

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09675

研究課題名(和文) NOS uncouplingを標的とした新規過活動膀胱治療薬開発にむけた基礎研究

研究課題名(英文) Endothelial nitric oxide synthase uncoupling cause lower urinary tract dysfunction associated with pelvic arterial occlusion

研究代表者

赤井畑 秀則 (Akaihata, Hidenori)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70644178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：16週齢SD系雄性ラットを正常群・慢性膀胱虚血ラットモデル(CBI)群・CBI/BH4群(CBIモデルにBH4を経口投与)の3群に分け、CBIモデル膀胱のBH4合成経路とBH4投与によるCBIモデルの下部尿路機能・BH4合成経路変化を評価した。その結果、CBI群ではBH4合成再生経路が亢進していた。また、BH4投与によるCBIモデルの動脈壁肥厚予防・酸化ストレス低減・下部尿路機能障害予防を認めた。本研究より、BH4投与がeNOS uncouplingを回避できるため、慢性虚血に伴う下部尿路機能障害への新規予防薬になりうると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過活動膀胱の原疾患は多岐にわたるが、現在は病態を無視した対症療法が行われている。今後、病態に即した治療を行うことが求められる。一方、酸化ストレス増加の要因として血管内皮における内皮型NOSアンカップリングが注目されている。eNOSの補酵素であるBH4が不足すると、eNOSによるNO合成が減少し、活性酸素の産生が増加する。この現象が内皮型NOSアンカップリングと呼ばれ、その増加した活性酸素は血管内皮を障害し動脈硬化を促進させる。今回、動脈硬化に起因する慢性虚血が引き起こす過活動膀胱と内皮型NOSアンカップリングの関連性を評価し、慢性虚血による過活動膀胱の発症機序に即した新規予防薬を探索した。

研究成果の概要(英文)：This study divided male Sprague-Dawley rats into Control, chronic bladder ischemia (CBI) and CBI with oral BH4 supplementation (CBI/BH4) groups. In the CBI group, bladder capacity and bladder muscle strip contractility were lower, and arterial wall was thicker than in Controls. The improvements were seen in bladder capacity, muscle strip contractility and arterial wall thickening in the CBI/BH4 group as compared with the CBI group. Western blot analysis of bladder showed expressions of eNOS, HIF-1 and DHFR, which could regenerate BH4, were higher in the CBI group than in Controls. In the CBI/BH4 group, HIF-1 and DHFR expressions were decreased compared with the CBI group. Our results suggest that chronic ischemia increases eNOS and DHFR in the bladder to prevent atherosclerosis progression. However, DHFR could not synthesize sufficient BH4 relative to the increased eNOS, resulting in LUTD. BH4 supplementation protects lower urinary tract function by promoting eNOS activity.

研究分野：下部尿路機能障害

キーワード：慢性膀胱虚血 下部尿路機能障害

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

過活動膀胱の罹患率に男女差はなく、男女共通の要因について検討された。その結果、生活習慣病の中でも特に動脈硬化症が過活動膀胱の重要な病因の一つであると分かってきた。私達はこれまで、動脈硬化による慢性虚血が酸化ストレスを増加させ膀胱組織障害を引き起こすことが、過活動膀胱の重要な病因であることを証明してきた。しかし、その詳細な発症機序は分かっていない。一方、酸化ストレス増加の要因として血管内皮における内皮型 NOS アンカッピングが注目されている。内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) の補酵素であるテトラヒドロピオプテリン (BH4) が不足すると、eNOS による NO 合成が減少し、活性酸素の産生が増加する。この現象が内皮型 NOS アンカッピングと呼ばれ、その増加した活性酸素は血管内皮を障害し動脈硬化を促進させている。

### 2. 研究の目的

本研究では、慢性膀胱虚血ラットモデルを用いて、慢性虚血が膀胱内 BH4 合成経路・内皮型 NOS アンカッピングに与える影響と、BH4 経口投与がラットモデルの下部尿路機能に及ぼす変化を評価する。そこから内皮型 NOS アンカッピングの慢性虚血による過活動膀胱発症における役割、内皮型 NOS アンカッピング回避の新規治療薬、過活動膀胱新規診断マーカーを探索する。

