

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09564

研究課題名(和文) 蓄尿障害の主体としての膀胱粘膜下層細胞群の液性因子による制御

研究課題名(英文) Neurohumoral modulation of mucosal cell populations as the site of bladder storage dysfunction

研究代表者

橋谷 光 (Hashitani, Hikaru)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授

研究者番号：10315905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱排尿筋の自発収縮は求心性神経を機械的に刺激し、副交感神経由来アセチルコリンはこの経路を増強するが、内在性弛緩物質であるPTHrP(副甲状腺ホルモン関連蛋白)は筋収縮抑制を介して求心性神経活動を減弱させた。下部尿路壁内の微小血管に投射するNO作動性神経は、交感神経からの伝達物質の放出抑制および血管平滑筋への直接的な弛緩作用により、交感神経性血管収縮に拮抗する機能を有することが示された。PTHrPおよびNO作動性神経は、求心性神経活動の抑制と血管拡張による血流増加を介して正常な下部尿路機能の維持に寄与していると考えられ、これらの経路の促進は下部尿路症状の治療戦略となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下部尿路症状は、加齢やメタボリック症候群などに併発することから、下部尿路内の環境のみならず、交感神経過活動など全身性の病態を反映している。尿意切迫感は膀胱由来の求心性神経の過活動により生じるが、内在性物質であるPTHrPは、副交感神経の影響下においても排尿筋の自発収縮抑制を介して求心性神経活動を制御する。また下部尿路壁内に広く分布するNO作動性神経は、微小血管の収縮性調節においては交感神経と拮抗する機能を有し血流維持に寄与する。PTHrPの活性化、NO作動性神経およびそのセカンドメッセンジャーであるcGMPの作用増強は、下部尿路症状の治療戦略となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Aberrant spontaneous phasic contractions of the detrusor smooth muscle (DSM) could cause excessive mechanical stimulations to bladder afferent nerves leading to urinary urgency. PTHrP, an endogenous relaxant, diminishes bladder afferent nerve firing by suppressing DSM contractility even under the influence of excitatory parasympathetic nerve activity during the bladder storage phase. Nitroergic nerves projecting to microvessels in the lower urinary tract (LUT) counteract with sympathetic vasoconstrictions that could diminish LUT blood flow. Thus, neurally-released NO presynaptically reduces sympathetic neurotransmitter release and also directly relaxes arteriolar smooth muscle resulting in vasodilatation. Pharmacological enhancement of PTHrP-induced DSM relaxation and/or nitroergic signalling pathways could be a promising therapeutic strategy for the treatment of lower urinary tract symptoms.

研究分野：排尿生理学

キーワード：過活動膀胱 求心性神経 NO作動性神経 微小血管 平滑筋 粘膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

下部尿路症状(LUTS)は超高齢社会における重要な医療課題である。とりわけ過活動膀胱(OAB)に代表される蓄尿障害では、心理的ストレスにより患者の肉体的および社会的活動が制約されフレイルや認知症の誘因ともなるため、病態解明に基づく治療法の確立が切望される。

OABの診断基準が尿意切迫感であることから、求心性神経の過活動が病態の出力であるが、多様な入力から出力に至る経路については不明な点が多い。LUTSはおよびOABは、加齢、メタボリック症候群や心血管障害などと高頻度に合併することから、全身性病態の一面であると考えられる。したがって膀胱壁内環境に起因する入力のみならず膀胱壁外からの神経性および液性入力についても考慮する必要がある。

膀胱粘膜には、尿意切迫感を中枢に伝達するC線維を含めて求心性神経が豊富に分布している。また粘膜には膀胱壁内で最も密な毛細血管網が存在し、蓄尿時の膀胱血流は粘膜主体に配分されていることから、粘膜を構成する細胞群は局所性(膀胱壁内)のみならず全身性の液性因子にも暴露されうる。求心性神経と毛細血管に加えて、壁伸展などの膀胱環境を感知して様々な伝達物質を放出する尿路上皮、粘膜の収縮要素である粘膜筋板さらにはPDGFR(血小板由来増殖因子)陽性細胞(PDGFR (+)細胞)などの間質細胞が存在している。これら粘膜を構成する細胞群の相互作用は、膀胱の蓄尿機能の維持および蓄尿から排尿への切り替えにおいて重要な役割を担っており、粘膜はOAB病態の主体かつ治療標的と理解される。

