

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592359

研究課題名(和文) 下部尿路閉塞により増強される膀胱粘膜自律収縮促進作用に関する研究

研究課題名(英文) Investigation on mucosa-derived substance that enhances spontaneous contractions of the urinary bladder in the rat with bladder outlet obstruction

研究代表者

秋野 裕信 (AKINO, HIRONOBU)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：90159335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱粘膜から放出される膀胱自律収縮を促進する液性因子(膀胱粘膜由来自律収縮促進因子)の効果は下部尿路閉塞(B00)で亢進している。B00ラットを用いて、この因子の本体の同定と効果増強の機序に関して検討した。

膀胱粘膜由来プロスタグランジン(PG)E2はin vivoでB00に伴い放出量が増加し、膀胱自律収縮が背景にある蓄尿期の排尿に至らない膀胱収縮(NVC)と関連し、そしてin vitro膀胱条片の膀胱自律収縮と関連した。膀胱粘膜由来自律収縮促進因子はPGE2であり、そしてPGE2放出量の増加に神経系と膀胱壁でのcyclooxygenase-2の発現亢進があることを示した。

研究成果の概要(英文)：We examined what the mucosa-derived substance that can act to enhance spontaneous contractions (SCs) of the urinary bladder is in the rat with bladder outlet obstruction (B00). The SCs in bladder strips from B00 rats were associated with the amount of prostaglandin (PG) E2 released from the mucosa in vitro: The amount of PGE2 released from the mucosa was increased in B00 rats in vivo: The non-voiding contraction (NVC) that was regarded as a surrogate of SCs in the bladder wall in vivo was associated with mucosa-derived PGE2. The mucosa-derived substance to enhance SCs may be PGE2. We also found out that the presence of the intact nervous system innervating lower urinary tract and the up-regulation of the expression of cyclooxygenase-2 in the bladder wall were associated with the increased amount of PGE2 released from the mucosa induced by B00.

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：下部尿路閉塞 膀胱粘膜 膀胱自律収縮 生理学 ストレス

1. 研究開始当初の背景

尿意や尿意切迫感の発生に膀胱壁の自律収縮の関与が報告され、脊髄損傷ラットでは膀胱粘膜伸張刺激が筋層の自律収縮を促進して、知覚神経を発火させることが報告された (Ikeda Y and Kanai A. Am J Physiol Renal Physiol 2008; McCarthy CJ et al. J Urol 2009)。前立腺肥大症に代表される下部尿路閉塞 (B00) は過活動膀胱の原因であり、実験動物レベルでは脊髄損傷とともに蓄尿期における排尿に至らない膀胱収縮 (non-voiding contraction: NVC) を認め、NVC 発生への膀胱自律収縮亢進の関与が示唆されている (Drake MJ et al. J Urol 2003)。しかし、B00 における自律収縮亢進に対する膀胱粘膜の関与は明らかにされていない。研究代表者らはラット B00 モデルを用いて膀胱内圧測定ならびに in-vitro での膀胱条片を用いて自律収縮に関する研究を行ってきた。その結果、膀胱粘膜を除去すると in-vitro 自律収縮の振幅 (収縮力) が低下し、B00 では粘膜除去片と粘膜片とを co-incubation すると粘膜除去片に比較して自律収縮の振幅が増加するが、正常ラットでは膀胱粘膜の自律収縮増強作用が認められないことを明らかにした。これらの事実は B00 膀胱において、粘膜から自律収縮を増強させる液性因子が放出されることを示しているが、この膀胱粘膜由来自律収縮促進因子が何であるか、そして B00 によって膀胱粘膜由来自律収縮促進因子の効果が増強される機序に関しては不明のままである。

2. 研究の目的

B00 においてその作用が亢進する膀胱粘膜由来自律収縮促進因子の本体を明らかにして、B00 が膀胱粘膜由来自律収縮促進因子の産生を亢進させる機序を明らかにする。膀胱自律収縮は B00 ラットで認められる NVC の背景にあると考えられており、NVC と粘膜由来自律収縮促進因子の候補としてのアデノシン 3 リン酸 (ATP) またはプロスタグランディン E2 (PGE2) に着目して実験を行った。

