様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 ２３ 日現在

機関番号：３２２０６
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2024
課題番号：２１Ｋ０９３７９

研究課題名（和文）廃用萎縮、神経障害、閉塞の新規マルチラットモデルによる低活動膀胱の病態解明

研究課題名（英文）Pathophysiological investigation of the hypoactive bladder using multiple models caused by defunctionalization, neurogenic, and obstruction

研究代表者

井上　高光（Inoue, Takamitsu）

国際医療福祉大学・国際医療福祉大学成田病院・教授

研究者番号：６０３７５２４３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ラットをsham群、萎縮群、回復群に分け、萎縮群は両側尿管を切断し両側尿管腟吻合を行った。day84にウロダイを行い萎縮群は膀胱摘出し回復群は片方尿管を萎縮膀胱に再吻合した。回復群はday105にウロダイを行い膀胱摘出した。day0,84におけるsham群、萎縮群、回復群についてday84の萎縮群および回復群で膀胱容量およびコンプライアンスがday0に比較し有意に低かった。また回復群は有意にday105で膀胱容量およびコンプライアンスが回復した。平滑筋/間質比はsham群に比較し有意に萎縮群で低く回復群は萎縮群に比較し有意に高かった。RNAseqを行いウサギでの遺伝子変化をラットでも認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
廃用性低活動萎縮膀胱とその回復の動物モデルの報告はこれまで全く行われていなかった。ウサギを使った2つの報告（Lipski,Machado)があるが、本来の生理的状況ではなかった。尿管をラット膣に吻合し萎縮膀胱を作成した1報があるが（Liu）ラットで尿管を再び膀胱へ繋ぐ報告はこれまで行われていない。研究代表者がウサギで確立したモデル（Kisou）は全く新しい低活動膀胱へのアプローチであり、今回の研究でラットへの適用が確立し、蛋白レベルで膀胱再生に繋がる新たな知見が得られる礎が出来た。今後の低活動膀胱における再生医療の進歩に大きく寄与できると考えている。

研究成果の概要（英文）：Rats were divided into sham, atrophy, and recovery groups. In the atrophy group, both ureters were cut and bilateral ureterovaginal anastomosis was performed. On day84, urodynamics study was performed and the bladder was excised in the atrophy group, and in the recovery group, an ureter was re-anastomosed to the atrophic bladder. In the recovery group, urodynamics study was performed and the bladder was excised on day105. For the sham, atrophy, and recovery groups on days0,84, the bladder capacity and compliance were significantly lower in the atrophy group and recovery group on day84 compared to day0. In addition, the recovery group had significantly recovered bladder capacity and compliance on day105. The smooth muscle/interstitial ratio was significantly lower in the atrophy group compared to the sham group, and significantly higher in the recovery group compared to the atrophy group. RNAseq was performed and gene expression changes observed in rabbits were also observed in rats.

研究分野：排尿生理学

キーワード：廃用性萎縮膀胱　低活動膀胱　遺伝子発現　再生医療

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

低活動膀胱は糖尿病や骨盤内手術による末梢神経損傷が主な原因の、近年見直されている疾患概念である。有病率は排尿症状を有する男性の約 48%と多く、生活の質を大きく低下させるが、治療法は殆ど存在しない。低活動膀胱では尿排出力低下や多量の残尿に起因する尿勢低下、残尿感、頻尿、尿失禁による生活の質の低下のみならず、慢性的な経過で膀胱の形態的、機能的変化、いわゆる膀胱リモデリングをもたらし、最終的には膀胱線維化や低コンプライアンス膀胱などの非代償性膀胱機能不全となり、尿閉や逆流性腎盂腎炎や腎機能低下へと発展し生命予後にも関わる。しかし現在、1940 年代や 1957 年に合成されたベタネコールおよびジスチグミンしか薬物治療法がない。

長期透析による乏尿は透析期間に応じ膀胱容量を廃用性に減少させ、腎移植後に回復することが、腎移植臨床の成績から知られている(Inoue et al. Transplantation 2011、Inoue et al. Int J Urol 2016)。しかし、この機能回復の分子生物学的メカニズムはほとんど研究されていない。

廃用性低活動萎縮膀胱とその回復の動物モデルの報告はこれまで全く行われていない。ウサギを使った２つの報告があるが、本来の生理的状況ではなかった（Lipski. J Urol 1998, Machado. J Urol 2000)。尿管をラット膣に吻合し萎縮膀胱を作成した 1 報があるが（Liu. J Urol 2012)、ラットで尿管を再び膀胱へ繋ぐ報告はこれまで行われていない。

