

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

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

高齢者における夜間頻尿の有病率は高く、それに伴う合併症が QOL に大きな影響を与えている。夜間頻尿の原因は多岐に渡り、各々の原因に対する対症療法や、過活動膀胱治療薬の投与が主な治療法である。しかしながら、これら既存の治療薬に反応しない患者は多く、夜間頻尿は難治である。

我々の行った先行研究では、夜間頻尿を有する患者において数種の血中脂肪酸濃度が有意に上昇しているという結果を得ている(図1; Kira, S., et al. World J Urol, 2019)。さらに夜間頻尿モデルマウス血漿などを用いた実験でも同様の結果を得ており、これら脂肪酸が夜間頻尿を誘発する因子の一つであると考えている。

脂肪酸は G タンパク質共益型受容体を介した様々な生理作用を有するが、我々の同定した脂肪酸に関してもすでに受容体が特定されており、これら脂肪酸受容体を介した作用により夜間頻尿が発症すると仮定した。今回は、我々の同定した脂肪酸が排尿に与える影響を検討し、新規の夜間頻尿治療薬開発の糸口とする。

3 研究の方法

実験 1: マウス排尿パターンの測定

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において、特に有意な変動を示す3種の脂肪酸(PEA、9HODE、4H-DoHE)を WT マウスに投与し排尿への影響を検討した。

マウスの排尿測定には排尿代謝ケージを用いた(図2)。装置内での馴化期間を2日以上置き、12時間の明暗サイクル中で、2日間の排尿パターンを記録。2日目の明期の始め(6:00am; ZT0)に各脂肪酸 10mg/kg で経腹的に投与し、投与前(Day1)、投与後(Day2)における明期の排尿パターンを比較した(図3)。マウスの明期における排尿を夜間頻尿として扱った。

図1 Metabolomic biomarkers of nocturia

| Biomarker | Odds ratio | 95% CI | p value |
|---------------------------|------------|---------------|---------|
| Palmitoylethanolamide | 2.262 | 1.342, 3.813 | 0.002 |
| 4-HDoHE | 2.111 | 1.161, 3.839 | 0.014 |
| 9-KODE | 2.365 | 0.903, 6.199 | 0.08 |
| 13-KODE | 1.291 | 0.996, 1.673 | 0.054 |
| 9-HODE | 3.006 | 1.267, 7.131 | 0.013 |
| 20-HDoHE | 1.561 | 1.024, 2.380 | 0.039 |
| 13-HODE | 2.006 | 1.097, 3.667 | 0.024 |
| Arachidonoyl ethanolamide | 10.934 | 1.519, 75.155 | 0.015 |
| Eicosapentaenoic acid | 1.897 | 1.010, 3.564 | 0.047 |
| Docosahexaenoic acid | 1.282 | 0.982, 1.674 | 0.068 |
| 19,20-diHDoPE | 1.239 | 0.960, 1.600 | 0.099 |
| 12-HETE | 1.823 | 1.060, 3.135 | 0.030 |
| Arachidonic acid | 1.650 | 1.046, 2.601 | 0.031 |

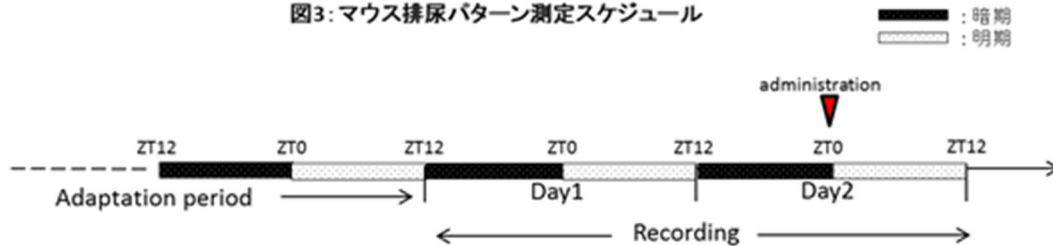
95% CI 95% confidence interval, HDoHE hydroxydocosahexaenoic acid, KODE oxo-octadecadienoic acid, HODE hydroxyoctadecadienoic acid, diHDoPE dihydroxy-docosapentaenoic acid, HETE hydroxy-eicosatetraenoic acid

