

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590707

研究課題名(和文)骨盤臓器組織障害性疼痛におけるセロトニン受容体シグナル系の役割

研究課題名(英文)The functional role of 5-HT receptors on visceral sensation of pelvic organs

研究代表者

宮井 和政 (Miyai, Kazumasa)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

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、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱、食道、直腸の上皮組織は刺激に応じてATPを分泌し、内臓痛を含む内臓感覚の伝達に寄与している。本研究では、上記の上皮組織からのATP分泌に、セロトニン(5-HT)受容体とその下流のシグナル系がどのように関わっているのかを検討した。膀胱上皮では5-HT1Dと5-HT4が発現しており、主に5-HT1Dが働いてATP分泌を抑制していた。5-HT1Dはその下流でcAMPを減少させるが、cAMPは膀胱上皮からのATP分泌を促進した。食道では5-HT受容体は機能しておらず、直腸では5-HT4だけが発現してATP分泌を抑制していた。膀胱では5-HT1Dが内臓知覚過敏の治療標的になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The epitheliums of urinary bladder, esophagus, and colorectum release ATP in response to various stimuli, which contributes to the transmission of visceral sensation including visceral pain. We investigated the involvement of 5-HT receptors and their downstream signals on the ATP release from these epitheliums. In the epithelium of urinary bladder (urothelium), 5-HT1D and 5-HT4 were expressed. Serotonin suppressed the distention-induced ATP release from urothelium via 5-HT1D. The ATP release was facilitated by cAMP, which was reduced by 5-HT1D. In the esophageal epithelium, none of the 5-HT receptor subtypes was expressed and functioned. In the colorectal epithelium, only 5-HT4 was expressed and inhibited the ATP release. These data suggested that the urothelium-specific 5-HT1D is a candidate for the therapeutic target for the visceral hypersensitivity of urinary bladder.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：内臓知覚 セロトニン 5-HT受容体 上皮組織 膀胱 食道 直腸

1. 研究開始当初の背景

(1) 消化管や下部尿路(尿管、膀胱、尿道)などの管腔臓器の上皮細胞は伸展などの機械的な刺激や酸などの化学物質による刺激に応じてATPを分泌し、求心性神経終末に存在するP2X₃受容体を介して中枢神経系に内臓痛覚を含む各種の内臓感覚を伝えている。しかしながら、伸展刺激を受容するチャンネルがどのようなものなのか、また、刺激に応じたATPの分泌量を調節する分子メカニズムがどのようなものなのか、については未解明の部分が多く存在していた。

(2) 近年、消化管および下部尿路の内臓知覚過敏を症状の1つとする疾患群(過活動膀胱、間質性膀胱炎、胃食道逆流症、過敏性腸症候群)などが注目されている。しかしながら、これらの疾患に対する治療のアプローチは、平滑筋の異常収縮を抑制することに重点がおかれ、内臓知覚伝達メカニズムの関与についてはほとんど研究が進んでいなかった。

(3) セロトニン(5-HT)は消化管や下部尿路の平滑筋収縮の駆動や調節に重要な役割を担っていることが知られていた。しかしながら、セロトニンが5-HT受容体からのシグナル系を介して内臓知覚伝達にも関与しているのかどうかについては全くの未知であった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、下部尿路である膀胱の上皮、および消化管である食道と直腸の上皮からの刺激に応じたATP分泌に5-HT受容体からのシグナル系が関与するのかどうかを検討することを主目的とした。そこで、まずはこれらの上皮組織に5-HT受容体が発現しているのかどうか、発現しているのであればどの受容体のサブタイプが発現しているのか、を明らかにすることを第1の目的とした。

(2) 次に、発現の認められた5-HT受容体サブタイプの作動薬や阻害薬が上記管腔臓器上皮からの伸展刺激に応じたATP分泌にどのような影響を与えるのかを解析し、どの5-HT受容体サブタイプが内臓知覚過敏の治療標的となるのかを検討することを第2の目的とした。さらに、5-HT受容体の下流にあるシグナル系であるcAMPや小胞体からのCa²⁺放出がATP分泌量の調節に果たす役割を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 膀胱、食道、および直腸における5-HT受容体サブタイプの発現を明らかにするため、上記組織から単離したmRNAを鋳型としたRT-PCR法をおこなった。上記の臓器は摘出したのちに上皮組織とそれ以外の組織(主に平滑筋組織)に分離し、それぞれの組織からRNAを単離し、RT-PCR法に用いた。PCRに

用いた5-HT受容体の各サブタイプのプライマーが機能しているのかどうかを検討するため、5-HT受容体サブタイプの発現が豊富な脳を材料として対照実験をおこなった。

(2) 5-HT受容体からのシグナル系が伸展刺激に応じた膀胱、食道、直腸の上皮からのATP分泌に与える影響を検討するため、摘出、展開した上記組織をウッシングチャンバーに挟み、漿膜側から静水圧をかけたときに粘膜(上皮)側から分泌されるATP量をルシフェリン-ルシフェラーゼ法にて解析した。5-HT受容体サブタイプの作動薬や阻害薬、またその下流のシグナル系を賦活・抑制する薬剤は粘膜側のチャンバーに投与し、ATP分泌量をどのように変化させるのかを検討した。

