

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462515

研究課題名(和文) ギャップ結合からみた過活動膀胱の原因解明とテルミサルタンの新規治療薬への応用

研究課題名(英文) Upregulation of Angiotensin II Type I Receptor and Connexin 43 in the Bladder of Aged Rats with Bladder Dysfunction

研究代表者

森 健一 (MORI, Kenichi)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：00579013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：加齢に伴う膀胱のAT1受容体(AT1R)の増加は、MAPキナーゼを介したコネクシン43の発現増加や膀胱線維化を促進させるが、これが排尿筋過活動や排尿筋収縮力の低下の原因と考えられた。一方、AT2受容体(AT2R)も加齢に伴い増加し、アディポネクチン分泌を促進させAT1R作用を抑制するが、AT1R作用に比べAT2Rの相対的作用が低下しており、これが加齢による排尿機能障害の原因の1つであると考えた。

研究成果の概要(英文)：We examined alterations in expression of angiotensin II type 1 receptors (AT1R) which induce organ tissue remodeling, angiotensin II type 2 receptors (AT2R) which protect against it, and related molecules in the bladder of matured rats with bladder dysfunction. In the bladder, the mRNA expression of AT1R, Cx43, MAPK, collagen 1, and AT2R were significantly higher in matured rats than young rats. The relative expression ratio of AT1R protein against AT2R protein in the mucosa and detrusor was significantly increased in matured versus young rats. Matured rats exhibit not only bladder overactivity but also impaired voiding, which are associated with upregulation of AT1R. The upregulation of AT2R also may play a significant role in the suppressing of AT1R induced remodelling. However, because AT1R upregulation is more dominant than AT2R increases, AT2R activation may not be sufficient to suppress AT1R stimulation in matured rats.

研究分野：排尿機能学

キーワード：加齢 排尿機能障害 レニン-アンジオテンシン系 AT1受容体 AT2受容体 コネクシン43

1. 研究開始当初の背景

(1) ギャップ結合は細胞膜に存在し細胞接着の他、細胞間コミュニケーションとしても重要な役割を持つ。ラット尿道狭窄モデルでは、排尿筋収縮力低下と伴にギャップ結合の構成蛋白の一つであるコネキシン 43(Cx43)が脱リン酸化され、Cx43の局在が細胞内へ変化する。これに伴うギャップ結合の破綻は排尿障害の原因の一つである。

(2) Cx43の脱リン酸化には局所のレニン-アンジオテンシン系(RAS)の亢進が関与することが心臓、脳などの組織で数多く報告されているが、膀胱組織におけるRASの亢進とCx43の脱リン酸化に関する報告はみられない。申請者は尿道狭窄によるラット過活動膀胱モデルを用いて、過活動膀胱では膀胱排尿筋におけるRASの亢進がみられることを明らかにした。このRASの亢進がMAPキナーゼ(MAPK)亢進に関与し、これが脱リン酸化Cx43の異常発現に関与することを明らかにしている。つまり、ギャップ結合破綻による細胞間コミュニケーションの異常が過活動膀胱の一因と考えている。さらに、ラット尿道狭窄モデルの排尿機能障害にアンジオテンシン type 受容体(AT1受容体)の亢進が関与していると報告や、尿道狭窄によるラット過活動膀胱モデルを用いて、AT1受容体の拮抗薬であるテルミサルタンを投与することで過活動膀胱が改善したとの報告がある。

(3) 高齢化は急速に進んでおり、今後も過活動膀胱の患者数は増えるものと考えられる。現在、過活動膀胱患者に使用されている主な薬物として抗コリン剤、 $\beta$ 3刺激薬などがあるが、これらの薬物を用いても頻尿などの症状改善が見られない過活動膀胱患者も多く存在する。高齢化が急速に進む中、高齢ラットの過活動膀胱に対するテルミサルタン投与の有効性を検討することは、国内だけではなく世界的にも重要である。

2. 研究の目的

高齢による排尿機能障害に膀胱局所でのRASが関与しているのかを検討し、高齢ラットの過活動膀胱に対するテルミサルタンの新規治療薬としての有効性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 高齢ラットおよび若年ラットの尿流動態学的検査を行う。8週齢、9ヶ月齢、15ヶ月齢雌のS-Dラットを用いて覚醒下シストメトリーによる尿流動態学的な比較検討を行い、高齢に伴う排尿機能障害の病態を明らかにする。

