

令和元年6月19日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10617

研究課題名(和文) ウサギで再現する長期透析後萎縮膀胱の腎移植後回復：再生医療への分子生物学的研究

研究課題名(英文) Molecular analysis in the functional recovery of hypocompliant defunctionalized bladder due to long-term dialysis using a rabbit model of urinary diversion

研究代表者

井上 高光 (Inoue, Takamitsu)

秋田大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60375243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：両側尿管を膣に植え替えて萎縮膀胱を作成し、次いで片側尿管を萎縮膀胱へ再吻合し機能回復を観察できた。膀胱容量、コンプライアンスの有意な低下および回復が確認できた。UPK1B, CST6, PIEZO2の遺伝子発現量の有意な減少は、ウサギ膀胱DNAマイクロアレイ、ウサギ萎縮膀胱粘膜RT-PCR、ヒト萎縮膀胱粘膜のRT-PCRで一致した。AGTR2の遺伝子発現量の有意な減少は、ウサギ膀胱回復時の筋層RT-PCRおよび回復時のウサギ筋層DNAマイクロアレイで一致した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は、長期透析や尿路変更に伴う廃用性萎縮膀胱の形成過程および尿流の回復過程において膀胱筋層および粘膜における遺伝子発現の変化を観察した初めての研究である。また廃用性萎縮膀胱とその回復における膀胱粘膜および筋層の形態的变化を観察することが出来た。これらの遺伝子発現の変化から、今後、神経因性膀胱などに伴う萎縮膀胱やその回復をモニターするバイオマーカーや膀胱再生医療につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The defunctionalized bladder was successfully developed after re-anastomosis of bilateral ureters to the vagina. The functional recovery of thee bladder was successfully observed after 2nd re-anastomosis of the unilateral ureter to the defunctionalized bladder. The significant downregulation of UPK1B, CST6, and PIEZO2 expression was observed among microarray in rabbit defunctionalized bladder, RT-PCR in rabbit defunctionalized bladder mucosa, and RT-PCR in human defunctionalized bladder mucosa. The significant downregulation of AGTR2 expression was observed among microarray in rabbit functionally recovered bladder and RT-PCR in rabbit functionally recovered bladder mucosa.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：膀胱 廃用性萎縮 回復 尿路変更 腎移植 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

長期透析による乏尿は透析期間に応じて膀胱容量を廃用性に減少させ、腎移植後に膀胱容量は回復する (Tanagho EA J Urol 111, 102-109, 1974, Inoue Transplantation 2011;92: 311-315)。また、長期透析によって腎移植レシピエントの膀胱は、容量だけでなく膀胱コンプライアンスも有意に悪化するが、腎移植施行後に尿量が回復し膀胱に尿が流入すると、膀胱コンプライアンスも正常範囲にまで回復する (Inoue et al. Int J Urol 23:694-700, 2016)。また小児における尿道や尿管狭窄に伴う高位の尿路変更や膀胱皮膚瘻においても、廃用性萎縮膀胱はしばしば認められる (Serrano DP J Urol 156, 1996)。我々は動物モデルを用いて萎縮膀胱モデルを作成し、上記現象の分子生物学的な背景を探った。

この廃用性萎縮膀胱の機能回復機構の排尿生理学的な検討は十分になされているが、分子生物学的な詳細なメカニズムは未だ研究されていない。また腎移植患者における廃用性萎縮膀胱において、正常膀胱とその分子生物学的機序機構を比較した研究は殆ど無い。

### 2. 研究の目的

本研究ではウサギを用いて両側尿管を膣に植え替えることで尿路変向術を行った。すべての尿を膣に流入させることで萎縮膀胱を作成しウロダイナミクス検査を用いてその機能を検証した。次いで片方の尿管を萎縮膀胱へ再吻合させることで、腎不全を防止しつつ膀胱全体での萎縮膀胱機能の回復を観察した。またこれらの膀胱を摘出し、ウサギマイクロアレイを用いて廃用性萎縮膀胱および尿流入による機能回復膀胱における遺伝子発現の網羅的解析を行い、RT-PCR を用いてこれを検証した。また当科で行っている腎移植におけるレシピエントの膀胱筋層および粘膜を用い、これを検証した。

