

平成 22 年 4 月 22 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890262
 研究課題名（和文） ガスメッセンジャー硫化水素のシクロホスファミド誘起膀胱炎および膀胱痛への関与
 研究課題名（英文） Involvement of a gaseous messenger H₂S in cyclophosphamide-induced cystitis and bladder pain
 研究代表者
 松波 真帆（MATSUNAMI MAHO）
 近畿大学・薬学部・助手
 研究者番号：90510123

研究成果の概要（和文）：本研究により、シクロホスファミド誘起膀胱炎モデルでは、TRP チャネルを介した初期の炎症が引き金となり、硫化水素合成酵素が発現誘導されることで膀胱内で硫化水素の産生が増大し、これが T 型 Ca²⁺チャネルを介して膀胱痛を誘起する一方、炎症症状を悪化させている可能性が示唆された。本知見は、膀胱炎や膀胱痛の治療薬開発において硫化水素合成酵素や T 型 Ca²⁺チャネルが新たな標的分子となりうることを強く示唆する。

研究成果の概要（英文）：This study suggests that, in the cyclophosphamide-induced cystitis model, TRP channel-mediated early inflammatory response triggers induction of expression of the hydrogen sulfide synthetic enzyme, leading to increase in the generation of hydrogen sulfide in bladder tissue. The generated hydrogen sulfide induces bladder pain through the T-type Ca²⁺ channels and aggravates the inflammatory symptom. These findings raise the possibility that hydrogen sulfide synthetic enzyme and/or T-type Ca²⁺ channels can be new target molecules for the development of therapeutic agents against cystitis and bladder pain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	720,000	216,000	936,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,320,000	396,000	1,716,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：医歯薬学・応用薬理学

キーワード：ガスメッセンジャー、硫化水素、膀胱炎、膀胱痛、一次知覚神経、神経因性炎症、硫化水素合成酵素、T 型 Ca²⁺チャネル

1. 研究開始当初の背景

NO、CO に次ぐ第 3 のガス状情報伝達物質と

して硫化水素 (H_2S) が注目されている。知覚神経系における H_2S の役割として、気道および膀胱組織では capsaicin 感受性一次知覚神経を介して神経因性炎症を誘起することが報告されている。所属研究室では、 H_2S が一次知覚神経上に発現する T 型 Ca^{2+} チャンネルを介して体性痛の情報伝達物質として機能することを報告している。さらに、結腸痛や膵臓痛を含む内臓痛の情報伝達にも上述のメカニズムが関与することを明らかにしている。結腸や膵臓以外の内臓痛を引き起こすことが知られている臓器として膀胱組織が挙げられる。膀胱痛は、膀胱炎発症時に認められるがそのメカニズムは未解明な部分が多い。そこで、今回、シクロホスファミド誘起膀胱炎モデルを用いて膀胱痛の情報伝達における H_2S の役割を解明し、さらには炎症発現にも関与するかについて明らかにすることを目的として本研究を企画した。本研究の実施により、膀胱痛および膀胱炎の発現メカニズムを解明し、新たな治療薬開発のための手掛かりを得たいと考えている。

2. 研究の目的

有毒ガスの 1 つとして知られる硫化水素 (H_2S) は生体内において L-システインからシスタチオン- γ -リアーゼ (CSE) およびシスタチオン- β -シターゼ (CBS) により酵素的に産生され多様な生理機能を示すことが明らかとなっている。所属研究室では、末梢組織において H_2S が一次知覚神経上に発現する T 型 Ca^{2+} チャンネルの活性化を介して体性痛を誘起することを報告している。また、 H_2S が一次知覚神経に作用し神経ペプチド遊離を介した神経因性炎症を誘起することが他のグループから報告されており、 H_2S が痛みおよび炎症発現に関与する新たな分子として注目されている。そこで、今回は H_2S が膀胱炎およびそれに伴う膀胱痛に関与するか否かを明らかにすることを主目的として本研究を企画した。臨床においては、膀胱炎に伴う痛みに対する十分な治療法が確立しているとはいえないため本研究により H_2S あるいは H_2S により活性化される T 型 Ca^{2+} チャンネルを標的とした新たな治療薬開発を目指して研究を進めていきたい。

