

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16767

研究課題名(和文) 下部尿路閉塞膀胱の慢性期における膀胱リモデリングとセロトニン受容体に関する研究

研究課題名(英文) the correlation of serotonin receptor and bladder remodeling in clinical stage of partial bladder outlet obstruction

研究代表者

垣渕 由岐子 (KAKIBUCHI, Yukiko)

山梨大学・大学院総合研究部・臨床助教

研究者番号：70735183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトでの前立腺肥大症に通じる、部分的下部尿路閉塞(pB00)マウスにおいて、長期のpB00状態は、対照群に比べて非活動期(ヒトでの夜間)の排尿回数を有意に増加させた。一方、この有意な増加は、ナフトピジルを長期投与したpB00マウスではみられなかった。また、pB00マウスでは、対照群に比べて5-HT2AのmRNAの発現が有意に低下したが、ナフトピジルを長期投与したpB00マウスではこの発現上昇は見られなかった。この現象は、ナフトピジルが5-HT2Aアンタゴニストとして作用することが、前立腺肥大症での蓄尿症状を緩和するメカニズムの一つであることを示唆していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の超高齢化社会への変容に伴い、加齢性に排尿蓄尿障害を呈する疾患である前立腺肥大症に悩む人口は将来的に増加すると予想される。本研究では、長期の部分的下部尿路閉塞状態が排尿の日内リズムにどのような変化を及ぼすか、また、前立腺肥大症の国産治療薬の一つであるナフトピジルの長期投与によってその変化をどのようなメカニズムで改善させるかに主眼を置いた研究であり、社会的にも国民へ貢献できたと考える。学術的には、長期の下部尿路閉塞状態、治療薬の長期投与での経過を追った基礎的研究は数少なく、その点についても評価されうると考える。

研究成果の概要(英文)：We reproduced benign prostate hyperplasia (BPH) with partial bladder outlet obstruction(pB00) mice. The increase in inactive-period micturition frequency was observed in pB00 mice compared to intact mice. And micturition frequency of inactive-period was significantly decreased in pB00 + NAF group compared to pB00. The mRNA-expression levels of 5-HT2A was significantly decreased in pB00 mice compared to intact mice ($p < 0.05$), which was canceled by long-termed naftopidil administration. Naftopidil behaves as 5-HT2 antagonists and this phenomenon could be the certain background mechanisms of relieving storage symptoms in BPH patient.

研究分野：医学

キーワード：下部尿路閉塞膀胱 セロトニン受容体 夜間頻尿 サーカディアンリズム 神経因性膀胱 前立腺肥大症

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

主に前立腺肥大症によって生じる下部尿路閉塞では、膀胱排尿筋の変化として初期には下部尿路閉塞の抵抗に抗って排尿を行うために代償性に膀胱排尿筋の過形成が起きるが、晩期には膀胱排尿筋の平滑筋組織が次第にコラーゲンを主体とした線維性組織に置換されることが知られている (Metcalf et al, 2010)。これらの変化が進むと、下部尿路閉塞が外科的治療などで解除されたとしても、膀胱の変形、下部尿路機能障害や下部尿路症状 (LUTS) が持続し、排尿筋過活動、過活動膀胱や低活動膀胱の病態がみられることがある (Abarbanel et al, 2007) (図 1, 2)。特に 70 歳以上の下部尿路症状は膀胱収縮障害によることが多いといわれている。しかし、これらの膀胱の二次的変化の機序は未だに不明な点が多く、根本的な治療も確立されていないのが現状である。

膀胱の構成要素である尿路上皮細胞では、様々な受容体、イオンチャネルを表面に発現させ、自らも ATP、Nitric oxide、Prostaglandine、アセチルコリンなどのメディエーターを産生し、排尿・蓄尿機能に参与している。また、膀胱壁の虚血や炎症、酸化ストレスによってもこれらのメディエーターの発現が変化することが知られている。下部尿路閉塞膀胱においても同様に虚血や炎症、酸化ストレス状態がおこるため、様々なメディエーターが膀胱の二次的変化にかかわっていることが指摘されている。これらの pB00 におけるメディエーターの作用機序の解明・制御は、pB00 における下部尿路機能障害の新たな治療法の端緒となる可能性があると考えられる。また、ブタ pB00 モデルにおいて、膀胱条片を用いた KCl やカルバコール誘発収縮が 5 ヶ月時に減弱するのに対し、セロトニン誘発収縮は減弱しないことが報告されている (Milicic et al, 2006)。

