPM8, PXP3, SBP などの発現を検討した。免疫組織学的検討と real time RT-PCR を行った。

4. 研究成果

メンソールの塗布により、ラットでの頻尿の発現はすでに報告を行っている。(Noguchi W, et al. Neurourology and Urodyn 2013)メンソールにより、膀胱の蓄尿量、排尿間隔が低下し、残尿量の増加を認めている。

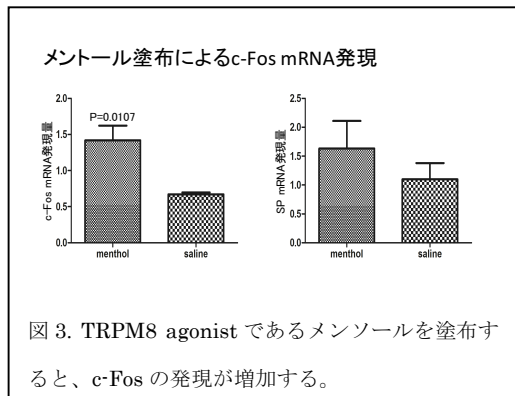


図3. TRPM8 agonist であるメンソールを塗布すると、c-Fos の発現が増加する。

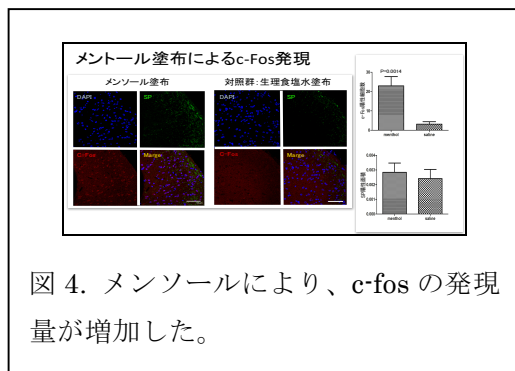


図4. メンソールにより、c-fos の発現量が増加した。

図3,4の様に、メンソールの塗布により脊髄中の c-fos 発現が増加した。TRPM8 の皮膚の刺激を介した膀胱への神経刺激が明らかになった。

また、図5のように、BCTC を投与したうえでメンソールを塗布すると、vehicle に比べてメンソールの効果が減弱されていることが示された。TRPM8 を介した頻尿のメカニズムは、脊髄における c-fos の発現が関与してい

るものと思われる。

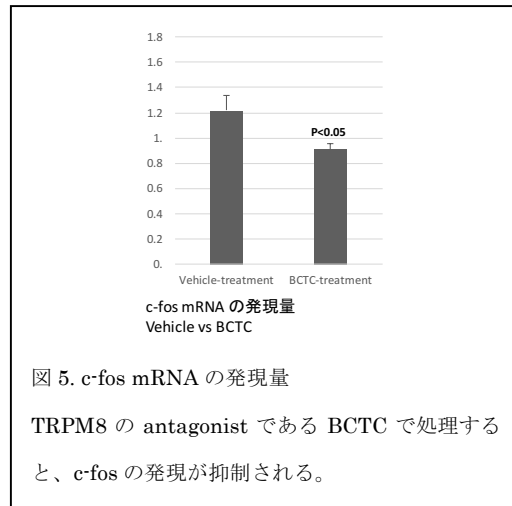


図5. c-fos mRNA の発現量

TRPM8 の antagonist である BCTC で処理すると、c-fos の発現が抑制される。

(実験2) 冷えストレスと c-fos

冷えストレスによる頻尿は、当科ではすでに完成された実験系で、多くの報告を行っている。(Imamura T, et al, 2013. Yamagishi T, et al, 2015, など)そして、ラットに冷えストレスを与えると、図6,7の如く脊髄中の c-fos が増加する。冷えストレスには、冷えの受容体である TRPM8 が関連していることが示唆されているが、本研究により、TRPM8 から脊髄中の c-fos を経由して中枢神経に影響を及ぼすことが示唆された。