3. 研究の方法

(1) シクロホスファミド誘起膀胱炎モデルの作製: Olivar と Laird の方法に基づき、マウスに抗悪性腫瘍薬であるシクロホスファミド 300 mg/kg を腹腔内投与することにより膀胱炎を誘起した。

(2) シクロホスファミド誘起膀胱炎モデルにおける痛みの評価: シクロホスファミド投与 3 時間半から 4 時間後の 30 分間に認めら

れる尿道口周囲皮膚表面に対する舐め行動を指標として計測し膀胱痛様行動を評価した。さらに von Frey filament を用いて尿道口から肛門間付近を刺激し関連痛覚過敏を測定した。

(3) シクロホスファミド誘起膀胱炎モデルにおける炎症症状の評価: 膀胱相対湿重量および膀胱における血管透過性を測定することにより評価した。シクロホスファミド投与 4 時間後、安楽死させたマウスから膀胱を摘出し膀胱相対湿重量を測定した。膀胱血管透過性は、シクロホスファミド投与直前に Evan's blue 50 mg/kg を静脈内投与し、その 4 時間後にマウスを安楽死させて膀胱を摘出し、膀胱組織中の Evan's blue 透過量を測定することにより評価した。さらに、ヘマトキシリン・エオジン染色により膀胱の組織像観察を行った。

(4) シクロホスファミド誘起膀胱炎モデルにおける膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および炎症症状に対する薬物効果の検討: 第 1 章で用いた阻害薬の投与量および投与スケジュールは、以下に示すように行われた。非選択的 TRP チャンネル阻害薬である ruthenium red は、3 mg/kg の用量でシクロホスファミド投与 30 分前に皮下投与した。 H_2S 合成酵素 CSE の阻害薬である DL-propargylglycine は、100 mg/kg の用量でシクロホスファミド投与 1 時間前に腹腔内投与した。T 型 Ca^{2+} チャンネル阻害薬 mibefradil および L 型 Ca^{2+} チャンネル阻害薬 verapamil は、それぞれ 10 mg/kg および 5 mg/kg の用量でシクロホスファミド投与 3 時間後に腹腔内投与した。第 2 章で用いた阻害薬の投与量および投与スケジュールは、以下に示すように行われた。一次知覚神経の除神経はペントバルビタール麻酔下 capsaicin 25 mg/kg を皮下投与した後、その 6 時間および 32 時間後に 50 mg/kg をそれぞれ皮下投与し、最終投与 10 日後に実験に用いた。mibefradil は、10 mg/kg の用量でシクロホスファミド投与 30 分前に 1 回腹腔内投与、または同用量の mibefradil をシクロホスファミド投与 30 分前および 3 時間後の 2 回腹腔内投与前投与した。TRPV1 チャンネル阻害薬である capsazepine は、15 mg/kg の用量でシクロホスファミド投与 30 分前および 3 時間後に皮下投与した。

(5) シクロホスファミド誘起膀胱炎モデルにおける膀胱組織中の CSE タンパク発現量の測定: シクロホスファミド投与四時間後、膀胱炎を発症したマウスの膀胱を摘出し、膀胱組織中の CSE タンパク発現量を Western blot 法を用いて測定した。

4. 研究成果

内因性ガスメッセンジャーである硫化水素の膀胱炎および膀胱痛への関与を明らかにするため、(1)では、シクロホスファミド誘起膀胱炎モデルの作製と炎症・痛みの評価系の確立および本モデル用いて硫化水素の特に膀胱痛への関与について解析を行った。続いて(2)では、本モデルで認められる膀胱痛とさらに炎症症状発現における硫化水素標的分子であるT型Ca²⁺チャンネルとの関わりについて解析を行った。

(1)

