

論文の内容の要旨

論文題目：膀胱機能調節および炎症性膀胱痛発現における Transient Receptor Potential M2 および A1 チャネルの役割—ノックアウトマウスを用いた検討

氏名：亀井 潤

【目的】

間質性膀胱炎は、膀胱内にハンナ病変または膀胱拡張後の粘膜出血を認め、前者をハンナ型、後者を非ハンナ型と呼ぶ。いずれも膀胱の過知覚症状（膀胱不快感、膀胱痛、頻尿）を主症状とする慢性疾患であり、著しい QOL の低下を招く。特にハンナ型は、病理組織学的に、膀胱尿路上皮の脱落との尿路上皮下層へのびまん性の炎症細胞浸潤とを特徴としており、さらに炎症性疼痛と関連する遺伝子の発現が上昇していることが報告されていることから、この疾患の背景には、膀胱を起源とした炎症性疼痛の存在が示唆されている。しかし、病態の全容解明および有効な治療法の確立はなされておらず、2015年に間質性膀胱炎（ハンナ型）は、本邦の指定難病に認定された。

TRPM2 および TRPA1 チャネルは、ハンナ型間質性膀胱炎患者の膀胱生検検体で mRNA の発現が上昇し、TRPM2 は、症状の重篤度と発現量に相関がみられたことが報告されている。また、TRPA1 は、炎症に伴う求心性神経の活動性亢進に関与していることが報告されている。このような既報から、ハンナ型間質性膀胱炎のような、膀胱を起源とした炎症および、それに伴う異常知覚亢進に対し、TRPM2 および TRPA1 が新規治療標的になりうる可能性が考えられるが、これらのチャネルの下部尿路機能調節における生理的な役割および膀胱における炎症性疼痛発症における役割は、未だ検討されていない。そこで、本研究では各チャネルに対するノックアウト（KO）マウスおよびそれらに共通するワイルドタイプ（WT）マウスを用いて、各 KO マウスの膀胱機能の phenotype を検討し、さらには、lipopolysaccharide (LPS) を膀胱内注入することによって誘発した膀胱炎に対する各 KO マウスの反応性を、WT マウスと比較検討した。

【方法】

1. TRPM2-KO マウスの膀胱機能評価

雌雄 10-12 週齢 TRPM2-KO マウスおよび WT マウスを用いて、*in vivo* の実験として精密代謝ゲージを用いた 24 時間排尿行動測定および除脳・無麻酔下膀胱内圧測定（CMG）を行った。また、*in vitro* の実験として膀胱条片等尺性収縮実験を行い、カルバコール、ATP 誘発収縮反応および経壁電気刺激誘発収縮反応を評価した。

2. TRPA1-KO マウスの膀胱機能評価

前項の TRPM2-KO マウスに関する実験と同様の実験を、雌雄 TRPA1-KO マウスに対して行った。WT マウスのデータは、前項で使用したマウスのデータを用いて、比較検討した。

3. TRPM2-KO マウスにおける LPS 膀胱内注入に対する反応性の評価

雌性 10-12 週齢 TRPM2-KO マウスおよび WT マウスを用いて、イソフルラン麻酔下で LPS 2.0 mg/ml を 1 時間膀胱内注入し、注入前後の排尿行動測定および膀胱痛様行動の経時的変化を観察した。膀胱痛様行動は、マウスが 30 分間に膀胱付近（会陰部付近）を舐める動作（licking）の回数で評価した。対照群として、LPS の代わりに生理食塩水を膀胱内注入した WT マウス群を置いた。WT マウスと TRPM2-KO マウスの間に、顕著な差が認められた時点において、CMG および摘出膀胱の病理組織学的評価を行い、加えて、膀胱及び L6 後根神経節(DRG)に発現する各種 TRP チャンネル(TRPA1, TRPM2, TRPM7, TRPM8, TRPV1, TRPV4)の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR で定量化した。

4. TRPA1-KO マウスにおける LPS 膀胱内注入に対する反応性の評価

雌性 10-12 週齢 TRPA1-KO マウスおよび WT マウスを用いて、LPS 2.0 mg/ml または生理食塩水を 1 時間膀胱内注入し、注入前後の排尿行動測定および膀胱痛様行動の経時的変化を観察した。上記 3 と同様に、WT マウスと TRPA1-KO マウスの間に、顕著な差が認められた時点において、CMG と摘出膀胱の病理組織学的評価を行い、膀胱及び L6 DRG において各種 TRP チャンネルのリアルタイム RT-PCR を行った。

【結果】

1. TRPM2-KO マウスの膀胱機能評価

TRPM2-KO マウスは、雄では、排尿行動測定、CMG において、WT マウスと比較して有意な違いを認めなかった。また、摘出膀胱の経壁電気刺激誘発収縮実験において、前投薬のない状態の 2Hz の電気刺激でのみ TRPM2-KO マウスの排尿筋収縮反応が高値を示したが、その他の周波数の電気刺激に対する収縮反応に有意差を認めなかった。一方、雌では、WT マウスと比較して、CMG の排尿閾値圧でのみ有意に高値を示したが、排尿行動測定、膀胱条片等尺性収縮実験では、有意な違いを認めなかった。

