

## 主論文の要旨

### **Herpes Simplex Virus Vector-Mediated Gene Delivery of Poreless TRPV1 Channels Reduces Bladder Overactivity and Nociception in Rats**

〔単純ヘルペスウイルスによる poreless TRPV1 受容体の遺伝子導入は、  
ラットにおける膀胱過活動及び侵害受容性疼痛を軽減する〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻  
病態外科学講座 泌尿器科学分野

(指導：後藤 百万 教授)

馬嶋 剛

## 【目的】

間質性膀胱炎/骨盤痛症候群（以下 IC/BPS）は、膀胱に非特異的な慢性炎症が生じる疾患である。頻尿、尿意切迫感、膀胱痛などの症状を呈し、患者の QOL を非常に低下させる。しかしながらその原因や病態は未だ不明であり、治療法も確立されていない。最近の知見によると、IC/BPS 患者の膀胱において TRPV1 受容体の発現が亢進していることが知られており、可能性のある治療ターゲットとして注目されている。しかしながら、以前行われた TRPV1 アンタゴニスト全身投与の臨床研究では、体温上昇や灼熱感などの副作用が問題となり、より臓器特異性の高い治療法が求められている。

TRPV1 受容体は膜 6 回貫通型受容体であり、カプサイシン受容体として知られる。受容体の c 末端において、TRP-like domain と呼ばれるアミノ酸配列が存在するが、この部位を欠損させた TRPV1 受容体（poreless TRPV1）は、陽イオン透過のための pore 形成に異常を来し、結果として機能障害を生じることが報告された。本研究では、poreless TRPV1 遺伝子を挿入した単純ヘルペスウイルスベクターを用いて、膀胱炎モデルラットの膀胱および求心路の TRPV1 受容体の活性を抑制し、膀胱過活動及び侵害受容性疼痛に対する効果について検討した。

## 【方法】

本研究は University of Pittsburgh, Institutional Animal Care and Use Committee に承認されたプロトコルの元に行われた。

ICP4 及び ICP27 を欠損させた複製欠損型単純ヘルペスウイルスに、HCMV をプロモーターとした poreless TRPV1 遺伝子を挿入することにより、ウイルスベクターを作成した。またコントロールとして、GFP 遺伝子を挿入したウイルスベクターを用いた (Fig. 1)。

### コントロールベクターの膀胱生理機能への影響

最初に膀胱の生理機能に対する影響を調べるため、麻酔下に 9 週齢雌性 SD ラットにおいて、コントロールベクター ( $1.1 \times 10^8$  plaque forming units) 又は生理食塩水を膀胱壁内に総量 30uL 注入した。

次に、別のラットにおいて、膀胱壁内に総量 30uL のコントロールベクターまたは poreless TRPV1 ベクター ( $1.1 \times 10^8$  plaque forming units) を注入した。

### 膀胱内圧測定

ウイルス注入から 1 週間後、麻酔下膀胱内圧測定を行った。生理食塩水を膀胱内へ持続還流しベースラインの膀胱内圧を測定した後、1uM のレジニフェラトキシン (TRPV1 アゴニスト) を持続還流し頻尿を誘発した。

### GFP 陽性細胞の観察

ウイルス注入から 2 週間後、コントロール群のラット及び無処置のラットを安楽死させた後、膀胱及び L4、L6、S1 後根神経節を摘出した。OCT コンパウンドに包埋後、凍結切片を作成しそれぞれ GFP の発現を蛍光顕微鏡下に観察した。

### レジニフェラトキシン誘発疼痛行動

ウイルス注入から2週間後、経尿道的にカテーテルを膀胱内へ挿入した。3 $\mu$ M のレジニフェラトキシン 0.3mL を膀胱内へ注入後、15 分間疼痛行動(licking 及び freezing 行動) を観察した。以前の報告により、licking 行動は陰部神経を介した尿道痛を、freezing 行動は骨盤神経を介した膀胱痛を反映していると考えられている。

### c-Fos 染色

疼痛行動観察から2時間後、麻酔下に冷却ヘパリン加生食を左心室より還流・脱血した後、4%ホルムアルデヒドにて還流固定を行った。L6 脊髄を採取し、抗 c-Fos 抗体にて免疫染色を行った。脊髄後角を medial dorsal horn、lateral dorsal horn、dorsal commissure、sacral parasympathetic nucleus の4区域に分け、それぞれ c-Fos 陽性細胞数を2群間で比較検討した。

## **【結果】**

### コントロールベクターの膀胱生理機能への影響

膀胱内圧測定及びレジニフェラトキシン誘発疼痛行動観察いずれの実験においても、コントロールベクター注入群と生食注入群の間に統計学的有意差を認めなかった。

### 膀胱内圧測定

コントロール群において、レジニフェラトキシンの膀胱内還流により著明に排尿間隔は短縮した。Poreless TRPV1 群においてもレジニフェラトキシンにより排尿間隔は短縮したが、コントロール群に比し短縮率は統計学的に有意に軽度であった (55  $\pm$  3 % vs. 68  $\pm$  4 %,  $p = 0.03$ ) (Fig. 2)。その他の排尿機能に関しては、2群間で有意な差を認めなかった。

### GFP 陽性細胞の観察

ウイルスベクターの感染状態を評価するために、蛍光顕微鏡下に GFP の観察を行った。コントロール群の膀胱及び S1/L6 後根神経節において多数の GFP 発現細胞が確認された。一方、コントロール群の L4 後根神経節、及び無処置ラットの膀胱と S1/L6 後根神経節においては GFP 発現細胞を認めなかった (Fig. 3)。

### レジニフェラトキシン誘発疼痛行動

licking 行動の回数は、2群間で統計学的有意差を認めなかった (Fig. 4a)。しかしながら freezing 行動の回数は poreless TRPV1 群で有意に少なかった ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4b)。

### c-Fos 染色

コントロール群の dorsal commissure 及び sacral parasympathetic nucleus 区域における c-Fos 陽性細胞数は、poreless TRPV1 群に比し有意に多く観察された (24  $\pm$  3 及び 9  $\pm$  1 細胞/切片、7  $\pm$  2 及び 3  $\pm$  0.9 細胞/切片、それぞれ  $p < 0.05$ ) (Fig. 5)。

## **【結論】**

単純ヘルペスウイルスベクターを用いた poreless TRPV1 遺伝子治療により、レジ

ニフェラトキシン誘発の膀胱過活動や膀胱痛が抑制された。poreless TRPV1 遺伝子治療の間質性膀胱炎への臨床応用の可能性が示唆された。