

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09037

研究課題名(和文) 内臓知覚過敏における肥満細胞由来メディエーターの役割

研究課題名(英文) The function of mast cell-derived mediators in visceral hypersensitivity

研究代表者

宮井 和政 (Miyai, Kazumasa)

大阪府立大学・総合リハビリテーション学研究科・教授

研究者番号：60283933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱や直腸の粘膜上皮は刺激に応じてATPを分泌し、内臓感覚を中枢に伝える。我々はヒスタミン受容体(H1-4)経路に着目し、ATP分泌に対する作用を検討した。

膀胱上皮にはH3受容体が、直腸上皮にはH1受容体が発現していた。無刺激下でのATP分泌に対しては、ヒスタミンは濃度により異なる作用を示した。一方、生理的圧刺激条件下では、直腸でのATP分泌が低濃度ヒスタミンにより促進、H1阻害薬により抑制され、膀胱でのATP分泌はヒスタミン、H3/4阻害薬により抑制された。また、ヒスタミン前処置は大腸菌由来リポ多糖刺激に応じた膀胱でのATP分泌をさらに促進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、内臓知覚過敏を伴う疾患群(過活動膀胱や過敏性腸症候群)は増加傾向にあるが、現在のところ、これらの疾患に対する薬物的な治療は内臓運動の抑制を標的にしたものばかりであり、内臓感覚そのものに着目した創薬の推進には重要な意義がある。本研究により、ヒスタミン受容体シグナル経路が膀胱や直腸の内臓感覚を調節している可能性が示唆された。外来性ヒスタミンの作用機序は複雑で更なる解析を必要とするが、膀胱・直腸ともに上皮に特異的に発現しているヒスタミン受容体の阻害薬はATP分泌を抑制する傾向が認められたことから、これら阻害薬は内臓知覚過敏に対する治療薬となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： The mucosal epithelium of urinary bladder or rectum secretes ATP in response to mechanical/chemical stimulation, and transmits the visceral sensation to the central nervous system. We focused on the histamine receptor (H1-4) signaling pathways and examined their effects on ATP release from their epithelium.

Urinary bladder epithelium (urothelium) specifically expressed H3 mRNA, whereas H1 mRNA was expressed in rectal epithelium. Histamine had different effects on ATP release under unstimulated condition depending on its concentration. On the other hand, under physiologically stimulated condition, ATP release from rectal epithelium was facilitated by low concentration of histamine and suppressed by H1 inhibitor, whereas low concentration of histamine and H3/4 antagonist inhibited urothelial ATP release. Moreover, pretreatment of histamine enhanced ATP release from urothelium in response to stimulation of Escherichia coli-derived lipopolysaccharide.

研究分野：器官生理学

キーワード：内臓感覚 膀胱 直腸 ヒスタミン受容体 アデノシン三リン酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膀胱や直腸などの管腔臓器の上皮は、伸展刺激や化学刺激に応じて ATP を分泌し、内臓感覚神経終末の P2X_{2/3} 受容体を介して内臓感覚を脊髄に伝える。管腔臓器上皮からの ATP 分泌を制御するシグナル経路を明らかにできれば、近年増加傾向にある内臓知覚過敏を伴う疾患群

(過活動膀胱や過敏性腸症候群など) に対する創薬ターゲットを同定できる。我々は、ATP 分泌を制御するシグナル経路を多数同定してきたが、その一つがセロトニン受容体シグナル経路である。膀胱上皮および直腸上皮からの ATP 分泌はともにセロトニンによって抑制されるが、膀胱上皮では 5-HT_{1D} 受容体が、直腸上皮では 5-HT₄ 受容体はその役割を担うことを明らかにしてきた¹。

膀胱および直腸における内在性セロトニンの作用は、摘出単離した器官を用いた実験でも認められることから、内在性セロトニンの由来は血小板や神経終末ではなく、臓器壁の肥満細胞だと考えられる。肥満細胞はセロトニン以外にもヒスタミンをメディエーターとして分泌している。しかしながら、管腔臓器上皮からの ATP 分泌に対するヒスタミンの作用は明らかではなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、肥満細胞由来のメディエーター群が内臓感覚伝達に果たす役割の全貌の解明を目指し、①膀胱および直腸上皮に局在しているヒスタミン受容体サブタイプを同定し、②ヒスタミンが膀胱および直腸上皮からの ATP 分泌に与える作用を検討した。生理的な ATP 分泌を引き起こす刺激としては静水圧による伸展刺激を、病的な ATP 分泌を引き起こす刺激としては、虚血による血糖不足を再現したグルコース除去刺激、および細菌感染性炎症を再現した大腸菌由来リポ多糖刺激を用いることで、無刺激下、生理的刺激下、病的刺激下の 3 条件での ATP 分泌に対するヒスタミンとその受容体の作用を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

