

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462447

研究課題名(和文)膀胱粘膜に存在する自律収縮 その特性と過活動膀胱の新規発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) A novel mechanism of over active bladder caused by the spontaneous contractions generated in the mucosal layer

研究代表者

榑田 信博 (Kushida, Nobuhiro)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30381396

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)：過活動膀胱患者は尿失禁や頻尿のためにQOLが低下するが、今後高齢化社会が進行し者数が増加するとされる。尿路上皮層を含む膀胱粘膜層は、排尿筋層や間質細胞、神経細胞に対して生理活性物質を放出することで下部尿路機能を制御に関与している。今回我々は粘膜層に存在する自律収縮機構とATP放出能機構を研究し、過活動膀胱発症の新たなメカニズムを解明したいと考えた。

今回の検討においては過活動膀胱モデルとして卵巢摘除モルモットを使用した。このモデルは頻尿傾向となり、粘膜層から放出されるATP量が増加、また膀胱粘膜層の自律収縮量もATP濃度により影響を受けることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Over active bladder patients are known to cause impaired quality of life because of pollakiuria and urgency urinary incontinence. The number of the patient will increase due to the increasing of the aging population. The mucosal layer in the bladder including urothelial layer associates with regulations of the lower urinary tract functions by releasing some bioactive substances. We focused on the spontaneous contractions in the mucosal layer and the ability of ATP release from the layer in order to study the novel mechanisms causing over active bladder symptoms. In this study, we used ovariectomized guinea pigs as an over active bladder model. The model caused pollakiuria as well as increased ATP release from the mucosal layer. We also showed that the spontaneous contractions in the mucosal layer could be affected by the ATP, which was probably released from the mucosal layer.

研究分野：排尿学

キーワード：下部尿路機能 過活動膀胱 ATP 尿路上皮 膀胱粘膜

1. 研究開始当初の背景

(1) 過活動膀胱患者は日常生活において尿失禁や頻尿のために QOL の低下が生じている。これまでは過活動膀胱の患者に対する治療は抗コリン剤および β_3 作動薬の投与が主な手段であったが、その有効性はいまだ限定的である。蓄尿状態を安定させて尿禁制を保つことはよりよい日常生活を送るために重要である。今後日本はますます高齢化社会が進行し、それにつれて過活動膀胱患者数が増加することが予想されており、上記の病態をこれまでとは別の観点から解明し、新たな治療法を開発することは大切である。

(2) 以前から膀胱壁には尿を貯留する時の電解質や細菌に対し防御機能、輸送機能があることが知られていた。さらに近年では尿路上皮から粘膜にかけての層が、その周囲に存在する知覚神経や筋繊維芽細胞・排尿筋などに種々の物質を放出する機能を有していることが明らかとなりつつある。最近の研究では、壁の伸展や浸透圧の変化の刺激で、粘膜層からサブスタンス P、一酸化窒素、ATP、ACh などが放出されることがわかってきた。膀胱の粘膜層は排尿筋層や神経組織と一緒にあり、ユニットとして排尿機能を制御しているものと思われ、粘膜層の機能を研究することで過活動膀胱の新たなメカニズムを明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

(1) 膀胱壁から作製された全層切片は自律収縮を持つことが以前より良く知られており、薬剤の膀胱に対する有効性などについても主にこの自律収縮量をメルクマールとして研究されることが多い。また閉塞膀胱を作製するなどにより実験的に膀胱を過活動状態にすると、自律収縮の頻度が増加することが報告されている。またこれまでのヒトの膀胱の全層切片を用いた報告でも、過活動膀胱患者から摘出した膀胱全層切片の自律収縮

は、正常な膀胱から得られた切片と比較して収縮の頻度・張力が大きく、また周期もばらついている(引用文献(1))ことが証明されている(図1)。

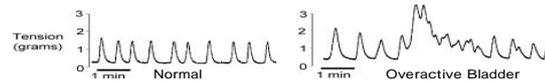


図1: ヒト膀胱全層の自律収縮、文献(1)より

(2) これまでの我々の予備的な検討では、モルモットの膀胱壁を丁寧に剥離して排尿筋層と粘膜層に分離すると、粘膜層が自律収縮機能を持っていることがわかった。粘膜層の自律収縮について詳細に検討した論文は少なく、また過活動膀胱などの病的状態の膀胱を使用し、粘膜層・排尿筋層を分離させて行った研究はこれまでないものと思われる。我々は粘膜層が伸展刺激などで ATP などの生理活性物質を放出することで、自身の自律収縮量を制御しているのではないかと考えた。自律収縮量やそのパターンが粘膜機能の状態を反映している可能性があり、過活動膀胱患者の障害の程度を推定する新たな指標としても活用できるかどうか検討した。

