

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：13501
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20K09575
研究課題名（和文）脊損後排尿障害へグルタミン酸信号伝達を介し関与する神経栄養因子前駆体の作用解析
研究課題名（英文）Analysis of action of neurotrophic factor precursor via glutamatergic signal transmission that is involved in voiding dysfunction after spinal cord injury
研究代表者
芳山 充晴（YOSHIYAMA, Mitsuharu）
山梨大学・大学院総合研究部・研究員
研究者番号：20422694
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：慢性脊髄損傷マウスは、膀胱平滑筋外尿道括約筋協調不全を呈する。但し、膀胱収縮中、外尿道括約筋が協調し弛緩する活動静止期があり（尿道抵抗の減弱）、その際に尿を排出できる。本研究は、Group 1代謝型グルタミン酸受容体であるmGluR1とmGluR5が脊髄損傷マウスの膀胱収縮と外尿道括約筋の協調運動に重要であることを示した。加えて、p75NTRが脊髄損傷後の可塑性変化において、膀胱収縮と外尿道括約筋の協調運動に関わるメカニズムの構築に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性脊髄損傷は、排尿筋外尿道括約筋協調不全を惹起し、排尿障害を起こす。やがて腎機能不全を呈するようになり、時として生命を脅かす。膀胱内が異常な高圧状態になることを回避できるよう、膀胱収縮時には外尿道括約筋が弛緩し、尿道抵抗が減弱することが望ましい。本研究では、脊髄損傷後に排尿筋外尿道括約筋協調不全を呈するメカニズムの一端を明らかにした。今回の研究成果が、将来的に、排尿筋外尿道括約筋協調不全を緩和し、膀胱と尿道の協調性のある活動へと導く治療法開発に役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Chronically spinal cord injured mice present detrusor-sphincter dyssynergia. In the meantime, there are some silent periods that show synergic activity of the bladder and external urethral sphincter during the bladder contraction (i.e., decreased urethral resistance), which lead to urine evacuation. In addition, the present study revealed that p75NTR plays important role in the mechanism associated with synergic activity of the bladder and external urethral sphincter in the plastic change after spinal cord injury.

研究分野：神経泌尿器科学

キーワード：排尿障害 脊髄損傷 神経栄養因子 代謝型グルタミン酸 膀胱 外尿道括約筋 マウス

1. 研究開始当初の背景

グルタミン酸受容体は、イオンチャネル共役型受容体と G タンパク質共役型受容体の二つに大別される。前者には *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体、及び、 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA)受容体が属し、中枢神経系に存在するそれぞれが膀胱と外尿道括約筋活動の制御において重要な役割を担う。他方、後者には 8 種類のサブタイプによって構成される代謝型グルタミン酸受容体 (metabotropic glutamate receptor, mGluR) が属する。その中で、mGluR1 と mGluR5 はラット腰仙髄オヌフ核に多く存在し[1]、mGluR 拮抗薬を用いた *in vivo* 薬理学実験において、mGluR が膀胱収縮時の外尿道括約筋活動の抑制性制御に関与することが明らかとなった[2]。本研究代表者による予備的研究は、mGluR1 と mGluR5 の両方が慢性脊髄損傷(spinal cord injury, SCI)マウスにおける排尿筋外尿道括約筋協調不全(detrusor-sphincter dyssynergia, DSD) に関与することを示唆した[3,4]。

脳由来神経栄養因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF) と神経成長因子(nerve growth factor, NGF)は、neurotrophin ファミリーに属する神経栄養因子であり、神経細胞の生存・分化、シナプスの機能亢進等の神経細胞の成長を調節する。下部尿路系において、これら神経栄養因子は様々な病態において排尿平滑筋、肥満細胞、尿路上皮細胞から放出されている。成熟 BDNF と NGF は放出前に酵素反応により神経栄養因子前駆体 proBDNF/proNGF から分泌小胞内において生成される。病態における成熟 BDNF と NGF の過剰発現は、制御不能な proBDNF/proNGF 放出につながる。proBDNF/proNGF は、SCI 後の膀胱や排尿反射経路において発現増加が確認されている低親和性神経成長因子受容体 p75 に対しては良好な親和性を示す (Table 1)。

加えて、proBDNF/proNGF は、p75-sortilin 複合体を優位に活性化する。Sortilin と p75 は共受容体を形成し、神経栄養因子前駆体によるアポトーシスの誘導に関与する。Sortilin は、高親和性神経成長因子

Table 1 Neurotrophin受容体 と 既知のリガンド	
受容体	リガンド
p75	proNGF, proBDNF, proNT3, proNT4
TrkA	NGF
TrkB	BDNF/NT4
TrkC	NT3

