

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09139

研究課題名(和文)免疫学的プロファイリングによる間質性膀胱炎の病態解明と新規診断ツールと治療法開発

研究課題名(英文)Elucidation of the pathophysiology of interstitial cystitis by immunological profiling and development of novel diagnostic tools and treatment methods

研究代表者

松尾 朋博(MATSUO, Tomohiro)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：60622024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、間質性膀胱炎の特異的因子についての検討を行うその過程で、対象者の年齢、特に膀胱排尿筋/尿道の加齢による変化が間質性膀胱炎をはじめとした下部尿路症状に大きな影響を与えている因子であることを突き詰め、その詳細について検討を行った。結論として、尿道の加齢に伴う虚血性および酸化ストレスが、NO/sGCシステムの障害、および膀胱-尿道の協調運動とに密接に関連している可能性があることを尿流動体検査や免疫組織学的解析によって解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、加齢による下部尿路症状の出現メカニズムに対して、尿流動体検査および免疫組織染色といった病態生理学的手法を用いて本質に迫る実験である。結論として、尿道の加齢に伴う虚血性および酸化ストレスは、NO/sGCシステムの障害、および膀胱-尿道の協調運動とに関連している可能性があると考えられ、加齢による膀胱尿機能障害の原因因子が本研究によって明らかにされた。この事実は、今後特に加齢による下部尿路障害に対する、新薬開発にかかわる重要な事実であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the process of investigating specific factors for interstitial cystitis, we found that age-related changes in the subjects, especially the bladder detrusor / urethra, caused interstitial cystitis and other lower urinary tract symptoms. Hence, we investigated the details of the factors that have a great influence on the urinary symptoms. In conclusion, the markers of urodynamic study and immunohistochemical staining that age-related ischemic and oxidative stress of the urethra may be closely associated with impaired NO / sGC system and bladder-urethral coordination.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：間質性膀胱炎 慢性炎症 膀胱 高齢

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間質性膀胱炎は、頻尿や尿意切迫感などにより生活の質を低下させる病態である。その成因や病態にある種の免疫機能の異常が指摘されているが、その他にも多種多様な因子が複雑に関与していると考えられ、新たな診断法や治療法の開発にその病態解明は重要である。そこでわれらは、免疫複合体を捕捉し解析することで疾患特異的因子を同定する『イムノコンプレキソーム解析法』を用いて、間質性膀胱炎の特異的因子についての検討に入った。また、膀胱粘膜や筋層も含めた膀胱全体での病態を網羅的に解明するために、免疫組織学的解析、および尿中酸化ストレスマーカーを検討していた。しかしながらその過程で、対象者の年齢、特に膀胱排尿筋/尿道の加齢による変化が間質性膀胱炎をはじめとした下部尿路症状に影響を与えている因子であることを突き詰め、その詳細について検討を行った。

2. 研究の目的

加齢に伴う酸化ストレスの蓄積が、尿道の弛緩を誘発するNO /可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)システムそのものを障害しているとの仮定のもとでラットの尿道平滑筋弛緩を誘発する一酸化窒素(NO) /可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)システムを含む膀胱と尿道の協調の加齢に伴う変化、および尿道虚血/酸化ストレスの変化を検討すること。

3. 研究の方法

(1) 使用した動物モデル

メスの Sprague-Dawley ラットを用い、若齢ラット群と老齢ラット群の2群に分けた。

(2) 尿道・膀胱機能評価

各群すべてのラットに対して、ウレタン麻酔下に膀胱内圧と尿道灌流圧(UPP)を同時に記録し、評価した。

(3) 薬物の注入

コントロールの尿道・膀胱機能測定が終了した1時間後に、NOドナーであるニトロプルシドナトリウム(SNP: 0.1 mg/kg)、およびsGC(0.1 mg/kg)の新規NO非依存性刺激剤であるBAY41-2272を両グループのラットに同時に静脈内投与した。その後N-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル塩酸塩(L-NAME、100 mg/kg)を静脈内注射し、両グループでNO合成酵素活性を阻害した。

(4) 免疫組織化学染色

組織の準備

ラットに安楽死処置を行ったうえで、リン酸緩衝ホルマリン液(10%)で固定し、パラフィンにて包埋後4 μ mの切片に切断した。

解析した項目

- 1) ヘマトキシリン-エオジン(HE)染色: 一般的な形態学の評価として
- 2) マッソントリクローム(MT)染色: 排尿筋の観察および間質の線維化の評価として
- 3) 8-OHdG (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA): 酸化ストレスの評価として
- 4) MDA (Abcam, UK): 酸化ストレスの評価として
- 5) HIF-1 (Novus Biologicals, USA): 虚血・低酸素マーカーとして

