

(続紙 1)

京都大学	博士（薬学）	氏名	寶満 隆
論文題目	過酸化水素による慢性膀胱炎モデルの構築と機序解明		
（論文内容の要旨） 慢性膀胱炎の一種である間質性膀胱炎（IC）は、頻尿、尿意亢進、尿意切迫感、炎症および膀胱痛等の症状を示す膀胱の器質的疾患であり、患者の生活の質は著しく低下する。近年、ICの認知度が高まるにつれて、臨床現場における治療薬のニーズも高まっている。しかし、ICの根本的な原因は未だ明らかにされておらず、ICまたはICに伴う症状に対する有効な治療法、治療薬は、世界的にもほとんど実用化されていない。ICの治療薬の開発が進まない主な原因の一つに、ICの適切なモデル動物が存在しないことが挙げられる。既存モデルとしてアルキル化剤に分類される抗悪性腫瘍薬シクロフォスファミドによる膀胱炎モデル等が用いられてきたが、いずれも炎症や頻尿といった症状がわずかに数日で回復し、慢性炎症を基盤とするICの適切なモデルとは言い難いものであった。近年、膀胱の機能障害において活性酸素種（ROS）がその原因の一つではないかと示唆されているが、ROSの膀胱に対する直接的な作用については、不明な点が多く残されている。本研究において著者は、過酸化水素（H₂O₂）を用いて、慢性膀胱炎症状を呈するモデル構築とそのメカニズム解明を目的とした検討を行い、以下の新知見を得た。 第一章 H₂O₂膀胱内注入による慢性膀胱炎モデルの確立 雌性C57BL/6Jマウス（5-6週齢）に、種々の濃度（0.5%、1.5%及び5%）のH₂O₂を膀胱内注入し、3時間、1、7および14日後の排尿回数（15分間）および膀胱重量を測定した。その結果、1.5% H₂O₂膀胱内注入群において、注入翌日から7日以上持続する有意な排尿回数増加と、14日以上持続する膀胱重量の増加が認められた。また、0.5% H₂O₂膀胱内注入群では顕著な変化は認められず、5% H₂O₂膀胱内注入群では、顕著な排尿回数および膀胱重量の増加が認められたものの、膀胱が周辺の臓器と癒着し、死亡する個体も多かったため、用いることはできなかった。一方、シクロフォスファミド（300 mg/kg）腹腔内投与による膀胱炎モデルでは、投与3時間後をピークとする排尿回数の増加、膀胱重量の増加が認められたが、いずれも数日以内に回復するものであった。これらの結果から、既存のシクロフォスファミド誘発膀胱炎モデル等と比較して、H₂O₂膀胱内注入により、頻尿症状、膀胱炎が比較的長時間持続する膀胱炎モデルが作成できたと考えられる。次に、本モデルに対して、抗コリン薬オキシブチニン、三環系抗うつ薬アミトリプチリン、代表的な抗炎症性鎮痛薬インドメタシン、麻薬性鎮痛薬モルヒネを単回腹腔内投与すると、いずれも頻尿症状を有意に抑制したが、試験直後の膀胱重量に変化は認められなかった。これらICの症状緩			

