

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390380

研究課題名(和文)メタボリック症候群：脳酸化ストレス制御はLUTS治療のブレイクスルーになり得るか

研究課題名(英文)Can modulation of oxidative stress in the brain be a breakthrough treatment for lower urinary tract symptoms?

研究代表者

横山 修 (YOKOYAMA, OSAMU)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：90242552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリック症候群、高血圧の病態モデルとしてのOLETFラット、食塩感受性ラットには排尿反射亢進を認めた。膀胱伸展に伴い上皮由来ATP、PGE2、NGFの放出増加、酸化ストレスマーカー8-OHdGの高値、膀胱虚血もみられた。Angiotensin II 受容体拮抗薬(ARB)で、アドレナリン 1A受容体選択的遮断薬投与により膀胱血流の改善と、ATP、PGE2、NGFの放出低下、排尿筋過活動抑制も観察された。また膀胱8-OHdG低下も認められた。臨床的にもARBの有効性を示唆させる結果が得られた。これらの病態モデルの排尿筋過活動は、膀胱虚血が酸化ストレスを通じて生じている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated, in rat models of metabolic syndrome (MetS) or salt-loading hypertension (HT), effects of MetS or HT on bladder function, associated changes in blood flow and epithelial mediators. These models showed frequent micturition. Amounts of ATP, PGE2 and NGF released from the stretched bladder epithelium were significantly increased. A significant decrease in blood flow was concomitant with increased oxidative stress. Angiotensin-II receptor blocker (ARB) and alpha1A blocker increased blood flow and decreased oxidative stress in the MetS bladder, resulting in suppression of detrusor overactivity. Score of lower urinary symptoms was found to be lower in male HT patients treated with ARB. Bladder ischemia and concomitant oxidative stress play an important role in development of storage dysfunction in MetS and HT via increases in release of ATP, PGE2 and NGF from the bladder epithelium. Agents increasing blood supply may improve micturition reflex via suppression of oxidative stress.

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：メタボリック症候群 下部尿路症状 酸化ストレス 膀胱虚血

## 1. 研究開始当初の背景

頻尿、尿意切迫感、尿失禁などの蓄尿症状、尿勢低下、尿線途絶、腹圧排尿、排尿遅延などの排尿症状、残尿感などの排尿後症状を併せて下部尿路症状 (LUTS; Lower Urinary Tract Symptoms) と呼ぶ。一方、メタボリック症候群は、肥満(内臓脂肪蓄積)とインスリン抵抗性という共通の病態を基盤として、高血圧、脂質異常、高血糖が重積し、粥状動脈硬化症に基づく虚血性心疾患や脳血管障害の発症が増大する疾患である。メタボリック症候群は複数の遺伝因子の存在を背景として、そこに過食や運動不足などの環境因子の負荷が加わり発症にいたるいわゆる複合遺伝形質 (complex trait) あるいは多因子遺伝性疾患 (multifactorial disease) と考えられている。高血圧、糖尿病、高脂血症などのメタボリック症候群の危険因子の数が多いため LUTS スコアも高いと報告され (Eur Urol 50: 581, 2006)、それらの危険因子と LUTS との相関が注目されている。われわれも平成 17 年度福井県前立腺検診受診者 (男性 3,624 人) や平成 17 年度福井県住民健康診査を受けた男女 28,832 人に下部尿路症状の調査を行い、基礎疾患、血圧、肥満度 (BMI) などとの相関について解析した。その結果、蓄尿症状には高血圧・呼吸器疾患・不眠が危険因子になり、特に夜間頻尿は肥満・高血圧・心疾患・不眠が独立したリスクで、メタボリック症候群の危険因子の数が多いためオッズ比が大きかった (LUTS 2012, 4: 11-15)。

