

令和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18609

研究課題名(和文)尿中細菌叢を治療ターゲットとした過活動膀胱の根治治療の探索

研究課題名(英文)Development of a radical treatment for overactive bladder focused on urinary microbiota

研究代表者

上田 倫央(Ueda, Norichika)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：40759528

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)：急性膀胱炎モデルを用いて検討した結果、我々は膀胱尿路上皮が膀胱内腔のLPSをToll-like receptor 4で感知し、早期に神経伝達物質ATPを放出することを明らかにした。さらに、ATP受容体であるP2X2、P2X3のノックアウトマウスを用いて検討した結果、LPSが誘導する膀胱求心性神経を介した脊髄L6-S1神経細胞の活性化と、その結果生じる早期排尿反射の亢進にATPシグナルが重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで細菌性膀胱炎では膀胱組織に生じる炎症性変化が頻尿をきたすと一般的に考えられてきた。しかし、本研究では膀胱組織に炎症性変化が生じる前に、神経伝達物質ATPを介した神経シグナルが早期に頻尿をきたすことを明らかにした。この頻尿メカニズムは膀胱内の感染制御や恒常性の維持に重要な役割を果たしていると考えられる。また、この頻尿メカニズムは、尿意切迫感や頻尿をきたす過活動膀胱の新規治療ターゲットになる可能性を有している。

研究成果の概要(英文)：In this study, using a mouse model of acute bacterial cystitis, we demonstrate that the bladder urothelium senses luminal extracellular bacterial lipopolysaccharide (LPS) through Toll-like receptor 4 and releases the transmitter ATP. Moreover, analysis of purinergic P2X2 and P2X3 receptor-deficient mice indicated that ATP signaling plays a pivotal role in the LPS-induced activation of L6-S1 spinal neurons through the bladder afferent pathway, resulting in rapid onset of the enhanced micturition reflex.

研究分野：排尿生理

キーワード：ATP LPS 排尿反射

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまで尿は無菌であると認識されてきたが、細菌検査技術の発展によって尿中には従来の検査方法では検出できない細菌が細菌叢を形成していることが明らかになった。そして、過活動膀胱患者の尿中には健常者とは異なった細菌叢が形成されていることが報告され、この細菌叢が過活動膀胱の発症に関与している可能性が示唆されている。しかし、一般的に膀胱内の細菌は自然免疫を介した炎症性変化を膀胱に生じさせて頻尿をきたすと考えられており、膀胱に炎症性変化が伴わない過活動膀胱の病態にどのように関与しているかは不明である。我々は先行実験において、マウスの膀胱は大腸菌の外膜成分である LPS に暴露されると早期に炎症性変化をきたさずに頻尿を引き起こすことを見出した。この結果は従来の炎症を介したメカニズムとは異なる新たな頻尿メカニズムが存在することを示唆しており、過活動膀胱の発症に関与している可能性がある。

### 2. 研究の目的

細菌暴露された膀胱が炎症性変化を介さずに頻尿を生じさせるメカニズムを解明し、過活動膀胱の新規治療法を探索することを目的とした。

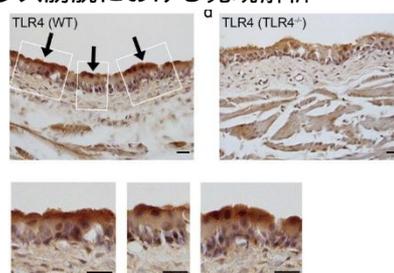
### 3. 研究の方法

- (1) LPS の受容体である Toll-like receptor 4 (TLR4) のマウス膀胱における発現解析
- (2) TLR4 アンタゴニストを用いた LPS 膀胱還流の排尿機能評価
- (3) LPS 暴露によって尿路上皮から放出されるメディエーター (ATP) の解析
- (4) LPS の膀胱暴露による膀胱求心性神経の活性化の解析
- (5) LPS 膀胱暴露によって尿路上皮から放出されるメディエーター (ATP) 抑制下での LPS による排尿機能評価

### 4. 研究成果

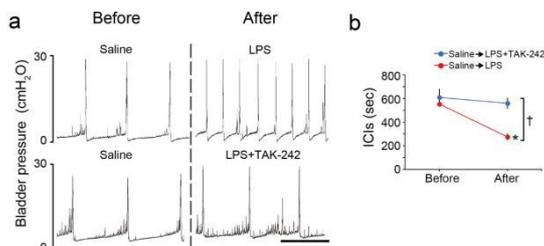
(1) LPS の受容体である Toll-like receptor 4 (TLR4) のマウス膀胱における発現解析

LPS の受容体は Toll-like receptor 4 (TLR4) であることが明らかにされており、TLR4 がこの頻尿のメカニズムに関与している可能性がある。そこで、マウス膀胱における TLR4 の発現解析を行った。その結果、蛍光免疫染色にて TLR4 はマウス膀胱尿路上皮に発現しており、その中でも、最内腔側である umbrella cell に発現していた。この結果から、膀胱尿路上皮の umbrella cell は膀胱内腔に存在する大腸菌 LPS を感知し、なんらかの作用を有している可能性が示唆された。