① シクロホスファミド誘起膀胱炎モデルの作製と炎症・痛みの評価系の確立：マウスにシクロホスファミド300 mg/kgを腹腔内投与することより投与3時間半から4時間後に膀胱痛様行動が発現し、尿道口から肛門付近の皮膚表面における関連痛覚過敏が認められた。さらに、シクロホスファミド投与4時間後、摘出した膀胱組織の病理切片より被蓋細胞の部分的破綻を伴う明らかな粘膜浮腫が認められ、膀胱相対湿重量は増加していた。これらのことから、本膀胱炎モデルマウスにおいて疼痛関連行動および関連痛覚過敏の評価系を確立し、炎症関連症状として、浮腫、血管透過性亢進、病理切片上の形態学的変化をとらえることに成功した(図1)。

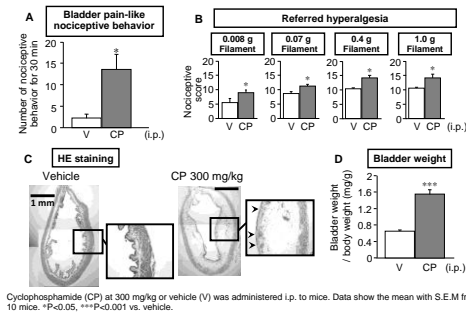


図1 シクロホスファミド (CP) 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および炎症症状

② シクロホスファミド誘起膀胱炎モデルにおける疼痛関連行動、機械的関連痛覚過敏ならびに炎症症状に及ぼす非選択的TRP阻害薬の効果の検討：シクロホスファミド誘起膀胱炎は、シクロホスファミドの肝代謝物acroleinの毒性に起因するとされている。一方、acroleinはTRPA1のアゴニストとしても作用する。このことから、シクロホスファミドによる膀胱炎発症におけるTRPA1の関与を、非選択的TRP阻害薬ruthenium redを用いて調べた。シクロホスファミド投与30分前にruthenium red 3 mg/kgを皮下投与したところ、シクロホスファミド誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱相対湿重量増加は

すべて消失した。このことから、シクロホスファミド誘起膀胱炎の発症にTRPチャンネルが関与することが示唆された(図2、3)。

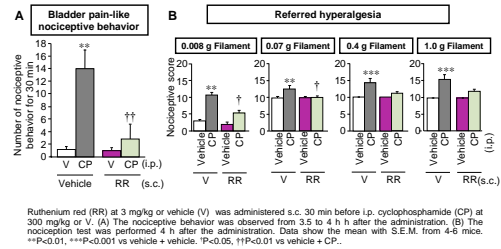


図2 シクロホスファミド (CP) 誘起膀胱炎モデルにおける疼痛関連行動、機械的関連痛覚過敏に及ぼす非選択的TRP阻害薬ruthenium red (RR) の効果

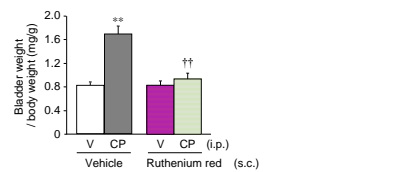


Figure 3: Bladder weight/body weight (mg/g) in a cyclophosphamide (CP) induced bladder inflammation model, showing the effect of ruthenium red (RR). Ruthenium red at 3 mg/kg or vehicle (saline) was administered s.c. to mice 3 h after and i.p. administration of cyclophosphamide (CP) at 300 mg/kg. The mice were killed 4 h after the administration. Data show the mean with S.E.M. from 5-8 mice. **P<0.01 vs vehicle + vehicle. †P<0.05 vs vehicle + CP.

