様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２１年 ５月２９日現在

研究種目：基盤研究（Ｃ）
研究期間：2007 年～2008 年度
課題番号：19591839
研究課題名（和文） 脊髄代謝型グルタミン酸受容体に着目した脊損後排尿障害の病態解明と治療法検討
研究課題名（英文） Elucidation of pathophysiology in voiding dysfunction after spinal cord injury and its treatments: a study on functional roles of spinal metabotropic glutamatergic mechanism

研究代表者 芳山 充晴 （YOSHIYAMA MITSUHARU）
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員
研究者番号：20422694

研究成果の概要：
本研究は、下部尿路機能調節における仙髄代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)経路の役割を検討した。mGluR1 欠損マウスを用いた研究は、mGluR1 が排尿時外尿道括約筋活動に対し抑制性であり、脊損後排尿障害との類似性を示した。mGluR5 の薬理実験では、脊損マウスの膀胱収縮時外尿道括約筋活動に対し mGluR5 が抑制性に制御することを明らかにした。これらの結果は、脊損後排尿障害の病態に mGluR が深く関わることを示唆する。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
２００７年度	2,700,000	810,000	3,510,000
２００８年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：泌尿器科学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学
キーワード：代謝型グルタミン酸受容体，脊髄損傷，膀胱，外尿道括約筋，排尿障害，マウス

１．研究開始当初の背景

本研究代表者(芳山充晴)の発表を含め、グルタミン酸受容体と慢性脊髄損傷排尿機能不全との関係を探究した基礎研究報告は過去に散見される(Yoshiyama et al., 1993, 1997, 1999; Yoshiyama & de Groat, 2002)。しかし、これらはいずれも NMDA 受容体、AMPA 受容体を介した外尿道括約筋活動の‘興奮性’制御に関した研究である。本研究は、グルタミン酸性神経伝達物質の‘抑制性’制御に着目し、慢性脊髄損傷排尿機能不全の病態機序を解明しようとするものであり、世界的にみてこれに類似した研究はいまだに報告がない。

脊髄損傷により上位中枢から下部尿路への制御が途絶えると排尿障害を来たす。慢性期には「膀胱過活動」と「排尿筋-外尿道括約筋協調不全」の様相を呈し、有病患者の Quality of Life を著しく低下させるだけでなく、生命予後にも多大なる影響を及ぼす。脊損後「膀胱過活動」は、無髄性C繊維を介する求心性神経伝達の異常亢進が関与することが明らかにされた(Yoshimura & de Groat, 1997)。一方、「排尿筋-外尿道括約筋協調不全」は(正常では膀胱の排尿収縮に伴い外尿道括約筋が弛緩するのに対し)、膀胱収縮時に外尿道括約筋も同時収縮してしまう高圧排尿の病態を呈し、その発症機序に関してはいまだ不明な点が多い。

