

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16751

研究課題名(和文) 脊髄損傷マウスの下部尿路機能障害に対するウイルスベクターを用いた新規治療法の開発

研究課題名(英文) Gene therapy with herpes simplex virus vectors improves lower urinary tract dysfunction in mice with spinal cord injury

研究代表者

清水 信貴 (Shimizu, Nobutaka)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：10368326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：過活動膀胱が発生する機序に膀胱求心性神経のC-fiberの受容体TRPV1が関与していることが分かり、それを抑制するウイルスベクターを用いて、脊髄損傷マウスの膀胱壁に注射した。治療法として複製欠損単純ヘルペスウイルスベクターの膀胱局所注射を用いた理由はこのTRPV1拮抗薬を全身投与すると副作用が出る事が分かっており、局所療法が適していると考えた為である。研究の結果、脊髄損傷マウスモデルによる排尿筋の無抑制収縮(頻尿)を優位に減少させる結果が出た。以上の背景を踏まえ、新規ウイルスベクターを用いた新しい手法は、新規治療方法となりうる事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷の発生数は、日本では高齢者の脊髄損傷の発生率が欧米に比較的多いと言われている。脊髄を損傷した後は、排泄ができない期間があり、その後不随意収縮にて頻尿が発生し、尿失禁が引き起こされる。このことは生活の質をかなり低下させる。よって脊髄損傷に伴う膀胱機能障害の病態機序の解明、ならびに治療法の開発は急務である。複製欠損単純ヘルペスウイルスベクターを用いた手法で脊髄損傷マウスの脊髄での病理学的診断かつ治療法へ試みたのは我々が初めてであり、さらに治療薬の開発に向けて研究を進める価値があると考え今回の研究を行った。結果、新規ウイルスベクターを用いた新しい手法は、新規治療方法となりうる事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：SCI induces detrusor overactivity (DO), which is mediated by spinal reflexes triggered by hyperexcitable C-fiber afferent pathways. It has also been reported that TRPV1 receptors predominantly expressed in C-fibre afferent pathways greatly contribute to DO in SCI. However, the clinical application of TRPV1 antagonists for chronic pain has been hampered partly due to their adverse events such as hyperthermia. Hence, the development of local therapies that can target TRPV1 receptors expressed in the affected organs and their afferent pathways without inducing systemic adverse events would be useful for the treatment of DO in SCI. This study investigated the effect of HSV vectors-mediated gene delivery of non-functional, poreless TRPV1 or PP1 in storage and voiding dysfunction using SCI mice. Gene therapy with HSV vectors encoding poreless TRPV1 or PP1 could be a novel treatment that can avoid systemic adverse events for hypersensitive bladder disorders such as SCI.

研究分野：下部尿路機能障害 排尿薬理

キーワード：脊髄損傷マウス 下部尿路機能障害 TRP channel ウイルスベクター 3アゴニスト laser microdissection 膀胱求心路 脊髄後根神経節

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、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

日本では高齢者の脊髄損傷の発生率が欧米に比較し多いと言われている。日本ではさらに高齢化することが予測されており、頸部脊柱管狭窄症を有する患者が増加し、これに伴い外傷としての非骨傷性頸椎損傷や、慢性疾患である頸椎症性脊髄症も増加が予測されている。また、脊髄損傷によって起こりうる障害としては、四肢運動・知覚障害・膀胱機能害などである。排尿効率が低下し多量の残尿が生じることで慢性的な尿閉や水腎症を来し尿路感染症や、腎機能低下へと発展し生命予後にも関わる。脊髄を損傷した直後は、排泄ができない期間(急性尿閉期)があり、この期間は膀胱が過伸展されて機能が低下しないように、水分摂取を制限し1日に5-6回導尿して膀胱の回復を待つことが多い。脊髄損傷の程度によって異なるが、膀胱が動き出すのに平均8週間を要するとされる。動き出すと今度は不随意収縮にて過活動膀胱の状態が発生し、尿失禁が引き起こされる。このことは生活の質をかなり低下させる。したがって脊髄損傷に伴う膀胱機能障害の病態機序の解明、ならびに治療法の開発は急務である。そこで我々は新規ウイルスベクターを用いた治療法の開発に取り組んだ。