自律神経、特に交感神経の活動亢進 (血圧、脈拍、尿・血清中のカテコラミンの上昇) は LUTS の重症度と相関する (J Urol 174: 1327, 2005)。特に過活動膀胱では脈拍が高く、さらに上昇させる抗コリン薬は危険と指摘されている (BJU Int 106: 268, 2010)。われわれも LUTS の発症に高血圧・糖尿病・心疾患などがどのように関与しているのか、「前立腺肥大症に伴う排尿障害に対するハルナール®の有効性・安全性に関する大規模調査」(有効性解析対象症例 4,915 例) のデータを再解析することで検討した (LUTS 2012, 4: 68-72)。昼間頻尿・夜間頻尿の蓄尿 2 症状はスコアが高くなるにつれ高血圧の合併頻度が高くなり、蓄尿症状スコア (合計) でも高血圧の合併頻度と有意な相関がみられた。

日本人における高血圧の特徴は肥満がなくても生じ、食塩摂取過剰により脳における酸化ストレスが関係している可能性が指摘されている (Hypertension 50: 360, 2007)。福井県住民健康診査の解析でも高齢者 (特に男性) は加齢とともに BMI は低下するが高血圧の頻度は増加した。本研究で証明すべき仮説は、脳の交感神経亢進が LUTS の発症に関与するか、高血圧が LUTS の発症に関与するかである。日常診療で使用する難治性の過活動膀胱 (特異性とも称せられる) はこのアウトプットが関与しているのではないかと

事実とすれば脳をターゲットとした内因

性抗酸化ストレス物質 adrenomedullin や melatonin は新規過活動膀胱治療薬になる可能性がある。また diet や exercise によるメタボの改善は LUTS 軽減に繋がる可能性もある。

## 2. 研究の目的

これまでに高フルクトース食にて 11 ヶ月飼育したラットでは、高血圧・インスリン抵抗性が獲得され、排尿回数の増加とともに膀胱壁 cyclooxygenase (COX)-2 発現の上昇・尿中 prostaglandin E2 の増加がみられることを報告した (NBS 2009)。しかしこのモデルには体重増加や脂質異常が認められず、メタボリック症候群の病態モデルとは言い難い。そこで新たな病態モデルを用いて検討した。

(1) OLETF ラット: 正常食でも 6 ヶ月の時点で体重増加、高血圧、インスリン抵抗性、脂質異常がみられ、また排尿回数の増加を認めた (未発表)。

(2) 高脂血症ラット: 高脂肪食 (2% cholesterol and 10% lard) で飼育したラットではインスリン抵抗性と排尿反射亢進がみられる (BJU Int 100: 658, 2007)。

(3) 食塩感受性ラット: 高食塩食 (8%) にて高血圧を認めるラットで、当講座で排尿回数が増加することを確認した。食塩抵抗性ラットでは高食塩食 (8%) でも血圧上昇は認めず、排尿回数増加もない。

(4) 自然発生高血圧ラット (SHR): これまで膀胱機能について多くの報告があり、排尿回数増加、アドレナリン感受性亢進、神経密度増加などみられる。

これら病態モデルを用いて以下の点を明らかにした。

(1) 酸化ストレスは末梢レベルのみならず、中枢においても生じていて、高血圧のみならず排尿反射も亢進させるのか。脳内への内因性抗酸化ストレス物質 melatonin の投与が排尿反射にどのように関わっているかを検討することで解明する。われわれはこれまでに強力な抗酸化作用を有する melatonin が脳内 GABA に作用して排尿反射を抑制することを報告した (J Urol 184: 386, 2010)。しかし、脳の酸化ストレスによって亢進した排尿反射を melatonin が抑制できるのか、あるいはその発生を遮断できるのか、過活動膀胱治療の新戦略に繋がる研究である。

(2) メタボリック症候群に伴う LUTS がメタボリック症候群の構成要素である高血圧の治療に伴い改善させることができるのか。また、膀胱血流改善効果を有するアドレナリン 1A 受容体選択的遮断薬である silodosin が亢進した排尿反射を改善できるのか OLETF ラットを用いて検討する。