グルタミン酸受容体は、ligand-gated channels を形成するイオンチャネル型(ionotropic)と、G 蛋白質共役型受容体である代謝型(metabotropic)の２種類に大別される。イオンチャネル型受容体に属する NMDA 受容体、AMPA 受容体を介す中枢系興奮性グルタミン酸性神経伝達は、正常の膀胱、及び外尿道括約筋活動制御において重大な役割を担う(de Groat & Yoshimura, 2001; Kakizaki et al., 1998; Matsumoto et al., 1995; Yoshiyama et al., 1991, 1993, 1994, 1997; Yoshiyama & de Groat, 2005)。更に、これら２種のイオンチャネル型受容体は、脊髄損傷後の排尿にも関連していることが明らかになった(Yoshiyama et al., 1993b, 1997, 1999, 2002)。一方、代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)の排尿機構における役割はまだ充分に理解されていない。代謝型グルタミン酸受容体のサブタイプは mGluR1-8 に分けられ、更にこれらは３種類のグループ I(mGluR 1,5)、II(mGluR 2,3)、III(mGluR 4,6,7,8)に分類される。正常ラットを用いた免疫組織学的実験は、mGluR1 と mGluR5 がオヌフ核に多く存在している(mGluR1 > mGluR5)ことを明らかにした(Alvarez et al., 2000)。過去の研究報告によると、グループ I/II mGluR 拮抗薬の脊髄腔内投与は、除脳無麻酔ラットの膀胱内圧シストメトリーと外尿道括約筋筋電図の同時測定において、膀胱収縮に対しては影響せず、膀胱収縮時の外尿道括約筋筋電図活動を促進した(Yoshiyama et al., Soc. Neurosci.学会抄録, 1995)。更に、グループ I/II mGluR 作動薬の脊髄腔内投与は、外尿道括約筋筋電図活動を抑制した(Tanaka et al., 2003; Yoshiyama & de Groat, ICS 学会抄録, 2003)。以上の結果は、脊髄内 mGluR を介したグルタミン酸神経伝達は、正常の外尿道括約筋活動を抑制性に制御している可能性を示唆する。しかし、興味深いことに、脊髄損傷後では、グループ I/II mGluR 拮抗薬は、膀胱活動のみならず外尿道括約筋筋電図も変えなかった(Yoshiyama & de Groat, ICS 学会抄録, 2004)。この結果は、脊損後に mGluR を介した神経伝達系路が外尿道括約筋活動に対する制御機能を失ってしまったことを示す。

２．研究の目的

脊髄正常マウスの下部尿路機能(膀胱、及び、外尿道括約筋機能)におけるmGluR1とmGluR5を介する経路の役割を解明する。更に、脊髄損傷後異常排尿(i.e., 「排尿筋-外尿道括約筋協調不全」)において､脊髄mGluR1とmGluR5の機能的役割の変化(中枢神経系制御の可塑性変化)を明らかにする。

３．研究の方法

脊髄正常、及び、脊損後の中枢性外尿道括約筋活動制御における脊髄mGluR1とmGluR5の機能的役割の比較検討

本研究では以下の検討を行うことで、齧歯動物(マウス)の正常と慢性脊髄損傷後の外尿道括約筋活動の差異を明らかにする。更に、脊髄mGluR1とmGluR5の関与、存在が病的状態(脊損Th10)において如何に変化するかを質的、量的に検討する。

対象：マウス(C57BL/6N)

(1)遺伝的正常マウス・脊髄正常群 (Wild type)
(2)mGluR1ノックアウト・マウス・脊髄正常群群 (mGluR1-KO)
(3)遺伝的正常マウス・脊損群 (Wild-SCT)

脊損後の外尿道括約筋機能不全が、オヌフ核の可塑性変化により生じるmGluR1の機能不全、又は消失なのか? オヌフ核内のmGluR1へ入力するグルタミン酸性信号伝達機構の機能低下、又は消失なのか? もしくは両方の変

化により生じるのか？ ･･･を特定するため、これら実験動物モデルに対し下記の実験系を用い検討した。

in vivo生理薬理学的機能実験：生理実験に用いるマウスは、全てsevoflurane吸入麻酔下で除脳し、排尿機能測定は無麻酔下で施行した。上記3群各々の排尿機能(膀胱、及び尿道活動)をシストメトリー(infusion rate: 10 or 30 μl/min)と括約筋筋電図測定にて評価した。更に、mGluR5拮抗薬、mGluR1/5作動薬、を腹腔内投与、又は、脊髄腔内投与して、その薬理学作用の差異を比較検討する。

４．研究成果

シストメトリー法と外尿道括約筋(EUS)筋電図(EMG)を用い、膀胱、及び、外尿道括約筋活動を代謝型グルタミン酸サブタイプ 1 (mGluR1)欠損マウス(KO)群と野生型マウス(WT)群で比較検討した。Fig.1 と Fig.2 は、それぞれ雄の WT 群と KO 群である。

