

令和元年5月30日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11042

研究課題名(和文) 蓄尿制御分子としての代謝型グルタミン酸受容体と酸感受性イオンチャネルの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the metabotropic glutamate receptor and the acid-sensitive ion channels as a urine collection control molecule

研究代表者

芳山 充晴 (YOSHIYAMA, Mitsuharu)

山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員

研究者番号：20422694

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)：マウスの下部尿路機能制御において、代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)サブタイプ1、及び、5が膀胱からの興奮性求心性信号伝達に關与すること、そして、その表現型に雌雄差があることを、同受容体遺伝子欠損(KO)マウスとmGluR5拮抗薬を用いて明らかにした。更に、酸感受性イオンチャネル(ASICs)が正常排尿と酸誘発性膀胱過活動の両方において興奮性求心性信号変換に關与することを示した。本研究の結果は、mGluR1、mGluR5、ASICsが下部尿路機能障害、特に頻尿の治療薬開発の標的分子になり得ることを示しており、同症状に苦しむ人々の生活の質改善と社会的生産性向上に寄与するであろう。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膀胱過活動症状はヒトの日常生活の質と生産活動性を著しく低下させる。故に、その発症機構の解明と治療法の開発は、同症状による損失を回避する上で重要である。本研究は、膀胱からの興奮性求心性信号伝達に代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)と酸感受性イオンチャネル(ASICs)が關与することを解明した。一方、このmGluR關与の程度には雌雄差があることも明らかにした。この結果は、標的分子の表現型に性差がある可能性を念頭に研究を実施すべきであることを示唆する。近年、医学研究において、遺伝子關連の表現型や薬物療法への反応性に性別を考慮することの重要性が提唱されており、本研究結果はそれに同調する。

研究成果の概要(英文)：The study using metabotropic glutamate receptor subtype 1 (mGluR1) gene deficit (KO) mice and mGluR5 antagonist revealed that mGluR1 and mGluR5 are involved in excitatory afferent signal transmission from the bladder in control of lower urinary tract (LUT) function and that the mGluR phenotype has a sex difference in the LUT function. Moreover, another study showed that acid-sensing ion channels (ASICs) are associated with excitatory afferent signal transduction in acid-induced bladder hyperreflexia as well as normal bladder activity. The present studies show that mGluR1, mGluR5 and ASICs can be target molecules for development of pharmacotherapy of lower urinary tract dysfunction such as bladder overactivity and thus these results would contribute to ameliorating a quality of life of patients who suffer from such dysfunction and to improving social productivity.

研究分野：神経泌尿器科

キーワード：マウス 代謝型グルタミン酸受容体 酸感受性イオンチャネル 下部尿路機能 膀胱 尿道 中枢神経 末梢神経

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 過活動膀胱とは、尿意切迫感を必須症状とし、通常は夜間頻尿と頻尿を伴う症状症候群である。原因となる疾患は、神経因性而非神経因性から多岐にわたる。更に、尿意切迫感(尿意亢進・頻尿)に加え膀胱痛を呈する病態は膀胱痛症候群に分類され、ヒトの日常生活の質、社会的生産性を著しく低下させる。

(2) 代謝型グルタミン酸受容体(metabotropic glutamate receptor)、acid-sensing ion channels (ASICs)の遺伝子が膀胱からの求心性信号伝達経路に発現していることから、これら分子が膀胱機能制御に関与していることが推察される。蓄尿期の膀胱知覚伝達に関わる分子を標的とした研究は、過活動膀胱や膀胱痛症といった下部尿路症状を改善する治療法開発へ発展する。

2. 研究の目的

(1) 代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)サブタイプ1と5は、膀胱求心路の後根神経節、脊髄後角に多く発現する。mGluRは様々な生理機能と疼痛・異常知覚を含む病態形成に関与していることから、膀胱知覚求心路における信号伝達においても機能的役割を持つことが推察される。本研究では、同受容体が膀胱知覚伝達制御に関与することを明らかにする。