(3) 高血圧の epigenetic factor である食塩過剰摂取は、本態性高血圧の原因として考えられているが、高血圧に伴う LUTS はどのようなメカニズムで発生してくるのであるのか。食塩感受性ラットを用いて検討する。

(4) 糖尿病、高血圧、脂質異常症などの生活習慣病と LUTS との関連が指摘されているが、これまで大規模な疫学調査は行われていない。われわれはデータ会社から生活習慣病患者に対する治療の一環として、LUTS に対する治療データを得て、生活習慣病に付随する LUTS 発生あるいは治療率の解析をした。

### 3. 研究の方法

(1) メタボリック症候群の病態モデルとしての OLETF ラットでは、体重増加とともに脂質異常、高血圧・インスリン抵抗性が獲得されると報告されている。このモデルを用いて膀胱壁に起こる酸化ストレスや、尿中の各種 mediator (prostaglandin E<sub>2</sub>; PGE<sub>2</sub>, ATP, nerve growth factor; NGF, substance P) の量を測定し、排尿パラメーターとの相関を求めた。

(2) OLETF ラットを用いて、高血圧の治療薬である angiotensin II 受容体拮抗薬 (ARB) である olmesartan、あるいは膀胱血流改善効果を有するアドレナリン 1A 受容体選択的遮断薬である silodosin が、酸化ストレスを改善して亢進した排尿反射を改善させることができるのか、検討する。

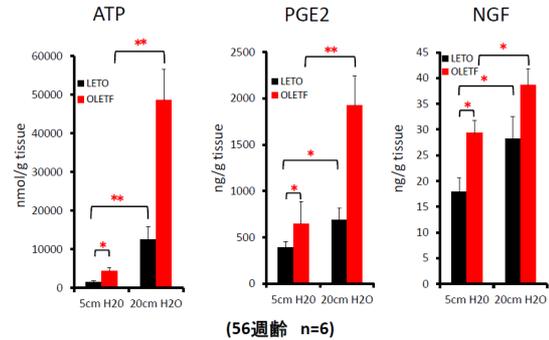
(3) 内因性抗酸化ストレス物質の排尿反射に対する影響を検討する。melatonin は松果体で産生されるホルモンで、概日時計の伝達物質として生体リズムを調節する他、インスリン分泌・糖・脂質代謝に関与し、さらに強力な抗酸化作用も有している (free-radical scavenger)。さらにフルクトースで飼育したメタボリック症候群病態モデルに melatonin を持続投与すると交感神経系を抑制し降圧も得られたと報告されている (Am J Hypertens 21:348, 2008)。われわれは melatonin が脳内 GABA に作用して排尿反射を抑制することを報告しているが (J Urol 184:386, 2010)、melatonin は加齢とともに減少し 70 歳以上ではピーク時の 1/10 程度になると言われているが、melatonin 補充が抗酸化作用を介して糖・脂質代謝のみならず下部尿路機能をも改善して、いわゆるアンチエイジングを実現できる「夢のくすり」になるのではと期待している。

### 4. 研究成果

メタボリック症候群にみられる変化は全身臓器に生じており、膀胱も決して例外ではない。メタボリック症候群にみられる臓器障害はその局所のレニンアンジオテンシン系 (RAS) が関与しているとの報告があり、心肥大や動脈硬化もその本体は局所 RAS と言われている。われわれは、MetS 病態モデルとして OLETF ラットを用い、正常食でも 6 ヶ月の時点で体重増加、高血圧、インスリン抵抗性、脂質異常がみられ、また膀胱内圧測定で排尿筋過活動の所見があることを報告した。酸化ストレスマーカーである 8-OHdG 濃度も膀胱では高いこと、膀胱壁伸展に伴う上皮由来

ATP、Prostaglandin E<sub>2</sub>、NGF が多く放出され (図 1) これが膀胱知覚神経 C 線維を刺激して排尿過活動を引き起こすものと推察された。