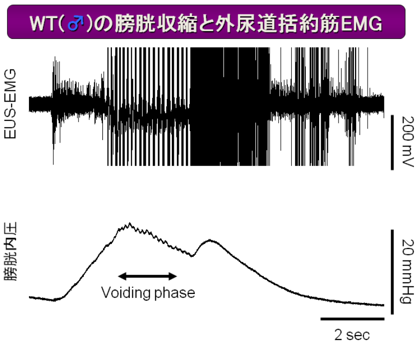

Fig. 1

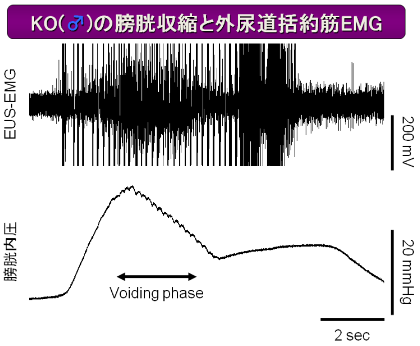

Fig. 2

Fig.3 では、EUS-EMG の silent phase を中心とした拡大図を示す。WT 群では所謂 silent であるのに対し、KO 群では uninhibited small bursting (USB)が確認された。

Fig.4 に示すように、WT 群と KO 群を比較した時、active phase の EUS-EMG 発火活動は同等だが、silent phase における発火(USB)は KO 群で著明に多かった。

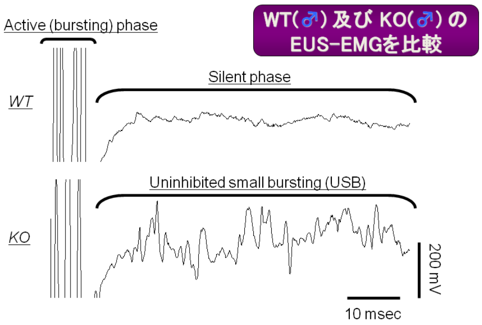

Fig. 3

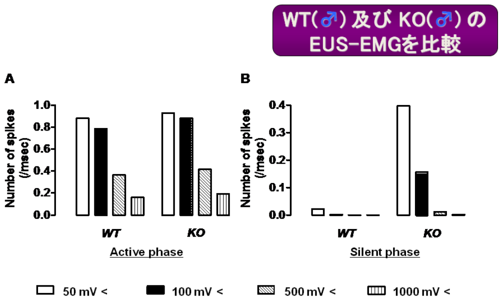

Fig. 4

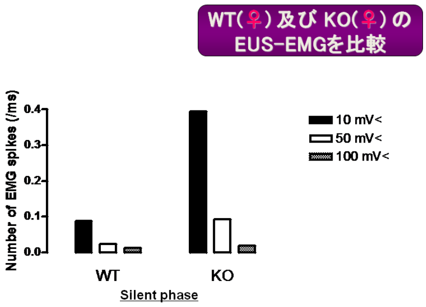

Fig. 5

Fig.5 は、雌の silent phase を WT 群と KO 群で比較した。雄と同様に、KO 群では uninhibited small bursting (USB)が WT 群に比し著明に多かった。

以上のように、排尿期における EUS-EMG の silent phase を見ると、WT 群では静的状態、KO 群では uninhibited small bursting (USB)を呈した。この結果は、mGluR1 が排尿期 EUS 活動の抑制性制御に関わることを示し、過去の薬理学的研究結果(Yoshiyama & de Groat, 2007)を支持する。この mGluR1 を介する抑制性制御は、EUS への興奮性伝達経路(e.g., NMDA 受容体, AMPA 受容体を介する経路)と相反するものであり、機能的役割が重要である。mGluR1 抑制性制御の欠失が排尿筋-外尿道括約筋協調不全(DSD)様状態を誘発したというこの研究結果は，mGluR1 機構が脊損後排尿障害における病態生理へ関与している可能性を示唆する。

他方、mGluR1 同様に mGlu group I に属する mGluR5 に関しても下部尿路活動におけるその役割を検討した。この実験系では選択的 mGluR5 拮抗薬である 6-methyl-2-(phenylethynyl)pyridine (MPEP)を用いた。

脊髄正常(NSC)WT 群の膀胱、及び、EUS-EMG 活動(Figs.6A and 7)において、MPEP 30mg/kg (i.p.)投与は膀胱収縮、及び、外尿道括約筋活動を変えなかった(Fig.6B and 8)。しかし、MPEP は排尿収縮間隔(IMI)を増加した(Fig.8)

