

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09354

研究課題名(和文) 間質性膀胱炎の肥満細胞関連因子は、膀胱知覚亢進に寄与するか

研究課題名(英文) Do mast cell-related factors in interstitial cystitis contribute to bladder hypersensitivity?

研究代表者

相澤 直樹 (Aizawa, Naoki)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80595257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：間質性膀胱炎・膀胱痛症候群(IC/BPS)のヒト膀胱生検検体で、肥満細胞関連因子の各種受容体サブタイプのいくつかの遺伝子発現が、正常検体に比べ増大していることを見出した。健康ラットにおいてヒスタミンの膀胱内注入は、膀胱伸展にตอบสนองする求心性神経活動において、AとC線維の両者の活動性を濃度依存的に増大させ、H2受容体が、このヒスタミンによる求心性神経活動増大に一部寄与している事を確認した。新たに確立した膀胱標本の検討により、膀胱炎ラットの膀胱標本では、膀胱粘膜の破綻および薬物の透過の事実を確認した。これらの結果は、IC/BPSを含む膀胱炎症と肥満細胞関連因子の関連を裏付ける結果となりえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IC/BPSのうち、特にICは指定難病に分類され、その病態および治療法は確立されていない。この背景に肥満細胞関連因子の関与があるか、炎症がどれだけ膀胱知覚に影響を与えるのか、はっきりとした結論は出ていなかった。

今回、患者の膀胱サンプルを用いた肥満細胞関連の脂質メディエーターの受容体発現解析と、動物実験による機能解析の結果、肥満細胞関連脂質メディエーターおよび炎症が膀胱知覚を含むIC/BPSの病態に寄与する可能性を裏付ける結果となり、今後の病態解明および治療法確立につながる研究になり得ると考える。

研究成果の概要(英文)：We found that gene expression of several mast cell-related receptor subtypes were upregulated in human bladder biopsy specimens from patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome (IC/BPS) compared with normal specimens.

Study of single unit afferent activities of rat bladder mechanosensitive afferent nerves provides evidence that histamine and H2 receptor has a physiological role of bladder sensory function. In addition, study by using newly established bladder "inside-out" preparation revealed that the bladder detrusor smooth muscle potentially has water (urine) permeability, whereas bladder mucosa has robust barrier mechanisms for preventing absorb water (urine) in at least normal rat, and that cyclophosphamide-induced cystitis bladder disrupted the bladder mucosa and drug penetration.

研究分野：排尿薬理学

キーワード：膀胱 炎症 間質性膀胱炎 肥満細胞 知覚

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間質性膀胱炎・膀胱痛症候群 (Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome: IC/BPS) は、原因不明の炎症により、慢性の骨盤部の痛み、頻尿などを引き起こし、患者の QOL を著しく損なう疾患である。ハンナ型 IC (指定難病、膀胱粘膜の特徴的なびらんを伴う) と BPS に分類され、病態は未知であり、根治的治療は確立されていない (Homma Y et al, 2020)。IC/BPS 患者の膀胱組織において肥満細胞の増殖が認められている (Malik ST et al., 2018)。一方で、この肥満細胞増大はハンナ型 IC に特異的ではないとの報告もある (Akiyama Y et al, 2018)。しかしながら、炎症が存在すれば肥満細胞が増大する可能性は共通している。

我々は、既報論文 (Ogawa T et al., 2010) のハンナ型 IC 患者膀胱組織のマイクロアレイデータを再解析し、粘膜固有層においてヒスタミンおよびロイコトリエン B4 (LTB4) の代謝酵素発現の低下を見出した (未公表データ)。この結果から、病変部位にヒスタミンや LTB4 が蓄積していることが推測された。

また、ハンナ型 IC 患者の膀胱生検試料において Toll-like receptor 7 (TLR7) の発現増大と TLR7 作動薬の Maus 膀胱内投与により膀胱の炎症と痛みを引き起こすことを見出した (Ichihara K, Aizawa N et al, 2017)。TLR7 は肥満細胞上に発現し、肥満細胞からのサイトカイン産生に寄与することが知られている。

2. 研究の目的

IC/BPS の背景に、肥満細胞、ヒスタミン、脂質メディエーターに関連した免疫や炎症反応が存在していれば、痛みや頻尿の症状発症にも関与しうると考え下記を明らかにすることを目的とした。