3. 研究の方法

対象：雌性 Wistar 系ラット 8 週齢。
方法：B00 は尿道外径 1.1mm の尿道狭窄によって作製した。尿道狭窄作製後 4 週間で実験を行った。In-vivo 実験では、膀胱頂部から挿入したカテーテルを利用して膀胱内圧測定し、ATP・PGE2 は 30%、50%膀胱容量における膀胱腔内放出量を測定した。ATP は luciferin-luciferase 法、PGE2 は酵素抗体法で測定した。In-vitro 実験では、膀胱条片 (粘膜を有する全層片と粘膜を剥離した筋層片) を作製し、組織バスに懸垂後に自律収縮の頻度と振幅を記録し、組織バス内に放出された ATP・PGE2 を測定した。RT-PCR による mRNA の発現は膀胱摘出後、ただちに液体窒素で凍結。-80 で保存し、可及的早期に実験

に供した。

4. 研究成果

(1) B00 ラット膀胱から in-vivo で膀胱腔内に放出される ATP と PGE2 量を測定した。in-vitro では B00 で膀胱条片からの ATP・PGE2 放出量は低下していたが、in-vivo では ATP・PGE2 の膀胱腔内への放出量は増加した。膀胱自律収縮が背景にあると想定される膀胱内圧測定での排尿に至らない膀胱収縮 (NVC) は膀胱容量の増加に伴い亢進し、ATP・PGE2 放出量も膀胱容量の増加に伴い増加した。これらの実験結果からは膀胱粘膜由来自律収縮促進因子が ATP であるか、PGE2 であるかの判別は不可能だが、ATP や PGE2 の膀胱粘膜からの放出量亢進の背景には、in-vivo と in-vitro の決定的な相違点である神経系が intact に存在することが膀胱粘膜からの ATP・PGE2 放出量の増加に必須であることを示唆した。

(2) 交感神経 1 受容体遮断薬 (1 ブロッカー) は B00 に伴う NVC を抑制し、そして研究代表者らは 1 ブロッカーが尿道由来知覚 C 線維を抑制するデータを過去の実験で得ている。これらの背景から、ATP・PGE2 放出に対する知覚 C 線維の関与を検討する目的で 1 ブロッカーであるナフトピジルの B00 ラットにおける ATP・PGE2 膀胱腔内放出量 (= 粘膜からの放出量) への影響を in-vivo で検討した。ナフトピジル (1 mg/kg) の全身投与は B00 ラットにおいて ATP・PGE2 放出量を低下させ、NVC を抑制した。

そして TRPV1 チャンネルを脱感作するレジニフェラトキシン (RTX) 皮下投与によって全身の TRPV1 陽性 C 線維の脱感作の影響についても検討した。RTX によって B00 ラットにおける ATP 放出量は減少傾向にあり、PGE2 放出量はむしろ増加傾向にあった。そして、RTX によって NVC は有意に亢進し、NVC が亢進したのにも関わらず膀胱容量は増大した。

これらの一見矛盾した結果は、1 ブロッカーは尿道の C 線維のみを抑制するが、RTX は尿道だけでなく膀胱の C 線維をも抑制することによると考えられた。RTX による膀胱知覚の鈍麻が膀胱の過伸展をもたらし、RTX 投与 B00 ラットでは NVC が亢進したのにも関わらず膀胱容量が増大したものと推察された。そして、RTX 投与によって、B00 膀胱で NVC が亢進し、ATP 放出量が低下、PGE2 放出量が増加したことは B00 における NVC の発生に膀胱粘膜から放出される ATP の関与は乏しく、PGE2 が NVC の発生に関連することを示した。B00 における NVC の発生に ATP ならびに TRPV1 チャンネル (RTX 感受性知覚 C 線維を含む) が関与しない結果は、これまでに報告されていない全く新しい知見である。

さらに、TRPV1 を RTX で脱感作した B00 ラットにおいて 1 ブロッカー、ナフトピジルの効果を検討した。RTX を投与したラットにおいてもナフトピジルの NVC を抑制し、粘膜

