

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591875

研究課題名（和文） 膀胱蓄尿機能障害に対する新規治療戦略の探索

研究課題名（英文） Study on new treatment strategy for bladder storage dysfunction

研究代表者

井川 靖彦（IGAWA YASUHIKO）

東京大学・医学部附属病院・特任教授

研究者番号：40159588

研究成果の概要（和文）：ラットを用いた電気生理学的解析の結果， beta3-AR作動薬および L-arginine/Nitric oxide系の活性化は，膀胱伸展刺激を受容する求心性神経活動および，それぞれ，PGE₂，acroleinの膀胱内注入によって誘発された求心性神経活動の亢進を抑制する作用があることを明らかにした．ヒト羊膜から間葉系幹細胞を分離培養し，ヌードマウス膀胱の凍結障害部に移植したところ，これらの細胞は障害部に生着し，平滑筋細胞に分化し，障害部平滑筋の再生・修復を促進しうることが確認できた．潰瘍型間質性膀胱炎において，膀胱尿路上皮および尿中にCXCL10は増加しており，バイオマーカーとして有望であることが示唆された．

研究成果の概要（英文）：Electrophysiological investigation in the rat revealed that beta3-AR agonists and activation of L-arginine/NO inhibit mechanosensitive afferent nerve activities primarily originating from the bladder in response to bladder distension as well as increased afferent nerve activities induced by intravesical instillation of PGE₂ and acrolein, respectively. Freeze-injured mouse bladders implanted with human amniotic mesenchymal cells recovered morphology and function faster than control-injected bladders. CXCL10 in the bladder urothelium and urine increased in ulcer type interstitial cystitis, suggesting its possible use as a biomarker.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：排尿学

1. 研究開始当初の背景

過活動膀胱は，尿意切迫感，頻尿，切迫性尿失禁を主症状とする代表的な膀胱蓄尿機能障害で，極めて頻度が高く，加齢とともにその罹病率はさらに

増加し，高齢化社会が進むわが国においてはこの病態の解明と治療法の確立は急務と考える．過活動膀胱に対して，今日まで抗ムスカリン薬による薬物療法が行われてきたが，口内乾燥・便秘，排尿困難，尿閉等の

副作用があり、治療に反応しない難治性患者も約30%と少なくない。また、保存的治療に反応しない高度の膀胱蓄尿機能障害に対しては、今日、腸管を利用した膀胱拡大術が標準的な治療として行われているが、手術侵襲が大きいことに加えて、結石形成、代謝性アシドーシス、膀胱破裂、悪性腫瘍の発生などの合併症もあり、必ずしも一般的な治療として普及するに至っていない。このような背景から、膀胱蓄尿機能障害に対してより侵襲が少なく、効果的な治療法を開発することが強く望まれている。

最近の研究では、尿路上皮は膀胱の充満に伴う伸展刺激や酸などの化学的刺激に対して、ATP、アセチルコリンなどの伝達物質を遊離し、これらの伝達物質が、尿路上皮下に存在する求心性神経や間質細胞に作用することによって、膀胱尿路上皮・求心性神経伝達系を形成し、膀胱知覚伝達に重要な役割を演じていることが判ってきた^{1),2)}。また、膀胱充満時の膀胱痛と主症状とする難治性蓄尿機能障害である間質性膀胱炎は、未だその病態生理が不明なところが多く、治療法も確立されていないが、過活動膀胱と同様に、膀胱尿路上皮・求心性神経伝達系がその病因の首座を占め、治療の標的となりうることが想定されている。

今回の研究では、研究協力者であるAntwerp大学Wyndaele教授の研究室が開発した、膀胱求心性神経活動を単一神経単位で測定するラットモデル³⁾を導入し、主にP2X3 プリン受容体、ベータ・アドレナリン受容体、TRPV1 受容体などの膀胱求心性神経活動に対する機能特性を電気生理学的に解析する。

膀胱再生・再建の研究は、再生の足場となる吸収性素材からなるスカフォードの開発・改良、再生促進因子の研究、SIS (小腸粘膜下組織) の応用など、様々な角度から研究が進められている。我々は、ヒト羊膜が免疫学的に寛容で、多分化能を有しており、倫理的観点からも比較的入手が容易であるなどの特長に着目し、ヒト羊膜を用いた膀胱再生・再建法の開発を目指して研究してきた。今回の研究では、ヒト羊膜から分離培養した間葉系幹細胞が、膀胱再生・再建に応用可能な否かを検討する。

