

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20580322

研究課題名（和文） コリン作動性神経－間質細胞－平滑筋の情報伝達が過活動膀胱の病態発現に果たす役割

研究課題名（英文） Pathophysiological roles of signal transductions between cholinergic nerves, interstitial cells and smooth muscle cells in overactive bladder.

研究代表者

海野 年弘 (UNNO TOSHIHIRO)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：90252121

研究成果の概要（和文）：

本研究では、尿失禁などの排尿障害を主徴とする過活動膀胱の発症メカニズムを明らかにする目的で、過活動膀胱のモデルマウスを作成し、膀胱の内在神経を電気刺激した時の収縮反応を解析した。その結果、モデルマウスでは、これまで知られていた神経による収縮に加え、未知の神経を介する収縮が新たに発現し、この成分の占める割合が増加することが明らかになった。この未知神経を介した収縮の実態が解明できれば、過活動膀胱の新たな治療薬のターゲットとなることが考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we attempted to clarify the pathogenetical mechanisms for the development of overactive bladder and investigated contractile responses of bladder smooth muscles to electrical field stimulation of intrinsic nerves in model mouse of overactive bladder. The results suggest that a component of bladder contraction responsible for unknown nerve stimulation was increased in the model mouse and that this unknown component may be a useful target for the new drugs for the treatment of overactive bladder.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：獣医薬理学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：過活動膀胱、コリン作動性神経、間質細胞、膀胱平滑筋細胞、ムスカリン受容体

1. 研究開始当初の背景

人医領域では、高齢化に伴って発生する尿失禁、排尿障害など泌尿器疾患の増加が問題となっており、先進国における患者数は10億人を超えると見積もられている。獣医領域においてもペットの高齢化が進み、人の場合と同様の泌尿器疾患（突発性膀胱炎など）が

増加しつつある。尿失禁には、中枢神経系の異常がないにもかかわらず意思とは無関係に膀胱が収縮して尿失禁を起こす「不安定膀胱（過活動膀胱）」と呼ばれるタイプが知られており、このタイプの発生頻度が一番高い。過活動膀胱になる原因はまだ十分に解明されていないものの、膀胱内の知覚神経過敏に

伴い膀胱平滑筋を興奮性に支配しているコリン作動性神経の活動亢進や平滑筋細胞の異常興奮が関わっていると考えられている。コリン作動性神経からは伝達物質としてアセチルコリンが放出され、膀胱平滑筋に存在するM2とM3のムスカリン受容体サブタイプに作用して同平滑筋を収縮させる。また、最近では、平滑筋束中に存在する間質細胞にもムスカリン受容体が存在し、同細胞がコリン作動性神経－膀胱平滑筋間の情報伝達に介在する可能性も示唆されている。すなわち、アセチルコリンが間質細胞に作用して同細胞を興奮させ、それがギャップジャンクションを介して平滑筋に伝播するという考えである。しかし、膀胱における神経－筋伝達に間質細胞が関与しているかどうか、また、過活動膀胱などの病態発現にどの程度関与しているのかについては明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、過活動膀胱の病態発現機構を明らかにする一環として、膀胱における生理学および病態生理学的役割がまだ明らかになっていない間質細胞に着目し、

- 1) 同細胞がコリン作動性神経－平滑筋の情報伝達にどのような役割を果たすのか、
- 2) その役割はムスカリン受容体のどのサブタイプを介しているのか、
- 3) 不安定膀胱の状態ではその役割がどのように変化するのか、

について明らかにし、尿失禁治療薬の新たな開発戦略を提供することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究計画では、間質細胞の一部が欠損したマウス (W/W^vミュータントマウス)、M2またはM3 ムスカリン受容体サブタイプの欠損マウス (必要に応じてM2/M3 両サブタイプ欠損マウスも用いる)、および対照として野生型マウスを実験動物として使用した。実験には、これらマウスの摘出膀胱から各目的に応じた標本作製・調製し、膀胱平滑筋の神経刺激収縮反応、細胞内Ca²⁺濃度の変化、膜電位反応などについて検討した。また、尿道の部分結紮により過活動膀胱のモデルマウス

