

機関番号：21601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21890205

研究課題名（和文） ラット膀胱蓄尿期における Rho-kinase の役割

研究課題名（英文） The role of Rho-kinase in the urinary storage phase

研究代表者

塩見 誉 (SHIOMI HOMARE)

福島県立医科大学・医学部・泌尿器科

研究者番号：10554181

研究成果の概要（和文）：

本研究では、伸展刺激による Rho-kinase (ROK) 経路の活性化が、膀胱平滑筋トーンスを維持することにより、膀胱コンプライアンスに関与することを証明した。したがって、ROK 阻害剤は膀胱コンプライアンスを増加することで、過活動膀胱などの膀胱蓄尿障害の治療に役立つと思われる。

研究成果の概要（英文）：

This study demonstrates that stretch activates Rho-kinase (ROK) pathway, which contributes to the maintenance of bladder tonus, thereby affecting bladder compliance. Therefore, it would appear that blockade of ROK may represent a useful therapeutic approach to over active bladder by increasing bladder compliance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,500,000	450,000	1,950,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：Rho-kinase、膀胱、伸展刺激、膀胱蓄尿期

## 1. 研究開始当初の背景

アゴニスト刺激によって引き起こされる平滑筋収縮において、Rho-kinase (ROK) は、ミオシン軽鎖を抑制し、細胞内  $Ca^{2+}$  レベルが低下しても筋収縮を持続させることが知られている。この  $Ca^{2+}$  感受性の亢進効果は  $Ca^{2+}$  sensitization と呼ばれ、膀胱平滑筋でも報告されており、アゴニストの受容体結合に伴う RhoA の活性化とその下流にある ROK の活性化に至る経路 (RhoA/ROK 経路) が関与することが明らかになった。一方、アゴニストに

よる刺激を受けなくても平滑筋は適度な伸展下で張力を保つ事ができるが、このような平滑筋の筋緊張 (トーンス) にも ROK が関与する可能性が指摘されている。膀胱平滑筋条片による実験 (muscle strip study) でも、静止張力負荷時の筋緊張に対して ROK 阻害剤が弛緩効果を認めると報告されている。このことから、伸展により ROK 経路が活性化され、平滑筋トーンスを維持している可能性が示唆されるが、そのメカニズムは不明である。また、特に膀胱では蓄尿に伴って膀胱が伸展

されていくので、伸展と平滑筋緊張の関係は膀胱コンプライアンスに影響を与える重要な因子の一つであり、そのメカニズムの解明は過活動膀胱をはじめとした膀胱蓄尿障害の治療に役立つと思われる。

## 2. 研究の目的

(1) 膀胱平滑筋切片に静止張力を負荷(伸展刺激)した時に、ROK 阻害剤の弛緩効果を検討する。また、静止張力負荷時の膀胱では、伸展刺激によって尿路上皮等から放出されたアゴニストによってROKが活性化している可能性もあるため、これを検討する(autocrine作用の検討)。

(2) 伸展刺激によるROKの活性化の有無を検討する。伸展刺激により平滑筋細胞外や筋小胞体などから細胞質内へ $Ca^{2+}$ が流入し、細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度が上昇している可能性がある。血管領域では、細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の上昇そのものがROK 経路を活性化する( $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$ -sensitization)という報告があるので、今回の膀胱伸展刺激によるROK活性の変化が $Ca^{2+}$ 依存性かどうかを検討する。

(3) 膀胱切片の実験結果が、実際の膀胱内圧-容量関係に適應するかどうかは明らかでない。また、in vivoの膀胱内圧測定では膀胱平滑筋の中樞神経支配を考慮しなくてはならず、純粋な筋原性の反応を評価しにくい。一方、whole bladder modelを用いたin vitroの膀胱内圧測定では、膀胱内圧を直接測定できるばかりか中樞神経支配を考慮しなくてよく、筋原性の反応を測定するのに適すると思われる。よって、本実験ではwhole bladder studyを用いて、ROKの膀胱コンプライアンスへの関与を検討する。

## 3. 研究の方法

本実験では、10週齢のSprague-Dawley系ラットを用いた。エーテル麻酔で安楽死させ、その摘出膀胱を用いた。

### (1) muscle strip study

膀胱伸展刺激時にROKが活性化しているかを調べる。また、伸展刺激で膀胱粘膜や平滑筋からアセチルコリンやATPなどが放出され、これらが受容体を刺激し、ROKを介した筋原性収縮をしている可能性も否定できないため、これを検討した。

muscle stripを作り、オルガンバス内に入れ、等尺性張力実験を行った。まずmuscle stripに1g重の静止張力を負荷して、安定するまで1時間以上は静止した。安定したトーンにROK阻害剤(Y-27632, HA-1077)を累積投与して、その弛緩効果を検討した。膀胱平滑筋はパパペリンで完全に弛緩することが知られているため、そのときの弛緩を100%と