### 3. 研究の方法

#### 動物

すべての動物実験は秋田大学動物実験センターの Internal ethical committee の承認を得て施行した。週齢 18 週から 26 週の日本白色種の雌ウサギを 1 匹ずつ飼育箱に入れ、通常食を与えて飼育した。ウロダイナミクスや手術では、ウサギを仰向けに固定台に固定し、ketamine (25 mg/kg body weight) で全身麻酔を行い、イソフルレンで麻酔維持した。安楽死は、イソフルレン麻酔下で pentobarbital 50-75mg/kg を術中に静注して行った。

#### ウロダイナミクス検査

ウサギ尿道に 6F の double lumen catheter を挿入した。ウサギ尿道は膣内にあり目視は困難でありブラインド操作で膀胱内にカテーテル挿入は困難であるため、開腹して膀胱を露出し、膀胱尿道を触知しつつカテーテルを尿道へ導いた。膀胱を空にした後、2mL/分の速度で、シリンジポンプで膀胱内に温生食を注入した。膀胱内圧を圧トランスデューサーで持続的に測定し、アンプで増幅してコンバータで変換し、コンピュータソフトで解析した。リークポイントの膀胱内圧 (cmH<sub>2</sub>O) と注入量 = 膀胱容量 (mL) を記録した。ついて膀胱内圧と膀胱容量から膀胱コンプライアンスを計算した。

#### 尿路変向術および尿管膀胱再吻合術

恥骨上を剃毛し、皮膚を約 4cm 切開、腹直筋を左右に分けて腹腔へ入った。ウロダイナミクス検査のあと、膀胱を尾側に牽引し、膀胱に入る両側の尿管および尿管を栄養する血管を同定した。尿管を栄養する血管は尿管膀胱接合部の再近傍で流入しており、この血管を温存して両側尿管を剪刀で切断した (Figure 1A)。膀胱側断端は 5-0 Prolene 縫合糸 (Ethicon, NJ) で結紮した。尿管断端を Spatulate し、先端に 5-0 Prolene をかけて膣壁に直径約 2-3mm の孔を開けて通し、約 1cm 遠位から糸を出して結紮し固定した (Figure 1B)。以後ウサギは膣より排尿 (もともと膣の途中に外尿

道口は開口)とした。

次いでウサギ膀胱が萎縮膀胱となったら、同様に恥骨上を剃毛し、皮膚を約 4cm 切開、腹直筋を左右に分けて腹腔へ入り、膀胱を触知しつつウロダイナミクス検査を行った。膀胱周囲を剥離し膀胱を露出させ、膣に吻合した両側尿管のうち 1 本を切断した。尿管断端を Spaturate し、先端に 5-0 Prolene をかけて膀胱頂部壁に外部から直径約 2-3mm の孔を開けて通し、約 1cm 遠位から糸を出して結紮し固定した(Figure 1C)。

次いで 6 週後に、同様に恥骨上を剃毛し、皮膚を約 4cm 切開、腹直筋を左右に分けて腹腔へ入り、膀胱を触知しつつウロダイナミクス検査を行った後、尿管を切断し、膀胱を膀胱頸部で膣との合流部まで追って切断し、膀胱を摘出した。摘出膀胱は写真、重量、大きさを計測の上、膀胱を半分に分けてホルマリンで処理し、膀胱粘膜および膀胱筋層を分けて液体窒素で凍結させ、また RNA later 内に -80 度で保存した。

