

博士學位論文

膀胱痛の発症における硫化水素、T型カルシウム
チャンネルおよび PAR2 の役割に関する研究

平成 30 年 1 月 12 日

近畿大学大学院

薬学研究科薬学専攻博士課程

尾崎友香

目次

緒論	6
第 1 章 Cyclophosphamide 誘起膀胱炎に伴う膀胱痛および cystathionine- γ -lyase の発現誘導における substance P/NK ₁ 受容体および NF- κ B 系の関与について.....	9
I. 緒言	9
II. 実験方法	11
1. 実験動物	11
2. Cyclophosphamide 誘起膀胱炎モデルの作製	11
3. CPA 誘起膀胱痛様行動の測定	11
4. CPA 誘起膀胱関連痛覚過敏の評価	11
5. 膀胱湿重量の測定	12
6. Western blot 法を用いた膀胱組織における各種タンパク発現量の測定	12
7. 膀胱組織における H ₂ S 合成酵素、CSE の活性測定	13
8. 使用薬物および投与スケジュール	14
9. 統計処理	14
III. 実験結果	15
1. CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量増加に対する CSE の競合的拮抗薬の効果	15
2. CPA 誘起膀胱炎マウスの膀胱組織における CSE タンパク発現量および 酵素活性の測定	16
3. CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量増加に対する NK ₁ 受容体選択的阻害薬の効果	16
4. CPA 投与により誘起される膀胱組織中の CSE 発現誘導に及ぼす NK ₁	

受容体選択的阻害薬の効果	17
5. CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量増加に対する NF- κ B 阻害薬の効果	18
6. CPA により誘起される NF- κ B p65 のリン酸化および CSE タンパク発現量増加に対する NF- κ B 阻害薬の効果	19
7. CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量増加に対するクルクミンの効果	20
8. CPA により誘起されるリン酸化 p65 および CSE タンパク発現量増加に対するクルクミンの効果	21
IV. 考察	23
V. 小括	26
第2章 亜鉛欠乏マウスでの cyclophosphamide 誘起膀胱炎に伴う膀胱痛における Ca _v 3.2 T 型 Ca ²⁺ チャネルの機能増強と発現増加の関与	27
I. 緒言	27
II. 実験方法	29
1. 実験動物	29
2. 食餌による亜鉛欠乏マウスの作製	29
3. 亜鉛キレーターによる亜鉛欠乏マウスの作製	29
4. 膀胱痛様行動の測定	29
5. von Frey filaments による膀胱関連痛覚過敏の評価	29
6. 膀胱湿重量の測定	29
7. ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry) 法による血漿・膀胱組織中亜鉛濃度の測定	30
8. Antisense 法を用いた Ca _v 3.2 ノックダウン	30
9. Western blot 法による各種タンパクの検出	30
10. 使用薬物および投与スケジュール	31

11. 統計処理	32
III. 実験結果.....	33
1. CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量増加に対する選択的 T 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬 NNC 55-0396 腹腔内投与の効果	33
2. CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量増加に対する選択的 T 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬 RQ-00311651 腹腔内投与の効果	33
3. CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量増加に対する選択的 T 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬 RQ-00311651 経口投与の効果.....	34
4. 亜鉛制限食を摂取させたマウスにおける血漿及び膀胱組織中亜鉛量の測定.....	35
5. 亜鉛制限食摂取マウスにおける CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏及び膀胱湿重量の変化	36
6. 亜鉛制限食摂取マウスにおける CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏に対する T 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬の効果.....	36
7. 亜鉛制限食摂取マウスにおける CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏に対する zinc chloride の効果	37
8. 亜鉛制限食摂取マウスにおける $Ca_v3.2$ T 型 Ca^{2+} チャネルノックダウンの効果	38
9. 亜鉛キレーター投与マウスにおける CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量の変化.....	39
10. 亜鉛キレーター投与マウスにおける CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量の増加に対する T 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬の効果...	40
11. 亜鉛キレーター投与マウスにおける $Ca_v3.2$ T 型 Ca^{2+} チャネルノックダウンの効果.....	40
12. 亜鉛キレーター投与マウスにおける CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏及び膀胱湿重量の増加に対する NMDA 受容体阻害薬の効果	41

13. 亜鉛キレーター投与マウスにおける CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量の増加に対する TRPA1 チャネル阻害薬の効果.....	42
14. 亜鉛キレーター投与マウスにおける CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量の増加に対する TRPV1 チャネル阻害薬の効果.....	43
15. CPA 投与マウスにおける $Ca_v3.2$, Egr-1, USP5 及び REST のタンパク発現量.....	44
16. 亜鉛キレーター投与マウスにおける $Ca_v3.2$, Egr-1, USP5 および REST のタンパク発現量.....	45
17. 亜鉛キレーター及び CPA 200 mg/kg を併用投与したマウスにおける $Ca_v3.2$, Egr-1, USP5 及び REST のタンパク発現量.....	46
18. 亜鉛キレーター及び/もしくは CPA 投与マウスの膀胱組織における CSE 発現量の測定.....	46
19. 亜鉛キレーター投与マウスにおける CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏及び膀胱湿重量の増加に対する CSE 阻害薬の効果.....	47
20. 亜鉛キレーター及び CPA 200 mg/kg を併用投与したマウスにおける $Ca_v3.2$, Egr-1, USP5 及び REST のタンパク発現量に対する CSE 阻害薬の効果.....	48
IV. 考察.....	50
V. 小括.....	54
第3章 Proteinase-activated receptor-2 活性化によって誘起されるマウスの膀胱痛における cyclooxygenase-2/prostaglandin E ₂ および T 型 Ca ²⁺ チャネルの関与.....	56
I. 緒言.....	56
II. 実験方法.....	58
1. 実験動物.....	58
2. T24 細胞の培養.....	58

3.	SLIGRL-amide 膀胱内投与誘起膀胱炎モデルの作製	58
4.	SLIGRL-amide 膀胱内投与誘起関連痛覚過敏の測定	58
5.	Western blot 法による COX-2 タンパクの検出	59
6.	PGE ₂ 測定法	59
7.	使用薬物および投与スケジュール	59
8.	統計処理	60
III.	実験結果	61
1.	PAR2 受容体活性化ペプチドを膀胱内投与することで誘起される関連痛覚過敏の発現	61
2.	SLIGRL-amide 膀胱内投与誘起関連痛覚過敏に対する非ステロイド性抗炎症薬の効果	62
3.	SLIGRL-amide 膀胱内投与誘起関連痛覚過敏に対する T 型 Ca ²⁺ チャネル阻害薬の効果	62
4.	SLIGRL-amide 膀胱内投与 6 時間後に摘出したマウス膀胱組織における COX-2 タンパク発現量の測定	63
5.	T24 細胞における SLIGRL-amide 刺激での COX-2 発現量及び PGE ₂ 産生量の測定	64
IV.	考察	65
V.	小括	67
	総括	68
	引用文献	72
	略語一覧	81
	主論文	83
	謝辞	

緒論

間質性膀胱炎（ハンナ型）とは、膀胱粘膜の慢性炎症（ハンナ潰瘍）を伴い、頻尿・尿意亢進・尿意切迫感・膀胱痛などの症状を呈する原因不明で難治性の疾患である。一方、膀胱粘膜に炎症病変が認められないにも関わらず膀胱痛や下部尿路症状を呈するタイプ（非ハンナ型）があり、両者を合わせて膀胱痛症候群と総称されることもある。間質性膀胱炎/膀胱痛症候群は、患者の QOL を著しく低下させるが、有効な治療法は少ない。細菌性膀胱炎の場合は抗生物質によって治療が可能だが、間質性膀胱炎/膀胱痛症候群では抗生物質が反応しない上、間質性膀胱炎/膀胱痛症候群における膀胱痛に既存の鎮痛薬は効果を示さない。薬物療法ではアレルギー反応を抑制するスプラタストや抗うつ薬のアミトリプチリンなどが適応外使用されているものの、より有効な治療薬の開発が望まれている。

これまでに川畑らのグループは cystathionine- γ -lyase (CSE) などの酵素によって L-cysteine から産生される内因性の H₂S が、知覚神経に発現する Ca_v3.2 T 型 Ca²⁺チャネルなどの機能を亢進させることで神経障害性疼痛¹⁾、体性痛^{2,3)}、膵臓痛^{4,5)} や結腸痛^{6,7)} などの内臓痛の発症に寄与することを明らかにしている。また、間質性膀胱炎と類似した症状を示す cyclophosphamide (CPA) 誘起膀胱炎モデルマウスにおいて、膀胱組織内で CSE の発現誘導が起こり、それに伴って産生される H₂S による Ca_v3.2 の機能亢進が膀胱痛の発症に関与することを報告している⁸⁾。このことより、CSE/H₂S/Ca_v3.2 系が間質性膀胱炎ならびに膀胱痛症候群の治療標的分子になる可能性が考えられる。

一方、知覚神経に豊富に発現している $\text{Ca}_v3.2$ は T 型 Ca^{2+} チャンネルの 3 つのサブタイプ ($\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$, $\text{Ca}_v3.3$) の中で Zn^{2+} , Cu^{2+} および Ni^{2+} のような二価金属イオンに対する感受性が最も高く、この特性には $\text{Ca}_v3.2$ のドメイン I、細胞外第二ループに存在する N 末端から 191 番目のヒスチジン残基 (His^{191}) が関与することが明らかにされている^{9,10)}。生体内で亜鉛は $\text{Ca}_v3.2$ の His^{191} に結合することでチャンネル機能を恒常的に抑制しており、 H_2S はこの亜鉛抑制を解除することでチャンネル機能を促進すると考えられている。川畑らのグループは、亜鉛供与体であるポラプレジンクが CPA 誘起膀胱炎に伴う膀胱痛を抑制すること¹¹⁾、および亜鉛キレーターである N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine (TPEN) もしくは亜鉛に対する親和性の高い H_2S ドナーである NaHS を結腸内投与することで $\text{Ca}_v3.2$ 依存性結腸痛が起きることを報告している¹²⁾。このことより生体内の亜鉛濃度の低下が、間質性膀胱炎/膀胱痛症候群患者で見られる膀胱痛の発症に関連している可能性が考えられる。膀胱痛以外にも、舌痛症¹³⁾を含む様々な痛み¹⁴⁾が亜鉛欠乏によって誘起されることが報告されているが、これらの知見と $\text{Ca}_v3.2$ の関連性はまだ証明されていない。

間質性膀胱炎患者では膀胱組織中の肥満細胞数が増加しており¹⁵⁾、尿中には肥満細胞由来トリプターゼの増加が認められる¹⁶⁾ことが報告されている。肥満細胞の脱顆粒によって細胞外に放出されるトリプターゼは、GPCR の 1 つである proteinase-activated receptor-2 (PAR2) を活性化することが知られており¹⁷⁾、トリプターゼ/PAR2 系が病態に関与する可能性も考えられる。また、川畑らは、CPA 誘起膀胱炎マウスの膀胱組織では COX-2 の発現誘導が起こっており、内因性 prostaglandin E_2 (PGE_2) によるプロスタノイド EP1 受容体の活性化が膀胱痛の発症に関与することを報告している¹⁸⁾。さらに、 PGE_2 により誘起される体性痛覚過敏には、EP4 受容体/cAMP/PKA 経路を介する $\text{Ca}_v3.2$ のリン酸化によるチャンネル機能の亢進が関与することを証明している¹⁹⁾。

そこで、本研究では、間質性膀胱炎/膀胱痛症候群患者における膀胱痛に対す

る有効な治療薬を開発するための標的分子を見出すため、CPA 誘起膀胱炎マウスモデルを用いて膀胱痛発症における $\text{H}_2\text{S}/\text{Ca}_v3.2$ 系の挙動と役割を解析し、さらに PAR2 活性化による膀胱痛の発症メカニズムを検討した。

第 1 章 Cyclophosphamide 誘起膀胱炎に伴う膀胱痛および cystathionine- γ -lyase の発現誘導における substance P/NK₁ 受容体および NF- κ B 系の関与について

I. 緒言

硫化水素 (H₂S) は一酸化窒素や一酸化炭素に次ぐ第 3 のガス状情報伝達物質として機能しており、L-cysteine から cystathionine- γ -lyase (CSE) あるいは cystathionine- β -synthase によって生成される他、cysteine amino transferase と 3-mercaptopyruvate sulfur-transferase によっても産生される²⁰⁻²³⁾。H₂S は哺乳類の生体内で生理学的及び病態生理学的に様々な役割を示すことが知られているが、その 1 つとして疼痛制御が挙げられる²⁴⁾。川畑らは、CSE により産生される H₂S が Ca_v3.2 T 型 Ca²⁺ チャネル及び/もしくは transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1) チャネル^{2,3,22,25)}を介して痛みの情報伝達を促進し、神経障害性疼痛¹⁾の他、膵臓痛^{4,5)}、結腸痛^{6,7)}などの内臓痛の発症に関与することを明らかにしており、これらの知見は別のグループによる研究によって支持されている^{26,27)}。

ヒトの間質性膀胱炎に類似した症状を呈する cyclophosphamide (CPA) 誘起膀胱炎マウスでは、膀胱組織中 CSE の発現誘導に伴う H₂S/Ca_v3.2 系の機能亢進が膀胱痛の発症に関与することが既に明らかにされている⁸⁾が、CPA によってどのように CSE の発現増加が誘起されるか、その具体的なメカニズムはまだ明らかではない。一方、間質性膀胱炎患者の生検組織では一次知覚神経の伝達物質として知られる substance P (SP) の受容体である NK₁ 受容体の mRNA 量が増加しており²⁸⁾、SP が間質性膀胱炎/膀胱痛症候群の病態に関与する可能性が指摘され

ている。さらに、マクロファージにおいて、lipopolysaccharide (LPS) 誘起 CSE の発現誘導に NF- κ B が関与することが証明されている²⁹⁾。

そこで、本章では CPA 誘起膀胱炎・膀胱痛マウスにおける CSE/H₂S/Ca_v3.2 系の治療標的分子としての可能性を検討し、その上流シグナルとして SP/NK₁ 受容体系及び NF- κ B 系が関与するか否かを検討した。

II. 実験方法

1. 実験動物

実験には雌系 ddY マウス (紀和実験動物研究所、和歌山) を使用した。実験動物には固形飼料 (MF オリエンタル酵母工業、東京) 及び水道水を自由に摂取させ、約 24°C の室温と 12 時間の明暗サイクルが管理された部屋で飼育した。

2. Cyclophosphamide 誘起膀胱炎モデルの作製

Cyclophosphamide 誘起膀胱炎モデルの作製は、既報^{18,30,31)}に従って行った。Cyclophosphamide monohydrate (CPA) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) は 0.9 % 生理食塩水に溶解し、400 mg/kg の用量でマウス腹腔内に投与することで膀胱炎を誘起した。

3. CPA 誘起膀胱痛様行動の測定

CPA 誘起膀胱痛様行動の測定は、既報^{18,31,32)}に準じて行った。マウスを実験台から約 25 cm 浮かせた網目が 5 mm 四方の金網の上に置き、透明のプラスチックケース (23.5 cm × 16.6 cm × 12.4 cm) をかぶせて 1 時間実験環境に順応させた。CPA 腹腔内投与 3 時間半から 4 時間後の 30 分間、尿道口周囲皮膚表面に対する舐め及び引きずり行動を侵害受容行動としてカウントした。

4. CPA 誘起膀胱関連痛覚過敏の評価

膀胱関連痛覚過敏の評価は、既報に準じて行った^{18,31,32)}。CPA 投与 4 時間後、0.008、0.07、0.4 および 1.0 g の強度の異なる 4 種類の von Frey filament により尿道口から肛門付近の皮膚表面を弱いものから強いものの順に刺激した。各フィラメントあたり 5-10 秒の間隔で 10 回刺激を行った。刺激に伴う侵害受容反応は以下に示した通りにスコア化し、結果は 10 回の刺激によって得られたスコアの

合計値で示した。

0点：反応なし

1点：外尿道口周囲への舐めあるいは噛みつき、体幹の前屈、体を起こす、位置を変える、肢をばたつかせる

2点：飛ぶ

5. 膀胱湿重量の測定

膀胱関連痛覚過敏の測定後、マウスを安楽死させた後、膀胱を摘出した。摘出した膀胱は、ろ紙で水分を軽くふき取り、電子天秤で測定した。

6. Western blot 法を用いた膀胱組織における各種タンパク発現量の測定

マウスの膀胱組織を氷上で摘出し、液体窒素で凍結した。各サンプルは 0.1 mg/mL phenylmethylsulfonyl fluoride、0.15 U/mL aprotinin、1 mM sodium orthovanadate を含む RIPA buffer [phosphate buffered saline (PBS)、1 % Igepal CA-630、0.5 % sodium deoxycholate、0.1 % sodium dodecyl sulfate (SDS)] 150 μ L 中でホモジネートし、その後超音波処理をした。10,000 G、4 $^{\circ}$ C の条件で 10 分間遠心後、上清を採取し、Bradford 法によりタンパク量を測定した。サンプル 100 μ L につき 2-mercaptoethanol (和光純薬、大阪) を 2 μ L、bromophenol blue (キシダ化学、大阪)、glycerol、10 % SDS を含む 1 M Tris-HCl (pH 6.7) を等量加え、95-100 $^{\circ}$ C で 5 分間煮沸処理した。得られたサンプルを CSE、リン酸化 NF- κ B p65 および GAPDH の場合は 12.5 % SDS-polyacrylamide gel (和光純薬、大阪) に添加し電気泳動により分離した。分離したタンパクは、polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, USA) に転写した。転写膜は 5 % skim milk、137 mM NaCl、0.1 % Tween 20、20 mM Tris-HCl (pH 7.6) を含む溶液でブロッキング処理した後、1000 倍希釈した anti-CSE rabbit polyclonal antibody (Sigma-Aldrich Japan, 石狩) あるいは 250 倍希釈した anti-phospho-p65 (Ser536)

rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) および 5000 倍希釈した anti-GAPDH rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) でそれぞれ 4°C、一晩反応させた。一次抗体を洗浄処理した後、5000 倍希釈した horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Cell Signaling Technology) を用いて室温で 90 分間反応させた。全てのタンパク質は enhanced chemiluminescence detection reagent (ナカライテスク、京都)を用いて室温で 1 分間反応させ発色させることによりバンドを検出した。検出したバンドの定量には densitometric software (ImageJ 1.44p, <http://imagej.nih.gov/ij>)を用いた。

7. 膀胱組織における H₂S 合成酵素、CSE の活性測定

酵素活性の測定は既報^{33,34)}に従って行った。マウスから取り出した膀胱組織は氷冷した 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) を必要量加えてホモジネートした。続いて、CSE 阻害薬である DL-propargylglycine (PPG) を最終濃度 2.5 mM になるよう添加したサンプルもしくは生理食塩水を添加したサンプルに分けてから 15 分間氷中でインキュベートした。その後に L-cysteine を 10 mM、pyridoxal-5'-phosphate を 2 mM になるように加え、37°C で 90 分インキュベートした。氷上に移して反応を止めた後、10 % trichloroacetic acid と 1 % zinc acetate を 1:1 で混合したものを加え、次に 20 mM N,N-dimethyl-p-phenylenediamine sulphate を添加して直ちに 30 mM FeCl₃ を加えた。遮光下で 20 分間インキュベートした後に 4°C、15,000 rpm の条件で 10 分間遠心した。採取した上澄みは波長 670 nm で吸光度測定した。H₂S 濃度は、標準物質として Na₂S を用いた検量線 (15-240 μM) から算出し、CSE 活性は PPG 存在下の測定値をそれぞれの非存在下の測定値から差し引いた値として表した。

8. 使用薬物および投与スケジュール

CSE の競合的拮抗薬 β -cyano-L-alanine (Sigma-Aldrich) は 0.9 % 生理食塩水で溶解し、50 mg/kg の用量で CPA 投与 30 分前に腹腔内投与した。CP-96,345 (Sigma-Aldrich) は 1 % Tween 80、1.5 % dimethyl sulfoxide (DMSO: Sigma-Aldrich) を含む 0.9 % 生理食塩水に溶解し、5 mg/kg の用量で CPA 投与 30 分前に腹腔内投与した。Pyrrolidine dithiocarbamate (Sigma-Aldrich) は生理食塩水に溶解し、30 あるいは 100 mg/kg の用量で CPA 投与 30 分前に腹腔内投与した。Curcumin (Sigma-Aldrich) は 0.5 % メチルセルロースで懸濁させ、3、30、100 あるいは 300 mg/kg の用量で CPA 投与 1 時間前に経口投与した。

9. 統計処理

得られた実験値は、平均値 \pm 標準誤差で示した。有意差の検定には、等分散データについて 2 群間の比較の場合は Student's t-検定を用い、3 群以上の比較には Tukey 法を用いた。不等分散データについては、3 群以上の比較に Kruskal-Wallis-H-検定を行った後 LSD 型多重比較法により検定した。P<0.05 で有意差ありとした。

III. 実験結果

1. CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量増加に対する CSE の競合的拮抗薬の効果

マウスに CPA を 400 mg/kg の用量で腹腔内投与した結果、投与後 3 時間半から 4 時間で膀胱痛様行動、関連痛覚過敏及び膀胱湿重量の有意な増加が認められること、そして CPA 誘起膀胱炎・膀胱痛は H₂S 合成酵素の 1 つである CSE の不可逆的阻害薬である PPG によって阻害されることが松波らによって報告されている⁸⁾。そこで、今回はより選択性の高い CSE の競合的拮抗薬である β-cyano-L-alanine (BCA) を用いて同様の結果が得られるか否かを検討した。その結果、BCA は 50 mg/kg の用量で CPA 投与 30 分前に腹腔内投与することにより膀胱痛様行動および関連痛覚過敏を強く抑制した (Fig. 1A, B)。また、CPA 投与 4 時間後に認められる膀胱相対湿重量増加を部分的にはあるが有意に抑制した (Fig. 1C)。

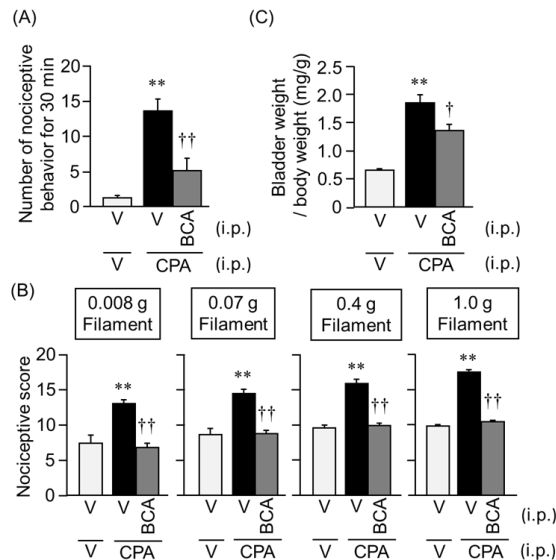


Fig. 1 β-cyano-L-alanine (BCA) at 50 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 30 min before i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) at 400 mg/kg or V. (A) The nociceptive behavior was observed from 3.5 to 4 h after the administration. (B) The nociception test was performed 4 h after the administration. (C) The mice were killed 4 h after the administration and bladder weight was measured. Data show the mean with S.E.M. from 5-8 mice. **P<0.01 vs V + V. †P<0.05, ††P<0.01 vs V + CPA.

