

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791743

研究課題名（和文） 膀胱求心性神経伝達路の機能解析

研究課題名（英文） Functional study of the bladder mechanosensitive afferent pathways

研究代表者

相澤 直樹 (AIZAWA Naoki)

東京大学・医学部付属病院・特任助教

研究者番号：80595257

研究成果の概要（和文）：ラット膀胱における伸展受容一次求心性神経活動測定を行った。検討の結果、TRPV1 と TRPV4 はそれぞれ別の経路を介して膀胱伸展受容求心性神経活動を促進することを明らかにした。さらには、化学的膀胱炎を誘発する物質であり TRPA1 受容体刺激薬にも分類される acrolein (cyclophosphamide の主要代謝物) の膀胱内注入では、A δ 線維と C 線維の両方の神経活動が促進され、内因性 NO 産生を増加させる NO 基質である L-arginine および PDE5 阻害薬の tadalafil の投与によって、それらが抑制しうることを明らかにした。また近年、膀胱の微小収縮(micro contraction)が膀胱求心性神経活動の促進に関与することが示唆されている。この微小収縮による求心性神経活動の促進機構が、過活動膀胱の主症状である尿意切迫感発現の背景にある病態メカニズムの一つとする興味深い仮説がある。我々が行った検討の結果、新規過活動膀胱治療薬であるアドレナリン β 3 受容体作動薬ミラベグロンが、ラットにおいて、膀胱微小収縮を抑制し、同時に伸展受容求心性神経活動のうち主に A δ 線維を抑制し得ることを明らかにした。このことは、 β 3 作動薬が過活動膀胱症状を改善する作用機序として、この微小収縮による求心性神経活動の促進機構に対する抑制作用が関与することを示唆するものと考えている。さらに、膀胱の微小収縮ではなく、脊髄反射を介した膀胱収縮（等容量性律動性膀胱収縮）とそれに同期する求心性神経活動の測定法を確立した。その結果、ラット膀胱の伸展受容求心性神経のうち、A δ と C 線維の両者が、“伸展”のみではなく“収縮”にも応答することが示された。

研究成果の概要（英文）：We have established the measurement of single-unit afferent activities (SAAs) of the bladder mechanosensitive primary afferent nerve fibers in *in vivo* rats, and have investigated the effect of several drugs on these SAAs in this experimental set-up. The study demonstrated that L-arginine (an NO substrate), tadalafil and sildenafil (PDE5 inhibitors), and mirabegron (a β 3-adrenoceptor (β 3-AR) agonist), can inhibit both A δ - and C- mechanosensitive afferent fibers. Moreover, the activation of TRPV4 in the bladder, probably urothelium, facilitated the micturition reflex by P2X-purinoreceptor-mediated activation of the mechanosensitive capsaicin-insensitive C-fibers. In addition, L-arginine and tadalafil can inhibit the activation of both fibers induced by intravesical acrolein, a metabolite of cyclophosphamide. We further investigated the relationship between the SAAs and bladder microcontractions, which have been recognized of myogenic origin. The results showed that mirabegron inhibited both bladder microcontractions and A δ -fiber afferent activity, suggesting that the microcontractions may be linked to the mechanosensitive afferent activities of A δ -fibers. In another study, we have established the measurement of SAAs synchronized with rhythmic bladder contractions. We found that mechanosensitive afferent activities of both A δ - and C-fibers of the rat bladder are capable of being responsive to both stretch and contractile stimuli, and that L-arginine and mirabegron inhibit the activation of mechanosensitive afferent nerves induced by bladder contractions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：排尿学

1. 研究開始当初の背景

過活動膀胱および間質性膀胱炎に代表される膀胱蓄尿機能障害の病態生理において、近年、膀胱知覚伝達を担っている求心性神経系の機能異常が注目されているが、膀胱の一次求心性神経活動を直接測定する方法は少ない。我々の講座では、日本国内で唯一、世界でも数か所で行っていない単一神経線維における膀胱伸展受容一次求心性神経活動を測定できる技術を確立している (single afferent recording)。