図3 シクロホスファミド (CP) 誘起膀胱炎モデルにおける膀胱相対湿重量増加に及ぼす非選択的TRP阻害薬ruthenium red の効果

③ シクロホスファミド誘起膀胱炎モデルにおける疼痛関連行動、機械的関連痛覚過敏ならびに炎症症状に及ぼす内因性H₂S合成酵素阻害薬の効果の検討：末梢組織において、H₂Sは主にCSEによって酵素的に生成されることが知られていることより、内因性H₂Sの膀胱痛および膀胱炎症状を検討する目的でCSE阻害薬DL-propargylglycine (PPG)の効果の検討を行った。PPG 100 mg/kgをシクロホスファミド投与1時間前に腹腔内投与したところ、シクロホスファミド誘起膀胱痛様行動および関連痛覚過敏を強力に抑制し、膀胱相対湿重量増加は部分的に抑制された。このことからCSE由来の内因性H₂Sは、シクロホスファミド誘起膀胱痛の発現に関与すること、さらに膀胱の炎症症状の発現にも部分的に関与している可能性が示唆された(図4、5)。

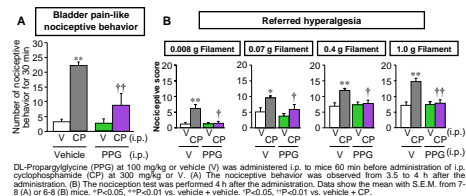
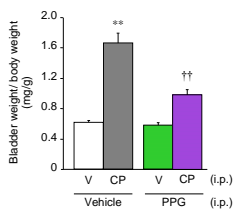


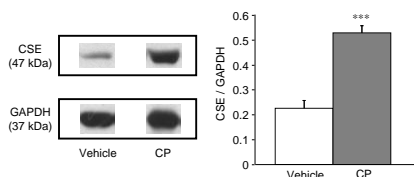
図4 シクロホスファミド (CP) 誘起膀胱炎モデルにおける疼痛関連行動、機械的関連痛覚過敏に及ぼすCSE阻害薬DL-propargylglycine (PPG) の効果



DL-Propargylglycine (PPG) at 100 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 60 min before administration of i.p. cyclophosphamide (CP) at 300 mg/kg or V. The mice were killed 4 h after i.p. administration and bladder weight was measured. Data show the mean with S.E.M from 8 mice. **P<0.01 vs. vehicle. ††P<0.01 vs. vehicle + CP.

図5 シクロホスファミド(CP)誘起膀胱炎モデルにおける膀胱相対湿重量増加に及ぼすCSE阻害薬DL-propargylglycine (PPG)の効果

④ シクロホスファミド誘起膀胱炎モデルにおける膀胱組織中のCSEタンパク発現量の増加：シクロホスファミド投与4時間後、膀胱炎を発症したマウスの膀胱組織中におけるCSEタンパク発現量をWestern blot法を用いて測定したところ、図6左に示すように、膀胱炎を発症していないマウスに比べシクロホスファミド投与マウスではCSEのバンドが明らかに濃くなった。また、これらのバンドを数値化し多数例についてまとめたところCSEタンパク発現量の有意な増加が認められた(図6)。

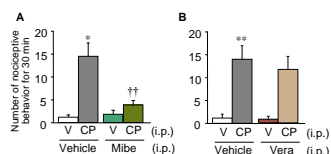


Typical photographs of Western blotting and quantified data by densitometry are shown. Cyclophosphamide (CP) at 300 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice. Data show the mean with S.E.M. from 4-6 experiments. ***P<0.001 vs. vehicle.

図6 シクロホスファミド(CP)誘起膀胱炎モデルにおける膀胱組織中のCSEタンパク発現量の増加

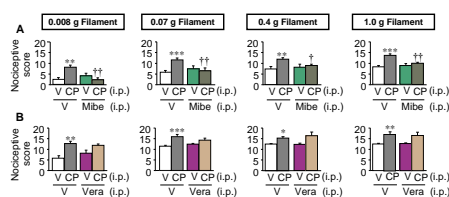
⑤ シクロホスファミド誘起膀胱炎モデルにおける疼痛関連行動、機械的関連痛覚過敏ならびに炎症症状に及ぼすT型Ca²⁺チャンネル阻害薬およびL型Ca²⁺チャンネル阻害薬の効果の検討：シクロホスファミド誘起膀胱炎成立時にCSEタンパク発現量の増加が認められたことより、H₂Sの標的分子として知られるT型Ca²⁺チャンネルが膀胱炎症成立後の痛み発現に関与するか否かについて検討を行った。T型Ca²⁺チャンネル阻害薬であるmibefradil 10 mg/kgをシクロホスファミド投与3時間後に腹腔内投与したところ、膀胱痛様行動および関連痛覚過敏は完全に抑制された。一方、L型Ca²⁺チャンネル阻害薬であるverapamil 5 mg/kgを同様のスケジュールで腹腔内投与したところ、抑制効果をしめさなかった。また、膀胱相対湿重量増加はいずれの阻害薬においても影響されなかった。このことから、シ

