

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791521

研究課題名（和文）蓄尿による伸展に対する膀胱平滑筋の興奮性の変化と過活動膀胱におけるその影響

研究課題名（英文）Changes of excitability to mechanical stretch in bladder smooth muscle and its effect to OAB.

研究代表者

矢内 良昌（YANAI YOSHIMASA）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：40468252

研究成果の概要（和文）：

我々はこれまでも細胞内電位記録や細胞内カルシウム濃度変化記録による平滑筋細胞の生理学的機能評価を行ってきた。今回は経時的な伸展刺激を与えることによる変化や過活動膀胱組織での変化について検討する予定であった。伸展刺激により自発活動電位の発生頻度は増加する傾向であったが、伸展時の連続的電位記録は技術的に困難であり、評価するに至っていない。

今後、等尺性張力測定等の記録方法を取り入れて検討を重ねることで評価しようと考えている。

研究成果の概要（英文）：

We have examined physiological functions of smooth muscles using a technique of intracellular membrane potential recording, intracellular Ca²⁺ concentration recording. In this time, we aimed to study the changes of excitability caused by time-dependent change of mechanical stretch in the bladder smooth muscle. Although the frequency of spontaneous action potentials seemed to be increased when the smooth muscle was stretched gradually, it was very difficult to record continuously in spite of stretching.

We will continue to study to understand the effect of mechanical stretch recording spontaneous contractions of smooth muscle strips.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2010年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：膀胱平滑筋、進展刺激、細胞内電位記録、過活動膀胱、活動電位

1. 研究開始当初の背景

現在我が国には800～900万人を超

える過活動膀胱 (OAB) 患者が存在すると報告されている。本疾患は尿意切迫感、頻尿、尿失禁など患者の QOL を著しく損なう。またその数は社会の高齢化とともに今後さらに増加すると考えられ、とくに介護を必要とする高齢者の場合にはその社会的負担を増大させることから早急に治療法を確立すべき泌尿器科領域の最重要課題の一つであると考えられる。

OAB の原因として以下のようなメカニズムが考えられている。

(1) 神経障害：

pontine micturition center (PMC) からの遠心路が膀胱を収縮させる仙随副交感神経中枢へ連絡されている。PMC より上位の大脳皮質、基底核などの障害では PMC に対する抑制が弱まり排尿反射が誘発されてしまう。これに対しては排尿反射亢進による膀胱不随意収縮を抹消 (膀胱ムスカリン受容体) レベルで抑える抗コリン剤が一般に使用される。他に脊髓損傷などで仙随より上位が障害される核上型障害によるものは、PMC などの上位中枢との連絡が途絶した状態で、仙随を中枢とした排尿反射路が新たに形成されることで出現すると考えられる。

(2) 下部尿路閉塞：

前立腺肥大症に代表される下部尿路閉塞患者での OAB が合併することがよく知られる。これには denervation supersensitivity の関与、平滑筋細胞の膜電位が浅くなり興奮性が高まることの関与、細胞間シグナル伝達に関与しているとされる間質細胞の増加などが原因となりうる事が示唆されている。

(3) 膀胱知覚過敏：

慢性膀胱炎、間質性膀胱炎などの膀胱の炎症性変化に求心性 C 繊維神経の活動亢進が関与していると推察されている。また慢性炎症時に産生されるプロスタグランジンや ATP なども C 繊維ニューロンの PG 受容体や P2X 受容体に結合し、この神経の活動をさらに促進している。