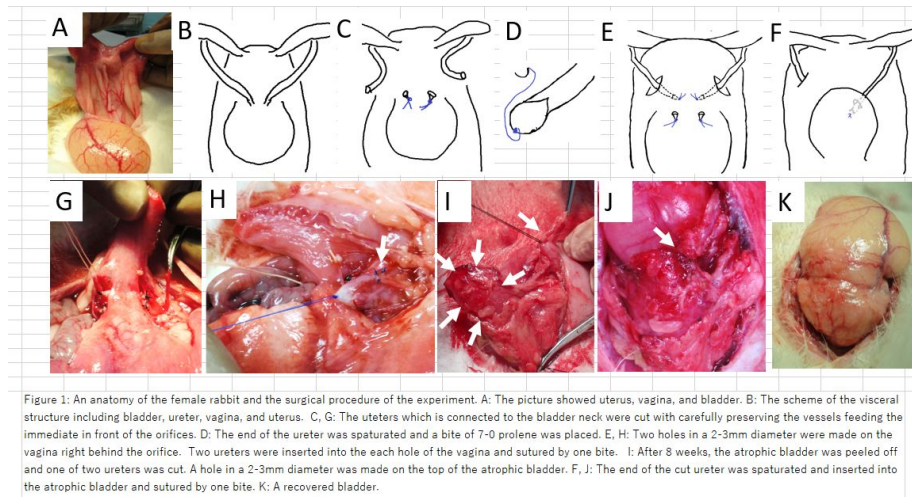


Figure 1: An anatomy of the female rabbit and the surgical procedure of the experiment. A: The picture showed uterus, vagina, and bladder. B: The scheme of the visceral structure including bladder, ureter, vagina, and uterus. C, G: The uteruses which is connected to the bladder neck were cut with carefully preserving the vessels feeding the immediate in front of the orifices. D: The end of the ureter was spatulated and a bite of 7-0 prolene was placed. E, H: Two holes in a 2-3mm diameter were made on the vagina right behind the orifice. Two ureters were inserted into the each hole of the vagina and sutured by one bite. I: After 8 weeks, the atrophic bladder was peeled off and one of two ureters was cut. A hole in a 2-3mm diameter was made on the top of the atrophic bladder. F, J: The end of the cut ureter was spatulated and inserted into the atrophic bladder and sutured by one bite. K: A recovered bladder.

## 患者および膀胱組織採取

2015 年 9 月から 2017 年 4 月までの期間に秋田大学附属病院で生体腎移植術を受けた 50 症例のうち、膀胱組織を採取できた 44 症例を対象とした。生体腎移植術中に、腎動脈および腎静脈を外腸骨動脈あるいは内腸骨動脈および外腸骨静脈に吻合した後、尿管膀胱吻合時に、患者膀胱筋層および粘膜から組織を採取した。

## 4. 研究成果

### ウサギ萎縮膀胱とその回復モデルの作成

ウサギを 3 群に分け、回復群(recovery group: n = 6)は 0W でウロダイナミクス検査後に両側尿管膣吻合術を行い、8 週後にウロダイナミクス検査後に膀胱周囲剥離し片方の尿管のみ尿管膀胱再吻合を行い、14 週後にウロダイナミクス検査後に膀胱周囲剥離し膀胱摘出を行った。萎縮群(defunctionalized group: n = 6)は 0W でウロダイナミクス検査後に両側尿管膣吻合術を行い、8 週後にウロダイナミクス検査後に膀胱周囲剥離のみを行い、14 週後にウロダイナミクス検査後に膀胱周囲剥離し膀胱摘出を行った。コントロール群(control group: n = 6)は 0W で皮膚切開(Sham operation)の上ウロダイナミクス検査を行い、8 週後に皮膚切開の上ウロダイナミクス検査を行い、14 週後に皮膚切開の上ウロダイナミクス検査を行った。

### 膀胱容量、膀胱内圧およびコンプライアンスの推移

回復群 6 例の膀胱容量の中央値は、8W で 0W に比較して有意に低下し(P = 0.002, Mann-Whitney U test)、14W で 8W に比較して有意に改善した(P = 0.026, Figure 2A)。膀胱コ

ンプライアンスの中央値は、8Wで0Wに比較して有意に低下し(P = 0.002)、14Wで8Wに比較して有意に改善した(P = 0.009, Figure 2B)。

