

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791664

研究課題名(和文)二分岐軸索による膀胱皮膚二重投射の尿意誘発メカニズムの解明と臨床的意義の検討

研究課題名(英文) Investigation for urinary urgency with dorsal root ganglion neurons projecting dichotomizing axons to both skin and bladder

研究代表者

柴田 泰宏 (Shibata, Yasuhiro)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10534745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：冷刺激で尿意が誘発される原因として膀胱と皮膚との間に関連痛類似の仕組みがあるのではないかと推測し研究を開始した。膀胱と皮膚へ2種類の逆行性神経トレーサーを投与した結果、これらを同時に含む神経細胞体をL6-S1の後根神経節に確認し、一部にTRPM8の発現を認めた。さらに、皮膚への冷刺激およびmenthol皮下投与により、膀胱知覚神経の活動電位が記録された。これらの結果から、膀胱と皮膚へ軸索を二重に投射するTRPM8陽性の知覚神経の存在が示された。これにより皮膚知覚の一部が中枢神経に至る過程で膀胱知覚と混同され、区別のできない形で認識されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to reveal the mechanism of urinary urgency evoked by cold sensation, we investigated the convergence of the primary sensory afferents of the skin and bladder. Dichotomizing afferents of L6-S1 dorsal root ganglion neurons that innervate the skin and bladder was constantly observed with retrograde neuron tracers in rats. In-situ hybridization revealed that approximately 8.0% of the double-labelled cells expressed transient receptor potential channel melastatin member 8 (TRPM8) transcripts in the dorsal root ganglions. Cold and menthol stimuli to the skin generated bladder nerve responses conducted through dichotomizing axons, which significantly decreased in the presence of the TRPM8 blocker BCTC. In conclusion, TRPM8-expressing sensory neurons with dichotomizing axons projecting to the skin and bladder may be responsible for the urinary urgency evoked by cold sensation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：膀胱 皮膚 二分岐軸索 後根神経節 TRPM8

### 1. 研究開始当初の背景

シャワーを浴びた瞬間や、冷水で手を洗ったときなど、周囲環境の急な温度の低下や皮膚刺激によって尿意切迫感や尿失禁を生ずることが経験的に知られており、これらは過活動膀胱の病態の一つと考えられる。また、脊髄損傷患者の大腿部から陰部にかけての皮膚領域に刺激を加えると排尿を誘発することが trigger voiding として知られ、脊髄損傷患者の排尿の補助として利用される場合がある。一方、皮膚と内臓の相互作用の例として鍼灸治療が知られており、尿・便失禁、間質性膀胱炎、夜尿症の治療に応用されている。このように皮膚刺激は膀胱知覚および膀胱収縮と密接に関係しているにもかかわらず、そのメカニズムは不明であった。

内臓知覚と体性知覚を混同して認識するメカニズムとして、心筋梗塞や狭心症で左肩・左上腕部痛を同時に認知することに代表される、関連痛という概念がある。この機構は、末梢の一次知覚神経線維が脳に至る間に内臓知覚と体性知覚神経回路が混同されることによって起こるとされ、その知覚刺激の合流部位によって4つの仮説(1:軸索反射説;一つの一次知覚神経が複数の臓器に軸索を延ばす、2:収束投射説;複数の知覚神経が一つの二次知覚神経に投射する、3:収束促通説;一つの一次知覚神経が他臓器を支配する一次知覚神経にシグナルを送る、4:Supraspinal interaction;脊髄より上位で感覚経路が混線する)が提唱されている。

### 2. 研究の目的

我々はこのような背景を元にし、皮膚知覚と膀胱知覚の関係について二分岐軸索をもつ後根神経節細胞が存在する可能性について検討してきた。つまり、同一の後根神経節細胞からの軸索が途中で分岐し、二分岐軸索となり、膀胱と皮膚へ同時に投射することにより、膀胱からの知覚と皮膚からの知覚が一次知覚神経のレベルで混同されて中枢から見た場合に両者が区別の付かない形で認識されるのではないかと考えた。これらの背景より逆行性神経トレーサーを使用して検討を行った結果、膀胱と皮膚に同時に軸索を投射する二分岐軸索の存在を証明することに成功し、さらにその二分岐軸索の一部に冷覚受容体として知られる TRPM8 が発現していることを形態学的に証明した。また、電気生理学的検討によって、冷刺激および TRPM8 のアゴニストであるメントールが二分岐軸索の神経活動に関与することを明らかにした。

これらの背景から、二分岐軸索の詳細についてさらに検討することによって寒冷刺激などの外的要因が尿意を引き起こすメカニズムについてより深い理解を得ることを本研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