図2: マウス用排尿代謝ケージ



NeuroUrol Urodyn, 36: 1034, 2017

図3: マウス排尿パターン測定スケジュール



実験 2: マウス血清脂肪酸濃度の概日リズム測定

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 2 日間にわたり経時的に採取し、各脂肪酸 (PEA、9HODE、4H-DoHE) 濃度の変化を LS/MS で測定した。血漿は麻酔下で心臓より全血を採取し遠心後に分離・回収した。外注検査会社 (CMIC 株式会社) へ送付し測定した。先行研究で行った実験の追加である。

* 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。

- 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: GPR55 の組織局在性の検討

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。WT マウスより脳、膀胱を摘出し、固定後に OCT に包埋し標本を作製。DAB 法、蛍光免疫染色で排尿中枢 (pons micturition center; PMC)、膀胱における GPR55 の発現を評価した。

その他、PMC、膀胱における GPR55 の発現の定量を Western blot で、膀胱各組織 (上皮/平滑筋) における GPR55 の発現の定量を RT-PCR で評価した。

実験 4: 膀胱における GPR55 の機能評価

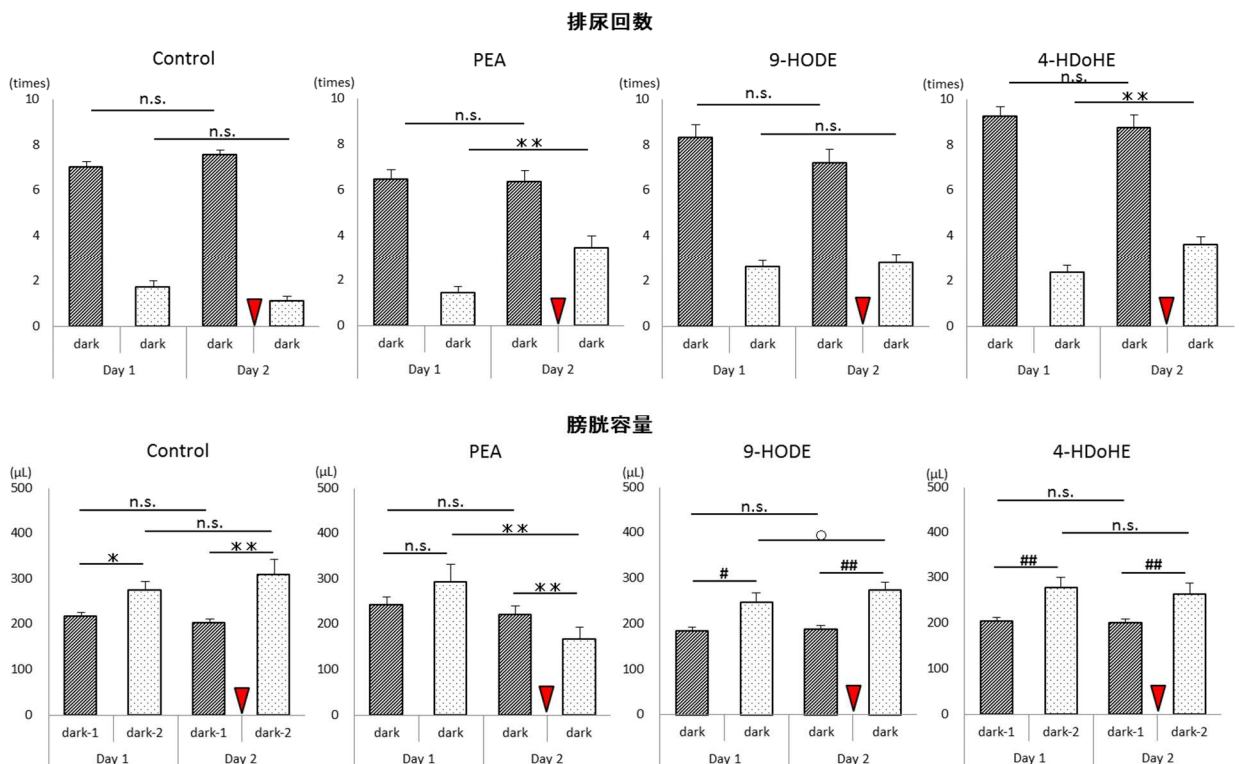
膀胱の GPR55 を PEA で刺激した際の変化を調べ、GPR55 の機能、夜間頻尿との関連を検討した。WT マウスより膀胱を摘出し、Organ bath を用いて PEA 投与後の張力変化を測定した。また膀胱上皮培養細胞を作製し、PEA 添加後の細胞内 Ca 濃度変化を Ca イメージングで測定した。

