

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462507

研究課題名(和文)慢性脊損後排尿障害に関連する神経ペプチドと代謝型グルタミン酸信号伝達の可塑性変化

研究課題名(英文)Plastic changes in transmission of neuropeptide and metabotropic glutamate related to voiding dysfunction after chronic spinal cord injury

研究代表者

芳山 充晴 (YOSHIYAMA, Mitsuharu)

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号：20422694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：野生型(WT)脊損マウスと代謝型グルタミン酸サブタイプ1a遺伝子欠損(mGluR1a-KO)脊損マウスの下部尿路機能を膀胱内圧測定と外尿道括約筋電図を用いて比較した。WTに比し、mGluR1a-KOは排尿筋外尿道括約筋協調不全(DSD)が更に著しかった。WT脊損マウスにmGluR5拮抗薬を投与すると膀胱収縮時のDSD発生の頻度が増した。以上の結果は、脊損後排尿困難において、mGluR1a、及び、mGluR5を介する神経信号伝達は、抗DSDとして作用していることを示す。

研究成果の概要(英文)：We compared the lower-urinary-tract function of the wild type (WT) spinal cord injured mouse and the metabotropic glutamate receptor subtype 1a (mGluR1a-KO) gene deficit spinal cord injured mouse, using a cystometrogram and external urethral sphincter (EUS) electromyogram (EMG). The mGluR1a-KO presented more marked detrusor-sphincter dyssynergia (DSD) compared with WT. The mGluR5 antagonist increased the occurrence rate of DSD in the WT spinal cord injured mouse. The above results suggest that the neural transmission via mGluR1a and mGluR5 is involved in anti-DSD in urinary voiding dysfunction after spinal cord injury.

研究分野：排尿機能学

キーワード：下部尿路機能 膀胱 外尿道括約筋 マウス 排尿障害 脊髄損傷 興奮性グルタミン酸受容体 神経ペプチド

1. 研究開始当初の背景

(核上性) 脊髄損傷により上位中枢から副交感神経核(膀胱へ)とオヌフ核(外尿道括約筋へ)を有する腰仙髄への神経伝達経路が途絶えると排尿障害を来す。慢性期には「膀胱過活動」と「排尿筋尿道括約筋協調不全」の病態を呈し、有病患者の生命予後に多大なる影響を及ぼす。脊損後の「膀胱過活動」は、無髄性C繊維を介する求心性神経伝達の異常亢進が関与することが明らかにされた。一方、(正常では膀胱の排尿収縮に伴い外尿道括約筋が弛緩するのに対し)膀胱収縮時に外尿道括約筋も同時収縮してしまい高圧排尿の病態を呈する「排尿筋尿道括約筋協調不全」に関しては、その発症機序に関して未だに不明な点が多い。

2. 研究の目的

(核上性) 脊髄損傷の慢性期では、「膀胱過活動」と「排尿筋尿道括約筋協調不全」を呈することがある。後者の病態においては、尿路感染症、水腎症、腎盂腎炎を惹き起こすことがあり、有病患者の「生活の質」のみならず「生命予後」をも脅かすことから有効な治療法の開発が急がれる。本研究では、腰仙髄レベルにおいて膀胱、及び、外尿道括約筋の機能制御への関与が示唆されるVIP/PACAP(神経ペプチド)と代謝型グルタミン酸を介する信号伝達に着目し、脊髄損傷慢性期に生じる下部尿路機能障害の発症機序と治療への応用を検討した。

3. 研究の方法

脊髄損傷によるVIP/PACAP信号伝達と代謝型グルタミン酸(mGlu)信号伝達における可塑性変化を精査・検討するにあたり、脊髄損傷マウスを作成し、分子生物学的、薬理学的手法を用いて正常マウスと比較した。使用するマウスは通常のC57BL/6に加え、当施設現有のmGluR1ノックアウト・マウス(C57BL/6バックグラウンド)を用いた。マウスの膀胱、第6腰髄/第1仙髄(L6/S1)後