(2) 高齢ラットと若年ラットの膀胱粘膜、膀胱筋層における分子生物学的な比較検討を行う。8週齢、9ヶ月齢、15ヶ月齢雌ラットの膀胱を摘出した後、顕微鏡下に膀胱筋

層と膀胱粘膜に分離し、AT1受容体、アンジオテンシン typeII受容体(AT2受容体)これらに関連する分子に関してRT-PCR法とウエスタンブロット法、さらに免疫組織学的な検討を行った。

4. 研究成果

(1) 膀胱内圧検査を行ったところ、15ヶ月齢の加齢ラットでは排尿筋無抑制収縮数と残尿量の増加、最大排尿筋収縮力と1回排尿量の低下を認めた。8週齢ラットと9ヶ月齢ラットでは排尿筋無抑制収縮や最大排尿筋収縮力の低下は認めなかった。高齢による排尿機能障害は排尿筋無抑制収縮と最大排尿筋収縮力の低下が主体であった(図1)。

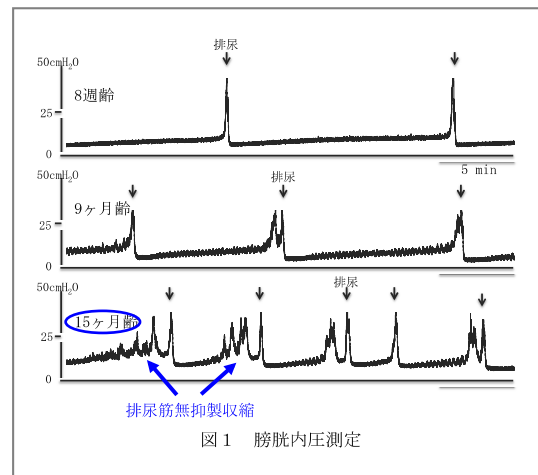


図1 膀胱内圧測定

(2) RT-PCR法によるmRNA発現の検討では、8ヶ月齢の若年ラットと比較し15ヶ月齢の加齢ラットの膀胱排尿筋及び膀胱粘膜において有意なAT1受容体、AT2受容体、Cx43、MAPK、PPAR、アディポネクチン、コラーゲンのmRNA発現増加を認めた。さらに、15ヶ月齢の加齢ラットにおける膀胱組織において神経成長因子(NGF)のmRNA発現の有意な発現増加を認めた。

(3) ウエスタンブロット法による各種蛋白の発現量の検討においても、8ヶ月齢の若年ラットと比較し15ヶ月齢の加齢ラットの膀胱排尿筋及び膀胱粘膜において有意なAT1受容体、AT2受容体、Cx43、MAPK、PPAR蛋白の発現増加を認めた(図2)。

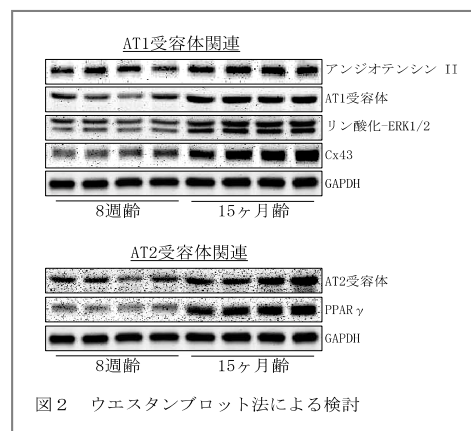
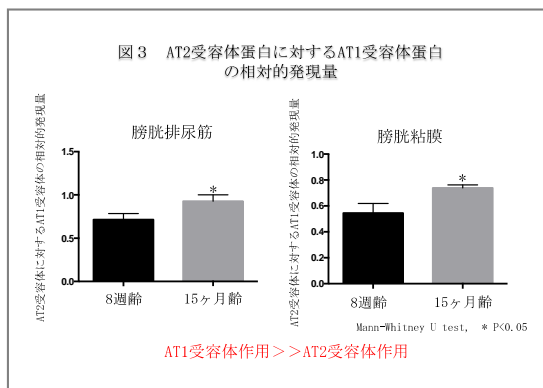


