

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

所属機関

山梨大学医学部 泌尿器科

職名・氏名

助教 井原 達矢

1 研究テーマ

脂肪酸の脂質受容体を介した排尿への影響、夜間頻尿との関連性の検討

2 研究の目的

血中脂肪酸が、膀胱などに発現する特異的受容体を介して排尿へ与える影響を検討し、夜間頻尿治療薬の創薬への足掛かりとする。

3 研究の方法

実験1: 先行研究にて同定された、夜間頻尿患者で増加する脂肪酸 (PEA、9HODE、4H-DoHE) をマウスに投与し排尿への影響を検討した。

実験2: マウス血中の脂肪酸 (PEA、9HODE、4H-DoHE) 濃度を LC/MS で経時的に測定した。

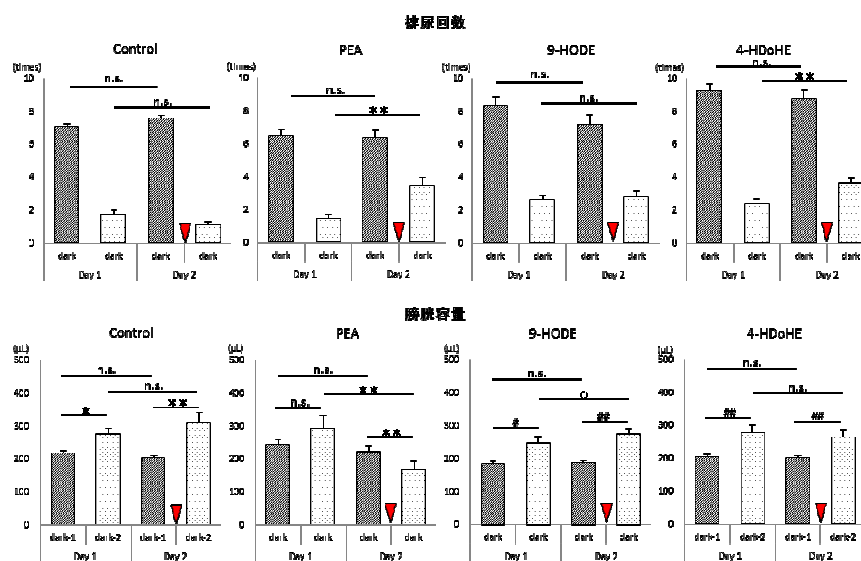
●以下、特異的受容体が同定されている脂肪酸“PEA”に関して詳細な機能を検討した。

実験3: PEAの特異的受容体である“GPR55”の臓器の局在を RT-PCR、Western blot、免疫染色等で評価した。

実験4: PEAを投与し膀胱のGPR55を刺激した際の変化を調べ、GPR55の機能、夜間頻尿との関連を検討した。Organ bathを用いた膀胱張力変化測定、Ca イメージング、ELISA、ATP 発光測定等を行った。

4 研究の成果

実験1 結果: 各脂肪酸 (PEA、9HODE、4H-DoHE) 10mg/kg を、睡眠期の始まりである朝6時に腹腔内投与した結果、PEA、4H-DoHE投与後の排尿回数増加や膀胱容量低下といったヒト夜間頻尿に類似した排尿パターン変化が誘発された。この変化は明暗変化のない恒暗環境下で増強された。(右図)



実験2 結果: WT マウスと夜間頻尿モデルマウス (Clock mutant マウス) の血漿を朝10時 (ZT4) から8時間毎で経時的に採取し、各脂肪酸 (PEA、9HODE、4H-DoHE) 濃度の変化を LS/MS で測定した。

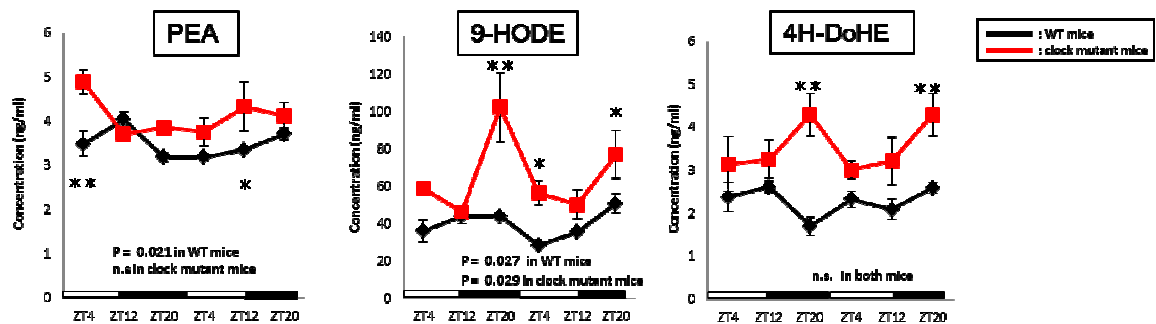
* Clock mutant マウス: 時計遺伝子の一つである *Clock* に mutation を有しており、これにより排尿の概日リズムが消失し夜間頻尿の Phenotype を呈するマウスである。

PEAの血中濃度は、WTでは睡眠期である明期に低く、活動期の暗期では逆となる概日リズムを呈していた。9-HODEの血中濃度はWT、Clock mutantともに睡眠期に低く活動期に高くなる概日リズムを呈していた。4H-DoHEではこのような経時的変化は呈さなかった。睡眠期におけるこれら3つの脂肪酸濃度はWTに比較しClock mutant

留意事項

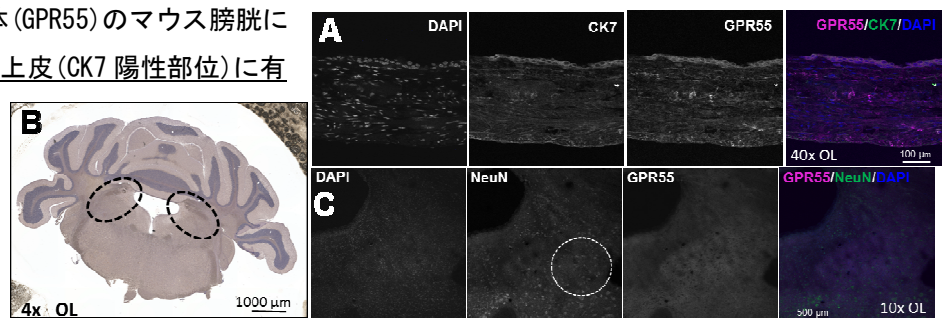
- ① 3枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

マウスで有意に高くなっていた。実験 1 の結果と合わせ、PEA 血中濃度の概日リズム消失が夜間頻尿の発症に関与している可能性が考えられた。Clock mutant マウスにおける 4H-DoHE 濃度は WT より高値であり、概日リズムは見られなかったがこの脂肪酸も排尿に何らかの影響を与えている可能性が考えられた。(下図)



実験 3 結果: PEA の特異的受容体 (GPR55) のマウス膀胱における局在を調べた結果、膀胱上皮 (CK7 陽性部位) に有意に発現していた。(図 A)

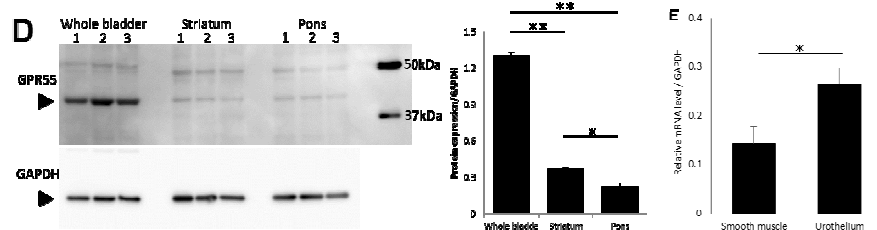
また、排尿中枢付近(点線内)には GPR55 の発現がほぼ見られないことを確認した。(図 B, C) (NeuN: 神経細胞体)



腹腔内投与した PEA が膀胱、中枢のどちらに作用したのか不明なため、マウスの膀胱・排尿

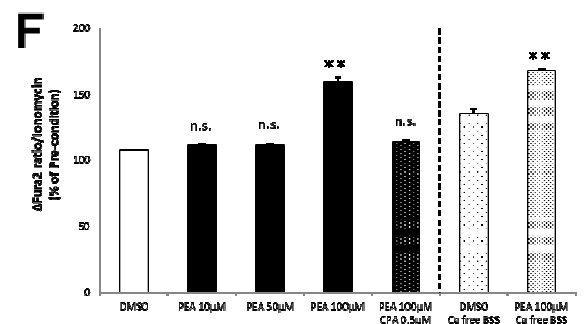
中枢における GPR55 を Western blot で定量した。結果、中枢よりも膀胱にきわめて豊富に GPR55 が存在していた。

[図 D: GPR55 局在は膀胱>線条体 (striatum)>橋 (pons: 排尿中枢付近)]



さらにマウス膀胱の各層の培養細胞(膀胱上皮、膀胱平滑筋)における GPR 発現量を RT-PCR で定量した(図 E)。

これら結果により、GPR55 は膀胱上皮に多く発現しており、腹腔内投与された PEA が中枢ではなく、膀胱上皮に作用している可能性が高いと考えられた。



実験 4 結果: 実験 3 の結果を踏まえ、膀胱上皮を用いた実験を行った。マウス膀胱上皮培養細胞に PEA を添加した際の細胞内カルシウム濃度の変化を Ca イメージング法で調べた結果(図 F)、投与前 (DMSO 添加後) からの細胞内 Ca 濃度は PEA100 μM 添加後で有意に上昇した。この変化は小胞体機能阻害剤の Cyclopiazonic acid (CPA) 作用下で抑制された。また、Ca 濃度ゼロの培養液中 (Ca free BSS) における PEA 投与後の細胞内 Ca 濃度上昇は維持されていた。これにより、PEA は膀胱上皮の GPR55 に作用し、小胞体内 Ca の細胞内への動員を誘発すると考えられた。

