

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月19日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06638

研究課題名(和文) 排尿筋低活動の病態解明と求心性神経活動に着目した新規治療標的の探索

研究課題名(英文) Assessment of pathophysiology of detrusor underactivity and sequence of new targets of therapeutic agents

研究代表者

亀井 潤 (Kamei, Jun)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：80805622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの排尿筋低活動の病態仮説に基づいて、さまざまな手法を用いて排尿筋低活動モデルラットの作成を試みた。また、マウスにおける加齢モデルの下部尿路機能の変化を詳細に確認するために、雌雄の老齢マウスの膀胱機能を多角的に評価して、膀胱における遺伝子発現変化をcDNAマイクロアレイで評価した。病態や薬効の評価に耐えうる適度の障害を有する新規排尿筋低活動ラットモデルを安定して作成することが今回の研究では困難であったが、老齢マウスがヒトの膀胱機能の加齢性変化に似た変化を呈しており、膀胱における遺伝子発現は加齢に伴い大きく変わることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

さまざまなアプローチ法や条件検討を重ねた結果、病態や薬効評価に適した安定した新規排尿筋低活動モデルラットを作成することは困難であった。一方、今回の研究により、老齢マウスはヒトの膀胱機能の加齢性変化に似た障害を呈することと、膀胱における多数の遺伝子発現が変化していることが判明し、将来的に原因遺伝子の探索に本研究が役立ち、遺伝子改変動物を用いた検討に発展できる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We tried to establish new detrusor underactivity rat models based on the pathophysiological hypothesis of human detrusor underactivity. Furthermore, we investigated age-related changes in in vitro and in vivo functions and gene expression of the bladder of male and female mice. We evaluated three types of new detrusor underactivity rat models with cystometry or frequency/volume measurements, and found it was very difficult to establish new models of rats with moderate detrusor underactivity with higher reproducibility. In contrast, we found aged mice demonstrated voiding and storage dysfunctions resembling to detrusor hyperactivity with impaired contractility (DHIC), which were more pronounced in male mice. Genomic changes associated with aging may contribute to the age-related bladder functional deterioration in mice.

研究分野：医歯薬学

キーワード：排尿機能学 加齢医学 排尿筋低活動

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

1. 研究開始当初の背景

高齢人口の増加に伴い、膀胱機能障害の有病率は増加している。排尿筋低活動による尿排出障害は、加齢とともに増加する代表的な膀胱機能障害であり、生活の質を低下させる大きな原因になる。しかし、その病態は未解明の点が多く、有効な治療法もなく、また、治療標的薬剤の効果判定に適した軽度～中等度の排尿筋低活動を呈する病態モデル動物も確立されていなかった。

これまでに我々は老齢ラット月齢(25 - 28 か月)では若齢ラット(6 か月)と比べて、排尿筋低活動を呈することを報告した。しかし、本モデルは作成に時間を要するため、より簡便に作成可能な病態モデル動物や遺伝子改変動物への応用が可能な動物種での検討が必要と考えたことから、研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、排尿筋低活動の病態を解明し、新規治療標的の候補を探索することを目的として、まず、比較的簡便に作成可能でかつ薬効評価に適した重症度を有する新規排尿筋低活動モデルラットを確立することを目指した。また、同時に加齢モデル動物が排尿筋低活動を呈することを利用して、将来的に遺伝子改変動物を用いた加齢モデル動物を作成することを目指して、老齢マウスの下部尿路機能の変化について、多角的かつ詳細な評価を行った。

3. 研究の方法

(1) 新規排尿筋低活動モデルラットの確立

ヒト排尿筋低活動の想定される病態生理として、膀胱を支配する末梢神経の障害、膀胱の過伸展および虚血再灌流障害、膀胱の慢性虚血などが挙げられていることから、これらの病因仮説に着目した病態モデル動物として、骨盤神経障害、膀胱過伸展、両側内腸骨動脈結紮による病態モデルラットを作成した。具体的には、骨盤神経障害モデルは、麻酔下で両側の骨盤神経を剥離して、絹糸で定量的な負荷を一定時間かけて障害を与えることで作成した。また、膀胱過伸展モデルは、麻酔下で経尿道的にカテーテルを挿入して、膀胱内圧を測定しながら膀胱に生理食塩水を注入し、一定の膀胱内圧を維持するように拡張し、その後膀胱内を空にすることで排尿筋の過伸展と膀胱の虚血および虚血再灌流障害を誘発した。内腸骨動脈結紮モデルは、麻酔下で両側の内腸骨動脈を剥離・結紮することで、膀胱血流障害を引き起こすことで作成した。