### 2. 研究の目的

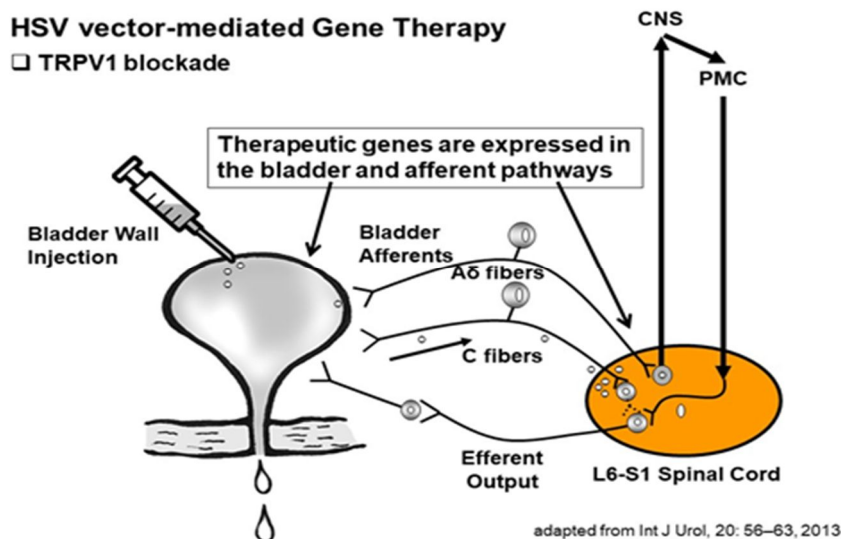
脊髄損傷マウスの下部尿路機能障害に対する新規ウイルスベクターを用いた分子生物学的診断、治療薬の開発を行う事を目的とした。

本研究は脊髄損傷(SCI)マウスを下部尿路機能障害モデル動物として使用し、新規ウイルスベクターを用いた新しい手法でマウスにおける過活動膀胱や排尿筋括約筋協調不全 (detrusor sphincter dyssynergia: DSD) の病態、ならびに下部尿路機能障害に関連する分子マーカーを同定し、治療法としての有用性を検討した。特にレーザーキャプチャー法 (Laser Microdissection (LMD)法) にて膀胱求心路の後根神経根(Dorsal Root Ganglion; DRG)での局所的 (膀胱求心神経のみ) 遺伝子発現量 (TRPA1, TRPV1, P2X2, P2X3, Kv1.2, Kv1.4, Kv4.3, Kv4.1, TRPC1, TRPC3, TRPC6) の解析を行うことでSCIでの排尿筋過活動の原因遺伝子を特定し、原因遺伝子のプロモーターをターゲットとした新規治療薬の開発の可能性を検討することである。

### 3. 研究の方法

(1) 2018年度はDRGでの受容体の膀胱求心性細胞をLaser Microdissection (LMD:レーザーキャプチャー法)で解析をした。DRG: L6、L1 摘出前1週間にFast Blue(FB; 鋭敏な逆行性蛍光色素)を膀胱壁に注射しておき、DRGはLMDに供するまで、OCTコンパウンドに包埋して-80で凍結保存した。-80で凍結保存された組織をクリオスタットで10µmの厚さに薄切し、フォイル付スライドガラス(PEN slide)に貼り付けた。LMD6000 (Leica Microsystems)を用いてレーザー光を利用して、組織切片上のFBで発色した目的細胞のみを光学顕微鏡下でレーザーによって切り取り、採取した。Cells Direct™を用いてreal time PCRを行った。DRGの局所的遺伝子発現量の解析を行った