2. CPA 誘起膀胱炎マウスの膀胱組織における CSE タンパク発現量および酵素活性の測定

我々は CPA 誘起膀胱炎マウスでは、膀胱組織において H₂S 合成酵素である CSE の発現誘導が生じることを報告している⁸⁾。そこで、今回のマウスにおいても同様に検討した所、CPA 400 mg/kg を腹腔内投与してから 4 時間後のマウスの膀胱組織において CSE の有意なタンパク発現量増加が認められた (Fig. 2A)。この CSE のタンパク発現誘導は、CSE の競合的阻害薬である BCA には影響されなかった (Fig. 2A)。さらに、CPA を投与したマウスの膀胱組織では、CSE の発現上昇に伴って、酵素活性が著しく上昇していることが明らかとなった (Fig. 2B)。

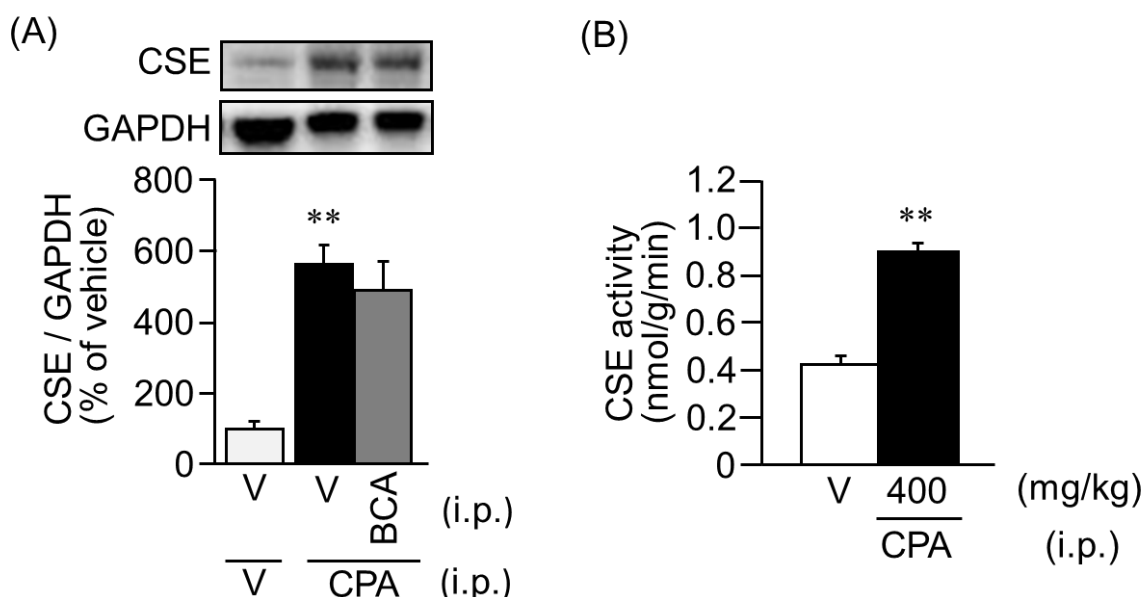


Fig. 2 β -cyano-L-alanine (BCA) at 50 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 30 min before i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) at 400 mg/kg or V. (A) Typical photographs of Western blotting and quantified data by densitometry are shown. (B) CSE activity in the bladder is shown as the difference in H₂S formation in the presence and absence of 2.5 mM PPG (DL-propargylglycine). Data show the mean with S.E.M. from (A) 5 mice, (B) 5 samples (6 bladders per sample). **P<0.01 vs V or V + V.

3. CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量増加に対する NK₁ 受容体選択的阻害薬の効果

次に、CPA 誘起膀胱炎・膀胱痛に substance P (SP)/NK₁ 受容体系が関与するかどうかを NK₁ 受容体選択的阻害薬である CP-96,345 (CP) を用いて検討した。CP を 5 mg/kg の用量で CPA 400 mg/kg 投与 30 分前に腹腔内投与した所、膀胱痛様

行動及び関連痛覚過敏を著明に抑制した (Fig. 3A, B)。また、CPA 投与 4 時間後に認められる膀胱相対湿重量増加は CP 5 mg/kg の前投与により抑制された (Fig. 3C)。

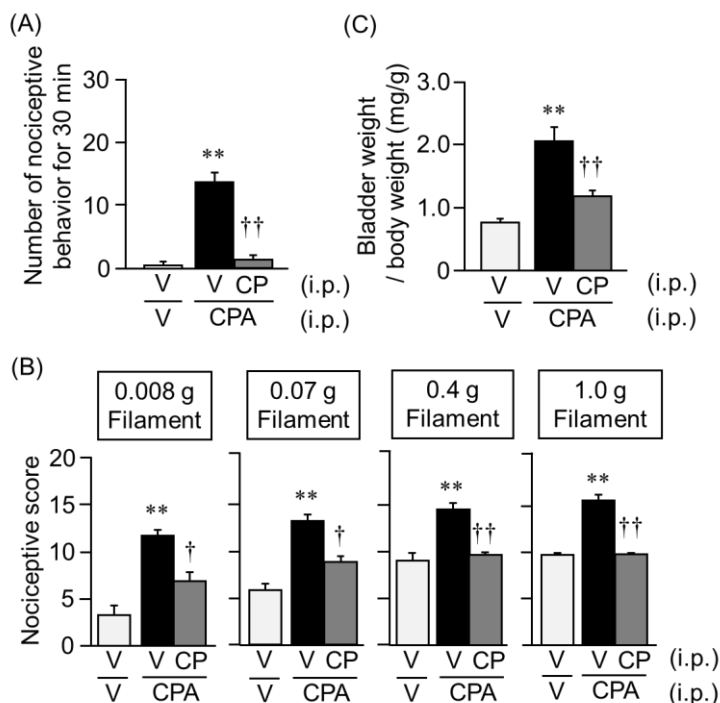


Fig. 3 CP-96,345 (CP) at 5 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 30 min before i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) at 400 mg/kg or V. (A) The nociceptive behavior was observed from 3.5 to 4 h after the administration. (B) The nociception test was performed 4 h after the administration. (C) The mice were killed 4 h after the administration and bladder weight was measured. Data show the mean with S.E.M. from 5-8 mice. **P<0.01 vs V + V. †P<0.05, ††P<0.01 vs V + CPA.

4. CPA 投与により誘起される膀胱組織中の CSE 発現誘導に及ぼす NK₁ 受容体選択的阻害薬の効果

CPA 誘起膀胱炎・膀胱痛の発症において SP/NK₁ 受容体系が CSE/H₂S/T 型 Ca²⁺ チャンネルの上流シグナルである可能性を検討するため、CPA 400 mg/kg 投与により誘起される膀胱組織中の CSE 発現誘導に及ぼす NK₁ 受容体選択的阻害薬 CP の効果を検討した。その結果、CPA による CSE タンパク発現誘導が CP により有意に抑制された (Fig. 4)。

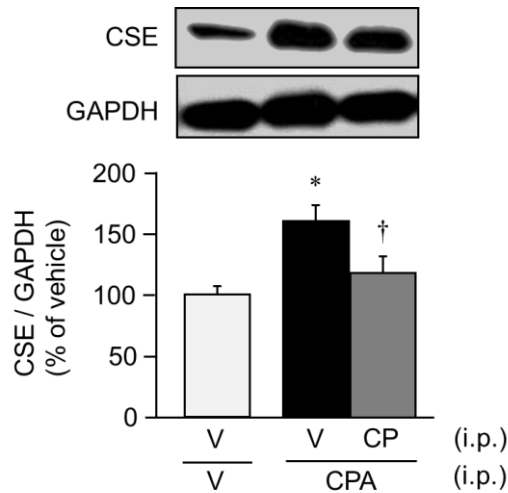


Fig. 4 Typical photographs of Western blotting and quantified data by densitometry are shown. CP-96,345 at 5 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 30 min before i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) at 400 mg/kg or V. The mice were killed 4 h after the administration. Data show the mean with S.E.M. for 6-11 mice. *P<0.05 vs V + V. †P<0.05 vs V + CPA.

5. CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量増加に対する NF-κB 阻害薬の効果

次に、CPA 誘起膀胱炎・膀胱痛に NF-κB 系が関与するかを NF-κB 阻害薬である pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) を用いて検討した。その結果、PDTC を 30 あるいは 100 mg/kg の用量で CPA 投与 30 分前に腹腔内投与することで、CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏が著明に抑制され (Fig. 5A, B)、膀胱湿重量増加が有意に抑制された (Fig. 5C)。

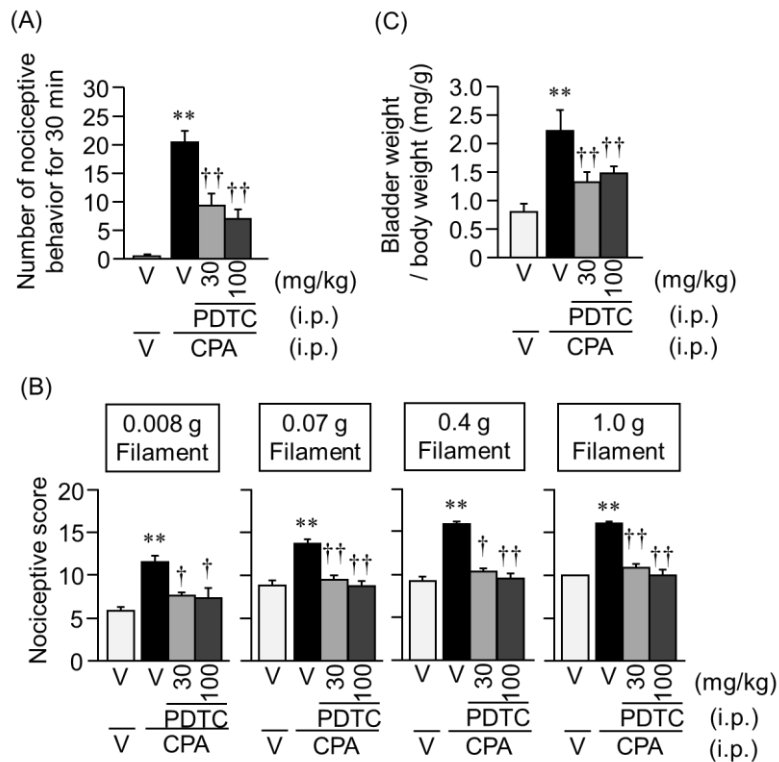


Fig. 5 Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) at 30 or 100 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 30 min before i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) at 400 mg/kg or V. (A) The nociceptive behavior was observed from 3.5 to 4 h after the administration. (B) The nociception test was performed 4 h after the administration. (C) The mice were killed 4 h after the administration and bladder weight was measured. Data show the mean with S.E.M. for 5-8 mice. **P<0.01 vs V + V. †P<0.05, ††P<0.01 vs V + CPA.

6. CPAにより誘起されるNF-κB p65のリン酸化およびCSEタンパク発現量増加に対するNF-κB阻害薬の効果

CPA 400 mg/kg 投与 1 時間後に摘出した膀胱組織においてNF-κB の活性化の指標であるNF-κB p65 のリン酸化 (リン酸化 p65) が著しく増加し、その増加がNF-κB 阻害薬であるPDTC 30 mg/kg を30分前投与することにより強力に抑制された (Fig. 6A)。一方、CPA 400 mg/kg を腹腔内投与して4時間後に摘出した膀胱組織において増加したCSEの発現量は、PDTCを30あるいは100 mg/kgの用量でCPA投与30分前に腹腔内投与することにより有意に抑制された (Fig. 6B)。

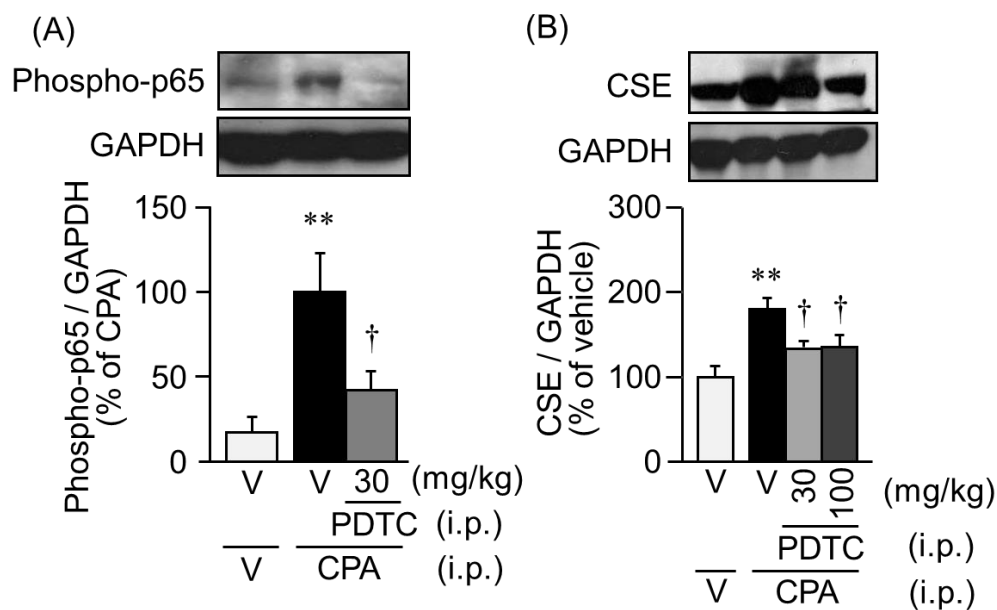


Fig. 6 Typical photographs of Western blotting and quantified data by densitometry are shown. Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) at 30, 100 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 30 min before i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) at 400 mg/kg or V. The mice were killed 1 or 4 h after the administration. Data show the mean with S.E.M. for 6-8 mice. ** $P < 0.01$ vs V + V. † $P < 0.05$ vs V + CPA.

7. CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量増加に対するクルクミンの効果

クルクミンはウコンに含まれる薬効成分で多様な生理活性を示すことが知られており、NF- κ B 経路の阻害を含む複数のメカニズムを介して抗炎症活性を示すことが報告されている³⁵⁾。従って、クルクミンは間質性膀胱炎/膀胱痛症候群の患者に応用出来る可能性が考えられる。そこで、今回はクルクミンの治療上の利点について検討した。その結果、クルクミンを 3-300 mg/kg の用量で CPA 投与 1 時間前に経口投与したところ、CPA 誘起膀胱痛様行動および関連痛覚過敏が用量依存的に強く阻止され (Fig. 7A, B)、CPA による膀胱湿重量増加がクルクミン 100 mg/kg の経口投与により部分的にはあるが有意に抑制された (Fig. 7C)。

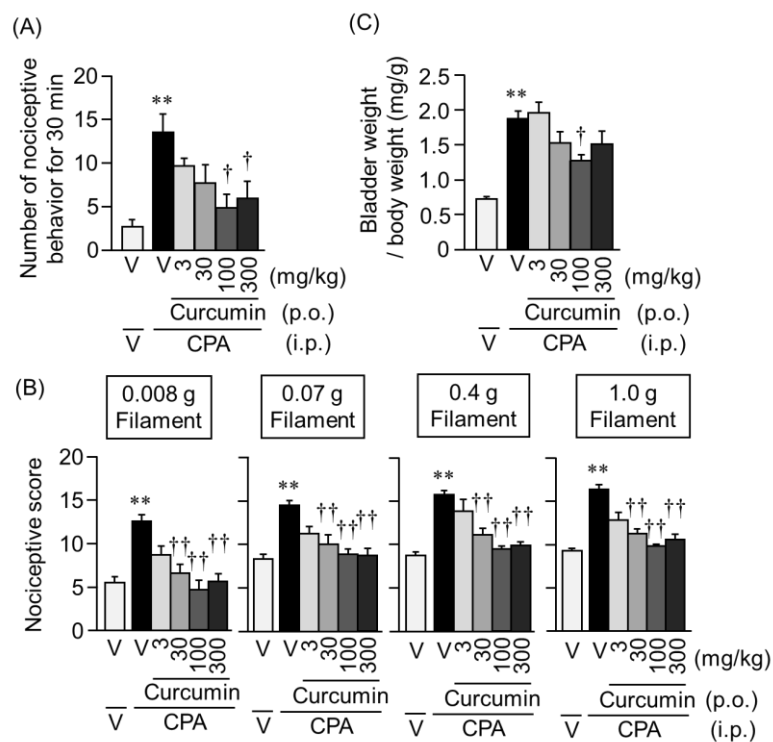


Fig. 7 Curcumin at 3, 30, 100 or 300 mg/kg or vehicle (V) was administered p.o. to mice 1 h before i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) at 400 mg/kg or V. (A) The nociceptive behavior was observed from 3.5 to 4 h after the administration. (B) The nociception test was performed 4 h after the administration. (C) The mice were killed 4 h after the administration and bladder weight was measured. Data show the mean with S.E.M. from 5-9 (treatment with curcumin) or 16-17 (control) mice. * $P < 0.01$ vs V + V. † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs V + CPA.

8. CPAにより誘起されるリン酸化 p65 および CSE タンパク発現量増加に対するクルクミンの効果

クルクミン 100 mg/kg の 1 時間前投与は、CPA 400 mg/kg の投与により増加したリン酸化 p65 及び CSE のタンパク発現量を著明に抑制した (Fig. 8A, B)。

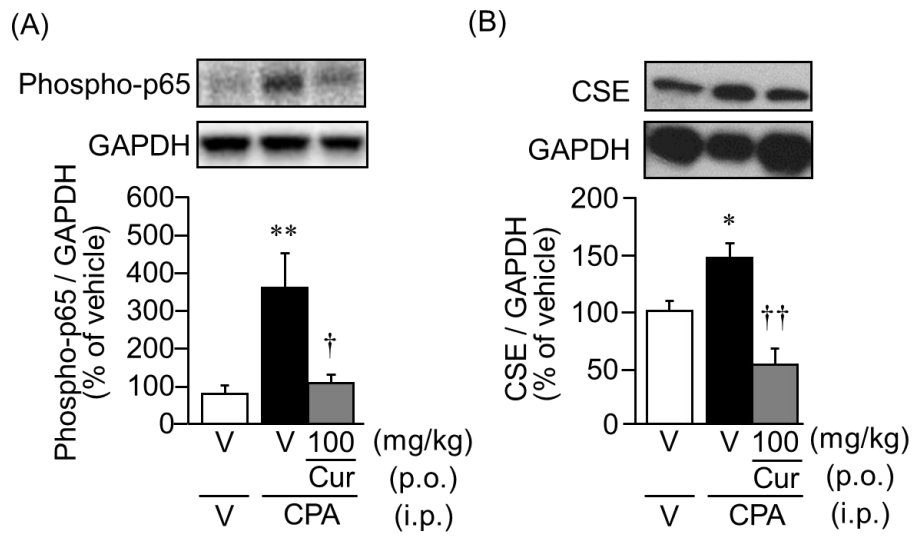


Fig. 8 Typical photographs of Western blotting and quantified data by densitometry are shown. Curcumin (Cur) at 100 mg/kg or vehicle (V) was administered p.o. to mice 1 h before i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) at 400 mg/kg or V. The mice were killed 1 or 4 h after the administration. Data show the mean with S.E.M. for 5-12 mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs V + V. † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs V + CPA.

