

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23790609

研究課題名(和文) 間質性膀胱炎における痛みの発現メカニズムの解析：サブスタンスPと硫化水素の役割

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms for the bladder pain in interstitial cystitis: the role of substance P and hydrogen sulfide

研究代表者

坪田 真帆 (TSUBOTA, Maho)

近畿大学・薬学部・助教

研究者番号：90510123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱組織においてサブスタンスPはおそらくNK1受容体を介して硫化水素合成酵素シタチオニン-リアーゼ(CSE)のup-regulationを引き起こし、これによって膀胱組織内で生成された硫化水素が炎症の進行を促進するとともにCav3.2 T型カルシウムチャネルを活性化することで膀胱痛の発現および維持に関与することが明らかとなった。今後、これらのシグナル経路を標的とした薬物が間質性膀胱炎の新たな治療薬として開発されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study clarified that, in the bladder tissues, substance P (SP) upregulates cystathionine-lyase (CSE) via NK1, and endogenous hydrogen sulfide generated by SP/NK1/CSE pathway facilitates processing of inflammation and participates in the development and maintenance of bladder pain through the activation of Cav3.2. These results suggest that the drug targeting these signaling pathway appears to serve as novel therapeutic strategy for treatment of painful bladder diseases including interstitial cystitis.

研究分野：薬理学

キーワード：間質性膀胱炎 硫化水素 サブスタンスP Cav3.2

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素、一酸化炭素に続く第3のガス状情報伝達物質である硫化水素 (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) などの酵素により内因性に生成され、様々な生理機能に関与することが報告されている。所属研究室では、 H_2S が体性痛および内臓痛を誘起することを明らかにし、これらの効果の発現には知覚神経上に発現する $Ca_v3.2$ T型 Ca^{2+} チャンネルの活性化が関与すること証明している。さらに、炎症性痛覚過敏、神経障害性疼痛および膀胱に伴う痛みには CSE 阻害薬である DL-proraegylglycine (PPG) が抑制効果を示すことから、病態時に内因性に産生される H_2S が痛み発現に関与することを見出している。私はこれまでに所属研究室において H_2S の内臓痛発現メカニズムの解析に取り組み、結腸痛および膀胱痛の発現に H_2S が関与することを共同研究者とともに明らかにしている^{1,2)}。最近、シクロホスファミド誘起膀胱炎モデルマウスを用いた膀胱の痛み発現における H_2S の役割を検討し、膀胱炎モデルマウスの膀胱組織中で CSE の蛋白発現量が増大し、膀胱炎に伴う痛みおよび炎症症状が PPG により抑制されることを学術雑誌において報告した³⁾。

間質性膀胱炎は症状として、強い膀胱痛が特徴の原因不明の疾患である。シクロホスファミド誘起膀胱炎モデルは、間質性膀胱炎に似た症状を示すことから実験動物モデルとして用いられている。上述のように、シクロホスファミド誘起膀胱炎モデルにおいて CSE を介した H_2S 産生亢進が膀胱痛および炎症症状に関与することは明らかであるが、膀胱炎発症時に CSE が産生増大するメカニズムについてはわかっていない。一方、一次知覚神経伝達物質であるサブスタンス P (SP) は末梢において肥満細胞に作用し神経因性炎症を誘起することが知られている。興味深いことに、SP をマウス膀胱内へ投与することにより実験的膀胱炎が誘起されることが報告されている。さらに、間質性膀胱炎患者の膀胱組織生検では SP 受容体の mRNA レベルでの増加が報告されていることより、間質性膀胱炎において SP が重要な役割を示すことが示唆されている。そこで今回、シクロホスファミド誘起膀胱炎モデルにおける CSE 蛋白発現量増大のメカニズムに SP が関与するとの仮説を立て本研究を企画した。さらに、細菌の内毒素であるリポポリサッカライド (LPS) のマウス膀胱内投与によっても同様に膀胱炎モデルが作製出来ることより、神経因性および細菌性膀胱炎の違いを比較検討し、それぞれに特徴的な分子メカニズムの解析も行う。本研究の実施により、膀胱炎および膀胱痛の病態に関与する新たな分子メカニズムを解明し、新しい治療薬開発のための手掛かりを得たいと考えている。

参考文献

1) Matsunami (Tsubota) et al., (2009) *Gut* 58: 751-761; 2) Nishimura et al., (2009) *Gut* 58: 762-770; 3) Matsunami (Tsubota) et al., (2012) *Br. J. Pharmacol.*, 167, 917-928;