回復群では対照群と比較して 8W 測定時の容量およびコンプライアンスが有意に低下し (p = 0.009 and p = 0.002, Figure 2C, 2D)、萎縮群と比較して 14W 測定時は有意に回復した(P = 0.026 and p = 0.002, Figure 2C, 2D)。萎縮群では対照群と比較して 14W 測定時のコンプライアンスと容量がそれぞれ有意に低下していた(P = 0.002, P = 0.002)。(Fig.2C, 2D)。

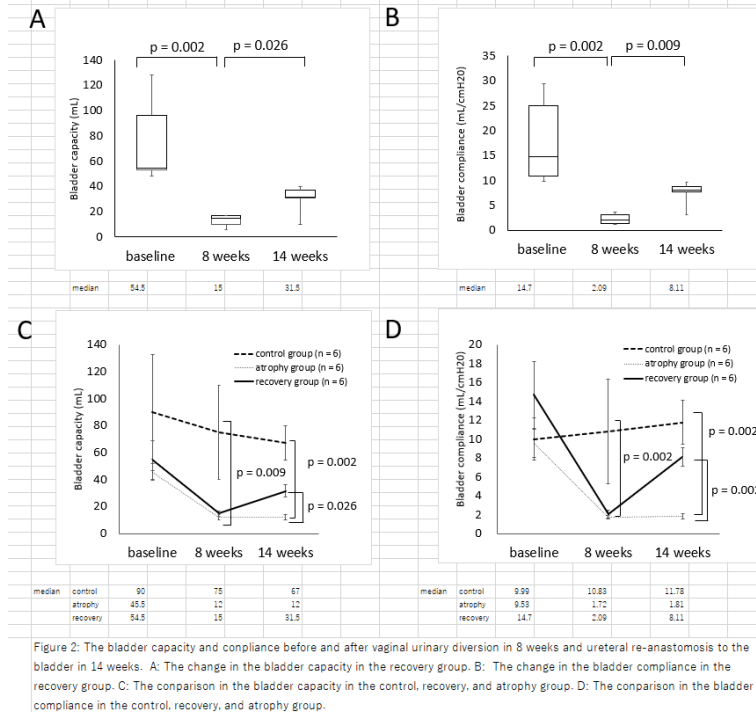


Figure 2: The bladder capacity and compliance before and after vaginal urinary diversion in 8 weeks and ureteral re-anastomosis to the bladder in 14 weeks. A: The change in the bladder capacity in the recovery group. B: The change in the bladder compliance in the recovery group. C: The comparison in the bladder capacity in the control, recovery, and atrophy group. D: The comparison in the bladder compliance in the control, recovery, and atrophy group.

### 膀胱の形態、重量、厚さ、弾性線維の定量

14 週後のコントロール群、膀胱萎縮群、萎縮膀胱回復群の膀胱の重量の比較では、平均値がそれぞれ 4.497g, 2.778g, 4.066g と萎縮膀胱群で膀胱重量が減少していた (Figure 3C)。膀胱組織の厚みの比較ではいずれの 2 群間にも有意差を認めなかった (Figure 3D)。

HC image を用いた膀胱膠原線維率の比較では、対照群 vs 萎縮群 (p=0.004)、萎縮群 vs 回復群 (p=0.025) で有意な線維組織の増生を認めた (Figure 3E)。筋層の占有率は 3 群で有意差を認めなかった (Figure 3F)。筋層に対する線維組織の率は、対照群 vs 萎縮群 (p=0.006)、萎縮群 vs 回復群 (p=0.010) で有意な線維組織の増生を認めた (Figure 3G)。

