

## 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 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591801

研究課題名（和文）膀胱収縮に対する尿路上皮の RHO/ROCK, NO の相互作用とムスカリンサブタイプ

研究課題名（英文）The interaction between RHO/ROCK and NO in the urothelium and the role of muscarinic receptor subtype for detrusor contraction

研究代表者

山西 友典（YAMANISHI TOMONORI）

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：90220425

研究成果の概要（和文）：ヒト、ブタ膀胱を用い、尿路上皮付着、および非付着膀胱平滑筋切片を作成して、コリン作動薬(carbachol および Pilocarpine)を段階的に投与し、濃度-収縮曲線（CRC）を作成した。次に ROCK 阻害薬(Y27632、fasudil)を添加した結果、ROCK 阻害薬は、尿路上皮非付着切片では収縮抑制効果が弱かったが、尿路上皮付着切片では有意に抑制した。

次に ROCK 阻害薬投与前に NOS 阻害薬(L-NAME) を前投与した結果、最大張力は L-NAME と Y-27632 の存在下でも減少した。しかし L-NAME 非存在下と L-NAME 存在下では最大張力に有意な差は見られなかった。

研究成果の概要（英文）：Cumulative concentration-response curves (CRCs) to cholinergic agonists (carbachol and pilocarpine) were obtained in the human and porcine detrusor tissues with and without urothelium. After the first curve, the second CRCs to cholinergic agonists were obtained in the presence of ROCK inhibitors (Y27632、fasudil). After administration of ROCK inhibitors decrease of maximum contraction (Emax) was greater in detrusor tissues with urothelium than those without urothelium. Then CRCs to carbachol were obtained in the presence of 30 μM L-NAME plus 30 μM Y-27632. There was a significant difference with regard to Emax between the control and tissues in the presence of Y-27632 and in the presence of L-NAME plus Y-27632. However no significant difference was noted between Emax in tissues with Y-27632 and in that with L-NAME plus Y-27632.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
平成 23 年度	700,000	210,000	910,000
平成 24 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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・排尿学

キーワード：ムスカリン、Rho、ROCK、カルバコール、ピロカルピン、Y27632、ファスジル、一酸化窒素

## 1. 研究開始当初の背景

過活動膀胱に対する他のメカニズムを解明し、新しい治療法を開発する必要がある。生活習慣病やメタボリック症候群が問題視されているが、高血圧、糖尿病、肥満などと過活動膀胱、排尿障害、勃起不全(ED)との関連が注目され、両者にNO-cGMP伝達経路、およびRho/Rho-associated serine-threonine protein kinase (Rho/ROCK)伝達経路が関係していると報告されている。ROCKとNOの関係では、ROCKがeNOSの発現や活性を抑制した、逆にNOがRhoAの活性を抑制した、ROCK阻害薬がラットNOSの抑制による組織的、機能的変化を抑制した、などROCKとNOとの相反作用が報告されている。また下部尿路閉塞では、ROCK阻害薬の膀胱平滑筋収縮抑制効果は増強するが、逆にNOSの発現が抑制される事が報告されており、尿路上皮におけるNOがROCKを介した収縮を抑制している可能性がある。

## 2. 研究の目的

- 1) Rho/ROCK伝達経路における排尿筋収縮とムスカリン受容体サブタイプとの関連を究明する。
- 2) carbachol以外のコリン作動薬、pilocarpineについても排尿筋に対する効果、およびムスカリンサブタイプの親和性について検討する。
- 3) 尿路上皮におけるRho/ROCK伝達経路の排尿筋収縮に関する因子として、NOとの関係を研究する。

## 3. 研究の方法

- 1) ヒト、ブタ膀胱を用い、尿路上皮付着、および非付着膀胱平滑筋切片を作成して、コリン作動薬(carbachol)を段階的に投与し、濃度-収縮曲線(CRC)を作成した。Krebs液で洗浄後、ROCK阻害薬(Y27632、fasudil)を添加し、阻害薬の存在下における第2CRCを作成し、排尿筋収縮に対するRho/ROCKシグナル伝達系の関与の有無を、尿路上皮付着、非付着組織において比較検討した。
- 2) ヒト、ブタ膀胱を用い、Pilocarpineを段階的に投与し、CRCを作成した。種々のムスカリン受容体サブタイプ選択的阻害薬の存在下におけるCRCを作成し、排尿筋収縮に対するムスカリン受容体サブタイプの親和性を比較検討した。
- 3) ヒト、ブタ膀胱での尿路上皮付着切片において、上記と同じ方法で、第1、第2CRCを作成し、さらに組織をKrebs液で洗浄し、L-NAME、Y27632(ともに30 $\mu$ M)を投与

した状態でのcarbacholCRCを作成し、Y27632の膀胱収縮抑制反応に対するL-NAMEの効果を検討した。

## 4. 研究成果

- 1) ROCK阻害薬は、尿路上皮非付着切片では収縮抑制効果が弱かったが、尿路上皮付着切片では有意に抑制した。さらに経壁電気収縮、KCLによる収縮による排尿筋収縮についても、尿路上皮付着の有無により比較検討した結果、Y27632は尿路上皮非付着切片では収縮抑制効果が弱かったが、尿路上皮付着切片では有意に抑制した。しかしfasudilでは、尿路上皮付着の有無に関わらず、収縮を抑制した。
- 2) ヒト、ブタ膀胱を用い、M3ムスカリン受容体作動薬であるピロカルピンの濃度-収縮曲線を作成した。種々のムスカリン受容体阻害薬を用いて、ピロカルピンの収縮抑制実験を行った結果、M3-ムスカリン受容体に親和性が高いことが判明した。
- 3) 尿路上皮付着切片における最大張力はY27632の存在下では減少した( $p < 0.0001$ )。L-NAMEとY-27632の存在下では、Controlのより減少した( $p < 0.0001$ )。しかし第2CRC(L-NAME非存在下)と第3CRC(L-NAME存在下)では最大張力に有意な差は見られなかった。

