

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462517

研究課題名(和文) 進行性膀胱機能障害への分子スイッチの探索

研究課題名(英文) Discovery of a molecular switch for progressive bladder dysfunction

研究代表者

松岡 俊光 (Matsuoka, Toshimitsu)

福島県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60528280

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)：中高年男性の前立腺肥大症による尿道の閉塞は、排尿時に膀胱へ負荷をもたらす徐々に膀胱機能を障害する。この慢性的な膀胱機能障害に膀胱低酸素状態が関わっていることは知られている。本研究では膀胱は低酸素に対してHIF-1を誘導し、血管新生を促進して低酸素を代償し機能を維持していることを示した。しかし低酸素が持続するとp53が誘導され、HIF-1を抑制し低酸素の代償機構が破たんしていた。その後、膀胱機能障害は進行していくことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bladder hypertrophy occurs as a compensatory response to infravesical obstruction, such as benign prostatic hyperplasia (BPH). However, this condition may also be an indication of ongoing pathogenic processes and entrance into a decompensatory stage. In addition, ischemia is also known to induce in men with bladder outlet obstruction as a result of BPH. This study has shown that hypoxia induces the expression of HIF-1 mRNA and encourages angiogenesis in bladder tissue. In addition, continuous hypoxia induces the expression of p53 mRNA and suppresses the expression of HIF-1 mRNA in bladder tissue. Taken together, our study suggests that p53 breaks down compensatory mechanism for hypoxia in the bladder, and then result in detrusor contractile dysfunction.

研究分野：下部尿路機能

キーワード：尿道部分閉塞 HIF-1 p53 膀胱 低酸素 虚血

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 中高年男性の下部尿路機能障害は前立腺による尿道閉塞だけでなく閉塞により徐々に膀胱機能も障害される。そのため慢性進行性疾患と位置付けられるようになり、膀胱収縮不全はその終末像である。このような低活動膀胱の状態に至るとその対処法は限られ現時点では収縮機能の回復は不可能である。これまで私たちはこの臨床上の難題を解決すべく尿道部分閉塞ラットを用いて、検討してきた。

(2) 私たちは尿道部分閉塞後の膀胱(閉塞膀胱)の機能障害の主な要因は、低酸素による酸化ストレスであることを明らかにした。さらに膀胱は加齢に伴い酸化ストレスに対し弱くなり障害を受けやすくなることを証明した。そこで酸化ストレスを抑制する ARB が、閉塞膀胱の機能障害に有効ではないかと仮説を立て、膀胱収縮不全に有用であることを実証した。これらの研究成果を生かし臨床応用するためには、このような抗酸化作用を持つ薬剤をいつから投与すれば有用か、その指標を確立することが重要であると考えた。一方、私たちは膀胱平滑筋が閉塞による過剰な伸展刺激で、リン酸化酵素 JNK を介した増殖シグナルを活性化させ、肥大した膀胱平滑筋が収縮を維持することを明らかにしてきた。しかし肥大した膀胱組織全体に従来の血管分布では酸素が十分供給できず低酸素となる。そこで HIF-1 が発現し血管新生が誘導されて膀胱の低酸素は代償され機能が維持される。この代償のメカニズムが破綻すると非可逆性の膀胱収縮不全におちいるのではないかと考えた。

(3) その鍵となる分子の候補として p53 に着目した。p53 は血管新生の阻害、アポトーシスの誘導などで癌を抑制する。一方、p53 の活性が高くなると癌は抑制されるものの臓器障害をもたらす寿命を短縮することも知られている。最近、心血管系では低酸素の

環境下で p53 がリン酸化され細胞内に蓄積し血管新生を阻害することが見出された。

持続する低酸素によって p53 は活性化され HIF-1 を抑制し血管新生を阻害することが他臓器で知られている。

## 2. 研究の目的

一般的に閉塞による膀胱機能障害の主因は組織の低酸素による酸化ストレスと考えられている。私たちの発見した ARB 同様、今後様々な抗酸化剤の有用性が報告されると思われる。しかしながらこのような薬をいつから使用すれば有用であるのか、その指標は临床上重要であるが未だ見つかっていない。そこで私たちは初期には低酸素に対し代償機構により機能が維持されている点に注目し、非可逆性の膀胱収縮不全に陥る最も重要なターニングポイントは代償機構の破綻ではないかと考えた。このような観点から膀胱機能障害のメカニズムを検討した報告はなく、この破綻の分子スイッチとして p53 は有力な候補である。

本研究では、経時的な経過で HIF-1 が p53 により抑制され、血管新生因子の発現低下、新生血管の減少、低酸素環境の進行、膀胱収縮不全にいたるか明らかにする。

