

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 24 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591787

研究課題名（和文） 低活動膀胱に対する中枢性及び末梢性神経ペプチド受容体を標的とした治療戦略

研究課題名（英文） Strategy targeting neuropeptide receptors in the central and peripheral nervous systems in treatment of underactive bladder

研究代表者

芳山 充晴（YOSHIYAMA MITSU HARU）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：20422694

研究成果の概要（和文）：遺伝性 2 型糖尿病マウス（DM）の下部尿路機能を評価した（野生型との比較）。DM では前頭葉の排尿抑制が十分に機能しておらず、反射排尿の様相を呈していた。DM では 30 週齢においても 80%以上の排尿効率を維持しており、軽度の低活動膀胱を呈していた。PACAP-38 脊髄腔内投与は正常マウスの最大排尿収縮圧を増加し、外尿道括約筋活動を部分的に抑制した。このように、脊髄 PACAP 受容体刺激は膀胱収縮力を増強し、排尿効率を高める可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Lower urinary tract function of genetically mutated mice with diabetes mellitus (DM) was evaluated and compared to that of the wild-type mice. The results suggest that in DM mice, mechanism controlling voiding in the forebrain is devoid of appropriate inhibitory function, and thus the animals present reflex micturition. DM mice at age of 30 week-old still retain voiding efficiency more than 80%, albeit moderately present underactive bladder. Intrathecal administration of PACAP-38 increased maximal voiding pressure and partially suppressed external urethral sphincter activity, suggesting the possibility that stimulation of spinal PACAP receptors enhances bladder contractility and ameliorates efficiency for voiding.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：排尿障害，膀胱，尿道，糖尿病，脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)，マウス

1. 研究開始当初の背景

低活動膀胱の原因 「表1」の通り。

表1 低活動膀胱を引き起こす原因疾患	
脊椎・脊髄疾患	脊髄形成不全、脊髄係留疾候群、腰部脊椎管狭窄症、椎間板ヘルニア、外傷性脊髄損傷、帯状疱疹、脊髄クモ膜炎など
自律神経ニューロパチー	糖尿病 、アルコール中毒症、Guillain-Barré 症候群など
骨盤内手術	広汎子宮全摘出術、直腸癌根治術など

低活動膀胱に対する今日の薬物治療

コリン作動薬/コリンエステラーゼ阻害薬と交感神経遮断薬の併用投与が一般的である。しかし、低活動膀胱治療において、コリン作動薬/コリンエステラーゼ阻害薬(e.g., 臭化ジスチグミン)の有効性は十分に確立しておらず、治療薬の選択肢は極めて限られる。

VIP/PACAP と VIP/PACAP 受容体

28 アミノ酸ペプチドである vasoactive intestinal polypeptide (VIP)と、PACAP-27 及びPACAP-38 の二形態で存在する pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)は、セクレチン/グルカゴン/VIP 神経ペプチド群に属する (Arimura, 1992; Pantaloni et al., 1996)。PACAP と VIP は、G 蛋白共役型受容体である VPAC1, VPAC2, PAC1 の 3 種と結合することが知られている (Arimura, 1998; Vaudry et al., 2000)。PACAP は、これら 3 種全てに高い親和性を有する。一方、VIP は、VPAC1 と VPAC2 にのみ高い親和性を示す。これら 3 種類のサブタイプ活性はアデニル酸シクラーゼを刺激し、サイクリック AMP 生成を促進する。更に、PAC1 活性は、ホスホリパーゼ C と関連した下流信号経路を刺激する (Laburthe et al., 2002)。

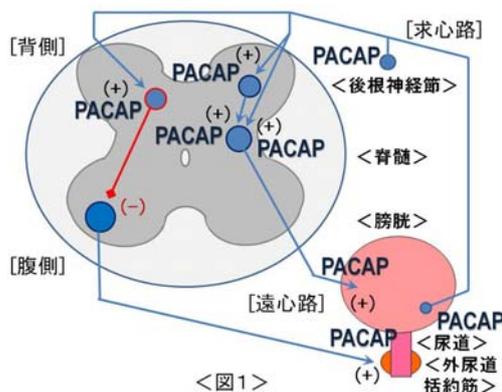
下部尿路機能制御機構における VIP/PACAP

図1：VPAC1, VPAC2, PAC1 のいずれにも高い親和性を有する PACAP に関し、過去の研究で明かされた局在部位と機能を示した (Yoshiyama & de Groat, 2008)。