IV. 考察

本章における研究結果より、ヒトの間質性膀胱炎に類似した症状を示す CPA 誘起膀胱炎マウスの膀胱組織において、SP/NK₁ 受容体系及び NF-κB 系が活性化されることで H₂S 産生酵素の 1 つである CSE の発現が誘導され、この CSE の過剰発現が膀胱痛や膀胱炎の誘発に関与することが示唆された。

これまでに、CPA 誘起膀胱炎に伴う膀胱痛が不可逆的 CSE 阻害薬である PPG によって阻害されることが明らかになっており⁸⁾、これは CSE 競合的拮抗薬 BCA を用いた今回の結果と一致している (Fig. 1A, B)。これらの知見より、CSE によって産生された H₂S が CPA 誘起膀胱炎に伴う膀胱痛に寄与していることを確証することができた。CPA 誘起膀胱痛は、T 型 Ca²⁺チャネル阻害薬及び Ca_v3.2 のノックダウンにより抑制される^{8,36)}ことが既に報告されており、CPA 誘起膀胱炎・膀胱痛の発症において CSE/H₂S/Ca_v3.2 系は中心的な役割を果たしているものと推定される。

次に、SP により活性化される NK₁ 受容体拮抗薬である CP の前投与が、CPA 誘起膀胱痛様行動と関連痛覚過敏を非常に強く阻止した (Fig. 3A, B) ことより、SP/NK₁ 受容体系が CPA 誘起膀胱痛に関与することが示唆された。更に、Western blot 法により、CPA 投与により誘起される CSE 発現誘導に及ぼす CP の効果を検討したところ、有意な抑制効果が認められた (Fig. 4) ことより、CPA 誘起膀胱炎・膀胱痛マウスでの CSE 発現誘導は SP/NK₁ 受容体の下流で起きていることが示唆された。

次に、NF-κB 阻害薬である PDTC の前投与が、CPA 誘起膀胱痛を著明に阻止し (Fig. 5A, B)、リン酸化 p65 及び CSE タンパク発現誘導を強く抑制した (Fig. 6A, B) ことより、NF-κB 系は CPA により誘起される CSE の発現誘導と、それに

伴う膀胱痛の発症に寄与していることが示唆された。この結果は、ラットまたはマウスでの CPA 誘起膀胱炎において NF- κ B 系が寄与するという報告^{37,38)}、マクロファージにおける LPS 誘起 CSE の発現誘導に NF- κ B 系が必要であるという報告²⁹⁾、及び CSE のプロモーター上に存在する NF- κ B 結合部位が哺乳類細胞における LPS 誘起 CSE 発現誘導に重要であるという報告³⁹⁾とも矛盾しない。

最後に、NF- κ B 系の阻害を含む多様な生理活性を有するクルクミン^{35,40)}の効果について検討したところ、クルクミンは CPA 誘起膀胱痛様行動及び関連痛覚過敏を用量依存的に抑制し (Fig. 7A, B)、リン酸化 p65 及び CSE タンパク発現誘導を著しく阻止した (Fig. 8A, B)。これらの結果は、クルクミンが膀胱組織において CPA 誘起 NF- κ B 活性化及び CSE 発現誘導を阻害することで膀胱痛を軽減することを示しており、間質性膀胱炎などの治療薬としてクルクミンが有用である可能性を示唆している。

一方、BCA、CP、PDTC 及びクルクミンは、膀胱痛に加えて、膀胱湿重量の増加を部分的ではあるが有意に抑制した (Fig. 1C, 3C, 5C, 7C)。これらの結果より、CSE、SP/NK₁ 受容体系や NF- κ B 系は CPA による膀胱炎症状にも関与していることが示された。これらは別のグループの報告と一致しており^{41,42)}、CSE やその上流シグナルを阻害する薬物は膀胱痛のみならず膀胱炎自体の治療にも役立つことが期待される。

これまでの報告と本章で得られた研究知見をまとめると、CPA の肝代謝物であるアクロレインが膀胱内に蓄積されて粘膜上皮を傷害すると、粘膜内の知覚神経が刺激されて SP が放出され、これによって NK₁ 受容体依存的に NF- κ B 系が活性化されて CSE の発現誘導が起こり、それに伴って膀胱組織における H₂S の産生が増加することで Ca_v3.2 T 型 Ca²⁺チャネルの機能が増強し、知覚神経の興奮性が過剰となり膀胱痛が起きるのではないかと推察される (Fig. 9)。従って、今後は CSE 阻害薬、T 型 Ca²⁺チャネル阻害薬及び NK₁ 受容体阻害薬などが膀胱痛及び膀胱炎治療薬として使用出来る可能性があると考えられる。また、NF- κ B

系を阻害するクルクミンなどはこれまでに明らかとなった効能の他に、間質性膀胱炎/膀胱痛症候群患者の膀胱痛・膀胱炎治療薬としての効能を発揮する可能性を秘めていると言えるだろう。

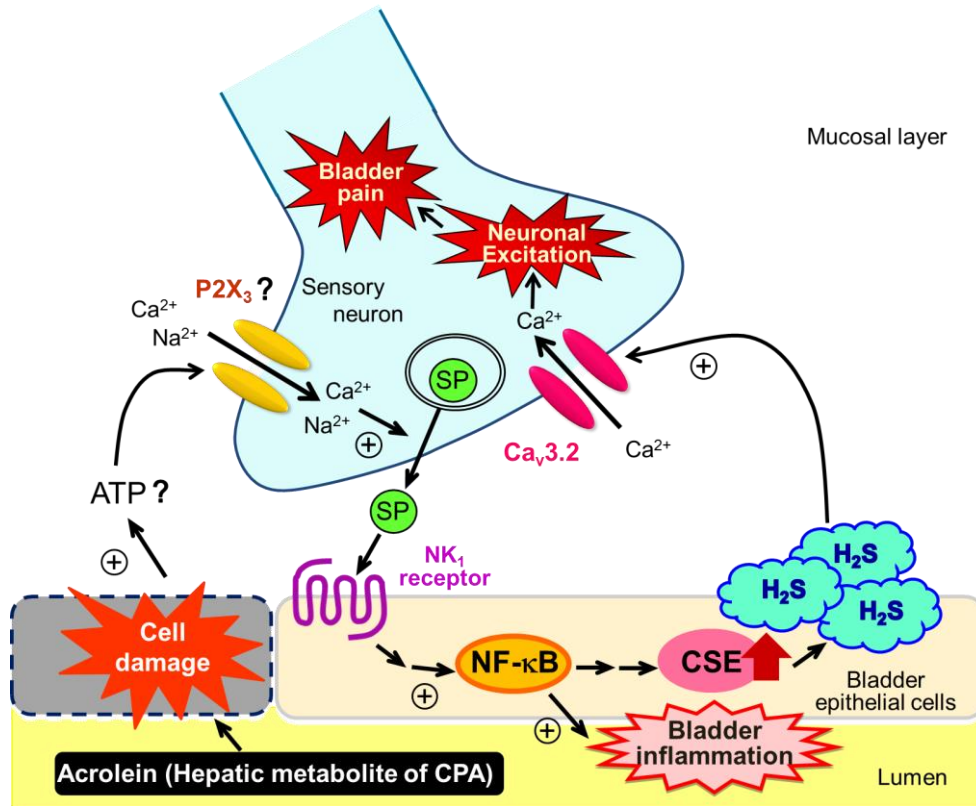


Fig. 9 A working hypothesis for the mechanisms of CPA-induced bladder pain in this study.
 ATP: adenosine triphosphate, CPA: cyclophosphamide, CSE: cystathionine-γ-lyase, H₂S: hydrogen sulfide,
 SP: substance P

V. 小括

1. CSE 競合的拮抗薬である BCA は CPA 誘起膀胱痛を抑制し、膀胱湿重量増加を抑制した。
2. CPA 400 mg/kg の投与は CSE のタンパク発現量を増やし、in vitro における H₂S の産生量を指標とした酵素活性を増強させた。
3. NK₁ 受容体阻害薬である CP は CPA 誘起膀胱痛及び膀胱湿重量増加を抑制し、膀胱組織における CSE 発現誘導を阻止した。
4. NF-κB 阻害薬である PDTTC 及び NF-κB 系を抑制することが知られているクルクミンは CPA 誘起膀胱痛及び膀胱湿重量増加を抑制し、NF-κB の活性化の指標となる p65 リン酸化タンパク及び CSE タンパク発現誘導を抑制した。

以上より、SP/NK₁ 受容体系及び NF-κB 系の活性化を介した CSE/ H₂S/ Ca_v3.2 T 型 Ca²⁺チャネル系が CPA により誘起される膀胱炎・膀胱痛症状の制御に関与していることが示唆された。

第2章 亜鉛欠乏マウスでの cyclophosphamide 誘起膀胱炎に伴う膀胱痛における Cav3.2 T 型 Ca²⁺チャネルの機能増強と発現増加の関与

I. 緒言

低電位活性化型 T 型 Ca²⁺チャネルの 3 つのサブタイプ (Cav3.1 ~ Cav3.3) の 1 つである Cav3.2 は一次知覚神経に豊富に発現し、痛みの発現に重要な役割を持つことが明らかにされている^{10,43)}。川畑らのグループは、これまでに Cav3.2 が神経障害性疼痛¹⁾および結腸痛^{6,7)}・膵臓痛^{4,5)}や膀胱痛⁸⁾を含む内臓痛に関与することを報告しており、これらの痛みの治療標的分子となることを示唆してきた。

一方、亜鉛は生命活動において重要な役割を担う必須微量元素の 1 つであり、味覚や嗅覚の形成や皮膚代謝、生殖機能、骨格形成、生体防御機能等への重要な関与が明らかにされている⁴⁴⁻⁴⁶⁾。興味あることに、生体内において亜鉛は Cav3.2 の細胞外ドメインに存在する 191 番目のヒスチジン残基 (His¹⁹¹) に結合し、チャネル機能を抑制的に制御している^{10,43)}。L-cysteine や H₂S は、亜鉛への感受性が高く、細胞外においてこれらの化合物の濃度が上昇すると、一次知覚神経に発現する Cav3.2 の His¹⁹¹ に結合した亜鉛によるチャネル機能抑制が減弱し、チャネル活性が亢進し、侵害受容ニューロンの興奮性が上昇する^{2,3,9,10)}。川畑らや Nelson らのグループは亜鉛キレート剤が Cav3.2 の亜鉛抑制を解除し、体性痛及び結腸痛を誘起することを報告している^{9,12)}他、川畑らのグループは亜鉛含有薬であるポラプレジンクが CPA 誘起膀胱痛および膀胱炎症状を抑制する事

を報告している¹¹⁾。

さらに、Ca_v3.2 のタンパク発現量は転写調節因子である early growth response 1 (Egr-1) により促進的に、repressor element-1 silencing transcription factor (REST) により抑制的に調節されていることが報告されている^{47,48)}他、Ca_v3.2 の膜発現が ubiquitin-specific protease 5 (USP5) による脱ユビキチン化を介するプロテアソーム分解の抑制などにより制御されている⁴⁹⁾ことが明らかにされている。また最近、知覚神経が興奮することで neuronal activity-dependent に USP5 の発現誘導が生じ、Ca_v3.2 の膜発現が増加することが報告された⁵⁰⁾。

そこで本章では、食餌制限もしくは亜鉛キレーターにより亜鉛欠乏状態にしたマウスにおいて CPA により誘起される膀胱痛の程度が変化するか否かを検討し、Ca_v3.2 の関与について検討すると共に、マウスの脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion: DRG) における Ca_v3.2、Egr-1、USP5 および REST の発現量について検討することでこれらの挙動を解析した。

II. 実験方法

1. 実験動物

18-25 g 雌性 ddY 系マウス (紀和実験動物) を使用した。

2. 食餌による亜鉛欠乏マウスの作製

飼育は既報⁵¹⁾に従って行った。1 ゲージごとに 4 匹以内に分けた上で亜鉛 48.9 mg/kg を含むコントロール食 (Zn+群) あるいは亜鉛 0.6 mg/kg を含む亜鉛欠乏食 (Zn-群) 及び水道水を自由に摂取させ、2 週間飼育した。

3. 亜鉛キレーターによる亜鉛欠乏マウスの作製

飼育は第 1 章と同様におこなった。亜鉛キレーターである N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine (TPEN) は既報^{52,53)}を参考に 5 mg/kg の用量で CPA 投与 30 分前にマウス腹腔内へ投与した。

4. 膀胱痛様行動の測定

第 1 章と同様の方法で行った。

5. von Frey filaments による膀胱関連痛覚過敏の評価

第 1 章と同様の方法で行った。

6. 膀胱湿重量の測定

第 1 章と同様の方法で行った。

7. ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry) 法による血漿・膀胱組織中亜鉛濃度の測定

ウレタン麻酔下、腹部大動脈より採血を行い、凝固抑制の目的でヘパリン 0.03 mL と混合させた。その後遠心 (4°C, 1,800 G, 10 min) し、上清の血漿は 1 mL の 60 % 硝酸に溶解させてサンプルとした。膀胱組織は重量を測定し、2 mL の 60 % 硝酸に溶解させた。血漿及び膀胱サンプルは、測定前日に 90°C で 2 時間インキュベートを行い、血漿サンプルは 3 mL に、膀胱サンプルは 5 mL に超純水でメスアップした。それぞれのサンプルの亜鉛濃度は、ICP-MS 法により測定した。

8. Antisense 法を用いた Cav3.2 ノックダウン

Cav3.2 T 型 Ca²⁺チャネルのノックダウンは 2 種類の antisense (AS) あるいは scramble (SC) oligodeoxy nucleotide (ODN) を混合し、5 µL の用量でマウスの脊髄クモ膜下腔内に 1 日 1 回 3 日間反復髄腔内投与した。Cav3.2 の AS-ODN および SC-ODN の配列は以下の通りである。

・ SC-ODN-Cav3.2 (No. 1, TAA GTG GTG GTA TGA GGG TGT TTG GGA; No. 2, GGG AAA GAC CAC GGG TAA TGG TAG GAC)

・ AS-ODN-Cav3.2 (No. 1, TGA AGT GGT AAT GGT GGT GAT GGT GGT; No. 2, GAG TGA TGA TGG ACA GGA ACG AGA CCG)

Cav3.2 のノックダウンの確認は L1 から L6 レベルの脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion: DRG) における Cav3.2 タンパク発現量を Western blot 法を用いて測定することで行った。

9. Western blot 法による各種タンパクの検出

サンプル調整法および Western blot 法は第 1 章と同様の方法で行った。サンプルはマウスの L1-L6 レベルの DRG あるいは膀胱を取り出して調整し、Cav3.2、Egr-1、USP5、REST および CSE のタンパク発現量を検討した。一次抗体として

使用した抗体は以下の通りである。一次抗体は the rabbit polyclonal antibodies against $Ca_v3.2$ (1:1000, Sigma-Genosys/Sigma-Aldrich), Egr-1 (1:500, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), USP5 (1:1000, Proteintech, Rosemont, IL), REST (1:500, Abcam, Cambridge, UK), CSE (1:1000, Sigma-Aldrich Japan, 石狩) および GAPDH (1:5000, Santa Cruz Biotechnology)を用いた。二次抗体は horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:5000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)を使用した。

10. 使用薬物および投与スケジュール

CPA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) は 0.9 % 生理食塩水で溶解し、200 あるいは 400 mg/kg の用量でマウスに腹腔内投与した。T 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬である RQ-00311651 (ラクオリア創薬、名古屋) および NNC 55-0396 (Sigma-Aldrich) は、0.5 % メチルセルロースで懸濁および 0.9 % 生理食塩水で溶解し、10 または 20 mg/kg の用量で CPA 投与 3 時間 20 分後および 3 時間後に腹腔内投与または 3、10 または 20 mg/kg の用量で CPA 投与 3 時間後に経口投与した。T 型 Ca^{2+} チャネルの 3 つのアイソフォームの内 $Ca_v3.2$ を選択的に阻害することが知られる zinc chloride (キシダ化学、大阪) は 0.9 % 生理食塩水で溶解し、340 μ g/kg の用量で CPA 投与 3 時間後に腹腔内投与した。TPEN は 6 mM HCl で溶解し、5 mg/kg の用量で CPA 投与 30 分前に腹腔内投与した。Transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) 阻害薬である SB366791 (Sigma-Aldrich) は、2 % DMSO および 1 % cremophol を含む 0.9 % 生理食塩水で溶解し、CPA 投与 3 時間後に腹腔内投与した。TRPA1 阻害薬である AP18 (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) は、7.5 % DMSO および 0.5 % Tween 80 を含む PBS に溶解し、CPA 投与 3 時間後に腹腔内投与した。NMDA 受容体阻害薬である MDL 105,519 は 0.9 % 生理食塩水で溶解し、CPA 投与 3 時間後に腹腔内投与した。最後に、CSE の競合的阻害薬である β -cyano-L-alanine (Sigma-Aldrich) は 0.9 % 生理食塩水で溶解し、

50 mg/kg の用量で CPA 投与 30 分前に腹腔内投与した。

11. 統計処理

第 1 章と同様の方法で行った。

III. 実験結果

1. CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量増加に対する選択的 T 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬 NNC 55-0396 腹腔内投与の効果

CPA 誘起膀胱炎に対する膀胱痛における選択的 T 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬、NNC 55-0396 (NNC) の効果を検討した。NNC を 20 mg/kg の用量で CPA 投与 3 時間後に腹腔内投与したところ、CPA 誘起膀胱痛様行動および関連痛覚過敏が有意に抑制された (Fig. 10A, B)。また、NNC 20 mg/kg は今回の投与スケジュールで CPA 誘起膀胱湿重量増加に影響しなかった (Fig. 10C)。

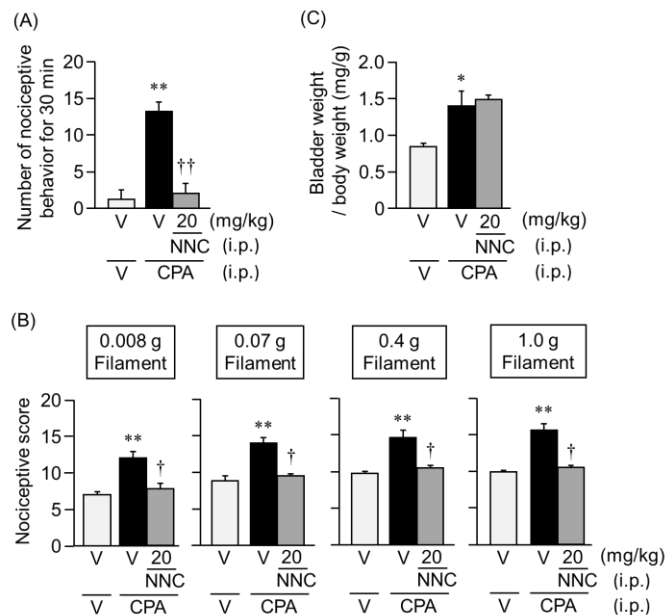


Fig. 10 NNC 55-0396 (NNC) at 20 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 3 h after i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) or V. (A) The nociceptive behavior was observed from 3.5 to 4 h after the administration. (B) The nociception test was performed 4 h after the administration. (C) The mice were killed 4 h after the administration and bladder weight was measured. Data show the mean with S.E.M. from 4-5 mice. *P < 0.05, **P < 0.01 vs V + V. †P < 0.05, ††P < 0.01 vs V + CPA.

2. CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量増加に対する選択的 T 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬 RQ-00311651 腹腔内投与の効果

不活化状態のチャネルに強い選択性を有する state-dependent T 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬である RQ-00311651 (RQ) の効果を検討した。その結果、RQ を 10 もしくは 20 mg/kg の用量で CPA 投与 3 時間 20 分後に腹腔内投与したところ、膀胱痛

様行動および関連痛覚過敏を強く抑制した (Fig. 11A, B)。また、RQ 10 および 20 mg/kg は今回の投与スケジュールでは CPA により誘起される膀胱湿重量の増加に影響しなかった (Fig. 11C)。

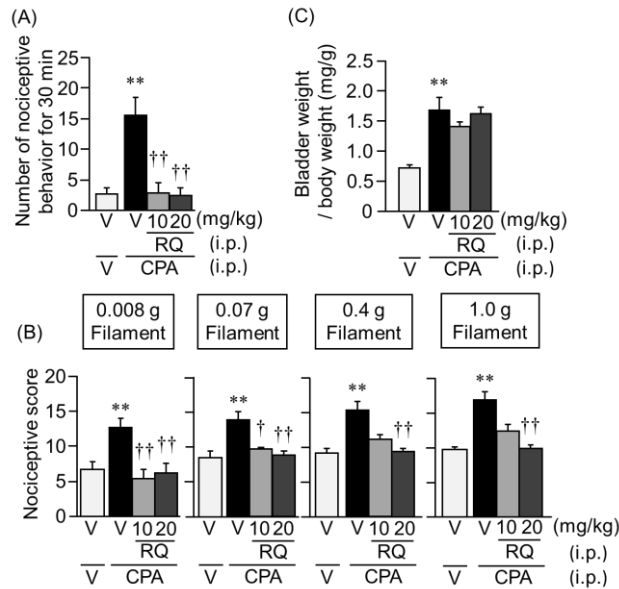


Fig. 11 RQ-00311651 at 10 or 20 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice after i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) or V. (A) The nociceptive behavior was observed from 3.5 to 4 h after the administration. (B) The nociception test was performed 4 h after the administration. (C) The mice were killed 4 h after the administration and bladder weight was measured. Data show the mean with S.E.M. from 5-6 mice. **P<0.01 vs V + V. †P<0.05, ††P<0.01 vs V + CPA.

3. CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量増加に対する選択的 T 型 Ca²⁺チャネル阻害薬 RQ-00311651 経口投与の効果

次に、RQ を経口投与した場合の効果を検討した。その結果、RQ は 10 または 20 mg/kg の用量で経口投与することにより膀胱痛様行動及び関連痛覚過敏を有意に抑制した (Fig. 12A, B)。また、RQ 10 および 20 mg/kg は今回の投与スケジュールで CPA により誘起される膀胱湿重量の増加に影響しなかった (Fig. 12C)。

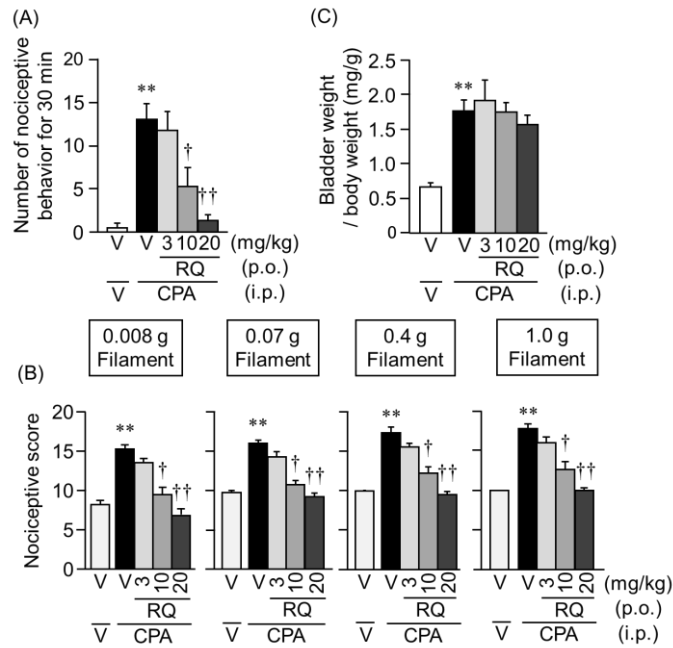


Fig. 12 RQ-00311651 at 3, 10 or 20 mg/kg or vehicle (V) was administered p.o. to mice after i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) or V. (A) The nociceptive behavior was observed from 3.5 to 4 h after the administration. (B) The nociception test was performed 4 h after the administration. (C) The mice were killed 4 h after the administration and bladder weight was measured. Data show the mean with S.E.M. from 4-7 mice. ** $P < 0.01$ vs V + V. † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs V + CPA.

4. 亜鉛制限食を摂取させたマウスにおける血漿及び膀胱組織中亜鉛量の測定

亜鉛制限食を摂取させたマウスにおける血漿及び膀胱組織中亜鉛量を ICP-MS 法により測定した。その結果、血漿中亜鉛量は Zn(+)群と比較して Zn(-)群において著しく低下していた (Fig. 13A)。一方、膀胱組織中亜鉛量は Zn(+)群と Zn(-)群ではほぼ同等だった (Fig. 13B)。

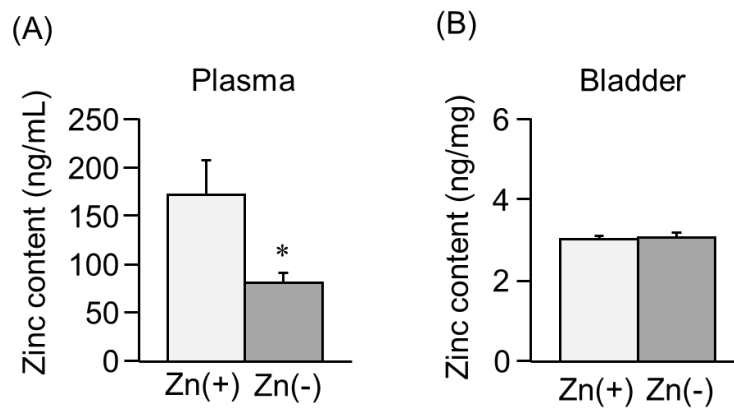


Fig. 13 Mice were fed the control [48.9 mg zinc/kg, Zn (+)] diet or zinc-deficient [0.6 mg zinc/kg, Zn (-)] diet for 14 days. Data show the mean with S.E.M. for 10 mice. Zinc content was measured by ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry), * $P < 0.05$ vs. Zn (+).