クロホスファミド誘起膀胱炎の痛み発現にT型Ca²⁺チャンネルが関与することが示唆された(図7、8および9)



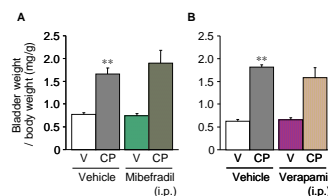
Mibefradil (Mibe) at 10 mg/kg, verapamil (Vera) at 5 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 3 h after i.p. administration of cyclophosphamide (CP) at 300 mg/kg or V. The nociceptive behavior was observed from 3.5 to 4 h after the administration. Data show the mean with S.E.M. from 7-8 (A) or 5-6 (B) mice. *P<0.05, **P<0.01 vs. V + V. ††P<0.01 vs. V + CP.

図7 シクロホスファミド(CP)誘起膀胱炎モデルにおける疼痛関連行動に及ぼすT型Ca²⁺チャンネル阻害薬mibefradil (Mibe) およびL型Ca²⁺チャンネル阻害薬verapamil (Vera)の効果



Mibefradil (Mibe) at 10 mg/kg, verapamil (Vera) at 5 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 3 h after i.p. administration of cyclophosphamide (CP) at 300 mg/kg or V. The nociception test was performed 4 h after the administration. Data show the mean with S.E.M. from 7-8 (A) or 5-6 (B) mice. *P<0.05, **P<0.01 vs. V + V. ††P<0.01 vs. V + CP.

図8 シクロホスファミド(CP)誘起膀胱炎モデルにおける機械的関連痛覚過敏に及ぼすT型Ca²⁺チャンネル阻害薬mibefradil (Mibe) およびL型Ca²⁺チャンネル阻害薬verapamil (Vera)の効果



Mibefradil at 10 mg/kg, verapamil at 5 mg/kg or vehicle (saline) was administered i.p. to mice 3 h after i.p. administration of cyclophosphamide (CP) at 300 mg/kg. The mice were killed 4 h after the administration and bladder weight were measured. Data show the mean with S.E.M. from 7-11 (A) or 5-6 (B) mice. **P<0.01 vs. vehicle + vehicle.

図9 シクロホスファミド(CP)誘起膀胱炎モデルにおける膀胱相対湿重量増加に及ぼすT型Ca²⁺チャンネル阻害薬mibefradil およびL型Ca²⁺チャンネル阻害薬verapamilの効果

以上の結果より、シクロホスファミドが肝で代謝されて生成されるacroleinは膀胱組織においてTRPA1を介して初期炎症を引き起こすことが考えられ、この初期炎症が引き金となり、CSEの発現誘導が起これ、H₂Sの産生が増大し、これがT型Ca²⁺チャンネルを介して膀胱痛の発現に寄与していることが示唆された。

(2)

① シクロホスファミド誘起膀胱炎モデルにおける疼痛関連行動、機械的関連痛覚過敏な

らびに炎症症状に及ぼす一次知覚神経除神経の効果の検討：(1)において、シクロホスファミド誘起膀胱炎の発症に TRPA1 の関与を示唆する知見が得られたことより、TRPA1 が豊富に発現している一次知覚神経 C 線維が本病態に関与する可能性について検討を行った。Capsaicin の大量投与により一次知覚神経を除神経したところ、コントロールマウスで認められた膀胱痛様行動および関連痛覚過敏はほぼ完全に消失した。さらに、膀胱相対湿重量の増加は部分的に抑制された。このことから、一次知覚神経 C 線維が本病態の膀胱痛発現に関与し、さらに炎症症状にも一部関与する可能性が示され、神経因性炎症への関与が示唆された (図 10 および 11)。

