

令和元年5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11039

研究課題名(和文)膀胱知覚受容機構の解明とその応用に基づく新規治療標的の探索

研究課題名(英文) Searching for new therapeutic targets based on the understanding of bladder sensory mechanisms

研究代表者

井川 靖彦 (Igawa, Yasuhiko)

東京大学・医学部附属病院・特任教授

研究者番号：40159588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱知覚伝達路に局在する各種TRPイオンチャネル・受容体のうち、特にTRPA1、TRPM2、TRPM8、TLR7に着目し、膀胱の炎症性知覚亢進への関与を検討した。その結果、TRPM2及びTLR7は炎症発現に関与するのに対して、TRPA1及びTRPM8は膀胱の炎症性知覚過敏に関与することが示された。加えて、下部尿路閉塞による過活動膀胱ラットモデルでは、膀胱微小収縮に同期して膀胱求心性神経活動が増強すること、並びに、選択的1A阻害薬であるsilodosin及びPDE5阻害薬であるtadalafilは、膀胱微小収縮に同期して増強する膀胱求心性神経活動を抑制する効果があ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

間質性膀胱炎(IC)は、治療法が確立されていない難治性疾患である。本研究では、膀胱の知覚伝達路に局在する感覚受容体であるTRPイオンチャネル及び免疫機構に関与するTLRに着目し、膀胱炎症性疼痛への関与を検討した結果、TRPA1、TRPM2、TRPM8、及びTLR7がICの炎症性膀胱知覚亢進の新規治療標的として期待しうることが示唆された。

今回のラットでの実験結果から、前立腺肥大症による過活動膀胱の発生機序として、膀胱微小収縮に伴う膀胱知覚神経活動の亢進が関与すること、並びに臨床上使用される1A阻害薬及びPDE5阻害薬はこの膀胱知覚神経活動の亢進を抑制して効果を発現することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Among the TRP ion channels and receptors expressed in the bladder sensory pathways, functional roles of TRPA1, TRPM2, TRPM8, and TLR7 in the development of inflammatory bladder hypersensitivity were evaluated. The results suggest that TRPM2 and TLR7 are involved in bladder inflammation itself, while TRPA1 and TRPM8 participate in inflammation-induced bladder afferent hyperactivity. In a rat model of overactive bladder (OAB) induced by bladder outlet obstruction (BOO), we found that bladder mechanosensitive afferent activities are enhanced in accordance with bladder microcontractions, and also that both silodosin, an 1A blocker, and tadalafil, a PDE5 inhibitor can inhibit the enhanced afferent activities.

研究分野：泌尿器科学、薬理学、神経生理学

キーワード：過活動膀胱 膀胱知覚 膀胱痛 TRPチャネル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

過活動膀胱による畜尿障害と排尿筋低活動（膀胱収縮不全）による尿排出障害は、加齢とともにその罹病率が増加する高齢者における代表的な膀胱機能障害である。超高齢化社会が進むわが国においてはこれらの病態の解明と治療法の確立は急務と考える。過活動膀胱に対しては、抗ムスカリン薬並びに 3 作動薬による薬物療法が行われているが治療に反応しない難治性患者も約 30%と少なくない。一方、排尿筋低活動に対する薬物療法で有効性が確認されているものは皆無である (J Urol. 2010; 184(5):1829-30)。このような背景から、過活動膀胱ならびに排尿筋低活動に対して、より侵襲が少なく、効果的な治療法を開発することが強く望まれている。最近の研究では、尿路上皮は膀胱の充満に伴う伸展刺激や酸などの化学的的刺激に対して、ATP やアセチルコリンなどの伝達物質を遊離し、これらの伝達物質が、尿路上皮下に存在する求心性神経や間質細胞に作用することによって、膀胱尿路上皮・求心性神経伝達系を形成して膀胱知覚伝達に重要な役割を演じていることが判ってきた (Nat Rev Neurosci. 2008;9:453-6; Auton Neurosci. 2010;153:33-40)。また、膀胱充満時の膀胱部痛を主症状とする難治性蓄尿障害である間質性膀胱炎は、未だその病態生理について不明なところが多く、治療法も確立されていないが、過活動膀胱と同様に、膀胱尿路上皮・求心性神経伝達系がその病因の首座を占め、その治療標的となりうるということが想定されている (Neurourol Urodyn. 2010;29: 97-106)。このように、過活動膀胱や間質性膀胱炎に代表される膀胱蓄尿機能障害の発症機序として、膀胱知覚受容機構の異常亢進が注目されており、さらに排尿筋低活動においても、その原因として膀胱知覚受容機構の障害が重要視されている。