膀胱知覚伝達求心路における VIP/PACAP 受容体：ラット、及び、ヒトの膀胱上皮には、それぞれ PAC1, VPAC1 が存在する (Braas et al., 2006; Reubi, 2000)。ラット膀胱上皮の PAC1 は、知覚神経伝達関連の TRPV1, CGRP と共に局在する (Zvarova, 2005; Fahrenkrug & Hannibal, 1998)。L6-S1 ラット後根神経節と L6-S1 ラット脊髄後角には、PAC1 と VPAC2 が存在する (Braas et al., 2006)。これらの結果は、膀胱からの知覚求心性伝達に VIP/PACAP が中枢性、及び、末梢性に関わることを示す。

排尿筋における VIP/PACAP 受容体：ラット

排尿筋には PAC1 と VPAC2 が、ヒト排尿筋には VPAC2 が存在する (Braas et al., 2006; Reubi, 2000)。排尿筋単離切片を用いた in vitro 実験系において、PACAP (PACAP-27 と PACAP-38) は、ラット、及び、マウスの定常状態にあった排尿筋のトーンスを増加させ、更に、神経電気刺激誘発の膀胱収縮を促進した。



尿道における VIP/PACAP 受容体：ラットの尿道上皮には PACAP 免疫反応 (-IR) 陽性細胞がカルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide: CGRP) と共に存在し、マウス尿道上皮では VPAC1 が確認された。これらの結果は、尿道知覚伝達への VIP/PACAP 関与を示唆する。In vitro 組織槽実験において、PACAP はブタ尿道平滑筋切片を弛緩した (Hernández et al., 2006)。

脊髄遠心路における VIP/PACAP：マウス、ラット、及び、ヒトの脊髄に PACAP-IR 陽性細胞と VIP-IR 陽性細胞が確認された。PACAP-IR 陽性細胞は、ラットの仙髄副交感神経核と dorsal commissure 領域に局在する (Zvarova et al., 2005)。前者は、排尿筋への興奮性出力を有し (de Groat, 1975)、後者に局在する介在ニューロンは、外尿道括約筋運動ニューロン (オヌフ核) へ抑制性に出力する (Blak et al., 1998; de Groat et al., 2001)。In vivo 機能実験において、脊髄正常、及び、慢性脊髄損傷ラットへの PACAP 脊髄腔内投与は膀胱収縮力を増加し、外尿道括約筋活動を抑制した (Ishizuka et al., 1995; Yoshiyama & de Groat, 2008)。

以上のように、中枢神経、及び、末梢神経・臓器局所のいずれにも存在する VIP/PACAP 受容体 (VPAC1, VPAC2, PAC1) の刺激は、膀胱と尿道の知覚伝達促進、排尿筋収縮促進、尿道抵抗低下の作用を呈する。すなわち、その活性 (作動薬) は、低活動膀胱の臨床的問題 (尿意低下、尿排出減弱、残尿量増加) を改善することが期待できる。

2. 研究の目的

低活動膀胱の主な臨床的問題点は、尿意低下、尿排出減弱、残尿量増加である。これら病態は、尿路感染症、水腎症、腎盂腎炎を引き起こし、時に生命予後を脅かす。神経ペプチドVIP/PACAPは、中枢神経、末梢神経、臓器組織に局在し、下部尿路の生理機能に関与する(Yoshiyama & de Groat, 2008)。そして、膀胱、尿道、及び、脊髄のVIP/PACAP受容体刺激は、求心性知覚伝達活性、排尿筋収縮力増強、尿道抵抗低下の作用を呈することから、低活動膀胱治療に有効である可能性がある。本研究は、低活動膀胱モデル動物の確立と、低活動膀胱治療においてVIP/PACAPを標的とする妥当性に関して検証することを主目的とする。

3. 研究の方法

適正な低活動膀胱モデル動物を確立する。商業的に購入可能な遺伝発症性2型糖尿病マウスの下部尿路機能を定量的に評価する。そして、正常マウス(野生型)と排尿生理学的特徴を比較する。

用いる動物は、糖尿病マウス(BKS. Cg-m+/+ *Lep^{db}/J*)、及び、その野生型マウス(*misty*)。

In vivo 排尿生理学的機能実験(反射排尿)

膀胱内圧測定(シストメトリー)法による評価。

In vivo 排尿行動実験(自発性排尿)