膀胱上皮に刺激が加わると種々の神経伝達物質が遊離されるが、どの神経伝達物質が遊離され排尿を誘発するのか調べるため、PEA 投与後の膀胱上皮培養細胞集塊からの ATP 放出を生物発光カウントで測定した。さらに膀胱上皮培養細胞へ PEA 投与し、培養上清を投与後 2 時間、6 時間、12 時間で回収し、ELISA 法を用い培養上清中の NGF、PGE2、PGI1、IL-6、IL-1 β を測定した。

4 結果

実験1: マウス排尿パターンの測定結果

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WT マウスへ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。12時間の明暗環境下では、統計学的に有意な変化がみられなかったが、睡眠・覚醒や排尿などの概日リズムを調節する重要な因子である明暗刺激のない恒暗環境下で下図の如く有意な差を呈した。



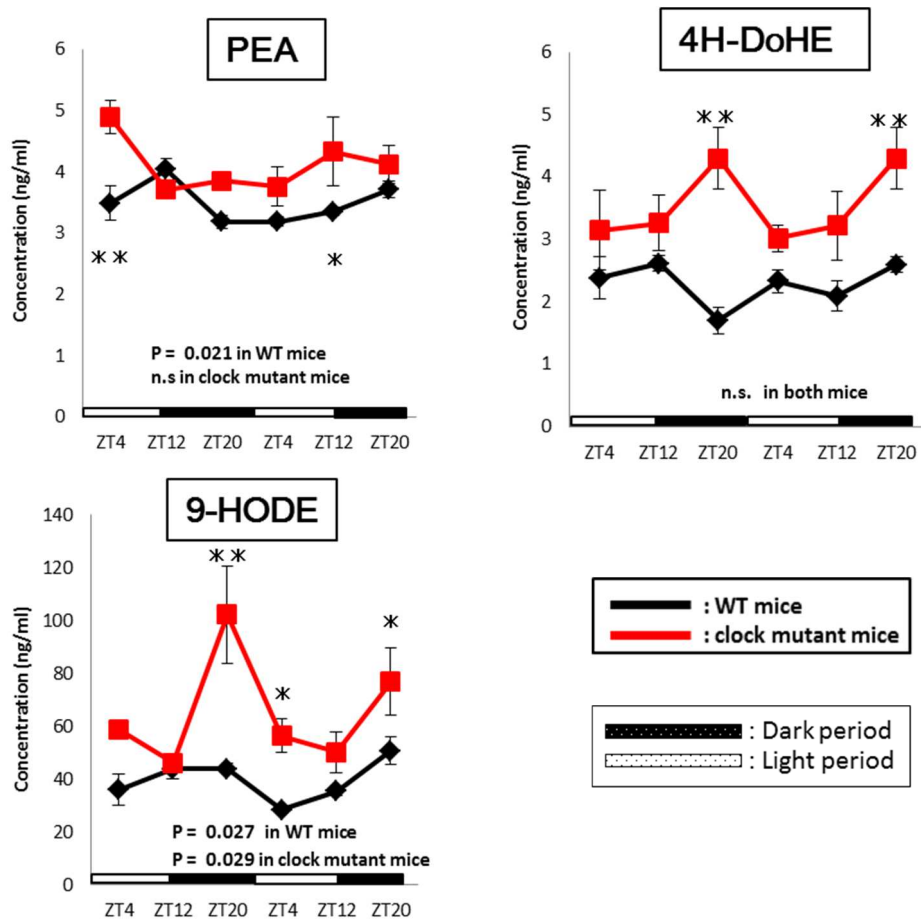
上図説明；各脂肪酸投与後の排尿パターン変化

排尿回数はPEA、4-HDoHE投与後(赤矢印)に有意に上昇した。膀胱容量はCtrl群において活動期(暗期)より睡眠期(明期)の方が大きくなる概日リズムをていしているが(図においては恒暗条件なので相対的な暗期・明期となる)、PEA投与後には膀胱容量が低下し、Ctrlでみられていた昼夜の膀胱容量の概日リズムが消失した。9-HODEでは膀胱容量が増加を呈し、4-HDoHE投与は膀胱容量に影響を与えなかった。(N=14, 8, 5, 7 from left side of graph)