して示した。

アセチルコリン阻害剤(アトロピン)とATP阻害剤(PPADS)を累積投与し、その弛緩効果を検討した。

### (2) western blot

muscle stripに伸展刺激を加えたときとROK阻害剤を加えたときのROK活性の変化を調べた。MYPT1(myosin phosphatase targeting subunit)のリン酸化率をROK活性の指標とした。非伸展時、伸展時、ROK阻害剤(Y-27632)投与後に伸展させた時の3種類のstripをアセトン固定し、蛋白を抽出。その抽出液を用いて、Western blotにてMYPT1のリン酸化率を測定した。EDTA( $Ca^{2+}$ のキレート剤)とタブシガルジン(小胞体 $Ca^{2+}$ ポンプ阻害剤)などで膀胱平滑筋細胞内の $Ca^{2+}$ を枯渇させる処理をした上で同様の実験を行い、 $Ca^{2+}$ が伸展刺激によるROK活性の変化にどう影響するかを検討した。

### (3) whole bladder study

摘出膀胱(whole bladder)の尿道からシリコンチューブを挿入して糸で固定。摘出膀胱はクレブス液に満たしたオルガンバス内に入れた。シリコンチューブに3方活栓をとりつけ、一方に圧トランスデューサー、もう一方に生食シリンジを連結させた。これにより、膀胱に生食を注入しながら膀胱内圧測定を行うことが可能になり、膀胱コンプライアンス( $\Delta$ 膀胱容量/ $\Delta$ 膀胱内圧)を算出した。

また、クレブス液内にROK阻害剤を投与した状態で膀胱内圧測定を行い、ROK阻害剤

(HA-1077)によって膀胱コンプライアンスが変化するかを検討した。

## 4. 研究成果

### (1) muscle strip study

静止張力負荷時のmuscle stripにROK阻害剤(Y-27632, HA-1077)を加えると用量依存性に弛緩効果を示したため、ROKが筋トーンスの維持に関与していることを確認できた。一方で、アセチルコリン阻害剤(アトロピン)とATP阻害剤(PPADS)を投与しても静止張力負荷時のmuscle stripは弛緩効果を示さなかった。したがって、ATPやアセチルコリンは静止張力の維持には関与していないことが示唆された。以上から、静止張力負荷時のROK活性化のメカニズムは、伸展刺激によって膀胱粘膜などからアセチルコリンやATPが放出され、それぞれの受容体を刺激する事でROKが活性化し、筋トーンスを維持するというものではないことがわかった。これは、伸展刺激そのものがROKを活性化している可能性を示唆する。

(2) western blot

MYPT1 のリン酸化は膀胱平滑筋の非伸展時にも存在し、伸展刺激でさらに増加するものの、ROK 阻害剤によって非伸展時よりも低下した。したがって、膀胱において ROK は内因性の活性を持ち、その活性は伸展刺激により増加することが分かった。また、EDTA やタプシガルジン処理により膀胱平滑筋細胞内外の  $Ca^{2+}$  を枯渇させても同様の結果が得られた。したがって、伸展刺激による ROK の活性化には  $Ca^{2+}$  非依存性のものがあることが分かった。

(3) whole bladder study

in vitro に膀胱内圧測定を行い、膀胱圧容量曲線を描いた。膀胱コンプライアンスは ROK 阻害剤により用量依存性に増加した。この study によって、ROK は膀胱切片での実験に限らず、実際に膀胱コンプライアンスに関与していることを確かめることが出来た。

本研究では、アゴニストによる受容体刺激がない状態で、膀胱平滑筋の張力維持に ROK が関与する可能性とそのメカニズムを探るとともに膀胱コンプライアンスへの関与についても検討を加えた。先述したように、伸展による ROK の活性化とそれに伴う膀胱トーンの維持を証明し、ROK が膀胱コンプライアンスに関与することも証明した。また伸展による ROK の活性化には少なくとも  $Ca^{2+}$  非依存性のものがあることも証明できた。

伸展刺激によって張力が発生するメカニズムや伸展刺激によって ROK が活性化する理由については、まだ十分に明らかにされていないが、血管平滑筋では、伸展刺激が Rho-A を活性化することが観察されている。したがって、膀胱平滑筋においても、伸展によってまず RhoA が活性化され、続いて下流の ROK の活性化が起こっている可能性がある。

