

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590721

研究課題名(和文)慢性骨盤痛症候群における肥満細胞の意義および病態解明

研究課題名(英文)The role of mast cells in the pathophysiology of chronic pelvic pain syndrome

研究代表者

松本 成史(MATSUMOTO, Seiji)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：10288912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：慢性骨盤痛症候群の代表的疾患である間質性膀胱炎(IC)や過敏性腸症候群(IBS)の病態に、肥満細胞が関与しているという仮説を立て、肥満細胞欠損マウスとコントロールマウスを用いて、ICモデル、IBSモデル、その併用モデルを用いて排尿動態の変化を検討した。肥満細胞欠損マウスはコントロールマウスに比して排尿量が有意に少く、各病態群で一番変化が顕著であったICモデル群では平均排尿量は有意に減少し、その変化率は肥満細胞欠損マウスよりコントロールマウスで有意であった。その病理所見では肥満細胞欠損マウスの方が、炎症性変化が軽微であった。以上の結果より、肥満細胞の存在は炎症増悪因子であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The present study was conducted to elucidate the role of mast cells in the pathophysiology of chronic pelvic pain syndrome (CPPS) including interstitial cystitis (IC), irritable bowel syndrome (IBS), etc. We investigated the possible roles of mast cells with IC model, IBS model and combination model using genetically mast cell-deficient WBB6F1/J-Kit^{W/Kit^{W-v}} (W/W^v) and congenic normal WBB6F1/J-Kit^{+/Kit⁺} (+/+). The rate of change in VV was significantly lower in the W/W^v than +/+, especially IC model group. Also, with regard to the change of bladder histology the inflammatory changes were less extensive in W/W^v than +/+. The presence of mast cells is the aggravating factor of inflammation. Further detailed study of the role of mast cells is needed to elucidate the pathophysiological mechanism underlying IC/CPPS.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：慢性骨盤痛症候群 肥満細胞 間質性膀胱炎 過敏性腸症候群

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性骨盤痛症候群 (chronic pelvic pain syndrome: CPPS) は、QOL を損ね、かつ治療に難渋することが多い疾患群である。代表的疾患である間質性膀胱炎 (Interstitial Cystitis; IC) は、主に閉経以前の 20-50 歳の女性を中心に生じる慢性疼痛を伴う非細菌性の膀胱炎様症状である。その主な症状である骨盤痛や頻尿・過活動膀胱 (overactive bladder: OAB) は、女性においては月経の前後で、また心的ストレスにより悪化することなどが知られている。また過敏性腸症候群 (Irritable Bowel Syndrome: IBS) とは、下痢や便秘などの便通異常を伴う腹痛や腹部不快感が、慢性的にくり返される疾患群で、これも心的ストレスにより悪化することなどが知られている。

OAB と IBS は、ともに QOL を損ねる疾患であり、膀胱と大腸の過活動 (過敏性) の病態で、海外では下部尿路症状 (Lower urinary tract symptoms: LUTS) と IBS が合併することが報告されており [1-3]、特に IC 患者では高率に IBS を併発している [4] ことが知られている。また、動物実験では大腸炎モデルでは膀胱知覚も過敏になっており [5]、逆にシクロホスファミド (cyclophosphamide: CYP) では結腸痛覚過敏が認められることが報告されている [6]。

(2) IC 患者においては、以前に膀胱組織中の肥満細胞の数 [7] と、肥満細胞由来のヒスタミン代謝物尿中濃度が増加していることが報告されている [8]。Dr. Theoharides のグループは、これらの報告を追認したのみならず、もう一つの肥満細胞活性化マーカーであるトリプターゼの尿中濃度の上昇も報告している [9]。一方、齧歯類を用いた動物実験では、急性拘束ストレスがニューロペプチドの neurotensin (NT) や、カプサイシン反応性の知覚神経を介して、膀胱肥満細胞を活性化することが報告されている [10, 11]。更に、女性ホルモンのエストラジオールで前処理することで、膀胱肥満細胞のカルバコールによる脱顆粒反応は増強した [12] ことも報告されている。これらの背景には、膀胱肥満細胞に発現されているエストロゲン・レセプターが関与していると推察される [13]。また他のグループからの報告では、向神経性偽狂犬病ウイルスの筋中投与 (神経因性の膀胱炎様炎症を惹起することが知られている) による膀胱炎は、compound 48/80 であらかじめ肥満細胞を脱顆粒させておいたラットでは生じなかった [14] ことを報告している。肥満細胞は交感神経と知覚神経末端に近接する形で血管周囲に存在し、アレルゲン、神経刺激、急性拘束ストレスにより活性化され、様々な血管透過性亢進因子、炎症惹起物質、知覚神経感作因子を放出する [15]。Corticotropin-releasing hormone (CRH) はストレスに応じて視床下部から放出され、視床下部・下垂体・副腎系を活性化する。CRH