(2) 2019年度、次にTRPV1の活性を抑える複製欠損ヘルペスウイルスベクター(poreless TRPV1とprotein phosphatase 1 (PP1))をSCIマウスの膀胱壁に注入し、膀胱内圧測定をした。



(3) 2020年度、引き続きSCIマウスを作成しウイルスベクター注入後の膀胱組織での検討を

行った。

#### 4 . 研究成果

( 1 ) 結果、SCI で TRPV1, TRPC1, TRPC3, TRPC6 が治療に有効なターゲットである可能性があることが分かった。( Shimizu N, Wada N, Shimizu T et al. Effects of nerve growth factor neutralization on TRP channel expression in laser-captured bladder afferent neurons in mice with spinal cord injury. Neuroscience letters. 2018; 683: 100-3. )

( 2 ) 結果、SCI マウスにおいてコントロールウイルスベクターに比較して poreless TRPV1 と protein phosphatase 1 ( PP1 ) のウイルスベクターを膀胱注射した群が、脊髄損傷後の排尿筋過活動を優位に抑制した。一方、病理学的検討で膀胱壁に注射したウイルスベクターが DRG に到達していることも確認できた。

( 3 ) 膀胱組織において poreless TRPV1 と protein phosphatase 1 ( PP1 ) のウイルスベクターを注射した方が、TRPV1 のリン酸化を減少させている事も分かった。この様にウイルスベクターを用いた膀胱局所への TRPV1 を抑制する治療は脊髄損傷後の排尿筋過活動の治療になる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件/うち国際共著 10件/うちオープンアクセス 7件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Shimizu N, Wada N, Shimizu T, Suzuki T, Takaoka EI, Kanai AJ, de Groat WC, Hirayama A, Hashimoto M, Uemura H, Yoshimura N.                          | 4. 巻<br>683             |
| 2. 論文標題<br>Effects of nerve growth factor neutralization on TRP channel expression in laser-captured bladder afferent neurons in mice with spinal cord injury | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Neuroscience Letters  | 6. 最初と最後の頁<br>100-103   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.neulet.2018.06.049.  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |
| 1. 著者名<br>Shimizu N, Suzuki T, Takaoka E-I, Shimizu T, Hirayama A, Uemura H, Kanai A, De Groat W.C., Yoshimura N  | 4. 巻<br>18              |
| 2. 論文標題<br>Therapeutic effects of PDE9 inhibitor on lower urinary tract dysfunction (LUTD) in mice with spinal cord injury (SCI)                              | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Eur Urol Suppl  | 6. 最初と最後の頁<br>e109-e110 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |
| 1. 著者名<br>Shimizu N, Suzuki T, Takaoka E, Shimizu T, Hirayama A, Uemura H, Kanai A A.J., De Groat W.C., Yoshimura N   | 4. 巻<br>18              |
| 2. 論文標題<br>herapeutic effects of p38 MAP kinase inhibitor in storage and voiding dysfunction in mice with spinal cord injury (SCI)                            | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Eur Urol Suppl  | 6. 最初と最後の頁<br>e5-6      |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |
| 1. 著者名<br>Shimizu N, Wada N, Shimizu T, Suzuki T, Kurobe M, Kanai AJ, de Groat WC, Hashimoto M, Hirayama A, Uemura H  | 4. 巻<br>39(1)           |
| 2. 論文標題<br>Role of p38 MAP kinase signaling pathways in storage and voiding dysfunction in mice with spinal cord injury                                       | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Neurourology and urodynamics  | 6. 最初と最後の頁<br>108-115   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>該当する            |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Shimizu N, Hashimoto M, Suzuki T, Takaoka E, Kwon J, Shimizu T, Wada N, Hirayama A, Uemura H, Kanai AJ, de Groat WC, Yoshimura N. | 4. 巻<br>37            |
| 2. 論文標題<br>Inhibition of phosphodiesterase type 9 (PDE9) improves storage and voiding dysfunction in mice with spinal cord injury.          | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Neurourology and urodynamics.   | 6. 最初と最後の頁<br>S96-S97 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する          |