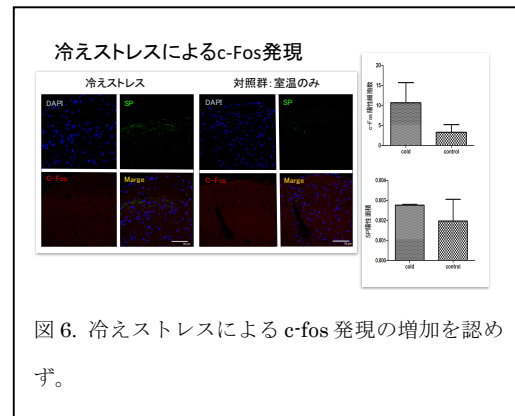


図6. 冷えストレスによる c-fos 発現の増加を認めず。

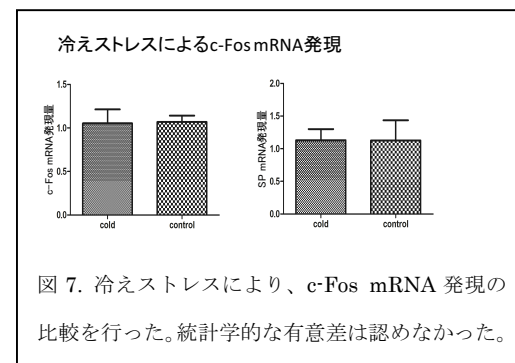
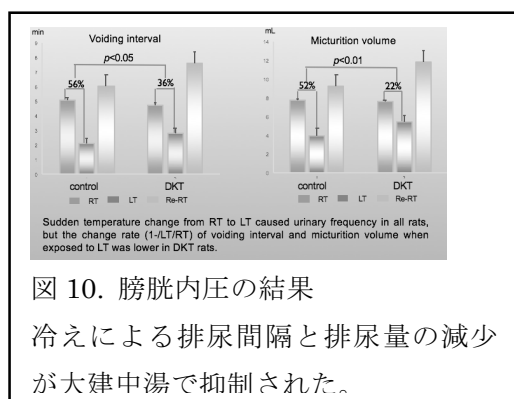
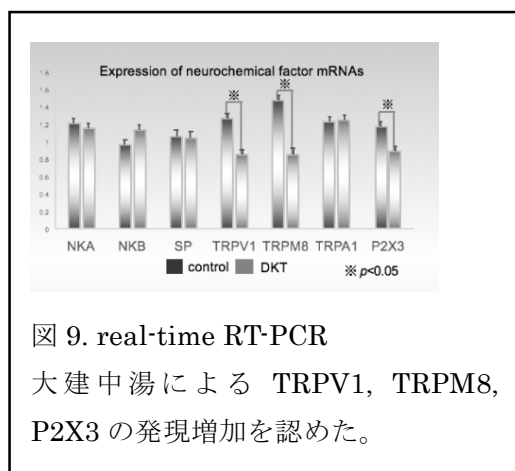
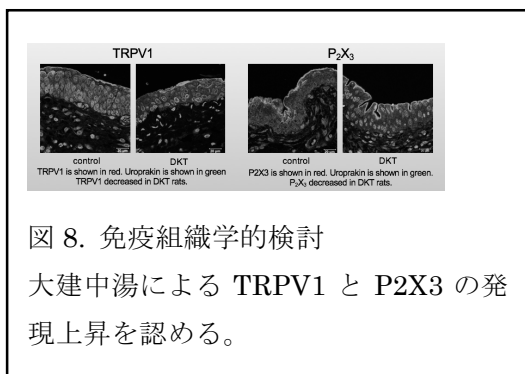


図7. 冷えストレスにより、c-Fos mRNA 発現の比較を行った。統計学的な有意差は認めなかった。

(実験3) 大建中湯と TRP チャンネル 図8,9,10のごとく、大建中湯の投与により、TRPV1, P2X3, TRPM8 の発現増加と、冷えストレスに対する排尿障害の程度が減弱して

様子を認めた。



大建中湯による、冷えストレスに対する治療効果は、TRPV1, TRPM8, P2X3 などの神経路を介して、発現すると考えられる。従って、大建中湯の作用機序は、脊髄のレベルでは c-fos が関与している可能性があるため、更なる検討が必要である。

考察

脊髄 c-Fos は求心性神経の刺激を受け脊髄ニューロンが活性化されることで発現する。メンソール塗布による c-Fos の発現増加は、皮膚に発現する TRPM8channel を介した中枢神経系の関与が示唆された。したがって、メンソール誘発排尿筋過活動は、TRPM8channel を介した中枢神経系によって

制御されていることが示唆された。われわれは、冷えストレス誘発は尿筋過活動の機序として、C線維の関与を報告した。しかし、本研究では、冷えストレスによって、c-Fos 発現量の増大傾向を認めたが、対照群と比較すると、有意な差がなかった。したがって、冷えストレス誘発排尿筋過活動は、TRPM8channel を介する中枢神経系以外の経路によっても制御されていることが示唆された。

