

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月10日現在

機関番号：14202
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21592068
 研究課題名（和文）間質性膀胱炎発症における酸感受性侵害受容器分子（ASICおよびTRPV1）の関与
 研究課題名（英文）Contribution of acid-sensing nociceptor molecules (ASIC and TRPV1) to symptom onset in interstitial cystitis
 研究代表者
 荒木 勇雄 (ARAKI ISAO)
 滋賀医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：50252424

研究成果の概要（和文）：本研究により、Acid-Sensing Ion Channel (ASIC) の膀胱における発現の局在が解明された。さらに、膀胱におけるASICの局在や排尿反射の酸感受性における性差が証明され、ASICが膀胱における酸感受性をコントロールすることによって、女性に多い間質性膀胱炎の発症に関与している可能性が示唆された。膀胱知覚神経路における侵害刺激受容メカニズムの一端が解明され、今後の研究の発展により間質性膀胱炎に対する新しい治療薬の開発に繋がる可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：The study elucidated the localization of acid-sensing ion channels (ASICs) in the bladder. The sex-related differences in expression profile of ASIC and in bladder response to intravesical acid irritation indicated that ASICs may contribute to the symptom onset in interstitial cystitis preferably occurring in women by controlling acid sensitivity in the bladder sensory pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：膀胱上皮，イオンチャネル，知覚，痛み，炎症

1. 研究開始当初の背景

間質性膀胱炎あるいは膀胱痛症候群は、蓄尿時の膀胱部（恥骨上部）の疼痛を特徴とし、昼間・夜間の頻尿を伴う症候群であり、QOLを著しく障害する。欧米での罹患率は極めて高く（40～450対10万）、女性に多いことが特徴である（男女比＝1:5～10）。本邦においても間質性膀胱炎に対する認識が広まりつつあり、日本排尿機能学会の住民アンケート

調査では、1～2.2%に膀胱痛を認めると報告されている。しかしながら、その病因はいまだに不明であり、確立された治療法も存在しない。したがって、間質性膀胱炎の病因解明と治療法の開発は、泌尿器科学領域に課せられた今日の主要テーマの一つである。発症機序として、膀胱上皮の機能異常に伴い上皮透過性が亢進し、尿中刺激物質の侵入に伴う膀胱間質の慢性炎症が引き金になると

考えられている (Parsons & Hurst, 1990)。また、間質性膀胱炎では、知覚神経系 (C 線維) が感作され知覚過敏状態となっていることが知られている (Elbadawi, 1997)。疼痛の神経伝達に關与する侵害受容器のうち、酸感受性侵害受容器は慢性炎症での組織アシドーシスによる疼痛の発現に中心的役割を担っている (Reeh & Kress, 2001)。したがって、間質性膀胱炎症状の発症においても酸感受性侵害受容器が關与している可能性は高い。近年、疼痛発症に關与する酸感受性侵害受容器分子として、Transient Receptor Potential channel (TRP) V1 や Acid-sensing ion channel (ASIC) (Wemmie et al, 2006) が注目されている。

2. 研究の目的

間質性膀胱炎の罹患率に見られる大きな性差および最近我々が証明した排尿反射求心路 (末梢) の酸化学刺激に対する反応性の性差に注目し、予備実験にてその発現に性差を認めた酸感受性侵害受容器分子である ASIC および TRPV1 の間質性膀胱炎の発症機序における關与を解明する。本研究によって、間質性膀胱炎発症の原因分子のひとつが特定されるとともに、治療薬の開発に道が開かれることが期待される。

具体的な検討課題は以下の3点である。

(1) 膀胱における侵害受容器、特に酸感受性を有する侵害受容器候補分子の発現について、雌雄差に注目して解析する。酸感受性を有する侵害受容器の有力な候補分子である TRPV1, ASIC, TWIN-related K⁺ channel (TREK-1) のほか、TRPA1, TRPM8, TRPV2 などの侵害受容器候補分子を対象として、マウス膀胱における遺伝子発現の雌雄差を検討する。特に、これまでに膀胱での報告のない酸感受性侵害受容器分子である ASIC の発現を中心に詳細に解析する。

(2) 酢酸 (pH 3.0) 膀胱内還流による酸化学刺激に対する排尿反射の反応 (排尿間隔の短縮) における雌雄差に、TRPV1 あるいは ASIC が關与しているかを *in vivo* 実験にて検討する。