(2) 膀胱上皮、排尿筋、膀胱後根神経節に遺伝子が発現しているASICsは、生体内において知覚受容器として機能している。本研究では、ASICsの、正常または病態(例えば、侵害性刺激誘発膀胱過活動)における機能的役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウスの膀胱、L6/S1後根神経節、L6/S1脊髄分節、脳幹におけるmGluR1、mGluR5、ASIC1、ASIC2、ASIC3の遺伝子発現を定量的に測定する。ウエスタン・プロテイング法でこれら蛋白質発現を確認し、免疫組織学的染色法を用いて脳幹、脊髄、後根神経節、膀胱における局在を同定する。

(2) 正常、及び病的下部尿路活動(膀胱内侵害性刺激誘発頻尿、等)におけるmGluR1、mGluR5、ASICsの関与を明らかにし、これらの機能的役割を解明する。薬理学的手法を軸に、現有のmGluR1遺伝子欠損マウスも活用する。我々が確立した*in vivo*下部尿路機能評価法(自発排尿行動と無麻酔下反射排尿の二重解析法)を用いて、薬理学的研究を実施する。

4. 研究成果

(1) Real time RT-PCR法を用いmGluR1とmGluR5の遺伝子発現定量測定を行った。mGluR1とmGluR5共に下部尿路末梢臓器には全く存在せず、後根神経節(DRG)に極少量存在するのみ。一方、中枢神経系には多く発現していた(GluR1: L6/S1脊髄<橋<中脳; GluR5: 橋<L6/S1脊髄<中脳)。

(2) 下部尿路機能に対するmGluR5拮抗薬2-Methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) []の効果を調べた。シストメトリー検査において、vehicle投与群とMPEP投与群の間で排尿量(VV)、排尿後残尿量(RV)、膀胱容量閾値(VT)、排尿効率(VE)を比較した(Table 1)。MPEP投与群では、

vehicle 投与群に比し、排尿量(VV)と膀胱容量閾値(VT)が著しく増加していた。

Table 1 Effects of MPEP 30 mg/kg i.p. on storage and voiding functions in mice

	Female				Male			
	VV (μ l)	RV (μ l)	VT (μ l)	VE (%)	VV (μ l)	RV (μ l)	VT (μ l)	VE (%)
Vehicle	156 \pm 27	6 \pm 2	162 \pm 28	97 \pm 1	94 \pm 16	7 \pm 2	101 \pm 18	93 \pm 1
MPEP	226 \pm 11*	6 \pm 1	232 \pm 11*	97 \pm 0	172 \pm 19*	7 \pm 2	179 \pm 20*	96 \pm 1

* $P < 0.05$, statistical difference from vehicle (by Mann-Whitney test).

(3) mGluR1 遺伝子欠損マウス(KO)と野生型(WT)の下部尿路機能を比較し、mGluR1 の機能的役割を検討した。代謝ケージを用いた覚醒下自発排尿行動評価：雌において、KOは野生型(WT)と比べ、有意に一回排尿量が多く(79.3%増)、一日排尿回数が少なかった(49.1%減)。しかし、一日飲水量、一日排尿量では、KOとWTに差が無かった。一方、雄では全ての検討項目でKOとWTに差が無かった。除脳無麻酔マウスにおける反射排尿シストメトリー検査：雌において、KOはWTと比べ、一回排尿量と排尿容量閾値が大きく(それぞれ、89.5%増と92.2%増)、排尿効率が低かった(3.5%減)。他方、雄では、KOがWTに比べて、有意に大きな排尿容量閾値(36.2%増)と低い排尿効率(4.0%減)を呈したものの、一回排尿量では差を示さなかった。以上の結果は、mGluR1 が膀胱からの興奮性求心性信号伝達に関与し、蓄尿期において重要であることを示す。一方、その関与の程度には性差があり、雄に比べて雌でmGluR1欠損の影響が顕著であった。これ故、研究実施にあたり調査対象分子の表現型に性差がある可能性を常に念頭に置く必要があると結論付ける。