一方、脊髄損傷(SCT)WT 群(Figs.9A and 10)

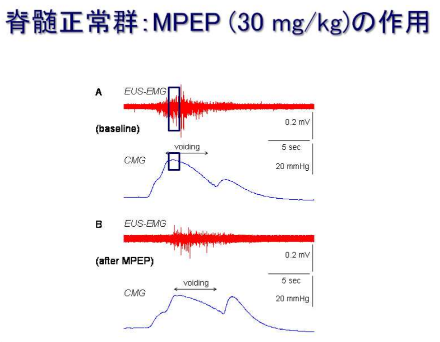

Fig. 6

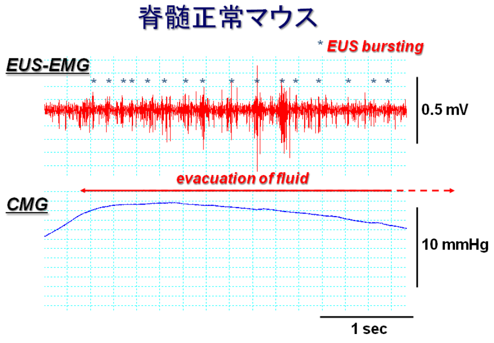

Fig. 7

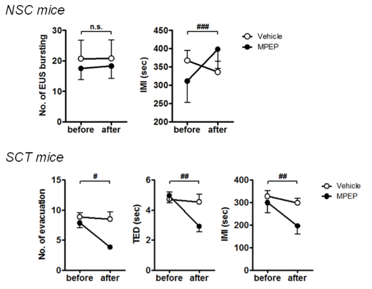

Fig. 8

では、MPEP 30mg/kg (i.p.)投与は、尿排出を伴う膀胱内圧下降回数(No. of evacuation; i.e., synergistic period)、総尿排出時間(TED)、及び、排尿収縮間隔(IMI)を減少した(Figs.8 and 9B)。排尿収縮間隔(IMI)減少は、1 回膀胱収縮あたりの総尿排出量減少による残尿量増加に起因するものと推測する。

SCT 群において MPEP 投与による結果は、

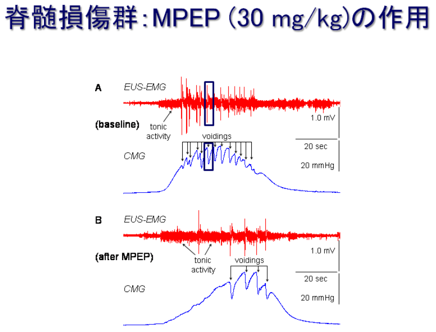

Fig. 9

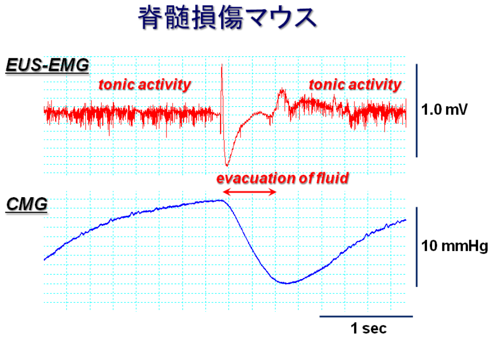

Fig. 10

mGluR5 が EUS-EMG 活動に対し抑制性に介入していることを示唆する。そこで、脊髄損傷(SCT)WT 群において、mGluR group I 作動薬(S)-3,5-Dihydroxyphenylglycine (S-DHPG)の効果を検討した。脊髄損傷(SCT)WT 群において、S-DHPG 脊髄腔内投与は、外尿道括約筋と膀胱の活動(排尿筋外尿道括約筋協調不全を含む)を廃絶した。

以上の結果は、脊髄 mGluR group I (i.e., mGluR1 と mGluR5)を標的とした作動薬、又は、活性化は、脊髄損傷後の DSD に基づく排尿障害を改善する可能性を示唆する。