(3) マウス間質性膀胱炎モデルおよびヒト間質性膀胱炎患者の膀胱における ASIC・TRPV1 の発現について解析する。

3. 研究の方法

(1) マウス膀胱における ASIC 発現実験

① ASIC 発現の雌雄差

ASIC 各サブユニットの発現量の雌雄差を検討する (real-time RT-PCR)

② ASIC 発現の局在

抗 ASIC 抗体による免疫組織染色を用いて、ASIC 蛋白発現の局在を解析する。

③ 膀胱の局在別 ASIC 発現の雌雄差

ASIC の局在が確認された段階で、膀胱粘膜と筋層を分けてそれぞれにおける ASIC の発現量を解析し、雌雄差を検討する (real-time RT-PCR, Western hybridization)。

(2) 排尿反射の酸感受性に対する ASIC, TRPV1 の關与に関する *in vivo* 実験
除脳マウスにおいて、膀胱瘻を作成し、生食を膀胱内に持続的に灌流することによって排尿反射を誘発し、膀胱内圧測定を行う。酢酸 (pH 3.0) を膀胱内に還流する酸化学刺激に対する排尿反射の反応 (排尿間隔の短縮; Yoshiyama et al, 2008) に対する ASIC アンタゴニスト (A-317567, amiloride) および TRPV1 アンタゴニスト (capsazepine) の膀胱内還流あるいは全身投与の効果を解析検討する。

(3) マウス間質性膀胱炎モデルにおける ASIC, TRPV1 の発現

Cyclophosphamide (200 mg/kg) を腹腔内に投与し、経時的 (12 時間, 24 時間, 48 時間, 7 日間, 2 週間) に膀胱における ASIC・TRPV1 の発現変化を解析し、正常膀胱における発現と比較検討する (real-time RT-PCR, Western hybridization)。

(4) ヒト間質性膀胱炎患者における ASIC, TRPV1 の発現

間質性膀胱炎女性患者における膀胱粘膜標本と女性膀胱癌患者の正常膀胱粘膜標本を用いて、ASIC および TRPV1 の発現量

(real-time RT-PCR・Western hybridization) と発現の局在 (免疫染色) を解析し比較検討する。

4. 研究成果

(1) マウス膀胱における ASIC および TRPV1 の発現には雌雄差が存在した。膀胱における ASIC サブユニットの局在には特異性があり、膀胱粘膜における ASIC1 および膀胱平滑筋における ASIC2 の発現に性差があることが判明した (BJU Int 104: 1746, 2009)。

(2) マウス間質性膀胱炎モデルにおいて各 ASIC サブユニットの経時的発現変化を明らかにした (International Continence Society 40th Annual Meeting, Toronto, Canada, August 23-27, 2010)。

(3) マウス *in vivo* 実験において、酢酸膀

膀胱内還流による排尿間隔の短縮には有意な雌雄差が存在した。これは膀胱知覚神経伝達系の酸感受性に性差があることを示す実験結果であり、間質性膀胱炎の発症率における性差と関連していることが示唆された (Am J Physiol 295: R954, 2008)。

(4) 膀胱に発現する酸感受性イオンチャネル (TRPV1, ASIC) が膀胱排尿反射の酸感受性における雌雄差に関与している可能性が示された。しかし、TRPV1 アンタゴニストを用いた実験の結果は、TRPV1 の関与は些細なものであることを示し、ASIC の関与を強く示唆した (Am J Physiol 298: F1351, 2010)。これらの実験結果から、雌雄差を持って膀胱に発現する ASIC が膀胱排尿反射の酸感受性をコントロールすることによって、間質性膀胱炎の発症に関与している可能性が考えられた。

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)

[雑誌論文] (計 5 3 件)

原著 (英文)

1) Wu Y, Miyamoto T, Li K, Nakagomi H, Sawada N, Kira S, Kobayashi H, Zakohji H, Tsuchida T, Fukazawa M, Araki I, Takeda M: Decreased expression of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV5 and TRPV6 in human renal cell carcinoma associated with vitamin D receptor. J Urol 186(6): 2419-2425, 2011.

doi: 10.1016/j.juro.2011.07.086. (査読あり)

2) Beppu M, Araki I, Yoshiyama M, Du S, Kobayashi H, Zakoji H, Takeda M: Bladder outlet obstruction induced expression of prostaglandin E₂ receptor subtype EP4 in the rat urinary bladder: a possible counteractive mechanism against detrusor overactivity. J Urol 186(6): 2463-2469, 2011.

doi: 10.1016/j.juro.2011.07.087. (査読あり)

