

Toll-like receptor 7 is overexpressed in the bladder of Hunner type interstitial cystitis and its activation in the mouse bladder can induce cystitis and bladder pain

Pain. 2017 Aug; 158(8): 1538-1545. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000947

Ichihara K, Aizawa N, Akiyama Y, Kamei J, Masumori N, Andersson KE, Homma Y, Igawa Y.

要旨 自然免疫応答に関する受容体 TLR7 は HIC の膀胱粘膜組織で過剰発現し、マウス膀胱での TLR7 活性化は膀胱痛をともなう炎症を惹起した。よって TLR7 を介した反応は HIC の病態生理に関与している可能性が示唆された。

1. 研究目的

間質性膀胱炎 (Interstitial cystitis : IC) は頻尿や膀胱痛を主症状とする難治性慢性膀胱機能障害である¹⁾。IC は膀胱鏡所見から、ハンナ型 (HIC) および非ハンナ型 (NHIC) に分けられる。HIC は NHIC に比較して病理組織学的にリンパ形質細胞浸潤が著しく、HIC の病態には炎症細胞浸潤を促進する何らかの機序が関与している可能性がある²⁾。Toll-like receptor (TLR) は自然免疫応答を介して外来病原体に対する炎症惹起に寄与する受容体で、獲得免疫機構とも関連して炎症を慢性化させる。これまでヒトでは 10 の TLR が同定され、このうち核酸認識を担う TLR7 は SLE やシェーグレン症候群などの IC を合併する頻度が高い自己免疫疾患の病態に関与することが知られている。TLR7 は神経細胞にも発現しており、疼痛惹起・持続にも関与する³⁾。以上より、TLR7 が HIC の病態にも関与している可能性があるとの仮説をたて、臨床検体および動物実験により下部尿路機能における TLR7 の役割を多角的に検討した。

2. 研究方法および結果

2・1 ヒト膀胱組織を用いた検討

HIC 群 (ハンナ病変および背景粘膜) および対照群 (膀胱癌患者の非癌部) から得た膀胱粘膜生検組織を用い、Real-time PCR 法、TLR7 モノクローナル抗体による免疫組織染色にて両群の TLR7 発現差を検討した。TLR7 mRNA 発現量は対照群に比較して HIC 群の背景粘膜で有意に高かった。組織標本内における TLR7 陽性細胞数の割合は、対照群に比較して、HIC 群で有意に高かった。

2・2 動物実験

TLR7 アゴニストである Loxoribine (LX) を C57BL/6N 雌性マウス膀胱内に注入し、以下の実験系により下部尿路機能における TLR7 の機能的役割を検討した。

2・2・1 マウス膀胱における TLR7 発現変化および肉眼・組織学的形態評価

マウス膀胱における TLR7 mRNA の発現を RT-PCR 法で検討した。また、LX 注入後 96 時間経過した時点の膀胱における肉眼、病理組織学的評価および TLR7 mRNA の発現変化を検討した。正常なマウス膀胱において TLR7 mRNA の発現が確認された。これをベースラインとした場合、LX 注入後の膀胱粘膜層における TLR7 mRNA 発現量は有意に亢進した。LX 注入後の膀胱は、肉眼的に壁肥厚・うっ血を呈し、組織学的にもリンパ球を中心とした炎症細胞の誘導が確認された。

2・2・2 排尿行動 (FVM) 観察

精密代謝ケージを用いて LX 注入前後の排尿行動 (排尿回数および一回排尿量) を記録した。別のマウスでは、LX 投与前から TLR7 アンタゴニストである Hydroxychloroquine (HCQ) を経口投与し、LX による排尿行動変化に対する抑制作用を検討した。LX 注入前に比較して、LX 注入後に排尿回数は経時的に増加し、一回排尿量は低下した。HCQ 経口投与群では LX 注入で認められた排尿行動の変化が有意に抑制された。

2・2・3 膀胱痛様行動 (Licking 行動) 観察

LX 注入前後の Licking 行動を検討した。LX 注入後 2 時間目では溶媒投与に比較して有意に Licking 行動が誘発された。その後 24 時間目には投与前の状態に戻ったが、48 時間目と 72 時間目においては再度溶媒群に比較して Licking 行動が有意に誘発され、観察期間中に Licking 行動は二相性に变化した。

2・2・4 膀胱内圧測定 (CMG)

麻醉下に膀胱頂部へカテーテルを留置して上丘上位で除脳した。麻醉覚醒後、無拘束の状態でもベースラインの CMG を施行した後に、LX を注入して同様に CMG を施行した。別のマウスでは、HCQ 注入後に

