

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592429

研究課題名(和文) 下部尿路機能障害における脊髄グリア細胞を介した中枢性感作メカニズムの関与

研究課題名(英文) Central sensitization mechanism depends on microglia participates in Lower Urinary Tract Symption

研究代表者

水流 輝彦 (Tsuru, Teruhiko)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：90625675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：間質性膀胱炎のモデルとして汎用されている化学発症膀胱炎モデルを用いた実験を行った。脊髄グリア細胞はcontrol群と比較して、GFAP、Iba1、Ox-18、AB144Pそれぞれの活性化マーカーで染色されることが確認できた。このことから膀胱の炎症モデルである間質性膀胱炎モデルにおいて脊髄グリア細胞は活性化されていると考えられる。膀胱の知覚過敏に脊髄グリア細胞を介した中枢性感作が関与している可能性が示唆される。マイクロアレイでも、間質性膀胱炎モデルにおいて発現がアップした遺伝子があり、それらの中に中枢性感作を起こした脊髄グリア細胞の発現遺伝子が含まれていると考える。

研究成果の概要(英文)：We make an experiment with interstitial cystitis model to certificate the association between microglia and Lower Urinary Tract Symption . Microglia is stained more than control model by activation makers; GFAP, Iba1, Ox-18, AB144P. Microglia is activated in interstitial cystitis model. It shows Central sensitization mechanism with microglia is concern with hypersensitivity of bladder. We make a microarray. some gene in interstitial cystitis model are expressed more than in control model. It shows gene of activated maicroglia is included in these.

研究分野：排尿管学

キーワード：下部尿路機能障害

1. 研究開始当初の背景

Hyperalgesia(痛覚過敏)や allodynia(異痛症)といった病的な慢性疼痛の原因は、求心路における反応閾値が低下する、あるいは同じ刺激に対して感受性が亢進する sensitization(感作あるいは過敏化)が原因とされている。過活動膀胱や間質性膀胱炎の発症メカニズムとしても、この感作(hypersensitivity: 知覚過敏)が想定されている(Yamaguchi O, 2007)。

従来、末梢性の感作(peripheral sensitization)におけるメカニズムを中心に研究がなされており、膀胱における知覚神経に対する刺激(化学伝達物質放出、平滑筋収縮活動)の増強や末梢知覚神経における刺激(化学伝達物質)に対する感受性の亢進に関連したメカニズムについて多くの研究成果が発表されてきた。しかしながら、過活動膀胱や間質性膀胱炎発症における中枢性のメカニズムに関する研究報告は少ない。

神経科学分野における精力的な基礎研究により、慢性疼痛における中枢性感作(central sensitization)のメカニズムが解明されてきた。特に近年、脊髄グリア細胞(microglia および astrocyte)の重要な役割が注目を集めている(Watkins LR et al, 2001; Scolz J & Woolf C, 2007)。末梢の刺激により知覚神経の中枢側(脊髄)終末から放出された神経伝達物質(グルタミン酸、サブスタンスP, CGRP など)により活性化された脊髄グリア細胞は、proinflammatory cytokine (TNF, IL-1, IL-6)や chemokine (CCL2)の放出、神経活性物質の放出(グルタミン酸、活性酸素、プロスタグランジン、ATP、アラキドン酸など)、シナプス間隙からのグルタミン酸取り込みの抑制などのメカニズムによって、中枢側知覚神経終末からの神経伝達物質(グルタミン酸、サブスタンスP など)の放出増強、脊髄後角ニューロン(脊髄における知覚伝達ニューロン)のグルタミン酸受容体(NMDA/AMPA)の感受性亢進を生じさせて求心路における中枢性感作を発生・維持させると考えられている。

これら中枢性感作における脊髄グリア細胞の関与は、もっぱら体性痛覚において研究されていたが、近年では内臓の知覚過敏(hyperalgesia あるいは hypersensitivity)においてもグリア細胞が重要な役割を担っていることが示唆されるようになってきた(Saab CY et al, 2007; Bradesi S, 2010)。したがって、膀胱を支配する知覚神経の中枢(脊髄)における感作メカニズムにもグリア細胞が関与している可能性は高い。

