

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861271

研究課題名(和文) 過活動膀胱発症における酸化ストレス応答の関与と分子機構の解明

研究課題名(英文) Involvement of oxidative stress on detrusor overactivity

研究代表者

清水 翔吾 (SHIMIZU, Shogo)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教

研究者番号：90721853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：尿意切迫感を必須とし頻尿または夜間頻尿を伴う過活動膀胱は患者の生活の質を著しく低下させる。しかし、病態発症の詳細な分子機構は明らかになっていない。申請者らは、動物実験において、脳内伝達物質の一つであるアンジオテンシン (Ang II) が排尿反射の短縮を惹起させることを明らかにした。また、その反応は、Ang II タイプ1 (AT1) 受容体拮抗薬を脳室内前処置によって、減弱された。そして、AT1受容体の下流にあるNADPH oxidase (Nox) 阻害薬の脳室内投与は排尿間隔の乱れを誘導した。脳内のAng II/AT1受容体/Nox経路は、排尿反射の亢進、つまり頻尿に關与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of centrally administered angiotensin II (Ang II) on the micturition reflex in urethane anesthetized (1.0 g/kg, intraperitoneally) male rats. In the continuous cystometry, central administration of Ang II but not vehicle dose-dependently shortened the urinary bladder intercontraction interval, without altering the bladder detrusor pressure and blood pressure. Central administration of antagonists of Ang II type 1 (AT1) but not type 2 receptors inhibited the Ang II induced micturition reflex. These data suggest that central administration of Ang II increases urinary frequency by acting on brain AT1 receptors. Moreover, centrally administered NADPH oxidase (Nox) inhibitor apocynin changed intercontraction interval in the rat. These data suggest that central Ang II/AT1 receptor/Nox pathways are involved in the activation of micturition reflex.

研究分野：排尿機能学

キーワード：アンジオテンシン 排尿 排尿筋過活動 過活動膀胱 活性酸素

1. 研究開始当初の背景

(1) 尿意切迫感を必須とし頻尿または夜間頻尿を伴う過活動膀胱の患者数は国内だけでも約 830 万人とされる。治療を必要とする約 400 万人の過活動膀胱患者の 25% は現在の経口薬物療法で治療効果が得られていない。理由として過活動膀胱が発症する詳細なメカニズムやそれを根治させる治療薬が明らかになっていないためである。

(2) 我々は、過活動膀胱の原因の一つとされる排尿筋過活動（膀胱平滑筋の過剰な収縮）の発症に、膀胱血流量の低下及びそれに伴う活性酸素の発生が関与することを報告してきた。自然発症高血圧ラット (spontaneously hypertensive rat; SHR) は頻尿症状に加えて、膀胱血流量の低下が報告されている。SHR に対して、降圧薬であるアンジオテンシン (Ang) タイプ 1 (AT1) 受容体拮抗薬 オルメサルタン (1, 3 mg/kg, Olm1, Olm3)、カルシウム拮抗薬であるニフェジピン (30 mg/kg) をそれぞれ 6 週間、1 日 1 回連日経口投与した。その結果、オルメサルタン投与は頻尿と膀胱血流量を改善したが、ニフェジピン投与では改善効果がみられなかった。Ang 及び AT1 受容体は膀胱上でも産生・発現し、AT1 受容体の下流には NADPH oxidase (Nox) が存在する。そのため、排尿筋過活動の誘導には、Ang 及び AT1 受容体下流で発生する活性酸素種の関与することが示唆された (Shimizu S et al. *NeuroUrol Urodyn.* 2014)。

(3) 脳内でも Ang は産生され、ストレス反応等に関与することが報告されている。また、排尿筋過活動を呈する SHR では、脳内の AT1 受容体の発現が増加していることが報告されている。しかしながら、脳内 Ang / 活性酸素と排尿機能の関係については、ほとんど報告されていない。

2. 研究の目的

(1) 我々は、Ang を含む脳内伝達物質量が変化し、尿意を感じやすい状態もしくは、尿が溜まっていると脳が勘違いすることで、頻尿症状を呈するのではないかと推察した。本研究は、排尿筋過活動発症の機序を明らかにすべく、脳内 Ang / 活性酸素種に着目して、その関与を検討した。

3. 研究の方法

(1) ウレタン (1.0 g/kg) 麻酔下にて、12 週齢雄性 Wistar/ST ラットの右側大腿動脈に挿入したカテーテルを介して血圧 / 心拍数を連続的にモニターした。右側大腿静脈に生理食塩水注入 (1.2 ml/h) 用のカテーテルを挿入した。膀胱に膀胱内圧測定用のカテーテルを挿入し、シリジポンプに接続して生理食塩水を注入 (12 ml/h) し、排尿反射を測定した。ラットを腹位にて脳定位固定台に置き、3 時間の安定後、ステンレスカニキュレを介して

側脳室へ Ang 各用量 (0.01, 0.03, 0.07 nmol) を 1 時間ごとに連続投与した。

(2) 薬物脳室内投与後、経時的に動脈血を採取し、血漿中のカテコラミン (ノルアドレナリン及びアドレナリン) を抽出し、高速液体クロマトグラフィーを用いて、電気化学的に定量した。そして、ストレス反応に関わる中枢性交感神経 副腎髄質 (SA) 系の賦活化の程度を評価した。