5. 亜鉛制限食摂取マウスにおける CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏及び膀胱湿重量の変化

Zn(+)群及び Zn(-)群マウスに CPA を 400 あるいは 200 mg/kg の用量でそれぞれ腹腔内投与したところ、CPA 400 mg/kg を投与した Zn(+)群と Zn(-)群マウスで誘起される膀胱痛様行動と関連痛覚過敏はほぼ同程度だった (Fig. 14A, B)が、CPA 200 mg/kg を腹腔内投与したマウスで誘起される膀胱痛様行動及び関連痛覚過敏は Zn(+)群と比較して Zn(-)群マウスにおいて有意に増加していた (Fig. 14A, B)。一方、CPA による膀胱湿重量増加の程度には Zn(+)群と Zn(-)群の間で差は見られなかった (Fig. 14C)。

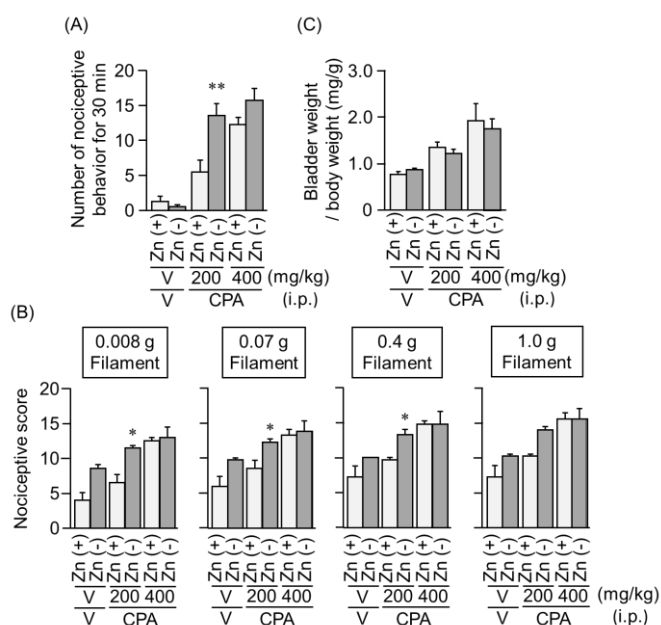


Fig. 14 Cyclophosphamide (CPA) at 200 or 400 mg/kg, or vehicle (V) was administered i.p. to mice. (A) The nociceptive behavior was observed from 3.5 to 4 h after the administration. (B) The nociception test was performed 4 h after the administration. (C) The mice were killed 4 h after the administration and bladder weight was measured. Data show the mean with S.E.M. for 4 mice. *P<0.05, **P<0.01 vs respective Zn (+) group.

6. 亜鉛制限食摂取マウスにおける CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏に対する T 型 Ca²⁺チャネル阻害薬の効果

次に、Zn(+)群には CPA を 400 mg/kg、Zn(-)群には CPA を 200 mg/kg の用量で腹腔内投与することで誘起される膀胱痛様行動・関連痛覚過敏に対する T 型 Ca²⁺チャネル阻害薬 NNC の効果を検討した。その結果、NNC を 10 mg/kg の用量で

腹腔内投与したところ、Zn(+)群と Zn(-)群でそれぞれ認められる膀胱痛様行動と関連痛覚過敏は完全に抑制された (Fig. 15A, B)。

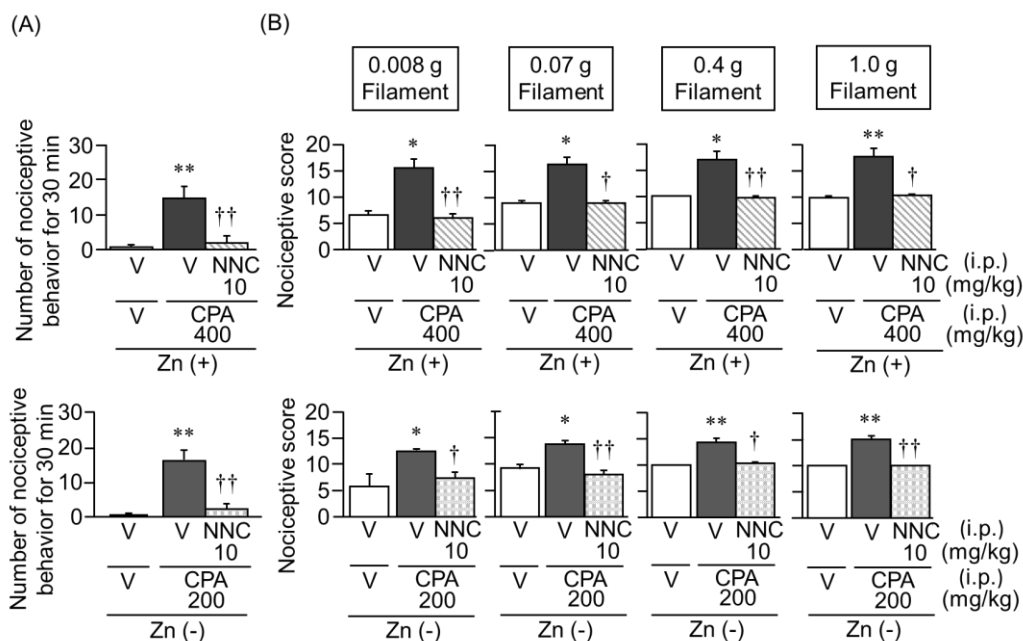


Fig. 15 NNC 55-0396 (NNC) at 10 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 3 h after i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) at 200 or 400 mg/kg or V.(A) The nociceptive behavior was observed from 3.5 to 4 h after the administration. (B) The nociception test was performed 4 h after the administration. Data show the mean with S.E.M. for 4 mice. *P<0.05, **P<0.01 vs V + V. †P<0.05, ††P<0.01 vs V + CPA 200 or 400.

7. 亜鉛制限食摂取マウスにおける CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏に対する zinc chloride の効果

次に、外来性の亜鉛の影響を調べるため、zinc chloride (ZnCl₂) を用いて検討を行った。その結果、ZnCl₂ 340 μg/kg の腹腔内投与は Zn(+)群と Zn(-)群で誘起される膀胱痛様行動及び関連痛覚過敏を有意に抑制した (Fig. 16A, B)。

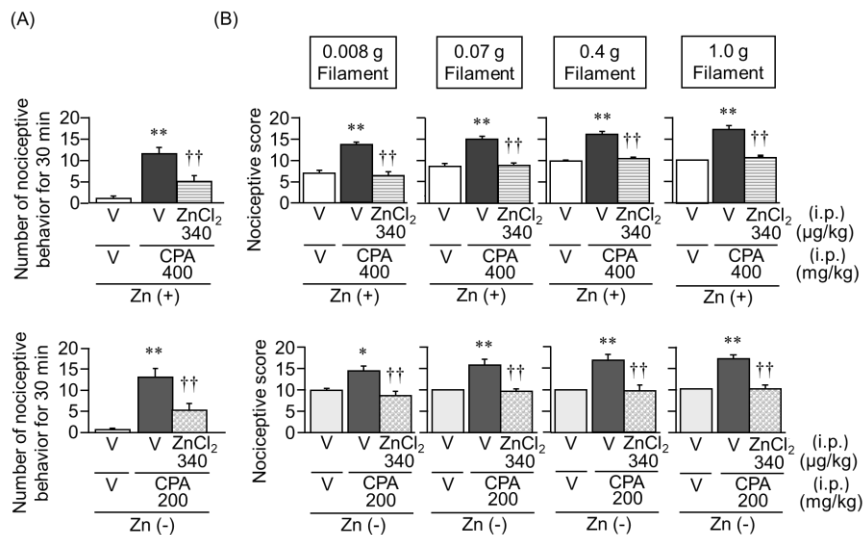


Fig. 16 Zinc chloride (ZnCl₂) at 340 µg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 3 h after i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) at 200 or 400 mg/kg or V. (A) The nociceptive behavior was observed from 3.5 to 4 h after the administration. (B) The nociception test was performed 4 h after the administration. Data show the mean with S.E.M. for 6-10 mice. *P<0.05, **P<0.01 vs V + V. ††P<0.01 vs V + CPA 200 or 400.

8. 亜鉛制限食摂取マウスにおける Ca_v3.2 T型 Ca²⁺チャネルノックダウンの効果

Ca_v3.2 に対する AS の反復髄腔内投与により、DRG における Ca_v3.2 タンパク発現量が著明に抑制されていることを確認した (Fig. 17A)。そこで、Ca_v3.2 をノックダウンしたマウスに CPA を 200 mg/kg の用量で投与したところ、Zn(-)群において膀胱痛様行動および関連痛覚過敏が完全に阻止された (Fig. 17B, C)。一方、SC を投与したコントロールマウスでは、Zn(+)群に比べて Zn(-)群の Ca_v3.2 タンパク発現量が著しく増加していた (Fig. 17A)。

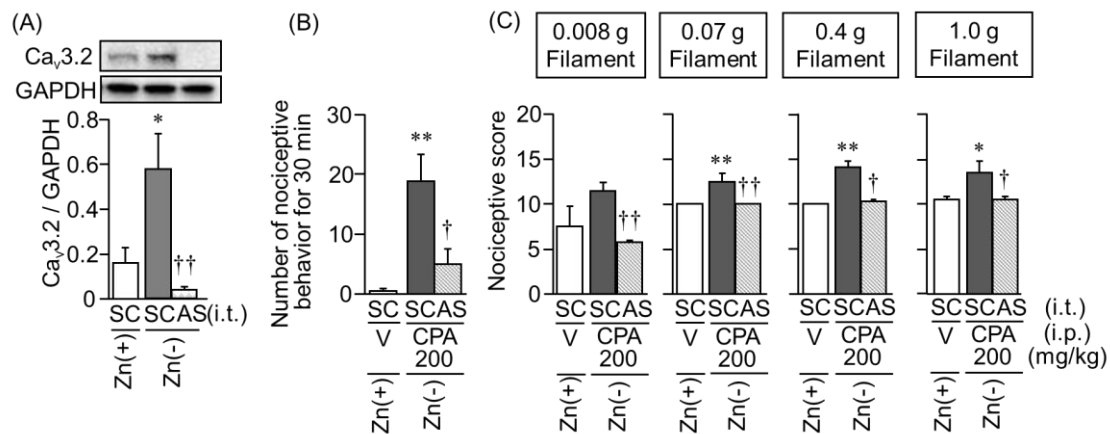


Fig. 17 Antisense-ODN-Cav3.2 (AS) or scramble-ODN (SC) at a dose of 10 μ g/mouse in a volume of 5 μ l was administered i.t. repeatedly once a day for 3 days. On the 4th day, vehicle (V) or cyclophosphamide (CPA) at 200 mg/kg was administered i.p. to mice. (A) Typical photographs of Western blotting and quantified data by densitometry are shown. (B) The nociceptive behavior was observed from 3.5 to 4 h after the administration. (C) The nociception test was performed 4 h after the administration. Data show the mean with S.E.M. for 4-5 mice. *P<0.05, **P<0.01 vs Zn(+) + SC or Zn(+) + SC + V. †P<0.05, ††P<0.01 vs Zn(-) + SC or Zn(-) + SC + CPA.

9. 亜鉛キレーター投与マウスにおける CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量の変化

細胞内外の亜鉛を取り込み、急性亜鉛欠乏状態を誘起する亜鉛キレーター、TPEN を 5 mg/kg の用量で腹腔内前投与し、その 30 分後に単独では痛みを誘起しない用量 (200 mg/kg) の CPA を投与した。その結果、膀胱痛様行動 (Fig. 18A)、関連痛覚過敏 (Fig. 18B)および膀胱湿重量 (Fig. 18C)が明らかに増加した。

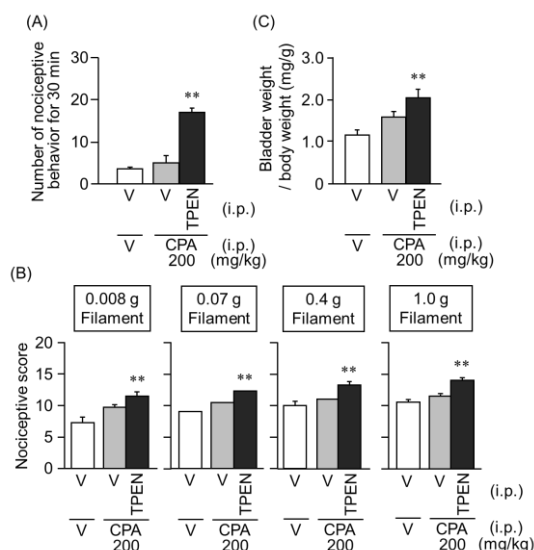


Fig. 18 N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine (TPEN) at 5 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 30 min before i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) at 200 mg/kg or V. (A) The nociceptive behavior was observed for 30 min 3.5 h after the administration. (B) The nociception test was performed 4 h after the administration. (C) The mice were killed 4 h after the administration and bladder weight was measured. Data show the mean with S.E.M. for 4 mice. **P<0.01 vs V + V.

10. 亜鉛キレーター投与マウスにおける CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量の増加に対する T 型 Ca²⁺チャネル阻害薬の効果

TPEN と CPA 200 mg/kg を併用投与したマウスにおける膀胱痛様行動・関連痛覚過敏の増加に T 型 Ca²⁺チャネルが関与するか否かを検討する為、T 型 Ca²⁺チャネル阻害薬である NNC を CPA 投与 3 時間後に腹腔内投与したところ、両者併用により誘起される膀胱痛様行動および関連痛覚過敏が強力に抑制された (Fig. 19A, B)。一方、膀胱湿重量増加に対しては有意な変化が認められなかった (Fig. 19C)。

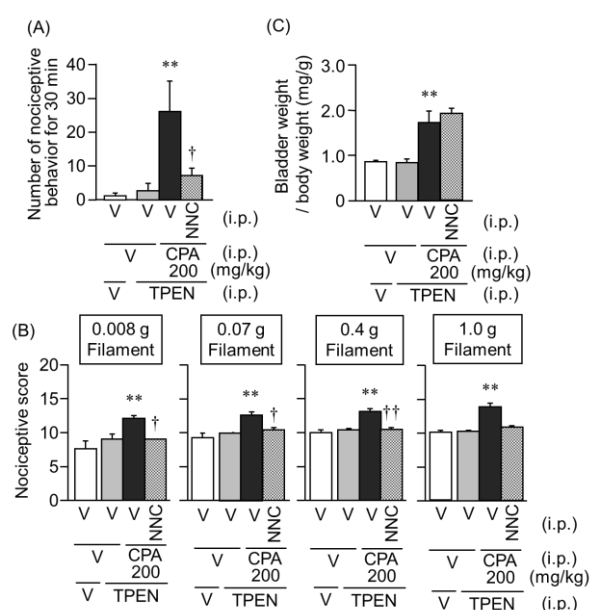


Fig. 19 N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine (TPEN) at 5 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 30 min before i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) at 200 mg/kg or V. NNC 55-0396 (NNC) at 10 mg/kg or V was administered i.p. to mice 3 h after i.p. administration of CPA or V. (A) The nociceptive behavior was observed for 30 min 3.5 h after the administration. (B) The nociception test was performed 4 h after the administration. (C) The mice were killed 4 h after the administration and bladder weight was measured. Data show the mean with S.E.M. for 5 mice. ** P<0.01 vs V + V + V. †P<0.05, ††P<0.01 vs V + CPA + TPEN.

11. 亜鉛キレーター投与マウスにおける Cav3.2 T 型 Ca²⁺チャネルノックダウンの効果

TPEN と CPA 200 mg/kg を併用投与したマウスにおける膀胱痛及び膀胱湿重量増加に Cav3.2 が関与するかを検討する為、先と同様にノックダウン実験を行った。その結果、両者併用投与したマウスにおいて膀胱痛様行動、関連痛覚過敏の著名な低下が認められ (Fig. 20B, C)、膀胱湿重量増加が有意に抑制された

(Fig. 20D)。また、DRG における $Ca_v3.2$ タンパク発現量がアンチセンス法により著明に抑制されていることも確認した (Fig. 20A)が、興味深いことに TPEN と CPA 200 mg/kg を併用投与したマウスの DRG において $Ca_v3.2$ のタンパク発現量が著しく増加していた (Fig. 20A)。

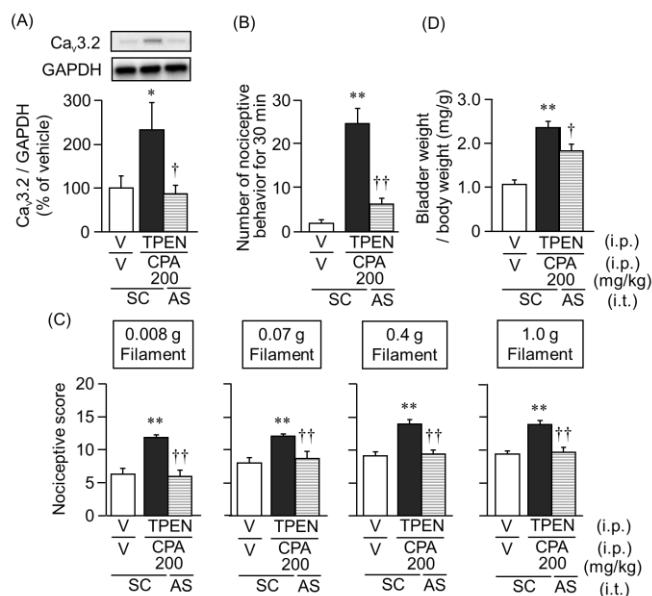


Fig. 20 Antisense-ODN- $Ca_v3.2$ (AS) or scramble-ODN (SC) at a dose of 10 μ g/mouse in a volume of 5 μ l was administered i.t. repeatedly once a day for 3 days. On the 4th day, N,N,N',N'-Tetrakis (2-pyridylmethyl)-ethylenediamine (TPEN) at 5 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 30 min before i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) at 200 mg/kg or V. (A) Typical photographs of Western blotting and quantified data by densitometry are shown. (B) The nociceptive behavior was observed for 30 min 3.5 h after the administration. (C) The nociception test was performed 4 h after the administration. (D) The mice were killed 4 h after the administration and bladder weight was measured. Data show the mean with S.E.M. for 8 mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs SC + V + V. † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs SC + TPEN + CPA.

12. 亜鉛キレーター投与マウスにおける CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏及び膀胱湿重量の増加に対する NMDA 受容体阻害薬の効果

亜鉛は NMDA 受容体の NR2A サブユニットにある結合部位に作用してその活性を抑制することが知られている^{14,54}。そこで、NMDA 受容体阻害薬である MDL105,519 (MDL) の効果を検討したところ、TPEN と CPA 200 mg/kg を併用投与することで誘起される膀胱痛様行動 (Fig. 21A)、関連痛覚過敏 (Fig. 21B)及び膀胱湿重量増加 (Fig. 21C) に影響しなかった。

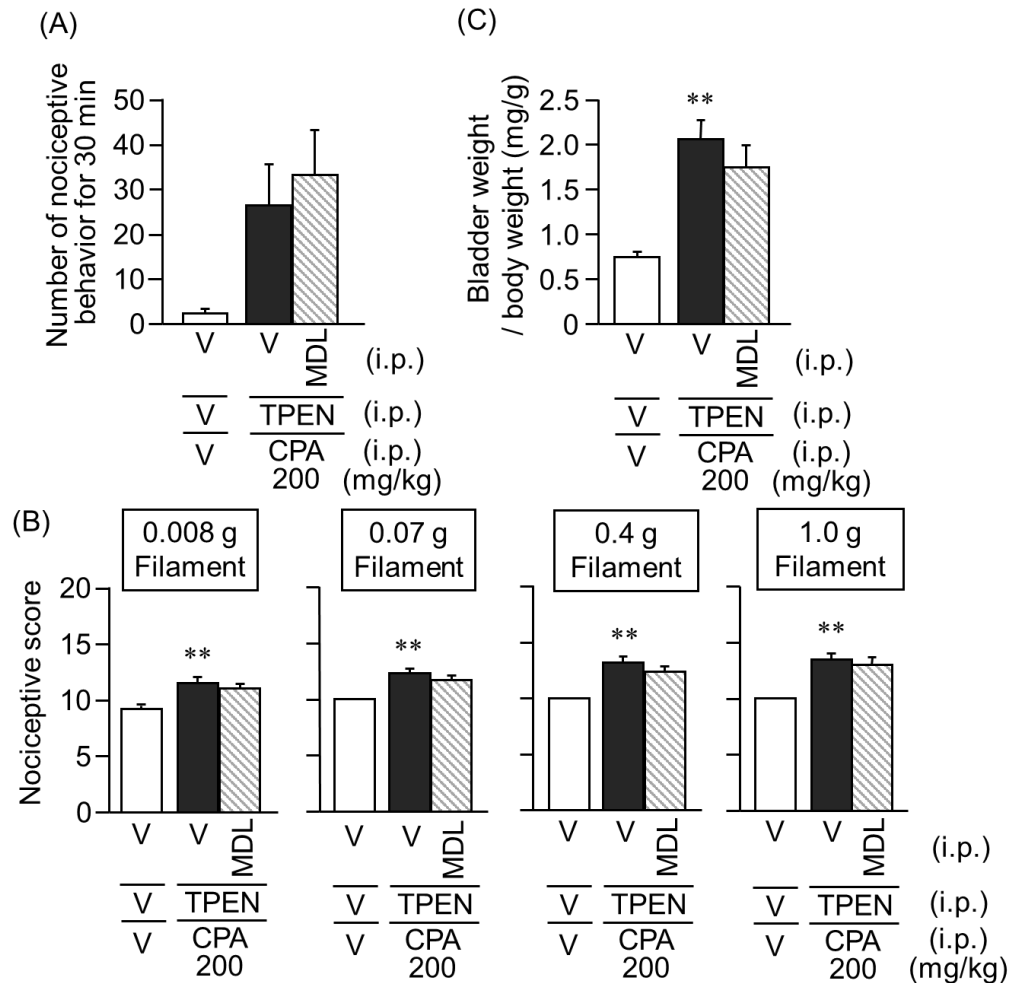


Fig. 21 N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine (TPEN) at 5 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 30 min before i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) at 200 mg/kg or V. MDL105,519 (MDL) at 1 mg/kg or V was administered i.p. to mice 3 h after i.p. administration of CPA or V. (A) The nociceptive behavior was observed for 30 min 3.5 h after the administration. (B) The nociception test was performed 4 h after the administration. (C) The mice were killed 4 h after the administration and bladder weight was measured. Data show the mean with S.E.M. for 6 mice. **P<0.01 vs V + V + V.