とその構造類似体である urocortin (Ucn) が共に、肥満細胞でも産生・放出されることを報告されており [16]、CRH と Ucn は、ラット皮膚肥満細胞を活性化し血管透過性を亢進させ、これらの反応は CRH receptor-1 antagonist の antalarmin の前処理によって抑制されたことより、CRH receptor-1 を介していると考えている [17, 18]。CRH や急性拘束ストレスによる皮膚の血管透過性亢進は肥満細胞欠損マウスでは認められていない事実より、皮膚肥満細胞がこれらの生体反応に必須の役割を担っていると考えられる。しかしながら、肥満細胞はその分布する臓器によって異なる反応性を示すことが広く知られており、皮膚肥満細胞で得られた知見が膀胱における肥満細胞でも同じかどうかは検討が必要である。また、炎症性サイトカインでヒト肥満細胞の増殖因子として重要な interleukin-6 (IL-6) が、IC 患者の尿中で高いことが報告されている [19]。更に IL-1 や TNF- α がヒト培養肥満細胞からの IL-6 産生・放出を誘導することを報告されている [20]。

以上より、CPPS の病態である IC や IBS には肥満細胞がその病態に大きく関与していることが考えられるが、CPPS における排尿状態への肥満細胞の影響についての報告は無い。今回、各病態における肥満細胞の有無で排尿状態がどのように変化するかについて検討した。

2. 研究の目的

(1) 慢性骨盤痛症候群 (CPPS) の代表的疾患である間質性膀胱炎 (IC)、過敏性腸症候群 (IBS) の病態に、肥満細胞が大きく関与していると言う仮説を立て、まず肥満細胞の有無で、排尿動態が変化するか否かを確認すべく、肥満細胞欠損マウス (WBB6F1/*kit-Kit^{fl/fl}/Slc*) とコントロールマウス (WBB6F1/*kitSlc*) を用いて、排尿動態 (排尿回数) の測定を実施し、下記モデルを使用して検討した。

IC モデル: CYP 膀胱炎 (CYP, 300 mg/kg 腹腔内投与後、頻尿等の排尿の変化が一番顕著に出現する 4 時間後) モデル

IBS モデル: 代表的な急性身体拘束 (簡易的な筒を用いて 30 分間拘束) によるストレス誘発大腸知覚過敏モデル

IC+IBS モデル: 上記の IC モデルと IBS モデルの併用モデル

3. 研究の方法

(1) 肥満細胞欠損マウス (WBB6F1/*kit-Kit^{fl/fl}/Slc*) およびコントロールマウス (WBB6F1/*kitSlc*) (雄性、入荷時 7 週齢、日本エスエルシー株式会社) を用い、予備飼育期間は 1 週間とし、毎日 1 回一般状態を観察し、馴化を行った。動物の飼育は、温度: 24 \pm 2、湿度: 50 \pm 10%、照明時間: 12 時間 (7~19 時)、換気回数: 16 回/

時間に設定したバリア施設内の飼育室で行なった。

(2) 肥満細胞欠損マウス (WBB6F1/kit-Kit^{fl}/Kit^{fl-v}/Slc) およびコントロールマウス (WBB6F1/kitSlc) を急性拘束群 10 匹、シクロホスファミド膀胱炎群 10 匹およびシクロホスファミド+急性拘束群 10 匹に群分け (下表) してマウス用代謝ケージ収容し、2 時間の排尿回数および一回毎の排尿量を、電子天秤を用いて個別に測定 (ただし、2 時間以内に排尿回数が最低 4 回確認されなかった場合は測定時間を延長) した。各群全ての測定し、その終了後に各々の下記モデルにて測定した。