間質性膀胱炎 (IC) は、その病因や病態生理が明らかになっていない難治性の膀胱蓄尿機能障害を示す疾患で、内視鏡所見から潰瘍型と非潰瘍型に分類され、この両型は、発症時期、膀胱容量、治療に対する反応性など臨床像も異にする特徴がある。これまで、ICの診断または治療効果判定のためのバイオマーカーとして数多くの物質が提案されてきたが、未だ有用性が明らかとされたものはない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、第一に、膀胱の尿路上皮・求心性神経伝達系に対する各種薬物の作用機序の詳細を解明するため、膀胱からの求心性神経活動を単一神経単位 (single unit) で直接測定するラットモデルを用いて、これまでの研究で尿路上皮・求心性神経伝達系への作用が示唆されている各種薬物を膀胱内または全身投与し、A・神経線維とC神経線維のそれぞれの神経活動に対する直接効果を検証することによって、膀胱蓄尿障害に対する新たな薬物療法の標的を探索することであった。第二に、ヒト羊膜を用いた膀胱再建再生法の開発を目的として、ヒト羊膜由来の細胞を分離培養し、ラットの膀胱凍結障害モデルや放射線性膀胱炎モデルの膀胱に注入し、膀胱再生効果があるか否かを検証することであった。第三に、潰瘍型間質性膀胱炎の診断に有用に有用な膀胱組織中および尿中マーカーを探索することであった。

3. 研究の方法

(1) 膀胱尿路上皮・求心性神経伝達系の電気生理学的解析

①膀胱内圧・求心性神経活動同時測定ラットモデルでの検討

膀胱内圧 (CMG) および膀胱からの求心性神経活動 (AA) を同時測定できるラットモデルを用いて、これまでの研究成果から膀胱尿路上皮・求心性神経伝達系に作用することが予想される薬物を膀胱内または経静脈的に

投与し、その CMG および AA に及ぼす効果を解析した。

(2) ヒト羊膜由来細胞を用いた膀胱機能再生・再建法の開発

① ヒト羊膜由来細胞の分離培養とその特性解析

ヒト羊膜から多分化能を有する間葉系幹細胞を分離培養し、その特性を免疫組織化学的に解析した。

② ラット膀胱凍結障害モデルでのヒト羊膜由来細胞移植の膀胱再生・再建効果の検討

①で得られたヒト羊膜由来間葉系幹細胞(HAMC)を、ヌードマウスの膀胱凍結障害モデルの障害部に注入し、生着するか否か、および再生促進効果を有するか否かを検討した。

(3) 間質性膀胱炎のバイオマーカー探索

① 膀胱尿路上皮 DNA

潰瘍型 IC 患者および対照群として膀胱癌患者から内視鏡下に膀胱尿路上皮を生検鉗子にて採取し、DNA microarray 解析法を用いて、網羅的にその遺伝子発現の違いを検討した。

② ①で得られた解析結果から、潰瘍型 IC 患者の膀胱尿路上皮中に発現が増加していると考えられる物質について、潰瘍型と非潰瘍型の間質性膀胱炎患者の膀胱尿路上皮中の蛋白レベルでの発現および尿中濃度を、それぞれ、免疫組織学的手法と ELISA 法にて検討した。同物質の尿中濃度は尿中クレアチニン値で補正し、両群間で比較検討した。

4. 研究成果

(1) 膀胱尿路上皮・求心性神経伝達系の電気生理学的解析

平成 20 年度に、膀胱内圧・膀胱求心性神経単一神経活動 (SAA) 同時測定ラットモデルを確立した。同モデルを用いて、膀胱尿路上皮・求心性神経伝達系における電気生理学的検討を行った結果、以下の成果を得た。

① ATP を膀胱内に投与すると、mechanosensitive C 線維の活動が促進されたが、A・線維の活動には変化がなかった。一方、mechanosensitive C 線維は、膀胱内にカプサイシンを投与した場合に反応(活動亢進)するか否かによってカプサイシン感受性と非感受性の2種類に分類できた。ATP 膀胱内投与によって活動促進される mechanosensitive C 線維は、カプサイシン膀胱内投与には反応せず、RTX を膀胱内に投与して脱感作状態にしても ATP 膀胱内投与によって誘発される活動促進は抑制されなかった。以上の結果から、膀胱内に ATP を直接注入して誘発される排尿筋過活動には、カプサイシン非感受性 C 線維の活動亢進が関与することが判明した[学会発表 1, 雑誌論文 6]。