13. 亜鉛キレーター投与マウスにおける CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量の増加に対する TRPA1 チャンネル阻害薬の効果

次に、TRPA1 チャンネル阻害薬である AP18 を用いて、TPEN と CPA 200 mg/kg の併用投与により誘起される膀胱痛に対する TRPA1 の関与について検討した。その結果、AP18 の CPA 投与 3 時間後投与は両者併用による膀胱痛様行動および関連痛覚過敏に有意な変化を示さなかった (Fig. 22A, B)。また、膀胱湿重量増加についても影響しなかった (Fig. 22C)。

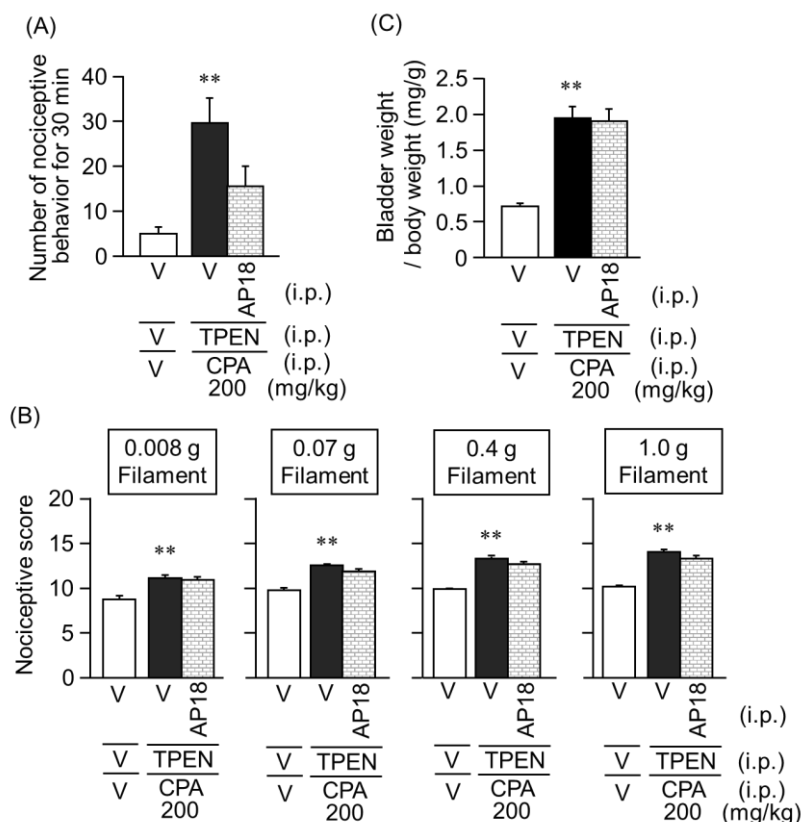


Fig. 22 N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine (TPEN) at 5 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 30 min before i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) at 200 mg/kg or V. AP18 at 10 mg/kg or V was administered i.p. to mice 3 h after i.p. administration of CPA or V. (A) The nociceptive behavior was observed for 30 min 3.5 h after the administration. (B) The nociception test was performed 4 h after the administration. (C) The mice were killed 4 h after the administration and bladder weight was measured. Data show the mean with S.E.M. for 8 mice. ** P<0.01 vs V + V + V.

14. 亜鉛キレーター投与マウスにおける CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量の増加に対する TRPV1 チャンネル阻害薬の効果

続いて、TPEN と CPA 200 mg/kg の併用投与により誘起される膀胱痛に対する TRPV1 の関与について検討した。その結果、TRPV1 阻害薬である SB366791 (SB) の CPA 投与 3 時間後腹腔内投与は両者併用による膀胱痛様行動および関連痛覚過敏に影響せず (Fig. 23A, B)、膀胱湿重量増加も変化しなかった (Fig. 23C)。

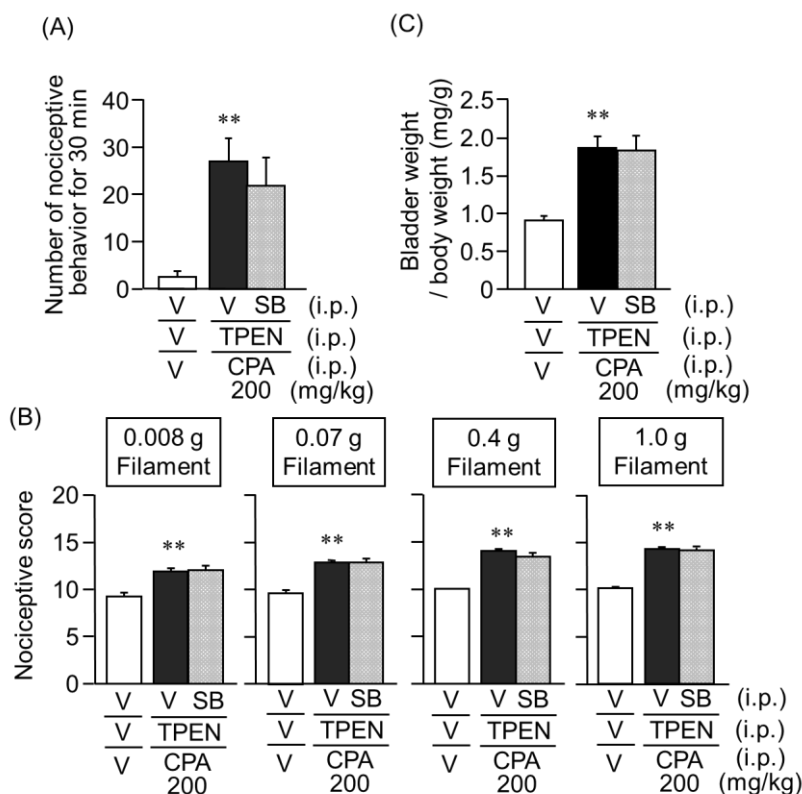


Fig. 23 N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine (TPEN) at 5 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 30 min before i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) at 200 mg/kg or V. SB366791 (SB) at 0.5 mg/kg or V was administered i.p. to mice 3 h after i.p. administration of CPA or V. (A) The nociceptive behavior was observed for 30 min 3.5 h after the administration. (B) The nociception test was performed 4 h after the administration. (C) The mice were killed 4 h after the administration and bladder weight was measured. Data show the mean with S.E.M. for 8 mice. ** P<0.01 vs V + V + V.

15. CPA 投与マウスにおける Cav3.2, Egr-1, USP5 及び REST のタンパク発現量

松波らは CPA 300 mg/kg を投与したマウスの DRG において、Cav3.2 のタンパク発現が増加傾向にあることを報告している。そこで、今回は CPA を 200 あるいは 400 mg/kg の用量で腹腔内投与して 4 時間後に摘出したマウスの DRG における Cav3.2, Egr-1, USP5 及び REST のタンパク発現量を Western blot 法により検討した。その結果、CPA 200 mg/kg の投与ではそれぞれのタンパク発現量に変化はなかったが、400 mg/kg の投与では Cav3.2, Egr-1, USP5 のタンパク発現量が著しく増加していた (Fig. 24A, B, C)。しかしながら、REST の発現量には有意な変化が認められなかった (Fig. 24D)。

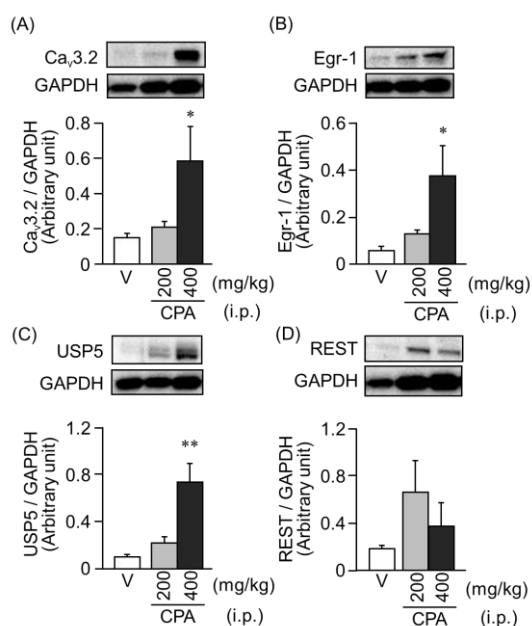


Fig. 24 Typical photographs of Western blotting and quantified data by densitometry are shown. Cyclophosphamide (CPA) at 200 or 400 mg/kg, or vehicle (V) was administered i.p. to mice. The mice were killed 4 h after the administration of CPA. Data show the mean with S.E.M. for 5 mice. *P<0.05, **P<0.01 vs V.

16. 亜鉛キレーター投与マウスにおける Ca_v3.2, Egr-1, USP5 および REST のタンパク発現量

TPEN を 5 あるいは 20 mg/kg の用量で腹腔内投与してから 4 時間 30 分後に摘出した DRG における Ca_v3.2, Egr-1, USP5 および REST のタンパク発現量を先と同様の方法で検討したが、いずれのタンパク発現量も有意な変化が検出出来なかった (Fig. 25)。

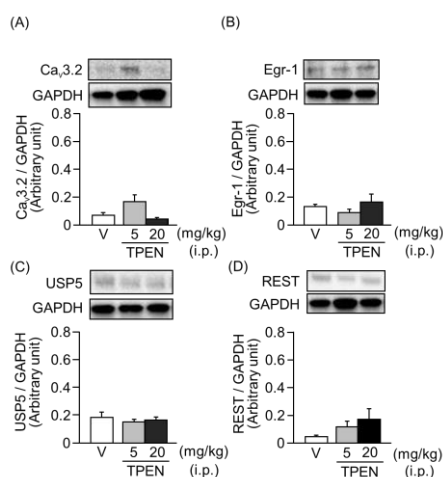


Fig. 25 Typical photographs of Western blotting and quantified data by densitometry are shown. N,N,N',N'-Tetrakis (2-pyridylmethyl)-ethylenediamine (TPEN) at 5 or 20 mg/kg, or vehicle (V) was administered i.p. to mice. The mice were killed 4.5 h after the administration of TPEN. Data show the mean with S.E.M. for 5 mice.

17. 亜鉛キレーター及び CPA 200 mg/kg を併用投与したマウスにおける Cav3.2, Egr-1, USP5 及び REST のタンパク発現量

TPEN と CPA 200 mg/kg を併用投与したマウスから抽出した DRG における Cav3.2, Egr-1, USP5 及び REST のタンパク発現量を測定したところ、それぞれ単独投与した場合には有意な変化は見られなかったが、両者を併用した場合には Cav3.2, Egr-1 及び USP5 の有意な発現増加が認められた (Fig 26 A, B, C)。一方で REST の発現量に有意な変化は認められなかった (Fig. 26D)。

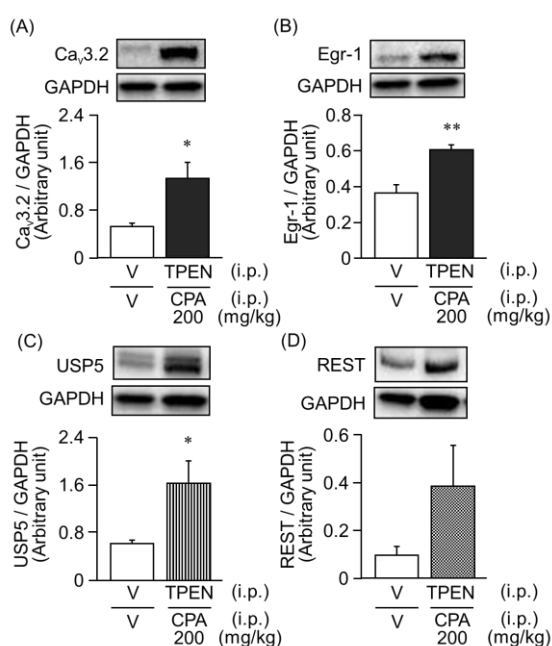


Fig. 26 Typical photographs of Western blotting and quantified data by densitometry are shown. N,N,N',N'-Tetrakis (2-pyridylmethyl)-ethylenediamine (TPEN) at 5 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 30 min before i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) at 200 mg/kg. The mice were killed 4 h after the administration of CPA. Data show the mean with S.E.M. for 5 mice. *P<0.05, **P<0.01 vs V + V.

18. 亜鉛キレーター及び/もしくは CPA 投与マウスの膀胱組織における CSE 発現量の測定

TPEN 及び/もしくは CPA 200 mg/kg を投与したマウスから抽出した膀胱組織における CSE タンパク発現量を Western blot 法により測定したところ、第 1 章で示した CPA 400 mg/kg 単独投与で認められる様な CSE 発現増加は検出されなかった (Fig. 27)。

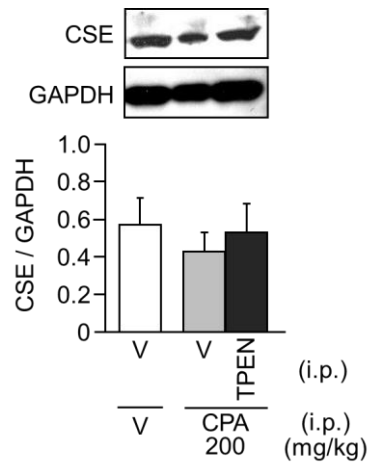


Fig. 27 Typical photographs of Western blotting and quantified data by densitometry are shown. N,N,N',N'-Tetrakis (2-pyridylmethyl)-ethylenediamine (TPEN) at 5 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 30 min before i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) at 200 mg/kg or V. The mice were killed 4 h after the administration of CPA. Data show the mean with S.E.M. for 4 mice.

19. 亜鉛キレーター投与マウスにおける CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏及び膀胱湿重量の増加に対する CSE 阻害薬の効果

TPEN と CPA 200 mg/kg の併用では膀胱組織中の CSE のタンパク発現誘導は検出されなかったが、CSE によって内因性に産生される H₂S が、膀胱痛の発症に寄与するか否かを、CSE の競合的拮抗薬である BCA を用いて検討した。その結果、BCA 50 mg/kg の前投与により、TPEN と低用量 CPA により誘起される膀胱痛様行動及び関連痛覚過敏が有意に抑制された (Fig 28A, B)。一方で、膀胱湿重量増加には影響を及ぼさなかった (Fig. 28C)。

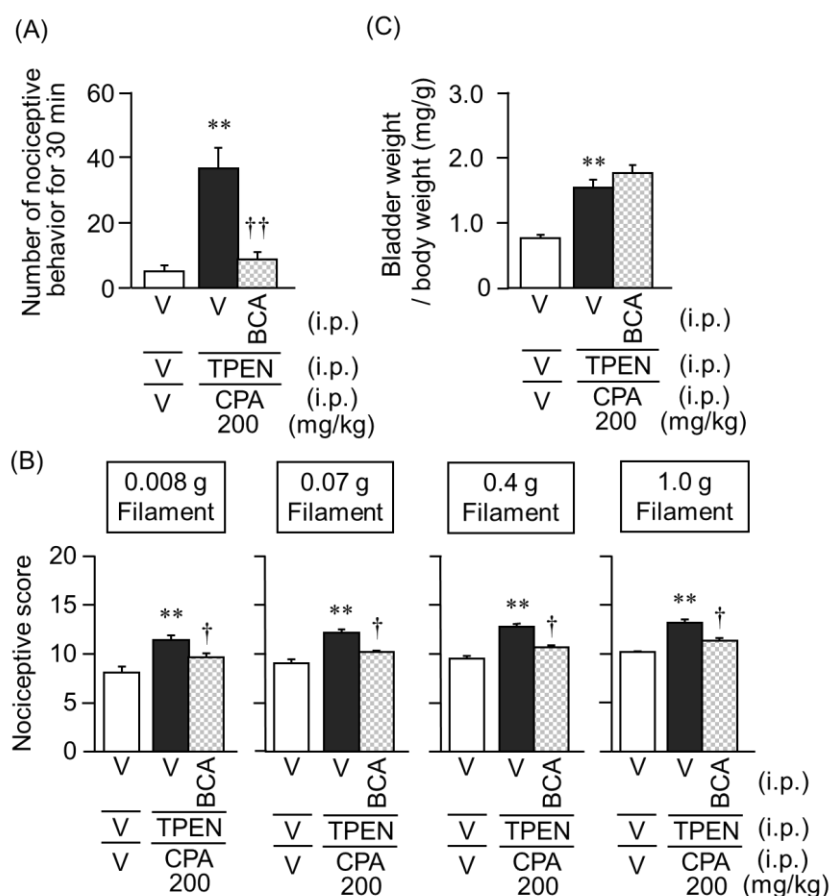


Fig. 28 N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine (TPEN) at 5 mg/kg and β -cyano-L-alanine (BCA) at 50 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 30 min before i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) at 200 mg/kg or V. (A) The nociceptive behavior was observed for 30 min 3.5 h after the administration. (B) The nociception test was performed 4 h after the administration. (C) The mice were killed 4 h after the administration and bladder weight was measured. Data show the mean with S.E.M. for 6-8 mice. **P<0.01 vs V + V + V. †P<0.05, ††P<0.01 vs V + TPEN + CPA.

20. 亜鉛キレーター及び CPA 200 mg/kg を併用投与したマウスにおける Cav3.2, Egr-1, USP5 及び REST のタンパク発現量に対する CSE 阻害薬の効果

TPEN と CPA 200 mg/kg の併用投与により誘起される知覚神経における Cav3.2 の発現誘導に CSE により内因性に産生される H₂S が関与するか否かを、CSE 阻害薬である BCA を用いて検討した。その結果、BCA の前投与は、TPEN と CPA 200 mg/kg を併用投与することで誘起される Cav3.2, Egr-1 及び USP5 のタンパク発現量増加を有意に抑制した (Fig. 29A, B, C)。しかしながら、REST の発現量に有意な変化は検出出来なかった (Fig. 29D)。

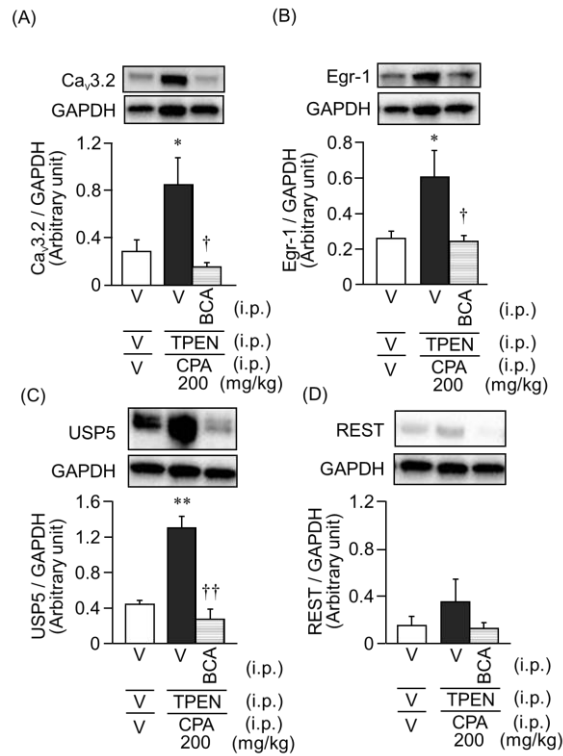


Fig. 29 Typical photographs of Western blotting and quantified data by densitometry are shown. β -cyano-L-alanine (BCA) at 50 mg/kg, N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine (TPEN) at 5 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 30 min before i.p. administration of cyclophosphamide (CPA) at 200 mg/kg. The mice were killed 4 h after the administration of CPA. Data show the mean with S.E.M. for 5 mice. *P<0.05, **P<0.01 vs V + V + V. †P<0.05, ††P<0.01 vs V + TPEN + CPA.