2. TRPA1-KO マウスの膀胱機能評価

TRPA1-KO マウスでは、雌雄ともに排尿行動測定、CMG、膀胱条片等尺性収縮実験のいずれの実験のいずれの項目においても、WT マウスと比較して有意な違いを認めなかった。

3. TRPM2-KO マウスにおける LPS 膀胱内注入に対する反応性の評価

排尿行動測定において、WT マウスでは、生理食塩水注入群に比べ LPS 注入群で、注入 24 - 48 時間後に有意な排尿回数の増加と 1 回排尿量の減少を認めた。一方、TRPM2-KO マウスでは、注入前の基準値と比較しても、WT マウスの生理食塩水注入群と比較しても、いずれのパラメータも有意な違いを認めなかった。また、膀胱痛様 licking 行動の回数は、注入前の基準値に比べ、注入 2 時間後は 3 群すべてで有意に増加したが、24 時間後では

WT マウスの LPS 注入群のみ引き続き増加していた。

LPS 注入 24 時間後に施行した CMG において、TRPM2-KO マウスは WT マウスに比べ、有意に排尿間隔が延長し 1 回排尿量が高値を示した。病理組織学的には、WT マウスでは LPS 注入 24 時間後には尿路上皮下に著明な浮腫性肥厚、血腫および炎症細胞浸潤を認めたが、生理食塩水注入群ではこのような変化を認めなかった。一方、TRPM2-KO マウスに LPS を注入すると、24 時間後に尿路上皮下に浮腫性肥厚を認めるものの炎症細胞浸潤は軽微であり、WT マウスの LPS 注入群と比べて、尿路上皮下層に浸潤した炎症細胞数は有意に低値を示した。リアルタイム RT-PCR では、WT マウスと TRPM2-KO マウスの膀胱、L6 DRG において、TRPM2 以外の TRP チャネルの mRNA の発現に有意な違いを認めなかった。WT マウスでは、生理食塩水注入群に比べ LPS 注入群は、膀胱の TRPM2 の mRNA の発現が有意に高値を示した。

4. TRPA1-KO マウスにおける LPS 膀胱内注入に対する反応性の評価

LPS 注入 24 - 48 時間後の排尿行動測定において、WT マウスでは排尿回数の増加と 1 回排尿量の減少を認めたが、TRPA1-KO マウスではそのような変化を認めなかった。膀胱痛様 licking 行動の回数は、TRPA1-KO マウスの LPS 注入群では、LPS 注入前の基準値に比べ、注入 2 時間後は有意に増加したが、注入 24 時間後には WT マウスの LPS 注入群と比較し licking 回数は低値を示し、48 時間後では有意に低値であった。

LPS 注入 24 時間後に施行した CMG において、TRPA1-KO マウスは WT マウスに比べて、有意に排尿間隔が延長し 1 回排尿量が高値を示した。一方、病理組織学的評価において、LPS 注入 24 時間後の TRPA1-KO マウスの膀胱組織は、WT マウスと同程度の炎症を認め、尿路上皮下層に浸潤した炎症細胞数も同程度であり、これは WT マウスの生理食塩水注入群と比較すると有意に高値であった。リアルタイム RT-PCR では、WT マウスと TRPA1-KO マウスの膀胱、L6 DRG において、TRPA1 以外の TRP チャネルの mRNA の発現に有意な違いを認めなかった。生理食塩水注入群に比べ LPS 注入群は、WT マウスおよび TRPA1-KO マウスともに、膀胱において TRPM2 の mRNA の発現が有意に高値を示した。

【考察】

侵害刺激がない状態において、TRPM2-KO および TRPA1-KO マウスの膀胱機能は、WT マウスに比べ、雌雄ともに大きな違いを認めなかった。この結果から、TRPM2 および TRPA1 は、マウス膀胱において生理的な機能調節に寄与している可能性が極めて少なく、その役割は限定的であると考えられた。

LPS を膀胱内に注入すると、WT マウスでは注入 24-48 時間後において、膀胱の炎症および頻尿と膀胱痛様行動が誘発され、膀胱の TRPM2 の mRNA の発現が亢進していた。他方、TRPM2-KO マウスでは、LPS による膀胱の炎症および頻尿と膀胱痛様行動のすべてが軽減していたことから、TRPM2 は、LPS 膀胱内注入による炎症発現・遷延に直接寄与す

ることで、結果的に炎症性知覚過敏の発症に関与すると考えられた。

一方、TRPA1-KO マウスでは、LPS 膀胱内注入によって膀胱の炎症は同程度に惹起されたにも関わらず、頻尿と膀胱痛様行動は軽減していたことから、TRPA1 は LPS 膀胱内注入による炎症反応自体には直接関与せず、炎症に伴う異常知覚の亢進に寄与することで炎症性知覚過敏の発症に関与すると考えられた。