(Bladder Outlet Obstruction: B00モデル)を作成し、排尿回数、1回排尿量、膀胱の組織学的変化および機能学的変化(神経刺激収縮反応、細胞内Ca²⁺濃度の変化など)について解析した。

4. 研究成果

(1) 膀胱におけるムスカリン受容体を刺激した時の収縮反応およびコリン作動性神経を介した収縮反応を、ムスカリン受容体サブタイプの欠損マウスおよび間質細胞の欠損

マウスを用いて検討した結果、M2 および M3 ムスカリン受容体サブタイプはそれぞれ異なる収縮メカニズムにより膀胱平滑筋を収縮させることが明らかとなった。しかし、神経刺激による収縮の発現には M3 サブタイプが関与しており、M2 サブタイプの直接の関与はほとんどないと考えられた。また、間質細胞が神経－筋伝達を直接仲介しているような証拠は得られなかった。

(2) 膀胱では、コリン作動性神経に加えてプリン作動性神経も膀胱平滑筋を興奮性に支配している。両者の神経刺激収縮反応を解析した結果、プリン作動性神経を介した収縮の発現は、M2 ムスカリン受容体サブタイプにより抑制性の調節を受けることを見出し、その調節には、百日咳毒素感受性のG蛋白質が関与することが明らかになった(図1参照)。

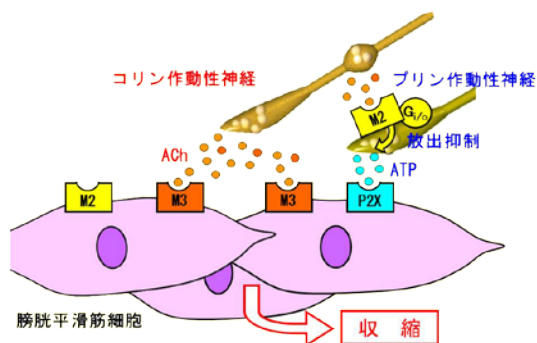


図1. 膀胱におけるコリン作動性およびプリン作動性神経による膀胱平滑筋の興奮性支配。ACh: アセチルコリン、M2: M2 ムスカリン受容体サブタイプ、M3: M3 ムスカリン受容体サブタイプ、P2X: P2X プリン受容体サブタイプ、Gi/o: Gi/o タイプG蛋白質。

(3) 過活動膀胱のモデルマウス (B00) を作成し、排尿機能の変化、膀胱の組織形態変化、および膀胱平滑筋の収縮能の変化を解析した結果、モデルマウスでは膀胱の肥大に伴って平滑筋層の線維化が起こり(図2参照)、排尿回数の増加および1回排尿量の減少といった過活動膀胱に特徴的な症状が認められた(図3参照)。また、モデルマウスでは、ムスカリン受容体刺激による平滑筋の収縮能が有意に増大していることが明らかとなった。この収縮増大には、Rhoキナーゼを介した収縮蛋白系のCa²⁺感受性の増大が関与していることも明らかとなった。

(4) 過活動膀胱の病態時に平滑筋の収縮能がどのような経時的変化をたどるか検討したところ、モデルマウスでは病態の初期にムスカリン受容体を介した収縮反応が増大するものの、病態の進行とともにむしろ抑制さ