代謝ケージ計測装置を用いた24(-48)時間排尿行動/飲水行動実験。

In vivo 薬理学・生理学的機能実験

PACAP作動薬(PACAP-38)をマウスの脊髄腔内(intrathecal)へ投与し、in vivo 各種下部尿路機能パラメーター(蓄尿期、及び、排尿期)に対するPACAP受容体活性の効果を評価・検討する。

4. 研究成果

糖尿病マウスの下部尿路機能を「一日排尿行動(覚醒下)実験」と「in vivo 膀胱内圧測定(除脳排尿反射)実験」にて評価し、低活動膀胱モデルとしての妥当性を検証した。今回、雌の遺伝発症2型糖尿病(DM, *db/db*)マウス(8-12週齢)とその野生型(WT, *m+/m+*)群を用い、比較・検討した。

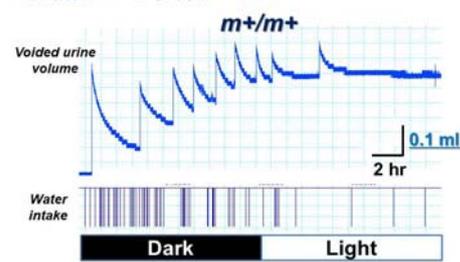
初期の実験では、8~12週齢のDMマウス及びその野生型WTマウスを使用。反射排尿機能の評価には除脳無麻酔下でのシストメトリー測定、覚醒下排尿行動の評価には代謝ケージ内24時間測定を行った。

[意識下自発排尿行動(代謝ケージ)実験]

WT群(図2, 4)と比べ、DM群(図3, 4)は多飲多尿であり、且、一日排尿回数が多く頻尿(35回 vs. 9.8回WT群)であった。一回排尿量

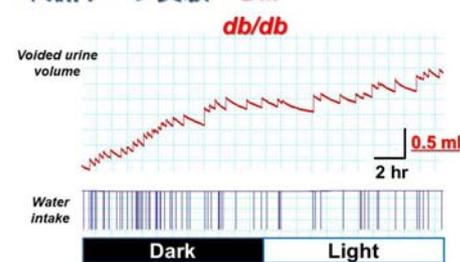
はWT群と比較し有意に多かった($219 \mu\text{l}$ vs. $146 \mu\text{l}$ WT群)。一方、排尿流量率では2群間に差はなかった。

代謝ケージ実験 - WT



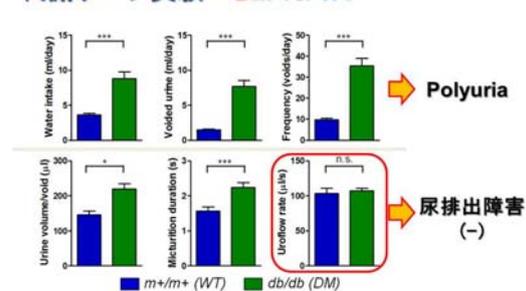
<図2>

代謝ケージ実験 - DM



<図3>

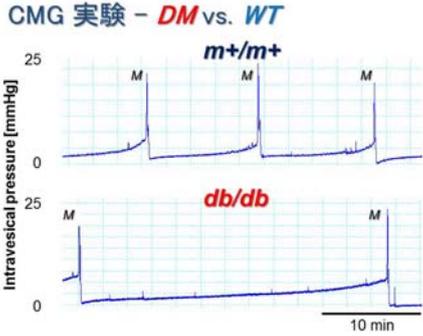
代謝ケージ実験 - DM vs. WT



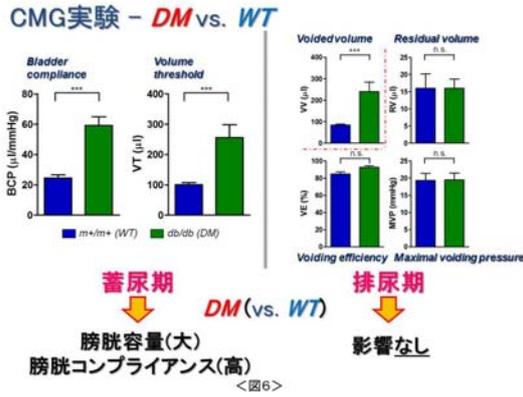
<図4>

[除脳無麻酔下排尿反射(CMG)実験]