4. 研究成果

(1) 膀胱上皮における5-HT受容体サブタイプ mRNA の発現

上皮を除いた膀胱(主に平滑筋)では5-HT_{1B}、5-HT_{1D}、5-HT_{2A}、5-HT_{2C}が強く、5-HT_{3A}、5-HT₄が弱く発現していたのに対し、膀胱上皮では5-HT_{1D}および5-HT₄のmRNAのみが豊富に発現していた。コントロールとして用いた脳組織では末梢型の5-HT_{2B}以外のmRNA発現が認められており、実験に用いたプライマーは正しく働いていることが示された(図1)。

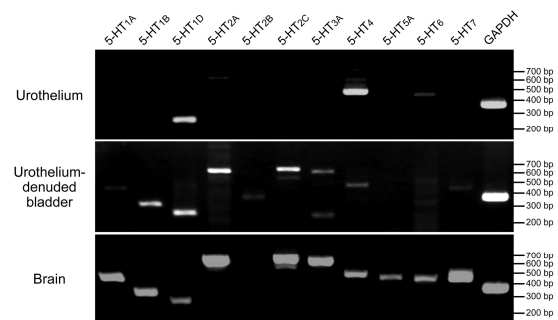


図1. 膀胱における5-HT受容体サブタイプの遺伝子発現

(2) 食道上皮における5-HT受容体サブタイプ mRNA の発現

食道においては、上皮にも上皮を除いた残りの組織においても、5-HT受容体のどの細部タイプの発現も認められなかった(図2)。

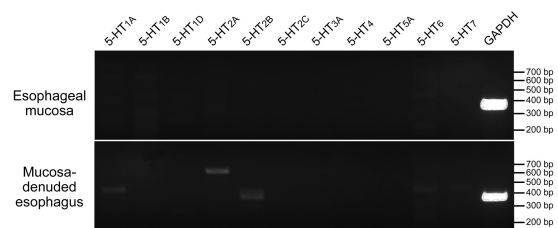


図2. 食道における5-HT受容体サブタイプの遺伝子発現

(3) 直腸上皮における 5-HT 受容体サブタイプ mRNA の発現

直腸上皮では、5-HT₄のみ強い発現が認められた。上皮以外の組織においては、5-HT_{2A}、5-HT_{2B}、5-HT_{3A}の強い発現と、5-HT_{1B}、5-HT₄の弱い発現が検出された(図3)。

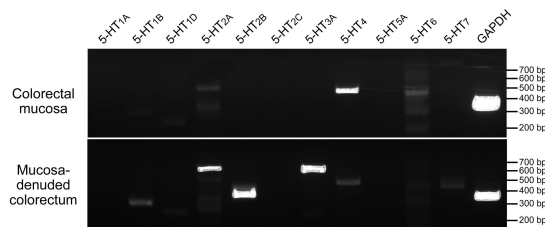


図3. 直腸における5-HT受容体サブタイプの遺伝子発現

以上の(1)~(3)の解析から、管腔臓器上皮においては0~2種類の特異的な5-HT受容体サブタイプしか発現していないこと、また、その発現パターンは臓器によって異なることが明らかとなった。

(4) 膀胱上皮からの ATP 分泌調節機構

セロトニンの粘膜側チャンパーへの投与は、伸展刺激に応じた膀胱上皮からの ATP 分泌量を有意に減少させた。このセロトニンによる ATP 分泌抑制は 5-HT₁₀ を介していた。これに対し、5-HT₄ の活性化では ATP 分泌が促進されていた。

5-HT₁₀ はその下流で cAMP 量を減少させるが、5-HT₄ は逆に増加させる。そこで、アデニル酸シクラーゼの作動薬 forskolin と cAMP 分解酵素阻害薬 rolipram の効果を検討したところ、どちらの薬品でも cAMP 量を増やしても ATP 分泌量は有意に増加した(図4)。以上のことから、セロトニンは主に 5-HT₁₀ に作用して cAMP 量を減少させることで ATP 分泌を抑制し、内臓知覚伝達を負に制御する可能性が示唆された。

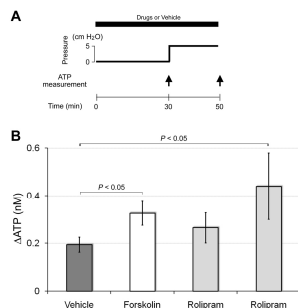


図4. 膀胱上皮からの ATP 分泌に対する cAMP の作用

また、cAMP とならぶセカンドメッセンジャー系である細胞内 Ca²⁺ の作用については、小胞体からの Ca²⁺ 放出が ATP 分泌を駆動したのに対し、細胞外からの貯蔵量作動性 Ca²⁺ 流入