2. 研究の目的

覚醒下膀胱内圧測定実験(CMG)並びに膀胱伸展受容一次求心性神経活動単離導出実験(single afferent recording)を用いて、膀胱機能と求心性神経伝達路の変化を薬理学的および電気生理学的に検討し、膀胱蓄尿機能障害の病態生理を求心性神経伝達路に焦点を当てて解明すると同時に、新しい治療薬候補を探索した。

3. 研究の方法

まずCMGにおいて各種薬物の下部尿路機能に及ぼす効果を検討した。各種パラメーターの内、特に求心性神経活動の指標と考えられる膀胱容量や1回排尿量に対する効果(用量依存性)を確認した上で、CMGで効果が確認された至適濃度の薬物を用いて single afferent recording を行った。この実験系では同時に、膀胱内 acrolein 注入により活性化された求心性神経活動を、これらの薬物が抑えるか否かも同時に検討した。

4. 研究成果

CMG において、TRPV4 作用薬である GSK1016790A(GSK)の膀胱内注入により、膀胱容量および1回排尿量は一過性に減少した(雑誌論文7)。

Single afferent recording において、Capsaicin(Cap)の感受性に基づいて、C 線維を Cap 感受性(n=8)と非感受性(n=14)の2つのタイプに分類できることが分かった。さらに、GSK の膀胱内注入は、Cap 非感受性 C 線維の単一求心性神経活動(SAAs)のみを有意に促進した(雑誌論文7)。膀胱内に一酸化窒素(NO)合成酵素阻害薬である L-NAME

を注入することにより、Aδ および C 線維の SAA は有意に促進され、この両線維の反応はその後の L-Arginine(NO 基質)投与により有意に抑制された。他方、L-Arginine 投与後、生理食塩水注入に対する Aδ および C 線維の SAA は有意に減弱した。Acrolein の膀胱内注入は Aδ および C 線維の SAA を促進し、この両線維の反応は L-Arginine の前投与によって有意に抑制された(雑誌論文8)。NO/cGMP 系の下流に位置し、勃起障害治療薬である PDE5 阻害薬の tadalafil および sildenafil は、L-Arginine と同様に Aδ および C 線維両者の SAAs を抑制し(学会発表4)、tadalafil については acrolein で惹起される SAAs の増大反応も抑制した(雑誌発表6)。

さらに、脊髓反射路を片側温存した状態で膀胱伸展刺激を加えて生じる膀胱律動性収縮並びにそれに同期して生じる SAAs に対して、L-Arginine の投与は Aδ と C 線維両者に対して有意な抑制を示した(学会発表7、15)。膀胱伸展時 SAAs 測定では、Mirabegron は Aδ および C 線維の両者の活動性を用量依存的に抑制したが、その効果は Aδ 線維に対する方が顕著であった(雑誌発表5)。一方、膀胱律動性収縮時 SAAs 測定では、Mirabegron は膀胱収縮時の Aδ 線維の活動性を有意に抑制したが、C 線維の活動性には影響を及ぼさなかった。また、Mirabegron は同時に律動性膀胱収縮の振幅および収縮幅を低下させ、収縮間隔を延長させた(学会発表16)。さらに、Mirabegron は膀胱内圧を一定にした等容量状態において発生する筋原性の膀胱微小収縮の数を減少させ、この時、Aδ 線維の SAAs は同期するように低下しており、Aδ 線維の活動性には膀胱の微小収縮が促進性に関与している可能性が示唆された(雑誌発表5)。

メタボリックシンドロームおよび糖尿病による下部尿路機能障害を検討するため、高脂肪食誘発肥満マウスおよび遺伝的 II 型糖尿病ラット Goto-Kakizaki (GK)ラットを用いて CMG を行った。マウスによる検討では、普通食群に比べて高脂肪食群で、基礎圧・排尿閾値圧・最大排尿圧・排尿量が低い傾向と残尿量が多い傾向を認めしたが、いずれも群間において有意差を認めなかった(雑誌発表4)。GK ラットの 46 週齢では、排尿圧の低下、膀