WT群と比べ、DM群は著明に大きな膀胱容量(VT: $240 \mu\text{l}$ vs. $84 \mu\text{l}$ WT群)、高い膀胱コンプライアンス(BCP: $58 \mu\text{l}/\text{mmHg}$ vs. $24 \mu\text{l}/\text{mmHg}$ WT群)を有していた(図5, 6)。排尿最大収縮圧(MVP)、残尿量(RV)、排尿効率(VE)において2群間に差はなかった。(VV: 一回排尿量)

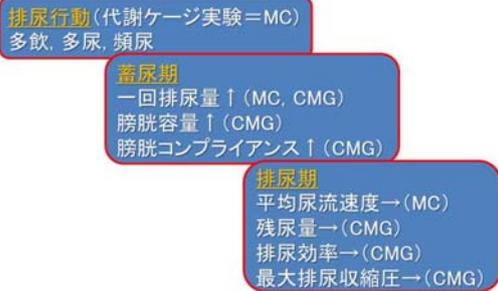


<図5>



<図6>

DM プロフィール (vs. WT)



<図7>

これら2種の評価法による結果を総合すると、DM群とWT群の差異は蓄尿相にあり、排尿相では2群間差が無いことが判明した(図7)。この結果は、DM初期には蓄尿相排尿筋活動もしくは膀胱知覚求心路に変化をもたらすが、排尿時排尿筋収縮と尿道弛緩の相互関係は維持されることを示す。更に重要なことは、WT群では反射排尿量(84μl)よりも自発排尿量(146μl)が多いのに対し、DM群では反射排尿量(240μl)と自発排尿量(219μl)が同じであること。これは、WT群では前脳から(橋排尿中枢へ)の抑制性制御による尿禁制が維持されているが、DM群ではその抑制機構が破綻しており、これがDMにおける尿意切迫感及び切迫性尿失禁と関係して

いる可能性を示した(図8)。これら一連の結果は、DM患者における下部尿路系臨床症状の病態解明とその治療法を探索する上で重要な手掛かりとなる。

一回排尿量の比較: WT vs. DM



<図8>

以上の結果は、「DM初期(8~12週齢)では低活動膀胱を来さない」ことを示す。DM群はWT群と比し、VTとBCPが大きく、その一方で、VEが保たれていることから、膀胱知覚求心性経路、又は、膀胱平滑筋はDM性変化を受けるものの、排尿時膀胱-尿道協調運動はその影響を受けていないことが推察される。

DM群では前脳の排尿抑制/尿禁制機構が破綻している可能性が示されたことは、実験開始当初想定されていなかった重要な発見である。

[高齢DMマウスの下部尿路機能評価]

糖尿病(DM)マウス、及び、その野生型(WT)マウスを10、20、30週齢時点で評価した。膀胱コンプライアンスは、DM群において20週齢でピークとなり(125.0μl/mmHg)、30週齢でも続いた(112.5μl/mmHg)。DM群の残尿量と膀胱容量閾値は週齢に伴い増加し、30週齢でピークとなった。排尿効率は、DM群の老化に伴い徐々に低下し、30週齢で81.5%となった。最大排尿収縮圧に対する週齢の影響はなし。DM群の膀胱重量は、10週齢では18.5mgであったが、20週齢、30週齢では57%増加。一方、尿道重量は10-30週齢で有意差なし。WT群の膀胱容量閾値は、10週齢、20週齢、30週齢がそれぞれ100.4μl、164.0μl、155.0μlであった。WT群において、残尿量、膀胱コンプライアンス、最大排尿収縮圧、膀胱及び尿道重量は週齢による影響がなかった。DM群とWT群の比較において、多種パラメータで差が確認できるのは20週齢以降。以上の結果から、DM群の週齢は、in vivo実験目的では30週齢以降を、in vitroでは20週齢以降が適している、と推察される。

[PACAP受容体活性は膀胱収縮力を増強させる]

PACAP38 (6 nmol) 脊髄腔内投与は、最大排尿収縮圧を 36%増加させ (31.7 mmHg→53.3 mmHg)、第 2 相膀胱収縮圧を 37%増加させた (15.0 mmHg→20.5 mmHg)。膀胱収縮時間を約 2 倍に増加させた (25 秒→53 秒)。外尿道括約筋筋電図において、PACAP-38 (6nmol i. t.) は、1 回平均活動期 (0.07 sec→0.49 sec) と 1 回平均静止期 (0.29 sec→1.82 sec) を増加させ、尿道活動期頻度 (2.78 Hz→0.43 Hz) へ減少させた。一方、PACAP は、尿道活動期/静止期比を変えなかった (0.23→0.27)。これら結果は、脊髄において PACAP は膀胱遠心路に対し興奮性に作用し、膀胱収縮力を増加させることを示唆する。一方、PACAP-38 は、外尿道括約筋活動頻度を低下させた。以上の結果は、脊髄 PACAP 受容体の活性が排尿を促進する可能性を示している。