根神経節(DRG)、L6/S1脊髄におけるmGluR5遺伝子発現を定量的に測定。in vivo下部尿路機能評価として、代謝ケージ解析、並びに、シストメトリー法(膀胱内圧測定)、外尿道括約筋筋電図検査、薬理学的実験を実施した。

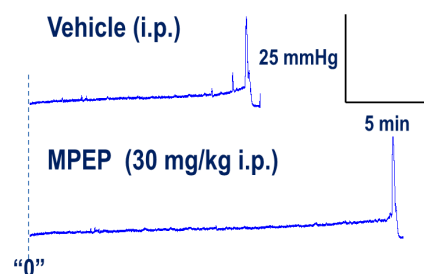
4. 研究成果

(1) 代謝型グルタミン酸受容体サブタイプ5(mGluR5)遺伝子発現: 脳幹、脊髄(L6/S1)、及び、L6/S1-DRGにmGluR5遺伝子発現を確認した(表1)。一方、膀胱上皮、排尿筋、尿道への発現は無く、また、雌雄差も無かった。

| | L6 DRG | S1 DRG | L6/S1 脊髄 | 橋 | 中脳 |
|---|-------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| メ | 0.18 ± 0.01 | 0.18 ± 0.04 | 19.6 ± 0.8 | 13.6 ± 1.1 | 25.3 ± 2.5 |
| オ | 0.12 ± 0.01 | 0.15 ± 0.01 | 19.2 ± 0.8 | 17.3 ± 0.9 | 26.4 ± 2.2 |

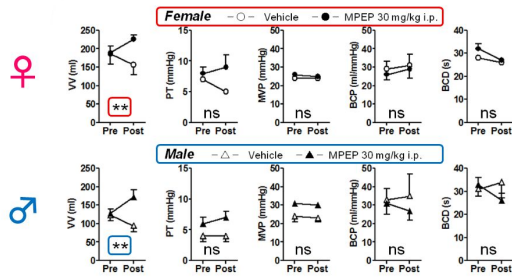
(2) 代謝型グルタミン酸受容体サブタイプ5(mGluR5)拮抗薬の効果: 図1で示すように、mGluR5拮抗薬であるMPEP(30 mg/kg)を腹腔内投与すると、蓄尿量を増加した。MPEPは、一回排尿量(VV)を増加したが、排尿圧閾値(PT)、最大排尿収縮圧(MVP)、膀胱収縮時間(BCD)、膀胱コンプライアンス(BCP)に影響しなかった(図2)。以上の結果は、mGluR5が膀胱からの興奮性求心性信号伝達に関与することを示唆

図1



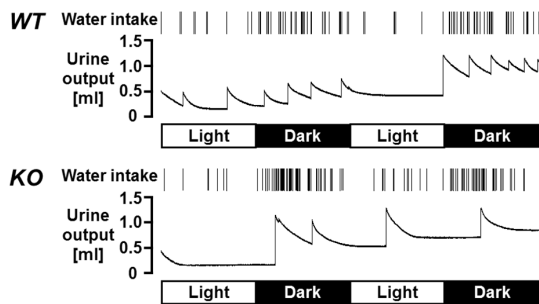
する。

図2



(3) 代謝型グルタミン酸受容体サブタイプ 1a(mGluR1a)遺伝子欠損(KO)マウスの下部尿路機能評価：(オスの)mGluR1a-KOマウスと野生型マウスの下部尿路機能を、代謝ケージを用いた自発排尿行動(図3)、及び、シストメトリー法(図4)を用いた排尿反射を評価した。自発排尿行動評価において、KOマウスは野生型(WT)マウスに比べ一回排尿量(UVV)が多く、一日排尿回数(VF)が少なかった(図3・表2)。

図3



| | WI (ml/日) | UO (ml/日) | VF (/日) | UVV (μ l) |
|----|---------------|---------------|-----------------|-------------------|
| WT | 2.9 \pm 0.3 | 1.6 \pm 0.1 | 7.3 \pm 0.8 | 255 \pm 39 |
| KO | 2.7 \pm 0.2 | 1.6 \pm 0.1 | 3.7 \pm 0.3** | 458 \pm 48** |