結論

メンソールを皮膚に塗布すると TRPM8channel を介した神経回路によって、脊髄 L6 後角部での c-Fos のタンパクレベル、および、mRNA レベルでの発現が有意に増加した。

冷えストレスによる脊髄 L6 後角部での c-Fos の発現量は増大する傾向が認められた。

大建中湯による、冷えストレスに対する治療効果は、TRPV1, TRPM8, P2X3 などの神経路を介して、発現すると考えられる。脊髄のレベルでは c-fos の関与が示唆される。

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 7 件)

- 1) Imamura T, Ogawa T, Minagawa T, Nagai T, Suzuki T, Saito T, Yokoyama H, Nakazawa M, Ishizuka O. Combined treatment with a $\beta 3$ -adrenergic receptor agonist and a muscarinic receptor antagonist inhibits detrusor overactivity induced by cold stress in spontaneously hypertensive rats. *Neurourol Urodyn.* **2017** Apr;36(4):1026-1033. DOI: 10.1002/nau.23061. (査読あり)
- 2) Minagawa T, Saitou T, Suzuki T, Domen T, Yokoyama H, Ishikawa M, Hirakata S, Nagai T, Nakazawa M, Ogawa T, Ishizuka O. Impact of ao-dake-humi, Japanese traditional bamboo foot stimulator, on lower urinary tract symptoms, constipation and hypersensitivity to cold: a single-arm prospective pilot study. *BMC Complement Altern Med.* **2016** Dec9;16(1):513. DOI:10.1186/s12906-016-1494-1 (査読あり)
- 3) Minagawa T, Suzuki T, Domen T, Yokoyama H, Ishikawa M, Hirakata S, Nagai T, Nakazawa M, Ogawa T, Ishizuka O. Modified sonourethrography assists urethral catheterization. *J Med Ultrason* (2001). **2016** Jul;43(3):443-8. doi:10.1007/s10396-

- 016-0699-8. Epub 2016 Feb 5. (査読あり)
- 4) Imamura T, Ishizuka O, Ogawa T, Yamagishi T, Yokoyama H, Minagawa T, Nakazawa M, Nishizawa O. Pathway Involving Beta-3 Adrenargic Receptors Modulate Cold Stress-Induced Detrusor Overactivity in Conscious Rats. Low Urin Tract Symptoms 7, 50-55, 2015. DOI: 10.1111/luts.12050 (査読あり)
 - 5) Imamura T, Ishizuka O, Ogawa T, Minagawa T, Ishizuka M, Hiragata S, Yokoyama H, Nakazawa M, Kurizaki Y, Nishizawa O. Expression of 5-Hydroxytryptamine Receptors in Human Urinary Bladders with Benign Prostatic Hyperplasia. Adv Ther 32, 29-37, 2015. DOI:10.1007/s12325-015-0242-0 (査読あり)
 - 6) Ogawa T, Imamura T, Nakazawa M, Hiragata S, Nagai T, Minagawa T, Yokoyama H, Ishikawa M, Domen T, Ishizuka O. Transient receptor potential channel superfamily: Role in lower urinary tract function. Int J Urol 22. 994-999, 2015. Doi 10.1111/iju.12861 (査読あり)
 - 7) Imamura T, Ogawa T, Minagawa T, Yokoyama H, Nakazawa M, Nishizawa O, Ishizuka O. Engineered bone marrow-derived cell sheets restore structure and function of radiation-injured rat urinary bladders. Tissue Eng Part A. 1600-1610, 2015. DOI10.1089/ten.TEA.2014.0592 (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

- (1) 今村哲也、永井崇、小川輝之、横山仁、斎藤徹一、鈴木都史郎、石塚修. 下部尿路閉塞ラットを用いた PDE5 阻害薬による冷ストレス排尿筋過活動の抑制効果の検討. 第 104 回日本泌尿器科学会総会. 2016 年 4 月 23 日~2016 年 4 月 25 日. 仙台国際センター (宮城県仙台市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 仁 (YOKOYAMA, Hitoshi)
信州大学・医学部附属病院・特任研究員
研究者番号 : 00596372

(2) 研究協力者

石塚 修 (ISHIZUKA, Osamu)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号 : 20184541

今村 哲也 (IMAMURA, Tetsuya)

信州大学・医学部・特任講師
研究者番号 : 00467143

皆川 倫範 (MINAGAWA, Tomonori)
信州大学・学術研究院医学系 (医学部附属病院)・講師
研究者番号 : 60638873