IV. 考察

本章における研究結果より、1) マウスにおいて亜鉛制限食摂取による慢性的な亜鉛欠乏あるいは亜鉛キレーターによる急性的な亜鉛欠乏によって、CPA 誘起膀胱炎関連膀胱痛が著しく増強されること、2) この亜鉛欠乏による CPA 誘起膀胱痛の増強には知覚神経に発現する $Ca_v3.2$ のチャネル機能の亢進に加えてタンパク発現増加が関与すること、3) 知覚神経における $Ca_v3.2$ のタンパク量増加には、Egr-1 発現増加による転写レベルでの発現増加と、USP5 発現増加による $Ca_v3.2$ のプロテアソーム分解の抑制が関与すること、さらに4) CSEにより内因性に産生される H_2S は、恐らく $Ca_v3.2$ のチャネル機能を直接亢進させることで知覚神経の興奮性を高め、それによって間接的に $Ca_v3.2$ のタンパク発現量の増加を促進している可能性が示唆された。

亜鉛欠乏食を2週間摂取させたマウスの血漿及び膀胱組織中亜鉛濃度を測定した所、膀胱組織中亜鉛濃度はZn(+)群とZn(-)群でほぼ同等だったが (Fig. 13B)、血漿中亜鉛濃度はZn(+)群に比べてZn(-)群で著しく低下していた (Fig. 13A)。この結果から、今回の条件下では、細胞内亜鉛はほとんど変化することなく、細胞外亜鉛が減少していることが示唆される。細胞内の亜鉛はTRPA1を活性化させる⁵⁵⁾のに対し、 $Ca_v3.2$ の活性には影響しない。一方、細胞外の亜鉛は $Ca_v3.2$ の細胞外ドメインに存在する191番目のヒスチジン残基に結合することでチャネル機能を抑制的に制御しており^{10,43)}、内因性 H_2S 等が亜鉛によるチャネル抑制を解除することで膀胱痛や結腸痛等の内臓痛や体性痛が増強されることが、川畑らによって既に報告されており^{2,3,9,10)}、今回の結果と矛盾しない。

先の章でも述べたように、CPA 誘起膀胱炎に伴う膀胱痛にCSE/ H_2S / $Ca_v3.2$ 系が関与することは既に報告されている⁸⁾。今回は亜鉛制限食摂取による慢性的な亜鉛欠乏あるいは亜鉛キレーターによる急性的な亜鉛欠乏によってCPA 誘起膀胱

膀胱痛が著しく促進され (Fig. 14A, B, 18A, B)、それらが T 型 Ca^{2+} チャンネル阻害薬 (Fig. 15A, B, 19A, B) や $\text{Ca}_v3.2$ のノックダウン (Fig. 17B, C, 20B, C) により抑制されることを証明した。

一方、亜鉛は NMDA 受容体の NR2A サブユニットにある結合部位に結合することで NMDA 受容体の活性を抑制すること⁵⁴⁾が報告されており、痛みの伝達過程において非常に重要であることが明らかにされている¹⁴⁾。そこで本研究でも NMDA 受容体の関与を検討したが、膀胱痛の程度に影響しなかった (Fig. 21A, B)。また、細胞内亜鉛が活性化に関与する TRPA1 チャンネル (Fig. 22A, B) 及び TRPV1 チャンネル (Fig. 23A, B) の関与も同様に検討したが、いずれも膀胱痛の程度に有意な変化をもたらさなかった。これらの結果より、 $\text{Ca}_v3.2$ が亜鉛欠乏による膀胱痛の増強に重要な役割を果たしていることが示唆された。

興味深いことに、亜鉛制限食摂取により亜鉛を慢性的に欠乏させたマウス、高用量 (400 mg/kg) の CPA を投与したマウス及び TPEN と低用量 (200 mg/kg) の CPA を併用投与したマウスの DRG において $\text{Ca}_v3.2$ 、Egr-1 及び USP5 の有意な発現増加が認められた (Fig. 17A, Fig. 24A, B, C, 26A, B, C)。これらのマウスにおける $\text{Ca}_v3.2$ のタンパク発現量増加には Egr-1 による転写促進及び USP5 による $\text{Ca}_v3.2$ プロテアソーム分解の抑制が関与している可能性が考えられるが、細胞外亜鉛濃度の低下や CSE により産生される内因性 H_2S による $\text{Ca}_v3.2$ のチャンネル機能亢進に伴う知覚神経の過剰興奮自体が、 $\text{Ca}_v3.2$ のタンパク量増加に寄与しているのではないかと推察される。知覚神経細胞において、神経興奮依存的に $\text{Ca}_v3.2$ の膜発現が増加し、これに USP5 の発現増加が関与することは既に報告されている⁵⁰⁾。本研究において、亜鉛キレーターによる急性的亜鉛欠乏状態のマウスにおいて、CPA を投与していない状態では $\text{Ca}_v3.2$ 、Egr-1 及び USP5 の発現量に有意な変化は認められなかったものの (Fig. 25A, B, C)、亜鉛制限食摂取によって慢性的に亜鉛を欠乏させた状態のマウスにおいては、CPA 投与なしでも亜鉛欠乏のみで $\text{Ca}_v3.2$ の発現量増加が見られた (Fig. 17A)。この理由については

急性と慢性の時間の差が関係していると考えられる。恐らく 2 週間という長時間における $Ca_v3.2$ の活性化が恒常的な知覚神経の興奮を引き起こし、 $Ca_v3.2$ の発現量増加に寄与したと推察している。一方、急性亜鉛欠乏状態のみでは $Ca_v3.2$ の発現量に影響を及ぼすほどの神経興奮は認められないが、低用量 CPA 投与によって内因性 H_2S などによる刺激が加わることで知覚神経の興奮性が亢進し、 $Ca_v3.2$ の発現増加が起こるのではないかと考えられる。

特に驚くべきことは、TPEN と CPA 200 mg/kg を併用投与したマウスから摘出した膀胱組織において CSE の発現誘導は認められなかった (Fig. 27) にも関わらず、CSE の競合的拮抗薬である BCA の前投与により膀胱痛の有意な抑制が認められ (Fig. 28A, B)、DRG における $Ca_v3.2$ 、Egr-1 及び USP5 の発現量増加が阻止された (Fig. 29A, B, C) ことである。これらの結果より、CSE により恒常的に産生される内因性 H_2S は $Ca_v3.2$ の活性および知覚神経興奮性を促進的に調節しており、Egr-1、USP5 及び $Ca_v3.2$ の発現誘導を後押ししているのではないかと考えられる。

結論として、高用量の CPA を投与したマウスでは CSE の発現誘導を介して発現が増加した内因性 H_2S による $Ca_v3.2$ の機能増強とそれに続く activity-dependent な Egr-1、USP5 と $Ca_v3.2$ の発現増加が膀胱痛に関与すると考えられる。一方、亜鉛欠乏状態では $Ca_v3.2$ の活性が既に上昇しており、低用量の CPA を投与することで内因性 H_2S 依存的に $Ca_v3.2$ の活性がさらに上昇し、それによる neuronal activity-dependent な Egr-1、USP5 と $Ca_v3.2$ の発現増加が膀胱痛を増強することが示唆された (Fig. 30)。従って、本章での研究は間質性膀胱炎/膀胱痛症候群のような難治性疾患の新規治療法として亜鉛補給が適応出来る可能性を示唆しており、膀胱痛の調節に亜鉛が重要な役割を果たしていることを示すものである。

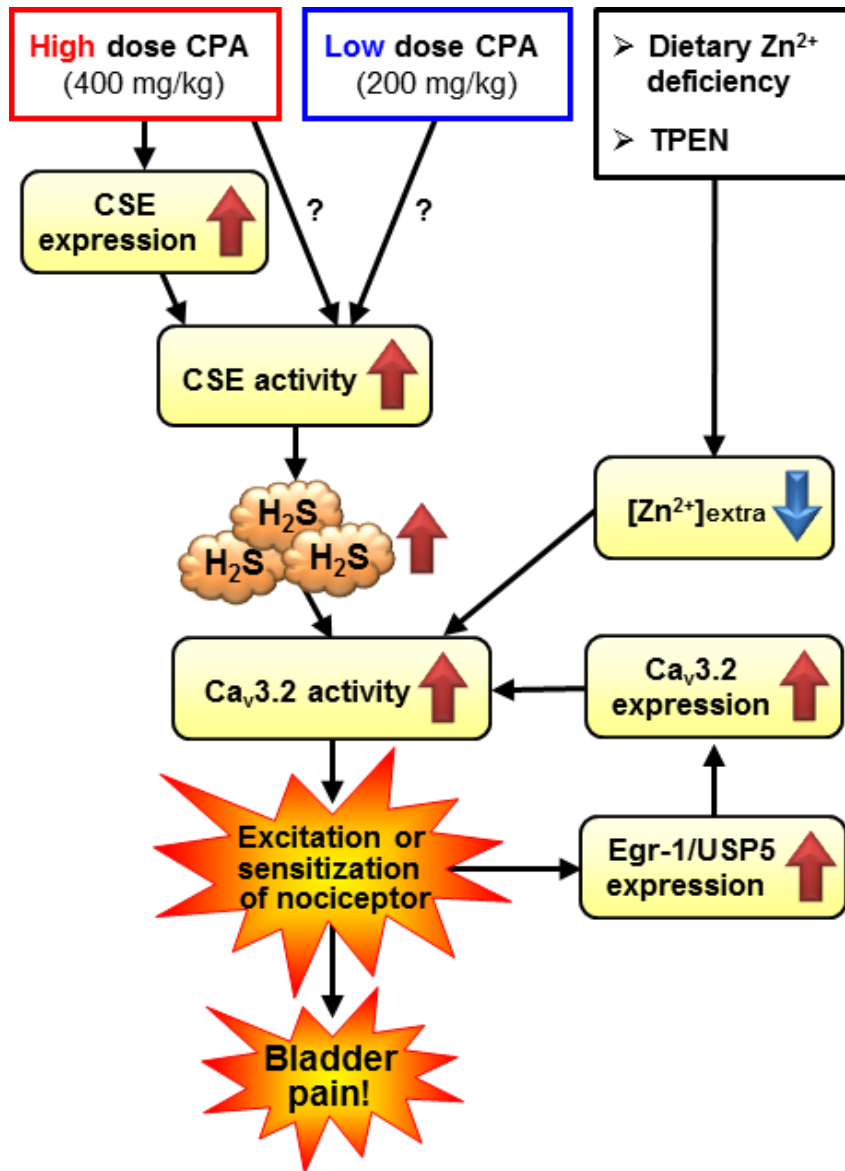


Fig. 30 A working hypothesis for the mechanisms by which zinc deficiency enhances CPA-induced bladder pain in mice. A high dose of CPA causes CSE upregulation in the bladder and then H₂S-dependent increased Ca_v3.2 activity followed by excitation of nociceptors, which in turn triggers Ca_v3.2 overexpression via Egr-1/USP5 upregulation and further increases Ca_v3.2 activity and bladder pain. A subeffective (low) dose of CPA and zinc deficiency synergistically enhance the activity and expression of Ca_v3.2 and nociceptor excitability in a similar fashion, leading to bladder pain.

Synergistically enhance the activity and expression of Ca_v3.2 and nociceptor excitability in a similar fashion, leading to bladder pain.

CSE: cystathionine-γ-lyase, CPA: cyclophosphamide, Egr-1: early growth response 1, H₂S: hydrogen sulfide, TPEN: N,N,N',N'-Tetrakis (2-pyridylmethyl)-ethylenediamine, USP5: ubiquitin-specific protease 5

V. 小括

1. T型 Ca^{2+} チャネル阻害薬である NNC の腹腔内投与は CPA 誘起膀胱痛様行動と関連痛覚過敏を抑制した。
2. state-dependent T型 Ca^{2+} チャネル阻害薬である RQ の腹腔内投与及び経口投与は CPA 誘起膀胱痛様行動と関連痛覚過敏を抑制した。
3. 亜鉛制限食を接種させたマウスにおける膀胱組織中亜鉛濃度はほぼ同等だったが、血漿中亜鉛濃度は Zn(+)群と比較して Zn(-)群において著しく低下していた。
4. 亜鉛制限食を接種させたマウスにおいて CPA 誘起膀胱痛様行動及び関連痛覚過敏が増強し、その増強が T 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬である NNC、 $\text{Ca}_v3.2$ を選択的に阻害することが知られている ZnCl_2 及び $\text{Ca}_v3.2$ のノックダウンにより阻止された。
5. 亜鉛キレーターを投与したマウスにおいて CPA 誘起膀胱痛様行動及び関連痛覚過敏が増加し、T 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬である NNC 及び $\text{Ca}_v3.2$ のノックダウンにより抑制された。
6. 低用量の CPA は $\text{Ca}_v3.2$ 、Egr-1 及び USP5 のタンパク発現量を変化させなかったが、高用量の CPA では増加した。
7. TPEN 単独投与では $\text{Ca}_v3.2$ 、Egr-1 及び USP5 のタンパク発現量が変化しなかったが、TPEN と低用量 CPA の併用投与では有意に増加した。
8. 亜鉛キレーター投与マウスにおける CPA 誘起膀胱痛様行動と関連痛覚過敏の増強及び DRG における $\text{Ca}_v3.2$ 、Egr-1 及び USP5 のタンパク発現量増加は可逆的 CSE 阻害薬である BCA により抑制された。

以上より、高用量の CPA では CSE の発現誘導に伴って増加した内因性 H_2S とそ

れに続く Egr-1 及び USP5 と Cav3.2 の発現増加が膀胱痛に関与すること、一方で亜鉛欠乏状態では Cav3.2 の活性がある程度上昇しており低用量 CPA 投与による内因性 H₂S 依存的に Cav3.2 の機能が更に増強することで神経興奮依存的な Egr-1 及び USP5 の発現増加とそれに伴う Cav3.2 の発現増加が膀胱痛を誘発することが示唆された。

第3章 Proteinase-activated receptor-2 活性化によって 誘起されるマウスの膀胱痛における cyclooxygenase-2/prostaglandin E₂ および T 型 Ca²⁺チャ ネルの関与

I. 緒言

プロテアーゼによって活性化される G 蛋白共役 7 回膜貫通型受容体である proteinase-activated receptors (PARs) は、PAR1 から PAR4 まで存在しており、胃・血管平滑筋や膀胱など生体内で広範な部位に発現している。一次知覚神経や上皮細胞に豊富に発現している PAR2 は、トリプシン、肥満細胞のトリプターゼなどのセリンプロテアーゼにより受容体の細胞外 N 末鎖が特定の部位で切断され、新たに露出された N 末鎖のアミノ酸配列「SLIGKV----」が tethered リガンドとして受容体の第 2 ループに結合することで受容体が活性化する¹⁷⁾。ラット・マウスの PAR2 の受容体活性化配列を基に人工的に合成されたペプチド SLIGRL-amide は、受容体の第 2 ループに直接結合し、非酵素的に PAR2 を活性化させることが出来る。

強い膀胱痛症状を特徴とする間質性膀胱炎患者では、膀胱組織生検中の肥満細胞数の増加や尿中における肥満細胞由来トリプターゼの増加が認められることが報告されている⁵⁶⁾。PAR2 はトリプターゼにより活性化されること、さらに PAR2 が内臓痛や体性痛に寄与している^{57,58)}という報告から推察すると、間質性膀胱炎に伴う痛み発現に PAR2 が関与している可能性は十分考えられる。マウス

における CPA 誘起膀胱炎には、肥満細胞由来トリプターゼによる PAR2 活性化とそれに伴う cyclooxygenase-2 (COX-2) 発現誘導が関与することが報告されている⁵⁹⁾他、川畑らのグループは CPA 誘起膀胱炎・膀胱痛に prostaglandin E₂ (PGE₂)/EP1 受容体系が関与することを報告している¹⁸⁾。さらに、同グループは PGE₂ が EP4 受容体/cAMP/PKA 経路を介して Ca_v3.2 T 型 Ca²⁺チャネルの AKAP 依存性リン酸化を誘起することでラットにおける機械的痛覚過敏を誘起することも報告しており¹⁹⁾、PAR2 の下流シグナルに COX-2/PGE₂ 系や T 型 Ca²⁺チャネルが存在する可能性が考えられる。

そこで、第 3 章では膀胱痛発現における PAR2 の役割を検討し、COX-2/PGE₂ 系と T 型 Ca²⁺チャネルの関与について検証した。

II. 実験方法

1. 実験動物

実験には 18-25 g の雌系 ddY マウス (紀和実験動物研究所、和歌山) を使用した。実験動物には固形飼料 (MF オリエンタル酵母工業、東京) を自由に摂取させ、約 24°C の室温と 12 時間の明暗サイクルが管理された部屋で飼育した。

2. T24 細胞の培養

ヒト膀胱上皮がん由来 T24 細胞を 10 % fetal calf serum (FCS) 及び 50 unit/mL penicillin (Gibco, Carlsbad, CA, USA)、50 µg/mL streptomycin (Gibco) を含んだ Eagle's minimal essential medium (E-MEM) (Wako Pure Chemical Co, Ltd, 大阪) 培地中で 37°C、5 % CO₂ 条件下で培養した。

3. SLIGRL-amide 膀胱内投与誘起膀胱炎モデルの作製

SLIGRL-amide 膀胱内投与誘起膀胱炎モデルの作製は既報⁶⁰⁾に従って行った。イソフルラン麻酔下、雌マウスの膀胱内に尿道口からカニューレを挿入し、PAR2 受容体活性化ペプチドである SLIGRL-amide またはコントロールペプチドである LRGILS-amide を 20 または 60 nmol/mouse (100 µM もしくは 300 µM) を膀胱内へ 200 µL 注入して 30 分間作用させた。その後、膀胱内液を排出し、上記の方法及び用量の SLIGRL-amide を再度 200 µL 注入し 30 分間作用させた。

4. SLIGRL-amide 膀胱内投与誘起関連痛覚過敏の測定

第 1 章と同様の方法で行った⁸⁾。SLIGRL-amide 投与 6 時間後及び 24 時間後に 0.008、0.07、0.4 及び 1.0 g の von Frey filaments を用いてマウスの尿道口から肛門付近の皮膚表面への機械的刺激に対する反応を観察した。

5. Western blot 法による COX-2 タンパクの検出

マウスに SLIGRL-amide 60 nmol/mouse を膀胱内投与し、6 時間後に頸椎脱臼し、膀胱を摘出した。摘出した膀胱は第 1・2 章と同様の方法でホモジネートし、サンプルとした。T24 細胞は、6 cm シャーレに 7.2×10^5 cells/well となるように播種し、FCS 10 % を含む EMEM 培地で 24 時間培養後、FCS free の培地に交換し、更に 24 時間培養した。実験開始 1 時間前に再び FCS free の培地に交換し SLIGRL-amide 100 μ M で刺激し、24 もしくは 48 時間後に SDS (sodium dodecyl sulfate) buffer (62.5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycerol pH 6.8) 100 μ L で細胞を回収した。タンパク定量を行った後、第 1・2 章と同様の方法で COX-2 と GAPDH の発現を確認した。一次抗体は、anti-COX-2 goat polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) 及び anti-GAPDH rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) を使用した。二次抗体は、horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-goat IgG-HRP (sc-2020) (Santa Cruz Biotechnology) 及び horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) を使用した。

6. PGE₂ 測定法

T24 細胞に SLIGRL-amide 100 μ M で 24 または 48 時間刺激後、培養上清を遠心し、上清を回収した。中の PGE₂ 量を EIA kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) を用いて測定した。

7. 使用薬物および投与スケジュール

SLIGRL-amide 及び LRGILS-amide は、扶桑薬品工業により合成提供され、0.9 % 生理食塩水に溶解した。NNC 55-0396 (Sigma-Aldrich, St Louis) は 0.9 % 生理食塩水に溶解し、20 mg/kg の用量で SLIGRL-amide 膀胱内投与 5.5 時間後に腹腔内投与した。Indomethacin (和光純薬、大阪) は、蒸留水で溶解した NaHCO₃ (sodium

hydrogen carbonate) (キシダ化学、大阪) に溶解し、5 mg/kg の用量で SLIGRL-amide 膀胱内投与 30 分前に腹腔内投与した。

8. 統計処理

第 1 章及び第 2 章と同様の方法で行った。

III. 実験結果

1. PAR2 受容体活性化ペプチドを膀胱内投与することで誘起される関連痛覚過敏の発現

マウスの膀胱内に SLIGRL-amide 20 あるいは 60 nmol/mouse を投与し、6 (Fig. 31A)及び24時間後 (Fig. 31B)に von Frey フィラメントで機械的刺激を与えた所、全てのフィラメントに対して侵害受容反応が有意に増加し、関連痛覚過敏が認められた (Fig. 31A, B)。一方、SL を逆配列にした control peptide である LRGILS-amide 60 nmol/mouse の膀胱内投与は侵害受容反応に影響しなかった (Fig. 31A, B)。

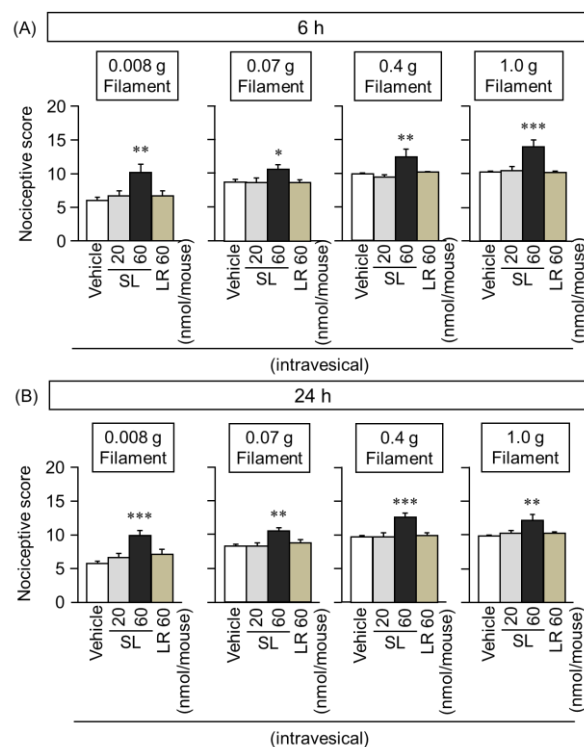


Fig. 31 Referred hyperalgesia 6 or 24 h after intravesical administration of SLIGRL-amide, a PAR2 activating peptide in mice. SLIGRL-amide (SL: 100 or 300 μ M solutions), LRGILS-amide (LR: 300 μ M solutions) or vehicle (V) was administered intravesically to mice twice in a volume of 200 μ L [20 (SL) or 60 (SL, LR) nmol/mouse for 30 min x2]. The nociception test was performed 6 h and 24 h after the administration. Data show the mean with S.E.M. for 6-14 mice. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 vs. V.

2. SLIGRL-amide 膀胱内投与誘起関連痛覚過敏に対する非ステロイド性抗炎症薬の効果

SLIGRL-amide 膀胱内投与 6 時間後に誘起される関連痛覚過敏に対する非ステロイド性抗炎症薬 indomethacin の効果を検討した。Indomethacin を 5 mg/kg の用量で SL 投与 30 分前に腹腔内投与したところ、SLIGRL-amide 誘起膀胱関連痛覚過敏は強く抑制された (Fig. 32)。

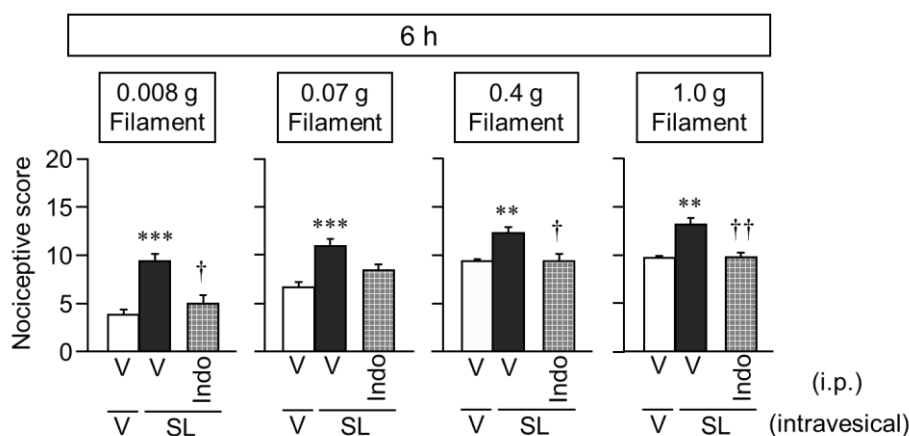


Fig. 32 Effect of indomethacin on referred hyperalgesia 6 h after intravesical administration of SLIGRL-amide, a PAR2 activating peptide, in mice. Indomethacin (Indo) at 5 mg/kg or vehicle (4% sodium hydrogen carbonate) was administered i.p. to mice 30 min before intravesical administration of SLIGRL-amide (SL) at 60 nmol/mouse (300 μ M solution for 30 min x2). The nociception test was performed 6 h after the administration. Data show the mean with S.E.M. for 5-8 mice. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. V + V. † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs. V + SL.