一日摂水量(WI)と一日排尿量(UO)において、2群間に有意差は無かった。一方、シストメトリー法評価において、KOマウスはWTマウスに比べ膀胱容量(VT)が大きく、膀胱

コンプライアンス(BCP)と最大排尿収縮圧(MVP)が高く、排尿効率(VE)が低かった(図4・表3)。

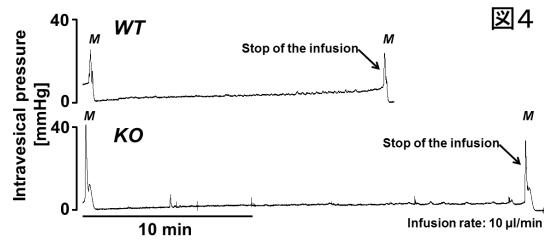


図4

| | MVP (mmHg) | BCP (μ l/mmHg) | VT (μ l) | VE (%) |
|----|---------------|------------------------|------------------|-----------------|
| WT | 27 \pm 1 | 26 \pm 3 | 167 \pm 12 | 97.2 \pm 0.6 |
| KO | 32 \pm 1* | 78 \pm 9*** | 328 \pm 59*** | 93.8 \pm 1.3* |

以上の結果は、mGluR1aが膀胱からの興奮性求心性信号伝達に関与すること、排尿収縮時外尿道括約筋興奮性入力の抑制性制御に関与することを示す。

(4) 慢性脊損マウスの下部尿路機能評価：典型的な慢性脊損(SCI)WTマウスの膀胱内圧変化と外尿道括約筋筋電図を図5に示す。

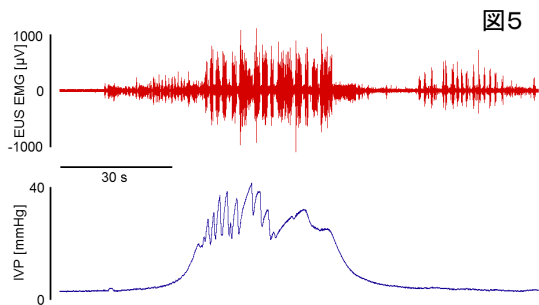


図5

SCI-WTマウスにおいて、MPEPは各膀胱収縮あたりの排出回数(No. of evacuation)を減少した。これに伴い、総排出時間(TED)を減少し、残尿量を増加したため、排尿収縮間隔(IMI)を短縮した(図6)。SCI-KOマウスでは、

より短縮した TED を呈した。そして、MPEP(30 mg/kg)投与は、更に排出回数を減じた。

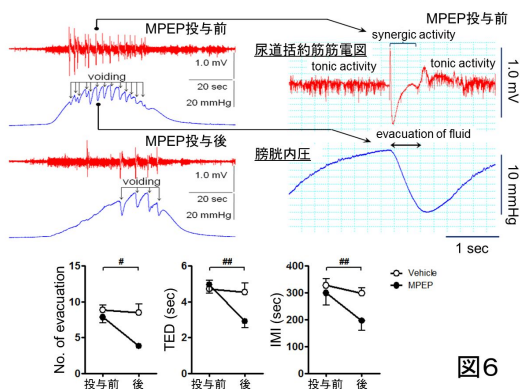


図6

(5) ヒト膀胱における PACAP サブタイプ遺伝子(PAC1、VPAC1、VPAC2)発現(x 1000)(表 4) :

| | PAC1 | VPAC1 | VPAC2 |
|----|------------|-----------|-------------|
| 粘膜 | 15.4 ± 5.8 | 4.1 ± 2.6 | 32.1 ± 16.3 |
| 筋層 | 25.1 ± 5.4 | 3.0 ± 1.8 | 19.7 ± 6.0 |

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5件)

Yoshiyama M, Mochizuki T, Nakagomi H, Miyamoto T, Kira S, Mizumachi R, Sokabe T, Takayama Y, Tominaga M, Takeda M. Functional roles of TRPV1 and TRPV4 in control of lower urinary tract activity: dual analysis of behavior and reflex during the micturition cycle. American Journal of Physiology Renal Physiology 査読有 Vol., 308 No. 10, 2015, pp. F1128-F1134,

