

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11179

研究課題名(和文)膀胱虚血におけるNrf2の役割の解明；過活動膀胱の新規治療標的としての可能性

研究課題名(英文)The role of Nrf2 in the pathogenesis of bladder ischemia

研究代表者

舟橋 康人(Funahashi, Yasuhito)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：70534824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では膀胱虚血マウスモデルにおけるNrf2の役割について検討を行った。L-NAMEをC57BL/6マウスに1週間投与すると膀胱の血流が低下し、Nrf2の発現が亢進しており、酸化ストレス、炎症がみられ、さらに機能的には頻尿を呈することが示された。一方でNrf2ノックアウトマウスでは膀胱血流の低下は同程度であったが、組織学的障害は悪化し、排尿間隔はさらに短縮することが示された。以上より、虚血による過活動膀胱の病態にNrf2が保護的に関与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過活動膀胱をはじめとする下部尿路症状の管理は、高齢化がすすむ本邦において健康長寿を目指すうえで近年ますます重要性が増している。過活動膀胱は複数の原因により引き起こされることが示唆されているが、膀胱の血流低下が原因の一つであると言われている。本研究では膀胱虚血に伴う過活動膀胱の病態にNrf2が保護的に関与していることが明らかとなった。今後、Nrf2を標的とした新規治療の開発の可能性が示唆された。

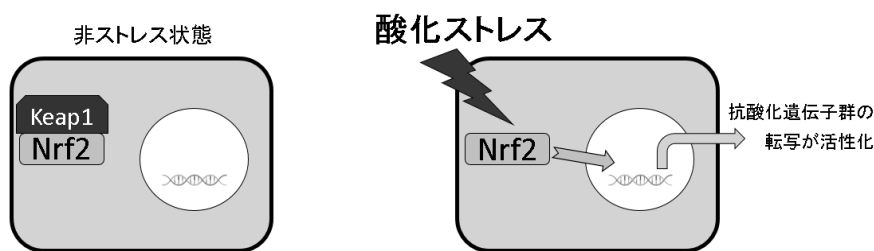
研究成果の概要(英文)：This study investigated the significance of Nrf2 in the bladder ischemic mouse model. The administration of L-NAME to C57BL/6 mice for 1 week resulted in the decreased blood flow in the bladder, increased Nrf2 expression, oxidative stress and inflammation in the bladder, and frequent micturition. Meanwhile, these damages were suppressed in the Nrf2 knock-out mice. Taken together, Nrf2 plays a protective role in the pathogenesis of ischemic overactive bladder.

研究分野：泌尿器科

キーワード：膀胱 虚血 Nrf2

## 1. 研究開始当初の背景

Keap1-Nrf2 制御系は生体防御において中心的役割を果たしている。非ストレス状態では Keap1 は Nrf2 に結合しプロテアソームによる分解を促進しているが、生体に炎症や虚血などの酸化ストレスが加わると Keap1 は失活し、Nrf2 が核内へ移行し、生体防御にかかわる遺伝子群の転写を活性化する。結果として Nrf2 は酸化ストレスの軽減、組織修復の促進などを誘導する。動物実験では、Nrf2 活性化物質であるカルノシン酸が濃度依存的に抗酸化/抗炎症作用を有することが示されている<sup>1)</sup>。また同じく Nrf2 活性化物質であるスルフォラファンが造影剤腎症を抑制すると報告されている<sup>2)</sup>。Nrf2 ノックアウトマウスは、薬剤や環境異物など外来性のストレスに対して脆弱であり、また内因性の活性酸素種からの障害も受けやすく、種々の炎症が遷延化、重症化することが報告されている<sup>3)</sup>。



近年、膀胱機能障害の病因として膀胱血流障害が注目され、過活動膀胱、前立腺肥大症、間質性膀胱炎などの病態における膀胱血流障害についての知見が集積されつつある。通常の蓄尿・排尿サイクルにおいても膀胱の血流が増減することが知られているほか、メタボリックシンドロームや動脈硬化により骨盤内臓器の血流が低下すると頻尿を有する率が高いと言われている。また動物実験においても動脈硬化モデル<sup>4)</sup>や自然発症高血圧モデル<sup>5)</sup>において骨盤内臓器血流が低下すると過活動膀胱を呈することが報告されている。我々も膀胱壁の血流増加により排尿筋過活動が改善することを報告している<sup>6)</sup>。これらの知見は膀胱血流の低下が病態の一因である過活動膀胱において、Nrf2 が関与している可能性を示唆するが、膀胱機能障害における Nrf2 の役割についてはいまだ明らかになっていない。