Fig. 1 RT-PCRによるTLR7 mRNA発現

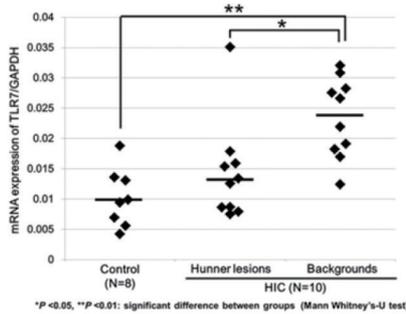


Fig. 2A TLR7抗体による免疫組織染色

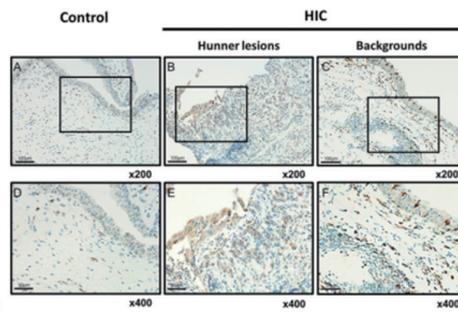


Fig. 2B TLR7陽性細胞数の定量解析

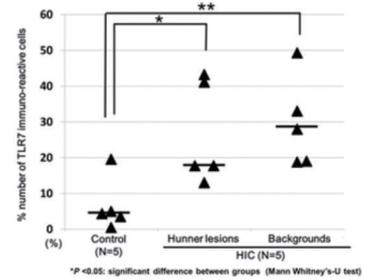


Fig. 3A TLR7 mRNA発現とその変化

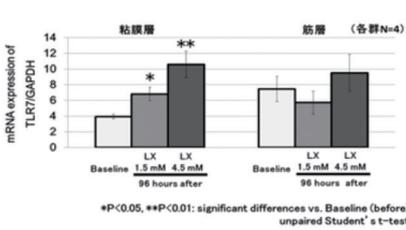


Fig. 3B 肉眼所見・病理組織学的評価

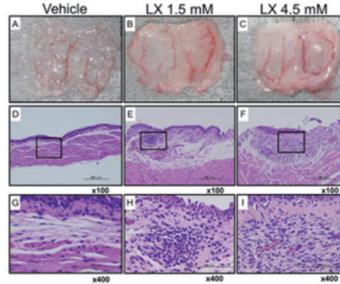


Fig. 4A 24時間排尿行動

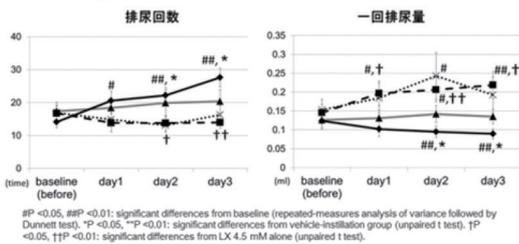
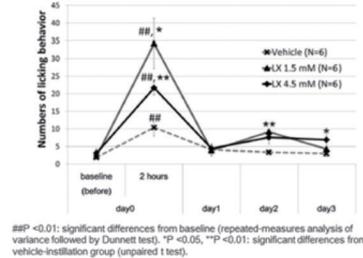


Fig. 4B 膀胱痛様行動



TLR7 mRNA 発現量は対照群に比較してHIC群の背景粘膜で有意に亢進していた (Fig. 1)。TLR7 陽性細胞数は対照群に比較してHIC群で有意に多かった (Fig. 2A, 2B)。雌マウス膀胱内にLX注入すると、膀胱粘膜におけるTLR7 mRNAは発現が亢進し、肉眼・組織学的炎症が誘導された (Fig. 3A, 3B)。この時、経時的に頻尿や膀胱痛が惹起された (Fig. 4A, 4B)。

LXを追加注入し、LXによるCMGパラメーターの変化に対する抑制作用を検討した。LX注入により排尿間隔は短縮、排尿量は有意に減少した。LX注入前からHCQを注入するとこれらの変化は抑制された。

2・2・5 摘出膀胱・骨盤神経を用いた膀胱伸展受容求心性神経活動測定

麻酔下に膀胱・骨盤神経叢・骨盤神経を一塊に取りだし、膀胱伸展にตอบสนองする求心性神経活動を骨盤神経から導出記録し、膀胱求心性神経活動に対するLXの直接効果を検討した。膀胱伸展にตอบสนองする求心性神経活動はLX注入により増大した。

3. 結論

TLR7はHIC患者の膀胱粘膜に過剰発現し、マウス膀胱におけるTLR7の活性化は膀胱痛をとまなう炎症を惹起した。また、TLR7アンタゴニストの投与によってアゴニストにより惹起された頻尿や一回排尿量の低下は抑制された。以上から、TLR7を介した反応がHICの病態生理にも関与している可能性が示唆された。

4. 参考文献

1. Homma Y, Ueda T, Tomoe H, Lin AT, Kuo HC, Lee MH, Oh SJ, Kim JC, Lee KS. Clinical guidelines for interstitial cystitis and hypersensitive bladder updated in 2015. *Int J Urol* 2016; 23: 542–9.
2. Maeda D, Akiyama Y, Morikawa T, Kunita A, Ota Y, Katoh H, Niimi A, Nomiya A, Ishikawa S, Goto A, Igawa Y, Fukayama M, Homma Y. Hunner-type (classic) interstitial cystitis: a distinct inflammatory disorder characterized by pancystitis, with frequent expansion of clonal B-cells and epithelial denudation. *PLoS One* 2015; 10: e0143316. doi: 10.1371/journal.pone.0143316. eCollection 2015.
3. Nicotra L, Loram LC, Watkins LR, Hutchinson MR. Toll-like receptors in chronic pain. *Exp Neurol* 2012; 234: 316–29.

市原 浩司

略歴

2003年 札幌医科大学医学部卒業
 同年 札幌医科大学泌尿器科学講座入局
 2016年 札幌医科大学大学院修了
 2017年 札幌医科大学附属病院泌尿器科