からの ATP 放出量を変化させなかったが、PGE2 放出量を有意に減少させた。この結果は、ナフトピジルは C 線維の抑制以外の経路で膀胱粘膜からの PGE2 放出を抑制し、NVC を抑制することを示唆した。そして、BOO に伴う NVC の発生に粘膜由来の PGE2 が関与することをさらに支持する結果であったと考えられた。(3) BOO に伴う NVC に PGE2 が関与することが、以上の実験から明らかとなったことから、in-vitro に立ち返り、in vitro 膀胱条片の膀胱自律収縮と PGE2 放出量に関して検討した。粘膜を除去した筋層片では膀胱自律収縮の振幅と PGE2 放出量は関連しないが、粘膜を有する全層片においては両者に有意な関連を認めた。粘膜由来 PGE2 と膀胱自律収縮の関連が in-vitro で確認された。

(4) PGE2 合成に関与する cyclooxygenase (COX)-1、COX-2 阻害薬の BOO に伴う NVC に対する効果に関して検討した。COX-1 阻害薬の NVC 抑制効果は乏しく、COX-2 阻害薬は NVC を有意に抑制した。さらに RT-PCR によって BOO に伴う COX-1 mRNA と COX-2 mRNA 発現の検討から膀胱における COX-1 mRNA 発現は BOO で変化しないが、COX-2 mRNA 発現が亢進することを明らかにした。RT-PCR による実験は膀胱を粘膜と筋層に分けて検討していないため、BOO に伴って粘膜における COX-2 mRNA 発現が亢進しているとは結論付けられない。しかし、過去の文献報告の結果を考慮し、BOO に伴って膀胱粘膜における COX-2 発現が亢進し、COX-2 によって産生が高まった PGE2 が膀胱自律収縮を促進すると推察した。

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 6 件)

Watanabe N, Akino H, Kurokawa T, Taga M, Yokokawa R, Tanase K, Nagase K, Yokoyama O. Antidiuretic effect of antimuscarinic agents in rat model depends on C-fibre afferent nerves in the bladder. BJU Int. 2013, 112:131-136 査読有.

doi:10.1111/j.1464-410X.2012.11747.x.

Ito H, Taga M, Tsuchiyama K, Akino H, Yokoyama O. IPSS is lower in hypertensive patients treated with angiotensin-II receptor blocker: Posthoc analyses of a lower urinary tract symptoms population. Neurourol Urodyn. 2013, 32:70-74 査読有.

doi:10.1002/nau.22267.

秋野裕信, 長瀬桂子, 田中一平, 渡邊 望, 大山伸幸, 三輪吉司, 横山 修. 膀胱知覚における筋層自律収縮の役割 - 上皮と間質細胞の関与も含めて -. 排尿障害プラクティス. 2012, 20:32-38 査読有.

秋野裕信, 横山 修. 膀胱機能をみる尿流

動態検査. 泌尿器外科. 2012, 25:2265-2271 査読有.

Yokoyama O, Tanaka I, Kusakawa N, Yamauchi H, Ito H, Aoki Y, Oyama N, Miwa Y, Akino H. Antimuscarinics suppress adenosine triphosphate and prostaglandin e2 release from urothelium with potential improvement in detrusor overactivity in rats with cerebral infarction. J Urol. 2011, 185:2392-2397 査読有

秋野裕信, 横山 修. Male LUTS と超音波推定膀胱重量. Urology Today. 2011, 18:46-50 査読無

[学会発表](計 15 件)

Akino H, Nagase K, Yokokawa R, Ito H, Aoki Y, Oyama N, Yokoyama O: Non-voiding contractions and intravesical release of adenosine triphosphate and prostaglandin e2 in a rat model of bladder outlet obstruction: effects of resiniferatoxin and an α 1-blocker, naftopidil, 43th Annual Meeting of the international Continence Society, 2013.8.28, Barcelona (SPA)

Nagase K, Akino H, Yokokawa R, Ishida H, Yokoyama O: The influence of the mucosa and bladder outlet obstruction on the effect of cyclooxygenase inhibitor, indomethacin, on spontaneous contractile activity in the rat bladder, 43th Annual Meeting of the international Continence Society, 2013.8.28, Barcelona (SPA)

長瀬桂子, 秋野裕信, 横川竜生, 青木芳隆, 三輪吉司, 横山 修: In vitro ラット全膀胱における膀胱内 ATP・PGE2 放出量と自律収縮: 下部尿路閉塞の影響, 第 20 回日本排尿機能学会, 2013.9.20, 静岡