・実験動物として Sprague Dawley ラットを使用。逆行性神経トレーサーを用いてラットの皮膚の知覚神経回路および膀胱の知覚神経回路の走行経路を標識、同定し明らかにする。

使用した神経トレーサーは、Fluoro Gold、diamidino yellow、Fast Blue、Alexa cholera toxin B conjugated、wheat germ agglutinin(WGA)。蛍光顕微鏡は名古屋市立大学医学部共同研究室の蛍光顕微鏡 Axio Vision(Zeiss)を用いた。実験動物に麻酔を施した後、膀胱および皮膚に上記逆行性神経トレーサーを注射し、一定の生存期間をおいてトレーサーが麻酔・環流固定後に後根神経節又は及び脊髄を採取、凍結切片を作製した後に蛍光顕微鏡を用いてトレースされた神経を形態学的に検索した。逆行性神経トレーサーの具体的な投与経路は、膀胱への神経トレーサー注入については下腹部を剃毛後に、下腹部正中切開を加えて膀胱を露出した後に、ハミルトンマイクロシリンジを用いて膀胱壁筋層内に全周に渡り均等の間隔で6カ所注入を行う。皮膚への逆行性神経トレーサー注入については、膀胱の知覚神経レベルと同じ L6-S1 にかけて、同じくハミルトンマイクロシリンジを用いて皮下注射を行う。

得られた検体を連続切片として、膀胱を支配する感覚神経、皮膚を支配する感覚神経、両者に同時に軸索を投射する二分岐軸索神経をカウントし、その陽性率を算出するとともに、二分岐軸索を持つ神経細胞体を材料として尿意に関連しているとされる機械刺激受容関連の分子などについて、特異性の高い抗体の存在するものについては免疫組織化学的に、特異性の高い抗体の存在しない分子については in situ hybridization 法を用いての検出を行った。具体的には、機械刺激受容に関与しているとされる TRPV4、TREK-1、ENaC/DEG family の発現や、ATP 受容体として知られる P2X3、最近機械刺激受容体として新規に報告された Piesol1/2 などについてその発現、分布が二分岐軸索をもつ感覚神経に重なっているかどうかを検討した。

上記、形態学的に得られた膀胱と皮膚へ同時に軸索を延ばす知覚神経細胞(二分岐軸索)の知見が正しいことを確認するため、電気生理学的手法によって二分岐軸索の証明を試みた。ウレタン麻酔後、脊髄以上の反射や自律神経の影響などを除外するため、ヤコビ線を目安に馬尾レベルで脊髄を切断した。膀胱側方に電極を当て、皮膚を刺激し膀胱側方で神経活動を記録した。

### 4. 研究成果

膀胱と皮膚分節 L6-S1 領域へそれぞれ異なる蛍光発色する逆行性神経トレーサーを注入した結果、L6-S1 の後根神経節に於いて、膀胱を支配する神経細胞体、皮膚を支配する神経細胞体、そして、両方の蛍光をもつ、膀胱と皮膚へ同時に軸索を投射する神経細胞

体が確認された。出現頻度は L6-S1 の平均で、皮膚へ軸索を延ばす神経細胞体が 16.7%、膀胱へ軸索を延ばす神経細胞体が 2.6%、皮膚と膀胱へ同時に軸索を延ばす神経細胞が 0.071%であった。二分岐軸索を持つ神経細胞体は、底頻度であるが、コンスタントに検出された。また、ラベリングの効率が 100%に届かないことを考えると、実際の出現頻度は得られた数字より若干高くなることが予想される。神経細胞体の直径のヒストグラムは、大部分が 1200 平方マイクロメートル以下であり、中型細胞から小型細胞によって構成されていることが示された。

得られた二分岐軸索をもつ神経細胞体のプロパティを知るため、*in situ hybridization* 法を用いて寒冷受容器候補遺伝子である TRPM8 の検出を試み、同神経細胞体の一部が TRPM8 を発現していることを確認した。他の感覚受容器候補として、TRPV4、Piezo2 などの遺伝子発現を検討したが、残念ながら発現は確認できなかった。

次に、電気生理学的検討の結果を示す。馬尾切断処理後に膀胱側方へ電極を当て、膀胱内に冷水、酢酸を注入し、活動電位が記録できることを確認した。次に、この状態で皮膚分節 L6-S1 領域に冷刺激、メンソール注入、溶媒注入をそれぞれ行った結果、皮膚への冷刺激とメンソール刺激が活動電位を生じさせた。また、TRPM8 阻害薬として知られている BCTC を投与語に冷刺激、またはメンソール刺激を行った結果、これらの刺激によって膀胱側方で得られる神経活動が有意に低下した。