(4) ASIC1、ASIC2、ASIC3 遺伝子発現量を膀胱粘膜、膀胱平滑筋、L6/S1 後根神経節における比較した。膀胱粘膜ではASIC1が他に比べ圧倒的に多く発現していた。一方、膀胱平滑筋ではASIC2が多く、これにASIC1発現が続いた。L6/S1 後根神経節ではASIC2が他に比べ圧倒的に多く、続いてASIC3とASIC1は同程度の量を発現していた。

(5) 下部尿路機能に対する非選択的ASIC阻害薬A-317567[]腹腔内投与の効果をシストメトリー法にて精査した。検討したパラメーター：排尿収縮圧閾値(PT)、最大排尿収縮圧(MVP)、膀胱コンプライアンス(BCP)、膀胱収縮時間(BCD)、排尿収縮間隔(ICI)をTable 2に示す。更に、希釈酢酸(pH 3)の膀胱内灌流により誘発された膀胱過活動に対するA-317567腹腔内投与の効果も調べた(Table 3)。結果は、通常の排尿、酸誘発性膀胱過活動状態の双方に対して、非選択的ASIC阻害薬A-317567腹腔内投与が蓄尿量を増加させることを示した。

Table 2 Effects of A-317567 on normal lower urinary tract activity

	PT (mmHg)	MVP (mmHg)	BCP (μ l/mmHg)	BCD (s)	ICI (s)
Before	5.9 \pm 0.6	22.6 \pm 1.8	37.7 \pm 2.8	26.1 \pm 2.3	313.0 \pm 26.5
After	19.1 \pm 5.4*	26.1 \pm 3.9	19.1 \pm 5.2*	40.7 \pm 8.9	398.9 \pm 39.7*

Table 3 Effects of A-317567 on A/A-induced bladder hyperreflexia

	PT (mmHg)	MVP (mmHg)	BCP (μ l/mmHg)	BCD (s)	ICI (s)

Before	3.9±0.3	15.7±1.8	16.5±1.7	20.3±4.0	79.2±9.1
After	4.8±0.4*	15.7±1.0	22.9±3.4*	15.8±1.0	134.9±12.0*

* $P < 0.05$, statistical difference from vehicle (by Mann-Whitney test).

(6) 下部尿路機能に対する非選択的 ASIC 阻害薬 A-317567 膀胱内灌流投与の効果調べた。A-317567 (100 μ M)を膀胱内灌流投与したところ、膀胱圧閾値(PT)、最大膀胱収縮圧(MVP)、膀胱コンプライアンス(BCP)は変化しなかった(Table 4)。この結果は、上述の A-317567 腹腔内投与(全身投与)で確認された膀胱容量増加効果が、中枢神経、又は、後根神経節への作用によるものだと示唆している(末梢臓器内のチャネルへの作用を否定)。

Table 4 Effect of intravesical perfusion of A-317567 on the bladder activity

	PT (mmHg)	MVP (mmHg)	BCP (μ l/mmHg)
Baseline	5.0±0.1	22.2±1.2	47.3±5.9
100 μ M	4.6±0.3	21.6±0.9	47.7±8.5

<引用文献>

Gasparini F, et al. *Neuropharmacology* 38:1493-1503, 1999.

Dubé GR, et al. *Pain* 117:88-96, 2005.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

Eser N,...Yoshiyama M(7番目)(他5名) The effect of *Ferula elaeochytris* root extract on erectile dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rat. *International Journal of Impotence Research*, 査読有, 2019. [DOI: [10.1038/s41443-019-0137-8](https://doi.org/10.1038/s41443-019-0137-8)]

Ihara T,...Yoshiyama M(12番目),...(他13名)The time-dependent variation of ATP release in mouse primary-cultured urothelial cells is regulated by the clock gene.