3) Yoshida A, Seki M, Nasrin S, Otsuka A, Ozono S, Takeda M, Masuyama K, Araki I, Ehlert FJ, Yamada S: Characterization of muscarinic receptors in the human bladder mucosa: direct quantification of subtypes using 4-DAMP mustard. Urology 78(3): 721.e7-e12, 2011.

doi: 10.1016/j.urology.2011.05.011. (査読あり)

4) Seki M, Ogoda M, Kuraoka S, Otsuka A, Ozono S, Takeda M, Masuyama K, Araki I, Yamada S: Muscarinic receptor binding of

imidafenacin in the human bladder mucosa and detrusor and parotid gland. LUTS: Lower Urinary Tract Symptoms 3(2): 64-68, 2011.

DOI: 10.1111/j.1757-5672.2011.00089.x (査読あり)

5) Takeda M, Homma Y, Araki I, Kakizaki H, Yamanishi T, Yokota T, Gotoh M, Igawa Y, Seki N, Takei M, Yoshida M, Sugaya K, Nishizawa O. The Japanese Naftopidil Neurogenic Lower Urinary Tract Dysfunction Study Group: Predictive factors for the effect of alpha1-D/A adrenoceptor antagonist, naftopidil, on subjective and objective parameters in patients with neurogenic lower urinary tract dysfunction. BJU Int 108(1): 100-107, 2011.

doi: 10.1111/j.1464-410X.2010.09682.x. (査読あり)

6) Yoshiyama M, Araki I, Kobayashi H, Zakoji H, Takeda M: Functional roles of TRPV1 channels in lower urinary tract irritated by acetic acid: in-vivo evaluations on the sex difference in decerebrate unanesthetized mice. Am J Physiol Renal Physiol 298: F1351-F1359, 2010.

doi: 10.1152/ajprenal.00695.2009. (査読あり)

7) Kobayashi H, Yoshiyama M, Zakoji H, Takeda M, Araki I: Sex differences in expression profile of acid-sensing ion channels in the mouse urinary bladder: a possible involvement in irritative bladder symptoms. BJU Int 104(11): 1746-1751, 2009. (査読あり)

doi: 10.1111/j.1464-410X.2009.08658.x.

8) Araki I, Haneda Y, Mikami Y, Takeda M: Incontinence and detrusor dysfunction associated with pelvic organ prolapse: clinical value of preoperative urodynamic evaluation. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct 20(11): 1301-1306, 2009.

doi: 10.1007/s00192-009-0954-2. (査読あり)

9) Mochizuki T, Sokabe T, Araki I, Fujishita K, Shibasaki K, Uchida K, Koizumi S, Takeda M, Tominaga M: The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca²⁺ influx and ATP release in primary urothelial cell cultures. J Biol Chem 284(32):21257-21264, 2009. (査読あり)

doi: 10.1074/jbc.M109.020206.

10) Du S, Hiramatsu N, Hayakawa K, Kasai A, Okamura M, Huang T, Yao J,

Takeda M, Araki I, Sawada N, Paton AW, Paton JC and Kitamura M: Suppression of NF- κ B by cyclosporine A and tacrolimus (FK506) via induction of the C/EBP family: implication for unfolded protein response. *J Immunol* 182(11): 7201-7211, 2009. doi: 10.4049/jimmunol.0801772. (査読あり)

総説 (英文)

1 1) Takeda M, Mochizuki T, Yoshiyama M, Nakagomi H, Kobayashi H, Sawada N, Zakoji H, Du S, Araki I: Sensor mechanism and afferent signal transduction of the urinary bladder: special focus on TRP ion channels. *LUTS: Lower Urinary Tract Symptoms* 2(2): 51-60, 2010. DOI: 10.1111/j.1757-5672.2010.00074.x (査読あり)

1 2) Araki I, Yoshiyama M, Kobayashi H, Mochizuki M, Du S, Okada Y, Takeda M: Emerging families of ion channel involved in urinary bladder nociception. *Pharmaceuticals* 3(7): 2248-2267, 2010. doi:10.3390/ph3072248 (査読あり)

1 3) Nishizawa O, Araki I, Ishizuka O, Uchimura N, Oh-oka H, Ozono S, Kakizaki H, Kasahara M, Gotoh M, Sakakibara R, Shinbo H, Sugaya K, Suzuki Y, Sone A, Takei M, Takeda M, Hirayama A, Homma Y, Yamaguchi O, Yamanishi T, Yokoyama O, Yoshida M: Clinical guidelines for nocturia. *Int J Urol* 17(5): 379-409, 2010. doi: 10.1111/j.1442-2042.2010.02527.x. (査読あり)