Transient receptor potential (TRP) ファミリーは知覚受容器として注目されているが、その中でも、TRPV1, V2, V4, M2, M4, M7, M8, A1 は膀胱尿路上皮または求心性神経に発現しており、膀胱知覚受容機構に関与する可能性が示唆されている (Eur Urol. 2008;54:612-20; Am J Physiol Renal Physiol. 2010;298: F692-701; Am J Physiol Renal Physiol. 2013;304:F918-29)。我々は、潰瘍型間質性膀胱炎患者の膀胱粘膜組織における遺伝子変化を網羅的にマイクロアレイ法にて解析した結果、CXCL9-11、TNFSF14 などの炎症性サイトカインの関与が強いことを報告した (J Urol. 2010;183(3):1206-12)。さらに最近、潰瘍型間質性膀胱炎患者の膀胱粘膜組織において、TRP A1, V1, V2, A1, M2 の mRNA 発現が有意に増加しており、特に TRPM2 において顕著であることも明らかにした (J Urol. 2013;190(5):1925-31)。さらに TRPM8 チャンネルが膀胱伸展受容に促進性に働くことを報告した (BJU Int. 2016;117(3):484-94)。

### 2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では、主に膀胱知覚伝達路に局在する各種 TRP イオンチャネル並びに受容体に着目して、それらの膀胱知覚機能における役割と各種病態における変化を解明し、その結果を基に膀胱機能障害の新規治療標的の探索・同定を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 下部尿路閉塞 (B00) による過活動膀胱 (OAB) 雄性ラットモデルを用いて、*in vivo* 膀胱求心性神経活動測定を行い、その膀胱求心性神経活動の特徴を解析した。さらに、B00/OAB モデルラットに選択的 1A 阻害薬である silodosin または PDE5 阻害薬である tadalafil を慢性投与し、膀胱求心性神経活動への効果を評価した。

(2) TRPM2 ノックアウト (KO) マウス及び TRPA1KO マウスを用いて、下部尿路機能の表現型を、精密排尿行動記録法、覚醒下除脳膀胱内圧測定法、膀胱排尿筋条片の収縮機能実験を用い

て評価した。さらに、膀胱内に lipopolysaccharide(LPS)を注入して誘発される膀胱の急性炎症とそれに伴う頻尿・膀胱痛様反応がどのように修飾されるかを検討した。

(3) ハンナ型間質性膀胱炎(HIC)患者の膀胱粘膜生検標本を用いて、Toll-like receptor 7(TLR7)の発現をRT-PCR法および免疫染色法で評価した。さらに、TLR7刺激薬であるLoxoribineをマウスの膀胱内に注入し、膀胱の炎症反応とそれに伴う頻尿・膀胱痛様行動が惹起されるか否かを検討した。

(4) 選択的TRPM8阻害薬であるKPR-2579が酢酸膀胱内注入によって誘発される膀胱伸展刺激受容求心性神経活動の亢進に対して抑制効果を示すか否かを検討した。さらに、別の選択的TRPM8阻害薬であるRQ-00434739が、プロスタグランジンE2の膀胱内注入によって誘発される膀胱伸展刺激受容求心性神経活動の亢進に対して抑制効果を示すか否かを検討した。

#### 4. 研究成果

(1) B00/OABラットにおいて、膀胱伸展刺激受容求心性神経活動(SAA)は、A $\delta$ 線維の活動が低下しており、かつ、膀胱の微小収縮(microcontraction)に同期して、A $\delta$ 線維、C線維ともに間欠的にその活動性が増強することが確認できた(主な発表論文 雑誌論文)。さらに、B00/OABモデルラットに選択的1A阻害薬であるsilodosinを慢性投与すると、膀胱の微小収縮自体は抑制しなかったが、微小収縮に同期して増強する両線維(A $\delta$ 線維とC線維)の活動を抑制することを明らかにした(主な発表論文 雑誌論文)。他方、B00/OABモデルラットにtadalafilを慢性投与した場合には、膀胱の微小収縮自体は抑制しなかったが、微小収縮に同期して増強するC線維の活動を抑制することを明らかにした(主な発表論文 学会発表)。

(2) TRPM2KOマウス及びTRPA1KOマウスはともに、精密排尿行動記録法、覚醒下除脳膀胱内圧測定法、膀胱排尿筋条片の収縮機能実験のいずれにおいても、対照群である野生型マウスとの有意な差を認めなかったことから、TRPM2及びTRPA1はいずれも膀胱の生理的機能調節には関与しないことが示唆された。他方、LPS膀胱内注入では、野生型に比べて、いずれのKOマウスも、頻尿や膀胱痛様行動が誘発されにくく、TRPM2KOマウスでは膀胱炎症所見も軽微であった。以上から、TRPM2は炎症発現に、TRPA1は膀胱の炎症性知覚過敏に関与することが示唆された(主な発表論文 雑誌論文、学会発表)。

(3) ハンナ型間質性膀胱炎(HIC)患者の膀胱粘膜生検標本では、TLR7の発現が増強していることを明らかにし、TLR7刺激薬であるLoxoribineをマウスの膀胱内に注入すると、膀胱炎とそれに伴う頻尿・膀胱痛様行動が惹起され、TLR7拮抗薬であるHydroxychloroquineを前投与するとこれらの反応は抑制されることを示した。TLR7拮抗薬はHICの新規治療薬候補として期待しうることを示した(主な発表論文 雑誌論文)。