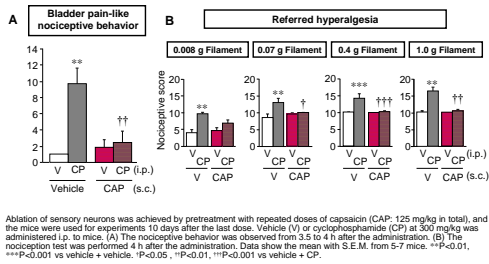


図 10 シクロホスファミド(CP)誘起膀胱炎モデルにおける疼痛関連行動、機械的関連痛覚過敏に及ぼす一次知覚神経除神経の効果

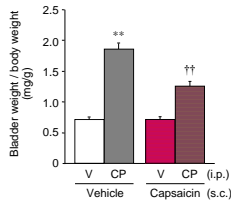


図 11 シクロホスファミド(CP)誘起膀胱炎モデルにおける膀胱相対湿重量増加に及ぼす一次知覚神経除神経の効果

② シクロホスファミド誘起膀胱炎モデルにおける疼痛関連行動、機械的関連痛覚過敏ならびに炎症症状に及ぼす T 型 Ca^{2+} チャンネル阻害薬の前処置および前後処置の効果の検討：第一章において、本膀胱炎モデルにおける膀胱炎成立後の痛みの発現に T 型 Ca^{2+} チャンネルが関与することを明らかにした。T 型 Ca^{2+} チャンネルは知覚神経上に多く発現していることから、本膀胱炎の炎症症状発現においても T 型 Ca^{2+} チャンネルが関与するかについて検討を行った。Mibefradil 10 mg/kg をシクロホスファミド投与 30 分前に 1 回腹腔内投与したところ、膀胱痛様行動および関連痛覚過敏に対して抑制効果は認められなかったが、

膀胱相対湿重量増加に対しては部分的にはあるが有意な抑制効果を示した。一方、同用量の mibefradil をシクロホスファミド投与 30 分前および 3 時間後の 2 回腹腔内投与した場合は、膀胱相対湿重量増加の抑制に加え、膀胱痛に対する強力な抑制も認められた。これらのことより、シクロホスファミド誘起膀胱炎において T 型 Ca^{2+} チャンネルは痛み発現制御に関与するだけでなく膀胱炎症発現にも一部関与する可能性が示唆された (図 12、13 および 14)。

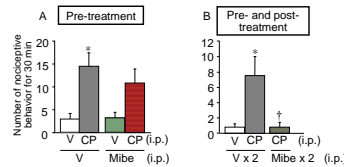


図 12 シクロホスファミド(CP)誘起膀胱炎モデルにおける疼痛関連行動に及ぼす T 型 Ca^{2+} チャンネル阻害薬 mibefradil (Mibe) の前処置および前後処置の効果

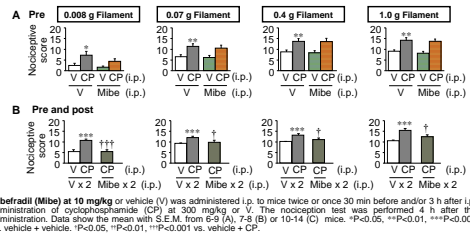


図 13 シクロホスファミド(CP)誘起膀胱炎モデルにおける機械的関連痛覚過敏に及ぼす T 型 Ca^{2+} チャンネル阻害薬 mibefradil (Mibe) の前処置および前後処置の効果

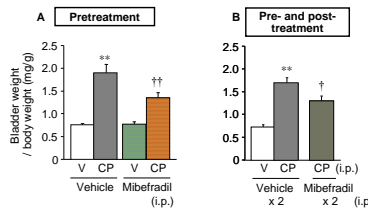


図 14 シクロホスファミド(CP)誘起膀胱炎モデルにおける膀胱相対湿重量増加に及ぼす T 型 Ca^{2+} チャンネル阻害薬 mibefradil の前処置および前後処置の効果