## 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10件)

- 1) Sazuka T (9人中7番目): Analysis of energy loss mediated by an alpha-1 blocker in patients with benign prostatic hyperplasia using a virtual urethra processed from an endoscopic video image. J Endourol. 2012;26(9):1216-20. doi: 10.1089/end.2012.0078 (査読有)
- 2) Fukuda T, Yamanishi T, Uchiyama T, Kamai T: Randomized, single-blind, parallel study of the effectiveness and safety of solifenacin versus propiverine in the treatment of overactive bladder. LUTS 2013;11-16, 2013 (査読有)
- 3) 山西友典、榊原隆次、内山智之: 下部尿路における $\beta$ -アドレナリン受容体サブタイプの役割. 自律神経 49:216-218, 2012 (査読無)

4) Sato E, (7人中6番目): Pulsed magnetic stimulation with a high-frequency continuous magnetic stimulator (SMN-X) does not exert an adverse effect on genital organs and the estrous cycle in female Wistar-Kyoto rats. *NeuroUrol Urodyn.* 2011;30:1675-1680. doi: 10.1002/nau.21126 (査読有)

5) 山西友典: 安全性に配慮した過活動膀胱治療. *Physicians' therapy manual.* 7:ISSN 1343-3598, 2011 (査読無)

6) 山西友典: 男性過活動膀胱の治療. 「特集: 頻尿・切迫性尿失禁の治療」、臨床泌尿器、65: 731-737, 2011 (査読無)

7) Watanabe M, Yamanishi T, (2番目、他4人): Efficacy of tolterodine ER for the treatment of neurogenic detrusor overactivity and/or low compliance bladder. *Int J Urol* 2010;17:931-6. doi: 10.1111/j.1442-2042.2010.02635.x. (査読有)

8) Yamanishi T, Sakakibara R, Uchiyama T, Hirata K: Role of urodynamic studies in the diagnosis and treatment of lower urinary tract symptoms. *Urological Science* 22:120-128, 2011 (査読有)

9) Yamanishi T, (1番目、他6人): Randomized, placebo-controlled study of electrical stimulation with pelvic floor muscle training for severe urinary incontinence after radical prostatectomy. *J Urol* 2010;184:2007-12. doi: 10.1016/j.juro.2010.06.103 (査読有)

10) 山西友典、本田幹彦、吉田謙一郎: 同効薬剤の選択—そのエビデンスと実際—抗コリン薬. *泌尿外.* 23(臨時増刊):413-414, 2010 (査読無)

[学会発表] (計7件)

1) Yamanishi T, Fuse M, Shibata C, Uchiyama T: The effect of L-NG-Nitroarginine Methyl Ester (L-NAME) on relaxation induced by Y 27632, a Rho-kinase inhibitor, in the porcine urinary bladder with intact urothelium. 43th Annual meeting of the International Continence Society (8.26-30. 2013, Barcelona).

2) Fuse M, Yamaguchi C, Uchiyama T, Kamai

T, Yamanishi T: Efficacy and safety of pilocarpine hydrochloride in the treatment of voiding difficulty in patients with detrusor underactivity. 38th Annual Meeting of the International Urogynecological Association (5/28-6/1, 2013 Dublin).

3) 布施美樹、山口千晴、内山智之、釜井隆男、山西友典: ヒトおよびブタの膀胱平滑筋収縮に対するムスカリンアゴニスト pilocarpine の効果. 第101回日本泌尿器科学会総会. (2013.4.25-28.札幌)

4) Sakakibara R, (12人中9番目): Influences of imidafenacin on cognitive function in patients with overactive bladder. 42nd Annual meeting of the International Continence Society (10.17-19.2012, Beijing).

5) Yamanishi T, (1番目、他5名): The effects of pirocarpine, a muscarinic receptor agonist, on contraction of the urinary bladder in the pig and human. The 32nd Congress of Societe Internationale d'Urologie (9/30-10/4.2012, Fukuoka).

6) Yamanishi T, Yoshida K: The effect of pilocarpine, an M3-muscarinic receptor agonist, on contraction of the porcine urinary bladder in vitro. 41st Annual Meeting of the International Continence Society. (8.29-9.2, 2011, Glasgow, UK)

7) Yamanishi T, Yoshida K: The effects of pilocarpine, an M3-muscarinic receptor agonist on contraction of the human urinary bladder in vitro. 36th Annual Meeting of the International Urogynecological Association (2011, 6, 28-7, 2 Lisbon)

[図書] (計3件)

1) 本間之夫、石塚修、大園誠一郎、賀本敏行、河内明弘、後藤百万、関成人、永井敦、舛森直哉、山西友典、横山修: 日本泌尿器科学会前立腺肥大症診療ガイドライン委員会編. 前立腺肥大症診療ガイドライン. リッチヒルメディカル、東京、2011.

2) 山西友典: 過活動膀胱ガイドライン「今日の治療指針2011年版」第53巻 (山口徹、北原光夫、福井次矢、編) pp1871-1875. 医学書院 東京、2011.

3) 山西友典: 過活動膀胱ガイドライン「今日の治療指針 2012年版」第 53 卷 (山口徹、北原光夫、福井次矢、編) pp1871-1875. 医学書院 東京、2012.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等  
特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山西 友典 (YAMANISHI TOMONORI)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90220425

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: