

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791525

研究課題名（和文） SERCA2a 遺伝子が排尿機能に及ぼす影響

研究課題名（英文） The influence of SERCA2a gene on voiding function

研究代表者

鳥本 一匡 (TORIMOTO KAZUMASA)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10382293

研究成果の概要（和文）：無麻酔拘束下膀胱内圧測定法により wild type (WT) ラット (n=10) と transgenic (TG) ラット (n=10) における膀胱機能の差異を検討した。TG ラット群の 4 匹は他の TG ラット 6 匹と比較して明らかに膀胱容量の減少、排尿回数の増加を認めた。 $(p<0.001)$ 、また摘出膀胱にて膀胱壁の肥厚を認めた。この結果により、TG ラットを膀胱壁肥厚群(n=4)と膀胱壁非肥厚群(n=6)にわけ、WT ラットとともに 3 群で Western blotting 法により膀胱での SERCA2 蛋白の発現量を比較した。結果は膀胱壁肥厚群が他の 2 群より有意に膀胱での SERCA2 蛋白量の発現が増加($p<0.05$)していた。よって膀胱での SERCA2 蛋白の発現量が増加することにより膀胱壁が肥厚、膀胱容量が減少し、膀胱機能が低下する可能性が示唆できた。

次に、尿道に部分閉塞を加えた場合に WT ラット群、TG ラット群でどのような変化が観察されるかを検討した。WT ラット、TG ラットの膀胱出口部部分閉塞 partial bladder outlet obstruction(pBOO)モデルを作成し、作成後 2 週間で SERCA2 の蛋白量の変化を比較した。比較は WT 群(n=5)、WTpBOO 群(n=5)、TGpBOO 群(n=5)の 3 群で比較した。結果は WTpBOO 群、TGpBOO 群の膀胱では WT の膀胱と比較して有意に SERCA2 蛋白の発現量が増加していた ($p<0.001$)。WTpBOO 群、TGpBOO 群の間には SERCA2 蛋白の発現量に差はなかった。TG ラットにおける膀胱壁の肥厚と pBOO ラットにおける膀胱壁の肥厚過程は異なっていると考えられるが、両者とも SERCA2 蛋白が有意に増加していることより、膀胱壁の肥厚過程に SERCA2 が影響している可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：We investigated the difference of bladder function between wild type rats (WT) (n=10) and transgenic rats (TG) (n=10) using cystometrogram in awake condition. In TG rats, 4 of them had smaller volume of bladder and higher frequency of micturition than the other 6 rats. The bladder walls of the 4 rats were hypertrophic. Then we divided TG rats into the hypertrophic group (n=4) and the non-hypertrophic group (n=6), and compared the expression of SERCA2 protein using Western blotting in these 2 group and the wild type group. The expression of SERCA2 protein in the bladders was significantly greater in the hypertrophic group than the other 2 groups ($p<0.05$). Therefore, it is suggested that greater expression of SERCA2 protein resulted in hypertrophic bladder and small bladder volume leading to bladder dysfunction.

Secondly, we investigated the influence of partial bladder outlet obstruction (pBOO) on bladder function. We compared the expression of SERCA2 protein among WT rats (n=5), WT rats with pBOO (n=5) and TG rats with pBOO (n=5). The expression of SERCA2 significantly increased in WT rats with pBOO and TG rats with pBOO than WT rats ($p<0.001$). There was no difference of the expression between WT rats with pBOO and TG rats with pBOO. The pathway of hypertrophy might be different between TG rats and pBOO rats. It is suggested that SERCA2 is related to the formation of bladder hypertrophy because the expression of SERCA2 protein significantly increased in those 2 groups.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：SERCA2、膀胱部分閉塞、膀胱機能

1. 研究開始当初の背景

昨今、抗ムスカリン受容体拮抗薬を中心とする過活動膀胱治療薬が次々に開発され、過活動膀胱に対する注目度が高くなっている。それに伴い、これまで以上に、その病態だけでなく、生理的排尿制御機構の解明に関する研究が盛んに行われている。膀胱機能の制御は中枢および末梢の両方で行われているが、我々は末梢での制御機構に焦点を絞って研究を行う。膀胱機能は、蓄尿・排尿の2つに大きく分けられる。蓄尿時に膀胱が充満されるとその信号が中枢へ伝えられる。この【充満した】という情報は、主に膀胱壁の伸展刺激が元になり求心性神経への信号を発生させると考えられている。そのひとつとして尿路上皮細胞の伸展により ATP が放出され、求心性神経を刺激することが証明されている

(*Physiol Rev* 84, 2004)。また、過活動膀胱では、膀胱壁から様々な神経伝達物質の分泌亢進が認められることが報告されている。

一方、直腸は膀胱と同様に腰仙髄より神経投射を受けている臓器であり、膀胱機能障害を有する場合には、多かれ少なかれ排便機能障害を伴っている。故に、膀胱機能・排便機能は同時に検討されるべきである。しかし、膀胱と直腸には、その制御機構に大きな違いが存在する。膀胱は外来神経（骨盤神経と下腹神経）のみで制御されている（図1）が、直腸は外来神経（骨盤神経と結腸神経）のみならず、壁内に独立した神経叢を持ち、両者