今回の研究では膀胱の知覚過敏状態と定義される過活動膀胱や間質性膀胱炎の発症における脊髄グリア細胞活性化の役割を検討することである。

2. 研究の目的

過活動膀胱や間質性膀胱炎などの下部尿路機能障害の病態解明と治療法の開発は、今日の泌尿器科学分野における重要な課題の一つである。病的慢性疼痛の原因とされる感作のうち、中枢性感作(central sensitization)の発生と維持に欠かせない脊髄グリア細胞は、体性疼痛ばかりでなく、内臓の知覚過敏(hyperalgesia あるいは hypersensitivity)においても重要な役割を担っていることが分かってきた。したがって、膀胱における知覚過敏状態である間質性膀胱炎や過活動膀胱といった下部尿路、特に蓄尿機能障害の発症に脊髄グリア細胞が関与している可能性は極めて高い。

本研究の目的は、過活動膀胱や間質性膀胱炎といった各種下部尿路機能障害の発生における脊髄グリア細胞を介した中枢性感作の関与を証明することである。本研究の成果によって、これまでとはまったく異なった新たな視点からの治療薬の開発の道を期待している。

3. 研究の方法

(1) ラットの各種下部尿路機能障害モデル(間質性膀胱炎、過活動膀胱)における脊髄グリア細胞の関与を証明する。神経障害性疼痛や炎症性疼痛における中枢性感作において脊髄グリア細胞が活性化される。したがって、慢性炎症が基盤となる間質性膀胱炎モデルや虚血に伴う除神経が関与する部分尿道閉塞による過活動膀胱モデルにおいて脊髄グリア細胞を介した中枢性感作が関与している可能性は高い。したがって、これら下部尿路機能障害モデルにおけるグリア細胞の活性化を証明するとともに、活性化を阻害した場合やグリア細胞の活性化の結果放出される proinflammatory cytokine や chemokine の作用を阻害した場合の下部尿路機能障害モデルでの膀胱機能(排尿反射)の改善が見られるかどうかを検討する。

脊髄グリア細胞における活性化に特徴的な形態変化および活性化マーカーの発現

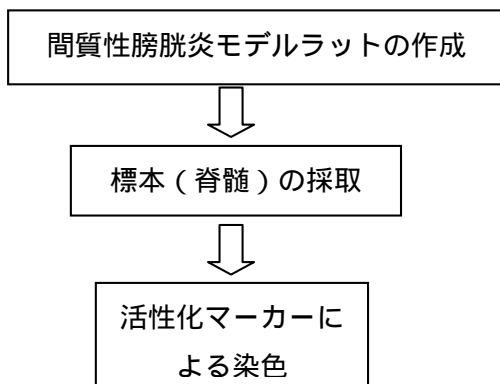
脊髄グリア細胞の活性化を阻止することによる膀胱機能の変化

脊髄における proinflammatory cytokine や chemokine を阻害することによる膀胱機能の変化

(2) 正常ラットにおいて、脊髄グリア細胞の活性化や proinflammatory cytokine・chemokine の髄腔内投与によって膀胱機能にどのような変化を及ぼすかを検討する。

脊髄グリア細胞の活性化によって生じる膀胱機能の変化を確認する

proinflammatory cytokine や chemokine を髄腔内に投与することによって生じる膀胱機能の変化を確認する



4. 研究成果

(1) ラットの各種下部尿路機能障害モデルにおける脊髄グリア細胞の関与を証明するために、間質性膀胱炎モデルの作成を行った。8週齢の雌性 Wistar ラットを用いて実験を行った。今回の実験では間質性膀胱炎のモデルとして汎用されている化学発症膀胱炎モデルを用いた。実験の48時間前にラット(150mg/kg)となるように生理食塩液で調整し腹腔内投与を行った。controlにも同量の生理食塩液の腹腔内投与を行った。