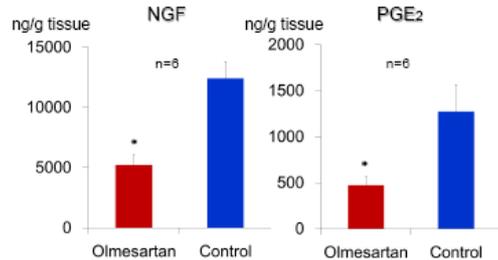
図 1 膀胱伸展による ATP、PGE<sub>2</sub> および NGF 放出量の変化



また膀胱壁ではムスカリン受容体、プリン受容体、iNOS、プロスタノイド受容体の発現も増えており、これは新規治療に繋がる結果と思われた。

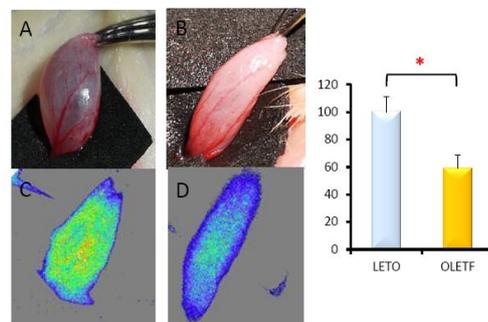
MetS 病態モデルに olmesartan (ARB) を投与すると血圧の低下とともに膀胱上皮由来のメディエーターの放出が低下した (図 2)、また、1 日の尿量も減少した。

図 2 OLMによる膀胱上皮における NGF および PGE<sub>2</sub> 放出量の変化



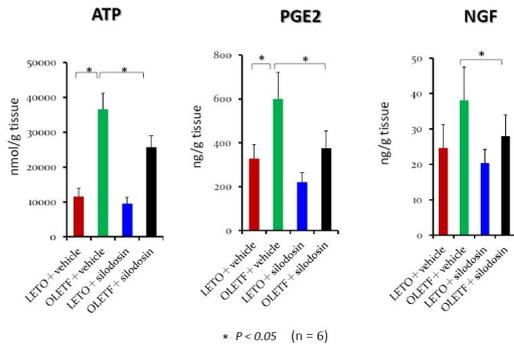
アンジオテンシン受容体サブタイプのうち AT<sub>1</sub> 受容体に拮抗する ARB は高血圧症の治療薬であるが、ARB を投与されている LUTS 患者の IPSS と、他の降圧薬を投与されている LUTS 患者ではスコア - に有意な差があることを報告した (Neurourol Urodyn, 2013)。したがって ARB は MetS に伴う過活動膀胱の治療薬になり得る可能性がある。この病態ラットには膀胱伸展時に血流障害が存在することを 2 次元レーザー血流計 OMRGAZONE を用いて証明した (図 3)。

図 3 二次元レーザー血流計 OMEGAZONE を用いたメボラットの膀胱血流



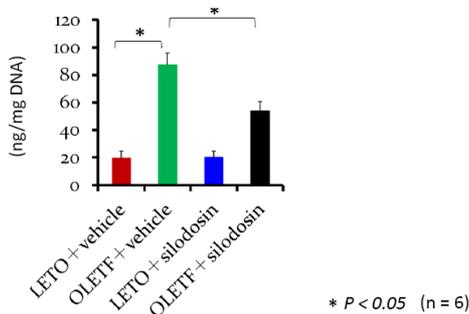
したがって、膀胱局所の血流を改善させることが下部尿路機能の回復に繋がる可能性がある。われわれはアドレナリン 1A 受容体選択性の遮断薬シロドシンを投与すると膀胱血流の改善とともに、膀胱伸展に伴う上皮由来 ATP、Prostaglandin E2、NGF の放出低下がみられ排尿筋過活動の抑制もみられることを報告した(図4)。