4. 研究成果

(1) 体重の比較

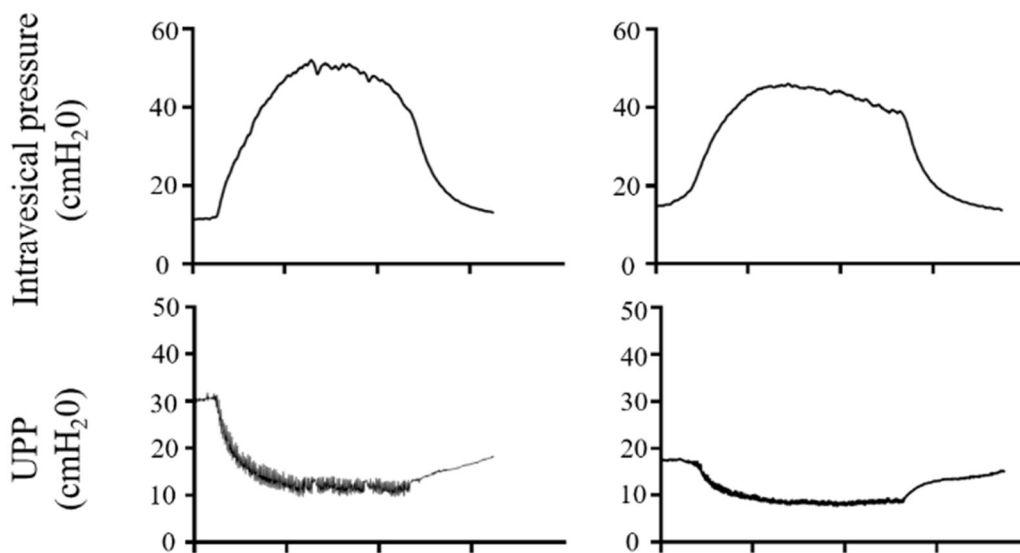
老齡ラットは、若齡ラットと比較して有意に体重が重かった（若齡 vs 老齡：265.6±14.4g vs 553.5±18.2g、 $p<0.01$ ）。

(2) ベースラインの UPP および膀胱内圧に関して

等容性条件下での UPP 測定は、若齡および老齡のラットで膀胱収縮が起こったときの HF0 を伴う尿道弛緩を反映していた。ベースラインの UPP は、若齡ラットと比較し、老齡ラットで有意に低かった（ $p=0.022$ ）。振幅膀胱収縮中の平均 UPP 最下点は、若齡ラットと老齡ラットの間で有意差はなかった（それぞれ、 9.7 ± 0.7 および 9.1 ± 0.9 cmH₂O； $p>0.05$ ）。ただし、尿道弛緩中の UPP の変化は、若年ラットと比較して老齡ラットで有意に小さかった（それぞれ、 -9.5 ± 0.9 対 -14.8 ± 1.8 cmH₂O； $p=0.021$ ）。

A. Young rats

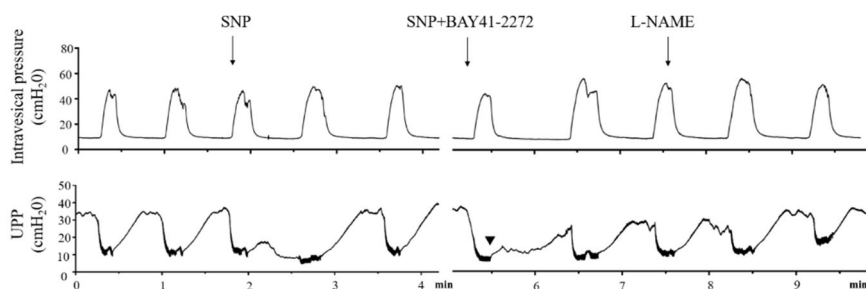
B. Middle-aged rats



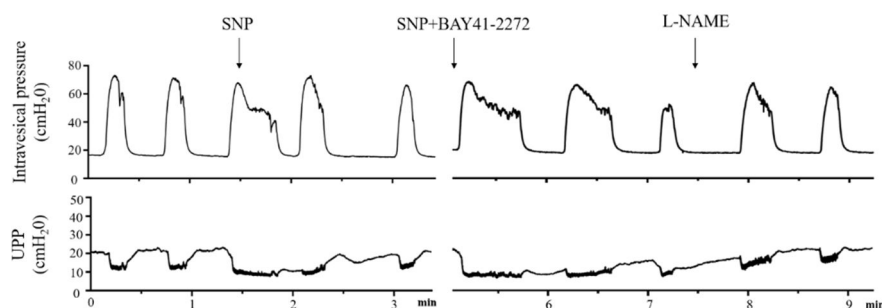
(3) 薬剤投与後の UPP の変化

BAY 41-2272 投与後の UPP nadir は老齡ラット（ 6.2 ± 0.5 cmH₂O、 $p<0.05$ ）、若齡ラット（ 7.2 ± 0.4 cmH₂O、 $p<0.05$ ）ともに低下し、尿道弛緩を増幅させた。L-NAME を静脈内投与後の UPP 基線圧は老齡ラットでは有意に増加した（ 15.8 ± 1.3 cmH₂O、 $p<0.05$ ）。