DOI: 10.1152/ajprenal.00016.2015

芳山充晴、中枢性グルタミン酸、モノアミン作動性下部尿路機能制御、山梨医科学誌、査読有、28巻、1号、2013、pp. 17-29、<http://opac.lib.yamanashi.ac.jp/opac/repository/1/29267/YMJ28-1-017to029.pdf>

Kamiyama M, Fukasawa M, Takihana Y, Sawada N, Nakagomi H, Yoshiyama M, Araki I, Takeda M. Distribution and possible function of cannabinoid receptor subtype 1 in the human prostate. Open Journal of Urology 査読有 Vol. 3, No. 2, 2013, pp. 102-109, DOI: 10.4236/oju.2013.32020

Zakoji H, Kobayashi H, Yoshiyama M, Takeda M, Araki I. Expression of large conductance, voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channels in human urinary bladder: alteration of subunit expression profile in association with bladder outlet obstruction. Open Journal of Urology 査読有 Vol. 3, No. 2, 2013, pp. 47-52, DOI: 10.4236/oju.2013.32009

Yoshiyama M, Roppolo JR, Takeda M, de Groat WC. Effects of urethane on reflex activity of lower urinary tract in decerebrate unanesthetized rats. American Journal of Physiology Renal Physiology 査読有 Vol. 304, No. 4, 2013, pp. F390-F396, DOI: 10.1152/ajprenal.00574.2012

[学会発表](計26件)

Mitsuharu Yoshiyama, Masayuki Takeda Metabotropic glutamate receptor subtypes 1 and 5 synergistically modulate bladder filling function in mice, The 31st Annual Congress of the European Association of Urology, March 13, 2016, Munich (Germany)

Tatsuya Ihara et al (8番目) Clock genes regulate circadian rhythm of Piezo1 and TRPV4 expressions and intracellular Ca²⁺ influx after stretch stimulation in the cultured urothelial cells, The 31st Annual Congress of the European Association of Urology, March 13, 2016, Munich (Germany)

Kobayashi H et al (7番目) Investigation of LUTS (lower urinary tract symptoms) with pelvic organ prolapse (cystocele), International Continence Society 45th Annual meeting, October 8, 2015, Montreal (Canada)

Tamami Taniguchi et al (6番目) The long-term effect of a special programme of pelvic floor muscle training for female patients with LUTS in Japan, International Continence Society 45th Annual meeting, October 8, 2015, Montreal (Canada)

Mitsuharu Yoshiyama(他2名) Roles of metabotropic glutamate receptor subtype 1a in lower urinary tract function of mice, International Continence Society 45th Annual meeting, October 7, 2015, Montreal (Canada)

Katsumi Kadekawa et al (2番目) Characterization of bladder and external urethral sphincter activity in mice with or without spinal cord injury - a comparison study with rats, International Continence Society 45th Annual meeting, October 7, 2015, Montreal (Canada)

Tatsuya Ihara et al (6番目) Clock mutant mouse is a novel experimental model for nocturia/nocturnal polyuria, International Continence Society 45th Annual meeting, October 7, 2015, Montreal (Canada)

芳山充晴、望月勉、武田正之. 代謝型グルタミン酸受容体1aサブタイプ欠損マウスの下部尿路機能評価、第22回日本排尿機能学会、2015年9月9日、京王プラザホテル札幌(札幌市・北海道)

井原達矢、他(7番目) 時計遺伝子異常による膀胱上皮Piezo1発現の変化と排尿への影

響、第22回日本排尿機能学会、2015年9月9日、京王プラザホテル札幌(札幌市・北海道)
Mitsuharu Yoshiyama(他2名) Functional roles of metabotropic glutamate receptor subtype 1a in control of lower urinary tract activity in mice, American Urological Association Annual Meeting, May 16, 2015, New Orleans, Louisiana (U.S.A.)