2. 研究の目的

私達は、気体メッセンジャーである硫化水素 (H_2S) が T 型 Ca^{2+} チャンネルを介して結腸痛や膀胱痛の情報伝達に関与することを報告している^{1,2)}。最近、強い膀胱痛を伴う間質性膀胱炎の実験モデルにおいて H_2S 合成酵素の発現誘導が認められ、 H_2S 合成酵素阻害薬が膀胱痛を抑制するという知見を得ている³⁾。一方、一次知覚神経由来のサブスタンス P (SP) が間質性膀胱炎の病態に関与することが示唆されていることから、今回は、 H_2S 合成酵素発現誘導における SP の役割を明らかにし、膀胱痛発症における SP- H_2S 系の関与を検討することを主目的として本研究を企画した。本研究により、膀胱炎に伴う痛みに対する新たな治療戦略の構築に貢献したい。

参考文献

1) Matsunami (Tsubota) et al., (2009) *Gut* 58: 751-761; 2) Nishimura et al., (2009) *Gut* 58: 762-770; 3) Matsunami (Tsubota) et al., (2012) *Br. J. Pharmacol.*, 167, 917-928;

3. 研究の方法

(1) サブスタンス P (SP) およびリポポリサッカライド (LPS) 膀胱内投与誘起膀胱炎モデルの作製

SP および LPS 膀胱内投与誘起膀胱炎モデルの作製は Saban らの報告に従って行った¹⁾。イソフルラン麻酔下、雌マウスの膀胱内に、尿道口からカニューレを挿入し、SP 6 あるいは 20 nmol/mouse、LPS 20 あるいは 200 μ g/mouse を膀胱内へ注入して 30 分間作用させ、その後、膀胱内液を排出させ、上記の方法および用量の SP を再度 30 分間作用させた。

(2) 関連痛覚過敏の評価

SP 膀胱内投与 6 および 24 時間後、LPS 投与 24 時間後に、von Frey filament を用いて尿道口から肛門付近の皮膚表面および後肢足底を刺激し、10 回の刺激に対する反応をスコア化し、合計値を算出した。

(3) SP および LPS 膀胱内投与による炎症症状の評価

侵害受容反応測定後にマウスを安楽死させた後、膀胱を摘出し、湿重量を測定した。また、SP 投与 24 時間後にマウスを安楽死させ、膀胱を摘出した。摘出した膀胱の病理切片を作製し、Hematoxylin-eosin 染色し、組織像の観察を行った。

(4) Antisense 法を用いた $Ca_v3.2$ のノックダウン

Ca_v3.2 に対するアンチセンスオリゴヌデオキシクレオチド 10 μg/mouse を脊髄くも膜下腔内へ 1 日 1 回 3 日間、計 3 回投与した。

(5) Western blot 法による各種タンパク発現量の測定

SP 膀胱内投与 6 および 24 時間後、膀胱を、24 時間後 DRG を摘出し、CSE および Ca_v3.2 の発現量をそれぞれ Western blot 法により測定した。

参考文献

1) Saban MR et al (2002) *Am J Physiol Renal Physiol* 282, 202-210

4. 研究成果

(1) シクロホスファミド (CPA) 誘起膀胱炎モデルに対する NK1 受容体選択的アンタゴニスト CP-96,345 の効果

CPA 誘起膀胱炎モデルにおける SP の受容体である NK1 のアンタゴニスト CP-96,345 の効果を検討したところ、CP-96,345 の前投与により CPA 誘起膀胱痛が強力に抑制され、膀胱湿重量増加は部分的に抑制された。さらに、CP-96,345 は、CPA 誘起 CSE タンパク発現量増加を部分的に抑制した。

(2) SP 膀胱内投与による関連痛覚過敏および膀胱炎症状の発現

Substance P 6 nmol/mouse 膀胱内投与 6 および 24 時間後、または substance P 20 nmol/mouse 膀胱内投与 24 時間後、侵害受容反応が有意に増加し、尿道口から肛門付近の皮膚表面および後肢足底において関連痛覚過敏が認められた。さらに、SP 6 nmol/mouse 膀胱内投与 6 時間後においては膀胱相対湿重量の変化が見られなかったが、24 時間後ではコントロール群に比べて有意な増加が認められた。また、SP 膀胱内投与 24 時間後の膀胱組織では、軽度の粘膜浮腫とわずかな好中球浸潤が見られる程度で、明らかな炎症像は見られなかった。