(3) モデル動物としては当初は脊髄損傷や閉塞膀胱モデルを想定したが、卵巣摘除(OVX)モデルが過活動膀胱モデルとしての排尿状態が安定していたので(引用文献(2))今回の検討で使用した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験には膀胱粘膜層と排尿筋層の剥離が容易である雌モルモットを使用した。実験動物の管理に関しては福島県立医科大学動物実験規程に従い、承認を得て施行した。

(2) 過活動膀胱モデル

500 g 雌モルモットの両側卵巣を背面切開で摘除した群を卵巣除(OVX)群(n=10)とし、切開のみの群を偽手術群(n=10)とした。手術4週間後に代謝ゲージを使用して24時間飲水量、排尿量、排尿回数を記録、膀胱と子

宮を摘出して重量を測定し、また血中の エストラジオール濃度を測定した。

(3) 生理学的実験

摘出した膀胱を縦切開し、粘膜・排尿筋層の間を顕微鏡下に剥離した粘膜切片と、膀胱の全層を含む全層切片(6 mm×2mm 大)を作製した(図2)。

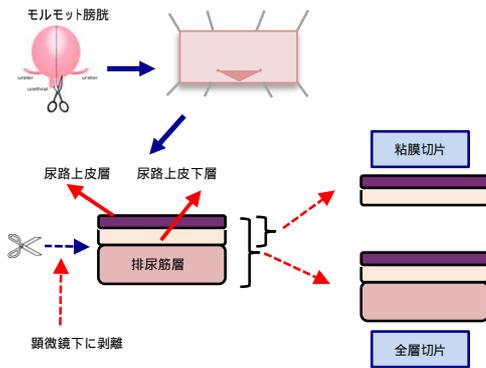


図2

これらの切片を酸素化したタイロイド液を灌流した水平型のチャンパーに懸架、一端をトランスデューサーへ懸架して、粘膜切片・全層切片の等尺性張力を測定した(図3)。

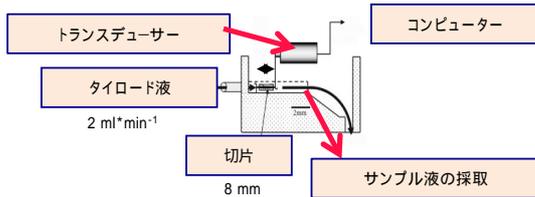


図3

(4) ATP 測定法

チャンパーへ懸架した粘膜切片の2 mm 後方の部位のタイロイド液をピペットで 100 μM 吸引し、そのうちの 20 μM を使用してルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を用いて、灌流液中に含まれる ATP 濃度を測定した(図3)。

(5) 組織学的検討

収縮実験後に組織標本を作製し、各切片の平滑筋包有量を HE 及びエラスティカ-マッソン染色を行いソフト Image J で計測した。

(6) 統計的手法

収縮反応を痙攣性収縮と自律収縮とにコンピュータソフトで分離し、Area-Under-the-Curve (AUC) で自律収縮量

を計測して、その大きさを切片間で比較した(図4)。

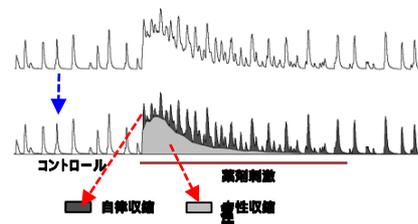


図4

4. 研究成果

(1) 粘膜層に存在する自律収縮量

膀胱の各種切片における 10 分間の自律収縮量を AUC で表記(ACU は各切片の断面積(mm²)で補正; 断面積(mm²) = 重量(mg)/ρ*長さ(mm)、ρ = 切片の比重(1.05 g/cm³)) して比較すると、粘膜切片の自律収縮量は全層、排尿筋、粘膜切片でそれぞれ 10.5、0.94、3.5 mN*sec/mm² であり、粘膜切片の自律収縮量は排尿筋切片に比較して有意に大きかった(図5)。

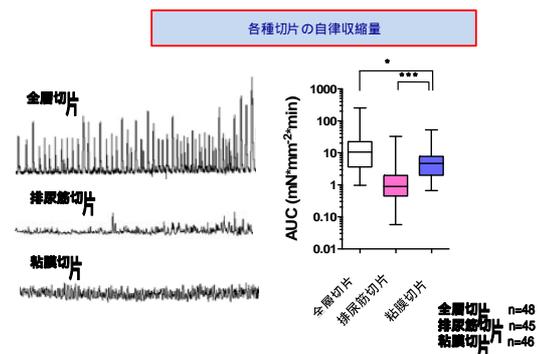


図5

(2) 過活動膀胱モデル

本研究では、過活動膀胱モデルとして両側の卵巣を摘除した OVX モデルを使用した。卵巣摘除を行うと過活動膀胱状態になるかどうか、当モデルでも検討した。

OVX 群の4週間後に血中の エストラジオール値を測定したところ OVX 群で有意に高値であった(偽手術 170.4、OVX 群 59.46 pg/ml) (図6)。

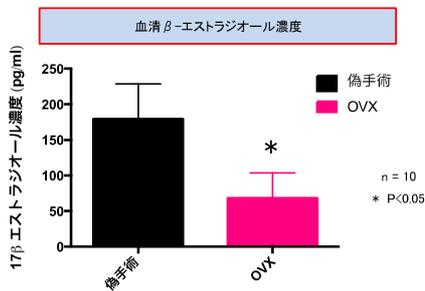


図 6

1 日の飲水量や排尿量に関しては偽手術、OVX 群を比較して有意差は認めなかった。排尿回数に関しては OVX 群で有意に多かった (表 1)

	偽手術群 (n=10)	OVX群 (n=10)
モルモット重量 (g)	511.1 ± 4.55	483.3 ± 6.87
子宮重量 (mg)	1475 ± 89.9	227.4 ± 38.0 *
膀胱重量 (mg)	610.4 ± 53.7	479.5 ± 47.1
24 時間飲水量 (ml)	29.3 ± 6.48	31.3 ± 6.74
24 時間尿産生量 (ml)	27.2 ± 4.94	26.0 ± 3.45
24 時間排尿回数	5.83 ± 0.79	8.83 ± 1.33 *
平均 1 回排尿量 (ml)	5.02 ± 0.47	3.57 ± 0.58 *

表 1

チストメトリーに関しては、生理食塩水を 0.66 ml/min で注入していくと、OVX 群では有意に 1 回排尿量が低下していた (偽手術群 : OVX 群 = 14.2 ± 2.4 : 10.8 ± 5.9 分) (図 7)

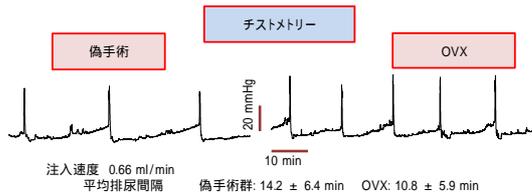


図 7

膀胱の組織学的な検討

膀胱粘膜と排尿筋を剥離した粘膜切片には筋はほとんど含まれていなかった。また OVX 群、偽手術を比較して包有される全層切片の排尿筋量に関しては意両群間で有意差を認めなかった。

(3) 粘膜層に存在する自律収縮量の比較

粘膜層に存在する自律収縮について偽手術、OVX 群で比較した。自律収縮量の基礎値においては偽手術群、OVX 群で有意差を認めなかった (偽手術群 : OVX 群 = 2.9 ± 2.4 : 3.5 ± 1.6 mN*sec/mm²)。100 μM ATP を包有するタ

イロード液で粘膜切片を還流すると両群とも自律収縮量の増加をみとめた。自律収縮量の増加率を両群間で比較すると OVX 群で有意に大きい結果となった (図 8)

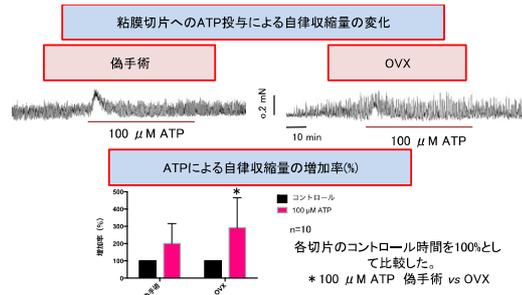


図 8

(4) 粘膜層から放出される ATP について

粘膜放出される ATP は生理活性物質として働くことが知られている。粘膜切片を 10 mN の伸展で刺激したときの放出される ATP の量について検討した (図 9)