Mitsuharu Yoshiyama(他2名) Involvement of metabotropic glutamate receptor subtype 1a in a mouse lower urinary tract function, The 30th Annual Congress of the European Association of Urology, March 23, 2015, Madrid (Spain)

Mitsuharu Yoshiyama(他2名) Systemic administration of an acid-sensing ion channel blocker alleviates bladder hyperactivity induced by intravesical acetic acid irritation in mice, International Continence Society 44th Annual meeting, October 22, 2014, Rio de Janeiro (Brazil)

芳山充晴 (他2名)ASIC阻害薬腹腔内投与はマウスにおける酢酸膀胱内灌流誘発の膀胱過活動を緩和する、第25回日本排尿機能学会、2014年9月18日、岡山コンベンションセンター(岡山市・岡山県)

Mitsuharu Yoshiyama(他2名) Systemic injection of A-317567, an acid-sensing ion channel blocker alleviates bladder hyperactivity induced by intravesical acetic acid irritation in decerebrate unanesthetized mice, The 9th Pan-Pacific Continence Society Meeting, September 13, 2014, Taichung (Taiwan)

Mitsuharu Yoshiyama (他3名) Acid-sensing ion channels are involved in afferent excitatory transmission controlling reflex bladder activity in

mice, American Urological Association Annual Meeting, May 17, 2014, Orlando, (U.S.A.)

芳山充晴、尿排出障害治療における中枢神経系分子標的の探索、第102回日本泌尿器科学会総会、2014年4月25日、神戸国際会議場(神戸市・兵庫県)

吉良聡 他(2番目)膀胱におけるP2Y受容体系の発現と機能的役割に関する検討、第102回日本泌尿器科学会総会、2014年4月25日、神戸国際会議場(神戸市・兵庫県)

Satoru Kira et al(2番目) Purinergic transmission via P2Y6 receptor plays an essential role in bladder storage function in mice, 29th Annual Congress of the European Association of Urology, April 11-15, 2014, Stockholm (Sweden)

吉良聡 他(2番目) P2Y6 receptors plays a critical role in bladder storage function in mice (P2Y6受容体は膀胱蓄尿機能に関与している)、第87回日本薬理学会年会、2014年3月19日、東北大学百年記念会館川内萩ホール・仙台国際センター(仙台・宮城県)

Hidenori Zakoji et al(10番目)

Urethroplasty for the difficult cases of anterior urethral stricture, The 8th Pan-Pacific Continence Society Meeting, September 27, 2013, Busan (Republic of Korea)

②①Hideki Kobayashi et al(6番目) Efficacy of the beta3-adrenoceptor agonist mirabegron in patients with stress urinary incontinence, The 8th Pan-Pacific Continence Society Meeting, September 27, 2013, Busan (Republic of Korea)

②②Mitsuharu Yoshiyama (他2名) Metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonist increases bladder capacity

without impairing voiding in decerebrate unanesthetized mice, The 8th Pan-Pacific Continence Society Meeting, September 27, 2013, Busan (Republic of Korea)

②③芳山充晴、膀胱上皮・排尿筋・末梢神経を標的にした下部尿路機能障害治療薬の開発、イブニングセミナー2・創薬へ導く排尿生理研究の最前線、第20回日本排尿機能学会、2013年9月19日、静岡コンベンションアーツセンター(グランシップ)(静岡市・静岡県)

②④Hideki Kobayashi et al(6番目) Efficacy of the beta3-adrenoceptor agonist mirabegron in patients with stress urinary incontinence, International Continence Society 43rd Annual meeting, August 26-30, 2013, Barcelona (Spain)

②⑤Mitsuharu Yoshiyama et al(他3名) Neither systemic nor intravesical administration of A-317567, an acid-sensing ion channel blocker affect the lower urinary tract activity in decerebrate unanesthetized mice, International Continence Society 43rd Annual meeting, August 27, 2013, Barcelona (Spain)

②⑥Mitsuharu Yoshiyama et al(他2名) Metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonist facilitates urine storage without impairing micturition in mice, American Urological Association Annual Meeting, May 5, 2013, San Diego (U.S.A.)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芳山 充晴 (YOSHIYAMA, Mitsuharu)
山梨大学・総合研究部・医学研究員
研究者番号：20422694

(2) 研究分担者

吉良 聡 (KIRA, Satoru)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：10530115