閉塞膀胱ラット（前立腺肥大症を想定）や卵巣摘除ラット（閉経後を想定）などの病態モデルで ROK の活性が増加するという報告がなされている。

したがって、膀胱蓄尿期における  $Ca^{2+}$  感受性を介した筋原性収縮メカニズムを解明することは、今後、過活動膀胱等の様々な膀胱蓄尿障害の治療に役立つと思われる、さらなる研究が必要だろう。

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 3 件)

- ① 塩見 蒼、高橋則雄、相川健、山口 脩 Rho-kinase と女性過活動膀胱、Urology View、査読無、Vol. 8、No. 1、2010、105 ページ～110 ページ

② Takahashi N, Shiomi H, Kushida N, Liu F, Ishibashi K, Yanagida T, Shishido, K, Aikawa K, Yamaguchi O, Obstruction alters muscarinic receptor-coupled RhoA/Rho-kinase pathway in the urinary bladder of rat. Neurourol Urodyn. 査読有 2009;28(3):257-262

③ Aikawa K, Sakai T, Shiomi H, Ogawa S, Kawashima Y, Kokubun S, Yanagida T, Kushida N, Matsuoka T, Yamaguchi O, The involvement of Angiotensin 2 Type 1 Receptor on Bladder Hypertrophy and Dysfunction in Obstructed Bladder of Rat. The 4<sup>th</sup> Pan-Pacific Continence Society Meeting Abstract Book, 査読有, 2009, 26-27

[学会発表] (計 6 件)

① Kawashima Y, Kushida N, Kokubun S, Ogawa S, Shiomi H, Nomiya M, Ishibashi K, Shishido K, Aikawa K, Yamaguchi O, MECHANICAL STRESS ACTIVATES LYSOPHOSPHATIDIC ACID RECEPTOR WITHOUT THE INVOLVEMENT OF LYSOPHOSPHATIDIC ACID IN HUMAN BLADDER SMOOTH MUSCLE CELLS, 40<sup>th</sup> Annual Meeting of the international Continence Society, 23rd 8 月 2010, Toronto, Canada

② Kokubun S, Aikawa K, Shishido K, Ishibashi K, Yanagida T, Nomiya M, Takahashi N, Shiomi H, Ogawa S, Kawashima Y, Yamaguchi O, Hayashi Y, PROTECTION OF NEURONS FROM DENERVATION PREVENTS BLADDER DYSFUNCTION FOLLOWING BLADDER OUTLET OBSTRUCTION IN RAT, 40<sup>th</sup> Annual Meeting of the international Continence Society, 23rd 8 月 2010, Toronto, Canada

③ 塩見 蒼、高橋則雄、國分周子、川島洋平、小川総一郎、赤井畑秀則、榎田信博、石橋 啓、宍戸啓一、相川 健、山口 脩、伸展で誘発される Rho-kinase の活性化と膀胱平滑筋トーンおよび膀胱コンプライアンスの関係、第 98 回 日本泌尿器科学会総会、2010 年 4 月 28 日、盛岡

④ Kawashima Y, Kushida N, Ogawa S, Shiomi H, Aikawa K, Yamaguchi O, EFFECT OF LYSOPHOSPHATIDIC ACID ON C-JUN TERMINAL KINASE ACTIVATION BY MECHANICAL STRETCH IN HUMAN BLADDER SMOOTH MUSCLE CELLS, 39<sup>th</sup> Annual Meeting of the international Continence Society, 29rd Sept 2009, San Francisco, USA

⑤ Shiomi H, Shishido K, Takahashi N, Kawashima Y, Ogawa S, Yazaki J, Ishibashi K, Aikawa K, Yamaguchi O, RHO-KINASE INHIBITOR INCREASES BLADDER COMPLIANCE IN AN IN VITRO RAT WHOLEBLADDER MODEL, 39<sup>th</sup>

Annual Meeting of the international  
Continence Society, 29rd Sept 2009, San  
Francisco, USA

⑥Ogawa S, Aikawa K, Kawashima Y, Shiomi  
H, Yoshida J, Chiba S, Shishido K,  
Yamaguchi O, THE EFFECT OF AGING ON NITRIC  
OXIDE AND NORADORELARINERELEASE IN  
ISOLATED RABBIT, 29rd Sept 2009, San  
Francisco, USA

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塩見 誉 (SHIOMI HOMARE)

福島県立医科大学・医学部・泌尿器科

研究者番号：1 0 5 5 4 1 8 1

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし