

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09228

研究課題名(和文) 間質性膀胱炎/膀胱痛症候群におけるTRPV4の役割解明

研究課題名(英文) Role of TRPV4 in interstitial cystitis/bladder pain syndrome

研究代表者

善積 克 (Yoshizumi, Masaru)

東北医科薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：70553379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、LPS誘発性膀胱炎モデルラットに対するTRPV4アゴニストの膀胱内投与の有用性と、その作用がLPSシグナルによるサイトカイン放出やマクロファージ表現型の変化に関与するかどうかを検討した。選択的TRPV4アゴニストをラット膀胱に同時注入することにより、LPSによる膀胱痛や排尿頻度の増加が抑制された。さらに、TRPV4の活性化により炎症性サイトカインが抑制され、M1型マクロファージからM2型マクロファージへと表現型がシフトすることが確認された。これらの結果から、膀胱におけるTRPV4の活性化はLPSによる炎症反応を制御することで、炎症由来の膀胱痛や頻尿を改善していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間質性膀胱炎・膀胱痛症候群は原因が未だ不明であり、治療には膀胱水圧拡張術や50%DMSO膀胱内注入療法があるが、治療効果は一時的でしばしば再燃するため根治治療が急務となる。本研究は、膀胱に局在するTRPV4がLPS誘発性の炎症反応に対して抗炎症へと働くことが確認できた。本研究結果により、TRPV4アゴニストが間質性膀胱炎・膀胱痛症候群に対する新規治療の候補として今後期待できる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the potential benefit of intravesical TRPV4 agonist for painful bladder hypersensitivity produced by a rat model of LPS-induced cystitis and whether its effects modulate the LPS signal for cytokine release and macrophage phenotype change. The increased bladder pain-related behaviors and voiding frequency caused by LPS were suppressed by concurrent injection into the rat bladder of a selective TRPV4 agonist, GSK1016790A. Moreover, the production and secretion of proinflammatory cytokines (e.g., CXCL1, CXCL10), are suppressed by the presence of GSK1016790A. Furthermore, TRPV4 activation switched the LPS-stimulated pro-inflammatory M1-type macrophage to the anti-inflammatory M2-type macrophage. These results suggest that that activation of TRPV4 in bladder regulates the proinflammatory response by LPS, and TRPV4 functions may be a promising future therapeutic target for refractory chronic cystitis.

研究分野：神経科学

キーワード：間質性膀胱炎 膀胱痛症候群 LPS TRPV4 炎症性サイトカイン マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

間質性膀胱炎・膀胱痛症候群は、「膀胱に関連する慢性の骨盤部の疼痛、圧迫感または不快感があり、尿意亢進や頻尿などの下部尿路症状を伴い、混同しうる疾患がない状態」の総称と定義され、一部の重症例が指定難病に認定されている。原因は未だ不明確であり、治療法としては膀胱水圧拡張術や50%DMSO膀胱注入療法のみで、これらの治療が奏効しても多くの患者で症状が再発する。現在、根治に至る治療法はなく、間質性膀胱炎・膀胱痛症候群の根治治療に向けて有効な分子標的を特定し、新規治療法を開発することが急務となる。

近年、グラム陰性菌細胞外膜の構成成分であるリポポリサッカライド(LPS)の炎症反応経路においてTRPV4を介した炎症制御機構が報告されている。TRPV4は、カルシウムイオン透過性非選択的カチオンチャネルであり、膀胱上皮の他、皮膚、肺などに強く局在している。膀胱上皮のTRPV4は、伸展刺激を感知するメカノセンサーとして働き、ATP放出による膀胱の知覚神経活動に寄与しており、その特性から炎症時にはTRPV4の活性化が知覚シグナルを亢進し、膀胱痛や頻尿の発現に関与していることが報告されてきた。しかしながら、骨髄由来または肺泡マクロファージの初代培養細胞において、LPS刺激による炎症性自然免疫応答に対し、TRPV4の活性化が炎症性サイトカインの抑制を誘導することが報告され、TRPV4-KOマウスから単離した気道及び膀胱上皮において、LPS誘導の炎症性サイトカインがむしろ増加することも示された。このように、TRPV4は環境変化に応じて炎症性と抗炎症性の両方の側面を持つ可能性があり、間質性膀胱炎・膀胱痛症候群モデル動物におけるTRPV4の役割について着手した。