膀胱容量・一回排尿量・膀胱コンプライアンスの増大が認められ、**single afferent recording**を応用して、膀胱の一次求心性神経活動の伝導速度を測定したところ、**GK** ラットでは対象群と比べて有意に遅くなっており、少なくとも**II型糖尿病**ラットでは、糖尿病によって膀胱知覚低下が惹起されていることが推測された(雑誌発表3)。

末梢レベルでの骨盤臓器組織の交叉性を調べるため、膀胱の**SAAs**に及ぼす直腸伸展刺激の影響を**single afferent recording**を応用して検討した。その結果、**C**線維では膀胱伸展刺激と直腸伸展刺激の両者をともに受容する神経線維が存在し、それらの神経線維においては、直腸を持続的に拡張することにより、膀胱伸展刺激に対する**SAAs**の反応が増強されることが明らかになった(雑誌発表2)。

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 8 件)

1. Minagawa T, Aizawa N, Igawa Y, Wyndaele JJ.

The role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel in activation of single unit mechanosensitive bladder afferent activities in the rat

NeuroUrol Urodyn. 2013 in press

2. Minagawa T, Wyndaele M, Aizawa N, Igawa Y, Wyndaele JJ.

Mechanisms of Pelvic Organ Cross-Talk: 2. Impact of Colorectal Distension on Afferent Nerve Activity of the Rat Urinary Bladder.

J Urol. 2013 in press

3. Aizawa N, Homma Y, Igawa Y.

Characteristics of lower urinary tract dysfunction and bladder afferent nerve properties in type 2 diabetic goto-kakizaki rats.

J Urol. 2013;189(4):1580-7.

4. Aizawa N, Homma Y, Igawa Y.

Influence of High Fat Diet Feeding for 20 Weeks on Lower Urinary Tract Function in Mice

LUTS 2013;5:101-108

5. Aizawa N, Homma Y, Igawa Y.

Effects of mirabegron, a novel β_3 -adrenoceptor agonist, on primary bladder afferent activity and bladder microcontractions in rats compared with the effects of oxybutynin.

Eur Urol. 2012;62(6):1165-73.

6. Minagawa T, Aizawa N, Igawa Y, Wyndaele JJ.

Inhibitory effects of phosphodiesterase 5 inhibitor, tadalafil, on mechanosensitive bladder afferent nerve activities of the rat, and on acrolein-induced hyperactivity of these nerves.

BJU Int. 2012;110(6 Pt B):E259-66.

7. Aizawa N, Wyndaele JJ, Homma Y, Igawa Y.

Effects of TRPV4 cation channel activation on the primary bladder afferent activities of the rat.

NeuroUrol Urodyn. 2012;31(1):148-55.

8. Aizawa N, Igawa Y, Nishizawa O, Wyndaele JJ.

Effects of nitric oxide on the primary bladder afferent activities of the rat with and without intravesical acrolein treatment.

Eur Urol. 2011;59(2):264-71.

[学会発表] (計 17 件)

国際学会

1. Aizawa N, Homma Y, Igawa Y

Effects of silodosin, a selective α_1A -adrenoceptor antagonist, on the single primary bladder afferent activity of the rat

28th Annual European Association of Urology(EAU)Congress(posters) March 15-19, 2013, Milan, Italy

2. Aizawa N, Füllhase C, Hedlund P, Homma Y, Igawa Y

Peripheral inhibition of fatty acid amide hydrolase depresses activities of single primary bladder mechanosensitive afferents of the rat

28th Annual European Association of Urology(EAU)Congress(posters, award for best poster) March 15-19, 2013, Milan, Italy

3. Aizawa N, Homma Y, Igawa Y

Comparison of the Effects of Mirabegron, a Novel B_3 -Adrenoceptor Agonist, With the Anticholinergic Agent, Oxybutynin, on Primary Bladder Afferent Activity and Bladder Microcontractions in Rats

42th Annual Meeting of the International Continence Society(ICS)(poster) October 15-19, 2012, Beijing, China

4. Aizawa N, Homma Y, Igawa Y

Effects of sildenafil, a phosphodiesterase type

5 inhibitor, on the primary single afferent activity of the rat bladder
27th Annual European Association of Urology(EAU)Congress(poster)
February24-28, 2012, Paris, France

