

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861414

研究課題名(和文) 間質性膀胱炎のメカニズムの解明と新規治療薬候補GsMTx4の可能性

研究課題名(英文) Investigation into the mechanism of interstitial cystitis and new therapeutic drug candidate GsMTx4

研究代表者

大竹 裕子(OOTAKE, Yuuko)

山梨大学・総合研究部・診療助教

研究者番号：80631449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：間質性膀胱炎患者、ならびに正常患者群から採取した膀胱上皮サンプルを用いてTRPC1、TRPC6、TRPV4チャンネルを測定した。また間質性膀胱炎群の患者から採取した間質性膀胱炎症状スコアと各TRPチャンネルとの相関を検討した。マウス排尿代謝ケージを用いGsMTx4を投与した際のマウスの排尿状態の変化を確認した。GsMTx4はマウスの膀胱機能においては蓄尿機能を増強する方向に作用することが分かった。

研究成果の概要(英文)：We examined the expression of h-TRPC1, h-TRPC6 and h-TRPV4 mRNAs in the bladder urothelium of interstitial cystitis patients by quantitative RT-PCR. In addition, we examined the correlation between IC symptom score and each TRP channels. The mouse metabolic cage experiment showed that administration of GsMTx4 decreased urinary frequency and increased urine volume/voided urine in mice, despite there being no changes in water intake and total urine volume. This indicates that GsMTx4 is effective in urine storage function.

研究分野：排尿生理

キーワード：間質性膀胱炎

1. 研究開始当初の背景

(1) 間質性膀胱炎 (Interstitial Cystitis: IC) は非細菌性の原因不明な難治性の炎症性疾患であり、有効な治療法は確立されていない。1日に何度も引き起こされる膀胱充満時痛のため、患者は著しく生活の質が損なわれる。日本、欧米での疫学調査では、相当数の患者が存在すると考えられている。ICの原因として、膀胱上皮のバリア機構である Glycosaminoglycan-layer (GAG 層) の破綻が考えられているが、それ以上の発症のメカニズム、疼痛の増悪のメカニズムは分かっておらず、その原因究明と治療法の確立が早急に求められている。

(2) IC 治療と神経障害性疼痛 IC に対して、現在有効とされている治療法は膀胱水圧拡張術やボトックス膀胱内注入療法などであるが、その効果は3-6カ月程度と限られたものであり、患者のQOLの改善、症状の緩和という点では満足のものとはなり得ていない。一般的な疼痛に対し使用される消炎鎮痛薬 (NSAIDs) などは本疾患には無効である。我々は臨床医療の場において IC の疼痛に対し、神経障害性疼痛治療薬であるプレガバリン (神経障害性疼痛に対する保険適応薬) を使用し、膀胱痛に対して一定の効果を得ている。また漢方薬であるブシは、神経障害性疼痛に対しての有効性が報告されており (PloS One. 2011) 我々は間質性膀胱炎患者に対し、ブシ治療を行い、その有効性を実証してきた (2009年米国泌尿器科学会総会で報告)。以上の知見より、今まで原因不明とされてきた間質性膀胱炎は、神経障害性疼痛の一つである可能性が示唆される。既存治療薬の作用機序は中枢性に作用するものであって、いまだに末梢における発症機序は不明であり、末梢性に作用する治療薬の開発は行われていない。

(3) 末梢における神経障害性疼痛の機序と IC 炎症応答の過程には細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が重要なステップとして働いていることが推測されており、その原因として TRP チャネルの増加が報告されている (JBC 2003)。神経障害性疼痛において脊髄後根神経節での TRPC1/TRPC6 の関与が報告されており、これらのチャネルは TRPV4 チャネルと共に TRPV4 刺激により活性化され、その疼痛が増強されることが報告された (JBC 2009)。TRPC1/TRPC6 は Ca^{2+} 透過性の高い陽イオンチャネルであり、その発現の変化は Ca^{2+} を中心とした細胞内シグナルの変化を引き起こしている可能性が推測される。これらの結果から、間質性膀胱炎の発症には膀胱上皮での TRPC1/TRPC6 を介する Ca signal pathway が関与しており、疼痛を惹起する新たな経路が構築されるのではないかと考えられる。