主任研究者（井上）は最近、新規の廃用性萎縮膀胱の回復ウサギモデルを確立した（Kisou, Inoue et al, Neurourol Urodyn in press, 2020)。マイクロアレイで解析すると、膀胱萎縮線維化時および回復時のアンギオテンシン II 受容体 Type 2（AT2）の有意な遺伝子発現上昇と低下をウサギ膀胱とヒト膀胱で共通変化として認めた。しかし、この研究ではウサギモデルのため蛋白レベルでの検証が出来なかった。

２．研究の目的

本研究ではラットによる同モデルを作成し、上記候補遺伝子の蛋白レベルの変化を検証する。中でも「アンギオテンシン受容体 AT1 および AT2 が膀胱リモデリングに関与するか」に注目し、長期経過観察における膀胱線維化や非代償性膀胱機能不全との関連を調べ新規再生医療への足がかりとする。

尿路変向による廃用性低活動萎縮膀胱「DRB rat model」の回復モデルの確立、膀胱線維化あるいは非代償性膀胱機能不全と、ウサギでの候補遺伝子との関連の検証、特に ATP や NO 放出に関連する TRPV4、P2RX1, PIEZO2, Cx43, NOS、また AT1 あるいは AT2 受容体阻害薬による膀胱線維化や低活動膀胱の抑制効果の検証、である。

３．研究の方法

＜ラット手術 day0＞

6 週齢の SD ラットを購入し、sham 群、萎縮群、回復群の 3 群に分けた。

① 麻酔（皮下注）

メス 8 週齢 SD ラット（日本 SLC、静岡）を 3 種混合麻酔を用いて麻酔する。塩酸メデトミジン 0.3mg＋ミダゾラム 4.0mg＋酒石酸ブトルファール 5.0mg＋生理食塩水/5ml を準備

する。ラットに 0.25ml/100g で皮下注する。ラットを拮抗薬で起こすときは、メデトミジン拮抗薬である、塩酸アチパメゾール 3.0mg＋生理食塩水/5ml を、ラットの場合、0.25ml/100g で皮下注する。

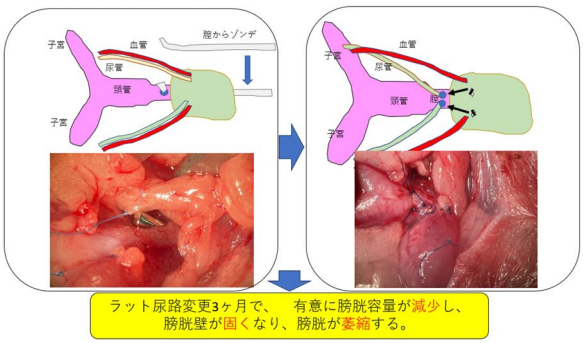
② ウロダイナミクス

ウロダイナミクスシステムは、膀胱内圧は持続的に圧トランスデューサーMLT844(AD Instruments, New Zealand)で測定し、信号をFE221ブリッジアンプ(AD Instruments, New Zealand)で拡張し、コンバーター#ML826; PowerLab 2/26（AD Instruments, New Zealand)で変換し、LabChart software　(AD Instruments, New Zealand)で解析した。
メス SD ラット四肢をコルク板に固定する。メスラット尿道に 22G サーフロ針（テルモ、東京）の外筒を挿入する。ピンセットでクリトリス部分をつまみ、天井やや頭側方向に軽く釣り上げ、前部尿道を直線化しつつ、8mm-10mm 程度、当たるまで尿道にサーフロ針を軽く挿入する（この時に、力を入れすぎると、偽尿道を作成するので注意)。引っかかるときは、出口から 5mm 程度で引っかかる。ピンセットとサーフロ外套を恥骨の尾側への角度に誘導して、後部尿道をまっすぐにする（このとき、サーフロ針でもってこようとしない。あくまでピンセットで尿道を伸ばして、共に角度を変える)。ゆっくりサーフロ針を膀胱内へ誘導する。
膀胱内にサーフロ針が入ったら、サーフロの針のほうにシリンジをつけ、サーフロ針内を生食で満たす。このことで呼び水となり、膀胱内の尿が排泄される。キムワイプを細くコヨリにして、膀胱内から尿を排除する。サーフロ針を余剰 10mm 程度のところで、ソフトジョースプリングクリップ（CSOFT6: Edwards Lifescinces, Irvine, CA）でクリトリスごと固定し、脇漏れを防ぐ。サーフロ針内に生食を満たし、ウロダイの回路につなぐ。
LabChart を開き、ゼロ点補正をし、ポンプを 0.1mL/min に合わせ、LabChart 側をスタートさせ、ポンプをスタートする。大きく波打つ波形の場合は、膀胱壁に当たっていると考え、サーフロ針を少し引き、やり直す。膀胱内圧が 50mmHg になるまでの膀胱容量と、時間、膀胱内圧を持続的に測定して記録する。