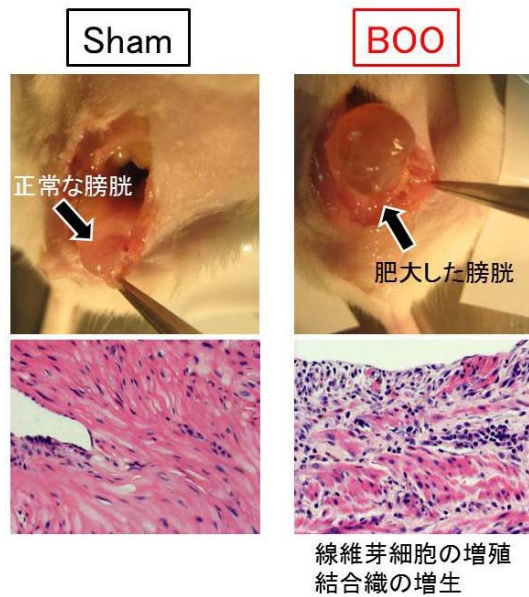


図2. 過活動膀胱のモデルマウス (BOO) および対照マウス (Sham) における膀胱の外観 (上段) と平滑筋組織像 (下段).

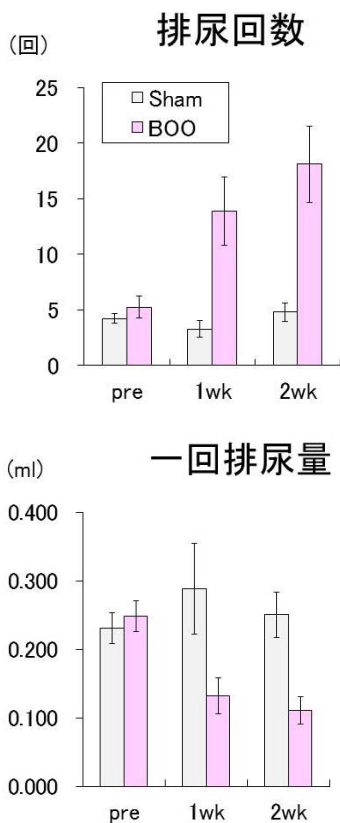


図3. 過活動膀胱のモデルマウス (BOO) および対照マウス (Sham) における排尿回数 (上段) および1回排尿量 (下段) の変化. Pre: モデルマウス作成前、1wk および 2wk: モデルマウス作成1週間および2週間後.

れることが明らかになった。この変化には、病態初期に収縮蛋白系のCa²⁺感受性増大による収縮能が増加するものの、病態の進行とともに平滑筋層の線維化が進行し、収縮能はむしろ抑制されることが関与していると考えられた。

(5) 膀胱におけるコリン作動性神経とプリン作動性神経を介した収縮反応を解析した結果、膀胱の肥大が進行した過活動膀胱モデルマウスでは、コリンおよびプリン作動性収縮に加え、未知神経を介する収縮が新たに発現し、この成分の占める割合が他の神経を介する収縮成分より増加することが明らかになった (図4参照)。また、膀胱平滑筋の自発性収縮反応も増大し、この反応は、コリン作動性神経およびプリン作動性神経から自発性に漏れ出たアセチルコリンやATPが関与しているわけではないことも明らかになった。過活動膀胱のモデルマウスでは、間質細胞の数が增加することから、未知神経を介する収縮および自発性の収縮反応に同細胞が関与している可能性が考えられた。また、この未知神経を介した収縮の実態が解明されれば、過活動膀胱の新たな治療薬のターゲットとなることが考えられた。

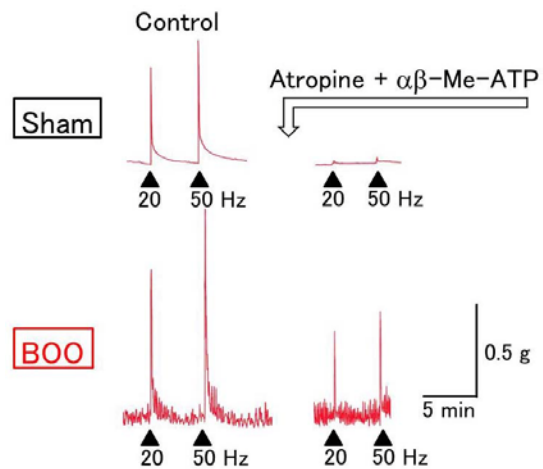


図4. 膀胱平滑筋の神経刺激収縮反応 (▲). 過活動膀胱のモデルマウス (BOO) では、atropin および $\alpha\beta$ -Me-ATP の存在下でコリン作動性及びプリン作動性神経を介した収縮成分を除去しても、神経刺激によりなおも収縮が発現した。この収縮は、未知神経を介する収縮成分と考えることができる。