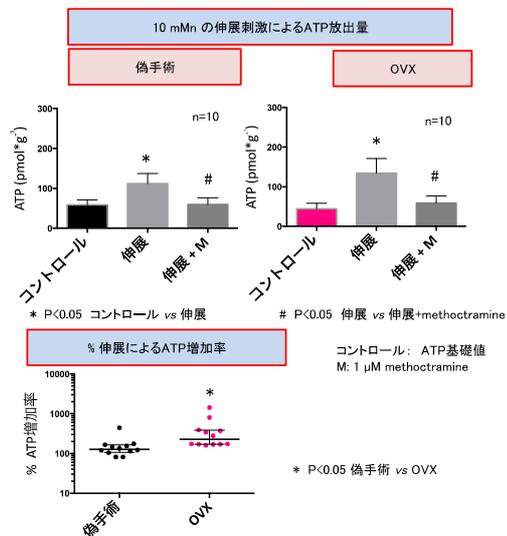


図 9

ATP の基礎値は両群間で差がなく、伸展刺激により両群間とも有意に ATP 放出量が増加した。増加率に関してみても、OVX 群で有意に大きかった。

(5) 全層切片の収縮反応

全層切片のカルバコールに対する収縮反応では、OVX 群で pEC50 値が低下した (偽手術 6.36, OVX 6.21)。一方、ATP に対する反応は 10⁻³ M で OVX 群にて亢進 (偽手術 787.0, OVX 986.6 mN/g) した (図 10)

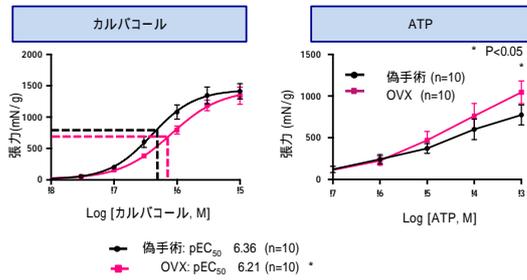


図 10

P2X、P2Y アゴニストにたいする作用では、 10^{-5} M α, β -methylene ATP、 10^{-4} M ADP に対する反応が、OVX 群で亢進していた(図 11)。

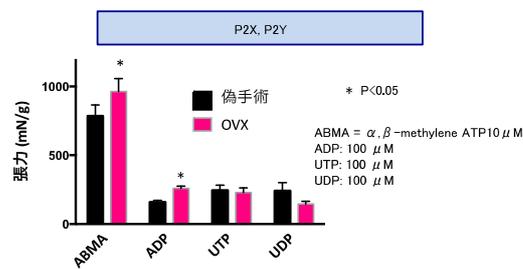


図 11

軽壁電気刺激では OVX 群でアトロピン感受性収が低下した (Tmax 値と比較 24 Hz で 偽手術 47.5, OVX 38.2%)(図 12)。

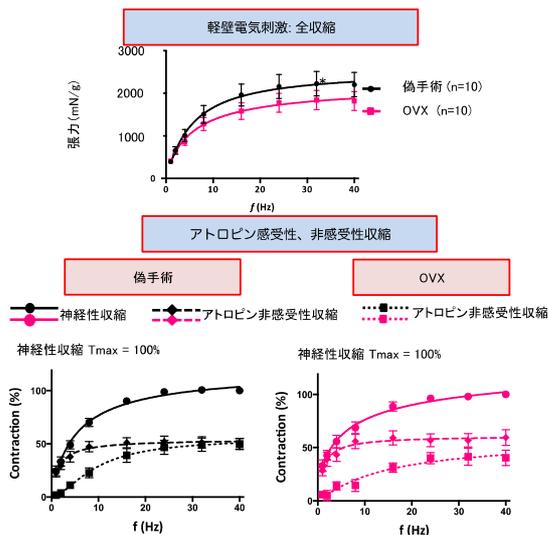


図 12

また軽壁電気刺激による ATP 放出量と排尿筋収縮量との相関は OVX 群でより大きかった (4 Hz, r^2 ; 偽手術 0.342, OVX 0.578) (図 13)。これは OVX 群ではプリン系収縮がより有意になっていることを示していると思われる。