(4) 本態性過活動膀胱：

OAB 患者の大部分は、原因が特定できない

この本態性 (idiopathic) である。求心性神経、特に C 繊維神経の興奮性が亢進していることや、平滑筋自体の興奮性が高まっていたり筋細胞間の電氣的 coupling が増強するなどの変化が関与 (Brading AF, Urology, 50, Suppl 6A, 57(1997)) しているらしい。このように本態性 OAB には筋因性 (myogenic) と神経因性 (neurogenic) の 2 つのメカニズムが同時に関与していると思われる。これらの OAB についてはムスカリン受容体を標的にした抗コリン剤が現在ほぼ唯一の臨床的な治療薬となっており、現在薬物療法の新たな標的として様々な研究が行われてきている。この中で膀胱壁の伸展刺激に対して尿路上皮から化学伝達物質が過剰に放出され求心性神経を介して OAB が引き起こされる可能性があり、これを制御することで OAB を改善する可能性がある (Cockayne DA, Nature 407, 1011-1015 (2000))。以上のような知見が得られてきた。一方、尿管平滑筋での研究で伸展されていない状態での電氣的興奮は稀にしか伝播しないが、伸展されている状態では pacemaker の興奮が 1 対 1 に伝播する、ということが報告されている。つまり内容物により伸展されることで興奮が伝わりやすくなり合目的に蠕動運動が行われていると推察される。もともと正常の膀胱においても排尿量 (=蓄尿量) により尿流量率は変化することが知られており (Miyata et, al. Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi. 1990 Jul;81(7):1071-8.), 膀胱平滑筋組織内でも伸展により筋細胞間の興奮の伝播が変化している可能性がある。さらに下部尿路閉塞などともなう膀胱平滑筋組織内の変化によってその興奮の伝播に関する変化が著明に亢進するとすれば、こうした知覚により引き起こされる病態の他に、上記の idiopathic OAB の筋因性のメカニズムとして考えられているような、平滑筋組織の興奮性の亢進状態の関与が明らかになる可能性もある。これは OAB の一つの原因解明、ひいては新たな OAB 治療戦略の標的になりうると思われる。

2. 研究の目的

膀胱組織は蓄尿という生理現象によって排尿直後から刻々と変化する伸展刺激を受

ける。その時々蓄尿量すなわち伸展の程度によって排尿時の収縮性に変化が生じる可能性があり、この原因を尿路上皮、神経、間質組織、平滑筋組織など構成成分のそれぞれに検討し、さらに相互作用に言及していく必要がある。我々はこれまで膀胱平滑筋組織を用い、細胞内電位記録法、細胞内カルシウム濃度変化記録法などにより平滑筋細胞の生理学、薬理的な検討を行ってきた。また膀胱における間質細胞の役割や、下部尿路閉塞モデルでのこれらの細胞の増加などを確認してきた。今回これらの手法を用い、生理的な速度での伸展刺激により正常、下部尿路閉塞のそれぞれの膀胱平滑筋組織の興奮性の変化について検討し、それがこれまでの蓄積されたデータに照らして平滑筋細胞内のどのようなシグナル伝達経路に影響しているのかを解明する。このときに伸展刺激の強度を経時的に定量化することが必要であり、この点が従来と同様の研究では考慮されてこなかった点である。本研究でも平滑筋細胞、間質細胞を材料とした研究を行う。そのなかで、非排尿時にも発生していることがわかっている、自発活動が定量化したその時点での伸展によってどのように変化するか、そこに間質細胞による修飾があるのかといったことを観察することでその興奮の伝播の変化やそもそもの興奮性の変化について検討する。

過活動膀胱を発症する一つの病態として下部尿路閉塞があり、これには denerbation supersensitivity の関与 (Speakman MJ, J. Urol 138, 1461-1466, 1987)、膀胱平滑筋自体の変性が生じ、これに伴い平滑筋細胞の膜電位が浅くなり興奮性が高まることの関与 (Seki, et, al. J. Urol 148. 1957-1961, 1992)、細胞間シグナル伝達に関与しているとされる (Hashitani, et, al. J Physiol. 2004 Sep 1;559 (Pt 2):567-81)、間質細胞の増加 (Kubota, Neurourol Urodyn. 2007 Aug 27) の関与などが示唆されている。この動物モデルを用いた同様の実験を行う。正常動物膀胱での実験で定量化した伸展刺激を与え、このときの興奮性の変化がどのように変化するかということを検討し、下部尿路閉塞モデルでの過活動が平滑筋組織あるいは間質細胞

の興奮性の変化にも起因するものか否かについて明らかにする。

3. 研究の方法

正常雌モルモット膀胱平滑筋組織を用いて下記の実験を行う。

(1) 平滑筋細胞の自発活動の発生頻度と伸展刺激の関係

平滑筋細胞の細胞内電位記録、細胞内カルシウム濃度変化記録を行うと、自発活動が記録されるがこの発生頻度は一定ではない。これは膀胱平滑筋の静止膜電位が消化管平滑筋ほど深くないため活動電位を発生させるL型カルシウムチャネルの閾値に容易に達するため静止膜電位での安定性が低いからかもしれない。しかしL型カルシウムチャネルの開孔のトリガーとなるものについてはいまだ定かではなく、ここに伸展刺激の関与の可能性はある。STREX社の培養細胞伸展システムを用いて蓄尿時の膀胱のように徐々に伸展されていく状況を擬似的に再現する。この状況での自発活動の発生頻度や電位変化の特徴を経時的に計測していくことでその影響を観察する。具体的には動物から摘出した膀胱を切開し、粘膜や粘膜下組織、一部の平滑筋組織を除去、ここから平滑筋片が1ないし数本含まれるようにシート状に平滑筋組織を切り出し、シリコン上に貼り付ける。