2. 研究の目的

本研究は、LPS誘発性の間質性膀胱炎・膀胱痛症候群モデルラットを用いて、LPSシグナルに対するTRPV4アゴニストの抗炎症効果を検討する。また、TRPV4アゴニストの炎症制御機構に関連する炎症性サイトカイン及びマクロファージの表現型変化を確認する。

3. 研究の方法

(1)膀胱炎モデルとして、ラット膀胱内にLPSを1日おきに4回膀胱内に注入することで間質性膀胱炎・膀胱痛症候群モデルを作製した。TRPV4アゴニストGSK10167790A(GSK)は、LPSとの混合液により、同様の操作で膀胱内に注入した。Control群として溶媒の0.1%DMSOを注入した。(2)(5)(6)の実験はControl群、LPS群、LPS+GSK群及びGSK単独群の膀胱を採取して実験を行った。

(2)組織染色は、各群の膀胱を採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、凍結切片を用いてヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、トルイジンブルー染色により炎症性細胞および肥満細胞を確認した。

(3)膀胱関連痛は、von Freyフィラメント法を用いて、尿道周囲の下腹部を機械刺激し、疼痛閾値の変化を測定した。

(4)排尿機能は、膀胱内圧測定法を用いて膀胱内圧を連続的に測定した。膀胱頂部に予めカテーター(PE-50)を挿入・留置し、2.4 mL/hrの一定速度で生理食塩水を膀胱内に灌流する。動物はボールマナーケージに拘束し、覚醒下で膀胱内圧の測定を行った。

(5)サイトカインアレイは、各群の膀胱をホモジナイズして溶解し、組織懸濁液を遠心分離した。各上清中の総タンパク質量を定量し、タンパク質量を調整後、ラットサイトカインアレイキットを用いてサイトカイン測定を行った。

(6)蛍光組織染色は、各群の膀胱組織の凍結切片を用いて、マクロファージの識別を行った。マクロファージは抗F4/80抗体で識別し、M1マクロファージとM2マクロファージはそれぞれ抗iNOS抗体及び抗CD206抗体を用いて識別した。

4. 研究成果

(1) LPS 誘発性の膀胱炎症に対する TRPV4 アゴニストの効果

LPS 誘発性の間質性膀胱炎・膀胱痛症候群モデルは、炎症性細胞の浸潤や膀胱上皮の肥厚など炎症スコアが高く、肥満細胞数も有意に増加した(図1)。LPS+GSK 群では、炎症性細胞の浸潤や膀胱上皮の肥厚が軽減され、LPS 群と比較して肥満細胞数が有意に減少した(図1)。しかしながら、GSK 単独群では、炎症スコアや肥満細胞数の有意な増加がみられた(図1)。

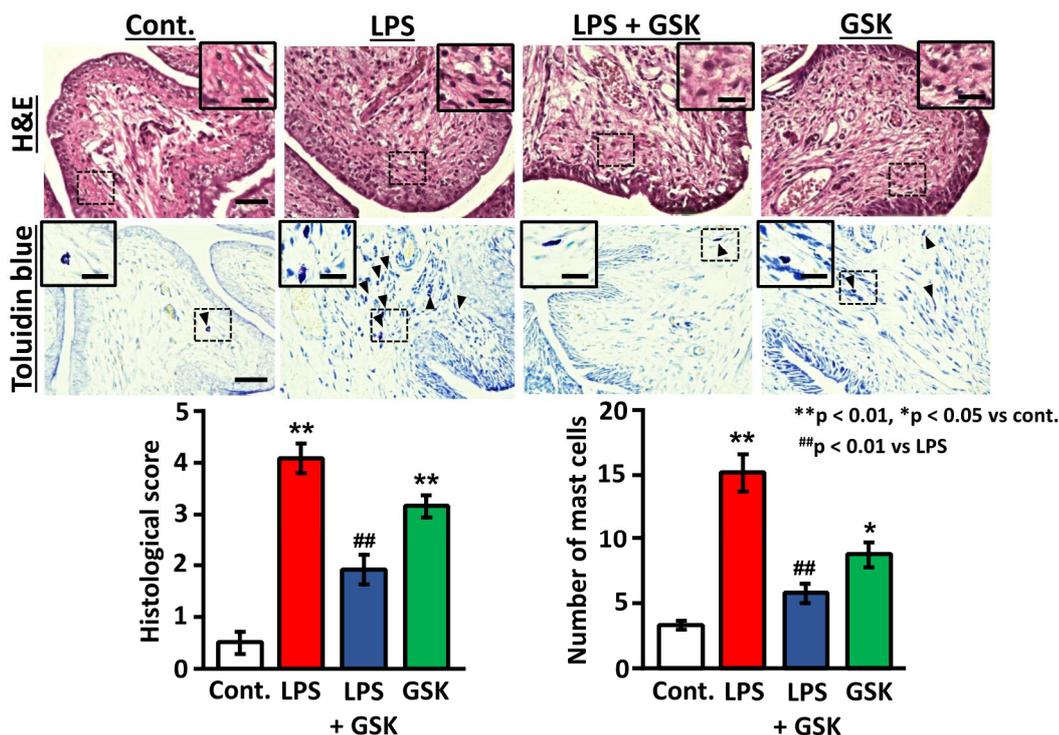


図1. LPS誘発性の膀胱炎症と肥満細胞数増加に対するTRPV4アゴニストGSK1016790A (GSK) 膀胱内注入 (i.ves.) による改善効果

炎症スコア

- 0 炎症や上皮に変化がないか、あってもごくわずかで、形態的に異常がない。
- 1 時折みられる好中球やリンパ球からなる微小な炎症性浸潤、または明確な出血、上皮の変化がないもの。
- 2 軽度の出血を伴うが、明確な上皮変化もない、好中球またはリンパ球が散在する軽度の炎症性浸潤。
- 3 軽度または軽度から中等度の炎症性浸潤が固有層にあり、炎症が固有筋層へ局所的に進展している。
- 4 中等度の炎症で、固有層と筋固有層の両方に好中球とリンパ球が散在から多発する。
- 5 前壁薄層および固有筋層に重度の炎症があり、上皮変化、出血、フィブリン沈着などの重要な所見を伴うもの。

(2) LPS 誘発性の膀胱痛と頻尿症状に対する TRPV4 アゴニストの効果

LPS 誘発性の間質性膀胱炎・膀胱痛症候群モデルは、LPS 初回投与から疼痛閾値の低下がみられ、GSK 存在下では疼痛閾値の低下が用量依存的かつ有意に改善することが明らかになった(図2)。排尿機能は、LPS 刺激により排尿間隔が有意に短縮し、頻尿を認められたが、GSK 存在下では排尿間隔が有意に延長していることが確認された(図2)。