図4 silodosin は膀胱伸展による mediator 放出量を減少



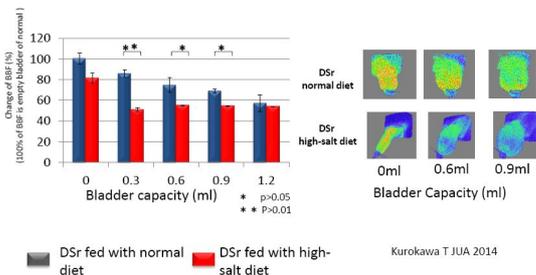
さらに膀胱 8-OHdG 濃度の低下、すなわち酸化ストレスの軽減も認められた(図5)。

図5 silodosin は膀胱壁酸化ストレスマーカー8-OHdGを減少



次に、ヒト高血圧の病態モデルとして、食塩感受性ラット(Dahl-Iwai S; DS)・食塩抵抗性ラット(Dahl-Iwai R; DR)を用い、高食塩食(8%)、一定水分量(40ml/day)にて高血圧を認めるDSラットで、飼育後10週から有意の排尿回数増加がみられるという結果が得られた。食塩抵抗性ラットでは高食塩食(8%)でも血圧上昇は認めず、排尿回数増加もなかった。DSを高食塩食で飼育したラットの膀胱血流をOmegazone OZ-1にて膀胱血流測定を行うと、低膀胱容量でも有意な血流低下が観察され、またex vivoでは膀胱伸展に伴い上皮由来ATP、Prostaglandin E2の放出増加も認められた(図6)。

図6 食塩感受性高血圧ラットにおける膀胱血流障害



したがってこれらのメタボリック症候群病態モデル、生活習慣病病態モデルの排尿筋過活動は、膀胱局所の血流障害、すなわち膀胱虚血が酸化ストレスを通じて生じている可能性が示唆された。また選択性の高いアドレナリン 1A 受容体遮断薬やARBにて血流を改善させれば下部尿路症状は改善させることができると推測された。

脳虚血に起因する排尿筋過活動に関しては、これまでわれわれの施設では脳梗塞モデルを作成して詳細な検討がなされている。特に脳血流改善を目的にカルシウム拮抗薬であるニフェジピンの脳内投与を行うと排尿筋過活動の抑制に有効である結果を報告している。脳内への内因性抗酸化ストレス物質 melatonin の投与が排尿反射にどのように関わっているかを検討した結果、GABA を介して排尿反射を抑制する効果とともに、腎における尿産生を低下させる作用があることを発見した(J Urol 184: 386-91, 2010)。この結果を得て、脳梗塞モデルに対して melatonin の MT1/MT2 受容体選択的 agonist である TAK-375 を投与したところ、排尿反射の抑制はみられなかった。これはこの化合物に GABA 作用が欠如していることに起因すると考えられた。脳の下部尿路機能を司る中枢や自律神経の高次中枢をターゲットに、メタボリック症候群病態モデルに生じる酸化ストレスがどのように下部尿路機能に影響し、また酸化ストレスの改善がどのようなメカニズムを介して排尿筋過活動の抑制に有効であるのか、今後の研究課題としたい。

## 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 16 件)

Yokoyama O, Hiro S, Hotta S, Mogami S, Yamagami H. Efficacy of fesoterodine on nocturia and quality of sleep in asian patients with overactive bladder, Urology, 2013, 83: 750-755 査読有.

Akino H, Namiki M, Suzuki K, Fuse H, Kitagawa Y, Miyazawa K, Fujiuchi Y, Yokoyama O. Factors influencing patient satisfaction with antimuscarinic treatment of overactive bladder syndrome: Results of a real-life clinical study, Int J Urol, 2013, 21: 389-394 査読有.

Yokoyama O, Homma Y, Yamaguchi O. Imidafenacin, an antimuscarinic agent, improves nocturia and reduces nocturnal urine volume, Urology, 2013, 82: 515-520 査読有.