5. Aizawa N, Wyndaele J, Homma Y, Igawa Y
Direct Effects of TRPV4 Cation Channel Activation on the Primary Bladder Afferent Activities of the Rat
41th Annual Meeting of the International Continence Society(ICS)(poster) August 31, 2011, Glasgow, United Kingdom

6. Aizawa N, Homma Y, Igawa Y
Effects of Mirabegron(YM178), A Novel Beta3-Adrenoceptor Agonist, on the Primary Bladder Afferent Activity of the Rat
41th Annual Meeting of the International Continence Society(ICS)(poster) August 31, 2011, Glasgow, United Kingdom

7. Aizawa N, Wyndaele J, Homma Y, Igawa Y
Effects of L-Arginine on Single Unit Bladder Afferent Activities Synchronized with Rhythmic Bladder Contractions in the Rat
41th Annual Meeting of the International Continence Society(ICS)(podium, award for best basic science abstract) August 31, 2011, Glasgow, United Kingdom

8. Aizawa N, Wyndaele J, Homma Y, Igawa Y
Effects of TRPV4 cation channel activation on the primary bladder afferent activities of the rat
The 6th Pan-Pacific Continence Society Meeting (non-discussion poster) September 24, 2011, Taipei, Taiwan

国内学会

「シンポジウム」

9. 相澤直樹、本間之夫、井川靖彦
治療標的としての膀胱求心性神経伝達路
第 100 回 日本泌尿器科学会総会, 2012/04/22, パシフィコ横浜 (横浜市)

「口演発表」

10. Aizawa N, Homma Y, Igawa Y
Characteristics of lower urinary tract dysfunction and changes in bladder afferent nerves in the type2 diabetic Goto-Kakizaki rat
Nagoya Shinshu Forum 2012, 2012/09/01, 名古屋マリオットアソシアホテル (名古屋)

11. 相澤直樹、本間之夫、井川靖彦
Goto-Kakizaki 糖尿病モデルラットにおける下部尿路機能障害の病態解析
第 19 回 日本排尿機能学会, 2012/08/30, 名古屋国際会議場 (名古屋)

12. 相澤直樹、本間之夫、井川靖彦
ラット膀胱微小収縮および伸展受容一次求心性神経活動に及ぼす $\beta 3$ アドレナリン受容体作動薬ミラベグロンと抗コリン薬オキシブチニンの作用の比較検討
第 19 回 日本排尿機能学会, 2012/08/29, 名古屋国際会議場 (名古屋)

13. 相澤直樹、本間之夫、井川靖彦
ラット膀胱伸展受容一次求心性神経活動に対する PDES 阻害薬、Sildenafil の抑制作用
第 100 回 日本泌尿器科学会総会, 2012/04/21, パシフィコ横浜 (横浜市)

14. 相澤直樹、ウインダーレ ジョンジャック、本間之夫、井川靖彦
TRPV4 チャンネルを介するラット膀胱伸展受容一次求心性神経活動の促進機構
第 18 回 日本排尿機能学会, 2011/09/16, 福井フェニックスプラザ(福井市)

15. 相澤直樹、ウインダーレ ジョンジャック、本間之夫、井川靖彦
L-Arginine の律動性膀胱収縮およびそれに同期する膀胱一次求心性神経活動に対する抑制作用
第 18 回 日本排尿機能学会, 2011/09/16, 福井フェニックスプラザ(福井市)

16. 相澤直樹、本間之夫、井川靖彦
新規 $\beta 3$ 受容体作動薬ミラベグロン(YM178) の、膀胱伸展時および律動性収縮時のラット膀胱一次求心性神経活動に対する直接作用
第 18 回 日本排尿機能学会, 2011/09/16, 福井フェニックスプラザ(福井市)

17. 相澤直樹、井川靖彦、西沢 理、本間之夫、Wyndaele JJ
ラット膀胱伸展受容一次求心性神経活動に対する内因性一酸化窒素の抑制作用
第 99 回 日本泌尿器科学会総会, 2011/04/22, 名古屋国際会議場(名古屋市)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://cont-med.umin.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

相澤 直樹 (AIZAWA Naoki)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：80595257

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：