## 3. 研究の方法

12 週齢オス SD ラットに尿道部分閉塞作成あるいはシャム手術をし 2 週ごとに 18 週齢まで経時的に以下の結果を比較する。

(1) 膀胱収縮機能は連続的膀胱内圧測定と同時に排尿量、残尿量を記録し評価する。

(2) 膀胱組織の HIF-1 と p53 はリアルタイム RT-PCR 法で mRNA 発現レベルを定量的に評価する。

(3) 膀胱の低酸素は hypoxyprobe による膀胱壁の組織染色で評価する。

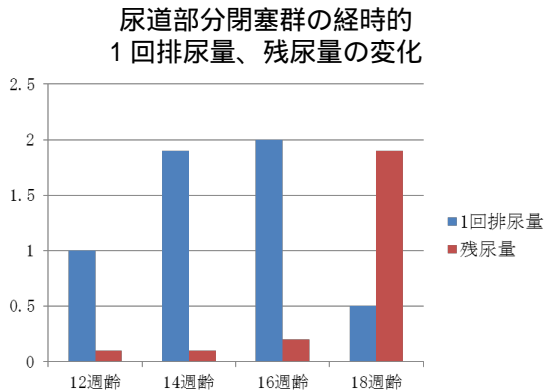
(4) 血管新生による 40  $\mu$ m 前後の微小血管を抗 CD31 抗体による免疫組織染色でその発現を評価する。

(5) p53 活性剤キナクリン (5 mg/kg/day)

をミニ浸透圧ポンプで持続投与して膀胱収縮機能障害の発現時期を評価する。

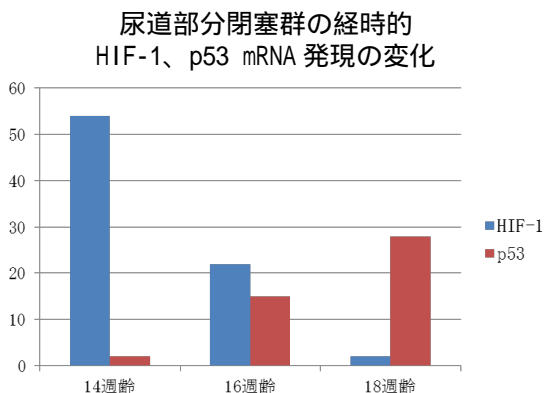
#### 4. 研究成果

(1) 連続的膀胱内圧測定、排尿量、残尿量測定の結果はシャム手術群では経時的な変化は認めなかった。一方、尿道部分閉塞群では排尿時最大膀胱内圧に変化はなかったが、1回排尿量、残尿量の発生など下図のごとく閉塞後に経時的变化を認めた。



排尿時最大膀胱内圧の低下は認められなかった。しかしながら尿道閉塞という特殊な状況も考えると1回排尿量の減少、残尿の発生から閉塞作成6週間までに膀胱の収縮機能低下は起きていると考えられた。

(2) HIF-1 と p53 の mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR 法で検討した。それぞれ12週齢の発現レベルを基準として解析した。シャム手術群ではどちらも経時的变化は見られなかった。一方、尿道部分閉塞群では HIF-1 の発現が閉塞作成2週間には増加しており、p53 の発現は4週間から上昇して下図のような経時的变化を認めた。



尿道閉塞により膀胱組織では HIF-1 の誘導がまず起こり、その後 p53 の発現と共に HIF-1 の抑制を認めた。

(3) 膀胱組織の低酸素状態を hypoxyprobe キットを使用し免疫組織染色にて評価した。シャム手術群では、陽性反応を認めなかった。一方、尿道部分閉塞群では、閉塞作成2週間から膀胱筋層に陽性反応認め、6週間後で最も強かった。

(4) 膀胱壁内の単位面積当たりの微小血管の数はシャム手術群では経時的变化は認めなかった。一方、尿道部分閉塞群では14週齢、16週齢と増加し、18週齢ではそれ以上の増加を認めなかった。

(5) p53 活性剤キナクリンを持続投与した。シャム手術群では特に効果は認められなかった。尿道部分閉塞群でもキナクリン投与による膀胱機能、組織学的検討結果には影響認められなかった。16週齢での p53 発現レベルは非投与時と比べ増強していた。

以上の結果から尿道部分閉塞により膀胱壁は低酸素状態になること、それに対し HIF-1 により血管新生が誘導され代償していること、しかし持続的な低酸素状態から p53 が誘導され HIF-1 が抑制され代償機構が破たんすることが示唆された。P53 活性剤の効果がほぼ認められなかったことに関してはさらに検討が必要である。

#### 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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松岡 俊光 (Matsuoka Toshimitsu)  
福島県立医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：60528280

### (2) 研究分担者

櫛田 信博 (Kushida Nobuhiro)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30381396

羽賀 宣博 (Haga Nobuhiro)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：50586617

小島 祥敬 (Kojima Yoshiyuki)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60305539

相川 健 (Aikawa Ken)  
福島県立医科大学・医学部・準教授  
研究者番号：80295419