実験2: マウス血清脂肪酸濃度の概日リズム測定結果

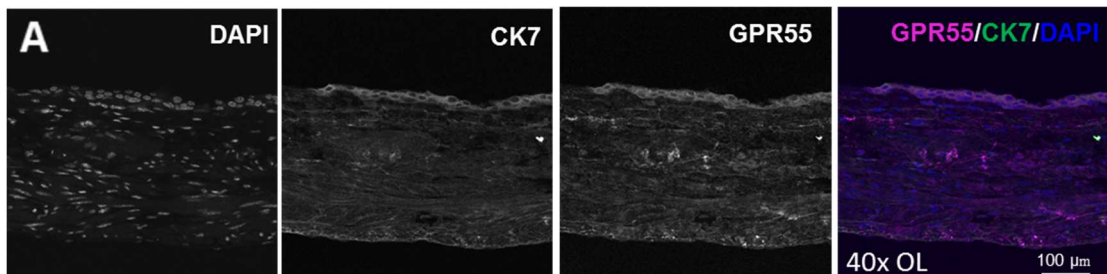
PEA、9HODE、4H-DoHEの血中濃度の経時的変化を測定した。PEAの血中濃度は、WTマウスでは睡眠期である明期に低く、活動期の暗期では逆となる概日リズムのパターンを呈していた。9-HODEの血中濃度はWT、Clock mutantともに睡眠期に低く活動期に高くなる概日リズムを呈していた。4H-DoHEではこのような経時的変化は呈さなかった。睡眠期におけるこれら3つの脂肪酸濃度はWTに比較しClock mutantマウスで有意に高くなっていた。(N=4 at each time point)

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)



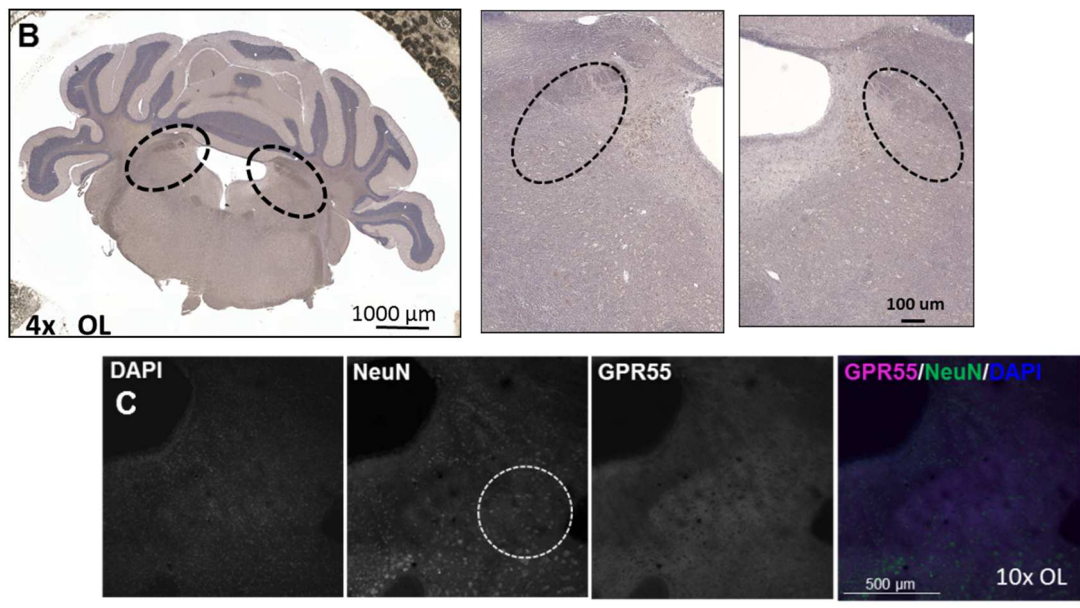
実験 3: GPR55 の組織局在性の検討結果

3-1; PEA の特異的受容体 (GPR55) の WT 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)に多く発現していた。(図 A)



3-2; 排尿中枢付近 (PMC; 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)



3-3; 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、WT マウスの膀胱と PMC における GPR55 発現を 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。

