

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460694

研究課題名(和文) 管腔臓器内臓痛を引き起こすシグナル経路の同定と内臓知覚過敏治療への応用

研究課題名(英文) The identification of signal pathways inducing the visceral pain of hollow organs and its application to the treatment of visceral hyperesthesia

研究代表者

宮井 和政 (Miyai, Kazumasa)

大阪府立大学・総合リハビリテーション学研究科・教授

研究者番号：60283933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：各種刺激に応じた管腔臓器粘膜上皮からのATP分泌は、内臓感覚の起点となる現象である。本研究では、膀胱、食道、直腸上皮からのATP分泌を制御するシグナル経路として PGE2-EP1経路、NO-cGMP経路、5-HT受容体経路に着目し、これらシグナル経路の作用が臓器によって異なるかどうかを検討した。その結果、NO-cGMP経路は全ての臓器で粘膜上皮からのATP分泌を抑制することを見出した。次に、細菌性膀胱炎および過敏性腸症候群モデル動物における粘膜上皮からのATP分泌の変化を検討した。これら内臓知覚過敏を呈するモデル動物では、膀胱および直腸上皮からのATP分泌が増大していることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The ATP release from mucosal epithelium of hollow organs in response to various stimuli contributes to the visceral sensation. In this study, we examined the effects of 1) PGE2-EP1 pathway, 2) NO-cGMP pathway, and 3) 5-HT receptor pathway on the epithelial ATP release in urinary bladder, esophagus, and colorectum. As a result, we found that NO-cGMP pathway inhibited the epithelial ATP release in all hollow organs analyzed in this study. Then we compared the epithelial ATP release in the model animals of bacterial cystitis or irritable bowel syndrome with that in healthy control animals. In these model animals with visceral hyperesthesia, the epithelial ATP release were increased in comparison to that in control animals.

研究分野：神経科学・生理学

キーワード：内臓知覚過敏 アデノシン3リン酸 粘膜上皮 管腔臓器 一酸化窒素 環状ヌクレオチド セロトニン

1. 研究開始当初の背景

(1) 尿路系や消化管などの管腔臓器の粘膜上皮は伸展などの機械刺激や化学刺激に応じて ATP を分泌し、求心性神経終末の P2X<sub>2/3</sub> 受容体に結合して内臓痛などの内臓知覚を伝達する。しかしながら、ATP 分泌量を調節するシグナル経路にどのようなものがあるのかについては十分に解明されておらず、また、ATP 分泌調節シグナル経路は各臓器に共通なのか、それとも臓器によって異なるのかも明らかではなかった。

(2) 内臓知覚異常を病態とする疾患群（過活動膀胱、過敏性腸症候群、胃食道逆流症、機能性ディスぺプシアなど）の患者数は年々増加傾向にある。これらの疾患では、腹痛といった内臓痛のみならず、尿意切迫感、胸やけ、胃もたれなどの内臓知覚過敏状態を呈するという共通の特徴が認められるが、この内臓知覚過敏が ATP 分泌の異常な増加によるものなのかについては未知の部分が多く残されていた。

2. 研究の目的

(1) そこで本研究では、膀胱、食道、直腸の粘膜上皮から分泌される ATP 量を制御するシグナル経路を同定し、各臓器の粘膜上皮におけるシグナル経路が共通しているのかどうか、また共通しているとすればその作用が同じなのか異なるのかを詳細に検討することを第 1 の目的とした。

(2) 次に、内臓知覚過敏を呈する複数のモデル動物（細菌性膀胱炎モデルマウスおよび過敏性腸症候群モデルラット）において、粘膜上皮からの ATP 分泌量がどのように変容しているのかを解析し、ATP 分泌量と内臓知覚過敏との関わりを解明することを第 2 の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 膀胱、食道、直腸の各粘膜上皮からの ATP 分泌を制御するシグナル経路を同定、解析するため、マウスおよびラットから膀胱、食道、直腸を摘出し、展開したのちに我々がカスタマイズしたウッシングチャンバーに装着した。漿膜側から与えた静水圧による伸展刺激や粘膜側から与えた化学刺激に応じて粘膜側に分泌された ATP 量をルシフェリン-ルシフェラーゼ法を用いて測定した。