Watanabe N, Akino H, Kurokawa T, Taga M, Yokokawa R, Tanase K, Nagase K, Yokoyama O. Antidiuretic effect of

antimuscarinic agents in rat model depends on C-fibre afferent nerves in the bladder. *BJU Int.* 2013, 112:131-136 査読有.

Yokoyama O, Yoshida M, Kim SC, Wang CJ, Imaoka T, Morisaki Y, Viktrup L. Tadalafil once daily for lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia: A randomized placebo- and tamsulosin-controlled 12-week study in Asian men, *Int J Urol*, 2013, 20:193-201 査読有.

Ito H, Taga M, Tsuchiyama K, Akino H, Yokoyama O. IPSS is lower in hypertensive patients treated with angiotensin-II receptor blocker: Posthoc analyses of a lower urinary tract symptoms population, *Neurourol*, 2013, 32:70-74 査読有.

Tsuchiyama K, Ito H, Taga M, Naganuma S, Oshinoya Y, Nagano K, Yokoyama O, Itoh H. Expression of MicroRNAs associated with Gleason grading system in prostate cancer: miR-182-5p is a useful marker for high grade prostate cancer, *Prostate*, 2013, 73:827-834 査読有.

Aoki Y, Yokoyama O. Metabolic Syndrome and Nocturia, LUTS, *LUTS*, 2012, 4:11-15 査読有.

Ito H, Oyama N, Miwa Y, Akino H, Imamura Y, Yokoyama O. Metastatic myxofibrosarcoma of the spermatic cord responding to mesna, adriamycin, ifosfamide, and dacarbazine combination therapy, *Int Canc Conf J*, 2012, 1:79-82 査読有.

Yokoyama O, Tanaka I, Kusukawa N, Yamauchi H, Ito H, Aoki Y, Oyama N, Miwa Y, Akino H. Antimuscarinics suppress adenosine triphosphate and prostaglandin e2 release from urothelium with potential improvement in detrusor overactivity in rats with cerebral infarction, *J Urol*, 2011, 185:2392-2397 査読有.

Yokoyama O, Yamaguchi O, Kakizaki H, Itoh N, Yokota T, Okada H, Ishizuka O, Ozono S, Gotoh M, Sugiyama T, Seki N, Yamada S. Efficacy of solifenacin on nocturia in Japanese patients with overactive bladder: impact on sleep evaluated by bladder diary, *J Urol*, 2011, 186:170-174 査読有.

Yokoyama O, Aoki Y, Tsujimura A, Takao T, Namiki M, Okuyama A. alpha(1)-Adrenoceptor blocker naftopidil improves sleep disturbance with reduction in nocturnal urine volume, *World J Urol*, 2011, 29:233-238 査読有.

Nagase K, Ito H, Aoki Y, Tanase K, Akino H, Yokoyama O. Co-administration of an

(1)-blocker improves the efficacy and safety of antimuscarinic agents in rats with detrusor overactivity, *Int J Urol*, 2011, 18:836-843 査読有.

Yamaguchi O, Kakizaki H, Homma Y, Takeda M, Nishizawa O, Gotoh M, Yokoyama O, Seki N, Yoshida M; ASSIST Study Group. Solifenacin as Add-on Therapy for Overactive Bladder Symptoms in Men Treated for Lower Urinary Tract Symptoms-ASSIST, Randomized Controlled Study, *Urology*, 2011, 78:126-133 査読有. Gotoh M, Homma Y, Yokoyama O, Nishizawa O. Responsiveness and minimal clinically important change in overactive bladder symptom score, *Urology*, 2011, 78:768-773 査読有.

Gotoh M, Yokoyama O, Nishizawa O. Japanese Propiverine hydrochloride in Japanese patients with overactive bladder: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Int J Urol*, 2011, 18:365-373 査読有.