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 11 件)

- (1) 武田正之、荒木勇雄、澤田智史、中込宙史、望月勉、小林英樹、座光寺秀典、芳山充晴、*医薬ジャーナル 新薬展望*2013 Vol. 49 S-1: 308(514)-319(525), 2013 年. 査読無
- (2) Yoshiyama M, Roppolo JR, Takeda M, de Groat WC. Effects of urethane on reflex activity of lower urinary tract in decerebrate unanesthetized rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 304: F390-F396, 2013. 査読有
- (3) 武田正之、中込宙史、芳山充晴、荒木勇雄. 排尿障害における $\beta 3$ 受容体刺激 (作動) 薬. *診断と治療* 第100巻・第8号: 1379-1385, 2012年. 査読無
- (4) 武田正之、中込宙史、芳山充晴、荒木勇雄. 排尿障害における $\beta 3$ 受容体作動薬. *Progress in Medicine* Vol. 32 (No. 4): 37-42, 2012年. 査読無
- (5) 武田正之、中込宙史、宮本達也、吉良聡、芳山充晴. 第 4 回国際尿失禁会議からの報告 Committee3 Cell Biology 「細胞生物学」. *排尿障害プラクティス* Vol.19(1): 66-88, 2011 年. 査読無
- (6) Beppu M, Araki I, Yoshiyama M, Du S, Kobayashi H, Zakoji H, Takeda M. Bladder outlet obstruction induced expression of prostaglandin E₂ receptor subtype EP4 in the rat bladder: a possible counteractive mechanism against detrusor overactivity. *J Urol* 186: 2463-2469, 2011. 査読有
- (7) 荒木勇雄、中込宙史、望月勉、小林英樹、芳山充晴、武田正之. 尿路上皮と排尿. *臨床検査* Vol.54(7): 726-730, 2010年. 査読無
- (8) 芳山充晴. 排尿障害の基礎. *臨床検査* Vol.54(7): 717-725, 2010年. 査読無
- (9) Takeda M, Mochizuki T, Yoshiyama M, Nakagomi H, Kobayashi H, Sawada N, Zakoji H, Du S, Araki I. Sensor mechanism and afferent signal transduction of the urinary bladder: special focus on transient receptor potential ion channels. *LUTS (Lower Urinary Tract Symptoms)* 2:51-60, 2010. 査読有
- (10) Araki I, Yoshiyama M, Kobayashi H, Mochizuki T, Du S, Okada Y, Takeda M. Emerging families of ion channels involved in urinary bladder nociception *Pharmaceuticals* 3:2248-2267, 2010. 査読有
- (11) Yoshiyama M, Araki I, Kobayashi H, Zakoji H, Takeda M. Functional roles of TRPV1 channels in lower urinary tract irritated by acetic acid: in vivo evaluations of the sex difference in decerebrate unanesthetized mice. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 298:F1351-F1359, 2010. 査読有

[学会発表] (計 20 件)

- (1) Yoshiyama M, Tsuchiya S, Takeda M. Blockade of neural transmission via metabotropic glutamate receptor subtype 5 facilitates urine storage without impairing bladder contractility and micturition in mice. (Abstract No. 133) International Continence Society 42nd Annual meeting, China National Convention Centre, Beijing, China, October 15-18, 2012.
- (2) Nakagomi H, Mochizuki T, Miyamoto T, Kira S, Yoshiyama M, Kawahara K, Moriyama Y, Koizumi S, Takeda M. Vesicular nucleotide transporter (VNUT) is a key molecule for mechanosensing in the human urinary bladder: negative correlation between VNUT expression in human bladder mucosa and first desire to void. (Abstract No. 12) International Continence Society 42nd Annual meeting, China National Convention Centre, Beijing, China, October 15-18, 2012.
- (3) 芳山充晴、土屋幸子、望月勉、中込宙史、宮本達也、吉良聡、武田正之. 代謝型グルタミン酸受容体サブタイプ5を介する神経伝達の遮断は膀胱収縮性及び排尿を損ね