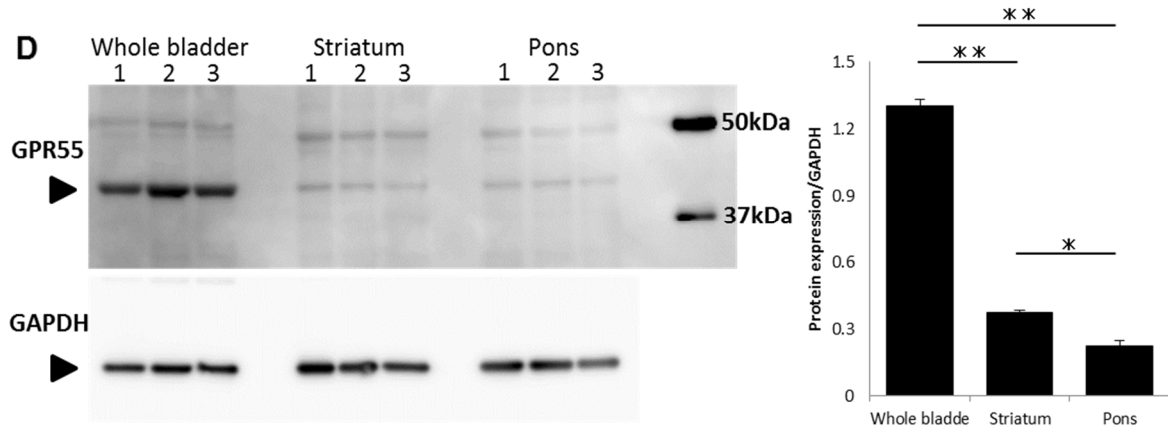
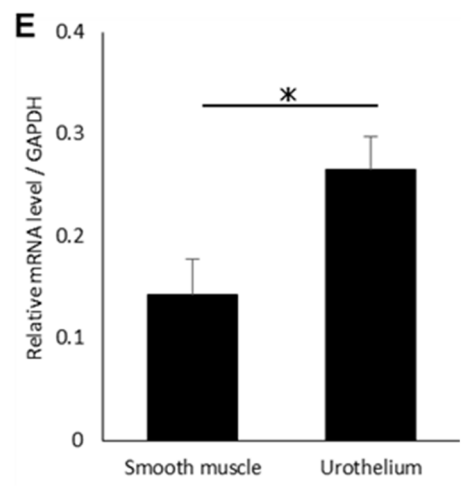


図 D; GPR55 の Western blot とその定量

GPR55 局在は膀胱>線条体(striatum)>橋(pons:PMC 付近)と膀胱で有意に多く発現し、PMC では極めて少ない。

3-4; WT マウス膀胱各層の培養細胞(膀胱上皮、膀胱平滑筋)における GPR55 発現量を RT-PCR で定量した結果、平滑筋層よりも膀胱上皮の発現量が有意に高かった(図 E)。

(N=4)



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:膀胱における GPR55 の機能評価結果

実験 3 の結果を踏まえ、膀胱上皮細胞を用いた実験を行った。

4-1; WT 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、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し排尿シグナルを中枢へ伝達すると考えられた。(図 F)

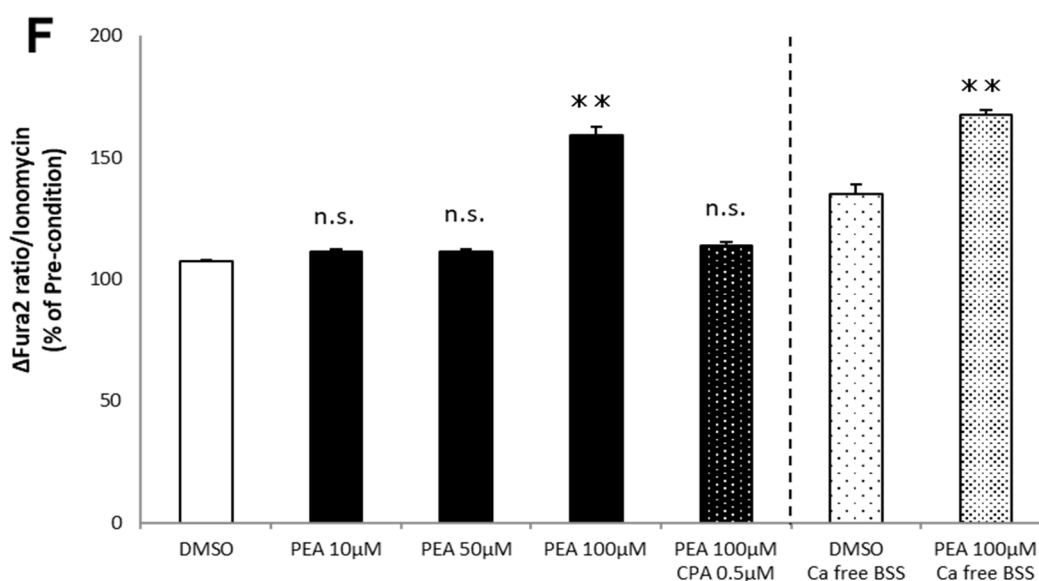


図 F ; Ca イメージング法による細胞内 Ca 流入量の定量

投与前(DMSO 添加)からの細胞内 Ca 濃度変化は PEA100 μ M 添加後に有意に上昇した。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。(N=114, 151, 110, 121, 98, 94, and 105 at each group from left side)

4-2; 摘出した WT 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(図 G)。

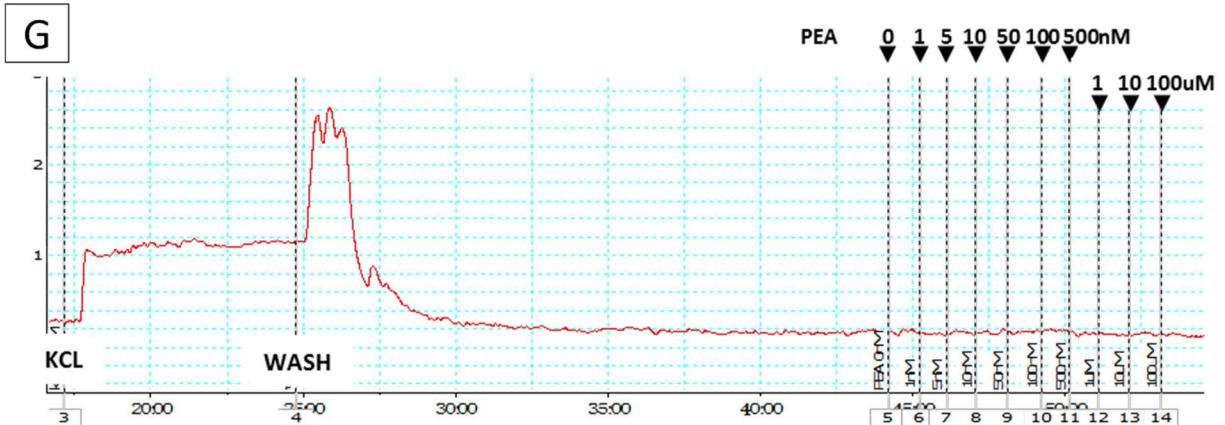


図 G ; Organ bath システムを用いた膀胱の張力変化測定

KCL で膀胱の収取を確認 (viability check) し、bath 内を 3 回 Wash。その後、PEA を 0nmol/L ~ 100uM/L まで順次投与し膀胱の収縮力を測定したが、膀胱平滑筋の収縮は誘発されなかった。

4-3; PEA 投与後に膀胱上皮培養細胞から放出される ATP (膀胱局所において膀胱筋層を収縮させ排尿反射を引き起こす) を、生物発光測定法で調べた。PEA 添加に一過性に ATP が放出されるが (図 H)、擬似的な蓄尿刺激 (伸展刺激) 負荷後の ATP 放出量は PEA で増強されなかった (図 I)。