- (1) IC/BPS 患者の膀胱病変粘膜における肥満細胞、脂質メディエーター受容体発現の変化
- (2) 脂質メディエーターの膀胱内投与が膀胱知覚へ与える影響
- (3) 炎症状態における膀胱粘膜の変化

これらの検討により、症状緩和を目的とした治療法の確立および創薬探索の基礎を作ることとした。

3. 研究の方法

本研究では、IC/BPS 患者の試料を用いた in vitro 実験および、ラットを用いた機能解析実験で、IC/BPS の炎症状態において、ヒスタミンなどが膀胱知覚に影響する可能性を探索するため、主に以下 3 つの検討を行った。

- (1) IC/BPS 患者の膀胱病変粘膜における肥満細胞、脂質メディエーター受容体発現の変化
IC/BPS 患者の膀胱粘膜検体および、膀胱癌患者の非癌部 (正常部位) の粘膜検体を用いて、肥満細胞、ヒスタミン受容体 (H1-H4)、LTB4 受容体 (BLT1, 2 受容体) および PGD2 受容体 (DP1, 2 受容体) ならびに、上記合成・代謝酵素の発現量を比較した。

- (2) 脂質メディエーターの膀胱内投与が膀胱知覚へ与える影響

膀胱内にヒスタミンおよび受容体拮抗薬を併用投与した時の変化を、膀胱内圧測定および、膀胱求心性神経活動測定実験を用いて調べた。加えて免疫組織学染色も行い、発現部位の確認も行った。

- (3) 膀胱炎モデルを用いた膀胱粘膜の病態変化の検討

シクロフォスファミド (CYP) 誘発出血性膀胱炎モデルを用いて、新たに確立した膀胱内腔と外腔を入替える膀胱標本において、膀胱粘膜のバリア機構の病態変化を検討した。健常ラット膀胱および CYP 投与 24 時間 (CYP 24) および 48 時間後 (CYP 48) のそれぞれの膀胱標本において、粘膜側または平滑筋側から KCl およびアセチルコリン (ACh) を投与し、排尿筋収縮が引き起こされるか否か検討した。

4. 研究成果

- (1) 間質性膀胱炎・膀胱痛症候群 (IC/BPS) のヒト膀胱生検検体で、肥満細胞関連因子 (ヒスタミン、ロイコトリエン、プロスタグランジン) の各種受容体サブタイプのいくつかの遺伝子発現が、正常に比べ IC/BPS 患者のサンプルで増大していることを見出した (未発表データのため、詳細な発表は差し控える)。

- (2) 健常ラットを用いて、膀胱内に肥満細胞関連因子を注入する手法を用いて、膀胱機能、特に膀胱知覚に及ぼす影響を検討した。膀胱伸展にตอบสนองする求心性神経活動を測定すると、ヒスタミンは、神経活動の A と C 線維の両者の活動性を濃度依存的に増大させた。また、これまで膀胱においてあまり検討されてこなかった、ヒスタミン H2 受容体のうち、拮抗薬であるシメチジンは、C 線維の活動性を増大させており、ヒスタミンによる求心性神経活動増大に一部寄与している可能性が見いだされた (図 1)。