Young rats

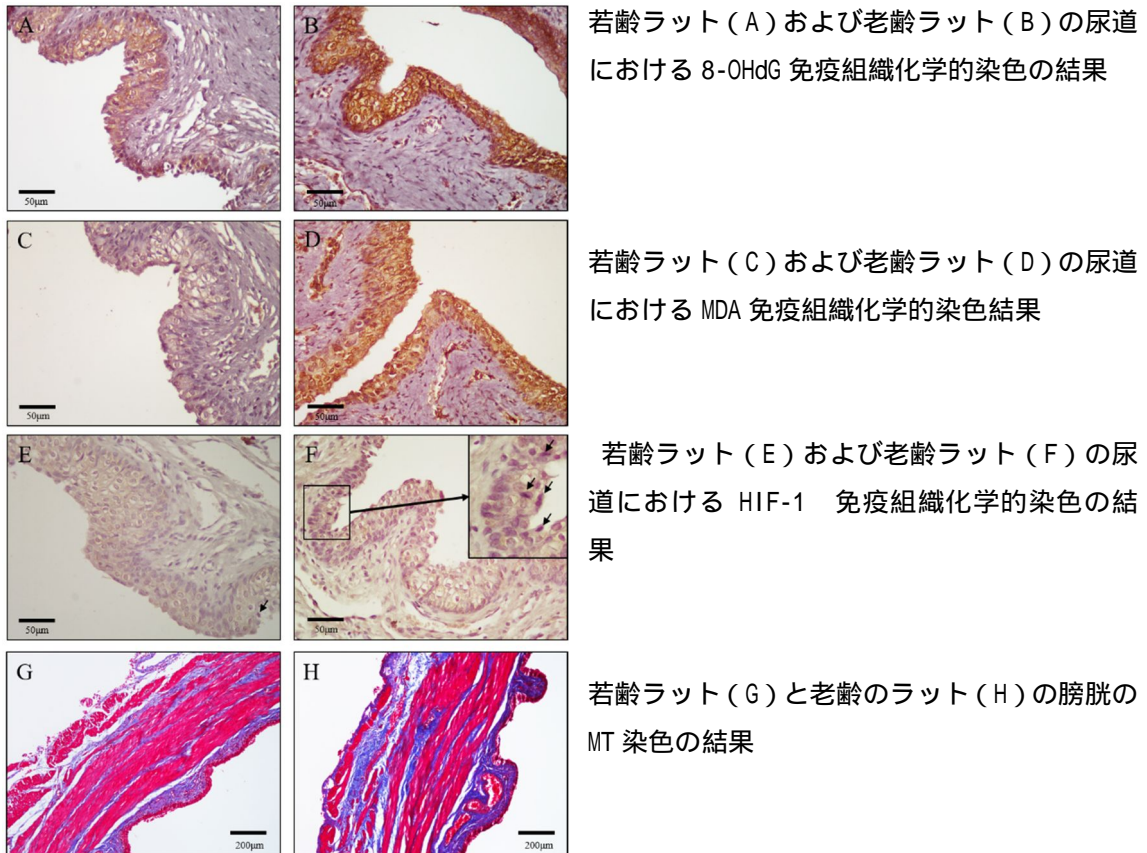


Middle-aged rats



(4) 免疫組織染色の結果

老齡ラットの尿道上皮における 8-OHdG および MDA の発現レベルは、若齡ラットよりも著明に高かった。同様に、老齡ラットの HIF-1 陽性細胞(下図矢印:尿道上皮の核)の頻度は、若齡ラットと比較して有意に高かった。MT 染色では、老齡ラットの平滑筋の萎縮と線維化は、若齡ラットに比べて有意に強かった。



(5) 本研究で分かったこと

ベースラインの UPP およびその変化は、若齡ラットよりも老齡ラットで有意に低かった。SNP および BAY41-2272 投与後、ベースライン UPP および UPP 最下点は両群とも有意に減少した。L-NAME の投与後、若齡ラットの UPP 変化/膀胱収縮振幅はベースラインよりもまだ低かったが、老齡ラットでは元のレベルに完全に回復した。HIF-1、8-OHdG、および MDA の免疫反応性は、若齡ラットよりも老齡のラットの方が高かった。

結論として、尿道の加齢に伴う虚血性および酸化ストレスは、NO/sGC システムの障害、および膀胱-尿道の協調運動とに関連している可能性があると考えられる。

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 Ohtsubo A, Oshiro T, Kimura R, Miyazato M, Matsuo T, Miyata Y, Sakai H
2. 発表標題 Oxidative Stress Induces Detrusor Under-activity and Urethral Dysfunction in Aging Rats
3. 学会等名 International Continence Society 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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
研究分担者	大庭 康司郎 (OHBA Kojiro) (20593825)	長崎大学・病院 (医学系)・講師 (17301)	
研究分担者	大山 要 (OHYAMA Kaname) (50437860)	長崎大学・医歯薬学総合研究科 (薬学系)・准教授 (17301)	
研究分担者	宮田 康好 (MIYATA Yasuyoshi) (60380888)	長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・准教授 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------