は伸展刺激による ATP 分泌を抑制していた。

(5) 食道上皮からの ATP 分泌調節機構

食道上皮には 5-HT 受容体の発現が認められなかったが、伸展刺激による ATP 分泌についてもセロトニンは何の作用も示さなかった。

ただし、セカンドメッセンジャー系の 1 つである cAMP については、forskolin で cAMP 量を増加させると膀胱上皮とは逆に ATP 分泌量が有意に抑制され、アデニル酸シクラーゼの阻害薬で有意に促進された。

(6) 直腸上皮からの ATP 分泌調節機構

直腸上皮では 5-HT₄ のみが発現していたが、5-HT₄ 作動薬は ATP 分泌を抑制する傾向を示したのに対し、5-HT₄ 阻害薬は ATP 分泌を促進する傾向が認められた。このことから、5-HT₄ は膀胱上皮とは逆に ATP 分泌の抑制に働くことが示唆された。ただし、直腸上皮には 5-HT₁₀ が存在しないため、セロトニンの作用としては膀胱上皮と同様に ATP 分泌を抑制している可能性が考えられた。

以上の(4)~(6)の解析から、膀胱上皮における内臓知覚に対する創薬ターゲットとしては、5-HT₁₀ が有力であると考えられた。5-HT₁₀ は検討した組織の中では膀胱上皮に特異的に発現している受容体であり、消化管に対する副作用の程度も低いと推察された。

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4件)

善積克, 松本-宮井和政, 林田健一郎, 河谷正仁. 膀胱知覚と脊髄の可塑性, 最近の知見. 排尿障害プラクティス, 査読なし, 21, 193-201, 2013.

松本-宮井和政, 河谷正仁. 膀胱上皮からの ATP 分泌における貯蔵量作動性 Ca²⁺ 流入と Ca²⁺ 抑制性アデニル酸シクラーゼの役割. 排尿障害プラクティス, 査読なし, 20, 16-23, 2012.

Matsumoto-Miyai K, Yamada E, Yoshizumi M, and Kawatani M. The regulation of distention-induced ATP release from urothelium by the adenylyl cyclase-cyclic AMP pathway. Biomed. Res., 査読あり, 33: 153-157, 2012. DOI: 10.2220/biomedres.33.153

Matsumoto-Miyai K, Kagase A, Yamada E, Yoshizumi M, Murakami M, Ohba M, and

Kawatani M. Store-operated Ca²⁺ entry suppresses distention-induced ATP release from urothelium. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 査読あり, 300: F716-F720, 2011.
DOI: 10.1152/ajprenal.00512.2010.

〔学会発表〕(計6件)

松本-宮井和政、善積克、河谷正仁 .一酸化窒素-cGMP 経路による膀胱上皮からのATP 分泌の抑制 .第20回日本排尿機能学会、2013年9月19日、静岡、静岡

新澤枝里子、松本-宮井和政、善積克、河谷正仁 . 伸展刺激に応じた食道上皮からのATP 分泌の制御機構 .第90回日本生理学会大会、2013年3月27日、江戸川、東京

Matsumoto-Miyai K, Yoshizumi M, and Kawatani M. Suppression of distention-elicited urothelial ATP release by NO-cGMP pathway. Society for Neuroscience 42nd Annual Meeting, New Orleans, USA, October 2012年10月15日.

松本-宮井和政、善積克、河谷正仁 . 内在性セロトニンシグナルの賦活化による膀胱上皮からのATP 分泌抑制 . 第19回日本排尿機能学会、2012年8月31日、名古屋、愛知

Matsumoto-Miyai K, Yoshizumi M, Yamada E, and Kawatani M. Regulation of distention-elicited urothelial ATP release by 5-hydroxytryptamine. Society for Neuroscience 41st Annual Meeting, Washington DC, USA, 2011年11月15日.

松本-宮井和政、善積克、河谷正仁 . セロトニンによる膀胱上皮からのATP 分泌の制御 . 第18回日本排尿機能学会、2011年9月16日、福井

〔図書〕(計2件)

松本-宮井和政、河谷正仁 . 痛み(しびれ)の分類 . 痛み・しびれ: その原因と対処法 (山本隆允編集), 真興交易(株)医書出版部, 東京, 25-30, 2013.

松本-宮井和政、河谷正仁 . 内臓痛のメカニズム . 痛みの Science & Practice シリーズ第2巻 : 痛みの薬物治療 (山本達郎編集), 文光堂, 東京, 50-57, 2013.

〔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)
秋田大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 60283933

(2) 研究分担者

河谷 正仁 (KAWATANI, Masahito)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 00177700

善積 克 (YOSHIZUMI, Masaru)
秋田大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 70553379

(3) 連携研究者
なし