2. 研究の目的

本研究では、粘膜下層細胞群の液性因子による機能制御を解明することを目的とした。

求心性C線維は、尿路上皮から放出されるATPなどの液性因子による化学的刺激とともに、蓄尿に伴う膀胱壁の伸展や筋収縮による機械的刺激によって活性化される。内在性の排尿筋弛緩物質であるPTHrP(副甲状腺ホルモン関連蛋白)が、排尿筋の自発収縮を抑制することにより求心性神経活動を抑制する可能性を検証した。また蓄尿時における副交感神経からの入力が、排尿筋収縮を介して求心性神経活動を促進する可能性についても検討した。さらにPTHrPによる排尿筋弛緩機構について、イオンチャンネルに着目して検討した。

LUTSおよびOABに合併する高血圧症や心血管障害においては、交感神経過活動や全身性および局所アンジオテンシンII(ATII)産生増加が病態において重要な役割を果たしている。交感神経に拮抗するNO作動性神経の作用と分布について、特に下部尿路壁内の微小血管を対象に検討した。

機械的刺激による求心性神経活動の発生源として、膀胱粘膜筋板に対応すると考えられる尿道粘膜の平滑筋について、その収縮特性や神経支配を調べて生理機能を考察した。

3. 研究の方法

(1) 求心性神経活動と膀胱内圧の同時測定

麻酔下ラットで左骨盤神経を近位端で切断し、双極電極を用いて膀胱に由来する求心性神経活動を記録した。遠心性神経の関与を調べるため、対側骨盤神経を維持ないし切断したモデル間で結果を比較した。両側尿管および尿道を結紮した膀胱にカテーテルを挿入、固定し、カテーテルを圧トランスデューサーおよび注入ポンプに接続して、生理食塩水注入時の膀胱内圧変化を求心性神経活動と同時に測定した。

(2) 細胞内カルシウム(Ca²⁺)イメージング

膀胱および尿道壁内の細動脈を対象として、Neuron-gial antigen 2 (NG2)ないしパルプアルブミン(PV)プロモーター制御下にCa²⁺感受性蛍光タンパクGCaMP6を発現するマウスを用いて、細動脈平滑筋細胞および内皮細胞

内の細胞内Ca²⁺シグナルを可視化し、フィールド電気刺激(EFS)により惹起される神経性反応の性質を調べた。

Ca²⁺蛍光指示薬Cal-520 を負荷したブタ尿道粘膜、膀胱粘膜筋板およびラット排尿筋を用いて、それぞれ自発細胞内Ca²⁺濃度上昇、薬物応答性、EFS誘発神経応答を調べた。

(3) 血管径経時測定

ラット膀胱および尿道壁内の細動脈の径を、血管壁追跡イメージングシステムを用いて経時的に計測した。EFSにより誘発される血管径の変化を観察し、交感神経、NO作動性神経、求心性神経の阻害薬を用いてそれぞれの神経の機能を調べるとともにホスホジエステラーゼ5 (PDE5)阻害薬などの効果を調べた。

(4) 蛍光免疫染色

ラットおよびマウスの膀胱、尿道壁内の細動脈を対象に、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)陽性交感神経、神経一酸化窒素合成酵素(nNOS)陽性NO作動性神経、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) 陽性求心性神経などの分布を観察した。またNO受容体として機能するsGC (可溶性グアニル酸シクラーゼ) の分布についても調べた。