③ 両側尿管膣吻合術

ラットに下腹部正中切開を行う。膀胱周囲の脂肪を切開し、膀胱基部の血管尿管束を探し当てる。尿管の左右の被膜を切開し、直角ピンセットで尿管を膀胱近傍で拾う。このとき尿管近傍にある膀胱栄養血管を傷つけないように注意する。3cm 程度に切断した 7-0 プロリン糸で尿管を結紮する。結紮した近位の尿管に薄く 7-0 プロリンの針をかけ、固定しておく。糸の固定部と尿管結紮部の間を切断する。近位の尿管をやや 3-5mm 程度剥離しておく。ラット膣よりゾンデを曲げた器具を挿入し、膀胱横の尿道にかからないようガイドしつつ、膣壁に約 1-2mm 程度の穴をあける。この穴よりゾンデでガイドしつつ、先程尿管に固定した 7-0 プロリンを、穴を通して膣の遠位 5mm 程度の場所に穿刺し結紮する。尿管の通った膣の穴を、1 針 7-0 プロリンで閉鎖する。これを両側尿管について行う。その後下腹部正中切開創を 2-0 バイクリルで全層結節縫合を行い閉創する。

両側尿管膣新吻合




④ Sham 手術

ラットに下腹部正中切開を行う。膀胱周囲の脂肪を切開し、膀胱基部の血管尿管束を探し当てる。尿管の左右の被膜を切開し、直角ピンセットで尿管を膀胱近傍で拾う。そのあと傷を閉じる。

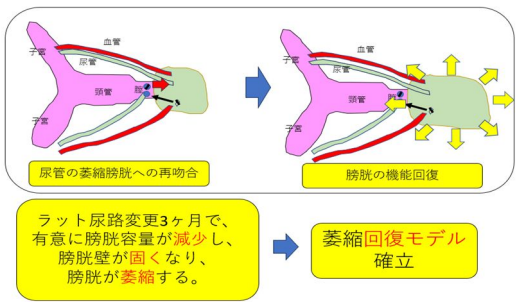
＜ラット手術 day 84、126＞

ラットのウロダイナミクス検査を行った。

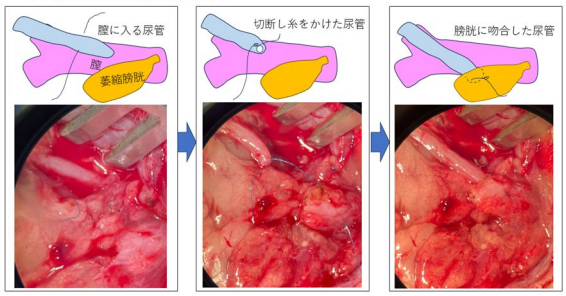
⑤ 片側尿管膀胱再吻合術

ラットに下腹部正中切開を行う。膀胱周囲の脂肪を切開し、左右どちらかの膀胱基部の血管尿管束を探し当てる。できれば水尿管のないほうの尿管を選択する。尿管周囲の血管を傷つけないように注意しつつ、尿管周囲を剥離する。直角ピンセットで尿管を膣吻合部近傍で拾う。3cm 程度に切断した 7-0 プロリン糸で尿管を結紮する。結紮した近位の尿管に薄く 7-0 プロリンの針をかけ、固定しておく。糸の固定部と尿管結紮部の間を切断する。近位の尿管をやや 3-5mm 程度剥離しておく。萎縮した膀胱壁に電気メスで穴を開け、内腔を確認する。この穴より先程尿管に固定した 7-0 プロリンを、穴を通して萎縮膀胱の遠位 5mm 程度の場所に穿刺し結紮する。尿管が太い場合は 2 本で膀胱に固定する。尿管の通った膀胱の穴の周囲を、1 針 7-0 プロリンで数カ所、補強閉鎖する。これは片側のみに行う。その後下腹部正中切開創を 2-0 バイクリルで全層結節縫合を行い閉創する。

片側尿管を膀胱に再吻合する




片側尿管膀胱新吻合




⑥ 膀胱摘出、sacrifice

ラットに下腹部正中切開を行う。膀胱周囲を丁寧に外し、膀胱基部の血管を切断し、尿道を膀胱頸部から 3mm 程度つけて、切断する。写真をメジャーと共に撮影し、大きさと重量を計測する。膀胱の正中を尿道から切開し、開いた像を撮影し、重量を計測する。膀胱を縦に 3 等分し、さらに 6 等分し、液体窒素、RNAlater、5%ホルマリンで保存した。

＜組織学的検討＞

ヘマトキシリン・エオジン染色およびマッソン・トリクローム染色を行い、顕微鏡で取り込んだ写真をもとに ImageJ および QuPath で解析し、単位面積あたりの平滑筋領域、平滑筋領域の間質における割合、単位平滑筋面積当たりの平滑筋核数を計算し、3 群で中央値を比較した。

