

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11190

研究課題名(和文)膀胱における尿再吸収機構の解明 -夜間頻尿治療への応用を目指す研究-

研究課題名(英文)The elucidation of urine reabsorption mechanism in the bladder

研究代表者

鳥本 一匡 (Torimoto, Kazumasa)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：10382293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ラットを用いて、膀胱における水およびナトリウム(Na)の吸収機構の一端を解明した。膀胱に機能的膀胱容量(生理的1回排尿量)を超える生理食塩水を注入すると、水およびNaが吸収される。水はアクアポリン(AQP)2を介して吸収され、AQP2の発現増加にはNaが関与する。Naの吸収は、上皮性Naチャンネルではなく細胞間隙のクロードインを介する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物およびヒトを対象にした実験で膀胱において水および電解質を含む低分子が吸収されることは証明されていたが、特にヒトにおける生理的意義は不明であった。Watanabeらが就寝中に排尿しない被験者を対象に、超音波走査を用いて「膀胱で尿が吸収されて容量が調整される」ことを強く示唆する研究結果を報告した。これは、夜間排尿を回避して睡眠を維持することに寄与する傍証であり、夜間頻尿の病態を再考させる成果である。我々の研究はこの機構の一端を解明することに成功し、新たな治療戦略を考案する契機となる。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated a part of the absorption mechanism of water and sodium in the rat bladder. When saline is infused into the bladder and the volume exceeds the functional bladder capacity (physiological voided volume per micturition), water and sodium are absorbed. Water is absorbed via aquaporin (AQP) 2 and sodium is related to the increased expression of AQP2. The uptake of sodium may be mediated by intercellular claudins rather than epithelial Na channels.

研究分野：泌尿器科

キーワード：膀胱吸収 夜間頻尿

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢者下部尿路症状のうち、最も治療に難渋するのは夜間頻尿である。夜間頻尿の主な原因は膀胱容量減少、夜間尿量増加および睡眠障害の3つであるが、夜間尿量増加、すなわち夜間多尿が夜間頻尿患者全体の約70%に関連している。夜間多尿の病態は、加齢に伴う循環器機能および腎機能の変化により昼間利尿が減少した結果、夜間尿産生量が増加するという「尿産生の昼夜逆転」とされている。夜間多尿が夜間頻尿につながる理由は「夜間尿量が多いと起床時刻までに機能的膀胱容量に1回以上到達するため、尿意を感じて中途覚醒を来す」であり、われわれ泌尿器科医にとっては疑いの余地はない。しかし、この理由には「膀胱へ到達した尿は、失禁または膀胱尿管逆流がなければ膀胱外へ移動することはない」、言い換えれば「膀胱では尿の再吸収は行われない」という前提がある。

(2) 生物における膀胱での尿再吸収に関する研究は古くから行われている。1956年にカエルなど両生類では、日常的に膀胱で尿を再吸収していることが報告された。以後、イヌやヒトといった動物でも *in vivo* または *ex vivo* 実験で、膀胱壁が水および溶質を透過することが報告された。生体での膀胱再吸収については、1997年に Sugaya らがラットを用いた研究で膀胱内に3時間貯留した生理食塩水が減少するということを報告した¹。さらに、2011年から2013年にかけて Spector らは、主にラットを用いて膀胱再吸収について詳細な報告をしているが、本研究と関連が深い内容について要点を示す。尿を閉鎖した膀胱内に1時間貯留した場合、尿量に変化はないが、水分摂取状況および濃度により尿中ナトリウム、カリウム、クロールの濃度変化が異なる²。すなわち、同じ濃度の尿を貯留させた場合、脱水ラットでは水分摂取過剰ラットよりも濃度減少幅が大きい。また、元の濃度が高いほど濃度減少の幅が大きい。要するに、脱水状態(尿の電解質濃度も高い)においては、膀胱内でより多くの電解質が吸収されるのである。残念ながら、この報告では貯留時間を延長した検証はしておらず、再吸収機構の解明には踏み込んでいない。