1 4) Takeda M, Araki I, Mochizuki T, Nakagomi H, Kobayashi H, Sawada N, Zakoji H: The forefront for novel therapeutic agents based on the pathophysiology of lower urinary tract dysfunction: pathophysiology of voiding dysfunction and pharmacological therapy. *J Pharmacol Sci* 112(2): 121-127, 2010. doi: 10.1254/jphs.09R17FM (査読あり)

1 5) Homma Y, Araki I, Igawa Y, Ozono S, Gotoh M, Yamanishi T, Yokoyama O, Yoshida M: Clinical guideline for male lower urinary tract symptoms. *Int J Urol* 16(10): 775-790, 2009. doi: 10.1111/j.1442-2042.2009.02369.x. (査読あり)

1 6) Araki I, Du S, Kobayashi H, Yoshiyama M, Takeda M: Mechanosensitive ion channels in bladder sensory transduction. *LUTS: Lower Urinary Tract Symptoms* 1(Suppl 1):

S18-S21, Sept. 2009.

DOI: 10.1111/j.1757-5672.2009.00021.x (査読あり)

[学会発表] (計 180 件)

特別講演, シンポジウムなど

1) 荒木勇雄: 臨床からみた排尿筋低活動へのアプローチ. 教育セミナー3-12「排尿筋低活動の治療をどう考える?」第100回日本泌尿器科学会総会, 横浜, 2012.4.21-24.

2) 荒木勇雄: 特別講演「蓄尿はどのようにして知覚されるのか?膀胱上皮と機械感受性イオンチャネルの役割」愛宕 GU フォーラム, 東京 (慈恵医大), 2012.3.22.

3) 荒木勇雄: 特別講演「女性の下部尿路機能障害」愛知県泌尿器科医会, 名古屋, 2012.2.18.

4) 荒木勇雄: 過活動膀胱診療ガイドライン診断の実践と問題点ー. イブニングシンポジウム「過活動膀胱診療ガイドライン 改訂ダイジェスト版, 間質性膀胱炎診療ガイドライン」第61回日本泌尿器科学会中部総会, 京都, 2011.11.16-18.

5) 荒木勇雄: Mechanosensitive ion channels in bladder mechanosensation. イブニングセミナー1「尿路上皮を科学するー膀胱壁におけるシグナル伝達と過活動膀胱の尿中マーカーの探索ー」第18回日本排尿機能学会, 福井, 2011.9.15-18.

6) 荒木勇雄: 膀胱知覚情報伝達システムにおける機械感受性イオンチャネルの役割. サテライトセミナー「蓄尿症状」膀胱蓄尿症状をつかさどる分子メカニズム 解き明かされる蓄尿機能 基礎から臨床」第99回日本泌尿器科学会総会, 名古屋, 2011.4.21-24.

7) 荒木勇雄: 尿路上皮の ENaC/TRPV チャネル. シンポジウム1「下部尿路機能障害の薬物療法ー現状と展望」第17回日本排尿機能学会, 甲府, 2010.9.29-10.1.

8) 荒木勇雄: 私の下部尿路機能研究の歴史. オープニングセミナー「下部尿路機能研究: 私の歴史」第17回日本排尿機能学会, 甲府, 2010.9.29-10.1.

9) 荒木勇雄: OAB治療の現状と新規治療ターゲット. シンポジウム: 過活動膀胱 (OAB) の基礎と臨床. 第52回日本平滑筋学会総会, 仙台, 2010.7.1-2.

10) 荒木勇雄: 膀胱のメカノセンサー. 第12回UTPシンポジウム, 東京, 2010.1.16-17.

一般演題 (国際学会)

1 1) Kobayashi H, Yoshiyama M, Inuzuka H, Kira S, Nakagomi H, Miyamoto T,

Haneda Y, Sawada N, Zakoji H, Tsuchida T, Araki I, Takeda M. Gene expression patterns of acid-sensing ion channels (ASICs) families in mammalian bladder. International Continence Society 40th Annual Meeting, Toronto, Canada, August 23-27, 2010.

1 2) Yoshiyama M, Araki I, Kobayashi H, Zakoji H, Takeda M. Intravesical infusion of a non-amiloride blocker of acid-sensing ion channels fails to affect lower urinary tract activity in unanesthetized decerebrate mice. International Continence Society 40th Annual Meeting, Toronto, Canada, August 23-27, 2010.