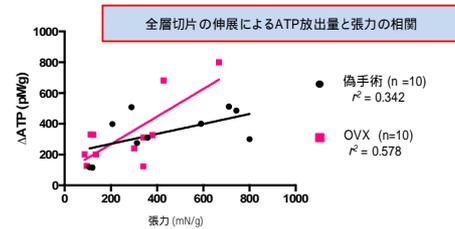


図 13

(6) 本研究のまとめ

今回の研究で膀胱粘膜層の自律収縮量が排尿筋切片に対して大きいこと、また過活動膀胱モデルとして OVX モデルを使用した検討で、ATP に対するモデルでの自律収縮量の増加率が大きくなることが明らかとなった。

最近で自律収縮はマイクロモーションとも呼ばれるようになってきているが、膀胱の局所における微弱な収縮が膀胱壁内に伝播され、尿意の知覚および膀胱収縮移行へのトリガーになるとも考えられている。ATP は膀胱においては上皮細胞から放出され、粘膜下層に存在する間質細胞や知覚神経に作用して尿意の形成に関与しているとされる。今回の検討では OVX モデルにおいて ATP の放出量が増加しており、オートレギュレーションにより自律収縮量を増加させ尿意亢進に関与している可能性があると思われた(図 14)。

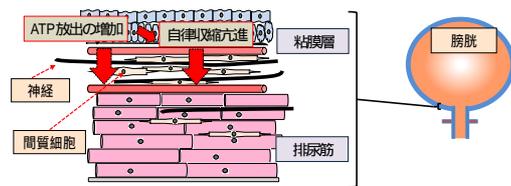


図 14

また全層切片を使用した収縮力検討では、OVX モデルにおいて、薬剤投与や軽壁電気刺激実験の結果では全体の排尿筋収縮力は低下した。さらにコリン作動性の収縮が低下していてプリン作動系の収縮が代償的に亢進しているという結果であった。これまでの報告でも下部尿路機能障害がある場合にはプリン系の収縮が亢進しているとの報告があり(引用文献(3))、今回の我々の検討でも同様の結果となった。まだこのメカニズム明ら

かではないが、排尿筋収縮力の低下を代償するために粘膜層からのATPなどのプリン系の伝達物質の放出の増加し、それが過活動膀胱の原因になっている可能性もある。

今回の検討で自律収縮の増加が頻尿につながる可能性が示されたが、その詳細なメカニズムを明らかにするためにはさらなる検討が必要であると思われる。

<引用文献>

(1) Spontaneous activity of lower urinary tract smooth muscles: correlation between ion channels and tissue function. Brading AF. J Physiol. 2006 Jan 1;570(Pt 1):13-22. Epub 2005 Oct 6.

(2) The effect of ovariectomy and estrogen replacement on acetylcholine release from nerve fibers and passive stretch-induced acetylcholine release in female rat bladder. Yoshida N. et al. NeuroUrol Urodyn. 2007;26(7):1050-5

(3) A quantitative study of atropine-resistant contractile responses in human detrusor smooth muscle, from stable, unstable and obstructed bladders. Bayliss M. et al. J. Urol. 1999;162(5):1833-9

5. 主な発表論文等

[学会発表](計4件)

櫛田信博、Release of adenosine triphosphate from the mucosal layer and changes in the contractile response of the bladder in ovariectomised guinea pig、International continence society annual meeting、平成28年9月14日、発表場所:「東京(日本)」

櫛田信博、女性ホルモンの蓄尿・排尿への作用/卵巣摘除モルモットを使用した検討、平成28年12月6日、発表場所:「東京国際

フォーラム(東京都・千代田区)」

櫛田信博、下部尿路機能に対する女性ホルモン低下の影響/プリン作動性成分の変化を中心とした検討、第105回日本泌尿器科学会総会、平成29年4月22日、発表場所:「城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市)」

櫛田信博、Effects of decreased estrogen on lower urinary tract function and assessment of purinergic system changes in the guinea pig bladder、American urological association annual meeting 2017、平成29年5月12日、発表場所:「ボストン市(アメリカ合衆国)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫛田 信博 (KUSHIDA Nobuhiro)

福島県立医科大学医学部泌尿器科・助教

研究者番号: 30381396

(2) 研究分担者

小島 祥敬 (KOJIMA Yoshiyuki)

福島県立医科大学医学部泌尿器科・教授

研究者番号: 60305539

相川 健 (AIKAWA Ken)

福島県立医科大学医学部泌尿器科・准教授

研究者番号: 80295419

柳田 知彦 (YANAGIDA Tomohiko)

福島県立医科大学医学部泌尿器科・講師

研究者番号: 20363765

羽賀 宣博 (HAGA Nobuhiro)

福島県立医科大学医学部泌尿器科・助教

研究者番号: 50586617