4. 研究成果

(1) Ang (3 nmol) の脳室内投与は、末梢でのアドレナリン量を増加させ、SA 系の賦活化に関与する可能性が示唆された (発表論文 4)。

(2) 次に、脳内 Ang による SA 系賦活化と排尿反射への影響を検討した結果、SA 系賦活化に影響しない Ang の濃度 (0.01, 0.03, 0.07 nmol) においても、排尿反射を惹起した。また、本 Ang 濃度の脳室内投与では、血圧の有意な変化は見られなかった。さらに、AT1 受容体拮抗薬バルサルタン脳室内前投与群では Ang による排尿間隔の短縮が抑制されたが、Ang タイプ 2 受容体拮抗薬 PD123319 脳室内前投与、各 AT 受容体拮抗薬静脈投与群では Ang による排尿間隔の短縮に影響しなかった。Ang は SA 系非依存的に、中枢性 AT1 受容体を介して排尿反射を惹起することが示唆された (発表論文 2)。

(3) Ang を、ウレタン麻酔下 (1.0 g/kg, ip) の雄性 Wistar 系ラットに、脳室内投与 (30 pmol/3 μ l /rat) すると同時に single cystometry を行った。その結果、Ang は、溶媒投与群と比較して、残尿量及び排尿効率に影響することなく、一回排尿量及び膀胱容量を減少させた。また、continuous cystometry において、脳室内投与 Ang は、溶媒投与群と比較して、排尿間隔の短縮を引き起こしたが、最大排尿圧には有意な影響を与えなかった。これらの結果から、脳内 Ang は、遠心性 (脳から膀胱) 経路ではなく脳幹の排尿中枢回路に作用して、膀胱からの求心性 (膀胱から脳) 刺激に過敏に反応する状態を起こすことが推測された。

(4) Ang II が脳内 AT1 受容体を介して排尿反射を惹起する機序として、AT1 受容体の下流にある Nox の関与に着目した。そして、Nox 阻害薬である apocynin を脳室内投与すると同時に、continuous cystometry を行った。その結果、排尿反射の間隔の乱れがみられ、脳内 Nox 及び Nox に起因する活性酸素が排尿・蓄尿の制御に重要な働きをする可能性が示唆された。

<引用文献>

Shimizu S, Saito M, Oiwa H, Ohmasa F, Tsounapi P, Oikawa R, Dimitriadis F, Martin DT, Satoh I, Kinoshita Y, Tomita S: Olmesartan ameliorates urinary dysfunction in the spontaneously hypertensive rat via recovering bladder blood flow and decreasing oxidative stress. *Neurourol Urodyn*. 2014;33(3):350-357.

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 4 件)

1. Liu N, Shimizu S, Shimizu T, Nakamura K, Yamamoto M, Higashi Y, Saito M: Protective effects of the selective alpha1A-adrenoceptor antagonist silodosin against cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *J Pharmacol Sci*. 査読有 2016;132(1):71-77. doi: 10.1016/j.jphs.2016.08.007.

2. Kawamoto B, Shimizu S, Shimizu T, Higashi Y, Honda M, Sejima T, Saito M, Takenaka A: Angiotensin II centrally induces frequent detrusor contractility of the bladder by acting on brain angiotensin II type 1 receptors in rats. *Sci Rep*. 査読有 2016;24;6:22213. doi: 10.1038/srep22213.

3. Shimizu T, Shimizu S, Higashi Y, Nakamura K, Yoshimura N, Saito M: A Stress-related Peptide Bombesin Centrally Induces Frequent Urination through Brain Bombesin Receptor Types 1 and 2 in the Rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 査読有 2016; 356(3):693-701. doi: 10.1124/jpet.115.230334.

4. Nakamura K, Shimizu T, Yanagita T, Nemoto T, Taniuchi K, Shimizu S, Dimitriadis F, Yawata T, Higashi Y, Ueba T, Saito, M: Angiotensin II acting on brain AT1 receptors induces adrenalin secretion and pressor responses in the rat. *Sci Rep*. 査読有 2014;4:7248. doi: 10.1038/srep07248.

[学会発表](計 3 件)

1. 清水翔吾, 川本文弥, 清水孝洋, 東洋一郎, 中村久美子, 新武享朗, 山本雅樹, 齊藤源顕: 脳内 Ang は中枢性 AT1 受容体を介し頻尿を惹起する. 第 89 回日本薬理学会年会 2016.3.9-11. パシフィコ横浜(神奈川).

2. 清水翔吾, 川本文弥, 清水孝洋, 東洋一郎, 中村久美子, 新武享朗, 齊藤源顕: 脳内アンジオテンシン II は中枢性 AT1 受容体を介して排尿反射を惹起する. 第 68 回日本薬理学会西南部会, 2015.11.21. 海峡メッセ下関(山

口).

3. Kawamoto B, Shimizu S, Hikita K, Muraoka K, Honda M, Sejima T, Higashi Y, Shimizu T, Saito M, Takenaka A: Central Angiotensin II increases urinary frequency by acting on brain AT1 receptors in rats. ICS2015, 2015.10.6-9. Palais des Congrès, Montreal, Canada.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 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 0 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
http://www.kochi-ms.ac.jp/~ff_phrmc/

6. 研究組織

(1) 研究代表者
清水 翔吾 (SHIMIZU, Shogo)
高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部
門・助教
研究者番号: 90721853

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号:

(4) 研究協力者
齊藤 源顕 (SAITO, Motoaki)
高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部
門・教授

研究者番号：60273893

清水 孝洋 (SHIMIZU, Takahiro)
高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部
門・准教授
研究者番号:00363276

東 洋一郎 (HIGASHI, Youichirou)
高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部
門・助教
研究者番号:80380062

中村 久美子 (NAKAMURA, Kumiko)
高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部
門・技術専門職員
研究者番号:30398052