図2 ウエスタンブロット法による検討

また、15ヶ月の加齢ラットの膀胱組織ではAT1受容体蛋白がAT2受容体蛋白より相対的に発現量が増加していた(図3)



(4)膀胱組織におけるAT1受容体の免疫組織学的な検討を行ったところ、8週齢の若年ラットに比べ、15ヶ月齢の加齢ラットにおいて膀胱粘膜及び筋層における発現増加を認めた。AT1受容体の局在の変化に関しては認めなかった。

(5)加齢に伴い膀胱組織でのAT1受容体発現が増加するとMAPKを介してCx43の発現を増加させる。これにコラーゲン増加による膀胱線維化が加わり、排尿筋無抑制収縮や排尿筋収縮力低下を引き起こしていると考察した。また、NGFの発現増加は排尿筋過活動の原因となることが報告されており、本研究においても膀胱組織におけるNGFの発現増加は排尿筋無抑制収縮の要因の一つと考える。一方、この亢進したAT1受容体作用を抑制するためAT2受容体の発現も加齢に伴い増加し、PPARを介するアディポネクチン分泌促進に働くが、加齢ラットではAT1受容体作用に比べAT2受容体の相対的作用が低下しており、これが加齢による排尿機能障害の原因の一つであると考えた。つまり、加齢による排尿機能障害に関しても慢性的なRASの活動性亢進が関与しているものと思われる。

(6)アンジオテンシン受容体にはAT1受容体とAT2受容体のサブタイプがある。AT1受容体はMAPKを介して間質線維化とCx43の発現を増加させるが、このCx43の高発現は過活動膀胱の原因の1であるといわれている。一方、AT2受容体はAT1受容体によるリモデリングを抑制する作用を有しホメオスタシスに参与する。テルミサルタンなどのAT1受容体阻害薬の中にはAT2受容体を介してPPARを刺激し、アディポネクチン分泌促進作用を有するものがあり、こういった点からもAT1受容体阻害薬は排尿障害治療薬のターゲットとなりうる可能性がある。テルミサルタンなどのAT1受容体阻害薬の使用に関しては、他臓器と同様に加齢による排尿機能障害の予防や進行の抑制を目的とした使用が期待できる。

#### <引用文献>

- Mori K, Noguchi M et al. Decreased cellular membrane expression of gap junctional protein, connexin 43, in rat detrusor muscle with chronic partial bladder outlet obstruction. Urology 65;1254-58, 2005.
- Tobu S, Noguchi M et al. Changes in angiotensin II type 1 receptor expression in the rat bladder by bladder outlet obstruction. Urol Int 89;241-45,2012. (DOI: 10.1159/000339373.)
- Cho AT, Park EY, Kim JC. Effect of angiotensin II receptor antagonist telmisartan on detrusor overactivity in rats with bladder outlet obstruction. Urology. 80(5):1163.e1-7,2012. (DOI:10.1016/j.urology.2012.05.002.)

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

- Kenichi Mori, Mitsuru Noguchi, Shohei Tobu, Fuminori Sato, Hiromitsu Mimata, Pradeep Tyagi, Michael B. Chancellor, Naoki Yoshimura. Age-Related Changes in Bladder Function With Altered Angiotensin II Receptor Mechanisms in Rats. NeuroUrol Urodyn. 2015 Aug 7. (DOI:10.1002/nau.22849). (査読有り)

- Tobu S, Noguchi M, Mori K, Matsuo M, Uozumi J. Chronic Urinary Retention Could Decrease the Number of Suburothelial Myofibroblasts in the Rat Bladder. Urol Int2014;92:477-481 (DOI:10.1159/000357118). (査読有り)

[学会発表](計10件)

- 森 健一、野口 満、東武昇平、澁谷忠正、住野泰弘、佐藤文憲、吉村直樹、三股浩光  
発表標題: アンジオテンシン II 受容体から見た加齢による排尿機能障害の原因  
学会名: 第20回日本排尿機能学会  
発表年月日: 2013年9月18日~9月21日  
発表場所: グランシップ(静岡県静岡市駿河区)

- K Mori, S Tobu, M Noguchi, Y Sumino, F Sato, H Mimata, N Yoshimura.  
発表標題: Bladder dysfunction and

increased bladder expression ratio of angiotensin II type I receptors against angiotensin II type II receptors in aged rats.