これらの結果から、形態学的、電気生理学的に、膀胱と皮膚へ軸索を二重に投射する二分岐軸索を持つ感覚神経が後根神経節に存在することが示された。このことは、皮膚への刺激が膀胱知覚と混同されて認識される可能性があることを示唆する物と考えられた。

#### 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)

Hamakawa Takashi, Sasaki Shoichi, Shibata Yasuhiro, Imura Makoto, Kubota Yasue, Kojima Yoshiyuki, Kohri Kenjiro: interleukin-18 may lead to benign prostatic hyperplasia via thrombospondin-1 production in prostatic smooth muscle cells. Prostate, 74(6):p590-601. 2014.

[雑誌論文](計 1 件)

[学会発表](計 7 件)

柴田泰宏 佐久間英輔 渡辺正哉 熊本奈都子 植田高史 鷺川眞也

第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会 ASIC2a の機能獲得形質転換に認められた小脳変性の解析

2014 年 3 月 27 日～2014 年 3 月 29 日 自治医科大学キャンパス(栃木県)

柴田泰宏 佐久間英輔 渡辺正哉 熊本奈都子 植田高史 鷺川眞也

第 73 回日本解剖学会中部支部学術集会 ASIC2a 点変異トランスジェニックラットに認められた小脳変性の解析

2013 年 10 月 5 日～2013 年 10 月 6 日 山梨大学キャンパス(山梨県)

柴田泰宏 佐々木昌一 濱川隆 高田麻沙 井村誠 水野健太郎 岡田淳志 梅本幸裕 安井孝周 河合憲康 窪田泰江 林祐太郎 郡健二郎

第 101 回日本泌尿器科学会総会 前立腺肥大症の発生誘引物質としての GDNF の可能性

2013 年 4 月 25 日～2013 年 4 月 28 日 さっぽろ芸術文化の館(北海道)

岩月 正一郎、内木 拓、安井 孝周、濱川 隆、田口 和己、戸澤 啓一、佐々木昌一、林 祐太郎、郡 健二郎：血清 AFP 上昇を伴う後腹膜腫瘍を契機に発見された熟知が困難な精巣腫瘍の 1 例。

第 259 回日本泌尿器科学会東海地方 2013 年 3 月 10 日、名古屋市

Sasaki Shoichi, Iwatsuki Shoichiro, Umamoto Yukihiro, Kubota Hiroki, Kubota Yasue, Mizuno Kentaro, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Androgen receptor is negatively regulated by feminization factor 1b(Fem1b) in mammalian testis. 10th International Congress of Andrology 2013.2.23-36, Melbourne

濱川 隆、窪田 泰江、井村 誠、柴田泰宏、早瀬 麻沙、日比野 充伸、佐々木 昌一、郡 健二郎：過活動膀胱に対するミラベグロンの有用性・安全性の検討。

第 18 回東海排尿障害研究会 2013 年 2 月 9 日、名古屋市

安井 孝周、戸澤 啓一、黒川 覚史、濱川 隆、藤井 泰普、新美 和寛、廣瀬 泰彦、岩月 正一郎、井村 誠、岡田 淳志、水野 健太郎、窪田 泰江、梅本 幸裕、河合 憲康、佐々木 昌一、林 祐太郎、小島 祥敬、郡 健二郎：90g 以上の大きな前立腺に対するロボット支援下前立腺全摘除術の経験。

第 5 回日本ロボット外科学会学術集会 2013 年 1 月 19 日、名古屋市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)  
なし

取得状況(計 0 件)  
なし

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

柴田 泰宏 (SHIBATA YASUHIRO)  
名古屋市立大学大学院医学研究科  
機能組織学分野・助教  
研究者番号：10534745

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

佐々木 昌一 (SASAKI SHOICHI)  
名古屋市立大学大学院医学研究科  
腎・泌尿器科学分野・准教授  
研究者番号：50225869

鵜川 眞也 (UGAWA SHINYA)  
名古屋市立大学大学院医学研究科  
機能組織学分野・教授  
研究者番号：20326135

濱川 隆 (HAMAKAWA TAKASHI)  
名古屋市立大学大学院医学研究科  
腎・泌尿器科学 臨床研究医  
研究者番号：40595394

小島 祥敬 (KOJIMA YOSHIYUKI)  
福島県立医科大学医学部  
泌尿器科 教授  
研究者番号：60305539

郡 健二郎 (KOHRU KENJIRO)  
名古屋市立大学大学院医学研究科  
腎・泌尿器科学 教授  
研究者番号：30122047