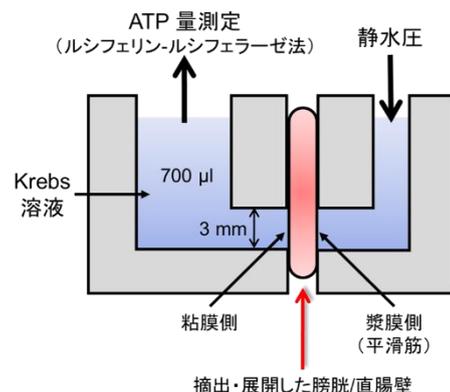
(1) 膀胱および直腸におけるヒスタミン受容体サブタイプの発現パターンの解析

膀胱および直腸におけるヒスタミン受容体サブタイプ (H1-4 受容体) mRNA の発現を、各受容体サブタイプに特異的なプライマーペアを用いた RT-PCR 法により同定した。8 週齢の C57BL/6 オスマウスの膀胱壁および直腸壁からコラゲナーゼ処理により上皮組織を剥離し、上皮組織と上皮以外の組織 (主に平滑筋組織) における発現パターンの違いを検討した。また、RT-PCR の可否を検討するため、同じプライマーペアを用いた脳組織における RT-PCR、および膀胱・直腸組織におけるハウスキーピング遺伝子である GADPH に特異的なプライマーペアを用いた RT-PCR をポジティブコントロール実験として行った。RT-PCR には Roche 社製のキットを用い、付属のプロトコールに従って実施した。

(2) 膀胱および直腸壁の粘膜上皮側からの ATP 分泌量の測定

7-10 週齢の C57BL/6 オスマウスから膀胱および直腸を摘出し、実体顕微鏡下で切開・展開したのち、マウス器官用にカスタマイズしたウッシングチャンバーに挟み、チャンパー内を 95% O₂/5% CO₂ でバブリングした

Krebs 溶液で満たした。粘膜上皮側のチャンパー内の Krebs 溶液に含まれる ATP 量をルシフェリン-ルシフェラーゼ法を用いたキット (KIKKOMAN 社製) により測定した (図 1)。生理的伸展刺激として、漿膜側から静水圧 (膀胱=5 cmH₂O: 蓄尿時の膀胱内圧; 直腸=20 mmHg; ヒトで便意を感じる直腸内圧) を加えた。また、虚血刺激として Krebs 溶液からグルコースを除去した条件を、細菌感染刺激として大腸菌由来のリポ多糖を粘膜上皮側に添加した条件を採用した。ヒスタミン、及びヒスタミン受容体阻害薬は粘膜上皮側に投与した。



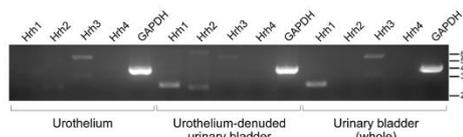
【図1. 膀胱壁/直腸壁からのATP分泌量の測定系】

4. 研究成果

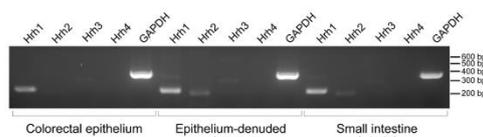
(1) 膀胱および直腸におけるヒスタミン受容体サブタイプの mRNA 発現 (図 2, 3)

膀胱上皮には H3 受容体 (Hrh3) が主に発現していたのに対し、上皮を除いた膀胱壁では H1 受容体 (Hrh1) および H2 受容体 (Hrh2) の発現が認められた (図 2)。一方、直腸上皮では H1 受容体 (Hrh1) が、上皮を除いた直腸壁では H1 受容体 (Hrh1) および H2 受容体 (Hrh2) が発現していた (図 3)。これらの結果から、膀胱上皮と直腸上皮には