- ずに蓄尿を促す. 第19回日本排尿機能学会 (愛知県名古屋市), 2012年.
- (4) Nakagomi H, Mochizuki T, Miyamoto T, Yoshiyama M, Araki I, Moriyama Y, Koizumi S, Takeda M. VNUT (vesicular nucleotide transporter) plays a crucial role in stretch-evoked ATP release from urothelium. (Abstract No. 495, May 20, 2012) American Urological Association Annual Meeting, Georgia World Congress Center, Atlanta, Georgia, U.S.A., May 19-23, 2012.
- (5) Yoshiyama M, Mochizuki T, Nakagomi H, Miyamoto T, Takeda M. Evaluation of increased voiding frequency in mice with type 2 diabetes mellitus. (Abstract No. 256, May 20, 2012) American Urological Association Annual Meeting, Georgia World Congress Center, Atlanta, Georgia, U.S.A., May 19-23, 2012.
- (6) Imamura N, Yoda Y, Nakagomi H, Miyamoto T, Tsuchida T, Fukazawa M, Araki I, Yoshiyama M, Takeda M. Risk factors of nocturia and assessment of nocturia-related quality of life in Japanese population. (Abstract No. 375) International Continence Society Meeting 41st, Glasgow, U.K., 29 August - September 2, 2011.
- (7) Mochizuki T, Yoshiyama M, Nakagomi H, Miyamoto T, Takeda M. TRPV4-deficient mice exhibit increased frequency of voiding ~evaluation of micturition behaviour using novel metabolic cage system~. (Abstract No. 411) International Continence Society Meeting 41st, Glasgow, U.K., 29 August - September 2, 2011.
- (8) Yoshiyama M, Mochizuki T, Nakagomi H, Kobayashi H, Miyamoto T, Zakoji H, Takeda M. Comparisons between voluntary behaviour and reflex response in control of the lower urinary tract function of mice. (Abstract No. 453) International Continence Society Meeting 41st, Glasgow, U.K., 29 August - September 2, 2011.
- (9) Nakagomi H, Mochizuki T, Miyamoto T, Kira S, Yoshiyama M, Araki I, Koizumi S, Moriyama Y, Takeda M. VNUT plays an important role in vesicular storage and subsequent exocytosis of ATP from bladder epithelium upon mechanical stretch stimulation. (Abstract No. 278) International Continence Society Meeting 41st, Glasgow, U.K., 29 August - September 2, 2011.
- (10) Yoshiyama M, Mochizuki T, Nakagomi H, Miyamoto T, Kobayashi H, Zakoji H, Takeda M. Evaluations of increased voiding frequency in mice with diabetes mellitus at early stage. (Abstract No. 182) International Continence Society Meeting 41st, Glasgow, U.K., 29 August - September 2, 2011.
- (11) Kobayashi H, Yoshiyama M, Inuzuka H, Kira S, Nakagomi H, Miyamoto T, Haneda Y, Sawada N, Zakoji H, Tsuchida T, Araki I, Takeda M. Gene expression patterns of acid-sensing ion channels (ASICs) families in mammalian bladder. (Abstract No. 520) International Continence Society 40th/International Uro-Gynecology Association Joint Meeting, Toronto, Canada, 23 August - 27 August, 2010.
- (12) Yoshiyama M, Araki I, Kobayashi H, Zakoji H, Takeda M. Intravesical infusion of a non-amiloride blocker of acid-sensing ion channels fails to affect lower urinary tract activity in unanesthetized decerebrate mice. (Abstract No. 519) International Continence Society 40th/International Uro-Gynecology Association Joint Meeting, Toronto, Canada, 23 August - 27 August, 2010.
- (13) Imamura N, Nakagomi H, Yoda Y, Zakoji H, Kobayashi H, Tsuchida T, Fukazawa M, Yoshiyama M, Araki I, Takeda M. Hypertension and type 2 diabetes mellitus are highly associated with nocturia than metabolic syndrome in Japanese population. (Abstract No. 381) International Continence Society 40th /International Uro-Gynecology Association Joint Meeting, Toronto, Canada, 23 August - 27 August, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芳山 充晴 (YOSHIYAMA MITSU HARU)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授
研究者番号: 20422694

(2) 研究分担者

中込 宙史 (NAKAGOMI HIROSHI)
山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 80418714

(3) 連携研究者

なし