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10件)

① Matsuyama, H., Unno, T., Komori, S.,

- Takewaki T.: Nitroergic inhibition of tachykininergic neuro-muscular transmission via cyclic GMP in the hamster ileum. *J. Vet. Med. Sci.*, 73: 453-458, 2011, 査読有.
- ② Suguro, M., Matsuyama, H., Unno, T., Tanahashi, Y., Kitazawa, T., Yamada, M., Komori, S.: Muscarinic receptor subtypes mediating Ca²⁺ sensitization of intestinal smooth muscle contraction; studies with mutant mice lacking the receptor subtypes. *J. Vet. Med. Sci.* 72: 443-451, 2010, 査読有.
- ③ Fujikawa, R., Muroi, Y., Unno, T., Ishii, T.: Ouabain exacerbates botulinum neurotoxin-induced muscle paralysis via progression of muscle atrophy in mice. *J. Toxicol. Sci.*, 35: 795-805, 2010, 査読有.
- ④ Tanahashi, Y., Unno, T., Matsuyama, H., Ishii, T., Yamada, M., Wess, J., Komori, S.: Multiple muscarinic pathways mediate the suppression of voltage-gated Ca²⁺ channels in mouse intestinal smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 158: 1874-1883, 2009, 査読有.
- ⑤ Kitazawa, T., Asakawa, K., Nakamura, T., Teraoka, H., Unno, T., Komori, S., Yamada, M., Wess, J.: M3 muscarinic receptors mediate positive inotropic responses in mouse atria: a study with muscarinic receptor knockout mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330: 487-493, 2009, 査読有.
- ⑥ Unno, T., Iida, R., Okawa, M., Matsuyama, H., Hossain, M.M., Kobayashi, H., Komori, S.: Tributyltin-induced Ca²⁺ mobilization via L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels in PC12 cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 28: 70-77, 2009, 査読有.
- ⑦ Yamamoto, M., Unno, T., Matsuyama, H., Kohda, M., Masuda, N., Nishimura, M., Ishii, T., Komori, S.: Two types of cation channel activated by stimulation of muscarinic receptors in guinea-pig urinary bladder smooth muscle. *J. Pharmacol. Sci.* 108: 248-257, 2008, 査読有.
- ⑧ Sakamoto, T., Matsuyama, H., Yamamoto, M., Tanahashi, Y., Kitazawa, T., Taneike, T., Komori, S., Unno, T.: A non-selective cationic channel activated by diacylglycerol in mouse intestinal myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 599: 54-57, 2008, 査読有.
- ⑨ Hossain, M.M., Suzuki, T., Unno, T., Komori, S., Kobayashi, H.: Differential presynaptic actions of pyrethroid insecticides on glutamatergic and GABAergic neurons in the hippocampus. *Toxicol.* 243: 155-163, 2008, 査読有.
- ⑩ Kitazawa, T., Hiram, R., Masunaga, K., Nakamura, T., Asakawa, K., Cao, J., Teraoka, H., Unno, T., Komori, S., Yamada, M., Wess, J., Taneike, T.: Muscarinic receptor subtypes involved in carbachol-induced contraction of mouse uterine smooth muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 377: 503-513, 2008, 査読有.
- [学会発表] (計 20 件)
- ① 松山勇人, 海野年弘, 坂本貴史, 棚橋靖行, 山田真久, Jurgen Wess, 小森成一: ハムスター小腸のタキキニン作動性神経-平滑筋間の情報伝達に対するNO作動性神経による抑制機構. 第 151 回日本獣医学会学術集会、2011 年 3 月 30 日、東京.
- ② Unno, T., Inasaki, M., Matsuyama, H., Tanahashi, Y., Kitazawa, T., Yamada, M., Wess, J., Komori, S.: Role of M3 muscarinic receptor-coupled signalling molecule in the activation of muscarinic cation channels in mouse ileal smooth muscle cells. 第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月 23 日、横浜.
- ③ 棚橋靖行、市村嘉郎、木村佳織、海野年弘、松山勇人、飯野哲、小森成一: マウス回腸縦走筋標本におけるムスカリン作動性収縮に対するカハール細胞の役割. 第 150 回日本獣医学会学術集会、2010 年 9 月 16 日、帯広.
- ④ 海野年弘、稲崎倫子、松山勇人、棚橋靖行、北澤多喜雄、山田真久、Jurgen Wess、小森成一: マウス回腸平滑筋細胞のムスカリン作動性陽イオンチャネルの活性化におけるM3受容体サブタイプに関連した情報伝達分子の役割. 第 150 回日本獣医学会学術集会、2010 年 9 月 16 日、帯広.
- ⑤ 海野年弘、北澤多喜雄、松山勇人、棚橋靖行、小森成一: 消化管におけるコリン作動性神経-平滑筋間の情報伝達機構-ムスカリン作動性陽イオンチャネルの活性化制御を中心として-. 第 149 回日本獣医学会学術集会、2010 年 3 月 26 日、東京.
- ⑥ Unno, T., Yamamoto, M., Hayashi, T., Koide, K., Tanahashi, Y., Matsuyama, H., Yamada, M., Wess, J. and Komori, S.