|  |                   |
|--|-------------------|
| 1. 著者名<br>Shimizu N, Suzuki T, Takaoka EI, Wada N, Shimizu T, Hirayama A, Uemura H, Yoshimura N                      | 4. 巻<br>13771     |
| 2. 論文標題<br>Therapeutic effects of p38 MAP kinase inhibitor on bladder dysfunction in spinal cord injured (SCI) mice. | 5. 発行年<br>2018年   |
| 3. 雑誌名<br>Int J Urol.  | 6. 最初と最後の頁<br>S49 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし   | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>該当する      |

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Shimizu N, Saito T, Igarashi N, Gotoh D, Majima T, Takai S, Hirayama A, William F G, Joseph C G, Uemura H, Yoshimura N  | 4. 巻<br>38                  |
| 2. 論文標題<br>Gene therapy with replication-deficient herpes simplex virus vectors encoding poreless TRPV1 or protein phosphatase 1 (PP1) reduces detrusor overactivity in mice with spinal cord injury. | 5. 発行年<br>2019年             |
| 3. 雑誌名<br>Neurourology and urodynamics  | 6. 最初と最後の頁<br>S3 supplement |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし  | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>該当する                |

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>Shimizu N, Nishimoto M, Hashimoto M, Saito T, Gotoh D, Hirayama A, Yoshimura N, Uemura H                                    | 4. 巻<br>S361       |
| 2. 論文標題<br>Efficacy of vibegron, a novel 3-adrenoreceptor agonist on storage and voiding dysfunction in mice with spinal cord injury. | 5. 発行年<br>2020年    |
| 3. 雑誌名<br>Neurourology and urodynamics  | 6. 最初と最後の頁<br>s361 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし  | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する       |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Gotoh D, Shimizu N, Wada N, Kadekawa K, Saito T, Mizoguchi S, Morizawa Y, Hori S, Miyake M, Torimoto K, de Groat WC, Fujimoto K, Yoshimura N. | 4. 巻<br>39(8)           |
| 2. 論文標題<br>Effects of a new 3-adrenoceptor agonist, vibegron, on neurogenic bladder dysfunction and remodeling in mice with spinal cord injury.         | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Neurourology and urodynamics  | 6. 最初と最後の頁<br>2120-2127 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/nau.24486.  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Nobutaka Shimizu, Daisuke Gotoh, Mitsuhisa Nishimoto, Mamoru Hashimoto, Tetsuichi Saito, Kazutoshi Fujita, Akihide Hirayama, Naoki Yoshimura, Hirotsugu Uemura | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Efficacy of vibegron, a novel 3-adrenoreceptor agonist for lower urinary tract dysfunction in mice with spinal cord injury                                    | 5. 発行年<br>2021年 |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Urology   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する    |