1 および 4 群は急性拘束後、再度代謝ケージに収容し排尿回数、排尿量を測定した。

2 および 5 群には CYP 投与 4 時間後、同様に排尿回数、排尿量を測定した。

3 および 6 群には CYP 投与 4 時間後に急性拘束し、同様に排尿回数、排尿量を測定した。

群	動物種および系統	試験群
1	WBB6F1/kit-Kit ^{fl} /Kit ^{fl-v} /Slc	IBS
2		IC
3		IBS+IC
4	WBB6F1/kitSlc	IBS
5		IC
6		IBS+IC

(3) CYP 誘発性 IC モデル動物を用いた研究では、Freezing (秒) (姿勢を保持して動かなくなる)、licking (回数/15 分間) (膀胱痛様行動と思われる下腹部を舐める) の行動観察が見られる [21] ため、IC 群 (2, 4 群) は投与後 15 分間、IBS+IC 群は拘束後 15 分間 (3, 6 群) 測定した。

(4) その後、膀胱摘出し、ホルマリン保存し、HE 染色およびトリイズンブルー染色を施行し、病理学的変化も検討した。

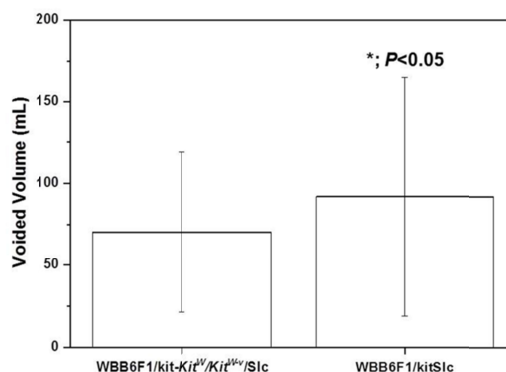
4. 研究成果

(1) 各群での前後での体重の変化 (下表) に差は認めなかった。

群	Pre		Post	
	Mean	SD	Mean	SD
1	20.01	1.47	20.16	1.11
2	19.83	1.41	20.18	1.8
3	19.82	1.43	21.32	1.34
4	21.66	0.95	22.27	0.79
5	21.78	0.86	21.92	1.13
6	21.92	0.68	22.37	0.8

(2) 各群で排尿回数は 4 または 5 回であった。

(3) 各群での 4 または 5 回の 1 回あたりの平均排尿量の前値は下図の通りで、肥満細胞欠損マウス (WBB6F1/kit-Kit^{fl}/Kit^{fl-v}/Slc) はコントロールマウス (WBB6F1/kitSlc) に比べ、有意に排尿量は少なかった。この結果は、肥満細胞の存在 (有無) が、排尿量 (膀胱容量) に影響を与えている可能性を示唆するものであった。



* Kruskal-Wallis ANOVA Multiple Comparison (Dunn's Method)

(4) コントロールマウス (WBB6F1/kitSlc) での各病態モデルでの前後での変化の結果を示す。

群		Mean	SD	変化率 (%)
4	Pre	83.53	58.29	
	Post	84.44	73.18	118.6
5	Pre	85.60	56.70	
	Post	14.93	9.47	19.2*
6	Pre	106.69	96.50	
	Post	21.59	8.33	22.3*

* Kruskal-Wallis ANOVA Multiple Comparison (Dunn's Method)

(5) 肥満細胞欠損マウス (WBB6F1/kit-Kit^{fl}/Kit^{fl-v}/Slc) での各病態モデルでの前後での変化の結果を示す。

群		Mean	SD	変化率 (%)
1	Pre	67.61	40.42	
	Post	68.37	51.44	110.7
2	Pre	66.00	47.32	
	Post	17.38	18.15	32.0*
3	Pre	77.09	57.20	
	Post	36.14	31.09	45.3*

* Kruskal-Wallis ANOVA Multiple Comparison (Dunn's Method)

(6) Freezing および licking の行動様式の結

果を見ると、両群 Pre 値での比較では、有意差は認めなかった（下表）。

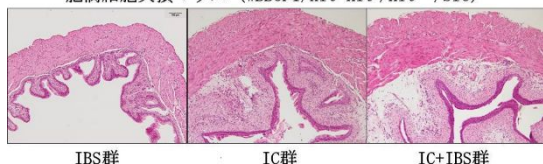
Pre; Mean(SD)	Freezing	licking
WBB6F1/Kit-Kit ^{fl} /Kit ^{fl-v} /Slc	7.00(4.00)	0
WBB6F1/KitSlc	9.73(5.92)	0.20(0.41)