- S.: Functional roles of M2 and M3 muscarinic receptors in neurogenic contractions in mouse bladder. 第 83 回日本薬理学会年会、2010 年 3 月 17 日、大阪.
- ⑦ 中島美和、北澤多喜雄、海野年弘、小森成一、山田真久、Jurgen Wess.: マウス結腸機能におよぼすアセチルコリン受容体経路の重要性. 第 148 回日本獣医学会学術集会、2009 年 9 月 27 日、鳥取.
- ⑧ Unno, T., Yamamoto, M., Hayashi, T., Koide, K., Tanahashi, Y., Matsuyama, H., Yamada, M., Wess, J. and Komori, S.: Functional roles of M2 and M3 muscarinic receptors in cholinergic nerve-induced contractions in mouse bladder studied with receptor knockout mice. 6th Int. Society of Auton. Neurosci. 2009 年 9 月 2 日, Australia.
- ⑨ Matsuyama, H., Unno, T., Sakamoto, T., Tanahashi, Y., Yamada, M., Wess, J. and Komori, S.: Role of M2 and M3 muscarinic receptor subtypes in mediating the cholinergic excitatory junction potentials in mouse ileum. 6th Int. Society of Auton. Neurosci. 2009 年 9 月 2 日, Australia.
- ⑩ Tanahashi, Y., Waki, N., Unno, T., Matsuyama, H., Yamada, M., Wess, J. and Komori, S.: Myenteric interstitial cells of Cajal and M3 muscarinic receptors regulate the periodicity of peristaltic movements in mouse small intestine. 6th Int. Society of Auton. Neurosci. 2009 年 9 月 2 日, Australia.
- ⑪ Matsuyama, H., Unno, T., Yamada, M., Wess, J. and Komori, S.: Three distinct muscarinic pathways mediating cholinergic EJPs in mouse ileum. 36th Int. congress of Physiol. Sci. (IUPS 2009). 2009 年 7 月 27 日, 京都.
- ⑫ Tanahashi, Y., Waki, N., Unno, T., Matsuyama, H., Yamada, M., Wess, J. and Komori, S.: Myenteric interstitial cells of cajal and M3 muscarinic receptors regulate the periodicity of peristaltic movements in mouse small intestine. 36th Int. congress of Physiol. Sci. (IUPS 2009). 2009 年 7 月 27 日, 京都.
- ⑬ 松山勇人, 海野年弘, 坂本貴史, 棚橋靖行, 山田真久, Jurgen Wess, 小森成一: マウス小腸のコリン作動性神経-平滑筋の情報伝達を仲介するムスカリン受容体サブタイプ. 第 51 回日本平滑筋学会総会, 2009 年 7 月 22 日、名古屋.
- ⑭ Nakajima, M., Kitazawa, T., Unno, T., Komori, S., Yamada, M. and Wess, J.: Functional muscarinic receptor subtypes involved in the regulation of colonic motor function in mice. Post-genomic Advances in the Physiology of Smooth Muscle. 2009 年 7 月 23 日, 名古屋.
- ⑮ Tanahashi, Y., Unno, T., Matsuyama, H., Yamada, M., Wess, J. and Komori, S.: Three distinct muscarinic pathways mediate the suppression of voltage-gated Ca²⁺ channels in mouse intestinal smooth muscle cells. Post-genomic Advances in the Physiology of Smooth Muscle. 2009 年 7 月 23 日, 名古屋.
- ⑯ 海野年弘, 林利美, 小出健人, 松山勇人, 山田真久, Jurgen Wess, 小森成一: マウス膀胱平滑筋の神経刺激で誘発される収縮反応における M2 および M3 ムスカリン受容体サブタイプの役割. 第 147 回日本獣医学会学術集会、2009 年 4 月 4 日、栃木.
- ⑰ 松山勇人, 海野年弘, 山田真久, Jurgen Wess, 小森成一: マウス回腸の興奮性接合部電位を仲介している M2 と M3 ムスカリン受容体サブタイプの役割-受容体欠損マウスを用いた研究. 第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 16 日、横浜.
- ⑱ 山本正行, 林利美, 松山勇人, 山田真久, Jurgen Wess, 海野年弘, 小森成一: マウス膀胱平滑筋における M2 または M3 ムスカリン受容体刺激による収縮の発現機序. 第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 16 日、横浜.
- ⑲ 棚橋靖行, 脇尚子, 海野年弘, 松山勇人, 山田真久, Jurgen Wess, 小森成一: マウス回腸の蠕動運動の発現における M2 および M3 ムスカリン受容体サブタイプの役割. 第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 16 日、横浜.
- ⑳ 北澤多喜雄, 浅川幸一, 寺岡宏樹, 海野年弘, 小森成一, 山田真久, Jurgen Wess: M3 ムスカリン受容体を介するマウス心房筋収縮増大作用. 第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 16 日、横浜.