[学会発表] 計11件(うち招待講演 0件/うち国際学会 10件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Shimizu N, Suzuki T, Takaoka EI, Wada N, Shimizu T, Hirayama A, Uemura H, Yoshimura N                     |
| 2. 発表標題<br>Therapeutic effects of p38 MAP kinase inhibitor on bladder dysfunction in spinal cord injured (SCI) mice. |
| 3. 学会等名<br>16th Urological Association of Asia (UAA), Kyoto (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Shimizu N, Suzuki T, Takaoka E, Kwon J, Wada N, Shimizu T, Hirayama A, Uemura H, Anthony J Kanai, de Groat William C, Yoshimura N |
| 2. 発表標題<br>Therapeutic effects of P38 map kinase inhibitor on bladder dysfunction in mice with spinal cord injury (SCI)                      |
| 3. 学会等名<br>113th Annual Meeting of American Urological Association (AUA), San Francisco (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1 . 発表者名<br>Shimizu N, Hashimoto M, Suzuki T, Takaoka E, Kwon J, Wada N, Hirayama A, Uemura H, Kanai AJ, De Groat WC, Yoshimura N |
| 2 . 発表標題<br>Inhibition of phosphodiesterase Type 9(PDE9) Improves storage and voiding Dysfunction in mice with spinal cord injury |
| 3 . 学会等名<br>International Continence Society, Philadelphia, USA ( 国際学会 )  |
| 4 . 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1 . 発表者名<br>Shimizu N, Takaoka E, Suzuki T, Kwon J, Hashimoto M, Uemura H, Hirayama A, Anthony J Kanai, de Groat William C, Yoshimura N |
| 2 . 発表標題<br>Therapeutic effects of PDE9 inhibitor in storage and voiding dysfunction in mice with spinal cord injury (SCI)              |
| 3 . 学会等名<br>American Urological Association (AUA) ( 国際学会 )  |
| 4 . 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1 . 発表者名<br>Shimizu N, Saito T, Igarashi N, Gotoh D, Majima T, Takai S, Hirayama A, William F G, Joseph C G, Uemura H, Yoshimura N  |
| 2 . 発表標題<br>Gene therapy with replication-deficient herpes simplex virus vectors encoding poreless TRPV1 or protein phosphatase 1 (PP1) reduces detrusor overactivity in mice with spinal cord injury |
| 3 . 学会等名<br>49th International Continence Society (ICS), Gothenburg, Sweden ( 国際学会 )  |
| 4 . 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1 . 発表者名<br>Shimizu N, Suzuki T, Takaoka E, Shimizu T, Hirayama A, Uemura H, Kanai A.A.J, De Groat W.C, Yoshimura N      |
| 2 . 発表標題<br>Therapeutic effects of p38 MAP kinase inhibitor on bladder dysfunction in mice with spinal cord injury (SCI) |
| 3 . 学会等名<br>34th Annual EAU Congress (EAU19), Barcelona, Spain ( 国際学会 )  |
| 4 . 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Shimizu N, Suzuki T, Takaoka E, Shimizu T, Hirayama A, Uemura H, Kanai A.A.J, De Groat W.C, Yoshimura N               |
| 2. 発表標題<br>Therapeutic effects of PDE9 inhibitor on lower urinary tract dysfunction (LUTD) in mice with spinal cord injury (SCI) |
| 3. 学会等名<br>34th Annual EAU Congress (EAU19), Barcelona, Spain (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Shimizu N, Suzuki T, Takaoka E, Kwon J, Shimizu T, Hirayama A, Kanai A J, de Groat W C, Yoshimura N, Uemura H      |
| 2. 発表標題<br>Therapeutic effects of PDE9 inhibitor on lower urinary tract dysfunction (LUTD) following spinal cord injury (SCI) |
| 3. 学会等名<br>39th SIU Athens, Greece (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Shimizu N, Nishimoto M, Hashimoto M, Saito T, Gotoh D, Hirayama A, Yoshimura N, Uemura H                                  |
| 2. 発表標題<br>Efficacy of vibegron, a novel 3-adrenoreceptor agonist on storage and voiding dysfunction in mice with spinal cord injury |
| 3. 学会等名<br>International Continence Society (ICS), online (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>清水信貴, 齋藤徹一, 後藤大輔, 馬嶋剛, 平山暁秀, 吉村直樹, 植村天受   |
| 2. 発表標題<br>Gene therapy with herpes simplex virus vectors encoding poreless TRPV1 or protein phosphatase 1 reduces detrusor overactivity in mice with spinal cord injury |
| 3. 学会等名<br>第108回 日本泌尿器科学会総会 international session (国際学会) (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2020年  |



|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>清水 信貴, 西本 光寿, 後藤 大輔, 橋本 士, 平山 暁秀, 吉村 直樹, 植村 天受 |
| 2. 発表標題<br>脊髄損傷マウスモデルの膀胱機能障害に対するピペグロンの効果                  |
| 3. 学会等名<br>日本排尿機能学会                                       |
| 4. 発表年<br>2020年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|         |         |