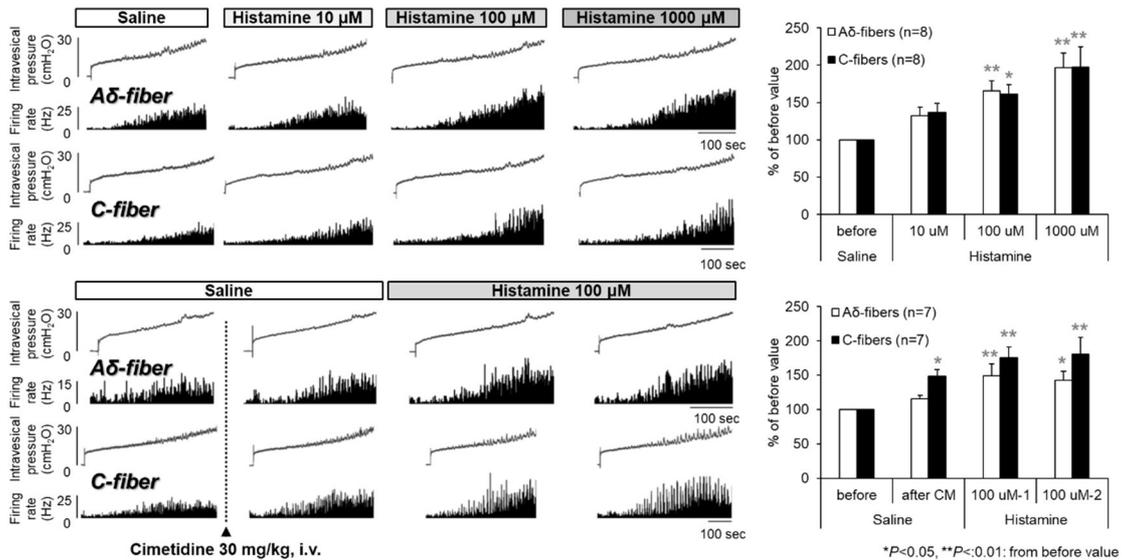


図 1: ラット膀胱伸展受容一次求心性神経活動 (A および C 線維) に及ぼす、ヒスタミン膀胱内注入とシメチジン静脈投与の影響。

他方、覚醒下とウレタン麻醉下で膀胱内圧測定を行うと、覚醒下ではヒスタミンおよびシメチジン投与は膀胱内圧パラメーターに変化をもたらさなかった一方で、ウレタン麻醉下では、排尿時の膀胱収縮がヒスタミンにより低下し、シメチジンがこの作用を消失させた。このことから、排尿時の排尿筋収縮には H2 受容体を介した収縮抑制または弛緩増強がウレタン麻醉により出現する可能性が示唆された。膀胱組織を蛍光免疫染色すると、H2 受容体の発現は、平滑筋より粘膜層に強く認められ、H2 受容体が膀胱知覚機能に寄与する可能性が示唆された (Podium short oral 発表、国際禁制学会 2023、トロント、カナダ。一般口演発表、第 30 回日本排尿機能学会、千葉)。

上述の通り、少なくともヒスタミンおよびシメチジン投与の膀胱機能が、麻醉の有無で変化があることから、膀胱機能に及ぼす麻醉薬の効果を再検討した。その結果、ウレタン麻醉に比ベイスフルラン麻醉では、排尿反射が不安定で、排尿機能が低下し、蓄尿時の膀胱伸展に伴う求心性神経活動は増大していた。背景因子として、膀胱血流の関与は否定的であり、カルシウム等の血中濃度の変化が考えられた。このようにウレタン麻醉とイソフルラン麻醉のラット膀胱機能に対する作用に違いが示され、実験条件設定のための有用な情報を提供した (Aizawa and Fujita., J Pharmacol Sci 2023 Vol. 152 Issue 2 Pages 144-150)。

- (3) 膀胱の炎症が膀胱粘膜のバリア機構に及ぼす影響を検討した。健常状態において、薬物は漿膜側から容易に平滑筋に到達し収縮を引き起こすが、膀胱粘膜側からは平滑筋に到達できないことが確認できた。これは、膀胱粘膜には尿(水)の侵入を許さない強固なバリア機構が備わっていることを示唆している。他方、CYP 投与により出血性膀胱炎が起こっている状態では、薬物は粘膜側からも平滑筋に到達し収縮が引き起こされたことから、炎症時においては、膀胱粘膜のバリア機構の破綻により膀胱内部に尿(水)が侵入する可能性が示唆された (図 2)。(一般口演発表、第 97 回日本薬理学会、神戸。一般口演発表 (優秀演題賞)、第 10 回日本平滑筋学会若手の会冬の研究発表会、鹿児島)。

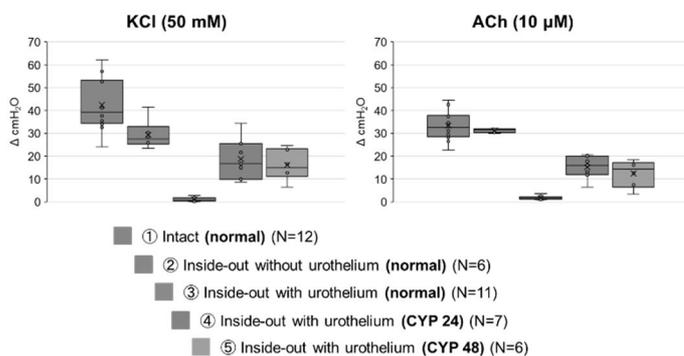


図 2: 健常ラット (normal) および CYP 誘発出血性膀胱炎モデル (CYP 24, CYP 48) における KCl および ACh をオルガンバス内に添加した際の膀胱内圧の変化

Intact: 膀胱正常標本
 Inside-out without urothelium: 膀胱内腔と外腔を入替えて、尿路上皮をはく離れた標本
 Inside-out with urothelium: 膀胱内腔と外腔を入替えた標本

本研究では、IC/BPS の背景に、肥満細胞、ヒスタミン、脂質メディエーターに関連した免疫や炎症反応の存在と、痛みや頻尿の症状発症の関与について検討した。結果として、ヒト膀胱サン

プルにおいて、肥満細胞関連因子のいくつかの発現増大を確認し、動物実験においても、特にヒスタミン関連因子が膀胱知覚に及ぼす影響を確認できた。また、炎症状態では、膀胱粘膜のバリア機構の破綻が確認でき、炎症時、膀胱内への尿中刺激物の侵入を示唆する所見を確認した。これらの発見は、IC/BPS の炎症時には、尿中由来の刺激物が肥満細胞関連因子を介して、膀胱知覚を亢進する可能性を示唆するものである。

今後、IC/BPS の病態における免疫・炎症機序の解明は必須となるが、結果として膀胱知覚を亢進させるメカニズムについては、本研究における発見は有益な情報を提供するものと考えられた。加えて、これらを標的とする創薬や治療法確立においても、本研究は裏付けとなる重要な情報を提供できるものと考えられた。

本研究では、肥満細胞関連因子の一部の検討を進めたが、今後は、未検討の肥満細胞関連因子の寄与も引き続き検討していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Aizawa N and Fujita T	4. 巻 152
2. 論文標題 Comparison of the effects of two anesthetics, isoflurane and urethane, on bladder function in rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci	6. 最初と最後の頁 144-150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2023.04.005	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10件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 相澤直樹
2. 発表標題 膀胱知覚（求心性神経）伝達と、その定量的機能解析（シンポジウム）
3. 学会等名 第64回日本平滑筋学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 相澤直樹，藤田朋恵
2. 発表標題 ラット膀胱機能に及ぼすウレタン麻酔とイソフルラン麻酔の違い
3. 学会等名 第146回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 相澤直樹，藤田朋恵
2. 発表標題 ラット膀胱機能に及ぼすウレタン麻酔とイソフルラン麻酔の違い
3. 学会等名 第29回日本排尿機能学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aizawa N and Fujita T
2. 発表標題 Comparison of the effects of two anesthetics, isoflurane and urethane, on bladder function in rats
3. 学会等名 ASCEPT-JSSMR NextGen Connections: Australia-Japan Symposium on Innovative Research in Smooth Muscle (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 相澤直樹, 藤田朋恵
2. 発表標題 ラット膀胱におけるヒスタミンH2受容体の生理的役割
3. 学会等名 第30回日本排尿機能学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 相澤直樹
2. 発表標題 膀胱知覚の温故知新
3. 学会等名 第30回日本排尿機能学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Aizawa N and Fujita T
2. 発表標題 Physiological role of histamine H2 receptor on bladder sensory function in rats
3. 学会等名 ICS 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Aizawa N and Fujita T
2. 発表標題 Comparison of the effects of two anesthetics, isoflurane and urethane, on bladder function in rats
3. 学会等名 ICS 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 相澤直樹, 藤田朋恵
2. 発表標題 Inside-out標本を用いた 膀胱粘膜の水吸収機構の検討
3. 学会等名 第97回日本薬理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 相澤直樹, 藤田朋恵
2. 発表標題 炎症による膀胱粘膜水吸収機構の変化: Inside-out標本を用いた検討
3. 学会等名 第10回日本平滑筋学会若手の会 冬の研究発表会
4. 発表年 2024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
研究 分担 者	藤田 朋恵 (Fujita Tomoe) (20296510)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	山西 友典 (Yamanishi Tomonori) (90220425)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	削除：2022年5月17日

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