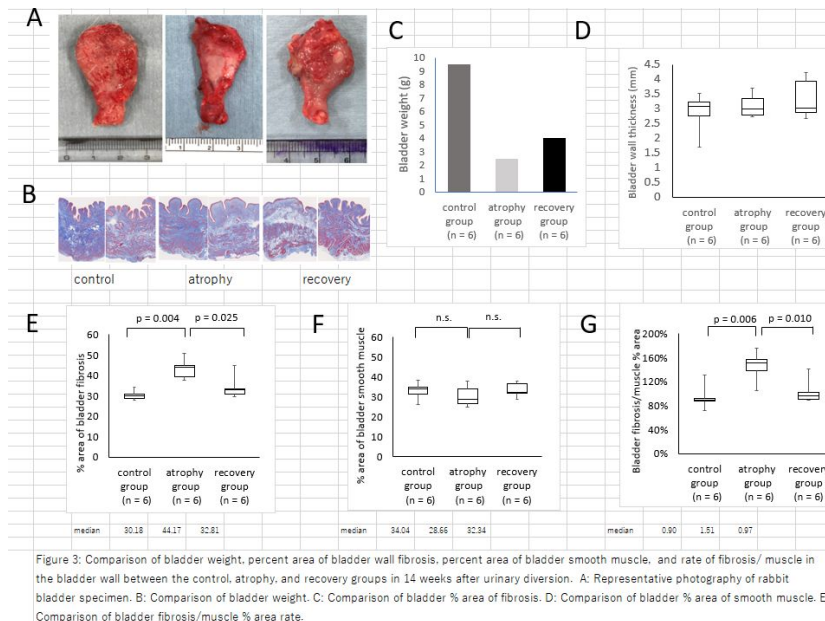


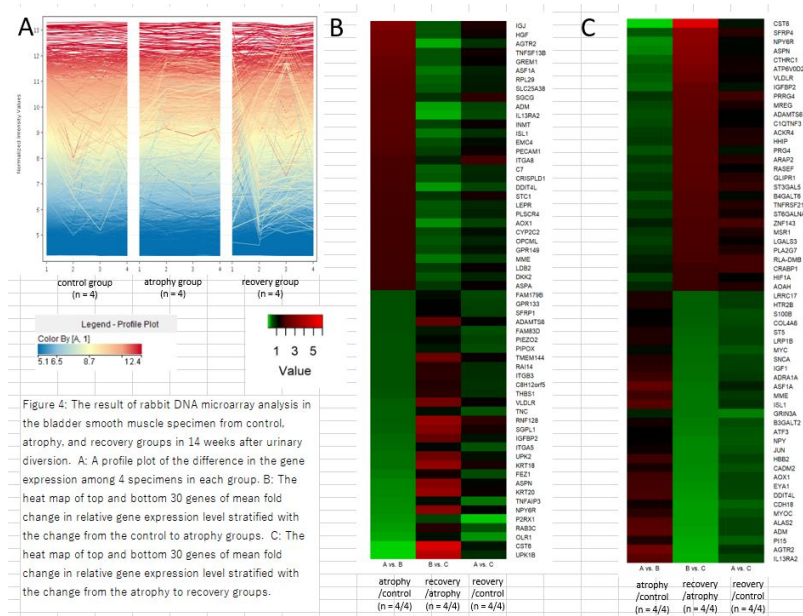
Figure 3: Comparison of bladder weight, percent area of bladder wall fibrosis, percent area of bladder smooth muscle, and rate of fibrosis/muscle in the bladder wall between the control, atrophy, and recovery groups in 14 weeks after urinary diversion. A: Representative photograph of rabbit bladder specimen. B: Comparison of bladder weight. C: Comparison of bladder % area of fibrosis. D: Comparison of bladder % area of smooth muscle. E: Comparison of bladder fibrosis/muscle % area rate.



## DNA マイクロアレイ

採取した膀胱組織のうち、各群 4 検体の筋層組織を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った (Affymetrix GeneChip™ Rabbit Gene 1.0 ST Array を使用)。解析ソフトウェア GeneChip® Command Console®および、データマイニングソフト Affymetrix® Transcriptome Analysis Console による発現差解析を行った。

コントロール群に比較して萎縮群で発現量が有意に増加した遺伝子および有意に減少した遺伝子のうち、名称と機能が知られている遺伝子の上位 30 個の、ヒートマップを記載した。これらの計 60 個の遺伝子のうち、膀胱萎縮時と膀胱回復時の両者で有意に遺伝子発現に変化を認め、その発現が萎縮時に upregulate し、回復時に downregulate したものは、AGTR2, ADM, AOX1 であり、萎縮時に downregulate し、回復時に upregulate したものは、CST6, ASPN, IGFBP2, VLDL であった (Figure 4B, 4C)。