受容体 tropomyosin receptor kinase (Trk) と小胞内腔において会合しながらソーティング制御してチロシキナーゼ型受容体をシナプスまで積極的に順行性輸送しており、神経栄養因子受容体を神経終末部位へ効率的に輸送するのに必要である。成熟 neurotrophins は同起源の Trk と p75 ヘテロ二量体を活性化し、生存と分化を促進する。

本研究代表者と他研究機関との共同研究は、神経栄養因子前駆体 proNGF により、p75、もしくは、p75-sortilin 複合体の活性を制御することでアポトーシスを阻害し、その結果、SCI 後に起こる神経可塑性変化により惹起される DSD と膀胱過活動を予防、緩和する可能性を示した[5]。

2. 研究の目的

本研究の目的は、慢性 SCI に伴う DSD と膀胱過活動の症状発現の予防、もしくは、症状緩和を旨とした治療法の開発である。SCI に続いて発症する膀胱過活動は、DSD の緩和により軽減できる可能性が示唆されており、DSD に対するアプローチが優先される。

本研究代表者による予備の実験では、慢性 SCI における DSD の病態において mGluR1/mGluR5 の関与が重要であることが示唆されている。本研究では慢性脊髄損傷に伴う排尿障害に関連して、下部尿路機能制御における腰仙髄 mGluR1/mGluR5 信号伝達の中枢神経損傷後可塑性変化と、その過程における神経栄養因子前駆体 proNGF と p75 (又は、p75-sortilin 複合体) の役割を究明した。

3. 研究の方法

(a)膀胱収縮と外尿道括約筋活動の協調運動 (synergy) に外尿道括約筋運動神経核(オヌフ核)における mGluR1 と mGluR5 の部分的な関与が必要であるこ

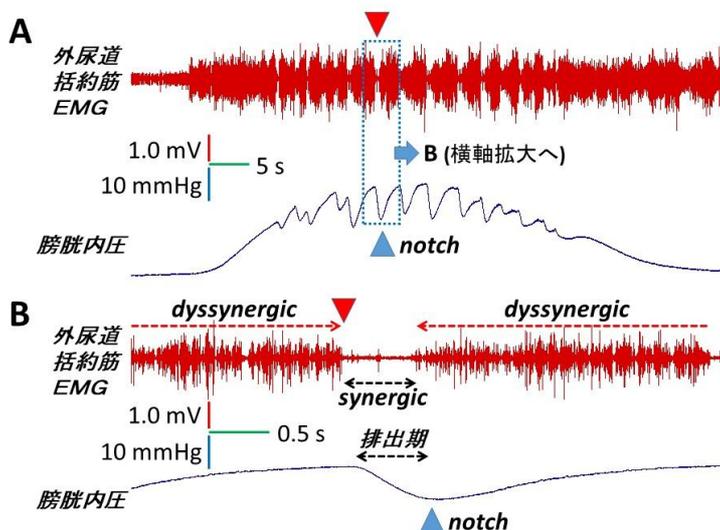


Fig. 1 野生型 脊髄損傷マウス

と、(b)慢性 SCI により、mGluR1 と mGluR5 の発現様態と機能的役割に変化を来たすということ、そして、(c)その過程に膀胱と外尿道括約筋を制御する神経ネットワークに proNGF/p75 信号伝達誘発のアポトーシス/神経可塑性変化が関与していることを検証した。そして更に、(d)そのアポトーシス/神経可塑性変化を阻止することにより、mGluR1/mGluR5 を介し膀胱と外尿道括約筋を制御する神経ネットワークが保護され、その結果、DSD の発症を予防、もしくは、緩和できるかを検証した。この proNGF/p75 信号伝達を制御する LM11A-31 を 4 週間連日経口投与し、Fig.1 に示す膀胱収縮と外尿道括約筋 EMG 活動における synergic pattern 数、dyssynergic period 総時間、及び、synergic/dyssynergic period 比を vehicle 投与群と比較した。病態生理機能実験では、シストメトリー法を用い、mGluR-KO 群と野生群、及び、LM11A-31 投与群と vehicle 群と比較した。

4. 研究成果

膀胱内圧測定と同時に実施した外尿道括約筋筋電図 (EUS-EMG) にて、脊損 (SCI) マウスの下部尿路機能 (排尿期) を評価した (Fig.1)。野生型脊損 (WT-SCI) マウスでは、EUS-EMG 活動が膀胱収縮開始直前から活発になり、膀胱収縮が始まると更に EUS-EMG 活動が顕著となる。但し、膀胱収縮 1 回あたり EUS-EMG 活動が静止する瞬間があり (膀胱外尿道括約筋協調活動期 = 外尿道括約筋活動静止期: EUS 静止期) その際に排尿する (平均 9 回/膀胱収縮) mGluR1-KO マウスの脊損モデル (KO-SCI) では、WT-SCI マウスに比べ EUS 静止期が著しく少なかった (平均 5 回/膀胱収縮) mGluR5 拮抗薬 MPEP を腹腔内投与 (3 mg/kg) すると、WT-SCI マウス (Fig.2) と KO-SCI マウスの両方で EUS 静止期が著しく減少した (それぞれ、平均 4 回/膀胱収縮、平均 2.4 回/膀胱収縮)。以上の結果は、代謝型グルタミン酸受容体 Group I に属する mGluR1、及び、mGluR5 が膀胱収縮中の EUS 静止期に重要な役割を担っていることを示唆している。