ともにヒスタミン受容体が発現しており、ヒスタミンが上皮に対しても作用する可能性があること、膀胱上皮と直腸上皮では発現しているヒスタミン受容体サブタイプが異なること、逆に上皮以外の層（主に平滑筋層）では共通して H1、H2 受容体の発現が認められることが明らかとなった。



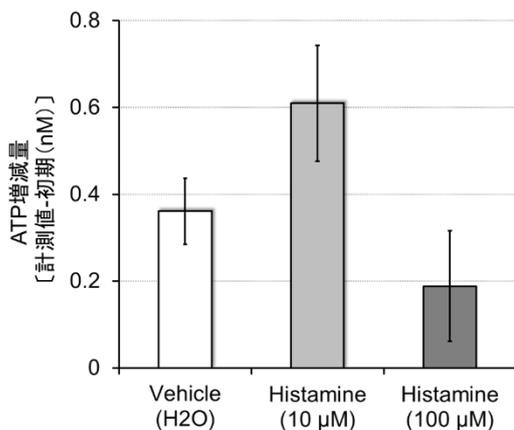
【図2. 膀胱におけるヒスタミン受容体mRNA発現】



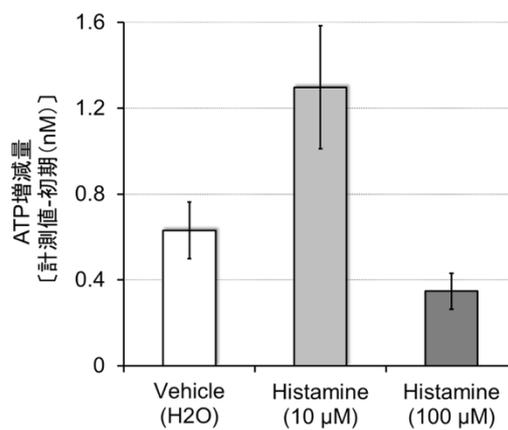
【図3. 直腸におけるヒスタミン受容体mRNA発現】

(2) 無刺激下での膀胱・直腸上皮からの ATP 分泌に対するヒスタミンの作用 (図 4, 5)

無刺激下での粘膜上皮側への ATP 分泌（構成性分泌）に対するヒスタミンの作用を検討したところ、膀胱・直腸ともに濃度によって異なる作用を呈することが示され、その傾向は特に直腸で顕著であった。直腸上皮側からの無刺激下での ATP 分泌は、低濃度（10 μM ）のヒスタミン投与により有意に促進されたが、高濃度（100 μM ）のヒスタミンは逆に抑制する傾向にあった（図 5）。膀胱においても、有意差こそ認められなかったものの、ほぼ同様の傾向を示した（図 4）。ヒスタミンには、同じ H1 受容体を介していても、低濃度では肺動脈血管を弛緩させるのに対し、高濃度では逆に収縮させるという二相性の作用があることが報告されており²、上皮からの ATP 分泌に対しても、濃度によって二相性の作用を示すという複雑性が存在する可能性が示唆された。



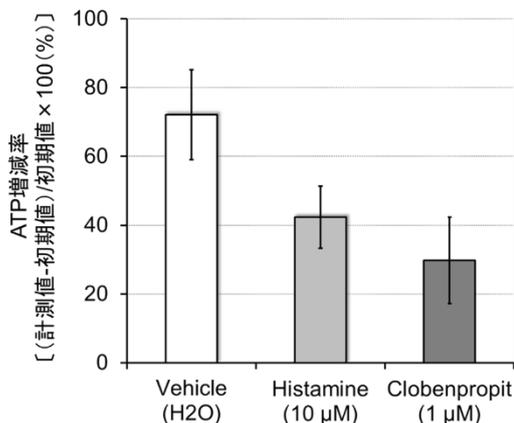
【図4. 膀胱上皮からのATP分泌に対するヒスタミンの作用（無刺激下；40分後）】



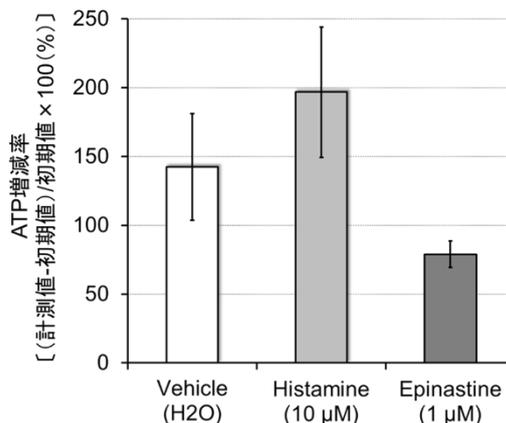
【図5. 直腸上皮からのATP分泌に対するヒスタミンの作用（無刺激下；40分後）】