一方、脊髄正常では、膀胱収縮と EUS-EMG 活動における mGluR5 の関与は、silent である。しかし、mGluR5 求心経路遮断は voiding efficiency を低下させることなく、膀胱容量(volume threshold)を増加する(Fig.11)。また、mGluR1-KO 群マウスは WT 群に比し大きな膀胱容量を持ち、mGluR5 拮抗薬により更に膀胱容量を増す。このことから、mGluR group I 拮抗薬は、脊髄損傷が無い場合、蓄尿量を増加させるのに有効であると言える。

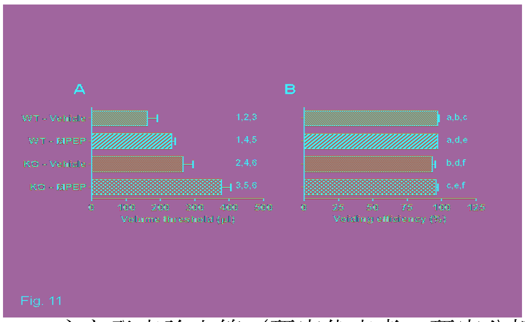

Fig. 11

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 9 件）

(1) Yoshiyama, M. Glutamatergic mechanisms controlling the lower urinary tract function. *LUTS (Lower Urinary Tract Symptoms)*, In press.査読有

(2) Kobayashi, H., Yoshiyama, M., Zakoji, H., Takeda, M. and Takeda, M. Sex differences in expression profile of acid-sensing ion channels in the mouse urinary bladder: a possible involvement in irritative bladder symptoms. *BJU Int.*, In press.査読有

(3) 芳山充晴： 蓄尿障害（1）排尿筋弛緩 －排尿筋過活動抑制：抗ムスカリン薬， β3受容体活性薬， BKチャンネル， その他 *排尿障害プラクティス* Vol.16(3):9(177)-17(185), 2008.査読無

(4) Yoshiyama, M., Kobayashi, H., Araki, I., Du, S., Zakoji, H. and Takeda, M. Sex-related differences in activity of lower urinary tract in response to intravesical acid irritation in decerebrate unanesthetized mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295:R954-R960, 2008.査読有

(5) Yoshiyama, M. and de Groat, W.C. The role of vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the neural pathways controlling the lower urinary tract. *J. Mol. Neurosci.* 36:227-240, 2008.査読有

(6) Yoshiyama, M. and de Groat, W.C. Effects of intrathecal administration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on lower urinary tract functions in rats with intact or transected spinal cords. *Exp. Neurol.* 211:449-455, 2008.査読有

(7) Yoshiyama, M. and de Groat, W.C. Role of spinal metabotropic glutamate receptors in regulation of lower urinary tract function in the decerebrate unanesthetized rat. *Neurosci. Lett.* 420:18-22, 2007.査読有

(8) Du, S., Araki, I., Yoshiyama, M., Nomura, T. and Takeda, M. Transient receptor potential channel A1 involved in sensory transduction of rat urinary bladder through C-fiber pathway. *Urology* 70:826-831, 2007.査読有

(9) Du, S., Araki, I., Mikami, Y., Zakoji, H., Beppu, M., Yoshiyama, M. and Takeda, M. Amiloride-sensitive ion channels in urinary bladder epithelium involved in mechanosensory transduction by modulating stretch-evoked adenosine triphosphate release. *Urology* 69:590-595, 2007.査読有

〔学会発表〕（計 23 件）

(1) Yoshiyama, M., Araki, I., Kobayashi, H., Zakoji, H. and Takeda, M. Effects of a metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonist on lower urinary tract functions in mice with normal or transected spinal cords. Abstract#338, International Continence Society 38th Annual Meeting, Cairo, Egypt, 20 October – 24 October, 2008.

(2) Yoshiyama, M., Araki, I., Kobayashi, H., Zakoji, H. and Takeda, M. Involvements of metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGluR5) in control of lower urinary tract in mice with normal or transected spinal cords. pp. 77-78, The 3rd Pan-Pacific Continence Society Meeting, Kaohsiung, Taiwan, 26 September – 27 September, 2008.