[学会発表](計 14 件)

Kurokawa T, Nagase K, Zha X, Akino H, Yokoyama O: Hypertension induced by salt loading is related to storage dysfunction in rats, The 2014 Annual Meeting of the American Urological Association, 2014.5.16, Orlando(USA)

黒川哲之, 查 新民, 長瀬桂子, 横山 修: 食塩過剰摂取による高血圧と膀胱血流障害に関する実験的研究, 第 102 回日本泌尿器科学会, 2014.4.26, 神戸

查 新民, 王 東, 長瀬桂子, 秋野裕信, 横山 修: OLETf ラットの膀胱血流障害と蓄尿障害に対するシロドシンの効果, 第 102 回日本泌尿器科学会, 2014.4.26, 神戸

查 新民, 王 東, 長瀬桂子, 秋野裕信, 横山 修: OLETf ラットの膀胱血流障害と蓄尿障害に対するシロドシンの効果, 第 20 回日本排尿機能学会, 2013.9.20, 静岡

Kurokawa T, Nagase K, Zha X, Akino H, Yokoyama O: Hypertension induced by salt loading is related to storage dysfunction in rats, 43th Annual Meeting of the international Continence Society, 2013.8.30, Barcelona(SPA)

Yokoyama O: Case-Based Discussion: OAB and UTI, *Advancements in Urology* 2013, 2013.2.15, Las Vegas(USA)

Zha X, Wang D, Nagase K, Hasegawa Y, Akino H, Yokoyama O: Associations between lower urinary tract symptoms and metabolic syndrome in olett f rats, 42th Annual Meeting of the international Continence Society, 2012.10.19, Beijing(CHN)

Wang D, Zha X, Nagase K, Hasegawa Y,

様式 C - 19、F - 19、Z - 19、CK - 19 (共通)

Muramatsu I, Yokoyama O: The influences of 5 alpha-reductase inhibitor dutasteride on contraction and alpha1-adrenoceptor expression in rat prostate, 42th Annual Meeting of the international Continence Society, 2012.10.18, Beijing(CHN)

Matsuta Y, Nagase K, Akino H, Yokoyama O: Melatonin enlarges the bladder without affecting the bladder contraction pressure or the electroencephalogram findings: a comparison between young and senescent rats, 42th Annual Meeting of the international Continence Society, 2012.10.17, Beijing(CHN)

Akino H, Nagase K, Watanabe N, Tanase K, Oyama N, Miwa Y, Yokoyama O: Effects of C-fibre's desensitization and alpha 1-blocker on non-voiding contractions in a rat model of bladder outlet obstruction, 42th Annual Meeting of the international Continence Society, 2012.10.17, Beijing(CHN)

Kurokawa T, Nagase K, Zha X, Akino H, Yokoyama O: Hypertension induced by salt loading is related to storage dysfunction in rats, 42th Annual Meeting of the international Continence Society, 2012.10.17, Beijing(CHN)

Yokoyama O: Male LUTS: pleoropic pathogeneses-from a novel basic and clinical research, SIU,2012.10.3,Fukuoka

Aoki Y, Matsuta Y, Tsuchiyama K, Matsumoto C, Kusaka Y, Yokoyama O: General & Epidemiological Trends & Socioeconomics: Practice Patterns, Cost Effectiveness, AUA 2012 Annual Meeting, 2012.5.20, Atlanta(USA)

Yokoyama O: Treatment satisfaction with antimuscarinics in male patients with overactive bladder, 6th JAPAN-ASEAN Conference on Men's Health & Aging,2011.7.2,Kamakura(JPN)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-fukui.ac.jp/home/ufms/file/kenkyu/welcome.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

横山 修 (YOKOYAMA OSAMU)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：90242552

(2)研究分担者

伊藤 秀明 (ITO HIDEAKI)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：00345620

多賀 峰克 (TAGA MINEKATSU)

福井大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00529349

秋野 裕信 (AKINO HIRONOBU)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：90159335

松田 陽介 (MATSUTA YOSUKE)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：90345687