以上のことから pB00 慢性期の膀胱では、漿膜層平滑筋様細胞に起因するセロトニン誘発収縮を有することが考えられる。

2. 研究の目的

pB00 慢性期におけるセロトニン誘発収縮に関する詳細な検討や臨床的な生理機能への外挿は十分なされておらず、上記の解明・制御は、pB00 における下部尿路機能障害の新たな治療の端緒となりうると考えられる。本研究の目的は、pB00 慢性期における膀胱の二次的変化に関して、セロトニン受容体との関連を明らかにすることである。

3. 研究の方法

雌性 C57/BL6 マウスを用いた。すべての動物は餌と水に自由にアクセスできる環境で、12 時間毎の明期と暗期に置かれた。pB00 手術を施していない群 (intact 群) 開腹、尿道確保のみ施行した群 (sham 群) pB00 手術を施した群 (pB00 群) pB00 手術施行後に 1 プロロッカーであり、セロトニン受容体に結合親和性のあるナフトピジルを投与した群 (pB00+NAF 群) の 4 群間 (n=7) で検討した。pB00 手術は過去に報告した既報 (Kanno Y. et al. 2015) に準じて行なう。すなわち、麻酔下にて下腹部を切開し、膀胱と近位尿道部を露出する。近位尿道を慎重に剥離し、直径 0.55 mm の金属棒を沿わせ、4-0 シルクブレードを用いて尿道と金属棒の周囲を結紮する。金属棒を慎重に引き抜き、下腹部を縫合する。sham 手術においては、近位尿道の剥離を行い結紮はせず閉腹する。

術後、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月の観察期間の後に、明期・暗期の排尿回数、排尿量を測定した。排尿行動評価のために aVSOP (automated Voided Stain On Paper) 法を用いた。

膀胱組織において、コラーゲン、コラーゲン、5-HT_{2A} 受容体、コラーゲン分解酵素である

MMP9 (matrix metalloproteinase 9)、MMP を不活化する Tissue inhibitor of metalloproteinases(TIMPs)のサブタイプである TIMP1,TIMP2 の mRNA の発現を調べた。膀胱を摘出し、凍結保存後 ISOGEN®を用いて総 RNA を抽出する。

9) 統計解析

膀胱重量などの連続データの結果は、平均値 ± 標準誤差で表す。各観察時点における sham 群に対する pB00 群の影響は、2 群の検定を用いて比較する。sham 群または pB00 群におけるそれぞれの経時的変化の評価は、多群の検定を実施する。有意水準は 5%とする。病理組織評価などのスコアは、中央値と分位点で表す。各観察時点における sham 群に対する pB00 群の影響は、Wilcoxon の順位和検定を用いて比較する。pB00 群におけるナフトピジルの作用を評価する場合は、ナフトピジル群との間の Wilcoxon の順位和検定を実施する。sham 群または pB00 群におけるそれぞれの経時的変化の評価は、多群の検定を実施する。有意水準は 5%とする。

4 . 研究成果

(1) pB00 手術後 6 か月後で、sham 群に比べて pB00 群では体重増加の傾向があった (pB00 27.4g vs.sham 24.5g 中央値)(図 3)。pB00 群において、排尿回数が術前に比べて、術後 1 か月後に有意に増加していた。一方で、総排尿量 については変化がなかった。また、pB00 群において、術後 3 , 6 か月後の排尿回数は、術後 1 か月後に比べて有意に減少した (p<0.05)。さらに、術後 6 か月後の pB00 群において、sham 群に比べて有意に明期の排尿回数が増加し、明期の平均排尿量が低下していた (p<0.05) (日内リズムの障害)。

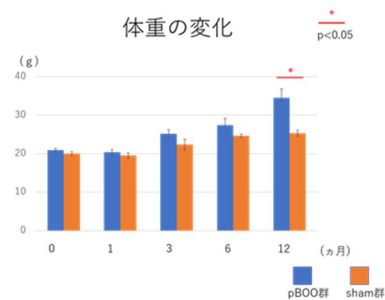


図 1

長期間の pB00 状態は日内リズムを障害する。哺乳類は睡眠期には排尿行動は減り、覚醒期には排尿行動が増える。マウスは夜行性の哺乳類であり、通常睡眠期である明期には排尿行動は少なく、覚醒期である暗期には排尿行動が多い。pB00 状態のマウスで体重増加がみられることは研究開始前には予想していないことであった。このメカニズムについてはまだ十分に明らかになっていないが、近年、男性だけでなく下部尿路症状を有する女性も、肥満やメタボリックシンドロームの傾向があることがわかっている。この観点から、pB00 マウスにおける体重増加は、日内リズムを障害しうることが考えられる。しかしながらこれは、鶏が先か、卵が先かの問題であり、さらなる検討が必要であると考えられる。