### 3. 研究の方法

#### 研究 1: ラットモデルを用いた、虚血による膀胱内内皮型 NOS アンカッピングの評価

16 週齢 Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラットにバルーンによる総腸骨動脈内皮傷害と 8 週間の高脂肪食飼育を施して動脈硬化を発生させ、膀胱を慢性虚血とする。この慢性膀胱虚血ラットモデル (CBI) 群の膀胱と、無処置・通常食の正常群の膀胱を摘出し、RNA 増幅バイアス回避のために独自開発した DNA マイクロアレイを用い、膀胱の BH4 合成経路・内皮型 NOS アンカッピングに関わる酵素 (DHFR, SR, GCH-1 など) の遺伝子発現を解析する。そこから、慢性虚血膀胱における BH4 合成経路の変化・内皮型 NOS アンカッピング発生について検討する。

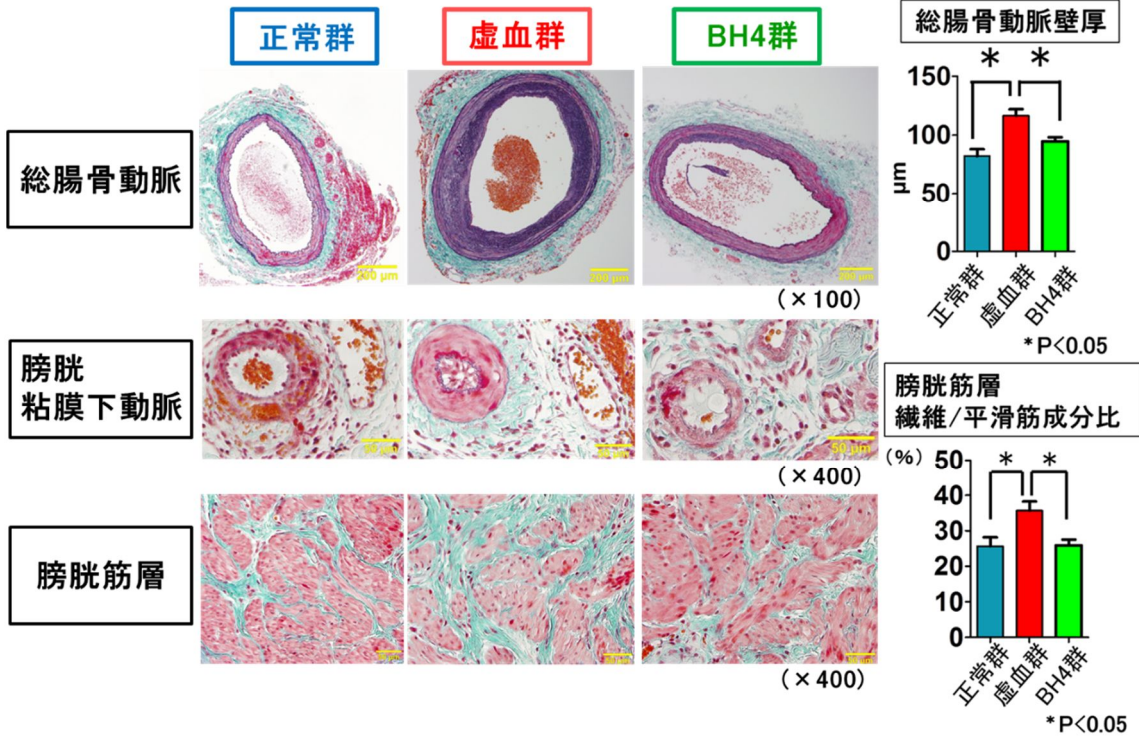
#### 研究 2: BH4 経口投与の内皮型 NOS アンカッピング発生への影響と、新規治療戦略の可能性