(3) 生理的刺激下での膀胱・直腸上皮からの ATP 分泌に対するヒスタミンの作用 (図 6, 7)

静水圧による生理的伸展刺激に応じた粘膜上皮側からの ATP 分泌（調節性分泌）に対する低濃度ヒスタミン（10 μM ）の作用を検討したところ、特に膀胱において複雑な作用を呈することが明らかになった。膀胱においては、無刺激下での ATP 分泌では低濃度ヒスタミンは促進傾向を示したものの、伸展刺激に応じた ATP 分泌に対しては逆に抑制傾向を示した（図 6）。一方、直腸においては、無刺激下と同様に、伸展刺激に応じた ATP 分泌も促進していた（図 7）。ただし、これらのデータには依然統計学的有意差は認められておら



【図6. 膀胱上皮からのATP分泌に対するヒスタミンの作用（伸展刺激下；40分後）】



【図7. 直腸上皮からのATP分泌に対するヒスタミンの作用（伸展刺激下；40分後）】

ず、更なるデータの蓄積が必要である。

(4) 生理的伸展刺激下での膀胱・直腸上皮からの ATP 分泌に対する内在性ヒスタミンの作用 (図 6, 7)

生理的伸展刺激に応じた ATP 分泌について、ヒスタミン受容体シグナル経路が内在的に作用しているかどうかを検討した。まず、生理的伸展刺激に応じてヒスタミンが膀胱壁や直腸壁から分泌されているかどうかを、ヒスタミンデヒドロゲナーゼと発色物質テトラゾリウム塩を用いた定量法により測定したが、この定量法ではどの条件下でもヒスタミンを検出できなかった。そこで、ヒスタミン受容体阻害薬の作用を検討することで、内在性ヒスタミン受容体シグナル経路の役割を明らかにすることを試みた。膀胱での伸展刺激に応じた ATP 分泌に対して、H3/4 受容体阻害薬 clobenpropit の前処置は抑制傾向を示した

(図 6)。また、直腸では H1 受容体阻害薬である epinastine が伸展刺激に応じた ATP 分泌を抑制する傾向にあった (図 7)。内在性ヒスタミンは、膀胱・直腸ともに生理的な刺激応答性 ATP 分泌を抑制する可能性が示唆された。

(5) 病的刺激下での膀胱・直腸上皮からの ATP 分泌に対するヒスタミンの作用

虚血状態を模したグルコース欠如条件下における ATP 分泌を検討したところ、膀胱・直腸ともに無刺激下での ATP 分泌にはグルコース欠如の影響は認められなかった。また、生理的伸展刺激下での ATP 分泌に対しては、膀胱・直腸ともにグルコース欠如により ATP 分泌量が若干低下したものの、統計学的に有意な差は認められなかった。

次に、膀胱において、細菌感染を模した条件である大腸菌由来リポ多糖の作用を検討した。リポ多糖投与刺激は ATP 分泌を惹起したが、低濃度ヒスタミン (10 μ M) の前処置はリポ多糖の作用をさらに強める傾向が認められた。リポ多糖応答性の ATP 分泌に対する clobenpropit の作用が今後の検討課題であると考えられる。

参考文献

1. Matsumoto-Miyai K et al. Serotonergic regulation of distention-induced ATP release from the urothelium. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 310: F646-F655, 2016.
2. 中野紀和男, 高松真二. ヒスタミン再発見. *化学と生物*, 33: 359-367, 1995.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 松本 宮井和政、河谷正仁	4. 巻 6
2. 論文標題 セロトニン受容体による排尿機能制御	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 腎臓内科・泌尿器科	6. 最初と最後の頁 159-164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazumasa Matsumoto-Miyai, Junichi Hashimoto, Eriko Okuyama-Shinzawa, Masahito Kawatani
2. 発表標題 The peripheral regulation of rectal visceral sensation by 5-HT4-cAMP and NO-cGMP pathways.
3. 学会等名 9th Federation of the Asia and Oceanian Physiological Societies Congress (9th FAOPS) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----