行動様式で、より変化が顕著であった Freezing に注目した場合の各病態群での変化を下表に示す。IC 群では、肥満細胞欠損マウス (WBB6F1/kit-Kit^{fl}/Kit^{fl-v}/Slc) で、有意差を認め、IBS+IC 群でも同様の結果であった（下表）。

Freezing; Post/Pre	IC 群	IC+IBS 群
WBB6F1/Kit-Kit ^{fl} /Kit ^{fl-v} /Slc	x23.37	x19.69
WBB6F1/KitSlc	x10.36	x9.43

(7) 病理所見では IBS 群では両群に有意差を認めず、IC 群において、CYP 投与による影響は肥満細胞欠損マウス (WBB6F1/kit-Kit^{fl}/Kit^{fl-v}/Slc) はコントロールマウス (WBB6F1/kitSlc) に比較して、炎症性変化が軽微であった。その傾向は IC+IBS 群でより顕著であった。

肥満細胞欠損マウス (WBB6F1/kit-Kit^{fl}/Kit^{fl-v}/Slc)

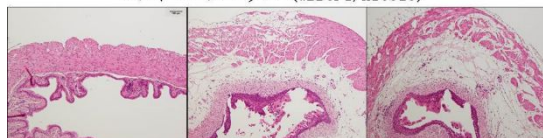


IBS群

IC群

IC+IBS群

コントロールマウス (WBB6F1/kitSlc)



IBS群

IC群

IC+IBS群

(8) 以上の各群の排尿動態の変化と病理所見の結果より、肥満細胞欠損マウス (WBB6F1/kit-Kit^{fl}/Kit^{fl-v}/Slc) では、特に IC 群において、CYP 投与による IC 様の変化 (1 回あたりの排尿量の減少) を軽減させたことより、肥満細胞の存在は炎症増悪因子であることが確認された。IC の病態解明には肥満細胞の意義をより詳細に検討する必要がある。各病態群での前後での排尿量の変化率に関しては、肥満細胞は炎症増悪因子であり、肥満細胞欠損マウス (WBB6F1/kit-Kit^{fl}/Kit^{fl-v}/Slc) が IC 群において CYP での変化を軽減させたことには大きな意味があると思われる。Freezing 行動の IC 群または IC+IBS 群での変化が肥満細胞欠損マウス (WBB6F1/kit-Kit^{fl}/Kit^{fl-v}/Slc) において顕著であった理由として、疼痛行動の代償的機能や排尿行動の影響も考えられるが、

その機序については今後の検討が必要である。IBS 群では急性拘束でのストレスによる変化であり、炎症状態とは異なるため、変化が認められなかった可能性がある。肥満細胞の役割が、通常状態と炎症状態とで異なる可能性があり、今後の検討課題である。また、肥満細胞そのものが IBS での関与が薄く、IC では関与が大きい結果が得られた。これらの結果に関しては、今後関連学会等で発表予定である。

<引用文献>

1. Br J Urol. 79:865,1997
2. Am J Gastroenterol. 102:2767,2007
3. Dig Liver Dis 41:721,2009
4. J Urol. 184:1358,2010
5. Gastroenterology. 129:1967,2005
6. Am J Physiol. 291:G658,2006
7. Br J Urol. 54:283,1982
8. Br J Urol. 59:230,1987
9. Br J Urol. 76:94,1995
10. J Urol. 157:669,1997
11. Urology. 53:1035,1999
12. Urology. 48:809,1996
13. Br J Urol 75:154,1995
14. J Urol. 164:852,2000
15. J Neuimmunol. 146:1,2004
16. Endocrinol. 145:43,2004
17. Endocrinology. 139:403,1998
18. J Pharmacol Exp Ther. 288:1349,1999
19. J Urol. 167:2461,2002
20. J Immunol. 171:4830,2003
21. Neurourol Urodyn, 29:501,2010

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

松本成史、ほか. ラット非細菌性前立腺炎モデルにおける下部尿路機能障害の検討. 第101回日本泌尿器科学会、2013年4月24日、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 成史 (MATSUMOTO, Seiji)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号: 10288912

(2) 研究分担者

西川 祐司 (NISHIKAWA, Yuuji)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90208166

柿崎 秀宏 (KAKIZAKI, Hidehiro)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10241324

橋爪 和純 (HASHIZUME, Kazumi)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号: 70596303