(3) SP 膀胱内投与誘起関連痛覚過敏および膀胱炎症状に対する NK1 受容体選択的阻害薬 CP-96,345 の効果

SP 膀胱内投与 6 および 24 時間後に誘起される関連痛覚過敏は、CP-96,345 により強く抑制された。さらに、CP-96,345 は SP 膀胱内投与 24 時間後に誘起される膀胱相対湿重量の増加を有意に抑制した。

(4) SP 膀胱内投与誘起関連痛覚過敏および膀胱炎症状に対する CSE 阻害薬 DL-propargylglycine の前投与の効果

SP 膀胱内投与 6 および 24 時間後に誘起される関連痛覚過敏は、DL-propargylglycine の前投与により強く抑制された。さらに、DL-propargylglycine は SP 膀胱内投与 24 時間後に誘起される膀胱相対湿重量の増加を有

意に抑制した。

(5) SP 膀胱内投与後の膀胱組織中における CSE のタンパク発現量の検討

SP 膀胱内投与 6 および 24 時間後に摘出したマウスの膀胱組織中における CSE のタンパク発現量は、vehicle を投与したマウスに比べ、有意に増加していた (図 1)。

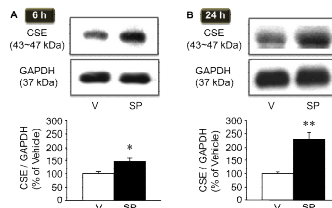


図 1 SP 膀胱内投与 6 および 24 時間後の膀胱組織中 CSE タンパク発現量

(6) SP 膀胱内投与誘起関連痛覚過敏に対する CSE 阻害薬 DL-propargylglycine の後投与の効果

DL-propargylglycine を SP 膀胱内投与 5 および 23 時間後に投与したところ、SP 膀胱内投与 6 および 24 時間後に認められる関連痛覚過敏は、強く抑制された。

(7) SP 膀胱内投与誘起関連痛覚過敏に対する T 型 Ca²⁺チャネル阻害薬 NNC 55-0396 の効果
NNC 55-0396 を SP 膀胱内投与 5 および 23 時間後に投与したところ、SP 膀胱内投与 6 および 24 時間後に認められる関連痛覚過敏は、強く抑制された。

(8) SP 膀胱内投与誘起関連痛覚過敏に対する Ca_v3.2 T 型 Ca²⁺チャネルノックダウンの効果
Ca_v3.2 に対するアンチセンスオリゴヌデオキシクレオチド処置マウスに、SP を膀胱内投与したところ、関連痛覚過敏の発現が阻止された (図 3)。

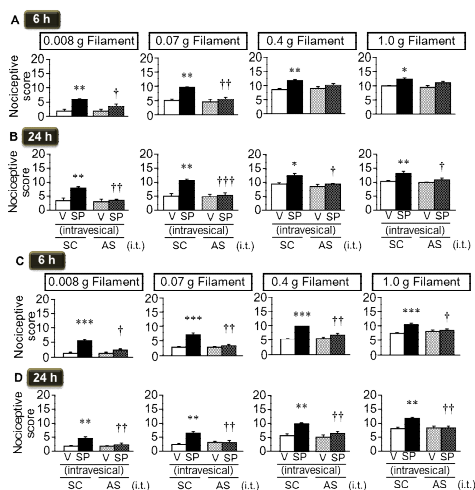


図 3 SP 膀胱内投与誘起関連痛覚過敏に対する Ca_v3.2 T 型 Ca²⁺チャネルノックダウンの効果

(9) SP 膀胱内投与誘起関連痛覚過敏に対する TRPA1 阻害薬 AP18 の効果

SP 膀胱内投与 6 および 24 時間後に認められる尿道口から肛門付近の皮膚表面および後肢足底における関連痛覚過敏に対して、TRPA1 阻害薬 AP18 を SP 膀胱内投与 5 および 23 時間後に投与したところ、SP による膀胱痛関連痛覚過敏に変化は認められなかった。

(10) LPS 膀胱内投与による膀胱関連痛覚過敏および膀胱炎症状の発現

LPS 20 あるいは 200 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 膀胱内投与 24 時間後に関連痛覚過敏を評価したところ、200 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 膀胱内投与において、侵害受容反応が有意に増加し、関連痛覚過敏が認められた。さらに、LPS 20 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 膀胱内投与では膀胱相対湿重量に変化は見られなかったが、200 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 膀胱内投与ではコントロール群に比べて有意な増加が認められた。