3. SLIGRL-amide 膀胱内投与誘起関連痛覚過敏に対する T 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬の効果

SLIGRL-amide 膀胱内投与 6 時間後に認められる関連痛覚過敏に対して T 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬である NNC 55-0396 (NNC) の効果を検討した。その結果、NNC を 20 mg/kg の用量で SL 投与 5.5 時間後に腹腔内投与することで SLIGRL-amide 誘起膀胱関連痛覚過敏が強く抑制された (Fig. 33)。

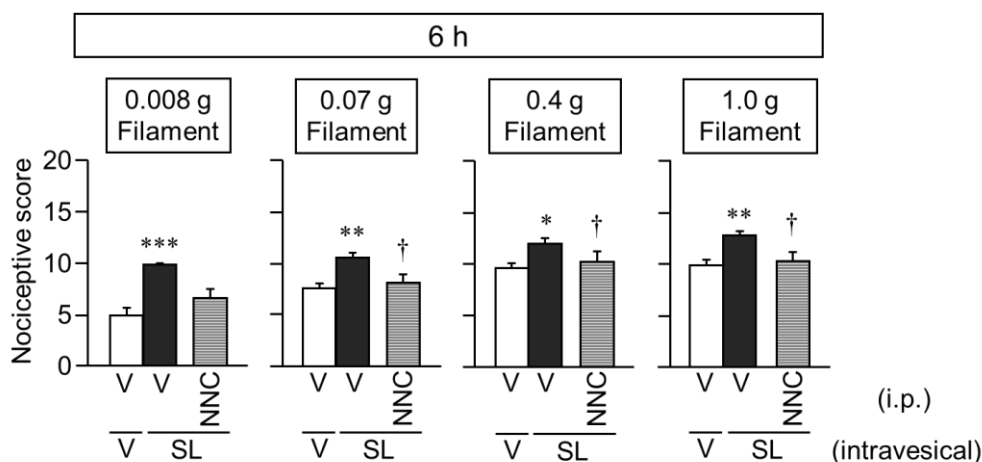


Fig. 33 Effect of NNC 55-0396, a T-type Ca^{2+} channel blocker, on referred hyperalgesia 6 h after intravesical administration of SLIGRL-amide, a PAR2 activating peptide, in mice. NNC 55-0396 (NNC) at 20 mg/kg or vehicle (V) was administered i.p. to mice 5.5 h after intravesical administration of SLIGRL-amide (SL) at 60 nmol/mouse (300 μ M solution for 30 min x2). The nociception test was performed 6 h after the administration. Data show the mean with S.E.M. for 8 mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. V + V. † $P < 0.05$ vs. V + SL.

4. SLIGRL-amide 膀胱内投与 6 時間後に摘出したマウス膀胱組織における COX-2 タンパク発現量の測定

SLIGRL-amide 投与 6 時間後に摘出したマウスの膀胱組織における COX-2 タンパク発現量を Western blot 法を用いて検討した。その結果、COX-2 発現量は vehicle 投与群と比較して SLIGRL-amide 投与群において有意に増加した (Fig. 34)。

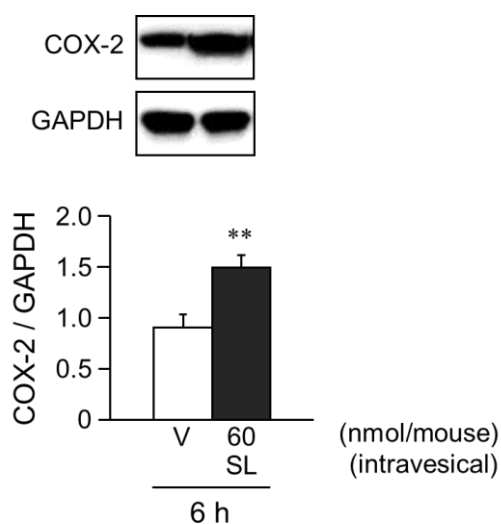


Fig. 34 Typical photographs of Western blotting and quantified data by densitometry are shown. SLIGRL-amide (SL) at 60 nmol/mouse (300 μ M solution for 30 min x2) or vehicle (V) was administered intravesically to mice twice in a volume of 200 μ L. Data show the mean with S.E.M. for 7 mice. ** $P < 0.01$ vs. V.

5. T24 細胞における SLIGRL-amide 刺激での COX-2 発現量及び PGE₂ 産生量の測定

ヒト膀胱上皮がん由来 T24 細胞を SLIGRL-amide 100 μ M で 24 もしくは 48 時間刺激し、回収した細胞サンプルで Western blot を行った所、SLIGRL-amide 刺激 24 時間では vehicle 群との間に有意な差は認められなかったが SLIGRL-amide 刺激 48 時間では著しい COX-2 タンパクの増加が検出された (Fig. 35A)。また、同スケジュールで刺激し、回収した上清で PGE₂ 量を測定した所、SLIGRL-amide 刺激 24 時間で有意な変化は無かったが、SLIGRL-amide 刺激 48 時間では PGE₂ 量の著明な増加が認められた (Fig. 35B)。

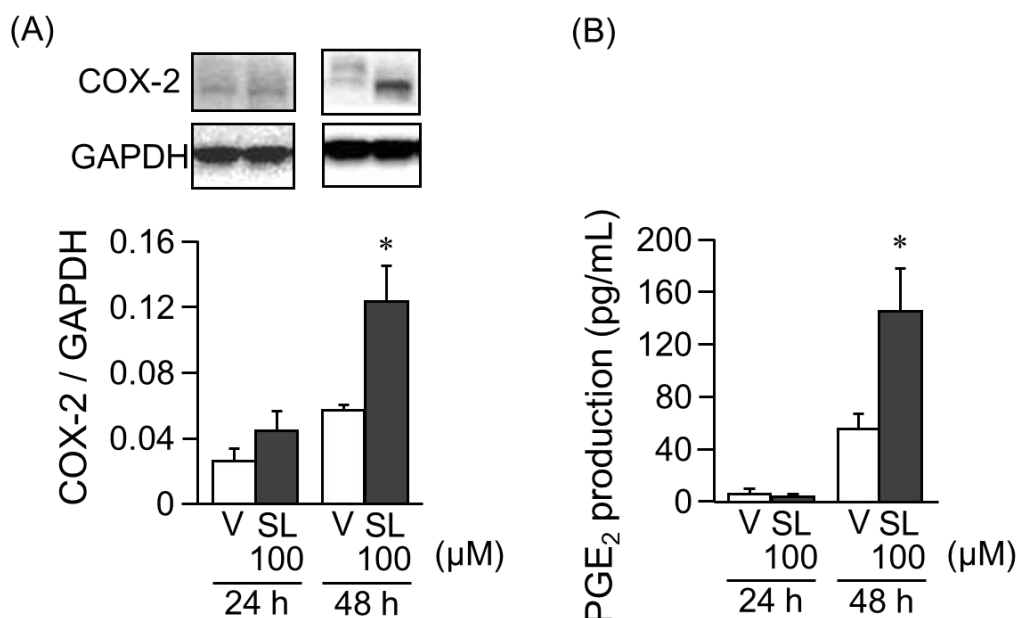


Fig. 35 Typical photographs of Western blotting and quantified data by densitometry are shown. T24 cells were treated with SLIGRL-amide at 100 μ M or vehicle (V) for 24 or 48 h. Data show the mean with S.E.M. from 4-6 experiments. *P<0.05 vs. V for 48 h.

IV. 考察

本章における研究結果より、マウス膀胱内において、PAR2 を刺激することにより COX-2 が誘導され、それによって産生される PGE₂ が T 型 Ca²⁺チャネル依存的に膀胱痛を誘起する可能性が示唆された。

本章において、PAR2 の受容体活性化ペプチドである SLIGRL-amide の膀胱内投与によって関連痛覚過敏が誘起され (Fig. 31)、これが COX を阻害する非ステロイド性抗炎症薬 indomethacin (Fig. 32)の前投与により阻止され、選択的 T 型 Ca²⁺チャネル阻害薬である NNC の後投与により有意に抑制された (Fig. 33)。これらの知見より、膀胱内 PAR2 活性化により COX 依存的にプロスタグランジンが産生され、それによって T 型 Ca²⁺チャネルを介して膀胱痛が誘起される可能性が示唆された。

また、マウス膀胱内の PAR2 を SLIGRL-amide で 6 時間刺激すると、膀胱組織中の COX-2 タンパク発現量に有意な増加が認められ (Fig. 34)、本モデルにおける関連痛覚過敏に COX-2/PGE₂ 経路が関与していることが示唆された。一方、ヒト膀胱上皮がん由来 T24 細胞において、PAR2 活性化ペプチドは 48 時間刺激後に、COX-2 発現誘導と PGE₂ 産生増加を誘起し、マウスにおける *in vivo* での結果を支持する知見が得られた (Fig. 35)。しかし、T24 細胞を用いる *in vitro* 実験では、PAR2 刺激後 24 時間では変化が認められず、マウスにおける *in vivo* での知見との乖離が見られた。この時間的なラグが種差によるのか、あるいは膀胱上皮細胞以外の関与によるのかは、現時点では不明である。

本研究結果は、肥満細胞から放出されるトリプターゼ等によって膀胱上皮細胞に発現する PAR2 が活性化されることで COX-2 の発現誘導が起こり、産生された PGE₂ によって知覚神経に発現する EP 受容体が活性化されることで T 型 Ca²⁺チャネルの機能亢進が起こり、膀胱痛が誘起される可能性を示すもので、間

質性膀胱炎/膀胱痛症候群の治療標的分子として PAR2、COX-2/PGE₂ 系及び T 型 Ca²⁺チャンネルが有望である可能性を示唆している (Fig. 36)。

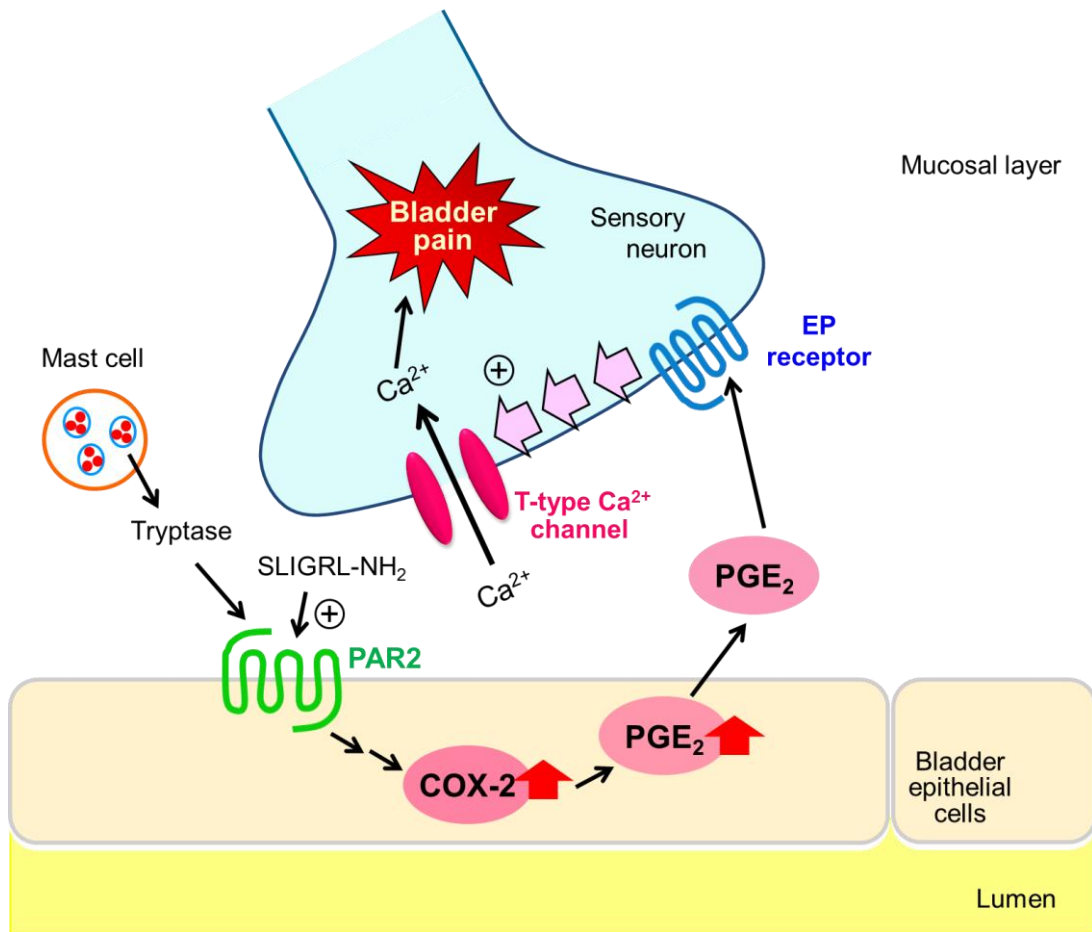


Fig. 36 A working hypothesis for the mechanisms of PAR2-induced bladder pain in this study.
 PAR2: proteinase-activated receptor-2, COX-2: cyclooxygenase-2, PGE₂: prostaglandin E₂

V. 小括

1. SLIGRL-amide を膀胱内投与することで膀胱関連痛覚過敏が誘発された。
2. SLIGRL-amide 誘起膀胱関連痛覚過敏は非ステロイド性抗炎症薬により抑制された。
3. SLIGRL-amide 誘起膀胱関連痛覚過敏は T 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬により抑制された。
4. SLIGRL-amide を膀胱内投与して 6 時間後に摘出した膀胱サンプル中の COX-2 発現量が増加した。
5. T24 細胞において SLIGRL-amide 24 時間刺激では COX-2 タンパク発現量と PGE_2 産生量に有意な変化が認められなかったが、SLIGRL-amide 48 時間刺激では COX-2 タンパク発現量と PGE_2 産生量の著しい増加が認められた。

以上より、膀胱上皮粘膜に発現する PAR2 の刺激により COX-2 の発現誘導が起こり、これによって増加した PGE_2 が恐らく T 型 Ca^{2+} チャネルを介して膀胱痛を誘起する可能性が示唆された。

総括

本研究では、膀胱炎に伴う膀胱痛、特に難治性疾患である間質性膀胱炎/膀胱痛症候群の病態に関与する分子メカニズムを解析し、新たな治療標的分子を見出すことを目的として検討を行った。

第1章では、CPA 誘起膀胱炎・膀胱痛マウスを用いて、H₂S 産生酵素の1つであるCSEの発現誘導メカニズムの解析を行った。まず、CSEの競合的拮抗薬であるBCAの前投与は、CPA 400 mg/kg 腹腔内投与により誘起される膀胱痛様行動、関連痛覚過敏を阻止し、膀胱湿重量の増加も部分的ではあるが有意に抑制した。CPA 処置マウスの膀胱組織ではCSEのタンパク発現量および酵素活性がいずれも有意に増加していた。次に、CSE/H₂S/Ca_v3.2 T型Ca²⁺チャネル系の上流シグナルを検討するため、間質性膀胱炎/膀胱痛症候群との関与が指摘されているSP/NK₁受容体の関与を検討したところ、NK₁受容体阻害薬であるCPの前投与は、CPA 誘起膀胱痛、膀胱湿重量および膀胱組織中のCSEタンパク発現増加を抑制した。さらに、NF-κB 選択的阻害薬であるPDTCとNF-κB系を抑制することが知られているクルクミンの前投与は、CPA 誘起膀胱痛様行動、関連痛覚過敏および膀胱湿重量増加を著明に抑制し、NF-κB 活性化の指標であるp65のリン酸化とCSEの発現増加を阻止した。これらの知見より、CPAの毒性肝代謝物であるアクロレインにより膀胱上皮が障害されることで知覚神経からSPが放出され、これによってNK₁受容体を介してNF-κB系が活性化されることでCSEの発現誘導が生じ、膀胱炎・膀胱痛が誘起されることが示唆された。

第2章では、Ca_v3.2 T型Ca²⁺チャネルの機能が細胞外の亜鉛によって抑制的に制御されていることに着目し、生体内の亜鉛を欠乏させた場合の影響を検討した。始めに、T型Ca²⁺チャネル阻害薬であるNNCもしくはRQを後投与したと

ころ、CPA 誘起膀胱痛様行動及び関連痛覚過敏はいずれも有意に抑制された。次に、亜鉛 48.9 mg/kg を含む飼料でマウスを 2 週間飼育する Zn(+)群と、亜鉛 0.6 mg/kg を含む飼料で同じ期間飼育する Zn(-)群に分類し、ICP-MS を用いて生体内亜鉛量を測定したところ、膀胱組織中亜鉛量は Zn(+)群と Zn(-)群でほぼ同じであったが、血漿中亜鉛量は Zn(+)群と比較して Zn(-)群で著しく低下していた。次に、Zn(+)群と Zn(-)群に、CPA を 200 または 400 mg/kg の用量で腹腔内投与したところ、CPA 400 mg/kg を投与したマウスでは Zn(+)群と Zn(-)群で症状に差は見られなかったが、CPA 200 mg/kg を投与したマウスでは Zn(-)群においてのみ明らかな膀胱痛様行動と関連痛覚過敏が認められた。また、Zn(+)群に 400 mg/kg の CPA を、Zn(-)群に 200 mg/kg の CPA を投与することで誘起される膀胱痛はいずれも T 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬あるいは zinc chloride により強く抑制された。さらに、Zn(-)群で CPA 200 mg/kg を投与することによる膀胱痛がアンチセンス法による $Ca_v3.2$ のノックダウンで完全に抑制されることを確認した。次に、亜鉛キレーターである TPEN を CPA 投与 30 分前に投与することで急性的に亜鉛欠乏状態にしたマウスを用いて検討した。その結果、TPEN と CPA 200 mg/kg の併用投与により明らかな膀胱痛様行動と関連痛覚過敏が誘発され、その膀胱痛は T 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬 NNC の投与や $Ca_v3.2$ をノックダウンすることで著明に阻止された。一方、亜鉛による影響を受けることが知られている NMDA 受容体や TRPA1 チャネルの阻害薬は、TPEN と CPA 200 mg/kg の併用投与により誘起される膀胱痛様行動・関連痛覚過敏に影響しなかったことより、亜鉛欠乏による膀胱痛の増強には、 $Ca_v3.2$ T 型 Ca^{2+} チャネルが中心的な役割を果たしていることが示唆された。続いて、DRG における $Ca_v3.2$ の挙動について解析した。 $Ca_v3.2$ T 型 Ca^{2+} チャネルのタンパク発現は転写促進因子である Egr-1、転写抑制因子である REST により調節されている他、脱ユビキチン化酵素である USP5 によるプロテアソーム分解の抑制により制御されている。そこで、CPA 処置マウスの DRG における $Ca_v3.2$ 、Egr-1、REST 及び USP5 の発現量を測定し、それに及ぼす TPEN

の影響を調べた。その結果、Ca_v3.2、Egr-1、USP5 のタンパク発現量は、CPA 200 mg/kg あるいは TPEN それぞれの単独投与では変化しなかったが、CPA 400 mg/kg の投与により著しく増加した。一方、TPEN と CPA 200 mg/kg を併用投与したところ、Ca_v3.2、Egr-1、USP5 のタンパク発現量が有意に増加した。さらに、CSE により産生される H₂S の関与を調べるため、CSE の競合的拮抗薬である BCA を用いて検討したところ、BCA の前投与は、TPEN と CPA 200 mg/kg の併用により誘起される膀胱痛様行動・関連痛覚過敏、DRG における Ca_v3.2、Egr-1、USP5 のタンパク発現量増加をいずれも阻止した。これらの知見より、1) CPA 400 mg/kg を投与したマウスでは CSE の発現誘導に伴って増加した H₂S による Ca_v3.2 の機能増強と、それに続く activity-dependent な Egr-1、USP5 と Ca_v3.2 の発現増加が膀胱痛に関与することが明らかとなり、さらに、2) 亜鉛欠乏状態では Ca_v3.2 の活性が既に上昇しており、低用量の CPA 投与による内因性 H₂S 依存的に Ca_v3.2 の活性がさらに促進し、neuronal activity-dependent な Egr-1、USP5 と Ca_v3.2 が発現増加することで膀胱痛が誘発されることが示唆された。

第3章では、膀胱痛発現における PAR2 の関与とその下流シグナルについて検証した。PAR2 活性化ペプチドである SLIGRL-amide をマウスに膀胱内投与したところ、6 時間及び 24 時間後に関連痛覚過敏が誘起された。この SLIGRL-amide 誘起関連痛覚過敏は、COX を阻害する NSAIDs の 1 つである indomethacin の前投与により阻止され、T 型 Ca²⁺チャネル阻害薬 NNC の後投与により有意に抑制された。SLIGRL-amide 膀胱内投与 6 時間後にマウスから摘出した膀胱組織では、COX-2 タンパク発現量が有意に増加していた。続いて、ヒト膀胱上皮がん細胞由来 T24 細胞を SLIGRL-amide で刺激したところ、24 時間刺激後では変化は見られなかったが、48 時間の刺激により COX-2 発現量と PGE₂ 産生量の増加がみられた。これらの知見から、膀胱内 PAR2 刺激により COX-2 の発現誘導が起こり、これによって産生される PGE₂ が T 型 Ca²⁺チャネル依存的に膀胱痛を誘起する可能性が示唆された。

以上、第1～第3章で得られた知見より、SP/NK₁系、NF-κB/CSE/H₂S/Ca_v3.2系およびPAR2/COX-2/PGE₂系が膀胱痛の発症に重要な役割を果たすこと、さらにCa_v3.2のチャネル機能を抑制する亜鉛は、膀胱痛の発症を抑制する因子として機能していることが示唆された (Fig. 37)。本研究により、間質性膀胱炎/膀胱痛症候群の治療において、NF-κBを阻害するクルクミン、Ca_v3.2を阻害する亜鉛などを含めて、今回新たに見出された治療標的分子に作用する薬物が有効である可能性が示唆され、本知見が将来の治療薬開発に向けたマイルストーンとなることを期待したい。