ラット排尿筋層標本を用いて、デスミン (平滑筋マーカー) およびPGP9.5 (神経マーカー) 陽性細胞におけるPTHrP受容体の発現の有無を調べた。

(5) 筋収縮力測定

ラット排尿筋およびブタ尿道粘膜平滑筋、膀胱粘膜筋板を用いて、それぞれ自発一過性収縮とその神経応答、薬剤応答性を調べた。

(6) パッチクランプ法

ラット排尿筋組織から酵素処理により平滑筋細胞を単離し、穿孔パッチクランプ法により自発電流および脱分極パルス誘発電流を測定した。

4. 研究成果

(1) 筋原性の求心性神経活動に対するPTHrPの抑制作用

ラットin vivo実験において、排尿筋の自発収縮に由来する一過性膀胱内圧上昇(TPRs)およびTPRsに対応するバースト状の求心性神経活動を認め、いずれも電位依存性L型カルシウム (LVDC) 阻害薬 (ニフェジピン) 静注により抑制された。対側骨盤神経維持例では、蓄尿相後半で大きなTPRsと対応する求心性神経活動を認め、アトロピン静注により大きなTPRsのみ抑制されて、対側神経切断例と同様のTPRsおよび求心性神経活動が残存した。膀胱平滑筋の伸展により放出される内因性弛緩物質であるPTHrP静注により、対側神経の維持ないし切断に関わらず、TPRsと対応する求心性神経活動が抑制された。蛍光免疫染色により、PTHrP受容体は膀胱平滑筋と血管平滑筋には発現していたが神経線維には発現していなかったことから、PTHrPによる求心性神経活動の抑制は排尿筋自発収縮の抑制を介して生じたと考えられた。PTHrPは、蓄尿期に低レベルの遠心性副交感神経作用がある状態でも排尿筋の自発収縮を抑制し、収縮により機械的に刺激される求心性神経活動を抑制することが示された。

(2) 尿道細動脈の収縮制御機構

ラットおよびマウスを用いて、尿道の平滑筋・粘膜層および横紋筋層の血流を担う細動脈における神経性収縮制御を検討した。ラット尿道細動脈において、EFSにより誘発される神経性収縮は交感神経により生じたが、ノルアドレナリン (アルファ受容体) ではなくATP (P2X受容体) が主要な役割を担っていた。神経性収縮は神経一酸化窒素 (NO) 合成酵素(nNOS)の阻害により増強したことから、交感神経性収縮の抑制に神経性NOが関与することが示唆された。一方、アルファ受容体作動薬により持続的な収縮を生じた状態ではEFSは神経性弛緩

を誘発し、この弛緩は神経性NO合成阻害剤(L-NPA)では抑制されなかったが非選択的NO産生阻害剤(L-NA)により強く抑制されたことから、血管内皮細胞におけるNO産生が重要な役割を担っていることが示唆された。

マウス尿道壁内の細動脈平滑筋においても、EFS誘発神経性弛緩に対応する細胞内カルシウム減少は、L-NPAでは抑制されずL-NAにより強く抑制された。しかしパルブアルブミンGCaMPマウスを用いて細動脈内皮細胞の細胞内カルシウム変動を可視化したところ、神経性アセチルコリンおよびノルアドレナリンの作用を遮断すると、EFSで誘発される内皮細胞内カルシウム上昇が消失することが確認された。内皮細胞においてEFS誘発カルシウム上昇が消失した条件においても、細動脈平滑筋における神経性細胞内カルシウム減少は持続しておりL-NAにより抑制された。これらの結果から、細動脈平滑筋における神経性の細胞内カルシウム減少は、内皮細胞由来のNOではなく、L-NPAにより抑制されないタイプ(スプライシングバリエーション)のnNOS依存性NOにより生じる可能性が示された。