(3) 2015年に Watanabe らが、生体のヒトを対象とした初めての研究成果を報告した³。健常成人ボランティアを対象として就寝中膀胱容量を超音波で連続計測している。ここで注目すべき点は、就寝中に排尿しない成人は蓄尿経過により大きく2群に分類されることである。ひとつは、就寝時から徐々に蓄尿量が増加して起床直前に機能的膀胱容量に到達する群であり、もう一方は、就寝後数時間の間に機能的膀胱容量に到達する群である。後者のうち図1に示す被験者では「膀胱での尿再吸収」により蓄尿量が調節されている可能性があり、夜間頻尿を防ぐ機構のひとつと考えられる。

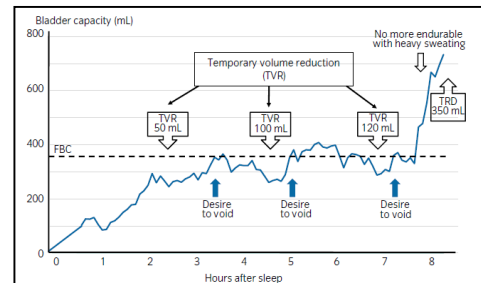


図1 文献3より引用

2. 研究の目的

膀胱における尿再吸収の仕組みはほとんど解明されていないため、まずはラットを用いて解明に取り組む。本研究では、尿路上皮 tight junction を構成する claudin に着目する。claudin は選択性をもつ小孔またはバリアを形成する膜貫通タンパク質であり、一定の条件下で尿の通過に深く関与している可能性がある。様々な条件下での claudin サブタイプ発現変化測定および抗体を用いた機能制御を行う。

- (1) 実験 : 膀胱における尿再吸収を制御する生理的条件を検討する
- (2) 実験 : 膀胱に発現する claudin サブタイプを確認する
- (3) 実験 : 膀胱で尿が再吸収されやすい条件で生じる claudin サブタイプ発現変化を検討する
- (4) 実験 : 膀胱における尿再吸収の制御試験を行う

3. 研究の方法

- (1) 実験 : ウレタン麻酔 (1.2g/kg 皮下注射) 下で下腹部を切開して、両側尿管を膀胱側で結紮して切断する。切断した腎側尿管断端は腹腔内に開放したままとし、閉腹する。経尿道的に PE50 チューブを膀胱へ挿入し、尿をすべて排出してから液体を注入してチューブを抜くと同時に膀胱頸部近傍で尿道を結紮する。2時間後に、開腹して26G 針で膀胱頂部より穿刺して液体を排出する。

・尿組成の影響 : 膀胱に塩化ナトリウム溶液 (0.9%) またはブドウ糖液 (5%) を注入する。

蒸留水と高濃度の塩化ナトリウム溶液およびブドウ糖液の実験を計画したが、予備試験の結果が安定しなかったことに加えて非生理的条件であったため中止した。

・膀胱壁伸展の影響 : 1回排尿量の目安である0.4mLを100%用量とし、0%、50%、100%または200%の液体を注入する。

・測定項目 : 膀胱内液の変化 (液体量、溶質濃度、浸透圧)、血漿浸透圧、血清ナトリウム濃度

- (2) 実験 : RT-PCR 法で膀胱に発現する claudin サブタイプの RNA を確認する。免疫組織化学方法で同定された claudin サブタイプを抗体で染色し、膀胱尿路上皮における発現部位を可視化する。

- (3) 実験 : Aquaporin (AQP)および amiloride-sensitive epithelial sodium channel (ENaC) について、RT-PCR 法で膀胱に発現する claudin サブタイプの RNA を確認する。免疫組織化学方法 で同定された claudin サブタイプを抗体で染色し、膀胱尿路上皮における発現部位を可視化する。機能阻害を行い、膀胱吸収における働きを確認する。

4. 研究成果

2017 年度は、生理食塩水が膀胱で吸収されること、その機構にはアクアポリン 2 (AQP2) が関与していることを証明した。具体的には、生理食塩水を膀胱に注入した場合、機能的膀胱容量 (約 0.4 mL) を超えると吸収が始まる。尿の流入および流出を止めた膀胱に 1.0 mL を注入して 3 時間経過すると、その容量は約 20%減少した。その 3 時間で膀胱壁の AQP2 の発現は増加するが、AQP2 の発現を制御すると生理食塩水は吸収されなくなった。また、生理食塩水が吸収される際には、水に加えて Na も吸収された。2018 年度は、膀胱での水吸収におけるナトリウム (Na) の関与について検証した。生理食塩水の代わりに 5%ブドウ糖液で膀胱を充満させた場合、膀胱での吸収量は大きく減少した。また、5%ブドウ糖液では AQP2 の発現は増加しなかった。以上より、膀胱での水吸収機構として、膀胱充満による膀胱壁の伸展と膀胱内容液に含まれる Na による尿路上皮の刺激が AQP2 合成を促進すると考えた。2019 年度 (最終年度) は、Na が膀胱壁を通過する機構を調べるため、尿路上皮細胞に存在する上皮性 Na チャンネル (ENaC) と尿路上皮細胞間隙に存在するクローディンについて検討を行った。生理食塩水による膀胱充満刺激で ENaC の発現は減少した。また、ENaC 阻害薬であるアミロライド (1 mM) を膀胱内に注入しても生理食塩水の吸収量に変化はなかったことから、ENaC は関与しないと判断した。一方で、クローディン 3 および 6 の発現は尿路上皮で増加した。クローディンはサイズ選択性と荷電選択性を持つ小孔を有し、Na を含む電解質など小さい溶質の透過性を担っている可能性がある。

<引用文献>

- Sugaya K, et al. *Neurourol Urodyn.* 1997;16:125
Spector DA, et al. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013;305:F1669
Watanabe H, et al. *Int J Urol.* 2016;23:182

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morizawa Yosuke, Torimoto Kazumasa, Hori Shunta, Gotoh Daisuke, Nakai Yasushi, Miyake Makito, Hirayama Akihide, Tanaka Nobumichi, Fujimoto Kiyohide	4. 巻 37
2. 論文標題 Aquaporin-2 plays an important role in water transportation through the bladder wall in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurourology and Urodynamics	6. 最初と最後の頁 2434 ~ 2440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/nau.23715	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morizawa Y, Torimoto K, Hori S, Gotoh D, Nakai Y, Miyake M, Fujimoto K	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of bladder distension on arginine vasopressin secretion in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1186/s13104-019-4105-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yosuke Morizawa, Kazumasa Torimoto, Shunta Hori, Daisuke Gotoh, Yasushi Nakai, Makito Miyake, Akihide Hirayama, Nobumichi Tanaka, Kiyohide Fujimoto	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Aquaporin-2 plays an important role in water transportation through the bladder wall in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurourology and Urodynamics	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森澤洋介 鳥本一匡 後藤大輔 堀俊太 中井靖 三宅牧人 田中宣道 藤本清秀
2. 発表標題 膀胱における水およびNa再吸収機構の検討
3. 学会等名 第68回日本泌尿器科学会中部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Morizawa Y, Torimoto K, Miyake M, Hori S, Gotoh D, Tatsumi Y, Nakai Y, Onishi S, Tanaka N, Watanabe H, Fujimoto K
2. 発表標題 Role of the Urinary Bladder in Water Metabolism - How Does the Bladder Absorb Urine?
3. 学会等名 Intenational Continnence Society 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森澤洋介、鳥本一匡、三宅牧人、後藤大輔、飯田孝太、大西健太、堀俊太、辰巳佳弘、中井靖、大西さゆり、田中宣道、藤本清秀
2. 発表標題 膀胱における尿再吸収機構の解明
3. 学会等名 第24回日本排尿機能学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	國安 弘基 (Kuniyasu Hiroki) (00253055)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	
研究分担者	藤本 清秀 (Fujimoto Kiyohide) (50264867)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	
研究分担者	三宅 牧人 (Miyake Maki to) (80601400)	奈良県立医科大学・医学部・助教 (24601)	