(3) 小林英樹 マウス膀胱内酢酸灌流モデルの性差における酸感受性イオンチャンネルの関与：間質性膀胱炎の新しい発症因子として. 第15回日本排尿機能学会大手町サンケイプラザ(東京). 2008年9月13日.

(4) 宮本達也 ヒト膀胱粘膜におけるTRPV1、TRPV4とTRPA1の発現と下部尿路症状との相関－閉塞と非閉塞の比較－. 第15回日本排尿機能学会. 大手町サンケイプラザ(東京). 2008年9月12日.

(5) 武田正之 亜急性期リハビリテーション施行中の尿閉患者に対するバクロフェン、ジスチグミン、αブロッカー3者併用療法の効果. 第15回日本排尿機能学会大手町サンケイプラザ(東京). 2008年9月12日.

(6) 小林晴名 要介護過活動膀胱患者と介護者のQOL向上を目的とした研究－薬物治療単独と社会資源活動の連携介入の併用による治療効果の比較－. 第15回日本排尿機能学会. 大手町サンケイプラザ(東京)2008年9月11日.

(7) 芳山充晴 マウス下部尿路機能に対する代謝型グルタミン酸受容体サブタイプ５拮抗薬の作用：脊髄正常群と慢性脊髄損傷群の比較. 第15回日本排尿機能学会. 大手町サンケイプラザ(東京). 2008年9月11日.

(8) Yuanjun, J. Kobayashi, H., Sawada, N., Yoshiyama, M., Mochizuki, T., Zakoji, H., Araki, I. and Takeda, M. Thr expression of prostaglandin E2 receptors (EP1, 2, 3, and 4) in the human urinary bladder epithelium of normal and bladder outlet obstruction – a novel mechanism in the afferent hyperactivity of bladder. Abstract#1318, American Urological Association May 17-22, 2008, Orlando, Florida, U.S.A. *J. Urol. 179* (Suppl.):452, 2008.

(9) Kobayashi, H., Yoshiyama, M., Araki, I., Zakoji, H., Sawada, N., Mochizuki, T., Tsuchida, T., Nomura, T., Fukasawa, M. and Takeda, M. Contribution of acid-sensing ion channels to gender difference in mouse bladder response to acetic acid: a novel candidate for interstitial cystitis pathogenesis. Abstract#365, American Urological

Association May 17-22, 2008, Orlando, Florida, U.S.A. *J. Urol. 179* (Suppl.):129-130, 2008.

(10) 芳山充晴　膀胱求心路の機械的知覚伝達における代謝型グルタミン酸受容体サブタイプmGluR1とmGluR5を介する相加的コントロール．第14回日本排尿機能学会．福島県ホテルリステル猪苗代．2007年10月6日．

(11) 小林英樹　膀胱炎モデル(マウス)における酸感受性イオンチャンネルの発現量変化．第14回日本排尿機能学会．福島県ホテルリステル猪苗代．2007年10月6日．

(12) 座光寺秀典　大コンダクタンスCa感受性Kチャネル(BKチャネル)のヒトとラットの膀胱における発現と機能の検討．第14回日本排尿機能学会．福島県ホテルリステル猪苗代．2007年10月5日

(13) 姜元軍　ヒト下部尿路閉塞膀胱上皮におけるProstaglandin E2受容体サブタイプ(EP1, EP2, EP3, EP4)の発現．第14回日本排尿機能学会．福島県ホテルリステル猪苗代. 2007年10月5日．

(14) Zabbarova, I., Roppolo, J., Yoshiyama, M., Ikeda, Y., McCarthy, C., Hagedorn, N., Birder, L., Fry, C., de Groat, W. and Kanai, A. Irradiation induces detrusor overactivity – studied acutely using a mouse model of radiation cystitis. Abstract#72, International Continence Society 37th Annual Meeting, Rotterdam, The Netherlands, 20 August – 24 August, 2007.