(2) 各臓器におけるセロトニン受容体サブタイプおよびセロトニン合成酵素の 1 つであるトリプトファン水酸化酵素群の mRNA 発現の有無を検討するため、各臓器から抽出、精製した mRNA を鋳型とした RT-PCR 法を実施した。また、膀胱上皮で mRNA 発現が認められたセロトニン受容体 5-HT<sub>1D</sub> および 5-HT<sub>4</sub> については、タンパク質の発現局在を明らかにするため、特異的抗体を用いた免疫組織化学法

を実施した。

4. 研究成果

(1) 膀胱上皮からの ATP 分泌を制御するシグナル経路の同定（表 1 参照）

膀胱上皮からの生理的伸展刺激に応じた ATP 分泌量を調節しているシグナル経路として、プロスタグランジン E<sub>2</sub> 受容体 EP1 からのシグナル経路、貯蔵量作動性 Ca<sup>2+</sup> 流入からのシグナル経路、セロトニン受容体 5-HT<sub>1D</sub> および 5-HT<sub>4</sub> からのシグナル経路を同定した（図 1 参照）。のシグナル経路は ATP 分泌を促進したのに対し、のシグナル経路は ATP 分泌を抑制していた。また、の経路の下流に存在するシグナル経路として、一酸化窒素 (NO) -cGMP 経路が存在する可能性を示唆した。

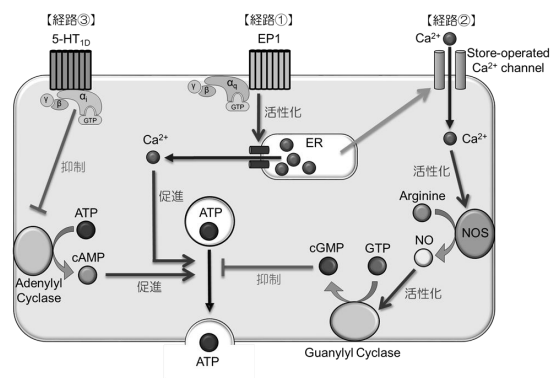


図1. 膀胱上皮からのATP分泌を制御するシグナル経路

の経路については、受容体のサブタイプによって作用が異なることが明らかとなった。セロトニンの投与は膀胱上皮からの ATP 分泌を抑制するが、この抑制作用は cAMP 量を減少させる 5-HT<sub>1D</sub> を介していた。一方、cAMP 量を増加させる 5-HT<sub>4</sub> の活性化は ATP 分泌を促進した。これら受容体の作用は、アデニル酸シクラーゼ活性化による cAMP の増加が ATP 分泌を促進することを示した我々の先行研究の結果とよく一致した。

また、5-HT<sub>1D</sub> および 5-HT<sub>4</sub> はともにタンパク質レベルで膀胱上皮細胞と平滑筋線維に局在していることを実証した、さらに、セロトニン合成に必要な酵素であるトリプトファン水酸化酵素 1 (TPH1) の mRNA 発現が膀胱に認められることを示し、セロトニンは膀胱組織において産生、分泌されている可能性を示唆した。

(2) 食道上皮からの ATP 分泌を制御するシグナル経路の同定（表 1 参照）

食道上皮からの ATP 分泌は、上記の経路で膀胱上皮と同様に促進されることを示した。の経路については膀胱上皮とは逆に促進作用を呈したものの、その下流と考えられる NO-cGMP 経路は膀胱上皮と同様に ATP 分泌を抑制していた。このことから、食道におい

では、貯蔵量作動性  $Ca^{2+}$  流入の下流シグナルが NO-cGMP 経路ではないことが示唆された。食道では、膀胱上皮とは逆にアデニル酸シクラーゼ-cAMP の経路が ATP 分泌を抑制しており、この経路はアデニル酸シクラーゼを抑制することで促進作用を示す可能性が考えられた。また、食道ではこの経路の存在は認められなかった。

食道上皮では TRPV1 の活性化が ATP 分泌を駆動するものの、伸展刺激に応じた分泌には関与しておらず、TRPV1 は逆流した胃酸などに反応して不快感を引き起こす可能性が示唆された。さらに、TRPV4 の活性化も伸展刺激に応じた ATP 分泌には関与しないことを示した。