過活動膀胱の治療として、抗コリン薬や $\beta_3$ 作動薬など膀胱の収縮を抑制する薬剤が主に用いられているが、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く、有効な新規治療法の開発が望まれている。前立腺肥大症/過活動膀胱を有する男性に対し $\alpha_1$ 遮断薬や PDE5 阻害薬が使用され有効性が認められているが、その機序の一つとして膀胱血流の改善が想定されている<sup>7)</sup>。このように膀胱虚血を改善し、酸化ストレスを抑制することが過活動膀胱に対する有効な治療となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究ではマウスを用い膀胱虚血の病態における Nrf2 の役割を検討し、病態機序を解明するとともに、Nrf2 に関係した新規治療ターゲットの開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

8週齢雌性 C57BL/6 マウスに L-NAME (1g/L)または水を飲水投与し(day1~7)、7日目に以下の項目を評価した。また Nrf2 ノックアウトマウスでも同様の検討を行った。

#### 膀胱微小循環の測定

膀胱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)

#### 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。また Nrf2 の発現、および局在を免疫染色にて評価した。

#### 生化学的検討

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

#### 覚醒下膀胱内圧測定

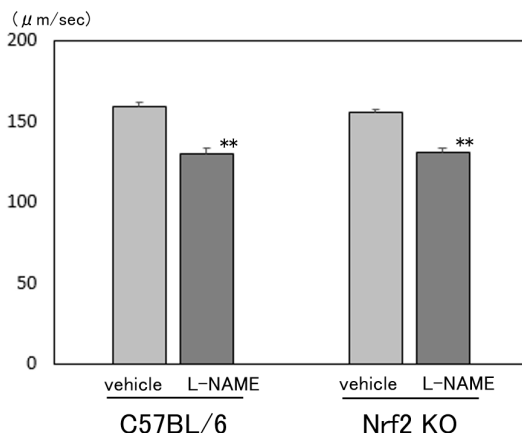
生食注入速度 10  $\mu$ L/分にて排尿間隔、膀胱容量、膀胱収縮力、残尿量、排尿筋過活動を評価した。(各群 n=6)

#### 統計解析

Mann-Whitney U 検定にて群間比較した。

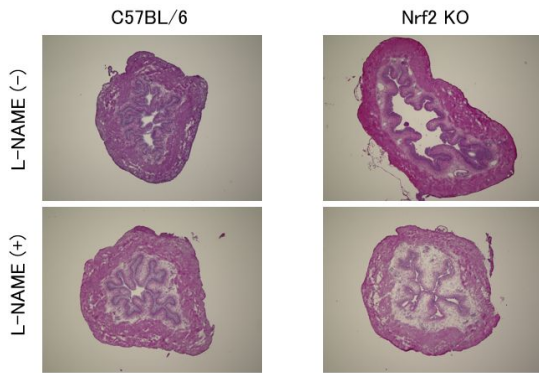
### 4. 研究成果

#### (1)膀胱血流



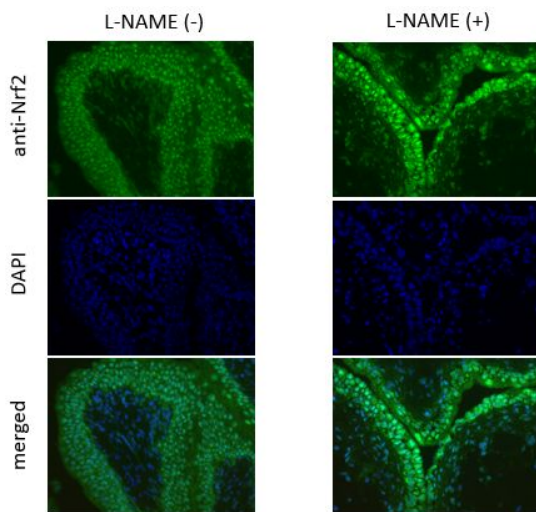
まず L-NAME の投与により C57BL/6 マウス、Nrf2 ノックアウトマウスともに膀胱血流が低下することが確認された。L-NAME 投与マウスを膀胱血流低下モデルとして用いることの妥当性が示された。