和に臨床使用されている薬物が有効性を示したことから、本モデルが慢性膀胱炎における頻尿治療薬スクリーニング系として利用可能であることが明らかとなった。

第二章 H₂O₂膀胱内注入による慢性膀胱炎発症のメカニズム

H₂O₂膀胱内注入による慢性膀胱炎発症のメカニズムを解明する目的で、以下の検討を行った。まず、H₂O₂膀胱内注入による排尿回数および膀胱重量の増加は、膀胱内注入直前にカタラーゼを処置すると完全に消失したのに対し、膀胱内注入直後の処置では全く効果を示さなかった。すなわち、H₂O₂が膀胱内に貯留する30分間での膀胱内壁への障害が引き金となっていると考えられる。また、過酸化水素は膀胱粘膜に対する一過性の傷害により、3時間から1日後にかけて粘膜透過性の亢進を引き起こした。これらは注入7日後では回復する一方で、血管透過性は注入3時間から7日後まで持続して亢進した。膀胱の組織切片を作成しヘマトキシリン・エオジン染色を行うと、H₂O₂注入後3時間から1日後にかけて、尿路上皮層の薄層化・破壊と粘膜下組織の浮腫が認められ、7日後においては、この尿路上皮層の薄層化・破壊は回復するものの、粘膜下組織の過形成、炎症性細胞の浸潤、および顕著な血管新生が認められた。また、H₂O₂注入3時間後から膀胱組織における炎症性サイトカイン（IL-1 β 、TNF- α およびIL-6）の持続的な増加が認められた。さらに、H₂O₂注入7日後では、線維化の指標であるTGF- β 発現量の増加、およびマッソントリクローム染色による粘膜固有層・粘膜下組織でのコラーゲンの経時的な増加が確認され、傷害を受けた組織が徐々に線維化していく徴候が認められた。以上の結果から、本モデルでは、膀胱固有層の炎症が長期にわたり持続することが示された。この原因として、膀胱内注入したH₂O₂により、一時的に尿路上皮層が破壊、粘膜透過性が亢進された結果、粘膜固有層・粘膜下組織が尿に曝露され、急性炎症が惹起されたものと考えられる。さらに、血管透過性の亢進、好中球などの炎症性細胞が浸潤した結果、膀胱炎症が持続し、血管新生および線維化が惹起されたものと考えられる。すなわち、本モデルは、膀胱の慢性的な炎症の結果、組織の過剰修復を引き起こし、粘膜固有層・粘膜下組織の肥厚化および膀胱の伸展性の喪失により膀胱容量が減少するという、ICの臨床像に近い病態を再現している可能性が示された。

以上、著者は、H₂O₂膀胱内注入により、既存するどの膀胱炎モデルよりも長時間持続する慢性膀胱炎モデルの構築に初めて成功した。その発症機序として、ROSによる膀胱粘膜の破壊、透過性の亢進と、それに続く固有層の炎症の慢性化、肥厚化が関与することを明らかにした。本研究成果は、炎症および頻尿を症状とする膀胱機能障害に、ROSが重要な役割を果たすことを示唆するものであり、ROSが関与する下部尿路症状の病態解明と、新たなIC治療薬の創製に有用な基礎的知見を提供するものである。

※上記モデルの製造方法についてはH24/10/30特許出願済（特願2012-238528）

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

慢性膀胱炎の一種である間質性膀胱炎 (IC) は、頻尿、尿意亢進、尿意切迫感、炎症および膀胱痛等の症状を示す膀胱の器質的疾患であり、患者の生活の質は著しく低下する。近年、ICの認知度が高まるにつれて、臨床現場における治療薬のニーズも高まっている。しかし、ICの根本的な原因は未だ明らかにされておらず、ICまたはICに伴う症状に対する有効な治療法、治療薬は、世界的にもほとんど実用化されていない。ICの治療薬の開発が進まない主な原因の一つに、ICの適切なモデル動物が存在しないことが挙げられる。既存モデルとしてアルキル化剤に分類される抗悪性腫瘍薬シクロフォスファミドによる膀胱炎モデル等が用いられてきたが、いずれも炎症や頻尿といった症状がわずかに数日で回復し、慢性炎症を基盤とするICの適切なモデルとは言い難いものであった。近年、膀胱の機能障害において活性酸素種 (ROS) がその原因の一つではないかと示唆されているが、ROSの膀胱に対する直接的な作用については、不明な点が多く残されている。本研究において申請者は、過酸化水素 (H_2O_2) を用いて、慢性膀胱炎症状を呈するモデル構築とそのメカニズム解明を目的とした検討を行い、以下の新知見を得た。