### (3) 直腸上皮からの ATP 分泌を制御するシグナル経路 (表 1 参照)

直腸上皮からの ATP 分泌については、この経路の作用は認められなかったものの、この経路およびその下流である NO-cGMP 経路は膀胱上皮と同様に ATP 分泌抑制作用を示した。この経路については、セロトニンが膀胱上皮と同様に ATP 分泌を抑制することを示した。しかしながら、その抑制作用は膀胱とは異なり、5-HT<sub>4</sub> からの cAMP 上昇を介していた。

表 1. 膀胱、食道、直腸の上皮からの ATP 分泌に対する各シグナル経路の制御作用

	膀胱上皮	食道上皮	直腸上皮
PGE <sub>2</sub> -EP1	↑	↑	→
AC-cAMP	↑	↓	↓
5-HT <sub>1D</sub>	↓	/	/
5-HT <sub>4</sub>	↑	/	↓
SOCE	↓	↑	↓
NO-cGMP	↓	↓	↓

- ↑: 伸展刺激による ATP 分泌を促進
- ↓: 伸展刺激による ATP 分泌を抑制
- →: 伸展刺激による ATP 分泌に効果なし
- /: 存在せず
- SOCE: 貯蔵量作動性  $Ca^{2+}$  流入

### (4) 内臓知覚過敏モデル動物における ATP 分泌の変容

大腸菌由来のリポ多糖をマウス膀胱粘膜側に投与すると、伸展刺激を与えなくても膀胱上皮からの ATP 分泌が引き起こされることを示した。リポ多糖を膀胱内に投与すると膀胱炎様の頻尿が誘発されるが、ATP 受容体である P2X<sub>2</sub> または P2X<sub>3</sub> 遺伝子欠損マウスではリポ多糖投与による頻尿は生じなかった。この結果は、リポ多糖による ATP 分泌過多が膀胱の内臓知覚過敏を誘発し、その結果として頻尿が発生することを示唆している。

また、直腸の内臓知覚過敏を呈する Wistar

Kyoto ラットでは、直腸に高い圧刺激を加えたときにのみ ATP 分泌量がコントロール動物と比較して増加する傾向が認められた。

上記(1)~(4)の結果から、管腔臓器粘膜上皮からの ATP は特に病的な内臓知覚伝達に関与していること、NO-cGMP 経路は膀胱、食道、直腸上皮からの ATP 分泌を全て抑制し、併発する割合の高い内臓知覚過敏を呈する疾患群に対する共通の創薬ターゲットとなりうること、の 2 点を明らかとした。

## 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 7 件)

Matsumoto-Miyai K, Yamada E, Shinzawa E, Koyama Y, Shimada S, Yoshizumi M, and Kawatani M. Serotonergic regulation of distention-induced ATP release from the urothelium. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 310: F646-F655, 2016. 査読有.

Takezawa K, Kondo M, Kiuchi H, Ueda N, Soda T, Fukuhara S, Takao T, Miyagawa Y, Tsujimura A, Matsumoto-Miyai K, Ishida Y, Negoro H, Ogawa O, Nonomura N, and Shimada S. Authentic role of ATP signaling in micturition reflex. *Sci. Rep.*, 6: 19585, 2016. 査読有.

Matsumoto-Miyai K, Yoshizumi M, and Kawatani M. Regulatory effects of 5-hydroxytryptamine receptors on voiding function. *Adv. Ther.*, 32: S3-S15, 2015. 査読有.

Kudo D, Miyakoshi N, Hongo M, Matsumoto-Miyai K, Kasukawa Y, Misawa A, Ishikawa Y, and Shimada Y. Nerve growth factor and estrogen receptor mRNA expression in paravertebral muscles of patients with adolescent idiopathic scoliosis: a preliminary study. *Spine Deform.*, 3: 122-127, 2015. 査読有.

Sonderegger P and Matsumoto-Miyai K. Activity-controlled proteolytic cleavage at the synapse. *Trends Neurosci.*, 37: 413-423, 2014. 査読有.