1 3) Mochizuki T, Nakagomi H, Miyamoto T, Araki I, Yoshiyama M, Takeda M. The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca²⁺ influx and ATP release in primary urothelial cell cultures using original culture cell stretch system. American Urological Association 105th annual meeting, San Francisco, CA, USA, May 29-June 3, 2010.

1 4) Kobayashi H, Yoshiyama M, Araki I, Kira S, Inuzuka H, Nakagomi H, Miyamoto T, Haneda Y, Sawada N, Kamiyama M, Kudou S, Zakoji H, Tsuchida T, Fukasawa M, Takeda M. Sex difference in expression profiles of acid-sensing ion channels and transient receptor potential channel v1 in the mouse urinary bladder. European Association of Urology 25th Annual Congress, Barcelona, Spain, April 16-20, 2010.

1 5) Yoshiyama M, Kobayashi H, Araki I, Zakoji H, Takeda M: Effect of intravesical infusion of capsazepine, a TRPV1 blocker, on activity of the lower urinary tract irritated by acetic acid in unanesthetized decerebrate mice. International Continence Society 39th Annual Meeting, San Francisco, USA, September 29-October 3, 2009.

1 6) Kobayashi H, Yoshiyama M, Araki I, Sawada N, Mochizuki T, Zakoji H, Takeda M: Sex difference in expression profile of acid-sensing ion channels and transient receptor potential channel V1 in the mouse urinary bladder. International Continence Society 39th Annual Meeting, San Francisco, USA, September 29-October 3, 2009.

1 7) Miyamoto T, Mochizuki T, Zakoji H, Kobayashi H, Yoshiyama M, Araki I, Takeda M: The expression of transient receptor potential (TRP) V4, A1 and V1 in

the human bladder mucosa of normal and bladder outlet obstruction: a novel mechanism in the obstruction-induced bladder overactivity. International Continence Society 39th Annual Meeting, San Francisco, USA, September 29-October 3, 2009.

1 8) Tsuchida T, Miyamoto T, Yamagishi T, Kira S, Kayanuma K, Haneda Y, Kobayashi H, Zakoji H, Araki I, Takeda M: The effect of chinese herbal medicine containing aconitine on the pain relief in interstitial cystitis patients- a preliminary study. American Urological Association 104th annual meeting, Chicago, IL, USA, April 25-30, 2009.

〔図書〕 (計 1 4 件)

英文

1) Isao Araki: TRP channels in urinary bladder mechanosensation. In: Advances in Experimental Medicine & Biology, vol. 704, The Transient Receptor Potential Channel, Md. Shahidul Islam (ed.), Springer, Dordrecht, pp. 861-879, 2011. doi: 10.1007/978-94-007-0265-3_45.

和文

2) 荒木勇雄, 岡田裕作: 排尿障害・排尿痛 日常診療でよくみる症状・病態－診断の指針・治療の指針－. XI. 腎臓および泌尿器系の異常. 総合臨床 2011年5月増刊号 60: 401-406, 2011.5.20.

3) 荒木勇雄: 過活動膀胱 (泌尿器・男性性器疾患)「今日の診断指針」第6版. 金沢一郎, 永井良三 総編集, pp. 1719-1720, 医学書院, 東京, 2010.3.15.

4) 荒木勇雄: II. 夜間頻尿の治療. 第1章 夜間頻尿の診断と治療. 「日本泌尿器科学会 2009年卒後教育テキスト」(第14巻2号). 内藤誠二編集. pp. 18-25, 日本泌尿器科学会, 東京, 2009.9.30.

5) 荒木勇雄, 羽根田破, 三神裕紀: 神経因性膀胱に対してコリン作動薬は有効か? (G. 下部尿路機能障害)「EBM 泌尿器科疾患の治療 2009-2010」後藤百万, 小川修, 笈善行, 出口隆, 鈴木孝治編集, pp 337-341, 中外医学社, 東京, 2009.5.1.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 勇雄 (ARAKI ISAO)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 50252424

(2)連携研究者

武田 正之 (TAKEDA MASAYUKI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：80197318

小林 英樹 (KOBAYASHI HIDEKI)

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50402053

芳山 充晴 (YOSHIYAMA MITSUHARU)

山梨大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：20422694

望月 勉 (MOCHIZUKI TSUTOMU)

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50377496

水流 輝彦 (TSURU TERUHIKO)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：90625675