4-2 の結果と合わせ、PEA の局所投与では膀胱を収縮させる ATP は放出されないということがわかる。

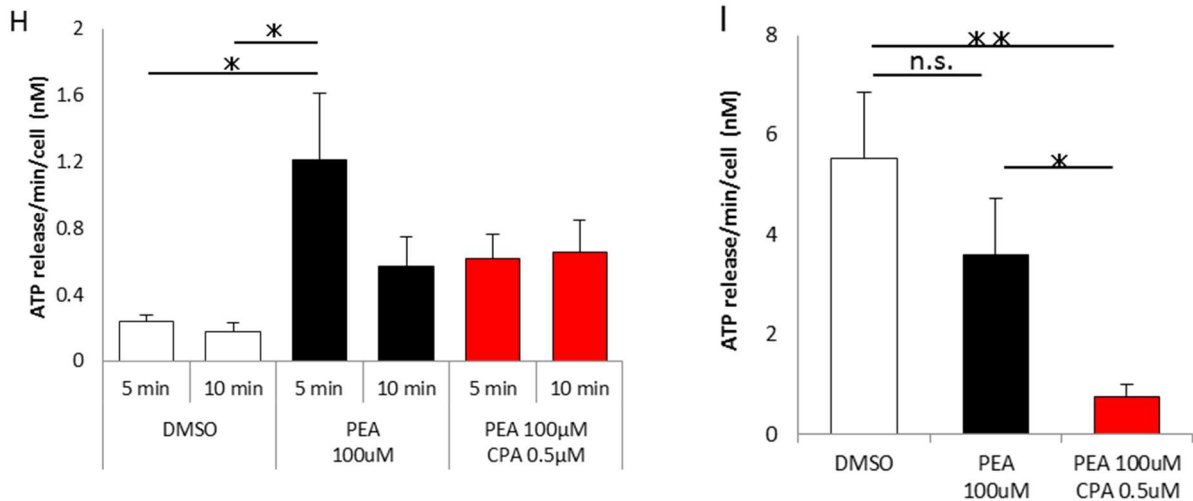
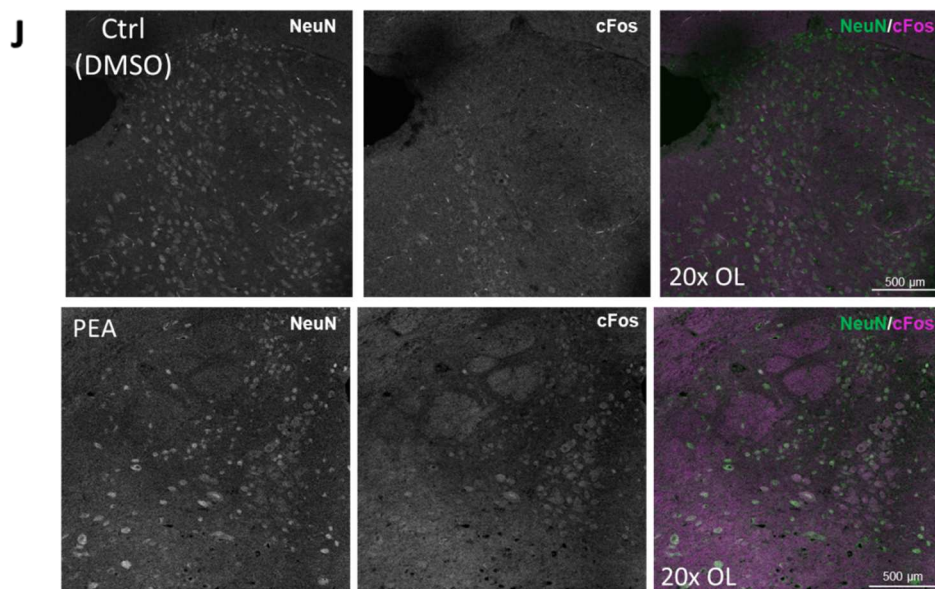


図 H and I ; 膀胱上皮培養細胞からの ATP 放出量測定

H; DMSO (Ctrl), PEA, PEA+CPA 添加後の自発的 ATP 放出量の変化を 5 分後、10 分後で測定した PEA 投与 5 分後に ATP が放出されるが、その変化は一過性で 10 分後には元に戻る。この変化は CPA で抑制される。(N=7, 6, and 5 in DMSO, PEA, and PEA+CPA)

I; DMSO (Ctrl), PEA, PEA+CPA 添加 5 分後に、擬似的な蓄尿刺激 (伸展刺激) を負荷し放出される ATP を測定した。PEA 投与後において、伸展刺激後の ATP 放出量は増加しなかった。CPA による伸展刺激後 ATP 放出の抑制が確認できる。(N=8, 8, and 7 in DMSO, PEA, and PEA+CPA)

4-4; WT マウスへの PEA 投与後の排尿中枢 (PMC) 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 PMC 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 J and K)



K Number of cfos positive cell

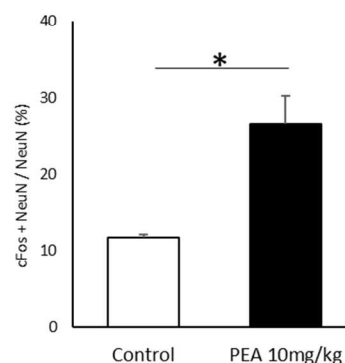


図 J and K ; PEA 投与後の PMC の蛍光免疫染色

J; PEA 10mg/kg 腹腔内投与 6 時間後のマウス PMC の免疫染色における代表写真。(NeuN; 神経細胞体, cFos; 神経活動活性マーカー)

