

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592367

研究課題名(和文)ラットストレスモデルにおける排尿機能、性機能の検討

研究課題名(英文)Evaluation of bladder and sexual function in rat water avoidance stress model.

研究代表者

高尾 徹也(Takao, Tetsuya)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30379177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：継続的なストレス負荷は、尿路系や男性生殖器系の臓器にも影響を与えられ、尿意切迫感、頻尿、尿失禁などの下部尿路症状(特に過活動膀胱)、膀胱痛を訴える間質性膀胱炎、さらには性機能障害にも関与している可能性がある。今回、我々はラットの慢性ストレスモデルを作成して頻尿、膀胱痛など下部尿路症状の発現メカニズム、性機能障害発現のメカニズムの解明を行った。慢性stress環境下における頻尿の発症に、炎症が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Water avoidance stress (WAS) is a potent psychological stressor and it is associated with visceral hyperalgesia. We investigated the voiding pattern and cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression in a rat bladder model of WAS. Metabolic cage analysis and cystometry showed significantly shorter intervals and less volume of voiding in WAS rats. Significantly higher expression of Cox-2 mRNA was verified by reverse transcription PCR. Immunohistochemistry and western blotting showed significantly higher Cox-2 protein levels in WAS bladders. Furthermore, immunohistochemistry showed high Cox-2 expression exclusively in smooth muscle cells. All WAS-induced changes were reduced by Cox-2 inhibitor pretreatment. Chronic stress might cause frequency through Cox-2 gene upregulation in bladder smooth muscle cells. Further study of Cox-2 in the WAS bladder might provide novel therapeutic modalities for interstitial cystitis.

研究分野：泌尿器科学

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：ストレス 頻尿

1. 研究開始当初の背景

現代社会の様々なストレス環境下では、ストレスはわれわれ現代人に何らかの影響を及ぼしていると考えられる。ストレスによって生じる内臓痛覚過敏は、過敏性大腸炎を引き起こす。また頻尿、切迫性尿失禁の症状を呈する過活動膀胱患者数が増加しており、この原因の一つにストレスも影響している可能性がある。心因性のストレスで性機能障害を呈する症例もある。このように、ストレスは尿路系および男性生殖器系になんらかの影響を与えている。海外での大規模疫学調査では、うつと性機能障害、下部尿路症状は関連があることが証明されている。動物実験では、ストレスによる抑うつラットモデルにおける排尿状態の変化として頻尿が知られており、セロトニンやカテコラミンなどの物質の低下が報告されている。

我々は、これまで男性ホルモンの低下による男性更年期障害症状を呈する日本人の患者でも、うつ症状と性機能症状が関連することを示してきた。また男性更年期障害症状を呈する患者に治療を行い血液中のサイトカインの変化を研究してきた。また動物実験では脊髄損傷ラットでの排尿機能の詳細な解析やシクロフォスファミドによるラット膀胱炎モデルを作成し、排尿機能および膀胱の分子生物学的検討を行った。糖尿病モデルラットを使用し、性機能障害の解析も行ってきた。また精巣特異的遺伝子群の解析としてマイクロアレイによる解析も行った。

以上のような学術的背景、およびこれまでの研究成果を踏まえ、ストレスモデルラットを用いてストレスによる下部尿路障害、性機能障害の機序の解明を行いたいと考えている。

2. 研究の目的

Water Avoidance Stress (WAS)というストレスラットを用いた動物実験では、慢性的なストレスは、機能的な消化器障害を引き起こす

という報告がある。慢性ストレスは、腸粘膜の障害をもたらす。ストレスにより誘導された大腸の免疫系の活性化が起こり、炎症性サイトカイン増加による求心性の経路の感受性亢進がおこっているという推察もなされている。腸粘膜と同様に膀胱粘膜の障害も報告されている。彼らは、膀胱粘膜の障害のみを報告しており、排尿機能の解析、性機能の解析などはなされていない。またその機序の解明もなされていない。本研究では、下記のような方針で研究を遂行する予定である。

(1) 膀胱粘膜の障害に関する検討：過去の論文では光学顕微鏡、電子顕微鏡による観察で膀胱粘膜障害が指摘されている。本研究では、より詳細な検討を行うため、膀胱組織から抽出した RNA を用いてマイクロアレイを行い分子生物学的変化を解析する。その後、有意差のある遺伝子の更なる解析をすすめ、機序の解明を行いたい。

(2) 膀胱機能の検討：これまでは組織学的な変化のみの検討がなされている。本研究では、代謝ケージを用いて 24 時間の排尿回数、1 回排尿量などを測定し、排尿状況の解析を行う。また膀胱内圧測定を行い、膀胱内圧、排尿間隔、1 回排尿量、残尿量などを解析する。ストレスによる排尿の機能的変化を解析する。a) で解析された遺伝子発現を抑制あるいは促進されるような薬剤を投与し、解析をしたい。

(3) 性機能に関する検討：WAS ラットでは、これまで性行動が抑制されるという報告がある。本研究では、陰茎海綿体内圧を測定し、末梢である陰茎組織での変化を解明したい。

3. 研究の方法

(1) SD オスラットを 10 匹ずつ 2 群に分ける。WAS ストレス負荷の方法としては、冷水を張った水槽内の狭い足場にラットを 1 日につき 2 時間以上放置する。これを 2 週間継続する。WAS ラット群と対照群でその後代謝ケージに

