

平成 21 年 05 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591857

研究課題名（和文） ヒトおよびモルモット排尿筋における膀胱出口閉塞とカルシウム感受性調節機序の関連

研究課題名（英文） The correlation between bladder outlet obstruction and calcium sensitization mechanism in human and guinea pig detrusor smooth muscle.

研究代表者

関 成人（SEKI NARIHITO）

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：90294941

研究成果の概要：

モルモットにおいて、膀胱出口閉塞（Bladder outlet obstruction: BOO）作成群では SHAM 手術群と比較して Rho kinase 阻害薬である Y-27632 投与（5 μM）により有意にカルバコールにより発生する収縮力が減少した。この結果は BOO に伴い細胞内 Ca^{2+} 濃度（ $[Ca^{2+}]_i$ ）非依存性収縮ひいては Rho kinase カスケードが増強されることを示唆した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

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：排尿筋、膀胱出口閉塞、過活動膀胱、 Ca^{2+} 感受性調節機序、Rho kinase

1. 研究開始当初の背景

平滑筋の収縮・弛緩に関与する機構のなかで、細胞内 Ca^{2+} 濃度（ $[Ca^{2+}]_i$ ）と収縮・弛緩メカニズムに関しては、近年多くのアゴニスト刺激において $[Ca^{2+}]_i$ が一定でも収縮力が増加すること、すなわち収縮装置の Ca^{2+} 感受性増加が筋緊張に重要な役割を果たしていることが、主に血管平滑筋において明らかとなり、その機序が解明されつつある。しかし、排尿筋の緊張調節と Ca^{2+} 感受性増加機序

（RhoA-ROCK pathway）の関係については実験動物レベルでの報告も少なく、さらにヒト排尿筋における本機序の存在は明らかにされていない。我々は Ca^{2+} 感受性増加機序とその情報伝達経路における ROCK および Protein kinase C (PKC) の関与について検討した結果、ヒト排尿筋においても RhoA-ROCK pathway あるいは PKC-CPI-17 (PKC potentiated protein phosphatase-1 inhibitory protein) pathway を介した Ca^{2+}

感受性調節機序が存在することを証明し、これらの機序の調節が新たな排尿障害（OAB）治療薬のターゲットとなる可能性を報告した。しかし、本機序と膀胱出口閉塞（Bladder outlet obstruction: B00）との関連については、わずかに B00 作成モデルラットで ROCK の発現が増加することが⁸⁾、また排尿筋過活動と本機序の関連については SHR ラットでの報告があるものの、それ以外の報告は極めて少なく、特にヒト排尿筋における報告は未だなされていない。排尿筋の緊張ならびに過活動は過活動膀胱（Overactive bladder: OAB）の発症と密接に関係することから、B00 を伴う排尿筋における Ca^{2+} 感受性調節機序の関与と役割の解明は、病態生理の点からも大変興味のあるところである。

2. 研究の目的

実験動物（モルモット）ならびにヒト排尿筋において、B00 ならびに OAB と Ca^{2+} 感受性調節機序の関連を明らかにする。すなわち、アゴニストによる膜受容体（ムスカリン受容体）刺激で発生する排尿筋収縮における、1) RhoA-kinase 活性化機構と、2) プロテインキナーゼ C (protein kinase C; PKC) 活性化機構の関与の程度と、下部尿路閉塞あるいは OAB の程度との関連を検討することで、B00 に伴う排尿筋機能障害（排尿筋過活動）における、 Ca^{2+} 感受性調節機序を介した収縮・弛緩の修飾機構の重要性を明らかにする。

3. 研究の方法

膀胱出口閉塞モデルの作製について、4 週齢のモルモット（雌）に開腹下で、膀胱頸部に径 2.2mm の銀リングを装着し、6 週間から 8 週間飼育したものを実験に使用した。また、コントロールとしては、sham operated（開腹下で、膀胱頸部を同定したのみ）のモルモットを 6 週間から 8 週間飼育したものを使用した。摘出した膀胱（図 1 参照）を、生理学的食塩水の中で、尿路上皮、結合組織を可及的に除去した後に、径 0.3 mm 程度、長さ 2 mm 程度のストリップを作製し、等尺張力記録装置にセットし トキシン (0.2mg/ml) で膜脱膜化標本を作製した。実験には以下の溶液を使用



図1 膀胱出口閉塞膀胱

した。

(溶液) 100 mM potassium methansulphonate, 2.2 mM Na_2 adenosine triphosphate, 3.38 mM $MgCl_2$, 10 mM ethyleneglycol-bis (b-aminoethylether)-N',N',N',N'-tetra acetic acid (EGTA), 10 mM creatinine phosphate and 20 mM tris-maleate

4. 研究成果

膜脱膜化標本で Ca^{2+} 濃度を 1 μ M に固定した後に、累積的に 1 μ M Calmodulin、100 μ M GTP、10 μ M Carbachol を加えたところ、その各々に反応して張力が増加した（図 2）。そこで Rho kinase 阻害薬である Y-27632 (5 μ M) を加えて、その抑制効果を Ca 非依存性収縮力とし SHAM 群と膀胱出口閉塞モデルとを比較検討した。図 3 に示すように膀胱出口閉塞モデルでは有意に Ca 非依存性収縮力が増強していた。5 μ M Y-27632 の投与により、膀胱出口閉塞群では 43.7% \pm 2.5% (n=4) 収縮力が減少したのに対し、SHAM 群では 21.5% \pm 1.5% (n=4) しか減少しなかった。考察：B00 群では SHAM 群と比較して 5 μ M Y-27632 の投与により有意に収縮力が減少した。この結果は B00 により Ca 非依存性収縮力ひいては Rho kinase カスケードが増強されることを示唆している。