次に、WT マウスに脊損を起こした日から in vivo 実験までの 4 週間、LM11A-31 (非ペプチド p75NTR リガンド/proNGF 拮抗薬) を連日経口投与した群と対照群 (蒸留水連日投与) を比較した。対照群では、上述の WT-SCI マウスと同じで、EUS 静止期を平均 9 回/膀胱収縮前後呈していた。他方、LM11A-31 投与群では、EUS 静止期が 0-2 回/膀胱収縮しかなく、尿排出は滲み出るだけの僅かな量 (15-40 μ L 程度) であった。これは、上述の KO-SCI マウスに MPEP を投与した後の膀胱収縮/外尿道括約筋活動に類似していた。この結果は、脊損後に生じるアポトーシスの過程でオヌフ核神経細胞内の mGluR1 受容体と mGluR5 受容体を介した信号伝達経路の不活性化が膀胱外尿道括約筋協調不全を助長している可能性を示唆している。

< 引用文献 >

- Alvarez, et al., *J Comp Neurol* 422:464-487 (2000)
 Yoshiyama & de Groat, *Neurosci Lett* 420:18-22 (2007)
 Yoshiyama & Takeda, *International Continence Society 47th Annual meeting*, Abstract No. 730 (2017)
 Yoshiyama & Takeda, *The 33rd Annual Congress of the European Association of Urology*, Abstract No. 443 (2018)
 Ryu, ... Yoshiyama, et al., *J Clin Invest* 128:1772-1786 (2018)

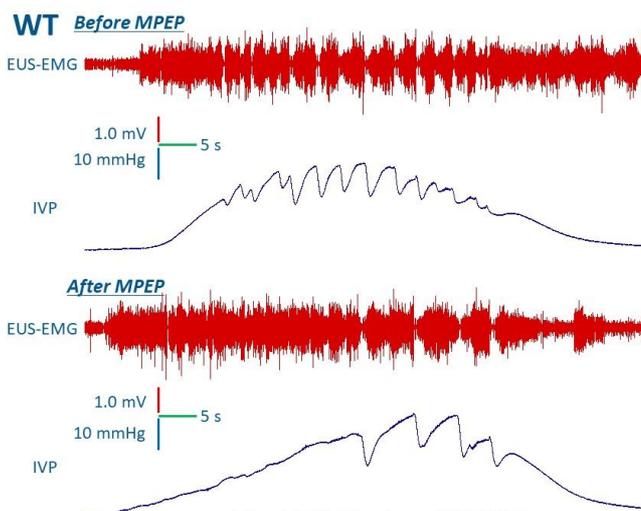


Fig. 2 野生型マウスへMPEP投与

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Eser, N., Buyuknacar, H.S., Cimentepe, O.O., Gocmen, C., Ucar, Y., Erdogan, S., Yoshiyama, M.	4. 巻 32
2. 論文標題 The effect of Ferula elaeochytris root extract on erectile dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Impotence Research	6. 最初と最後の頁 186-194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41443-019-0137-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Fraser, M.O., Smith, P.P., Sullivan, M.P., Bjorling, D.E., Campeau, L., Andersson, K.-E., Yoshiyama, M.	4. 巻 39
2. 論文標題 Best practices for cystometric evaluation of lower urinary tract function in muriform rodents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurourology and Urodynamics	6. 最初と最後の頁 1868-1884
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/nau.24415	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshiyama, M., Kobayashi, H., Takeda, M., Araki, I.	4. 巻 11
2. 論文標題 Blockade of acid-sensing ion channels increases urinary bladder capacity with or without intravesical irritation in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 592867
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2020.592867	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshiyama, M.
2. 発表標題 Acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) inhibitor increases functional bladder capacity with or without acidic irritation of lower urinary tract in mice when administering intraperitoneally but not intravesically
3. 学会等名 International Continence Society 2020 Online Meeting（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Mitsuharu Yoshiyama, Hidehiro Kakizaki	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 19
3. 書名 Handbook of Neurourology: Theory and Practice	

〔産業財産権〕

〔その他〕

Translation of in vivo preclinical research https://www.ics.org/live/16July21
--

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------