## (2)組織学的検討(H&E 染色)



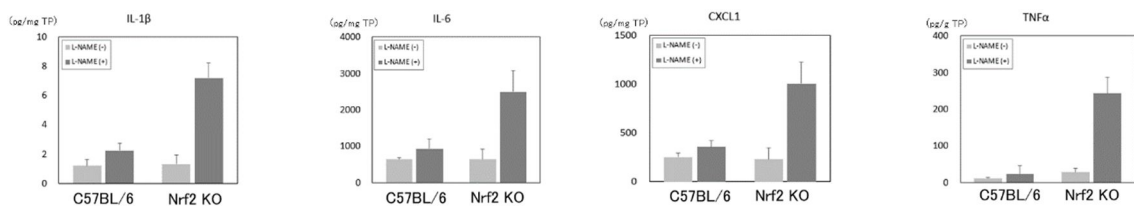
C57BL/6 マウスではL-NAME の投与により粘膜下層を中心に間質の浮腫、炎症細胞浸潤がみられた。Nrf2 ノックアウトマウスでは組織障害がより重篤であった。

## (3)Nrf2 免疫染色



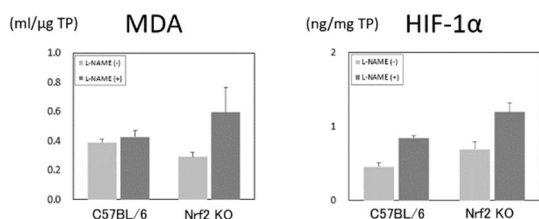
C57BL/6 マウスにおいて Nrf2 免疫染色を行った。L-NAME の投与により Nrf2 の発現亢進、細胞質から核内への移行が確認された。

## (4)炎症性サイトカインの発現



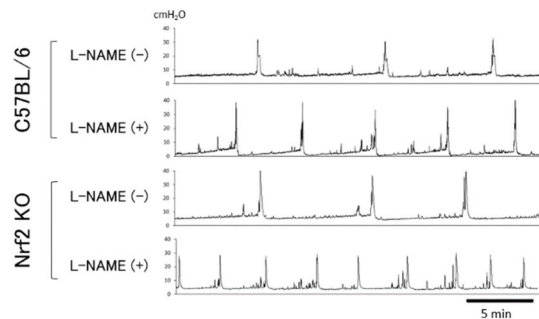
L-NAME の投与により IL-1、IL-6、CXCL1、TNF といった炎症性サイトカインの膀胱における発現が亢進した。Nrf2 ノックアウトマウスでは、より炎症の程度が強かった。

## (5)酸化ストレスマーカーの発現



L-NAME の投与により MDA、HIF-1 といった酸化ストレスマーカーの膀胱における発現が亢進した。Nrf2 ノックアウトマウスでは、より酸化ストレスの程度が強かった。

#### (6)膀胱内圧測定



	L-NAME	排尿間隔(sec)
C57BL/6	-	470 ± 42
	+	374 ± 42**
Nrf2 KO	-	469 ± 85
	+	196 ± 29**

\*\*; p < 0.01 compared to L-NAME(-)

L-NAME の投与により排尿間隔が短縮した。Nrf2 ノックアウトマウスは、より頻尿を呈していた。

以上の結果をまとめると、膀胱虚血により膀胱に炎症が起き、頻尿となることが示された。この変化はNrf2 ノックアウトで、より強く起きることが示された。

#### (結語)

本研究により膀胱虚血による頻尿にたいし Nrf2 は保護的に働くことが示された。

#### <引用文献>

- 1) Zhang D, et al. J Neurochem 2015; 133: 898-908.
- 2) Zhao Z, et al. Oxid Med Cell Longev 2016; 98: 25623.
- 3) Shelton ML, et al. Kidney Int 2015; 88: 1261-73.
- 4) Goi Y, et al. Pharmacology 2016; 97: 161-70.
- 5) Shimizu S, et al. Neurourol Urodyn 2014; 33: 350-7.
- 6) Mine S, et al. Urology 2013; 81: 155-9.
- 7) Morelli A, et al. S Sex Med 2011; 8: 2746-60.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Funahashi Y, Majima T, Takai S, Matsukawa Y, Yamamoto T, Gotoh M
2. 発表標題 Nrf2 plays a crucial role in the pathogenesis of ischemia-induced bladder overactivity
3. 学会等名 The 48th International Continence Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----