これらのモデル動物を用いて膀胱内圧測定または24時間排尿行動測定を行い、排尿筋低活動モデルとしての妥当性を検証した。

(2) 老齢マウスの膀胱機能評価とその原因遺伝子の探索

成熟群(12 か月齢)および老齢群(27-30 か月齢)の雌雄 C57BL/6 マウスを用いて、加齢に伴う *in vitro* および *in vivo* の膀胱機能変化および膀胱の遺伝子発現変化を評価した。具体的には、*in vitro* の検討としては膀胱平滑筋線条の収縮反応および弛緩反応実験、膀胱のムスカリン、ATP、受容体の mRNA の発現量を比較し、*in vivo* の検討 24 時間排尿行動測定、膀胱内圧測定を行った。さらに、cDNA マイクロアレイを行い、加齢に伴い膀胱で発現が変化する遺伝子を網羅的に解析した。

4. 研究成果

(1) 新規排尿筋低活動モデルラットの確立

骨盤神経障害モデル動物として、両側の骨盤神経を 5g 重の重さで 1 分間および 5 分間牽引したモデル動物を作成した。骨盤神経の剥離のみを行った群を偽手術群として、5 日後に覚醒下の膀胱内圧測定を行った。1 分間の骨盤神経牽引では障害が極めて軽微であり、5 分間の牽引で 1 分間の骨盤神経牽引より重度の障害がみられたため、偽手術群と 5g 重 5 分間の両側骨盤神経牽引による骨盤神経障害モデルを作成して、比較検討を行った。

図 1 に示すように、各パラメータの平均

値を比較すると、骨盤神経障害群の方が残尿量・膀胱容量が増加し、平均尿流量、排尿効率が低下する傾向がみられたものの、偽手術群と比較して統計学的に有意な差が見られたのは、非排尿収縮の振幅のみであった。詳細に個々の個体のデータを確認すると、今回作成した骨盤神経障害モデルは手技が安定した後も障害の程度に個体間のばらつきが非常に大きいことが判明した。以上のことから、このモデルは排尿筋低活動を起こしうると考えられたが、病態や薬効評価を今後行うに当たっては適切とは言い難いと判断した。

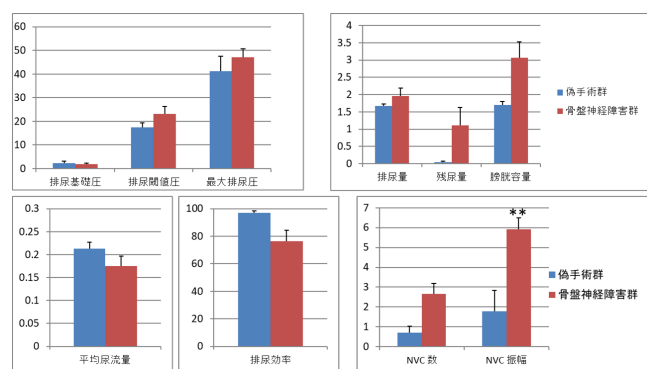


図1. 骨盤神経障害モデルと偽手術群のモデル作成5日後膀胱内圧測定結果
偽手術群 n = 5, 骨盤神経障害群 n = 14 ** p < 0.01 (un-paired t test)

膀胱過伸展モデルでは、30 分間膀胱内圧を 80-100cmH₂O に保った群を膀胱過伸展群、経尿道的にカテーテルを挿入しただけで、膀胱を進展させなかったものを偽手術群として、モデル作成 5 日後に覚醒下の膀胱内圧測定を行った。

本モデルは、先の骨盤神経障害モデルラットと比較すると、個体間のばらつきは少なかったが、図 2 に示した通り、排尿効率や残尿量がほとんど変化せず、個体数を増やしても更なる検討を行っても、統計学的に有意な障害を生じさせることが期待が難しかった。少なくとも、本モデルが将来的に病態や薬効評価に適したモデルとは考えにくいと判断し、本モデルの追及を断念した。

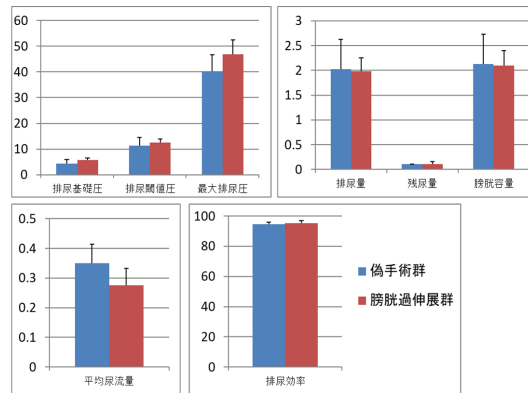


図2. 膀胱過伸展モデルと偽手術群のモデル作成5日後膀胱内圧測定結果
偽手術群 n = 4 骨盤神経障害群 n = 5, 統計的有意差なし (unpaired t test)