このシリコンを伸展システムに装着し、伸展速度を設定した上で経時的に細胞内電位記録や細胞内カルシウム濃度変化記録を行いデータを蓄積する。

ここである程度の伸展で変化がみられるようならこの変化が細胞内シグナル伝達経路のどこを介して生じているのかを検討する。具体的には、これまで解っている自発活動にかかわるシグナル伝達経路上のチャネル、レセプターなどの作動薬や拮抗薬を用いてこの変化の増減を観察し、影響のものを同定することでこの変化を生じる経路を推察する。またこの経路が類推されたなら、これは伸展による興奮性の変化に対する治療標的となりうることが予想される。

(2) 間質細胞の自発活動の検討

形態学的に同定した間質細胞から細胞内電位記録と、カルシウム蛍光指示薬による細胞内カルシウム濃度変化の観察を行う。特にカルシウム濃度測定においては、平滑筋細胞から得られるカルシウム信号との時間的、空間的關係に注意して観察を行う。このことにおいても伸展刺激を与えていった際の影響を検討する。平滑筋細胞での検討と同様に変化が認められたなら、そのシグナル伝達経路について同定すべく、薬理学的考察を行う。

(3) 下部尿路閉塞(B00)モデル動物の作成

B00 モデルの作成については確立された方法に従って行う。

200 g 雌モルモットを用いる。麻酔を行ったうえで下腹部に切開を加え、膀胱前面を露出、膀胱頸部を絹糸で適度に結紮することによる軽度の尿路閉塞を作成 (Kubota, Neurourol Urodyn. 2007 Aug 27) する。

(4) 結紮手術を行った動物の過活動膀胱についての評価

下部尿路閉塞手術を施行したモデル動物を代謝ケージで飼育する。このとき経時的に排尿記録を行い、排尿回数の増加、1 回排尿量の減少などを確認し、閉塞による OAB 状態が形成されていく過程を観察、確認する。

(5) 下部尿路閉塞後過活動膀胱組織を用いた実験

① コントロール動物膀胱平滑筋組織での実験で定量化した伸展刺激を同様に与え、平滑筋細胞に刺入した微小ガラス電極で細胞内電位記録を行う。またカルシウム蛍光指示薬による細胞内カルシウム濃度変化記録を行う。これらにより記録される自発活動のデータとコントロール動物から記録されたデータとを比較検討する。コントロール動物で興奮性の制御に関する細胞内シグナル伝達経路が同定されたなら、下部尿路閉塞モデル動物でも同様の経路で制御が可能であるか確認する。

② 間質細胞についても同様に実験を行い、

やはりコントロール動物のデータとの比較により平滑筋細胞、間質細胞の興奮性の亢進、興奮の伝播の亢進などについて検討する。興奮性の亢進や伝播の変化が存在するならば、それがどのような細胞内シグナル伝達経路の変化によって引き起こされるものかについて試薬を用いた実験を行うことで薬理学的に類推する。

4. 研究成果

我々はこれまでも細胞内電位記録や細胞内カルシウム濃度変化記録による平滑筋細胞の生理学的に機能評価を行ってきた。今回はここに経時的な伸展刺激を与えることでの変化について検討する予定であった。伸展刺激により自発活動電位の発生頻度は増加する傾向があるようであったが、実際伸展していくと電位記録が連続的には行えないという技術的関門があり、評価するにいたっていない。

今後、等尺性張力測定などの他の記録方法を取り入れて検討を重ねることで、経時的伸展刺激による平滑筋組織の自発活動の発生頻度への影響や同様の観点で過活動膀胱の組織についてのその変化などについて評価しうるのでないかと考えている。

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 1 件)

矢内良昌、佐々木昌一、窪田泰江、橋谷光、郡健二郎、膀胱排尿筋収縮と NO、排尿障害プラクティス、査読無し、Vol. 18 No. 2 2010, pp. 31-37

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢内 良昌 (YANAI YOSHIMASA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：40468252