## PT-PCR によるウサギ粘膜、筋層およびヒト粘膜、筋層の遺伝子発現の検証

ウサギ膀胱萎縮時の筋層 RT-PCR において、DNA マイクロアレイの結果と一致したのは、UPK1B および CST6 であった。ヒト萎縮膀胱筋層と正常膀胱筋層との RT-PCR の比較において、ウサギ筋層 DNA マイクロアレイの結果と有意に一致したのは、HGF, PECAM1, UPK1B, UPK2, CST6 であった。

ウサギ膀胱萎縮時の粘膜 RT-PCR において、ウサギ筋層 DNA マイクロアレイの結果と有意に一致したのは、HGF, PECAM1 であった。P2RX1 については、有意ではあるものの、粘膜では逆方向の結果となった。ヒト萎縮膀胱粘膜と正常膀胱粘膜との RT-PCR の比較において、ウサギ筋層 DNA マイクロアレイの結果と有意に一致したのは、UPK1B, CST6, PIEZO2 であった。UPK2 については、有意ではあるものの、粘膜では逆方向の結果となった。

ウサギ膀胱回復時の筋層 RT-PCR において、回復時のウサギ筋層 DNA マイクロアレイの結果と有意に一致したのは、AGTR2 であった。

また、萎縮群で線維組織の比率が上昇したことを受け、筋層間質に多く分布するコラーゲン 1 型、3 型の遺伝子である COL1A1, COL1A2, COL3A1 についても膀胱筋層組織を用いて RT-PCR を行った。ウサギ筋層 DNA マイクロアレイでは有意な変化は認めなかった。ウサギ膀胱萎縮時の筋層 RT-PCR について、COLA2 および COLA1 では、有意に発現が低下していた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

なし

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 喜早 祐介、井上 高光、西島 和俊、奈良 健平、神田 壮平、沼倉 一幸、鶴田 大、齋藤 満、成田 伸太郎、善積 克、佐藤 滋、羽淵 友則(2018)ウサギを用いた萎縮膀胱機能回復の分子生物学的検討、第106回日本泌尿器科学会総会、京都、4月
2. 喜早 祐介、井上 高光、西島 和俊、沼倉 一幸、鶴田 大、齋藤 満、成田 伸太郎、善積 克、佐藤 滋、河谷 正仁、羽淵 友則(2017)ウサギを用いた廃用性萎縮膀胱の機能回復モデルの作成、第24回日本排尿機能学会、9月、東京
3. 喜早 祐介、井上 高光、西島 和俊、奈良 健平、神田 壮平、沼倉 一幸、鶴田 大、齋藤 満、成田 伸太郎、善積 克、佐藤 滋、河谷 正仁、羽淵 友則(2017)ウサギを用いた長期透析萎縮膀胱の腎移植後回復モデルの作成、第14回泌尿器科再建再生研究会、6月、東京
4. 喜早 祐介、井上 高光、西島 和俊、奈良 健平、神田 壮平、沼倉 一幸、鶴田 大、齋藤 満、成田 伸太郎、善積 克、佐藤 滋、河谷 正仁、羽淵 友則(2018)ウサギを用いた長期透析における廃用性萎縮膀胱ととの機能回復における分子生物学的検討、第15回泌尿器科再建再生研究会、6月、神奈川

〔図書〕(計 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

なし

○取得状況(計 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名： 河谷 正仁 ローマ字氏名：Masahito Kawatani

所属研究機関名：秋田大学 部局：医学系研究科 職名：教授

研究者番号(8桁)：00177700

研究分担者氏名： 西島 和俊 ローマ字氏名：Kazutoshi Nishijima

所属研究機関名：秋田大学

部局名：バイオサイエンス教育・研究サポートセンター 職名：准教授

研究者番号(8桁)：70435874

研究分担者氏名：齋藤 満 ローマ字氏名：Mitsuru Saito

所属研究機関名：秋田大学 部局：医学部附属病院 職名：講師

研究者番号(8桁)：80400505

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：喜早 祐介 ローマ字氏名：Yusuke Kiso

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。