内腸骨動脈結紮モデルでは、モデル作成前、作成後 7 日、14 日、21 日、28 日の時点で 24 時間排尿行動測定を行い、排尿行動の経時的変化を評価して、28 日後の排尿行動測定が終了した後に膀胱内圧測定を行った (偽手術群 6 匹、内腸骨動脈結紮群 5 匹)。しかし、内腸骨動脈結紮群は、排尿行動測定でいずれの時点でもモデル作成前および偽手術群と比較して有意な排尿行動の変化を示さず、4 週後の膀胱内圧測定でも偽手術群と比較して膀胱機能に差が見られなかった。したがって、本モデルも排尿筋低活動モデル動物としては適さないと考えられた。

(2) 老齢マウスの膀胱機能評価とその原因遺伝子の探索

覚醒下の膀胱内圧測定では、雌雄ともに老齢群では有意な平均尿流率の低下と非排尿性膀胱収縮 (NVCs) の増加を認め、加えて雄では最大排尿圧・1 回排尿量・膀胱容量の有意な減少を認めた (図 3)。また図 4 に示すように、雌雄ともに老齢群では、膀胱平滑筋の収縮反応および弛緩反応がいずれも有意に減弱しており、その程度は雄でより顕著であった。

老齢群での mRNA 発現は、雄では M3 と P2X1 受容体が、雌では 2 受容体がそれぞれ有意に低下していた。cDNA マイクロアレイでは、加齢に伴い多くの遺伝子に発現変化が認められ、雌に比べ雄の方が遺伝子発現の加齢性変化は顕著であった。

以上の結果から、27 か月齢以上の老齢マウスは蓄尿機能障害と排尿機能障害を同時に認めており、その変化は雄でより顕著であること、さらにさらに膀胱における遺伝子発現の変化が下部尿路機能障害の加齢性変化に寄与している可能性があることを示した。

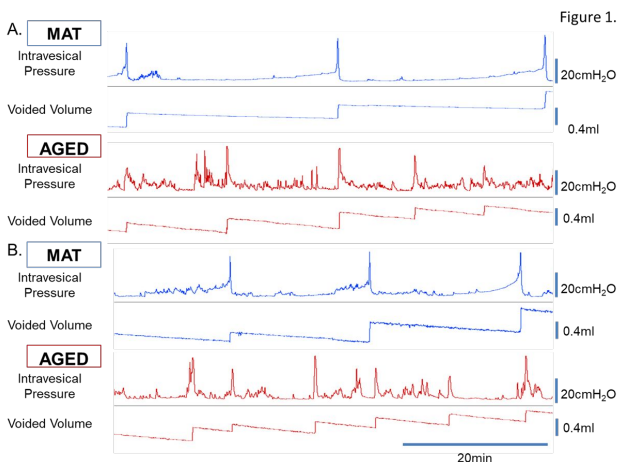


図3. 老齢群と成熟群の覚醒下膀胱内圧測定における、代表チャート

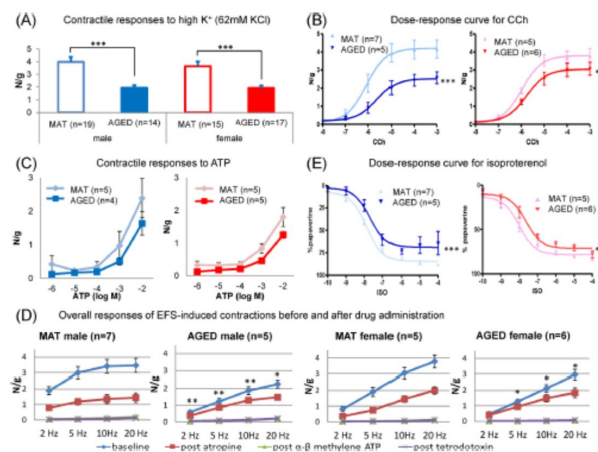


図4. 老齢群と成熟群の in vitro organ bath study における、膀胱排尿筋の収縮反応と弛緩反応

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Kamei J, Ito H, Aizawa N, Hotta H, Kojima T, Fujita Y, Ito M, Homma Y, Igawa Y. Age-related changes in function and gene expression of the male and female mouse bladder. Scientific Reports. 8(1):2089. 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-20406-0. 査読あり

亀井潤、井川靖彦 高齢者における下部尿路症状の疫学 Modern Physician 37: 1241-1243, 2017. 査読なし

〔学会発表〕(計 1 件)

亀井潤、伊藤悠城、相澤直樹、井川靖彦 加齢と下部尿路機能 第 26 回日本排尿機能学会
2019/9/13, 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

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。