摘出したマウス膀胱の PEA 投与後の収縮反応を Organ bath system で測定したが、何の変化も見いだせなかった。また、PEA 投与後に膀胱上皮培養細胞から放出される ATP (膀胱筋層を収縮させ排尿反射を引き起こす) を、

留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

生物発光測定法で調べたが、有意差は見いだせなかった。(図割愛)

しかし、PEA 投与後の排尿中枢における神経活動の変化を免疫染色で調べたところ、PEA 投与後 6 時間のマウス排尿中枢において、cFos 活性(神経活動の指標となるタンパク)が有意に上昇していた。(図 G)

すなわち PAE で誘発される夜間頻尿は、GPR55 の刺激による膀胱上皮からの ATP などによる膀胱局所の反応ではなく、ATP 以外の神経伝達物質が膀胱上皮から放出され、排尿中枢を經由して排尿反射を引き起こす可能性が考えられた。

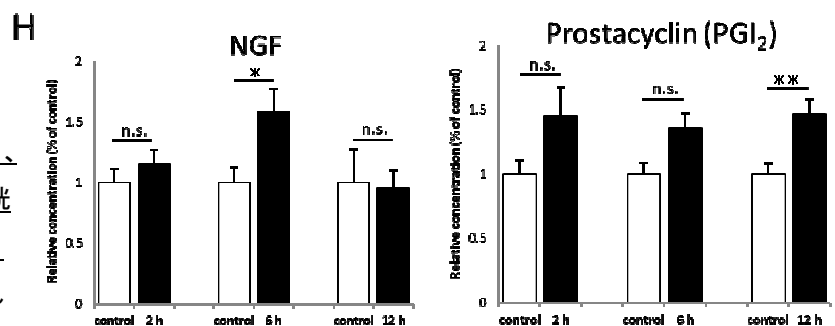
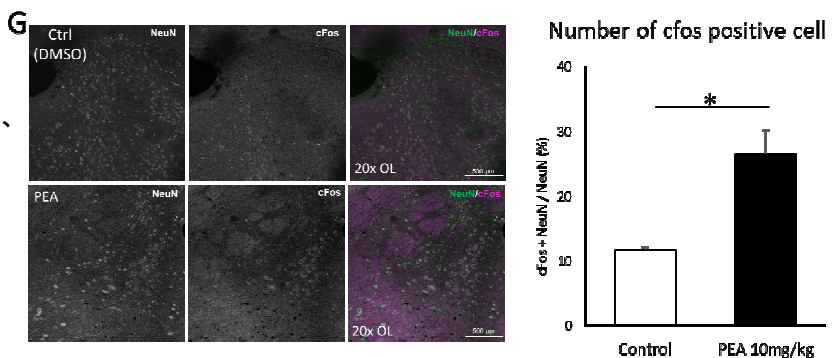
この PEA による GPR55 刺激により膀胱上皮から放出される神経伝達物質を同定す

るため、PEA 添加後の膀胱上皮培養細胞上清を 2, 4, 6 時間毎に回収し、ELISA 法を持ち検討した。(図 H)

種々の化合物に対し ELISA を行ったところ、

PEA 添加後 6 時間における NGF、12 時間後における PGI₂ の有意な上昇を確認した。

すなわち、PEA は膀胱上皮の GPR55 に作用し、NGF や PGI₂ を分泌させる。そしてそれが膀胱内に存在する求心性神経末端に作用することにより、排尿を引き起こす可能性が示唆された。



5 今後の展望

PEA 刺激による神経伝達物質の実験に関し、GPR55 非機能下 (siRNA 処置など) での ELISA を行う予定である。

また、GPR55 のアンタゴニスト投与が排尿抑制効果を示すのか実験を行っていく。PEA 以外の脂肪酸 (9HODE や 4H-DoHE) にも特異的受容体が存在する可能性があり、報告が上がり次第、同じように実験を行っていく。

現状の実験データが示す限り、血中 PEA 濃度の日内変動が消失し睡眠期にも高値を持続していることが夜間頻尿を引き起こしている可能性が高く、創薬に結び付けることができるかも検討していく。

6 研究成果の発信方法 (予定を含む)

今年度の泌尿器科国際学会 (国際尿禁制学会や環太平洋泌尿器科学会など) での発表を予定する。

実験データがすべてまとめ次第、論文投稿を行う。

留意事項

① 3 枚程度で作成してください。

② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。