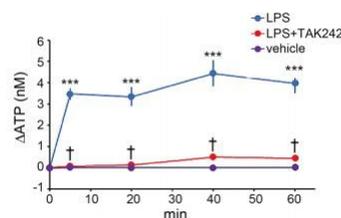
(2) TLR4 アンタゴニストを用いた LPS 膀胱還流の排尿機能評価

TLR4 が LPS の膀胱還流によって生じる頻尿に関与しているかどうか検証するために、LPS と同時に TLR4 のアンタゴニスト (TAK-242) を膀胱還流し、排尿機能評価を行った。LPS 単独膀胱還流群では排尿間隔は有意に短縮したが、LPS と TLR4 のアンタゴニストを同時に膀胱還流した群では、排尿間隔の短縮は LPS 単独投与群と比較し有意に減弱していた。この結果から、膀胱尿路上皮の umbrella cell に発現している TLR4 は、LPS によって誘導される頻尿に関与していることが示唆された。



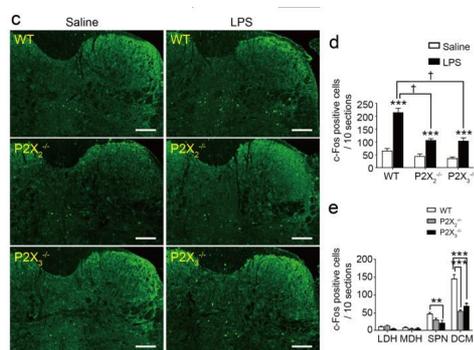
(3) LPS 暴露によって尿路上皮から放出されるメディエーターの解析

過去の報告より、ATP が排尿反射に重要な働きをしていることが示唆されている。ウッシングチャンバーを用いて、摘出したマウス膀胱に LPS を暴露させ、尿路上皮から放出される ATP を測定した。さらに LPS に TAK-242 を追加投与し、ATP の放出量を比較検討した。その結果、LPS 暴露により ATP が早期に放出され、その放出量は TAK-242 により有意に抑制された。



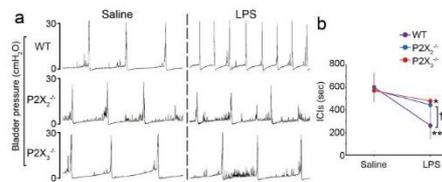
(4) LPS の膀胱暴露による膀胱求心性神経の活性化の解析

マウスでは主に L6-S1 の脊髄神経細胞が膀胱からの求心性入力を受容している。脊髄後角では、興奮性の求心性神経入力に c-Fos を発現させるため、c-Fos の発現を神経活動マーカーとして評価した。LPS を膀胱還流させると L6-S1 の c-Fos 発現細胞数が増加した。続いて LPS が誘導する脊髄神経細胞の活性化に ATP シグナルが関与しているか調べるために ATP 受容体のノックアウトマウス (P2X2<sup>-/-</sup>、P2X3<sup>-/-</sup>) を用いて、c-Fos 陽性細胞数を評価した。LPS 膀胱還流で生じた c-Fos 陽性細胞数の増加は ATP 受容体ノックアウトマウスでは抑制された。この結果から、ATP 受容体を介した ATP シグナルは LPS 膀胱還流による脊髄 L6-S1 の脊髄神経細胞の活性化に重要な役割を果たしていることが示唆された。



( 5 ) LPS 膀胱暴露によって尿路上皮から放出されるメディエーター (ATP) 抑制下での LPS による排尿機能評価

ATP 受容体ノックアウトマウスを用いて LPS 膀胱還流による排尿機能評価を行った。LPS 膀胱還流で生じた排尿間隔の短縮が ATP 受容体ノックアウトマウスでは抑制された。



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 Ueda Norichika, Kondo Makoto, Takezawa Kentaro, Kiuchi Hiroshi, Sekii Yosuke, Inagaki Yusuke, Soda Tetsuji, Fukuhara Shinichiro, Fujita Kazutoshi, Uemura Motohide, Imamura Ryoichi, Miyagawa Yasushi, Nonomura Norio, Shimada Shoichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Bladder urothelium converts bacterial lipopolysaccharide information into neural signaling via an ATP-mediated pathway to enhance the micturition reflex for rapid defense	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-78398-9	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上田倫央、近藤誠、竹澤健太郎、木内寛、関井洋輔、稲垣裕介、福原慎一郎、島田昌一、野々村祝夫
2. 発表標題 大腸菌暴露によって誘導される膀胱の早期生体防御反応：膀胱尿路上皮におけるToll-like receptor4-ATP pathwayで細菌を排除する
3. 学会等名 第26回日本排尿機能学会（招待講演）
4. 発表年 2019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
---------	---------