

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20082

研究課題名(和文)人工尿逆流による前立腺炎モデルの確立とPDE5阻害薬の炎症抑制作用の機序の解明

研究課題名(英文) Establishment of prostatitis model due to reflex of artificial urine

研究代表者

舟橋 康人 (Funahashi, Yasuhito)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70534824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：尿酸濃度の異なる人工尿をラット外尿道口から注入したところ、尿酸を含む人工尿で、前立腺の炎症、血流低下、頻尿が確認された。またヒト前立腺培養細胞を用いた検討では、尿酸の投与により間質細胞で酸化ストレスの活性化が確認された。

以上より、尿の前立腺導管内への逆流による炎症の惹起には尿中の尿酸が関与しており、間質細胞の酸化ストレス障害が機序であることが解明された。

研究成果の概要(英文)：We prepared artificial urine containing $\times 0$, $\times 0.5$, and $\times 1$ uric acid compared with the previously reported original composition. Male SD rats were catheterized into the urethra and 500 μL of artificial urine was instilled. On day 7, rats were evaluated. Additionally, human prostatic epithelial, stromal, and smooth muscle cells were cultured in medium containing uric acid and oxidative stress was evaluated.

Abacterial prostatitis, upregulation of proinflammatory cytokines and oxidative stress markers, disturbed prostatic microcirculation, and frequent micturition were observed in rats given artificial urine containing uric acid. In cultured cells, uric acid activated the oxidative stress pathway in stromal cell; these changes were ameliorated by probenecid.

This study demonstrated that urinary uric acid induces abacterial prostatitis and bladder overactivity when refluxed into the prostatic duct. The activation of oxidative stress is involved in this inflammation.

研究分野：医学

キーワード：前立腺 炎症 尿酸 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

慢性非細菌性前立腺炎は会陰や恥骨上の疼痛、頻尿を伴い、患者の生活の質を著しく低下させる疾患である。また前立腺肥大症組織には高頻度に無症候性炎症が見られることが知られているが¹⁾、前立腺過形成や癌化、下部尿路症状の出現との関係が注目されており、前立腺内の炎症の存在と前立腺体積との間に相関がみられたとする研究や²⁾、前立腺癌の発生に間質の炎症が関与しているとする研究³⁾、炎症を有する症例で有意に下部尿路症状が重篤であったとする研究⁴⁾など数多く報告されている。有症状例に対しては様々な薬物療法が臨床で用いられているが、病態が不明なこともあり、治療抵抗性の症例をしばしば経験し対処に難渋することが多いため、有効な新規治療法の開発が望まれている。

前立腺に炎症が起こる機序として、細菌・ウイルスの感染、加齢に伴う性ホルモン環境の変化、前立腺の虚血、自己免疫の関与、尿の前立腺導管内への逆流などが提唱されている。過去の基礎研究では、細菌性、ホルモン性、自己免疫性、化学物質誘発前立腺炎ラットモデルなどが用いられているが、小動物とヒトの下部尿路の解剖学的違いもあり、これらのモデルの組織像はヒトの慢性前立腺炎とは大きく違うことが問題である。一方、前立腺肥大症患者で起こる排尿に伴う尿の前立腺内への逆流⁵⁾が炎症と関係していることが予想されるが、同様の機序で炎症を起こす動物モデルは存在しない。我々は過去に、雄性ラットの膀胱より尿を直接採取し外尿道口より注入すると、1週間後に前立腺に炎症と間質の増生が起こり、排尿筋過活動となることを報告した⁶⁾。このモデルは作成が容易であり、ヒトの慢性前立腺炎と組織像が似ているという利点があるが、一方で尿

中には非常に多くの成分が含まれており、どの成分が炎症の原因となっているか分からないことや、ラットにより尿の組成が一定でない点など限界もある。

尿酸は尿中に豊富に含まれるが、様々な臓器において炎症を惹起することが知られている。そのため尿の前立腺導管内への流入による前立腺炎の発症においても、尿中の尿酸が原因物質である可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では尿中の尿酸が前立腺炎を引き起こすかどうか、またその機序について検討を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

< in vivo 実験 >

人工尿逆流性前立腺炎ラットモデル作成においては、12週齢雄性SDラットに人工尿500µLを経尿道的に投与し、7日目に各種評価を行った。

人工尿は過去の文献に従い、尿素、尿酸、クレアチニン、塩化アンモニウムなどを調合し、尿酸の濃度を変えた3種類作成した。

	x0	x0.5	x1
Uric acid	0	0.5	1.0
Urea	200	200	200
Creatinine	4.0	4.0	4.0
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	5.0	5.0	5.0
NaCl	54	54	54
KCl	30	30	30
NH ₄ Cl	15	15	15
CaCl ₂	3.0	3.0	3.0
MgSO ₄	2.0	2.0	2.0
NaHCO ₃	2.0	2.0	2.0
Na ₂ C ₂ O ₄	0.1	0.1	0.1
Na ₂ SO ₄	9.0	9.0	9.0
NaH ₂ PO ₄	3.6	3.6	3.6
Na ₂ HPO ₄	0.4	0.4	0.4

組織学的検討

H&E染色で前立腺内の炎症細胞浸潤、間質

の増生を検討した。

生化学的検討

炎症性サイトカイン(TNF、IL-1、IL-6)、MDA、HIF-1の発現量をELISA法にて測定した。(各群 n=6)

前立腺微小循環の測定

前立腺の微小循環を調べるために、麻酔下に腹壁切開より挿入したペンシル型 CCD 生体顕微鏡により、経時的に毛細血管の血流速度を測定する。微小循環の解析は、倍率400倍で録画した膀胱毛細血管のビデオ映像から対象血管の血流測定を行い数値化(ml/min/100gm)した。(各群 n=6)

覚醒下膀胱内圧測定

生食注入速度 40 μ L/分にて排尿間隔、膀胱容量、膀胱収縮力、残尿量、排尿筋過活動を評価した。(各群 n=6)

< in vitro 実験 >

ヒト前立腺培養細胞(上皮細胞、間質細胞、平滑筋細胞)の培養液に尿酸を加え、24時間後に下記の検討を行った。

In situ hybridization

80%コンフルエントの培養細胞をもちい、NADPH oxidase 4 に対して in situ hybridization を行った。DAPI にて核を染色した。

炎症マーカー測定

IL-1 と IL-6 の mRNA レベルを 2-step RT-PCR にて測定した。(各群 n=6)

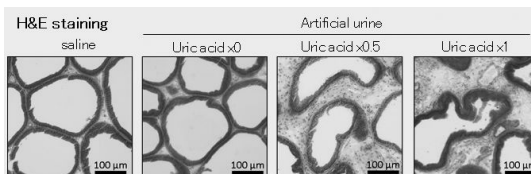
統計解析

Mann-Whitney U 検定にて群間比較した。

4. 研究成果

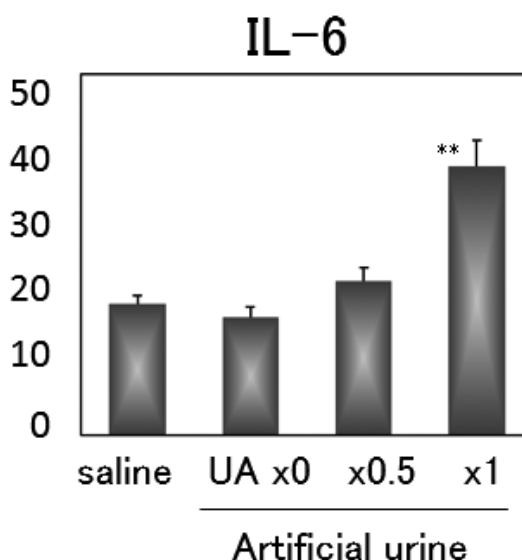
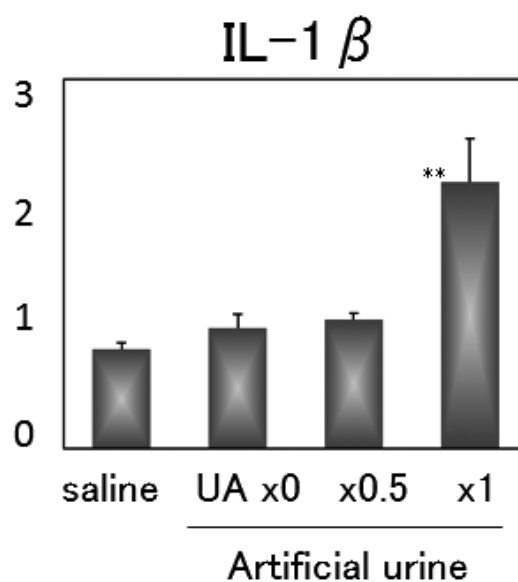
< in vivo 実験 >

H&E 染色

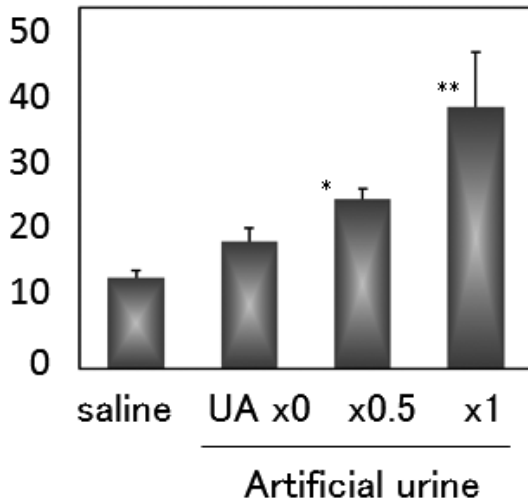


コントロール群、尿酸 x0 群では前立腺に炎症を認めないが、x0.5 群、x1 群では造成した間質に炎症細胞浸潤を認めた。

炎症性サイトカイン(pg/mg)

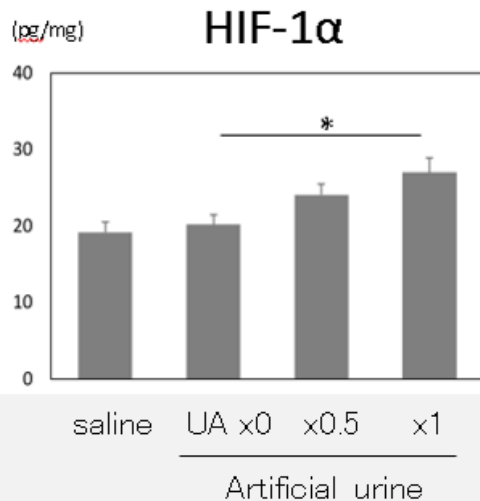
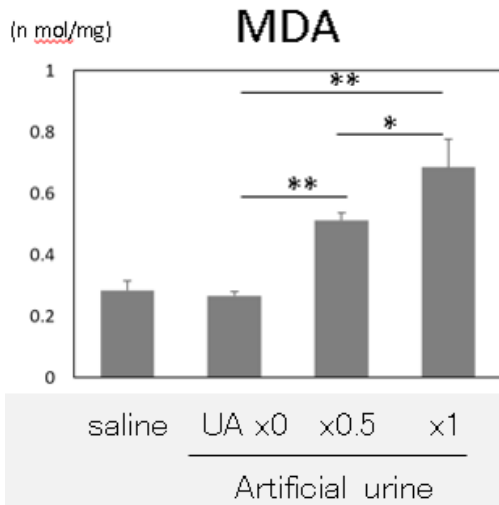


IL-18



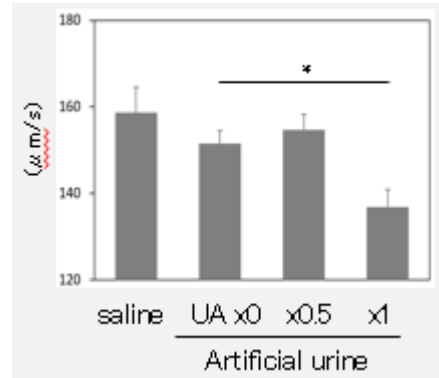
IL-1、IL-6、IL-18がx0群に比べx1で有意に発現が亢進していた。

酸化ストレスマーカー



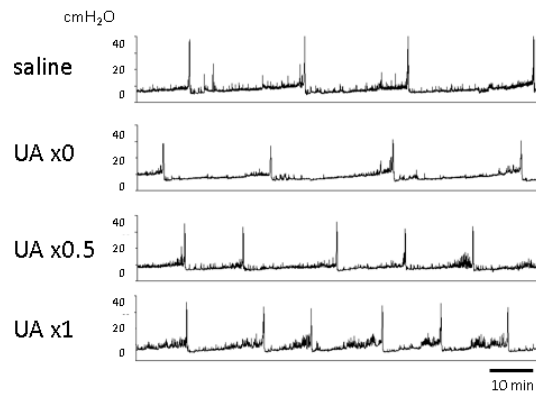
尿酸を含む人工尿の投与により、前立腺組織内の malondialdehyde、HIF-1 の発現が亢進していた。

前立腺微小循環



x1群にて前立腺表面の赤血球速度が低下していた。おそらく腫大した間質により血管が圧排され、微小循環障害が引き起こされると推測される。

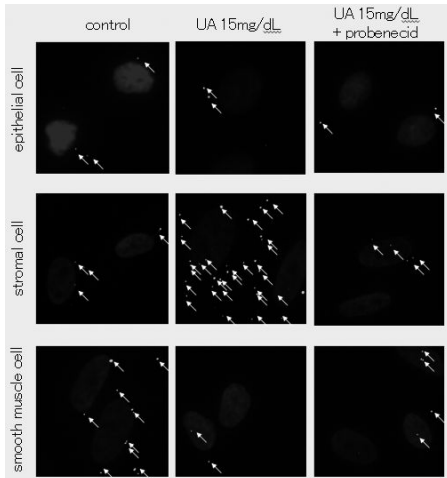
覚醒下膀胱内圧測定



排尿間隔はコントロール群 1260 ± 193 秒、x0群 1450 ± 145 秒、x0.5群で 1131 ± 113 秒、x1群で 969 ± 129 秒でx1群で有意に短縮していた。

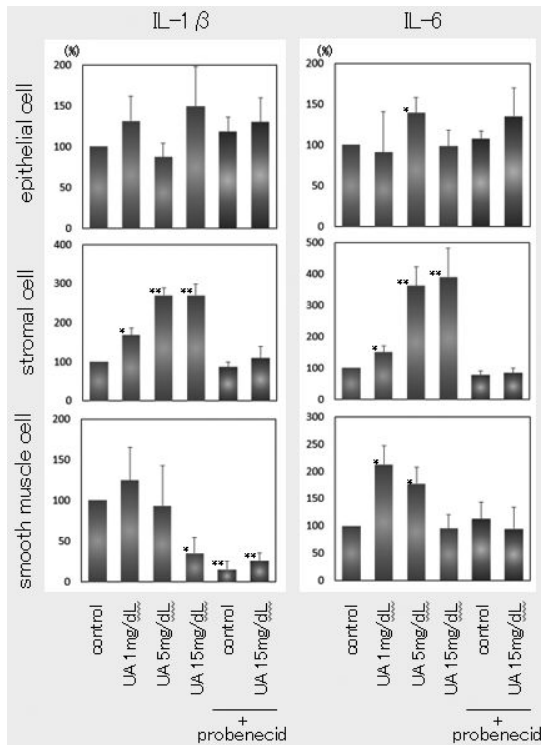
< in vitro 実験 >

NADPH oxidase mRNA 発現



間質細胞において尿酸を加えると NADPH oxidase 4 の発現が増えていた。この変化は尿酸の細胞内への取り込みを抑制する probenecid の投与により抑制された。

炎症性サイトカイン発現



間質細胞において IL-1、IL-6 の発現が尿酸濃度依存性に増加がみられ、probenecid の投与により抑制された。

以上の結果より、尿の逆流による前立腺炎の発症において尿酸が原因物質であり、その機

序は酸化ストレス経路の活性化であることが解明された。

< 引用文献 >

- 1) Zlotta AR, et al. Eur Urol. 2014; 66: 619-22.
- 2) Di Silverio F, et al. Eur Urol. 2003; 43: 164-75.
- 3) Kwon OJ, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2014; 111: E592-600.
- 4) St Sauver JL, et al. Urology. 2008; 71: 475-9.
- 5) Kirby RS, et al. BJU Int. 1982; 54: 729-31.
- 6) Funahashi Y, et al. Prostate. 2017; 77: 164-172.

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

舟橋 康人 (FUNAHASHI, Yasuhito)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70534824

(2) 研究分担者

なし