による制御を受ける。壁内神経叢の働きにより、脊髄損傷等により外来神経が障害された場合でも、排便反射は消失することはない（図2）。

その壁内における運動機能の調節機構に関与する重要な因子として、カハールの介在細胞 (Interstitial cells of Cajal: ICC) が注目されている。消化管に存在する ICC は、自動運動のペースメーカーや壁内神経とのクロストークにおいて重要な役割を担っていることは周知の事実である (*Takaki, J Smooth Muscle Res* 39(5): 137-161, 2003)。さらに、最近では、消化管壁における伸展刺激受容器としての可能性が注目を集めている (*Sanders and Ward, J Physiol* 578, 2007)。尿路においても ICC の存在が証明されている。多くの哺乳類では腎盂尿管移行部に ICC が存在し、尿管蠕動のペースメーカーとして働いている可能性が示唆されている。膀胱に関しては、モルモットで ICC が、ヒトでは ICC 様細胞が確認されている。いずれも膀胱収縮に対して促進作用を持つことが報告されており、排尿機能における制御機構の一部を担っている可能性は高い。より興味深いことに、尿路上皮細胞の伸展により ATP が放出され、求心性神経を刺激するメカニズムにカハールの介在細胞 (ICC) が関与する可能性が示唆されている

2. 研究の目的

前述のような学術的背景のもとで、膀胱平滑筋や ICC における自動的な興奮の源となる

Ca²⁺振動現象に深く関わっている筋小胞体 Ca²⁺ポンプを強制発現させた SERCA2a 遺伝子強制発現ラットを作成し、排尿機能に及ぼす影響や尿道閉塞時の肥大膀胱の形成における影響を検討する。

3. 研究の方法

実験 1

目的：SERCA2a 遺伝子（図 1）強制発現ラットの膀胱において、導入した遺伝子の発現の有無、および、局在を明らかにする。

対象：15 週齢 SERCA2a 遺伝子強制発現 Wistar ラット、および、野生型 Wistar ラット

方法：①摘出膀胱を用いて、RT-PCR 法で SERCA2a 遺伝子の発現量を測定する。

②摘出膀胱を用いて、免疫組織化学染色で SERCA2a 蛋白の発現量・局在を測定する。

実験 2

目的：尿道閉塞モデル partial bladder outlet obstruction (pBOO)において、SERCA2a 遺伝子強制発現が膀胱壁肥厚に及ぼす影響を検討する。

対象：12 週齢 SERCA2a 遺伝子強制発現 Wistar ラット、および、野生型 Wistar ラット

方法：①尿道を結紮し、部分閉塞(pBOO)を作成する。

②3 週間後に、膀胱壁肥厚程度の違いにつき、組織学的に検討する

実験 3

目的：SERCA2a 遺伝子強制発現ラットの排尿機能につき検討する。

対象：15 週齢 SERCA2a 遺伝子強制発現 Wistar ラット、および、野生型 Wistar ラット

方法：ウレタン麻酔下で膀胱瘻を造設し、生理食塩水持続注入 (0.04 mL/min) し、膀胱内圧測定を行う。

4. 研究成果

無麻酔拘束下膀胱内圧測定法により wild type (WT) ラット (n=10) と transgenic (TG) ラット (n=10) における膀胱機能の差異を検

討した。TG ラット群の 4 匹は他の TG ラット 6 匹と比較して明らかに膀胱容量の減少、排尿回数増加を認めた。(p<0.001)、また摘出膀胱にて膀胱壁の肥厚を認めた。この結果により、TG ラットを膀胱壁肥厚群(n=4)と膀胱壁非肥厚群(n=6)にわけ、WT ラットとともに 3 群で Western blotting 法により膀胱での SERCA2 蛋白の発現量を比較した。結果は膀胱壁肥厚群が他の 2 群より有意に膀胱での SERCA2 蛋白量の発現が増加(p<0.05)していた。よって膀胱での SERCA2 蛋白の発現量が増加することにより膀胱壁が肥厚、膀胱容量が減少し、膀胱機能が低下する可能性が示唆できた。

次に、尿道に部分閉塞を加えた場合に WT ラット群、TG ラット群でどのような変化が観察されるかを検討した。WT ラット、TG ラットの膀胱出口部部分閉塞 partial bladder outlet obstruction (pBOO)モデルを作成し、作成後 2 週間で SERCA2 の蛋白量の変化を比較した。比較は WT 群(n=5)、WTpBOO 群(n=5)、TGpBOO 群(n=5)の 3 群で比較した。結果は WTpBOO 群、TGpBOO 群の膀胱では WT の膀胱と比較して有意に SERCA2 蛋白の発現量が増加していた(p<0.001)。WTpBOO 群、TGpBOO 群の間には SERCA2 蛋白の発現量に差はなかった。TG ラットにおける膀胱壁の肥厚と pBOO ラットにおける膀胱壁の肥厚過程は異なっていると考えられるが、両者とも SERCA2 蛋白が有意に増加していることより、膀胱壁の肥厚過程に SERCA2 が影響している可能性が示唆される。

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)

[学会発表] (計 2 件)

①Characteristic Findings of Bladder Function in SERCA2a-Transgenic Rats, The 41st International Continence Society, 2011/08/31, Glasgow, UK

②SERCA2a-transgenic (TG)ラットにおける膀胱機能の検討, 第 18 回日本排尿機能学会, 2011 年 9 月 17 日, フェニックスプラザ (福井)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥本 一匡 (TORIMOTO KAZUMASA)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：10382293