対象をペントバルビタールナトリウム麻酔下(50 mg/kg, 腹腔内投与)に、下腹部切開を行い、脱血し還流固定を行った後に脊髄を採取した。

脊髄におけるグリア細胞の活性化を確認するために、ABC法(avidin-biotinylated peroxidase complex)による染色を行った。

活性化マーカーとして GFAP (glial fibrillary acidic protein)、Iba1、Ox-18、AB144Pを用いた。

脊髄グリア細胞は control 群と比較して、GFAP、Iba1、Ox-18、AB144P それぞれの活性化マーカーで染色されることが確認できた。このことから膀胱の炎症モデルである間質性膀胱炎モデルにおいて脊髄グリア細胞は活性化されていると考えられる。このことより脊髄グリア細胞を介した中枢性感作が関与している可能性が示唆される。

(2) 膀胱炎モデルの確認

今回の実験では、間質性膀胱炎のモデルとして汎用されている化学発症膀胱炎モデルを用いたが、実際に膀胱炎モデルが作成されているかを確認した。

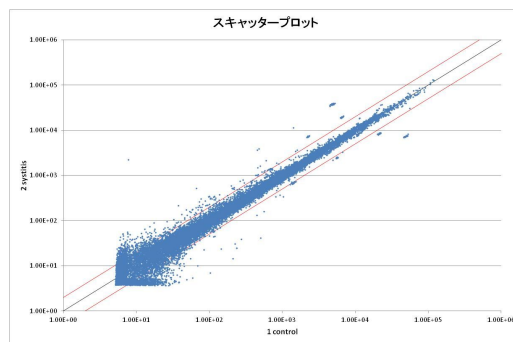
モデルの膀胱を摘出し、ホルマリン固定したのちに、HE染色を行った。炎症細胞の出現を認めており、膀胱炎モデルは作成できていると考えた。

(3) 間質性膀胱炎モデルと control 群の2群間における mRNA の二群間の遺伝子発現比較

間質性膀胱炎モデルおよび control 群より脊髄を採取した。Rneasy Plus Mini Kitを用いて RNA サンプルの抽出を行った。

マイクロアレイ (Hokkaido System Science Co.Ltd) は外部委託にて行った。

間質性膀胱炎モデルで2倍以上発現がアップした遺伝子があり、それらの中に中枢性感作を起こした脊髄グリア細胞の発現遺伝子が含まれていると考えられる。



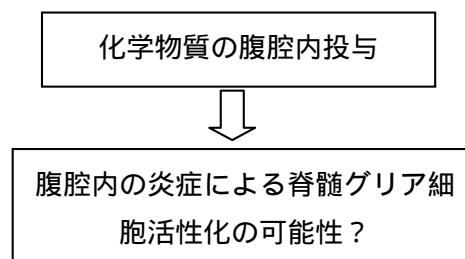
今回は間質性膀胱炎モデルのみでの結果であるが、下部尿路閉塞による過活動膀胱モデルでも同様に遺伝子発現に差を認めれば、脊髄グリア細胞の活性化における責任遺伝子を同定できることが考えられる。

今後の課題と展望

今回は化学薬品の腹腔内投与による間質性膀胱炎モデルを作成し、脊髄グリア細胞の活性化を示した。しかし、このモデルでは化学薬品の腹腔内投与による直接的な疼痛により脊髄グリア細胞の活性化が生じている可能性がある。

今後、人工的に下部尿路閉塞をおこすことで過活動膀胱モデルを作成し、同様の実験検討を行うことで、下部尿路機能障害の発症に脊髄グリア細胞が関与している可能性をさらに追求していく。

グリア細胞の活性化を阻害した場合に間質性膀胱炎や過活動膀胱の症状の発症が抑制されるか、グリア細胞の活性化の結果放出されるサイトカインの作用を阻害した場合に下部尿路機能障害モデルでの膀胱機能(排尿反射)の改善が見られるかどうかを引き続き検討する。





並行して他のモデルでの
追加実験の継続

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)
現在、これまでの実験結果を学会発表すべくデータをまとめている。

6. 研究組織

(1)研究代表者

水流 輝彦 (TSURU, Teruhiko)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：90625675

(2)研究分担者

荒木 勇雄 (ARAKI, Isao)
滋賀医科大学・医学部・客員教授
研究者番号：50252424

影山 進 (KAGEYAMA, Susumu)
滋賀医科大学・医学部・講師
研究者番号：50378452

(3)連携研究者

遠山 育夫 (TOOYAMA, Ikuo)
滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・教授
研究者番号：20207533