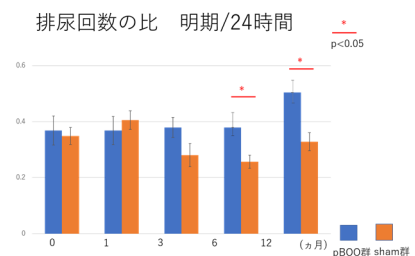


図 2

以上より、pB00 がマウスにおいて排尿行動の日内リズムを障害するということが分かった。これはヒトにおいて夜間頻尿として観察される病態に通ずる。

(2) 手術後 6 か月後の排尿回数に各群で有意差はなかった。pB00 群において、intact 群, sham 群に比べると明期 (非活動期) の排尿回数の増加と排尿量の有意な減少がみられたが、pB00+NAF 群ではその変化は見られなかった (図 5)。

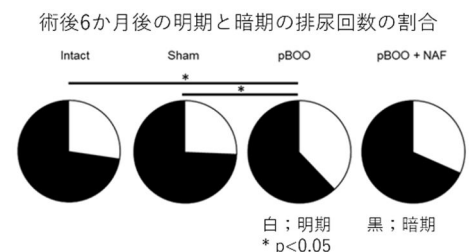


図 3

以上より、ナフトピジルは pB00 により引き起こされる排尿行動の日内リズムの障害を緩和したと考えられる。

(3) intact 群に比べて pB00 群ではコラーゲン I、コラーゲン III、5-HT2A, TIMP1, TIMP2 の mRNA の発現が有意に増加し、MMP9 の発現は有意に低下した。

また、pB00 群に比べて、pB00+NAF 群では、5-HT2A 及び TIMP2 の mRNA の発現レベルが有意に低下した。

ナフトピジルは一般的な薬理学的特性として α_1 ブロッカーに親和性を持つが、同時に 5-HT2 アンタゴニストとして作用する。本研究では、pB00 で

5-HT2A の増加がみられるが、この変化はナフトピジルの長期投与により打ち消された。この現象は、前立腺肥大症の患者において蓄尿症状を緩和するメカニズムの一つではないかと考える。

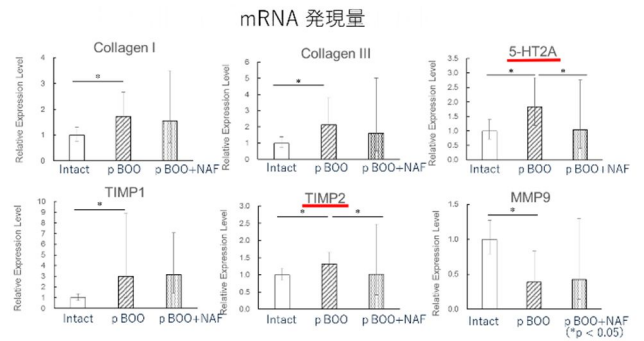


図 4

しかしながら、ナフトピジルの長期投与がコラーゲン I およびコラーゲン III の mRNA の発現を低下させないため、 α_1 ブロッカーの長期的な効果として、形態学的変化は引き起こさないが、機能的変化は起こしうることが考えられる。

以上より、pB00 マウスにおいて、長期的な α_1 ブロッカーの投与は排尿パターンを逆転させ、ナフトピジルはセロトニン受容体の発現を低下させる。

(4) pB00 慢性期におけるセロトニン受容体との関連、 α_1 ブロッカーの長期投与がもたらす効果のメカニズムへの外挿は、これまで十分なされておらず、上記の成果は、pB00 における下部尿路機能障害の新たな治療の端緒となりうると考えられる。また、当初予想していなかった pB00 状態と肥満の関連についても、その発症のメカニズムに焦点を当てて検討したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kitta T, Kanno Y, Chiba H, Higuchi M, Ouchi M, Togo M, Moriya K, Shinohara N.	4. 巻 25
2. 論文標題 Benefits and limitations of animal models in partial bladder outlet obstruction for translational research.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Urol. 2018 Jan	6. 最初と最後の頁 36-44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iju.13471.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kitta T, Kanno Y, Higuchi M, Ouchi M, Moriya K, Shinohara N
2. 発表標題 .Long-term administration of alpha-1 blocker reverses the micturition pattern in bladder outlet obstruction mice.
3. 学会等名 49th International Continence Society annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅野由岐子、橘田岳也、樋口まどか、築山 真由子、大内みふか、東郷未緒、西村陽子、中村美智子、守屋仁彦、篠原信雄
2. 発表標題 下部尿路閉塞は排尿における日内リズムを障害する
3. 学会等名 第24回日本排尿機能学会総会
4. 発表年 2017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
---------------------------	-----------------------	----