② 選択的 beta3-AR 作動薬である CL316, 243 (CL) の静脈内投与は膀胱の伸展刺激に反応する一次求心性神経のうち、膀胱伸展刺激によって惹起される A・線維の活動を抑制したが、C 線維のそれは抑制しなかった。一方、膀胱内にプロスタグランジン (PG) E2 を注入すると、C 線維のみ活動が亢進するが、この PGE2 によって促進される C 線維活動を、CL の静脈内投与は抑制しうることが判明した[学会発表 2, 11, 20, 雑誌論文 2, 3, 11]。

③ 脊髄損傷ラットにおいては、SAA は膀胱の micromotion に呼応して促進される 2 つのタイプ (accelerated と non-accelerated) が存在し、accelerated タイプは、神経伝達速度に関係なく慢性脊髄損傷ラットにおいてその頻度が高いことが判明した[雑誌発表 1]。

④ nitric oxide (NO) の基質である L-arginine の静脈内投与は A δ および C 線維の両者の活動性を抑制した。NOS 阻害薬の L-NAME の膀胱内投与は両線維の神経活動性を促進したが、この L-NAME による活動性亢

進は、L-arginine の静脈内前投与によって抑制された。さらに、L-arginine の静脈内前投与は、acrolein 膀胱内投与によって促進される両線維の神経活動も抑制した。以上の結果は、L-arginine/NO 系は、膀胱伸展刺激を受容する膀胱求心性神経を抑制し、さらに、acrolein 誘発膀胱炎に伴う求心性神経活動の亢進も抑制する作用があることが判明した[雑誌論文 4].

⑤ 卵巣摘出によるエストロゲン欠乏は、膀胱伸展刺激受容求心性神経のうち、C 線維の活動性を低下させたが、A δ 線維の活動には影響を与えなかった。高齢ラットは血中エストロゲンレベルは低下していたが、頻尿と求心性神経活動の亢進を認めた。したがって、エストロゲン欠乏は、高齢ラットに認められる頻尿と求心性活動の亢進の主な原因とは考えにくいことが示唆された[学会発表 5, 雑誌論文 5].

(2) ヒト羊膜由来細胞を用いた膀胱機能再生・再建法の開発

ヒト羊膜から間葉系幹細胞を分離培養し、ラット膀胱の健常部と凍結障害部に移植したところ、凍結障害部においてのみ、移植細胞が生着し、平滑筋様の細胞に分化しうることを確認した。ヒト羊膜から間葉系幹細胞(HAMC)を分離培養し、ヌードマウス膀胱の凍結障害部に移植したところ、凍結障害部において移植した HAMC 細胞が生着し、平滑筋細胞に分化し、障害部平滑筋の再生・修復を促進しうること、ならびに機能的にも膀胱平滑筋の収縮機能回復を促進することが確認できた[学会発表 12, 雑誌論文 9].

(3) 間質性膀胱炎のバイオマーカーの探索

① DNA microarray 解析の結果、潰瘍型 IC 患者の膀胱尿路上皮においては、CXCR3 binding chemokine と TNFSF14 が過剰発現しており、これらをバイオマーカーとして利用できる可能性があ

ることが示唆された[雑誌論文 8].

② ①の検討で、潰瘍型 IC 患者の膀胱尿路上皮中に過剰発現が示唆された CXCR3 binding chemokine のうち、CXCL10 について、潰瘍型と非潰瘍型の IC 患者の膀胱尿路上皮中の蛋白レベルでの発現量および尿中濃度を検討したところ、潰瘍型 IC 患者では、非潰瘍型 IC 患者と比べて、膀胱尿路上皮内および尿中の両方で、非潰瘍型間質性膀胱炎患者と比べて有意に増加していた。以上から、尿中 CXCL10 は、潰瘍型 IC のバイオマーカー候補として有望であることが示唆された[学会発表 3 参照].