Neurourology and Urodynamics, 査読有, 37:2535-2543, 2018. [DOI: [10.1002/nau.23793](https://doi.org/10.1002/nau.23793)]

Ryu JC,...Yoshiyama M(13番目),...(他15名) Role of ProNGF-p75 signaling in loss of bladder function after spinal cord injury. *Journal of Clinical Investigation*, 査読有, 128:1772-1786, 2018. [DOI: [10.1172/JCI97837](https://doi.org/10.1172/JCI97837)]

Ihara T,...Yoshiyama M(13番目),...(他14名) The Circadian expression of *Piezo1*, *TRPV4*, *Connexin26*, and *VNUT*, associated with the expression levels of the clock genes in mouse primary cultured urothelial cells. *Neurourology and Urodynamics*, 査読有, 37:942-951, 2018. [DOI: [10.1002/nau.23400](https://doi.org/10.1002/nau.23400)]

Ihara T,...Yoshiyama M(13番目),...(他14名) The oscillation of intracellular Ca^{2+} influx associated with the circadian expression of *Piezo1* and *TRPV4* in the bladder urothelium. *Scientific Reports*, 査読有, 8:5699, 2018. [DOI: [10.1038/s41598-018-23115-w](https://doi.org/10.1038/s41598-018-23115-w)]

Kadekawa K,...Yoshiyama M(8番目),...(他8名) The role of capsaicin-sensitive C-fiber afferent pathways in the control of micturition in spinal intact and spinal cord injured mice. *American Journal of Physiology, Renal Physiology*, 査読有, 313:F796-F804, 2017. [DOI: [10.1152/ajprenal.00097.2017](https://doi.org/10.1152/ajprenal.00097.2017)]

Ihara T,...Yoshiyama M(12番目),...(他14名) The clock mutant mouse is a novel experimental model for nocturia and nocturnal polyuria. *Neurourology and Urodynamics*,

査読有, 36:1034-1038, 2017. [DOI: [10.1002/nau.23062](https://doi.org/10.1002/nau.23062)]

Kira S, Yoshiyama M(2番目),...(他8名) P2Y₆-deficiency increases micturition frequency and attenuates sustained contractility of the urinary bladder in mice. Scientific Reports, 査読有, 7:771, 2017. [DOI: [10.1038/s41598-017-00824-2](https://doi.org/10.1038/s41598-017-00824-2)]

Hattori T, Lluell P, Rouget C, Rekić M, Yoshiyama M. Ketanserin and naftopidil enhance the potentiating effect of alpha-methyl-serotonin on the neurally-induced contraction of human isolated urinary bladder muscle strips. International Neurourology Journal, 査読有, 21:20-28, 2017. [DOI: [10.5213/inj.1732758.379](https://doi.org/10.5213/inj.1732758.379)]

Ihara T,...Yoshiyama M(11番目),...(他13名) Clock genes regulate the circadian expression of Piezo1, TRPV4, Connexin26, and VNUT in an ex vivo mouse bladder mucosa. PLoS One, 査読有, 12(1):e0168234, 2017. [DOI: [10.1371/journal.pone.0168234](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168234)]

Palea S,... Yoshiyama M(9番目)(他7名) Netupitant, a potent and highly selective NK1 receptor antagonist, alleviates acetic acid-induced bladder overactivity in anesthetized guinea-pigs. Frontiers in Pharmacology, 査読有, 7:234, 2016. [DOI: [10.3389/fphar.2016.00234](https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00234)]

Nakagomi H, Yoshiyama M(2番目),...(他21名) Urothelial ATP exocytosis: regulation of bladder compliance in the urine storage phase. Scientific Reports, 査読有, 6:29761, 2016. [DOI: [10.1038/srep29761](https://doi.org/10.1038/srep29761)]

Kadekawa K, ... Yoshiyama M(10番目) (他8名) Characterization of bladder and external urethral activity in mice with or without spinal cord injury - a comparison study with rats. American Journal of Physiology, Regulatory Integrative Comparative Physiology, 査読有, 310:R752-R758, 2016. [DOI: [10.1152/ajpregu.00450.2015](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00450.2015)]

〔学会発表〕(計 15 件)

芳山 充晴、他 . マウス下部尿路機能制御において性別は代謝型グルタミン酸受容体サブタイプ1表現型へ有意に影響する . 第25回日本排尿機能学会、2018年 .