(15) Kobayashi, H., Araki, I., Zakoji, H., Du, S., Sawada, N., Mochizuki, T., Yoshiyama, M., Tsuchida, T., Nomura, T., Fukasawa, M., Takihana, Y. and Takeda, M. Acid-sensing ion channel: expression changes in the urinary bladder following chronic bladder inflammation. Abstract#119, International Continence Society 37th Annual Meeting, Rotterdam, The Netherlands, 20 August – 24 August, 2007.

(16) Zakoji, H., Araki, I., Beppu, M., Yoshiyama, M., Du, S., Kobayashi, H., Mochizuki, T. and Takeda, M. The expression and the role of BK channels in the urinary bladder: the alteration of subunit expression profile in association with bladder outlet obstruction, and the affect of BK channel on afferent pathway in lower urinary tract. Abstract#194, International Continence Society 37th Annual Meeting, Rotterdam, The Netherlands, 20 August – 24 August, 2007.

(17) Yoshiyama, M., Araki, I., Zakoji, H., Kobayashi, H., Du, S., Aiba, A. and Takeda, M. Additive control by metabotropic glutamate receptors 1 and 5 in bladder afferent mechanosensory transmission. Abstract#260, International Continence Society 37th Annual Meeting, Rotterdam, The Netherlands, 20 August – 24 August, 2007.

(18) Uchiyama, T., Sakakibara, R., Yoshiyama, M., Lui, Z., Yamamoto, T., Ito, T., Yamaguchi, C, Awa, Y., Yamanishi, T. and Hattori, T. Photo-stimulating effects of low reactive level laser on micturition function in rats. Abstract#392, International Continence Society 37th Annual Meeting, Rotterdam, The Netherlands, 20 August – 24 August, 2007.

(19) Yoshiyama, M., Araki, I., Kobayashi, H., Zakoji, H., Du, S. and Takeda, M. Different cystometric responses between male and female mice to the lower urinary tract irritation by acetic acid. Abstract#399, International Continence Society 37th Annual Meeting, Rotterdam, The Netherlands, 20 August – 24 August, 2007.

(20) Yoshiyama, M., Araki, I., Zakoji, H., Kobayashi, H., Du, S., Aiba, A. and Takeda, M. Role of metabotropic glutamate receptor subtype 1 in afferent processing of reflex micturition in mice. Abstract#253, American Urological Association May 19-24, 2007, Anaheim, California, U.S.A. *J. Urol.* 177 (Suppl.):84-85, 2007.

(21) Zakoji, H., Araki, I., Beppu, M., Yoshiyama, M., Kobayashi, H., Du, S., Sawada, N., Mochizuki, T., Fukasawa, M., Takihana, Y. and Takeda, M. The expression and role of large conductance, voltage- and Ca^{2+}-activated K^+ (BK) channels in the urinary bladder: the alteration of subunit expression profile in association with bladder outlet obstruction, and the affect of BK channel on the afferent ex. Abstract#982, American Urological Association May 19-24, 2007, Anaheim, California, U.S.A. *J. Urol.* 177 (Suppl.):325, 2007.

(22) Du, S., Araki, I., Mikami, Y., Yoshiyama, M. and Takeda, M. Amiloride-sensitive ion channels in urinary bladder epithelium involved in mechanosensory transduction by modulating stretch-evoked ATP release. Abstract#994, American Urological Association May 19-24, 2007, Anaheim, California, U.S.A. *J. Urol.* 177 (Suppl.):328-329, 2007.

(23) Du, S., Araki, I., Nomura, T., Yoshiyama, M. and Takeda, M. Agonists of transient receptor potential channel A1 cause hyper-reflexic micturition by affecting bladder afferent activity in rats. Abstract#996, American Urological Association May 19-24, 2007, Anaheim, California, U.S.A. *J. Urol.* 177 (Suppl.):329, 2007.

６．研究組織

(1)研究代表者

芳山　充晴(YOSHIYAMA MITSUHARU)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員
研究者番号：20422694

(2)研究分担者

小林　英樹(KOBAYASHI HIDEKI)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号：50402053

(3)連携研究者

なし