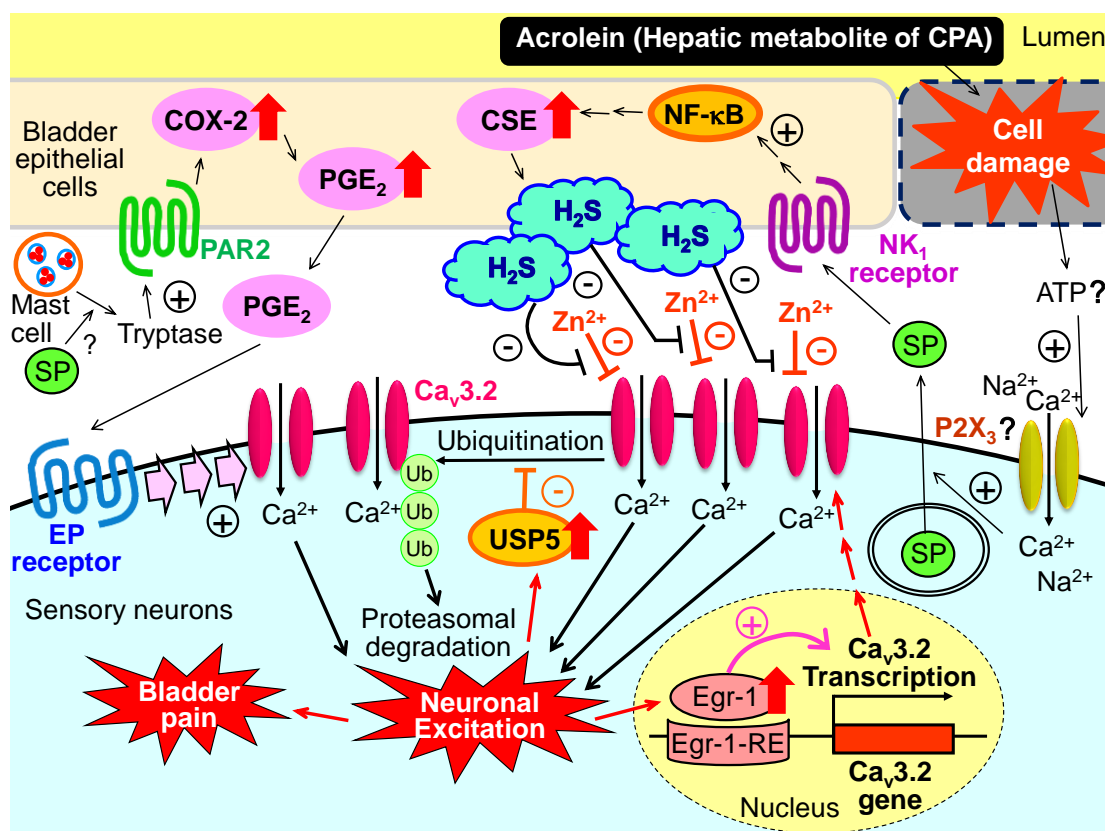


Fig. 37 A summary scheme for the mechanisms of bladder pain in this study.
 ATP: adenosine triphosphate, CSE: cystathionine-γ-lyase, COX-2: cyclooxygenase-2, CPA: cyclophosphamide, Egr-1: early growth response 1, H₂S: hydrogen sulfide, PAR2: proteinase-activated receptor-2, PGE₂: prostaglandin E₂, SP: substance P, TPEN: N,N,N',N'-Tetrakis (2-pyridylmethyl)-ethylenediamine, Ub: ubiquitin, USP5: ubiquitin-specific protease 5

引用文献

- 1) Takahashi T, Aoki Y, Okubo K, Maeda Y, Sekiguchi F, Mitani K, Nishikawa H, Kawabata A. Upregulation of Ca_v3.2 T-type calcium channels targeted by endogenous hydrogen sulfide contributes to maintenance of neuropathic pain. *Pain*, **150**, 183-191 (2010).
- 2) Maeda Y, Aoki Y, Sekiguchi F, Matsunami M, Takahashi T, Nishikawa H, Kawabata A. Hyperalgesia induced by spinal and peripheral hydrogen sulfide: evidence for involvement of Ca_v3.2 T-type calcium channels. *Pain*, **142**, 127-132 (2009).
- 3) Okubo K, Matsumura M, Kawaishi Y, Aoki Y, Matsunami M, Okawa Y, Sekiguchi F, Kawabata A. Hydrogen sulfide-induced mechanical hyperalgesia and allodynia require activation of both Ca_v3.2 and TRPA1 channels in mice. *Br J Pharmacol*, **166**, 1738-1743 (2012).
- 4) Nishimura S, Fukushima O, Ishikura H, Takahashi T, Matsunami M, Tsujiuchi T, Sekiguchi F, Naruse M, Kamanaka Y, Kawabata A. Hydrogen sulfide as a novel mediator for pancreatic pain in rodents. *Gut*, **58**, 762-770 (2009).
- 5) Terada Y, Fujimura M, Nishimura S, Tsubota M, Sekiguchi F, Kawabata A. Roles of Ca_v3.2 and TRPA1 channels targeted by hydrogen sulfide in pancreatic nociceptive processing in mice with or without acute pancreatitis. *J Neurosci Res*, **93**, 361-369 (2015).
- 6) Matsunami M, Tarui T, Mitani K, Nagasawa K, Fukushima O, Okubo K, Yoshida S, Takemura M, Kawabata A. Luminal hydrogen sulfide plays a pronociceptive role in mouse colon. *Gut*, **58**, 751-761 (2009).
- 7) Tsubota-Matsunami M, Noguchi Y, Okawa Y, Sekiguchi F, Kawabata A. Colonic hydrogen sulfide-induced visceral pain and referred

- hyperalgesia involve activation of both Ca_v3.2 and TRPA1 channels in mice. *J Pharmacol Sci*, **119**, 293-296 (2012).
- 8) Matsunami M, Miki T, Nishiura K, Hayashi Y, Okawa Y, Nishikawa H, Sekiguchi F, Kubo L, Ozaki T, Tsujiuchi T, Kawabata A. Involvement of the endogenous hydrogen sulfide/Ca_v 3.2 T-type Ca²⁺ channel pathway in cystitis-related bladder pain in mice. *Br J Pharmacol*, **167**, 917-928 (2012).
 - 9) Nelson MT, Woo J, Kang HW, Vitko I, Barrett PQ, Perez-Reyes E, Lee JH, Shin HS, Todorovic SM. Reducing agents sensitize C-type nociceptors by relieving high-affinity zinc inhibition of T-type calcium channels. *J Neurosci*, **27**, 8250-8260 (2007).
 - 10) Sekiguchi F, Kawabata A. T-type calcium channels: functional regulation and implication in pain signaling. *J Pharmacol Sci*, **122**, 244-250 (2013).
 - 11) Murakami-Nakayama M, Tsubota M, Hiruma S, Sekiguchi F, Matsuyama K, Kimura T, Moriyama M, Kawabata A. Polaprezinc attenuates cyclophosphamide-induced cystitis and related bladder pain in mice. *J Pharmacol Sci*, **127**, 223-228 (2015).
 - 12) Matsunami M, Kirishi S, Okui T, Kawabata A. Chelating luminal zinc mimics hydrogen sulfide-evoked colonic pain in mice: possible involvement of T-type calcium channels. *Neuroscience*, **181**, 257-264 (2011).
 - 13) Yoshida H, Tsuji K, Sakata T, Nakagawa A, Morita S. Clinical study of tongue pain: Serum zinc, vitamin B12, folic acid, and copper concentrations, and systemic disease. *Br J Oral Maxillofac Surg*, **48**, 469-472 (2010).

- 14) Nozaki C, Vergnano AM, Filliol D, Ouagazzal AM, Le Goff A, Carvalho S, Reiss D, Gaveriaux-Ruff C, Neyton J, Paoletti P, Kieffer BL. Zinc alleviates pain through high-affinity binding to the NMDA receptor NR2A subunit. *Nat Neurosci*, **14**, 1017-1022 (2011).
- 15) Peeker R, Enerback L, Fall M, Aldenborg F. Recruitment, distribution and phenotypes of mast cells in interstitial cystitis. *J Urol*, **163**, 1009-1015 (2000).
- 16) Tomaszewski JE, Landis JR, Russack V, Williams TM, Wang LP, Hardy C, Brensinger C, Matthews YL, Abele ST, Kusek JW, Nyberg LM, Interstitial Cystitis Database Study G. Biopsy features are associated with primary symptoms in interstitial cystitis: results from the interstitial cystitis database study. *Urology*, **57**, 67-81 (2001).
- 17) Hollenberg MD, Compton SJ. International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*, **54**, 203-217 (2002).
- 18) Miki T, Matsunami M, Nakamura S, Okada H, Matsuya H, Kawabata A. ONO-8130, a selective prostanoid EP1 receptor antagonist, relieves bladder pain in mice with cyclophosphamide-induced cystitis. *Pain*, **152**, 1373-1381 (2011).
- 19) Sekiguchi F, Aoki Y, Nakagawa M, Kanaoka D, Nishimoto Y, Tsubota-Matsunami M, Yamanaka R, Yoshida S, Kawabata A. AKAP-dependent sensitization of Ca_v3.2 channels via the EP4 receptor/cAMP pathway mediates PGE₂-induced mechanical hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, **168**, 734-745 (2013).
- 20) Fukami K, Kawabata A. Hydrogen sulfide and neuronal differentiation: focus on Ca²⁺ channels. *Nitric Oxide*, **46**, 50-54 (2015).

- 21) Kimura H. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. *Nitric Oxide*, **41**, 4-10 (2014).
- 22) Terada Y, Kawabata A. H₂S and Pain: A Novel Aspect for Processing of Somatic, Visceral and Neuropathic Pain Signals. *Handb Exp Pharmacol*, **230**, 217-230 (2015).
- 23) Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev*, **92**, 791-896 (2012).
- 24) Kawabata A, Ishiki T, Nagasawa K, Yoshida S, Maeda Y, Takahashi T, Sekiguchi F, Wada T, Ichida S, Nishikawa H. Hydrogen sulfide as a novel nociceptive messenger. *Pain*, **132**, 74-81 (2007).
- 25) Fukami K, Fukami K, Sekiguchi F, Sekiguchi F, Kawabata A, Kawabata A. Hydrogen Sulfide and T-Type Ca²⁺ Channels in Pain Processing, Neuronal Differentiation and Neuroendocrine Secretion. *Pharmacology*, **99**, 196-203 (2017).
- 26) Andersson DA, Gentry C, Bevan S. TRPA1 has a key role in the somatic pro-nociceptive actions of hydrogen sulfide. *PLoS One*, **7**, e46917 (2012).
- 27) Miyamoto R, Otsuguro K, Ito S. Time- and concentration-dependent activation of TRPA1 by hydrogen sulfide in rat DRG neurons. *Neurosci Lett*, **499**, 137-142 (2011).
- 28) Marchand JE, Sant GR, Kream RM. Increased expression of substance P receptor-encoding mRNA in bladder biopsies from patients with interstitial cystitis. *Br J Urol*, **81**, 224-228 (1998).
- 29) Badiei A, Giese S, Davies S, Izani Othman M, Bhatia M. LPS Up-Regulates Cystathionine gamma -Lyase Gene Expression in Primary Human Macrophages via NF-kappaB/ERK Pathway.

- Inflamm Allergy Drug Targets*, **14**, 99-104 (2015).
- 30) Laird JM, Souslova V, Wood JN, Cervero F. Deficits in visceral pain and referred hyperalgesia in $Na_v1.8$ (SNS/PN3)-null mice. *J Neurosci*, **22**, 8352-8356 (2002).
 - 31) Olivar T, Laird JM. Cyclophosphamide cystitis in mice: behavioural characterisation and correlation with bladder inflammation. *Eur J Pain*, **3**, 141-149 (1999).
 - 32) Tsubota M, Miyamoto T, Hiruma S, Saeki H, Miyazaki T, Sekiguchi F, Funakami Y, Kawabata A. Repeated Cold Stress Reduces Cyclophosphamide-Induced Cystitis/Bladder Pain and Macrophage Activity in Mice. *Pharmacology*, **99**, 286-290 (2017).
 - 33) Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, Anuar FB, Whiteman M, Salto-Tellez M, Moore PK. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J*, **19**, 1196-1198 (2005).
 - 34) Taniguchi E, Matsunami M, Kimura T, Yonezawa D, Ishiki T, Sekiguchi F, Nishikawa H, Maeda Y, Ishikura H, Kawabata A. Rhodanese, but not cystathionine-gamma-lyase, is associated with dextran sulfate sodium-evoked colitis in mice: a sign of impaired colonic sulfide detoxification? *Toxicology*, **264**, 96-103 (2009).
 - 35) Abdollahi E, Momtazi AA, Johnston TP, Sahebkar A. Therapeutic effects of curcumin in inflammatory and immune-mediated diseases: A nature-made jack-of-all-trades? *J Cell Physiol*, **233**, 830-848 (2018).
 - 36) Sekiguchi F, Miyamoto Y, Kanaoka D, Ide H, Yoshida S, Ohkubo T, Kawabata A. Endogenous and exogenous hydrogen sulfide facilitates T-type calcium channel currents in $Ca_v3.2$ -expressing HEK293 cells.

- Biochem Biophys Res Commun*, **445**, 225-229 (2014).
- 37) Kiuchi H, Takao T, Yamamoto K, Nakayama J, Miyagawa Y, Tsujimura A, Nonomura N, Okuyama A. Sesquiterpene lactone parthenolide ameliorates bladder inflammation and bladder overactivity in cyclophosphamide induced rat cystitis model by inhibiting nuclear factor-kappaB phosphorylation. *J Urol*, **181**, 2339-2348 (2009).
- 38) Vykhovanets EV, MacLennan GT, Vykhovanets OV, Cherullo EE, Ponsky LE, Gupta S. Molecular imaging of nuclear factor-kappaB in bladder as a primary regulator of inflammatory response. *J Urol*, **187**, 330-337 (2012).
- 39) Wang M, Guo Z, Wang S. The binding site for the transcription factor, NF-kappaB, on the cystathionine gamma-lyase promoter is critical for LPS-induced cystathionine gamma-lyase expression. *Int J Mol Med*, **34**, 639-645 (2014).
- 40) Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Padmavathi G, Monisha J, Roy NK, Prasad S, Aggarwal BB. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *Br J Pharmacol*, **174**, 1325-1348 (2017).
- 41) Geppetti P, Nassini R, Materazzi S, Benemei S. The concept of neurogenic inflammation. *BJU Int*, **101 Suppl 3**, 2-6 (2008).
- 42) Nazif O, Teichman JM, Gebhart GF. Neural upregulation in interstitial cystitis. *Urology*, **69**, 24-33 (2007).
- 43) Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev*, **67**, 821-870

- (2015).
- 44) Fukada T, Yamasaki S, Nishida K, Murakami M, Hirano T. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. *J Biol Inorg Chem*, **16**, 1123-1134 (2011).
 - 45) Murakami M, Hirano T. Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling. *Cancer Sci*, **99**, 1515-1522 (2008).
 - 46) Rink L, Haase H. Zinc homeostasis and immunity. *Trends Immunol*, **28**, 1-4 (2007).
 - 47) Fukami K, Sekiguchi F, Yasukawa M, Asano E, Kasamatsu R, Ueda M, Yoshida S, Kawabata A. Functional upregulation of the H₂S/Ca_v3.2 channel pathway accelerates secretory function in neuroendocrine-differentiated human prostate cancer cells. *Biochem Pharmacol*, **97**, 300-309 (2015).
 - 48) van Loo KM, Schaub C, Pernhorst K, Yaari Y, Beck H, Schoch S, Becker AJ. Transcriptional regulation of T-type calcium channel Cav3.2: bi-directionality by early growth response 1 (Egr1) and repressor element 1 (RE-1) protein-silencing transcription factor (REST). *J Biol Chem*, **287**, 15489-15501 (2012).
 - 49) Garcia-Caballero A, Gadotti VM, Stemkowski P, Weiss N, Souza IA, Hodgkinson V, Bladen C, Chen L, Hamid J, Pizzoccaro A, Deage M, Francois A, Bourinet E, Zamponi GW. The deubiquitinating enzyme USP5 modulates neuropathic and inflammatory pain by enhancing Ca_v3.2 channel activity. *Neuron*, **83**, 1144-1158 (2014).
 - 50) Stemkowski P, Garcia-Caballero A, Gadotti VM, M'Dahoma S, Huang S, Black SAG, Chen L, Souza IA, Zhang Z, Zamponi GW. TRPV1 Nociceptor Activity Initiates USP5/T-type Channel-Mediated

- Plasticity. *Cell Rep*, **17**, 2901-2912 (2016).
- 51) Takeda A, Iwaki H, Ide K, Tamano H, Oku N. Therapeutic effect of Yokukansan on social isolation-induced aggressive behavior of zinc-deficient and pair-fed mice. *Brain Res Bull*, **87**, 551-555 (2012).
- 52) Zhang C, Lu X, Tan Y, Li B, Miao X, Jin L, Shi X, Zhang X, Miao L, Li X, Cai L. Diabetes-induced hepatic pathogenic damage, inflammation, oxidative stress, and insulin resistance was exacerbated in zinc deficient mouse model. *PLoS One*, **7**, e49257 (2012).
- 53) Zhao Y, Tan Y, Dai J, Li B, Guo L, Cui J, Wang G, Shi X, Zhang X, Mellen N, Li W, Cai L. Exacerbation of diabetes-induced testicular apoptosis by zinc deficiency is most likely associated with oxidative stress, p38 MAPK activation, and p53 activation in mice. *Toxicol Lett*, **200**, 100-106 (2011).
- 54) Erreger K, Traynelis SF. Zinc inhibition of rat NR1/NR2A N-methyl-D-aspartate receptors. *J Physiol*, **586**, 763-778 (2008).
- 55) Hu H, Bandell M, Petrus MJ, Zhu MX, Patapoutian A. Zinc activates damage-sensing TRPA1 ion channels. *Nat Chem Biol*, **5**, 183-190 (2009).
- 56) Boucher W, el-Mansoury M, Pang X, Sant GR, Theoharides TC. Elevated mast cell tryptase in the urine of patients with interstitial cystitis. *Br J Urol*, **76**, 94-100 (1995).
- 57) Bao Y, Hou W, Hua B. Protease-activated receptor 2 signalling pathways: a role in pain processing. *Expert Opin Ther Targets*, **18**, 15-27 (2014).
- 58) Kawabata A, Matsunami M, Sekiguchi F. Gastrointestinal roles for proteinase-activated receptors in health and disease. *Br J Pharmacol*,

153 Suppl 1, S230-240 (2008).

- 59) Wang ZY, Wang P, Bjorling DE. Role of mast cells and protease-activated receptor-2 in cyclooxygenase-2 expression in urothelial cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **297**, R1127-1135 (2009).
- 60) D'Andrea MR, Saban MR, Nguyen NB, Andrade-Gordon P, Saban R. Expression of protease-activated receptor-1, -2, -3, and -4 in control and experimentally inflamed mouse bladder. *Am J Pathol*, **162**, 907-923 (2003).

略語一覽

AKAP	A-kinase anchoring protein
AS	antisense
ATP	adenosine triphosphate
BCA	β -cyano-L-alanine
cAMP	cyclic AMP
COX-2	cyclooxygenase-2
CP	CP-96,345
CPA	cyclophosphamide
CSE	cystathionine- γ -lyase
DMSO	dimethyl sulfoxide
DRG	dorsal root ganglion
Egr-1	early growth response 1
E-MEM	Eagle's minimal essential medium
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GPCR	G protein-coupled receptor
H ₂ S	hydrogen sulfide
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry
LPS	lipopolysaccharide
LRGILS-amide	Leu - Arg - Gly - Ile - Leu - Ser - amide
MDL	MDL105,519
mRNA	messenger RNA
Na ₂ S	sodium sulfide
NaHS	sodium hydrosulfide
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NK ₁	neurokinin 1
NNC	NNC 55-0396
ODN	oligodeoxy nucleotide
PAR2	proteinase-activated receptor-2
PBS	phosphate buffered saline
PDTC	pyrrolidine dithiocarbamate
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PKA	protein kinase A
PPG	DL-propargylglycine
QOL	quality of life
REST	repressor element-1 silencing transcription factor
RQ	RQ-00311651

SB	SB366791
SC	scramble
SDS	sodium dodecyl sulfate
SLIGRL-amide	Ser - Leu - Ile - Gly - Arg - Leu - amide
SP	substance P
TRPA1	transient receptor potential ankyrin-1
TRPV1	transient receptor potential vanilloid-1
TPEN	N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine
Ub	ubiquitin
USP5	ubiquitin-specific protease 5
ZnCl ₂	zinc chloride

主論文

本論文の内容は以下の学術雑誌に公表した。

1. SEKIGUCHI, F., KAWARA, Y., TSUBOTA, M., KAWAKAMI, E.,
OZAKI, T., KAWAISHI, Y., TOMITA, S., KANAOKA, D., YOSHIDA, S.,
OHKUBO, T., KAWABATA, A.

Therapeutic potential of RQ-00311651, a novel T-type Ca²⁺ channel blocker, in distinct rodent models for neuropathic and visceral pain.

Pain, **157(8)**, 1655-1665 (2016).

2. OZAKI, T., TSUBOTA, M., SEKIGUCHI, F., KAWABATA, A.

Involvement of NF-κB in the upregulation of cystathionine-γ-lyase, a hydrogen sulfide-forming enzyme, and bladder pain accompanying cystitis in mice.

Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, **45(4)**, 355-361 (2018).

3. OZAKI, T., MATSUOKA, J., TSUBOTA, M., TOMITA, S., SEKIGUCHI, F.,
MINAMI, T., KAWABATA, A.

Zinc deficiency promotes cystitis-related bladder pain by enhancing function and expression of Ca_v3.2 in mice.

Toxicology, **393**, 102-112 (2018).

4. TSUBOTA, M., OZAKI, T. (co-first author), HAYASHI, Y., OKAWA, Y., FUJIMURA, A., SEKIGUCHI, F., NISHIKAWA, H., KAWABATA, A.

Prostanoid-dependent bladder pain caused by proteinase-activated receptor-2 activation in mice: Involvement of TRPV1 and T-type Ca²⁺ channels.

Journal of Pharmacological Sciences, **136**, 46-49 (2018).

5. TSUBOTA, M., OKAWA, Y., IRIE, Y., MAEDA, M., OZAKI, T., SEKIGUCHI, F., ISHIKURA, H., KAWABATA, A.

Involvement of the cystathionine-γ-lyase/Ca_v3.2 pathway in substance P-induced bladder pain in the mouse, a model for nonulcerative bladder pain syndrome.

Neuropharmacology, **133**, 254-263 (2018).

謝辞

終わりに臨み、本研究の実施において終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました近畿大学薬学部 川畑篤史教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究を進めるにあたり有益な御助言を賜りました近畿大学薬学部 関口富美子准教授、坪田真帆助教ならびに近畿大学工学部 南武志教授に深く感謝致します。さらに、本研究に御協力頂きました近畿大学薬学部病態薬理学研究室の諸氏に厚く御礼申し上げます。