秋野裕信, 長瀬桂子, 横川竜生, 横井聡始, 関雅也, 伊藤秀明, 大山伸幸, 横山 修: In vitro 全膀胱の膀胱腔外 PGE2 放出と自律収縮に対する下部尿路閉塞・ α 1 遮断薬の影響, 第 20 回日本排尿機能学会, 2013.9.20, 静岡

秋野裕信, 長瀬桂子, 横川竜生, 渡邊 望, 石田泰一, 棚瀬和弥, 大山伸幸, 三輪吉司, 横山 修: 下部尿路閉塞ラットの non-voiding contraction (NVC) と膀胱内 ATP・PGE2 放出量に対する C 線維脱感作・ α 1 遮断薬の効果, 第 101 回日本泌尿器科学会, 2014.4.26, 神戸

Akino H, Nagase K, Watanabe N, Tanase K, Oyama N, Miwa Y, Yokoyama O: Effects of C-fibre's desensitization and α 1-blocker on non-voiding contractions in a rat model of bladder outlet obstruction, 42th Annual Meeting of the international Continence Society,

2012.10.17, Beijing(CHN)
Akino H, Nagase K, Watanabe N, Tanase K, Oyama N, Miwa Y, Yokoyama O: Non-voiding Contractions Induced by Bladder Outlet Obstruction: Effects of C-fiber's Desensitization and an Alpha 1-adrenoceptor Blocker Naftopidil, 32nd congress of the Societe Internationale d'Urologie, 2012.10.1, Fukuoka(JPN)
秋野裕信, 長瀬桂子, 横川竜生, 渡邊 望, 伊藤秀明, 青木芳隆, 大山伸幸, 三輪吉司, 横山 修: レジニフェラトキシン全身投与が下部尿路閉塞ラットの non-voiding contraction と膀胱腔内 ATP・プロスタグランジン E2 放出量に及ぼす効果について, 第 19 回日本排尿機能学会, 2012.8.31, 名古屋
秋野裕信: 1 遮断薬の症状改善メカニズムを探る, 第 19 回日本排尿機能学会, 2012.8.30, 名古屋
秋野裕信, 長瀬桂子, 田中一平, 横山 修: 膀胱自律収縮に関する研究から過活動膀胱治療の新規標的を探求する, 第 100 回日本泌尿器科学会総会, 2012.4.22, 横浜
秋野裕信: 脊髄損傷ラットにおける 1-Blocker の静脈投与における膀胱活動の変化について, 第 18 回日本排尿機能学会, 2011.9.16, 福井
秋野裕信: 脳梗塞急性期における膀胱壁の ATP 放出メカニズムの亢進と C-fiber の関与について, 第 18 回日本排尿機能学会, 2011.9.16, 福井
Akino H, Nagase K, Watanabe N, Yamauchi H, Oyama N, Miwa Y, Yokoyama O: ATP and PGE2 release from the rat bladder in-vitro and in-vivo: the effect of bladder outlet obstruction and the association with bladder weight, spontaneous contraction or non-voiding contractions, 41th Annual Meeting of the international Continence Society, 2011.8.29, Glasgow(GBR)
Nagase K, Tanaka I, X Zha, Kusakawa N, Ito H, Aoki Y, Oyama N, Miwa Y, Akino H, Yokoyama O: Effects of A1-blocker on the release of ATP and prostaglandin E2 from the urethral epithelium in bo rats, 41th Annual Meeting of the international Continence Society, 2011.8.29, Glasgow(GBR)
秋野裕信, 長瀬桂子, 田中一平, 渡邊 望, 石田泰一, 棚瀬和弥, 大山伸幸, 三輪吉司, 横山 修: 下部尿路閉塞での in-vitro 膀胱自律収縮と膀胱粘膜由来 ATP 放出量, 第 99 回日本泌尿器科学会, 2011.4.21, 名古屋

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.u-fukui.ac.jp/home/ufms/file/kenkyu/welcome.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
秋野裕信 (AKINO HIRONOBU)
福井大学・医学部・准教授
研究者番号: 90159335

(2) 研究分担者
横山 修 (YOKOYAMA OSAMU)
福井大学・医学部・教授
研究者番号: 90242552

渡邊 望 (WATANABE NOZOMU)
福井大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 80572429