入れ、水分や餌を自由摂ることができる状態で1回排尿量・排尿間隔を測定する。膀胱内圧測定は、イソフルレン気化吸入麻酔にて、下腹部正中切開創よりPE-50カテーテル(外径0.97mm)を膀胱内に挿入する。閉腹後、ラットをボールマニケージに格納し、カテーテルを通して膀胱内に生食を注入しながら膀胱機能を測定する。膀胱内圧、排尿間隔、1回排尿量、残尿量を測定する。WASラット群と対照群の2群間での差を検討する。またストレス負荷の前後で、セロトニン・カテコラミン等を採血にて測定する。膀胱機能測定終了後にペントバルビタールにて安楽死させ(150mg/kg以上を腹腔内から投与)膀胱や副腎を摘出し、重量測定を行う。またHE染色や免疫染色等による病理学的検討も行う。

(2)対照群とWAS群の膀胱を摘出し、RNAをとり、Agilent社製DNAマイクロアレイキット(Cy3, Cy5による2色法で約30000遺伝子搭載されている)を用いて、遺伝子発現の差を検討する。WASストレスを行った腸粘膜の解析では、mast cellの数の上昇、IL-1、IFNなどの炎症性サイトカインの上昇、substance PやNeurokinin-1およびその受容体の増加などがみられており、本研究でも炎症性サイトカインや痛みに関与する遺伝子群の変化が考えられる。結果により今後の展開が変化しうるが、遺伝子発現が優位に上昇あるいは減少している遺伝子群をターゲットにしてさらに解析を進める。

(3)遺伝子発現が優位に上昇あるいは減少している遺伝子群をターゲットにして具体的には、real-time RT-PCRで発現量の差の再確認し、タンパクレベルでの発現量の差をWestern blotting、免疫染色などを用いてさらに詳細な解析を進める。

ある遺伝子群がRNAレベル、タンパクレベルでも発現に差があるとすれば、その遺伝子群を抑制するような薬剤(例えば、炎症系サイトカインの上昇がみられるのであれば抗

炎症剤など)を用いて、再度膀胱機能評価を行う。薬剤をWASストレス負荷の前に投与することで予防効果があるのか、WASと同時にあるいはストレス負荷後に投与することにより治療効果があるのかということを解析する。またその時の病理組織変化を解析する。

4. 研究成果

代謝ケージや膀胱内測定の結果、Water Avoidance Stress (WAS)モデルラットが頻尿を呈すことを報告した。その機序の解明のために、摘出した膀胱からRNAを抽出しDNAマイクロアレイを用いてWASラット群と対照群で遺伝子発現の差を探索した。WASラット群で発現が亢進していた代表的な遺伝子は、S100A8、S100A9、MMP7、IL-6、IL-1、FOS、COX-2などであった。炎症に関与する遺伝子群が多いため、慢性のストレス環境下での頻尿に炎症が関与しているのではないかと考え、COX-2に着目した。免疫染色とWestern blottingの検討で、膀胱平滑筋細胞でのCOX-2発現は、WASラット群ではタンパク質レベルで上昇していた。膀胱内圧測定でのCOX2阻害薬を用いた検討では、WASラット群に対しCOX2阻害薬投与群では、頻尿は改善した。免疫染色とWestern blottingの検討で、膀胱平滑筋細胞でのCOX-2発現は、タンパク質レベルで減少していた。慢性stress環境下における頻尿の発症に、炎症が関与している可能性が示唆された。

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1件)

Yamamoto K, Takao T, Nakayama J, Kiuchi H, Okuda H, Fukuhara S, Yoshioka I, Matsuoka Y, Miyagawa Y, Tsujimura A, Nonomura N. Water avoidance stress induces frequency through cyclooxygenase-2 expression: a

bladder rat model. Int J Urol. 2012 Feb;19(2):155-62. 査読あり
doi: 10.1111/j.1442-2042.2011.02905.x.

大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：30263263

〔学会発表〕(計 3件)

山本圭介、奥田英伸、福原慎一郎、吉岡 巖、
木内 寛、高尾徹也、宮川 康、辻村 晃、
中山治郎、松岡庸洋、野々村祝夫：Water
Avoidance Stress ラットにおける
Fesoterodine の効果、第 100 回日本泌尿器科
学会総会、2012.4.21、横浜市

山本圭介、奥田英伸、福原慎一郎、吉岡 巖、
松岡庸洋、高尾徹也、宮川 康、辻村 晃、木
内 寛、中山治郎、野々村祝夫：COX-2
inhibitor は Water Avoidance Stress ラット
の頻尿を改善する、第 18 回日本排尿機能学
会、2011.9.16、福井市

山本圭介、奥田英伸、福原慎一郎、中山治
郎、高尾徹也、宮川 康、辻村 晃、奥山
明彦、木内 寛：Water Avoidance Stress ラ
ットモデルの頻尿と COX-2 の関連、第 99 回
日本泌尿器科学会総会、2011.4.21、名古屋
市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高尾 徹也 (TAKAO TETSUYA)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：30379177

(2)研究分担者

辻村 晃 (TSUJIMURA AKIRA)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40294053

宮川 康 (MIYAGAWA YASUSHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：70362704

野々村 祝夫 (NONOMURA NORIO)