(4) 選択的TRPM8阻害薬であるKPR-2579は、低体温を誘発しない用量で、酢酸の膀胱内注入によって誘発される頻尿および膀胱伸展刺激受容C線維の病的活動亢進を抑制しうることを明らかにした(主な発表論文 雑誌論文)。さらに、別の選択的TRPM8阻害薬であるRQ-00434739もKPR-2579と同様に、低体温を誘発しない用量で、プロスタグランジンE2の膀胱内注入によって誘発される頻尿および膀胱伸展刺激受容C線維の病的活動亢進を抑制しうることを明らかにした(主な発表論文 雑誌論文)。以上の結果から、選択的TRPM8阻害薬は膀胱知覚過敏に対する治療薬の候補となることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計35件)

Aizawa Naoki, Ohshiro Hiroyuki, Watanabe Shuzo, Kume Haruki, Homma Yukio, Igawa Yasuhiko,

RQ-00434739, a novel TRPM8 antagonist, inhibits prostaglandin E2-induced hyperactivity of the primary bladder afferent nerves in rats, *Life Sciences*, 査読有, Vol.218, 2019, pp.89-95, DOI:10.1016/j.lfs.2018.12.031

Kamei Jun, Aizawa Naoki, Nakagawa Takayuki, Kaneko Shuji, Kume Haruki, Homma Yukio, Igawa Yasuhiko, Attenuated lipopolysaccharide-induced inflammatory bladder hypersensitivity in mice deficient of transient receptor potential ankinin 1, *Scientific Reports*, 査読有, Vol.8(1), 2018, pp. 15622, DOI:10.1038/s41598-018-33967-x

Aizawa Naoki, Watanabe Daiji, Fukuhara Hiroshi, Fujimura Tetsuya, Kume Haruki, Homma Yukio, Igawa Yasuhiko, Inhibitory effects of silodosin on the bladder mechanosensitive afferent activities and their relation with bladder myogenic contractions in male rats with bladder outlet obstruction, *NeuroUrol Urodyn*, 査読有, Vol.37(6), 2018, pp.1897-1903, DOI:10.1002/nau.23547

Aizawa Naoki, Fujimori Yoshikazu, Kobayashi Jun-ichi, Nakanishi Osamu, Hirasawa Hideaki, Kume Haruki, Homma Yukio, Igawa Yasuhiko, KPR-2579, a novel TRPM8 antagonist, inhibits acetic acid-induced bladder afferent hyperactivity in rats, *Neurourology and Urodynamics*, 査読有, Vol.37(5), 2018, 1633-1640, DOI:10.1002/nau.23532

Ichihara Koji, Aizawa Naoki, Akiyama Yoshiyuki, Kamei Jun, Masumori Naoya, Andersson Karl-Erik, Homma Yukio, Igawa Yasuhiko, Toll-like receptor 7 is overexpressed in the bladder of Hunner-type interstitial cystitis, and its activation in the mouse bladder can induce cystitis and bladder pain, *Pain*, 査読有, Vol.158(8), 2017, pp.1538-1545, DOI:10.1097/j.pain.0000000000000947

Aizawa Naoki, Ichihara Koji, Fukuhara Hiroshi, Fujimura Tetsuya, Andersson Karl-Erik, Homma Yukio, Igawa Yasuhiko, Characteristics of the mechanosensitive bladder afferent activities in relation with microcontractions in male rats with bladder outlet obstruction, *Sci Rep*, 査読有, Vol.7(1), 2017, pp.7646, DOI:10.1038/s41598-017-07898-y

#### [学会発表](計 38 件)

Aizawa N, Fukuhara H, Fujimura T, Homma Y, Igawa Y: Effects of tadalafil, a PDE type 5 inhibitor, on the bladder mechanosensitive afferent activities related to microcontractions in male rats with bladder outlet obstruction. The 47th International Continence Society (ICS) Annual meeting (国際学会), 2017 年

Kamei J, Aizawa N, Nakagawa T, Akiyama Y, Kaneko S, Homma Y, Igawa Y: TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL MELASTATIN 2 (TRPM2) MEDIATES LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS)-INDUCED INFRAMMATORY BLADDER PAIN AND FREQUENT VOIDING IN MICE. The 46th International Continence Society (ICS) annual meeting (国際学会), 2016 年

#### [その他]

ホームページ等

<http://cont-med.umin.jp/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：本間 之夫

ローマ字氏名：(HOMMA, yukio)

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：登録診療員

研究者番号(8桁)：40165626

研究分担者氏名：宮崎 英世

ローマ字氏名：(MIYAZAKI, hideyo)

所属研究機関名：帝京大学

部局名：医学部附属病院

職名：准教授

研究者番号(8桁)：80323666

研究分担者氏名：相澤 直樹

ローマ字氏名：(AIZAWA, naoki)

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：特任講師

研究者番号(8桁): 80595257