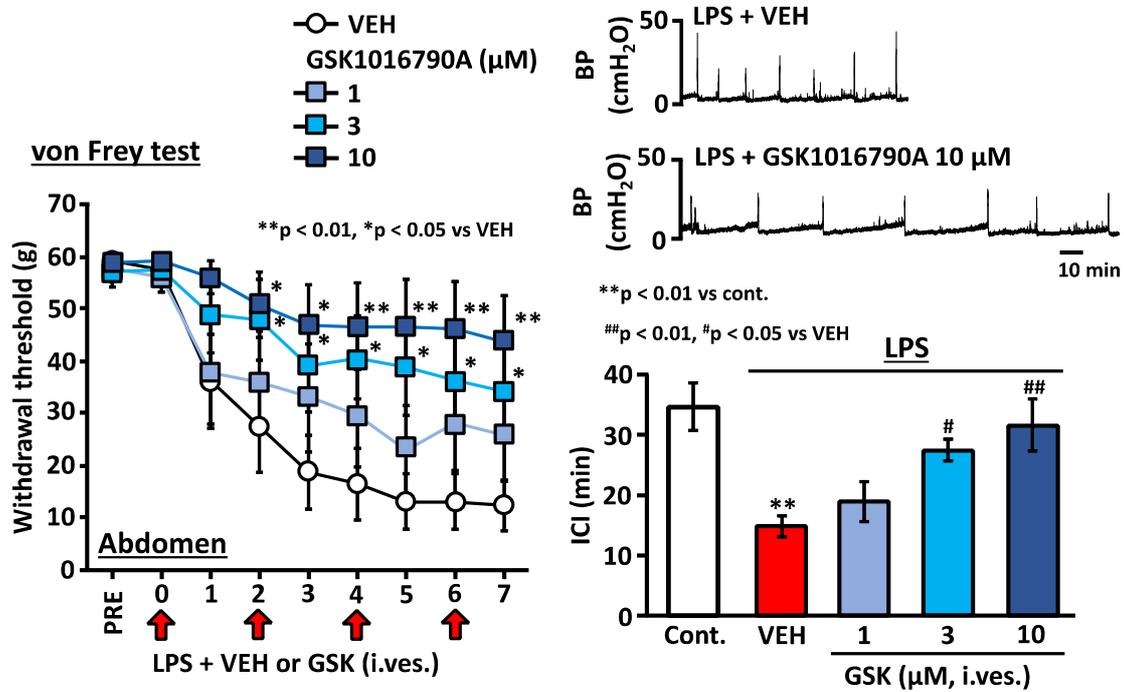


図2. LPS誘発性の膀胱痛と頻尿症状に対するTRPV4アゴニストGSK1016790A (GSK) 膀胱内注入 (i.ves.) による改善効果

BP: bladder pressure, ICI: intercontraction intervals

(3) LPS 誘発性炎症性サイトカインに対する TRPV4 アゴニストの効果

LPS 刺激群では、炎症性ケモカインである CXCL1、CXCL5、CXCL9、CXCL10、CCL3、CCL5、CCL20 及び CX3CL1 が有意に増加していることが明らかになった (図3)。GSK 存在下では、これらの炎症性ケモカインが有意に抑制されたが、IL-1 は対照的に増加していた (図3)。IL-1 の増加に関しては、創傷治癒にも役割を果たすことが示唆されている (図3)。

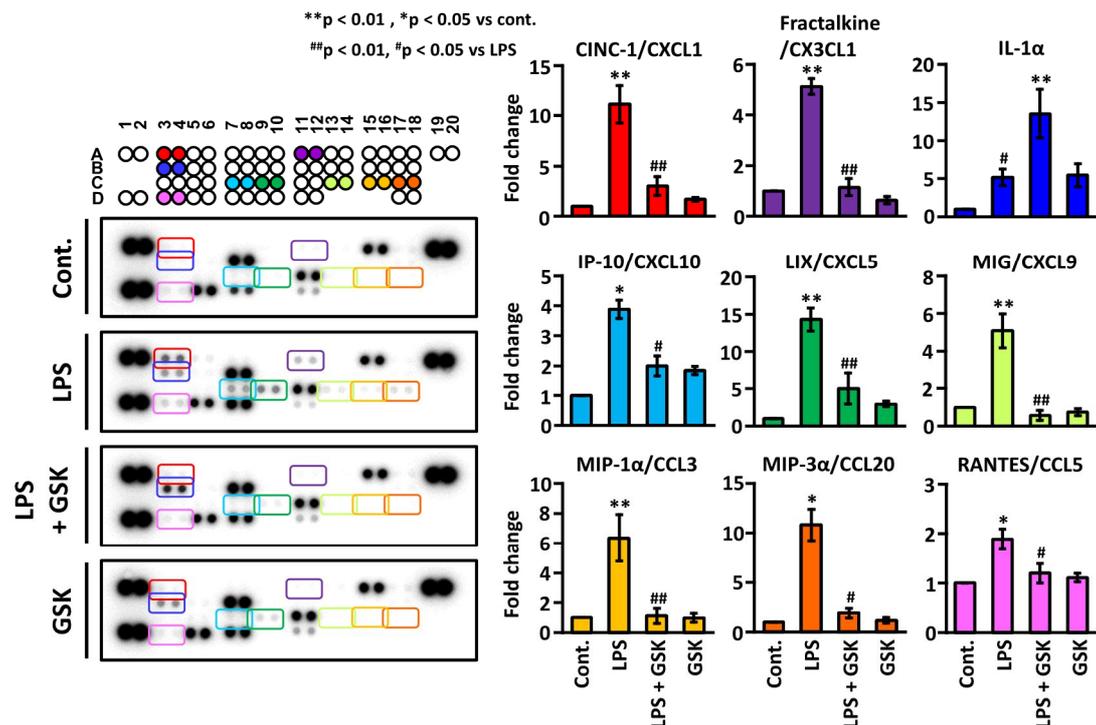


図3. LPS誘発性炎症性サイトカインに対するTRPV4アゴニストGSK1016790A (GSK) の抑制効果

(4) 膀胱組織における M1 マクロファージと M2 マクロファージの表現型変化

LPS 刺激群では、膀胱粘膜固有層において M1 マクロファージが有意に増加していたが、GSK 存在下では M1 マクロファージが減少していた (図 4)。LPS+GSK 群ではさらに M2 マクロファージの有意な増加が観察された (図 4)。