③ シクロホスファミド誘起膀胱炎モデルにおける疼痛関連行動、機械的関連痛覚過敏ならびに炎症症状に及ぼす TRPV1 阻害薬の効果の検討：シクロホスファミド誘起膀胱炎にお

ける膀胱痛および炎症症状発現における T 型 Ca^{2+} チャネルの役割が本チャネルに特異的な作用であるか確認するため TRPV1 阻害薬 capsazepine を用いて同様の検討を行った。Capsazepine 15 mg/kg をシクロホスファミド投与 30 分前および 3 時間後の 2 回皮下投与したところシクロホスファミド誘起膀胱痛および膀胱相対湿重量増加に有意な抑制効果を示さなかった (図 1 5 および 1 6)。

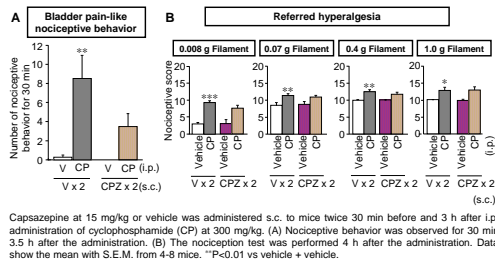


図 1 5 シクロホスファミド (CP) 誘起膀胱炎モデルにおける疼痛関連行動、機械的関連痛覚過敏に及ぼす TRPV1 阻害薬 capsazepine (CPZ) の効果

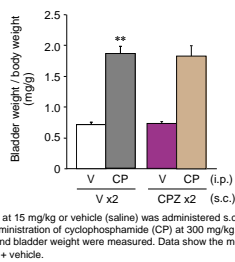


図 1 6 シクロホスファミド誘起膀胱炎モデルにおける膀胱相対湿重量増加に及ぼす TRPV1 阻害薬 capsazepine (CPZ) の効果

(1)において、本モデルマウスの膀胱組織中で CSE が発現誘導されることを確認していることから、一次知覚神経を介した初期の炎症が引き金となり、硫化水素合成酵素が発現誘導されることで膀胱組織内において硫化水素の産生が増大し、これが T 型 Ca^{2+} チャネルを介して膀胱痛を誘起する一方、炎症症状を悪化させている可能性が示唆され、本モデルの病態の発現メカニズムを解明するための重要な知見を得ることができた

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ①発表者名：西浦佳那恵、松波真帆 他 2 名
発表タイトル：Cyclophosphamide 誘起膀胱炎マ

ウスにおいて H_2S の標的分子 T 型 Ca^{2+} チャネルは神経因性炎症と膀胱痛に関与する
学会等名：第 83 回日本薬理学会年会
発表年月：2010 年 3 月 16 日
発表場所：大阪国際会議場 (大阪府)

- ②発表者名：松波真帆 他 4 名
発表タイトル：内因性ガスメッセンジャー H_2S の内臓痛情報伝達における役割：膀胱痛への関与
学会等名：第 59 回日本薬学会近畿支部大会
発表年月：2009 年 10 月 14 日
発表場所：近畿大学 (大阪府)

- ③発表者名：松波真帆 他 3 名
発表タイトル：Hydrogen sulfide is a key mediator for bladder pain during cyclophosphamide-induced cystitis in mice
学会等名：13th Congress of the European Federation of Neurological Societies (EFNS 2009)
発表年月：2009 年 9 月 13 日
発表場所：フィレンツェ (イタリア)

- ④発表者名：松波真帆 他 2 名
発表タイトル：内因性ガスメッセンジャー硫化水素のシクロホスファミド誘起膀胱炎および膀胱痛への関与
学会等名：第 82 回日本薬理学会年会
発表年月：2009 年 3 月 16 日
発表場所：横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.phar.kindai.ac.jp/byoutai/index.files/byoutai.htm>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
松波 真帆 (MATSUNAMI MAHO)
近畿大学・薬学部・助手
研究者番号：90510123

- (2) 研究分担者 ()

研究者番号：

- (3) 連携研究者 ()

研究者番号：