K; NeuN と cFos の染色陽性細胞の定量。(N=4)

すなわち PEA 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、排尿中枢を経由して排尿を引き起こす可能性が考えられた。

4-5; 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中の神経伝達物質を ELISA で測定した。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 Prostaglandins、Cytokine などを分泌させる。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。(図 L)

L

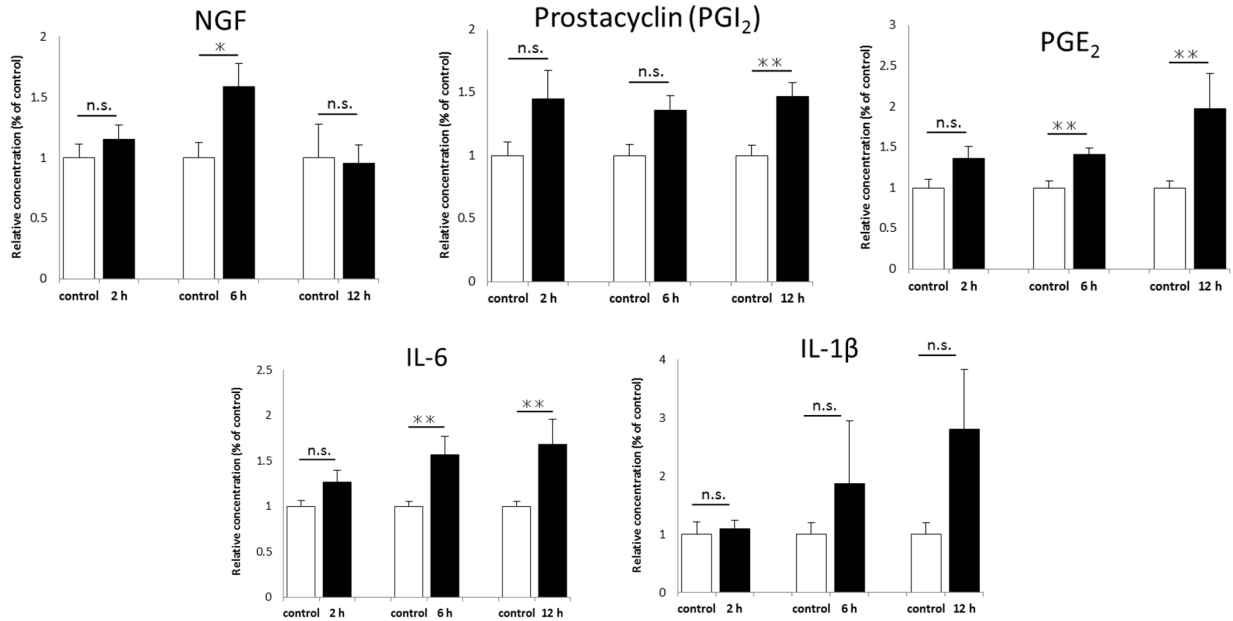
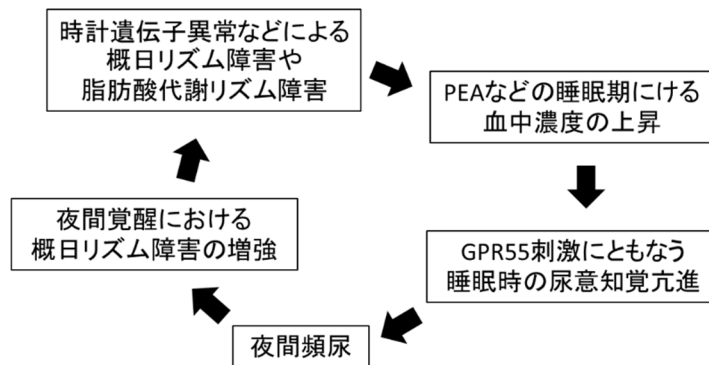


図 L ; 膀胱上皮培養細胞上清中の各種神経伝達物質定量

各種神経伝達物質は、PEA 投与後 2 時間では変化なかった。IL-1 β を除き、6 時間、12 時間と経時的に上昇していた。

5 まとめ；夜間頻尿の原因として以下の新たな病態を提唱できる



6 今後の実験計画

- ✓ 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) の特異的受容体が同定され次第、同じように実験を行っていく。
- ✓ GPR55 機能阻害が夜間頻尿治療へ応用し、創薬に結び付けることができるか検討していく。