Fukiya Y, Yoshizumi M, Saito M, Matsumoto-Miyai K, Nimura T, and Kawatani M. Synergistic effects of loxoprofen and glycine on the micturition reflex in conscious rats. *Biomed. Res.*, 35: 17-23, 2014. 査読有.

河谷正仁, 松本-宮井和政, 善積克. 膀胱の自律神経支配. 臨床神経科学, 32, 1363-1365, 2014. 査読無.

〔学会発表〕(計7件)

竹澤健太郎, 上田倫央, 惣田哲次, 福原慎一郎, 木内寛, 宮川康, 高尾徹也, 辻村晃, 根来宏光, 松本-宮井和政, 近藤誠, 島田昌一, 野々村祝夫. 膀胱 ATP シグナル伝達の生理的・病的意義の検討. 第22回日本排尿機能学会, 2015年9月11日, 札幌, 北海道.

Takezawa K, Kondo M, Kiuchi H, Soda T, Fukuhara S, Takao T, Miyagawa Y, Tsujimura A, Matsumoto-Miyai K, Shimada S, and Nonomura N. A new mechanism of infection-induced bladder hyperactivity: lipopolysaccharide causes rapid ATP release from urothelium and stimulates the mechanosensory afferent pathway. The 2015 AUA Annual Meeting (AUA2015), 2015年5月15日, New Orleans, USA.

竹澤健太郎, 惣田哲次, 福原慎一郎, 木内寛, 高尾徹也, 宮川康, 辻村晃, 近藤誠, 松本-宮井和政, 島田昌一, 野々村祝夫. 細菌性膀胱炎における膀胱知覚亢進の新機構 - LPS は炎症とは独立して膀胱上皮の ATP 放出を惹起し P2X 受容体を介して mechanosensitive afferent を活性化する. 第103回日本泌尿器科学会総会, 2015年4月18日, 金沢, 石川.

Takezawa K, Kondo M, Kiuchi H, Soda T, Fukuhara S, Takao T, Miyagawa Y, Tsujimura A, Matsumoto-Miyai K, Shimada S, and Nonomura N (2015). A novel mechanism of infection-induced bladder hyperactivity: LPS causes rapid urothelial ATP release and stimulates the mechanosensory afferent pathway. 30th Annual EAU Congress (EAU15), 2015年3月23日, Madrid, Spain.

Yoshizumi M, Matsumoto-Miyai K, and Kawatani M. Inhibitory effects of loxoprofen and glycine on the micturition reflex in conscious rats, 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2014), 2014年11月17日, Washington DC, USA.

善積克, 松本-宮井和政, 河谷正仁. 覚醒下ラットにおけるロキソプロフェン及びグリシンの排尿機能抑制効果と併用投与による効果. 第21回日本排尿機能学会,

2014年9月18日, 岡山, 岡山.

吹谷由美子, 善積克, 松本-宮井和政, 河谷正仁. 覚醒下ラットにおけるロキソプロフェン及びグリシン併用投与による排尿機能抑制の相乗効果. 第102回日本泌尿器科学会総会, 2014年4月25日, 神戸, 兵庫.

〔図書〕(計3件)

松本-宮井和政, 河谷正仁. 内臓痛. 痛み of Science & Practice シリーズ第6巻: 痛み診療キーポイント(川真樹人編集), 文光堂, 東京, 264 (54-54), 2014.

松本-宮井和政, 河谷正仁. 関連痛. 痛み of Science & Practice シリーズ第6巻: 痛み診療キーポイント(川真樹人編集), 文光堂, 東京, 264 (55-55), 2014.

松本-宮井和政, 河谷正仁. 臨床オリエンテッド下部尿路の解剖と生理. 神経因性膀胱ベッドサイドマニュアル(榊原隆次編集), 中外医学社, 東京, 297 (9-20), 2014.

〔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  
宮井 和政 (MIYAI, Kazumasa)  
大阪府立大学・総合リハビリテーション学  
研究科・教授  
研究者番号: 60283933

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
河谷 正仁 (KAWATANI, Masahito)  
善積 克 (YOSHIZUMI, Masaru)  
島田 昌一 (SHIMADA, Shoichi)