(3) 下部尿路におけるNO作動性神経支配

NO作動性神経は、排尿時の尿道平滑筋の弛緩において主要な役割を果たしているほか、膀胱の微小血管や膀胱粘膜筋板の拡張、弛緩にも関わっているが、膀胱排尿筋ではNO作動性の弛緩は認められない。そこで下部尿路壁におけるNO作動性神経の分布を部位および標的細胞ごとに調べた。ブタ下部尿路標本を用いた蛍光免疫染色法により、nNOS陽性神経は尿道平滑筋には密に分布し、膀胱排尿筋にもまばらに分布していた。nNOS陽性神経は粘膜筋板に分布していたが尿道粘膜平滑筋には分布していなかった。膀胱および尿道粘膜の微小血管では、nNOS陽性神経と交感神経が絡み合うように近接して分布しており、CGRP陽性求心性神経も分布していた。これらのnNOS陽性神経の各種細胞への分布パターンは、NO作動性神経の機能的な投射に合致するものであった。

(4) 尿道粘膜平滑筋の収縮特性

ブタ尿道粘膜の平滑筋(以下、粘膜平滑筋)は、膀胱の粘膜筋板のような集団層構造を形成せず個々の細胞の集団として分布する。粘膜平滑筋は自発一過性細胞内カルシウム濃度上昇を生じ、対応する自発収縮を発生した。粘膜平滑筋の自発カルシウム濃度上昇はアセチルコリンによって促進され、ノルアドレナリンにより抑制されたことから、尿道壁の平滑筋とは異なる薬理学的特性を有することが示された。ノルアドレナリンによる収縮抑制作用に関わる受容体サブタイプを検討したところ、基線張力の減少には2受容体が、自発収縮の頻度の抑制には3受容体が関与していることが示唆された。

(5) PTHrPによる排尿筋弛緩機構

ラット排尿筋細胞は、大コンダクタンズカルシウム活性化カリウム(BK)チャネル開口による自発一過性外向き電流(STOCs)を発生していた。PTHrPは排尿筋の静止膜電位に相当する保持電位-40mVではBK-STOCsを増強しなかったが、わずかに脱分極した-30mVではその頻度を上昇させた。またPTHrPは、脱分極誘発外向き電流に対して、排尿筋の生理的電位変動範囲(活動電位振幅相当の-40mVから+20mV)では影響を与えず、LVDCCによる内向き電流にも影響を与えなかった。PTHrPは、排尿筋組織標本で発生するバースト状の自発一過性カルシウム濃度上昇を早期に終了させてバーストの持続時間を短縮させたが、自発カルシウム濃度上昇の最大振幅やバーストの発生頻度には影響を与えなかった。PTHrPはバースト状の自発活動電位発生時の脱分極条件においてのみ、おそらく小胞体からの自発カルシウム放出を促進することでSTOCsを促進して、LVDCCに依存する活動電位を抑制することで自発収縮の持続時間および振幅を減少させることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshikawa Mikako, Mitsui Retsu, Takano Hiromichi, Hashitani Hikaru	4. 巻 920
2. 論文標題 Mechanosensitive modulation of peristaltic contractions in the mouse renal pelvis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 174834 ~ 174834
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2022.174834	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 Takeya Mitsue, Higashi Ryuhei, Hashitani Hikaru, Nakamura Kei ichiro, Hayashi Tokumasa, Nakashima Noriyuki, Takano Makoto	4. 巻 600
2. 論文標題 PDGFR (+) subepithelial interstitial cells act as a pacemaker to drive smooth muscle of the guinea pig seminal vesicle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 1703 ~ 1730
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP281686	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 Mitsui Retsu, Chikada Yota, Arai Keiji, Hashitani Hikaru	4. 巻 386
2. 論文標題 Functional nitrenergic innervation of smooth muscle structures in the mucosa of pig lower urinary tract	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 513 ~ 531
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-021-03521-9	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 Mitsui Retsu, Hashitani Hikaru, Lang Richard J., van Helden Dirk F.	4. 巻 473
2. 論文標題 Mechanisms underlying spontaneous phasic contractions and sympathetic control of smooth muscle in the rat caudal epididymis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv - European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 1925 ~ 1938
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00424-021-02609-z	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 該当する

1. 著者名 Sugiura Ayu, Mitsui Retsu, Hashitani Hikaru	4. 巻 474
2. 論文標題 Role of PTHrP in attenuating transient pressure rises and associated afferent nerve activity of the rat bladder	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv - European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 1077 ~ 1090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00424-022-02736-1	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13件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hikaru Hashitani
2. 発表標題 Mucosal microvasculature in the lower urinary tract:A therapeutic target for LUTS
3. 学会等名 ICS2021 ONLINE (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hikaru Hashitani, Retsu Mitsui
2. 発表標題 Non-locomotive roles of smooth muscle as a trigger of afferent signals
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉浦有優、三井烈、橋谷光
2. 発表標題 Roles of PTHrP in stabilising bladder micromotions and associated afferent nerve activity in rats
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋谷 光
2. 発表標題 下部尿路機能障害における臓器内微小循環の役割
3. 学会等名 第23回UTPシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋谷 光、三井 烈、近田陽太、新井慶二
2. 発表標題 ブタ下部尿路粘膜の平滑筋要素におけるNO作動性神経の分布と機能
3. 学会等名 第28回日本排尿機能学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三井烈、近田陽太、新井慶二、橋谷光
2. 発表標題 ブタ下部尿路粘膜における NO 作動性神経の分布
3. 学会等名 63回平滑筋学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hikaru Hashitani
2. 発表標題 Lamina propria ~The site of function and disorder of the bladder?~
3. 学会等名 Advances in Urogenital and Gut Research Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 秀和、三井 烈、橋谷 光
2. 発表標題 膀胱細動脈における神経性 NO シグナル伝達に対するPDE5 阻害薬の作用
3. 学会等名 第27回日本排尿機能学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋谷 光、アイリス リム、三井 烈、ドナ セラズ、ラス チェスウイリアムス
2. 発表標題 ブタ膀胱の粘膜筋板と排尿筋におけるアンジオテンシン II 収縮の比較
3. 学会等名 第27回日本排尿機能学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hikaru Hashitani
2. 発表標題 Mechanism underlying pericyte spontaneous activity in viscera
3. 学会等名 第100回日本生理学会記念大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Wataru Kudo, Hikaru Hashitani
2. 発表標題 Parathyroid hormone-related protein suppresses spontaneous contractions of the detrusor smooth muscle by activating BK channels.
3. 学会等名 第100回日本生理学会記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 橋谷 光、三井 烈、田中 秀和、平井 優那
2. 発表標題 げっ歯類の尿道細動脈における神経性収縮制御に関する検討
3. 学会等名 第29回排尿機能学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 秀和、平井 優那、三井 烈、橋谷 光
2. 発表標題 尿道細動脈の収縮性の神経性制御機構
3. 学会等名 第64回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Birder L, Chess-Williams R, Clarkson B, Feng B, Fry C, Gebhart J, Griffiths D, Hashitani H, Kanai A, Lovick T, McCloskey K, Mitsui T, Takeda M	4. 発行年 2023年
2. 出版社 International Continence Society	5. 総ページ数 2202
3. 書名 Incontinence 7th Edition, Chapter2: Neural Control and Cell Biology	

〔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	三井 烈 (Mitsui Retsu) (90434092)	名古屋市立大学・薬学総合研究院(医学)・講師 (23903)	

6. 研究組織（つづき）

	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	中森 裕之 (Nakamori Hiroyuki) (60824349)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教 (23903)	
研究分担者	西川 信之 (Nishikawa Nobuyuki) (30722748)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員 (23903)	

	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
研究協力者	相澤 直樹 (Aizawa Naoki)		
研究協力者	杉浦 有優 (Sugiura Ayu)		
研究協力者	工藤 亘 (Kudo Wataru)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
	オーストラリア	ボンド大学	ニューカッスル大学
英国	ブリストル大学	オックスフォード大学	