＜RNA sequence＞

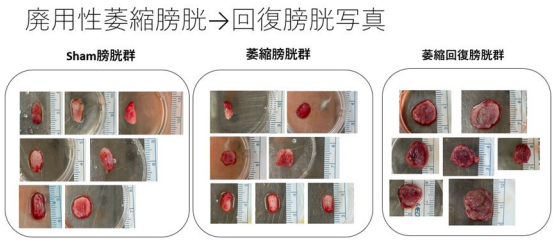
RNA later で採取した検体を 100ng/6uL であることを確認し、RNA sequence を行い網羅的 mRNA 発現解析を行った。

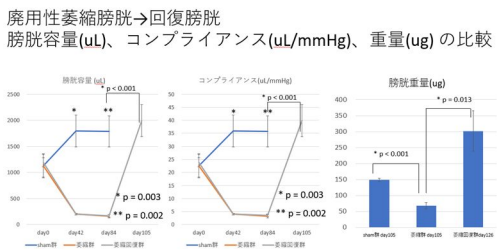
４．研究成果

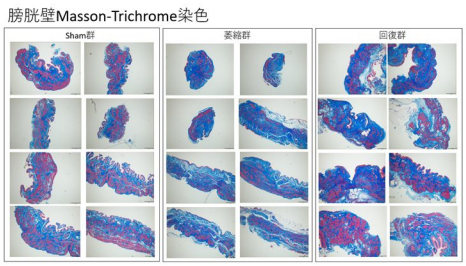
Sham 群、萎縮群、回復群について、day 0 および 84 における膀胱内圧 50mmHg における平均膀胱容量は、それぞれ 1,128, 1129, 1328 (uL)、および 1787, 169, 164 (uL)であり、平均膀胱コンプライアンスは、それぞれ 22.6, 22.6, 26.5 (uL/mmHg)、および 35.7, 3.4, 3.5 (uL/mmHg)であった。day84 で萎縮群、回復群は sham 群に比較して有意に膀胱容量およびコンプライアンスが低い結果であった（p = 0.99, 0.002, 0.002)。day 105 における回復群の膀胱容量および膀胱コンプライアンスは 1990 (uL)および 39.8 (uL/mmHg)であり、day84 の萎縮群と比較して有意に回復していた(p <0.001, p <0.001)。

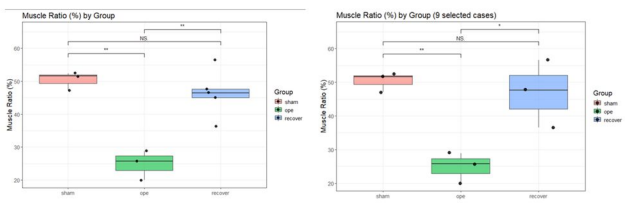
また Sham 群、萎縮群、回復群の膀胱摘出時の膀胱重量はそれぞれ 148、68、302(ug)であり、萎縮群で sham 群に比較して有意に軽く、回復群で萎縮群に比較して有意に重い結果であった(p <0.001, p = 0.010)。

また、




先にウサギで得た候補遺伝子の蛋白レベルの変化を検証した。中でも「アンギオテンシン受容体 AT1 および AT2 が膀胱リモデリングに関与するか」に注目し、神経支配と膀胱線維化や非代償性膀胱機能不全との関連を調べている。ウサギ膀胱とヒト膀胱で共通変化として認めた、膀胱萎縮線維化時および回復時のアンギオテンシン II 受容体 Type 2(AT2)の有意な遺伝子発現上昇と低下をラット膀胱で共通変化として認めた。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

| |
|---|
| １．発表者名<br>井上高光、千原尉智蕗、根来宏光、西山博之、宮崎淳 |
| ２．発表標題<br>両側尿管膣吻合を用いたメスラット尿路変更による廃用性萎縮膀胱モデルの作成 |
| ３．学会等名<br>第111回日本泌尿器科学会総会 |
| ４．発表年<br>2024年 |

| |
|---|
| １．発表者名<br>井上高光 |
| ２．発表標題<br>長期透析による廃用性萎縮膀胱とその腎移植後の回復～臨床から基礎研究へ |
| ３．学会等名<br>Urology Research Meeting 2021 |
| ４．発表年<br>2021年 |

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

| | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|---|---|---|---|
| 研究分担者 | 高岡　栄一郎<br>(TAKAOKA EIICHIROU)<br>(50625340) | 自治医科大学・医学部・准教授<br>(32202) | |
| 研究分担者 | 根来　宏光<br>(NEGORO HIROMITSU)<br>(80708595) | 筑波大学・医学医療系・准教授<br>(12102) | |

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 |
| --- | --- |