Yoshiyama M, et al. The sex influences metabotropic glutamate receptor subtype 1 phenotype in control of lower urinary tract activity. International Continence Society 48th Annual meeting, 2018.

Yoshiyama M, et al. Metabotropic glutamate receptor subtypes 1 and 5 are necessary for synergic activity of bladder and external urethral sphincter in mice with spinal cord injury. The 33rd Annual Congress of the European Association of Urology, 2018.

芳山 充晴、他 . 代謝型グルタミン酸受容体経路遮断は完全脊髄損傷マウスの排尿機能不全を増悪する . 第24回日本排尿機能学会、2017年 .

Yoshiyama M, et al. Blockade of metabotropic glutamatergic pathways worsens voiding dysfunction in mice with chronically-transected spinal cord. International Continence Society 47th Annual meeting, 2017.

Ihara T, et al. Effect of restraint stress on alternation of circadian bladder function to induce nocturia. International Continence Society 47th Annual meeting, 2017.

Taniguchi T, et al. Pelvic floor supportive underwear enhances alleviating effect of pelvic floor muscle training on lower urinary tract symptoms in pelvic organ prolapse patients. International Continence Society 47th Annual meeting, 2017.

Taniguchi T, et al. Evaluation of a novel underwear which supports the pelvic floor in pelvic organ prolapse patients. International Continence Society 46th Annual meeting, 2016.

Ihara T, et al. Circadian regulations of Piezo1, TRPV4, Connexin26 and VNUT by clock genes in the mouse bladder urothelium. International Continence Society 46th Annual meeting, 2016.

Kadekawa K, et al. The role of capsaicin-sensitive C-fiber afferent pathways in the control of micturition in normal mice and lower urinary tract dysfunction in mice with spinal cord injury. International Continence Society 46th Annual meeting, 2016.

Ihara T, et al. Clock genes regulate circadian rhythm of VNUT expression, Connexin 26 expression and stretch-evoked ATP release in the cultured urothelial cells. (Abstract No. MP68-04, May 9, 2016) American Urological Association Annual Meeting, 2016.

Kim SW, et al. Glycine transporter type 2 (GlyT2) inhibitor ameliorates autonomic dysreflexia during bladder hydrodistention and detrusor overactivity in IC/BPS rat model. American Urological Association Annual Meeting, 2016.

Kadekawa K, et al. Characterization of tonic activity of external urethral sphincter during voiding underlying inefficient voiding after spinal cord injury in rats. American Urological Association Annual Meeting, 2016.

Yoshiyama M, et al. Metabotropic glutamate receptor subtypes 1 and 5 synergistically modulate bladder filling function in mice. The 31st Annual Congress of the European Association of Urology, 2016.

Ihara T, et al. Clock genes regulate circadian rhythm of Piezo1 and TRPV4 expressions and intracellular Ca²⁺ influx after stretch stimulation in the cultured urothelial cells. The 31st Annual Congress of the European Association of Urology, 2016.

〔図書〕(計1件)

Yoshiyama M, Kakizaki H. Spinal Cord. In: Liao L and Madersbacher H (eds.) Neurourology: Theory and Practice. pp. 37-54, Springer, Netherlands, 2019. [DOI: [10.1007/978-94-017-7509-0_4](https://doi.org/10.1007/978-94-017-7509-0_4)]

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：井原 達也

ローマ字氏名：(IHARA, Tatsuya)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。