16 週齢 SD 系雄性ラットを、正常群、慢性膀胱虚血ラットモデル群 (CBI 群)、ラットモデルに BH4 を 1 日 1 回連日経口予防投与 (10mg/kg/日) した慢性膀胱虚血・BH4 投与群 (CBI/BH4 群) の 3 群に分け、24 週齢で各群に膀胱内圧測定を施行し下部尿路機能の評価する。その後、膀胱・総腸骨動脈を摘出し、等尺性張力実験による膀胱平滑筋収縮力測定・ウエスタンブロットによる膀胱の BH4 合成新生経路・再生経路に関与する酵素である DHFR や SR, GCH-1 などの蛋白発現と酸化ストレスマーカー (HIF1a 等) の発現評価、総腸骨動脈壁厚測定を行う。その比較から、BH4 経口投与が慢性虚血膀胱の内皮型 NOS アンカッピング発生に与える影響や、BH4 経口投与の新規予防薬としての可能性を検討する。

### 4. 研究成果

CBI 群では再生経路のジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 発現が亢進したが、新生経路関連酵素に有意差はなかった。CBI 群は他 2 群より、膀胱内圧測定では有意に膀胱容量が減少し (CBI 群 vs 正常群, CBI/BH4 群:  $P < 0.01$ ,  $P = 0.011$ )、等尺性張力実験では膀胱平滑筋条片の収縮反応が有意に低下した。また、CBI 群は他群と比べ有意な総腸骨動脈壁厚を示した (CBI 群 vs 正常群, CBI/BH4 群:  $P < 0.01$ ,  $P = 0.014$ )。ウエスタンブロットでは DHFR と HIF1 (酸化ストレスマーカー) 発現が CBI 群では他群より有意に亢進し (DHFR; CBI 群 vs 正常群, CBI/BH4 群:  $P < 0.01$ ,  $P = 0.018$ , HIF1 ; CBI 群 vs 正常群, CBI/BH4 群:  $P < 0.01$ ,  $P = 0.012$ )。新生経路の酵素は 3 群で有意差はなかった。CBI モデルの DHFR 発現亢進と、BH4 投与による CBI モデルの動脈壁厚予防・酸化ストレス低減・下部尿路機能保護を認めた。結果より、血流障害に対して膀胱では酸化ストレス低減目的に BH4 合成再生経路が活性化するも代償できずに障害される可能性と、十分量の BH4 が慢性虚血に伴う下部尿路機能障害への新規予防薬となる可能性が示唆された。

**【結果：慢性虚血による組織障害の予防効果】**



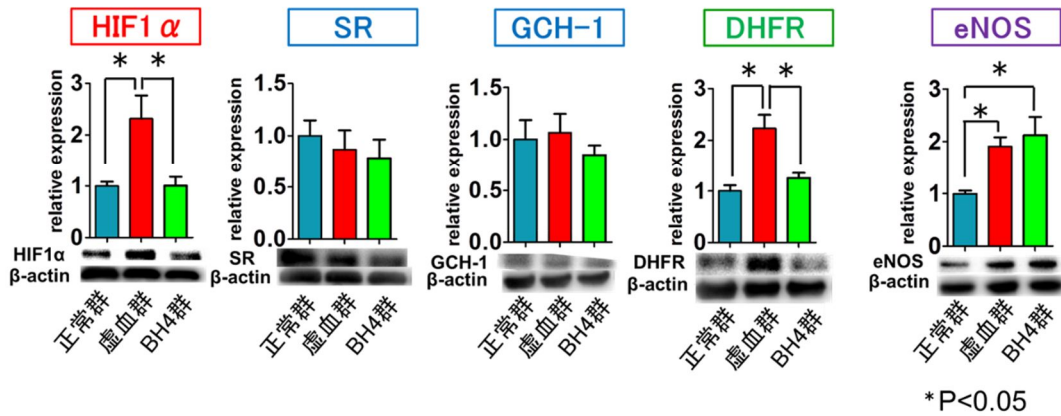
**【摘出膀胱を用いた蛋白発現分析】**

**【酸化ストレスマーカー】**

**【BH4合成新生経路】**

**【BH4合成再生経路】**

**【NO合成経路】**



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	秦 淳也  (Hata Junya)  (00769606)	福島県立医科大学・医学部・助教   (21601)	
研究分担者	小島 祥敬  (Kojima Yoshiyuki)  (60305539)	福島県立医科大学・医学部・教授   (21601)	
研究分担者	石橋 啓  (Ishibasshi Kei)  (90347211)	福島県立医科大学・医学部・博士研究員   (21601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関