[その他]

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~pharmaco/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海野 年弘 (UNNO TOSHIHIRO)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：90252121

(2)研究分担者

小森 成一 (KOMORI SEIICHI)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：70195866

松山 勇人 (MATSUYAMA HAYATO)
岐阜大学・応用生物科学部・助教
研究者番号：80345800

(3)研究協力者

酒井 洋樹 (SAKAI HIROKI)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授

坂本 貴史 (SAKAMOTO TAKASHI)
岐阜大学・大学院連合獣医学研究科・博士課程

山本 正行 (YAMAMOTO MASAYUKI)
岐阜大学・大学院連合獣医学研究科・博士課程

棚橋 靖行 (TANAHASHI YASUYUKI)
岐阜大学・大学院連合獣医学研究科・博士課程

小出 健人 (KOIDE KENTO)
岐阜大学・応用生物科学部・学部学生

市村 嘉朗 (ICHIMURA ROSHIROU)
岐阜大学・応用生物科学部・学部学生

安藤 久美子 (ANDOH KUMIKO)
岐阜大学・応用生物科学部・学部学生

木村 佳織 (KIMURA KAORI)
岐阜大学・応用生物科学部・学部学生

杉山京子 (SUGIYAMA KYOKO)
岐阜大学・応用生物科学部・学部学生

松井 隆輔 (MATSUI RYUUSUKE)
岐阜大学・応用生物科学部・学部学生

桂田 泰輔 (KATSURADA TAISUKE)
岐阜大学・応用生物科学部・学部学生