(4) 膀胱上皮における TRPC1/TRPC6 と TRPV4 TRPC チャネルは、マウス膀胱上皮細胞に発現していることが報告されている (AJP-Renal Physiol 2011)。また TRPV4 チャネルも膀胱上皮に発現しており、伸展刺激により活性化されることが報告されている (JBC 2009)。前述したように、神経障害性疼痛の発症には TRPC1/TRPC6 が関与しており、TRPV4 刺激によりこれらのチャネルは活性化される。膀胱上皮においてはこの TRPV4 刺激は伸展刺激であり、ICにおける膀胱充満時痛は、膀胱伸展刺激による TRPV4 刺激がトリガーとなり、その結果 TRPC1/TRPC6 を活性化し、疼痛を引き起こしている可能性がある。

(5) IC における TRPC1/TRPC6 と GsMTX4 : 我々の仮説 IC 発症の我々の仮説を以下に述べる。膀胱上皮 GAG-layer の異常により、尿中侵害物質が膀胱壁内に侵入する。これらの侵害刺激物質が膀胱上皮での TRPC1/TRPC6 を upregulate させる。

正常状態よりも増加した TRPC1/TRPC6 により、神経障害性疼痛が発症。膀胱伸展による TRPV4 刺激が繰り返して起こること

で、膀胱充満時痛がさらに増悪する。
(6) 新規神経障害性疼痛治療薬としての GsMTX4 の可能性 GsMTX4 は selective stretch-activated ion channel inhibitor であり、TRPC1/TRPC6 チャネルを阻害し、細胞内 Ca^{2+} 流入を減弱させ、神経障害性疼痛を改善することが報告されている (J.Neuroscience 2009, Pain 2008)。GsMTX4 はクモ毒から抽出されるペプチドであり、マウス心筋の stretch-activated channel 伸展誘発性不整脈に対し抑制効果があることが報告されており (Nature. 2001) 治療薬としての利用が試みられている。ICにおいても GsMTX4 は膀胱上皮の TRPC1/TRPC6 チャネルを阻害することにより Ca^{2+} 流入を減弱させ、結果として痛みを改善するものと思われる。

2. 研究の目的

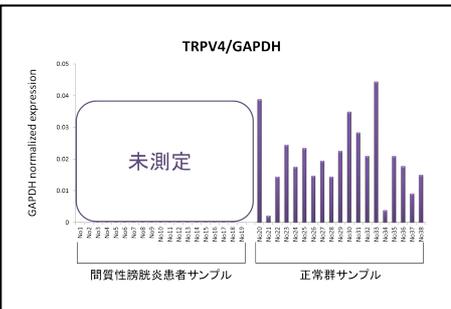
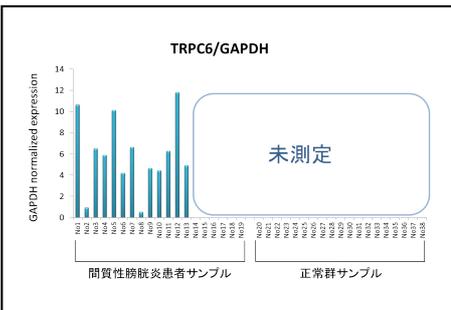
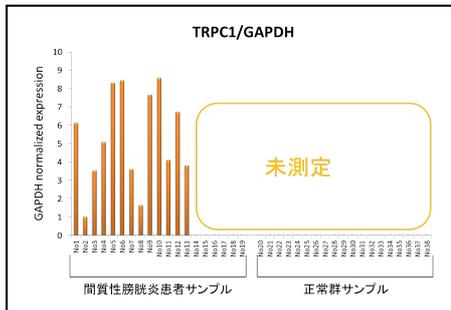
間質性膀胱炎 (Interstitial Cystitis: IC) は、頻尿・膀胱充満時痛などの症状を呈する原因不明の難治性疾患である。日本における疫学調査では、潜在的な患者が相当数いると予想されている。近年、難治性の疼痛である神経障害性疼痛における TRPC1/TRPC6 チャネルの関与が注目されている。我々は IC が神経障害性疼痛と同様なメカニズムで発症しているのではないかと考え、膀胱上皮における TRPC1/TRPC6 チャネルが IC においても関与していることを証明し、IC 発症のメカニズムを解明したいと考えている。また TRPC1/TRPC6 の阻害薬である GsMTX4 の効果を IC モデルにおいても実証し、IC に対する新規治療薬の可能性を検証したいと考えている。