学会名：第6回排尿障害モデル動物研究会  
発表年月日：2013年9月21日～9月21日

発表場所：グランシップ（静岡県静岡市駿河区）

Kenichi Mori, Shohei Tobu, Mitsuru Noguchi, Yasuhiro Sumino, Fuminori Sato, Hiromitsu Mimata, Naoki Yoshimura.

発表標題：Bladder dysfunction and increased bladder expression ratio of angiotensin II type I receptors against angiotensin II type II receptors in aged rats.

学会名：第65回西日本泌尿器科学会総会  
発表年月日：2013年10月31日～11月2日

発表場所：マリトピア（佐賀県佐賀市新栄東）

Mori K, Tobu S, Noguchi M, Sumino Y, Sato F, Mimata H, Yoshimura N.  
発表標題：Bladder Dysfunction and Increased Bladder Expression Ratio of Angiotensin II Type I Receptors against Angiotensin II Type II Receptors in Aged Rats.

学会名：国際尿禁制学会（ICS 2013）  
発表年月日：2013年8月26日～8月30日

発表場所：バルセロナ国際会議場（バルセロナ、スペイン）

Mori K, Sumino Y, Sato F, Mimata H, Yoshimura N.

発表標題：Decreased expression ratio of estrogen receptor- against estrogen receptor- in the bladder of rats with partial bladder obstruction.

学会名：国際尿禁制学会（ICS 2014）  
発表年月日：2014年10月20日～10月24日

発表場所：SulAmerica コンベンションセンター（リオデジャネイロ、ブラジル）

森 健一 . シンポジウム：加齢に伴う排尿機能障害：アンジオテンシン受容体からみた排尿機能障害の解明

学会名：第21回日本排尿機能学会  
発表年月日：2014年9月17日～9月20日

発表場所：岡山コンベンションセンター（岡山県岡山市）

Mori K, Yoshizawa T, Kawamorita N, Sumino Y, Sato F, Mimata H, Yoshimura N.

発表標題：Age-related bladder dysfunction in rats: Involvement of the angiotensin II receptor system.

学会名：アメリカ泌尿器科学会（AUA2014）  
発表年月日：2014年5月16日～5月21日

発表場所：オレンジカウンティコンベンションセンター（オランダ、アメリカ合衆国）

Mori K, Sumino Y, Sato F, Mimata H.  
発表標題：Alterations of hematogenesis and bone mineral density after dutasteride treatment in aged patients with benign prostatic hyperplasia.

学会名：アメリカ泌尿器科学会（AUA2015）  
発表年月日：2015年5月15日～5月19日

発表場所：モリアル会議センター（ニューヨーク、アメリカ合衆国）

Mizoguchi S, Mori K, Yoshimura N, Mimata H.

発表標題：Effects of estrogen receptor activation on prostatic inflammation and bladder overactivity in a rat model of chronic nonbacterial prostatitis.

学会名：ヨーロッパ泌尿器科学会（EUA2015）  
発表年月日：2015年10月6日～10月9日

発表場所：フェリア・デ・マドリッド会議場（マドリッド、スペイン）

溝口晋輔、森 健一、佐藤文憲、吉村直樹、三股浩光 .

発表標題：ラット慢性非細菌性前立腺炎モデルにおけるエストロゲン受容体を介した下部尿路症状の改善効果

学会名：第22回日本排尿機能学会  
発表年月日：2015年9月9日～9月11日

発表場所：京王プラザホテル（札幌市、北海道）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕  
出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 健一 (KENICHI Mori)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号：00579013

(2) 研究分担者

三股 浩光 (HIROMITSU Mimata)  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号：60219714

住野 泰弘 (YASUHIRO Sumino)  
大分大学・医学部・講師  
研究者番号：30325716

(3) 研究協力者

吉村 直樹 (NAOKI Yoshimura)  
米国ピッツバーグ大学・泌尿器科・教授