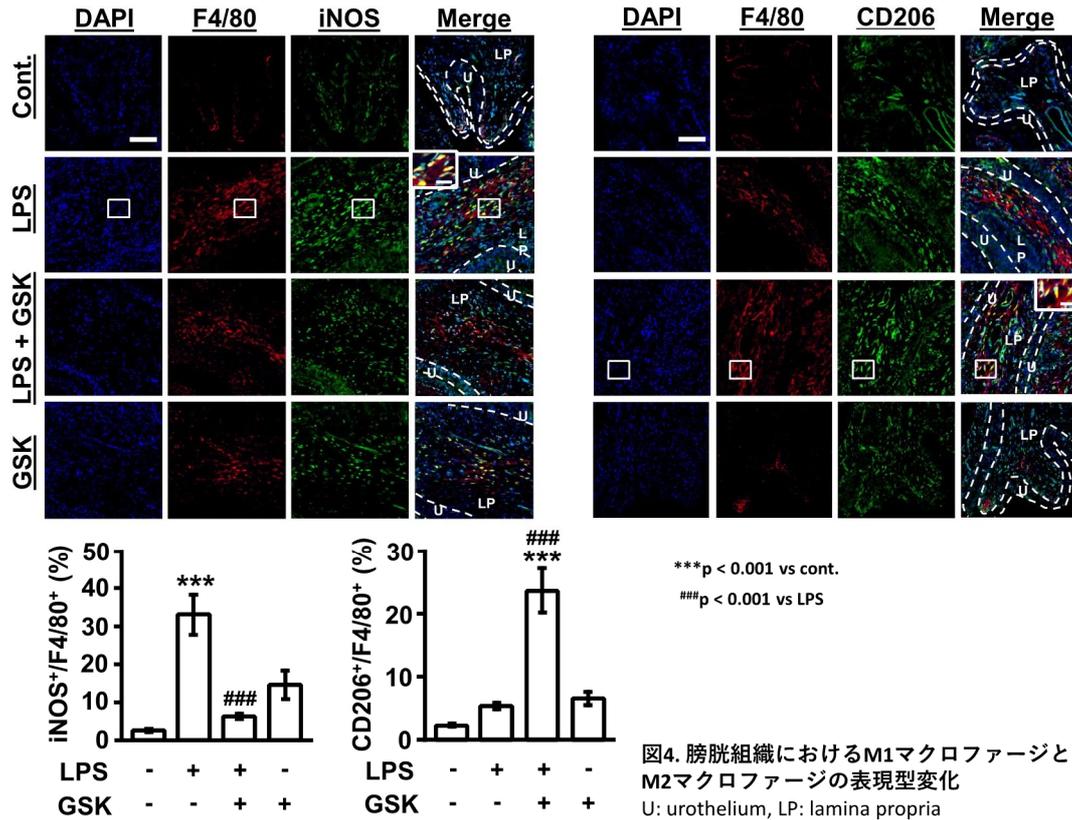


図4. 膀胱組織におけるM1マクロファージとM2マクロファージの表現型変化
U: urothelium, LP: lamina propria

以上の結果から、LPS 誘発性の間質性膀胱炎・膀胱痛症候群モデルにおいて惹起される膀胱炎症由来の膀胱痛や頻尿症状は、TRPV4 アゴニスト存在下では有意に改善されることが明らかになった。TRPV4 アゴニストによるこれらの改善効果は、TRPV4 アゴニスト単独刺激ではむしろ炎症が生じるが、共刺激においてはLPSで誘発される種々の炎症性ケモカインやM1マクロファージを制御することで抗炎症効果を発揮し、膀胱炎症を軽減することで膀胱痛や頻尿症状が改善されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshizumi Masaru, Watanabe Chizuko, Mizoguchi Hirokazu	4. 巻 9
2. 論文標題 Gabapentin reduces painful bladder hypersensitivity in rats with lipopolysaccharide induced chronic cystitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmacology Research & Perspectives	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prp2.697	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Chizuko, Komiyama Asami, Yoshizumi Masaru, Sakurada Shinobu, Mizoguchi Hirokazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Morphine Antinociception Restored by Use of Methadone in the Morphine-Resistant Inflammatory Pain State	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2020.593647	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tagami Keita, Yoshizumi Masaru, Inoue Akira, Matoba Motohiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Effectiveness of gabapentinoids for cancer-related rectal and vesical tenesmus: Report of four cases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Indian Journal of Palliative Care	6. 最初と最後の頁 381~381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/IJPC.IJPC_203_19	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Yoshizumi Masaru, Yonezawa Akihiko, Kimura Yukio, Watanabe Chizuko, Sakurada Shinobu, Mizoguchi Hirokazu	4. 巻 18
2. 論文標題 Central Mechanisms of Apomorphine and m-Chlorophenylpiperazine on Synergistic Action for Ejaculation in Rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Sexual Medicine	6. 最初と最後の頁 231~239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jsxm.2020.10.014	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Yoshizumi Masaru, Tazawa Naoya, Watanabe Chizuko, Mizoguchi Hirokazu	4. 巻 13