以上の結果より、膀胱組織において SP はおそらく NK1 受容体を介して CSE の up-regulation を引き起こし、これによって膀胱組織内で生成された H_2S が炎症の進行を促進するとともに $\text{Ca}_v3.2$ T 型 Ca^{2+} チャンネルを活性化することで膀胱関連痛覚過敏の発現および維持に関与することが明らかとなった。また、LPS 膀胱内投与による膀胱炎モデルの確立と痛みの評価系を確立することに成功した。今後、これらのシグナル経路を標的とした薬物が間質性膀胱炎の新たな治療薬として開発されることが期待される。

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 0 件)

[学会発表](計 9 件)

発表者名：尾崎友香、坪田真帆、川畑篤史
発表標題：The NK1 receptor antagonist prevents the cyclophosphamide-induced cystitis-related bladder pain and upregulation of cystathionine- γ -lyase, an H_2S -generating enzyme, in mice.

学会等名：Pharmacology 2014.

発表年月日：2014 年 12 月 16-28 日

発表場所：ロンドン（イギリス）

発表者名：尾崎友香、坪田真帆、川畑篤史
発表標題：Mechanisms for upregulation of cystathionine- γ -lyase, a hydrogen sulfide-generating enzyme, in mice with cyclophosphamide-induced cystitis: Involvement of substance P/NK1 pathway and NF- κ B signals.

学会等名：International Symposium “Gasotransmitters: Physiology and

Pathophysiology”

発表年月日：2014 年 9 月 21-23 日

発表場所：カザン（ロシア）

発表者名：久保里紗、坪田真帆、川畑篤史
他 3 名

発表標題：可溶性トロンボモジュリンおよび抗 HMGB1 中和抗体は lipopolysaccharide あるいは substance P 膀胱内注入により誘起される膀胱痛を抑制する

学会等名：第 125 回日本薬理学会近畿部会

発表年月日：2014 年 6 月 20 日

発表場所：岡山コンベンションセンター（岡山県岡山市）

発表者名：久保里紗、坪田真帆、川畑篤史
他 3 名

発表標題：Lipopolysaccharide 膀胱内注入により誘起されるマウス膀胱炎・膀胱痛に対する可溶性トロンボモジュリンの効果：投与量による違い。

学会等名：生体機能と創薬シンポジウム 2013

発表年月日：2013 年 8 月 29-30 日

発表場所：九州大学病院百年講堂（福岡県福岡市）

発表者名：尾崎友香、坪田真帆、川畑篤史
他 1 名

発表標題：シクロホスファミド誘起膀胱炎・膀胱痛に対する NK1 受容体拮抗薬および curcumin の効果：硫化水素 / T 型カルシウムチャンネル系の上流シグナルの解析

学会等名：第 123 回日本薬理学会近畿部会

発表年月日：2013 年 7 月 12 日

発表場所：ウインクあいち（愛知県名古屋市中区）

発表者名：大川恭昌、松波（坪田）真帆、川畑篤史

発表標題：ウスにおいて substance P 膀胱内投与は硫化水素合成酵素の発現誘導と $\text{Ca}_v3.2$ T 型 Ca^{2+} チャンネルの活性化を介して膀胱痛 / 関連痛覚過敏を誘起する

学会等名：日本薬学会第 132 年会

発表年月日：2012 年 3 月 28-31 日

発表場所：北海道大学札幌キャンパス（北海道札幌市）

発表者名：松波（坪田）真帆、大川恭昌、川畑篤史 他 1 名

発表標題：サブスタンス P 誘起遅発性膀胱痛マウスモデルを用いた間質性膀胱炎の分子病態解析：内因性硫化水素と $\text{Ca}_v3.2$ T 型カルシウムチャンネルの役割について。

学会等名：第 85 回日本薬理学会年会

発表年月日：2012 年 3 月 14-16 日

発表場所：国立京都国際会館（京都府京都市）

発表者名：川畑篤史、松波(坪田)真帆 他
5名

発表標題：Impact of Cav3.2 T-type calcium channels targeted by hydrogen sulfide on bladder nociception.

学会等名：Neuroscience 2011

発表年月日：2011年11月12-16日

発表場所：ワシントン(アメリカ)

発表者名：松波(坪田)真帆、大川恭昌、川畑篤史

発表標題：サブスタンスPの膀胱内投与により誘起される膀胱関連痛覚過敏には硫化水素合成酵素の発現誘導とCa_v3.2 T型Ca²⁺チャネルが関与する。

学会等名：第120回日本薬理学会近畿部会

発表年月日：2011年11月11日

発表場所：グランビア京都(京都府京都市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

坪田 真帆 (TSUBOTA, Maho)

近畿大学・薬学部・助教

研究者番号：90510123