第一章 H_2O_2 膀胱内注入による慢性膀胱炎モデルの確立

雌性C57BL/6Jマウス (5-6週齢) に、種々の濃度 (0.5%、1.5%及び5%) の H_2O_2 を膀胱内注入し、3時間、1、7および14日後の排尿回数 (15分間) および膀胱重量を測定した。その結果、1.5% H_2O_2 膀胱内注入群において、注入翌日から7日以上持続する有意な排尿回数増加と、14日以上持続する膀胱重量の増加が認められた。また、0.5% H_2O_2 膀胱内注入群では顕著な変化は認められず、5% H_2O_2 膀胱内注入群では、顕著な排尿回数および膀胱重量の増加が認められたものの、膀胱が周辺の臓器と癒着し、死亡する個体も多かったため、用いることはできなかった。一方、シクロフォスファミド (300 mg/kg) 腹腔内投与による膀胱炎モデルでは、投与3時間後をピークとする排尿回数の増加、膀胱重量の増加が認められたが、いずれも数日以内に回復するものであった。これらの結果から、既存のシクロフォスファミド誘発膀胱炎モデル等と比較して、 H_2O_2 膀胱内注入により、頻尿症状、膀胱炎が比較的長時間持続する膀胱炎モデルが作成できたと考えられる。次に、本モデルに対して、抗コリン薬オキシブチニン、三環系抗うつ薬アミトリプチリン、代表的な抗炎症性鎮痛薬インドメタシン、麻薬性鎮痛薬モルヒネを単回腹腔内投与すると、いずれも頻尿症状を有意に抑制したが、試験直後の膀胱重量に変化は認められなかった。これらICの症状緩和に臨床使用されている薬物が有効性を示したことから、本モデルが慢性膀胱炎における頻尿治療薬スクリーニング系として利用可能であることが明らかとなった。

第二章 H_2O_2 膀胱内注入による慢性膀胱炎発症のメカニズム

H_2O_2 膀胱内注入による慢性膀胱炎発症のメカニズムを解明する目的で、以下の検討を行

った。まず、 H_2O_2 膀胱内注入による排尿回数および膀胱重量の増加は、膀胱内注入直前にカタラーゼを処置すると完全に消失したのに対し、膀胱内注入直後の処置では全く効果を示さなかった。すなわち、 H_2O_2 が膀胱内に貯留する30分間での膀胱内壁への障害が引き金となっていると考えられる。また、過酸化水素は膀胱粘膜に対する一過性の傷害により、3時間から1日後にかけて粘膜透過性の亢進を引き起こした。これらは注入7日後では回復する一方で、血管透過性は注入3時間から7日後まで持続して亢進した。膀胱の組織切片を作成しヘマトキシリン・エオジン染色を行うと、 H_2O_2 注入後3時間から1日後にかけて、尿路上皮層の薄層化・破壊と粘膜下組織の浮腫が認められ、7日後においては、この尿路上皮層の薄層化・破壊は回復するものの、粘膜下組織の過形成、炎症性細胞の浸潤、および顕著な血管新生が認められた。また、 H_2O_2 注入3時間後から膀胱組織における炎症性サイトカイン（ $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ および IL-6 ）の持続的な増加が認められた。さらに、 H_2O_2 注入7日後では、線維化の指標である $\text{TGF-}\beta$ 発現量の増加、およびマッソントリクローム染色による粘膜固有層・粘膜下組織でのコラーゲンの経時的な増加が確認され、傷害を受けた組織が徐々に線維化していく徴候が認められた。以上の結果から、本モデルでは、膀胱固有層の炎症が長期にわたり持続することが示された。この原因として、膀胱内注入した H_2O_2 により、一時的に尿路上皮層が破壊、粘膜透過性が亢進された結果、粘膜固有層・粘膜下組織が尿に曝露され、急性炎症が惹起されたものと考えられる。さらに、血管透過性の亢進、好中球などの炎症性細胞が浸潤した結果、膀胱炎症が持続し、血管新生および線維化が惹起されたものと考えられる。すなわち、本モデルは、膀胱の慢性的な炎症の結果、組織の過剰修復を引き起こし、粘膜固有層・粘膜下組織の肥厚化および膀胱の伸展性の喪失により膀胱容量が減少するという、ICの臨床像に近い病態を再現している可能性が示された。

以上、著者は、 H_2O_2 膀胱内注入により、既存するどの膀胱炎モデルよりも長時間持続する慢性膀胱炎モデルの構築に初めて成功した。その発症機序として、ROSによる膀胱粘膜の破壊、透過性の亢進と、それに続く固有層の炎症の慢性化、肥厚化が関与することを明らかにした。本研究成果は、炎症および頻尿を症状とする膀胱機能障害に、ROSが重要な役割を果たすことを示唆するものであり、ROSが関与する下部尿路症状の病態解明と、新たなIC治療薬の創製に有用な基礎的知見を提供するものである。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成25年2月25日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。