なお、本研究課題は遂行途中であり、同研究室の梶岡が研究代表者としての研究課題

図2 膜脱膜化標本の Ca^{2+} 感受効果

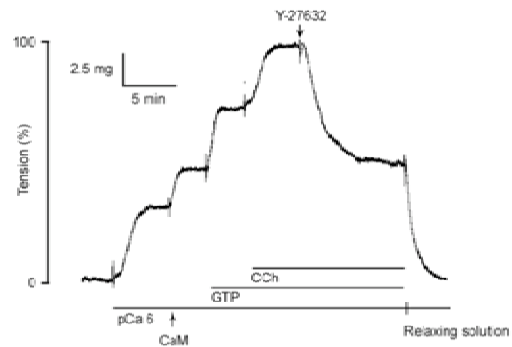
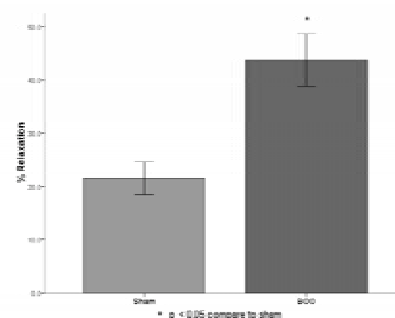


図3 SHAM群と膀胱出口閉塞群の Ca^{2+} 非依存性収縮力



「過活動膀胱の分子生物学的・電気生理学的特性を解明し、新治療法の可能性を探る」において共同研究者として、引き続き、B00 モデルを作製し、さらに詳細に電気生理学的手法や分子生物学的手法を用いて B00 がなぜ Rho Kinase カスケードを増強するのかを解明していく予定である。

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7件)

- Nomura H, Seki N, Yamaguchi A, Naito S: Photoselective vaporization of the prostate: Outcome according to the prostate size in a series of 102 Japanese patients. *Int J Urol* 16: 87-90, 2009 (査読有り)
- Seki N, Nomura H, Yamaguchi A, Naito S: Effects of photoselective vaporization of the prostate (PVP) on urodynamics in patients with benign prostatic enlargement. *J Urol* 180: 1024-1029, 2008 (査読有り)
- Shahab N, Seki N, Takahashi R, Kajioka S, Takei M, Yamaguchi A, Naito S: The profiles and patterns of detrusor overactivity and their association with overactive bladder symptoms in men with benign prostatic enlargement associated with detrusor overactivity. *Neurourol Urodyn* (in press) (査読有り)
- Kajioka S, Nakayama S, Asano N, Seki N, Naito S, Brading AF: Levromakalim and MgGDP activate small conductance ATP-sensitive K channels of K channel pore 6.1/sulfonylurea receptor 2A in pig detrusor smooth muscle cells: Uncoupling of cAMP signal pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 327 (1): 114-123, 2008 (査読有り)
- Kajioka S, Nakayama S, Seki N, Naito S, Brading AF: Oscillatory membrane currents paradoxically induced via NO-activated pathways in pig detrusor cells. *Cell Calcium* 44: 202-209, 2008

(査読有り)

- Tomoda T, Zhu HL, Iwasa K, Aishima M, Shibata A, Seki N, Naito S, Teramoto N: Effects of flavoxate hydrochloride on voltage-dependent Ba²⁺ currents in human detrusor myocytes at different experimental temperatures. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 376 (3): 195-203, 2008 (査読有り)
- Takahashi R, Nishimura J, Seki N, Yunoki T, Tomoda T, Kanaide H, Naito S: RhoA/Rho kinase-mediated Ca²⁺ sensitization in the contraction of human prostate. *Neurourol Urodyn* 26 (4): 547-551, 2007 (査読有り)

[学会発表](計6件)

- 関成人、他：ヒト膀胱および前立腺における Rho-kinase の発現と機能。第 14 回日本排尿機能学会(福島、2007.10.06)
- 関成人、他：ムスカリン受容体を介した排尿筋の持続性収縮における膜電流の包括的検討。第 96 回日本泌尿器科学会総会(横浜、2008.04.25)
- 梶岡俊一、関成人、高橋良輔、他：亜硝酸薬による膀胱排尿筋の逆説的収縮機構の解明。第 15 回日本排尿機能学会(東京、2008.09.12)
- Takahashi R, Seki N, Naito S: RhoA/Rho kinase mediated Ca²⁺ sensitization in the contraction of human prostate. The 3rd Pan-Pacific Continence Society Meeting (Taiwan, 2008.09.26)
- Seki N, Kajioka S, et al: Comprehensive studies of ATP-sensitive potassium channels in pig and human detrusor smooth muscle cells. International Continence Society 2008 (Egypt, 2008.10.20)
- Shiga K, Seki N, Naito S: Enhancement of the contractile responses of detrusor muscle by thrombin and trypsin in the cyclophosphamide-induced cystitis model of mice. 第 60 回日本泌尿器科学会西日本総会(北九州、2008.11.07)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

関 成人 (SEKI NARIHITO)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：90294941

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

梶岡 俊一 (KAJIOKA SYUNICHI)
九州大学・大学院医学研究院・特任講師
研究者番号：90274472

高橋 良輔 (TAKAHASHI RYOUSUKE)
九州大学・大学病院・医員
研究者番号：30529805