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Aizawa N, Igawa Y, Nishizawa O, Wyndaele JJ: Effects of nitric oxide on the primary bladder afferent activities of the rat with and without intravesical acrolein treatment. *European Urology*, 59:264-271, 2011(査読有り)
2. Aizawa N, Igawa Y, Andersson KE, Iijima K, Nishizawa O, Wyndaele JJ: Effects of intravesical instillation of ATP on rat bladder primary afferent activity and its relationship with capsaicin-sensitivity. *Neurourology and Urodynamics*, 30: 163- 168, 2011(査読有り)
3. Kurizaki Y, Ishizuka O, Imamura T, Ichino M, Ogawa T, Igawa Y, Nishizawa O, Andersson KE: Relation between expression of α (1)-adrenoceptor mRNAs in bladder mucosa and urodynamic findings in men with lower urinary tract symptoms. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 45: 15-19, 2011(査読有り)
4. Michel MC, Ochodnický P, Homma Y, Igawa Y. β -Adrenoceptor agonist effects in experimental models of bladder dysfunction. *Pharmacology &*

- Therapeutics, 131:40-49, 2011(査読有り)
5. Aizawa N, Iijima K, Rosenbaum JS, Downs TR, Igawa Y, Andersson KE, Wyndaele JJ: Comparison of the effects of oestrogen deficiency and old age on primary bladder afferent activity and voiding behaviour in the ageing female rat. BJU International 2010(査読有り)
 6. Aizawa N, Igawa Y, Nishizawa O, Wyndaele JJ: Effects of CL316, 243, a beta(3)-adrenoceptor agonist, and intravesical prostaglandin E(2) on the primary bladder afferent activity of the rat. Neurourology and Urodynamics, 29:771-776, 2010(査読有り)
 7. Igawa Y, Aizawa N, Homma Y: Beta3-adrenoceptor agonists: possible role in the treatment of overactive bladder. Korean Journal of Urology, 51:811-818, 2010(査読有り)
 8. Minagawa T, Imamura T, Igawa Y, Aizawa N, Ishizuka O, Nishizawa O: Differentiation of smooth muscle cells from human amniotic mesenchymal cells implanted in the freeze-injured mouse urinary bladder. European Urology, 58: 299-306, 2010(査読有り)
 9. Kinebuchi Y, Aizawa N, Imamura T, Ishizuka O, Igawa Y, Nishizawa O: Autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation into injured rat urethral sphincter. International Journal of Urology, 17: 359- 368, 2010(査読有り)
 10. Ogawa T, Homma T, Igawa Y, Seki S, Ishizuka O, Imamura T, Akahane S, Homma Y, Nishizawa O: CXCR3 binding chemokine and TNFSF14 over expression in bladder urothelium of patients with ulcerative interstitial cystitis. The Journal of Urology, 183: 1206-1212, 2010(査読有り)
 11. Iijima K, Igawa Y, Wyndaele JJ, De Wachter S: Mechanosensitive primary bladder afferent activity in rats with and without spinal cord transection. The Journal of Urology 182: 1504-1510, 2009(査読有り)
- [学会発表] (計 21件)
1. Igawa Y: Lower urinary tract reconstruction using tissue engineering. Taiwanese Continence Society Annual Meeting. October 17, 2010, Taipei, Taiwan
 2. Igawa Y: The beta3-adrenoceptor agonist: Its possible roles in OAB treatment. OAB symposium Taipei. October 16, 2010, Taipei, Taiwan
 3. 井川 靖彦:膀胱知覚受容のメカニズム. 京都府立医科大学大学院・特別講義. 2010年10月5日. 京都市
 4. 井川 靖彦:In vivo 単一神経活動導出法による膀胱求心性神経の機能解析. 第17回日本排尿機能学会. ワークショップ 1 求心性神経伝達と下部尿路機能. 2010年9月30日. 甲府市
 5. 井川 靖彦:ベータ3アドレナリン受容体作動薬. 第17回日本排尿機能学会 シンポジウム1. 下部尿路機能障害の薬物療法-現状と展望. 2010年9月30日. 甲府市
 6. 井川 靖彦: メタボリックシンドロームと下部尿路症状. 第75回日本泌尿器科学会東部総会 シンポジウム2. メタボリックシンドロームと泌尿器疾患 2010年9月15日. 宇都宮市
 7. Igawa Y, Kato H, Ichino M, Nishizawa O: A new urethral lengthening procedure using intestinal tube for sphincteric incontinence in patients with myelodysplasia. 23rd International Symposium on Paediatric Surgical Research. September 14, 2010, Tokyo, Japan
 8. Igawa Y, Ichino M, Nishizawa O: Urodynamic risk factors against spontaneous resolution of primary vesico- ureteral reflux in male infants. 23rd International Symposium on Paediatric Surgical Research. September 14, 2010, Tokyo, Japan
 9. Ichino M, Igawa Y, Ishizuka O, Nishizawa O: Lower urinary tract dysfunction after radical hysterectomy. International continence Society-International Urogynecology Association joint Annual Meeting. August 23-27, 2010, Toronto, Canada
 10. Kurizaki Y, Ishizuka O, Imamura T, Ichino M, Ogawa T, Igawa Y, Nishizawa O, Andersson K: Relation between expression of β_1 -adrenoceptor mRNAs in bladder mucosa and urodynamic findings in men with lower urinary tract symptoms. International continence Society-International Urogynecology Association joint

- Annual Meeting. August 23-27, 2010, Toronto, Canada
11. Ishizuka O, Nakayama T, Imamura T, Kurizaki Y, Igawa Y, Nishizawa O, Andersson K: Saline loading caused the change of the expression of A1-adrenoceptor subtypes and angiotensin II type1 receptors in the prostate of spontaneously hypertensive rats. International continence Society-International Urogynecology Association joint Annual Meeting. August 23-27, 2010, Toronto, Canada
 12. Aizawa N, Igawa Y, Wyndaele J: Effects of L-arginine, an no donor, on the primary afferent activity withor without acrolein-Treated rat bladder. International continence Society- International Urogynecology Association joint Annual Meeting. August 23-27, 2010, Toronto, Canada
 13. 井川 靖彦: 小児下部尿路機能障害の診断と治療. 第 9 回小児泌尿器教育セミナー(第 19 回日本小児泌尿器科学会). 2010 年 7 月 1 日. 札幌市
 14. 井川 靖彦: 神経因性膀胱の診断と治療の進歩. 第 47 回日本リハビリテーション医学会学術集会. シンポジウム 7 排尿障害のリハビリテーションの進歩. 2010 年 5 月 22 日. 鹿児島市
 15. 井川 靖彦: 神経因性膀胱の治療. 第 98 回日本泌尿器科学会総会. 2010 年 4 月 29 日. 盛岡市
 16. Igawa Y, Ichino M, Ogawa T, Nishizawa O: Characteristics of neurogenic lower urinary tract dysfunction associated with spinal lipoma and: impact of lipoma removal. 25th Annual European Association of Urology Congress. April 19, 2010, Barcelona, Spain
 17. Imamura T, Igawa Y, Ogawa T, Homma T, Seki S, Ishizuka O, Akahane S, Homma Y, Nishizawa O: Expression level of CXCL10 peptide in bladder urothelium and urine as possible biomarkers for diagnosis of ulcerative interstitial cystitis. 25th Annual European Association of Urology Congress. April 18, 2010, Barcelona, Spain
 18. 井川 靖彦: 尿路再建術の現状と今後の展望. 第 1 回山梨排尿障害セミナー. 2010 年 4 月 8 日. 甲府市
 19. 井川 靖彦: 過活動膀胱の病態生理UPDATE. 京都排尿障害フォーラム. 2010 年 3 月 19 日. 京都市
 20. Igawa Y, Aizawa N, Wyndaele JJ: Effects of CL316, 243, a beta3-adrenoceptor agonist, and prostaglandin E2 on the primary bladder afferent activity of the rat. 39th Annual Meeting of International Continence Society, October 3, 2009, San Francisco, USA
 21. Igawa Y, Aizawa N, Iijima K, Wyndaele JJ, Andersson K-E, Nishizawa O: Effects of intravesical capsaicin, resiniferatoxin and ATP on primary bladder afferent activity of the rat. 38th Annual Meeting of International Continence Society. October 24, 2008, Cairo, Egypt
- [その他]
ホームページ等
コンチネンス医学講座
(<http://cont-med.umin.jp/>)
6. 研究組織
(1) 研究代表者
井川 靖彦 (IGAWA YASUHIKO)
東京大学・医学部附属病院・特任教授
研究者番号: 40159588
- (2) 研究分担者
小川 輝之 (OGAWA TERUYUKI)
信州大学・医学部・特任助教
研究者番号: 90467142
- 相澤 直樹 (AIZAWA NAOKI)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号: 80595257
- (3) 連携研究者
なし