2. 論文標題 TRPV4 activation prevents lipopolysaccharide-induced painful bladder hypersensitivity in rats by regulating immune pathways	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.1080302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計12件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 善積 克, 渡辺千寿子, 溝口 広一
2. 発表標題 間質性膀胱炎/膀胱痛症候群におけるガバペンチノイドの治療機序
3. 学会等名 第72回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺千寿子, 善積 克, 櫻田 忍, 溝口 広一
2. 発表標題 Mirror image pain発現機構におけるアストロサイトの関与
3. 学会等名 第72回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 溝口広一, 渡辺千寿子, 込山麻美, 善積克, 櫻田忍
2. 発表標題 炎症性疼痛下において減弱したmorphine鎮痛作用は、methadoneの単回前処置により回復する
3. 学会等名 第40回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 善積 克
2. 発表標題 間質性膀胱炎/膀胱痛症候群におけるガバペンチノイドの効果
3. 学会等名 第19回生物化学若手研究者セミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 善積 克, 米澤 章彦, 木村 行雄
2. 発表標題 卒後・生涯教育プログラム：射精の生理学：基礎研究から見る射精機能の解析
3. 学会等名 日本性機能学会第31回学術総会/第30回日本性機能学会東部総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaru Yoshizumi, Akihiko Yonezawa, Yukio Kimura, Chizuko Watanabe, Masahito Kawatani, Shinobu Sakurada, Hirokazu Mizoguchi
2. 発表標題 Central mechanisms contribute to pro-ejaculatory response induced response induced by the combination of dopamine and 5-HT2 receptor agonist in rats
3. 学会等名 22nd World Meeting of the International Society for Sexual Medicine (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 善積 克, 渡辺千寿子, 溝口 広一
2. 発表標題 質性膀胱炎/膀胱痛症候群モデルラットにおけるガバペンチンの抑制効果
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺千寿子, 善積 克, 櫻田 忍, 溝口 広一
2. 発表標題 炎症性疼痛下における対側性疼痛発現機構の解明
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 善積 克, 渡辺千寿子, 溝口 広一
2. 発表標題 間質性膀胱炎/膀胱痛症候群におけるガバペンチンの薬効機序
3. 学会等名 第71回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺千寿子, 善積 克, 櫻田 忍, 溝口 広一
2. 発表標題 炎症性疼痛発現におけるタキキニンペプチドの関与
3. 学会等名 第71回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林 貴史, 渡辺千寿子, 菅野秀一, 善積 克, 我妻恭行, 原 明義, 櫻田 忍
2. 発表標題 マウス 型糖尿病誘発アロディニアにおける脊髄cholecystokinin-8とhemokinin-1の関与
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 善積 克, 渡辺千寿子, 溝口 広一
2. 発表標題 Lipopolysaccharide誘発性膀胱炎の炎症制御におけるTRPV4の役割
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------