3. 研究の方法

ヒト膀胱上皮サンプルを用いて、正常群と IC 患者群における TRPC1、TRPC6、TRPV4 の発現量を定量的 RT-PCR、Western Blot を用いて比較を行う。また免疫組織染色による各 TRP チャンルの局在を評価する。次にマウス IC モデル (cyclophosphamid 誘発性 IC モデル) を作成し、control 群と IC 群における各 TRP チャンルの発現を確認する。排尿代謝ケージを用いて control 群と IC 群における排尿行動の変化 (排尿回数、1 回排尿量等) を測定する。また膀胱内圧テレメトリ システムによる膀胱パラメータの比較 (無抑制収縮の有無、膀胱収縮圧、膀胱容量等) を行う。さらにはマウス膀胱上皮培養細胞を用いた in vitro 間質性膀胱炎モデルを作成し、Ca imaging 法を用いて伸展刺激時の細胞内 Ca²⁺ の測定 (control 群 VS IC 群) と、IC モデルにおける GsMTX4 の効果を測定する。

4. 研究成果

結果 1



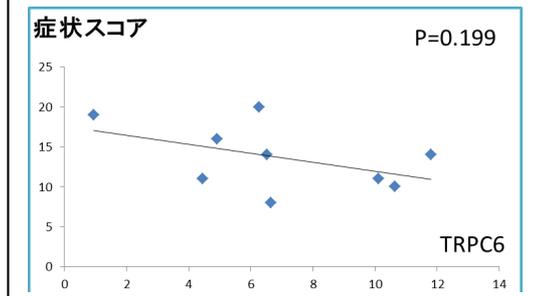
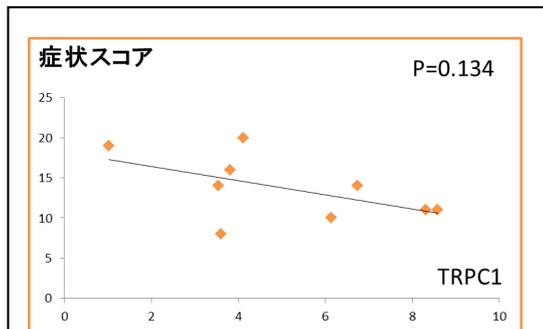
間質性膀胱炎患者ならびに正常群から採取した膀胱上皮細胞サンプルから各種 TRP チャンルの発現量を測定している。現在、間質性膀胱炎患者から採取したサンプル数は 19、正常群から採取したサンプルも 19 あり測定中である。各群の測定がすべて終了後にそれぞれの群間での有意差の有無な

どを検定する予定である。

結果 2

間質性膀胱炎群の患者における臨床データ (間質性膀胱炎症状スコア、問題スコア) と各 TRP チャンルとの相関を検討した。サンプルを採取した患者において、臨床データを採取できたものを以下に記す。

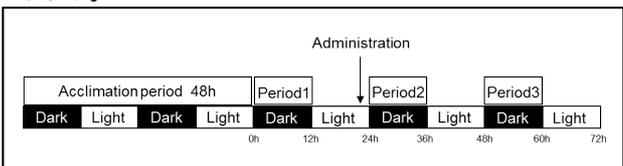
	症状スコア					問題スコア				
	質問1	質問2	質問3	質問4	合計スコア	質問1	質問2	質問3	質問4	合計スコア
No1	0	2	4	4	10	2	3	1	2	8
No2	5	5	5	4	19	4	4	4	4	16
No3	1	5	4	4	14	4	4	2	2	12
No5	0	4	3	4	11	2	2	3	3	10
No8	2	2	2	2	8	0	0	0	1	1
No10	2	3	1	5	11	2	1	3	4	10
No11	5	5	5	5	20	4	4	4	4	16
No12	3	3	3	5	14	3	3	3	4	13
No13	4	5	3	4	16	4	3	4	4	15



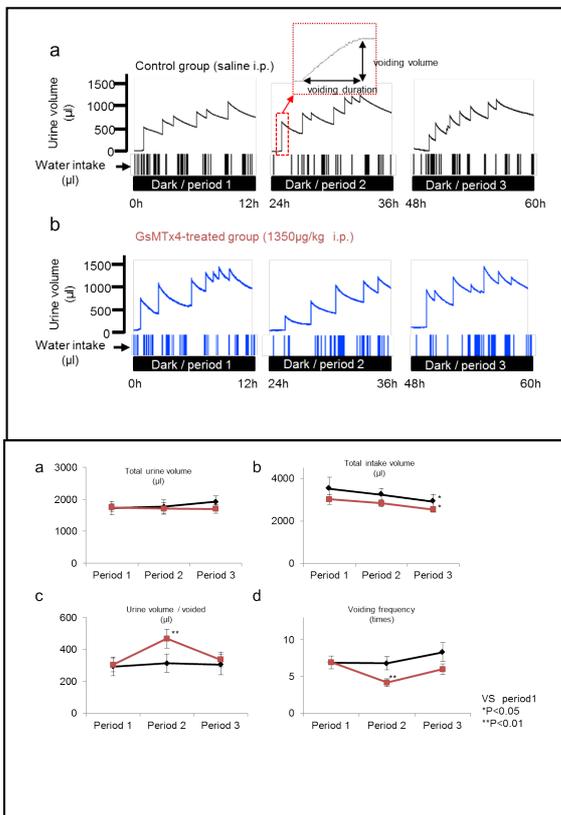
現時点においては TRPC1、TRPC6 の mRNA 発現量と症状スコアにおいては有意な相関関係は見られていない。未測定サンプルを測定後に再度検討する方針である。

結果 3

マウス排尿代謝ケージを用いて control 群と IC 群における排尿行動の変化 (排尿回数、1 回排尿量等) を測定する。まずは control 群のマウスを用いて、排尿代謝ケージ実験を行った。実験プロトコルは下記に示すとおりである。



このプロトコルに従って、まず GsMTX4 を投与した際の排尿状態の変化を確認した。結果は以下に示すとおりである。



Control 群マウスにGsMTx4を投与すると生理食塩水投与群と比較して有意に排尿間隔が延長し、また1回排尿量は有意に増加した。このことからGsMTx4はマウスの膀胱機能においては蓄尿機能を増強する方向に作用することが分かった。またマウスの飲水量などには影響は与えず、観察できた範囲内では餌の摂取量や活動性には影響を与えていないものと思われた。

結果4

マウス IC モデル (cyclophosphamid 誘発性 IC モデル) の作成には難渋している。既報の文献を参照して IC マウスを作成しているが安定したモデルマウスの作成には至っていない。Cyclophosphamid を腹腔内に投与することにより、明らかに頻尿を呈するマウスは作成できるものの代謝ケージにて測定してみると明らかに飲水量が減少していたり観察中に非常に活動性の低下しているマウスが散見された。これらのマウスから膀胱を摘出し切片を作成したところ膀胱の炎症は確認できたものの、排尿代謝ケージで安定した測定を行うに適した IC モデルマウスを作るためにさらなる実験条件の検討が必要と思われる。

また、そのために IC モデルマウスにおける各 TRP チャネルの発現量の確認は未施行である。IC モデルマウスが安定して作成できるようになった後に行っていく予定である。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大竹 裕子 (OOTAKE, Yuuko)

山梨大学・総合研究部・診療助教

研究者番号：80631449

(2) 研究協力者

宮本 達也 (MIYAMOTO, Tatsuya)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：80456459

武田 正之 (TAKEDA, Masayuki)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：80197318