

過活動膀胱等の治療法の研究

山口 脩, 野宮正範, 池上憲太郎, 宮崎 希, 今井祐樹, 春木 満
日大工・生命

1. はじめに

前立腺肥大症は中高年男性の代表的な排尿障害である。本疾患では肥大前立腺が下部尿路を閉塞するため、排尿困難に加えて頻尿や尿意切迫感のような過活動膀胱(Overactive Bladder: OABと略)の症状が出現し、生活の質(QOL)を著しく損ってしまう。そのため、過活動膀胱の治療・予防法の開発は重要である。本研究ではTAC-302 および水素水による過活動膀胱の改善効果について報告する。また、尿産生停止により膀胱が使用されなくなった場合に萎縮を起こすメカニズムの検討も行った。さらに、水素水による食塩感受性高血圧の改善効果についても報告する。

2. TAC-302 による OAB 改善効果

TAC-302 は熱帯地方で切り傷の治療に使われていた植物から抽出されたシクロヘキセン鎖アルコールで、神経突起伸長作用、神経修復作用および神経保護作用をもつ化合物である。過活動膀胱を有する患者の膀胱では部分的に神経脱落(partial denervation)が起きていることから、OABの発生とdenervationの関連性が指摘されてきた。そこで、ラット慢性膀胱虚血(chronic bladder ischemia: CBI)モデルを用いて、TAC-302がその神経保護および修復効果により膀胱過活動の発生を防止できるか検討した。また、TAC-302の膀胱壁内神経に対する保護効果を形態学的および機能的側面から検証した。さらに、作用機序の解明を目指し、神経成長と修復に関与するとされているNGFおよびGhrelinの発現についても検討した。

【対象と方法】

16週齢雄性ラットを対照群8匹, CBI群12匹, CBI+TAC-302投与(CBI-TAC)群11匹に分けて検討した。対照群は、無処置普通食で飼育。CBI群は、両側腸骨内皮傷害後、高コレステロール食で飼育。CBI-TAC群は、両側腸骨動脈内皮傷害後、TAC-302(0.1%)混餌高コレステロール食で飼育した。8週後、覚醒非拘束下に膀胱内圧測定を行った後、摘出膀胱の平滑筋条片を用いた等尺性

張力実験および膀胱と腸骨動脈の組織学的評価、PCP9.5(非特異的神経マーカー)を用いた神経染色、ELISA法によるNGFの発現、定量的RT-PCRによるGhrelinの発現を解析した。Achの放出量は、膀胱切片をオルガンバス中に懸垂し、マイクロダイアリシス法によって測定した。また、胃におけるGhrelin mRNAの発現もTAC-302投与群で測定し、非投与群と比較した。

【結果】

体重・膀胱重量は群間に差を認めなかった。CBIとCBI-TAC群の腸骨動脈は、血管壁肥厚を伴う動脈閉塞性変化を呈し、動脈壁の厚さは、CBIとCBI-TAC群間で有意差を認めなかった。膀胱内圧測定では、対照群に比べ、CBI群の排尿間隔は著明に短縮し、膀胱容量と一回排尿量の有意な減少を示した(図1)。一方、CBI-TAC群では、この排尿間隔の短縮と膀胱容量の減少が有意に改善した(図1)。経壁神経電気刺激に対する収縮反応性は、対照群に比べてCBI群で有意に低下し、CBI-TAC群では、この収縮反応性の低下が有意に抑制された(図2)。膀胱のCGRPおよび

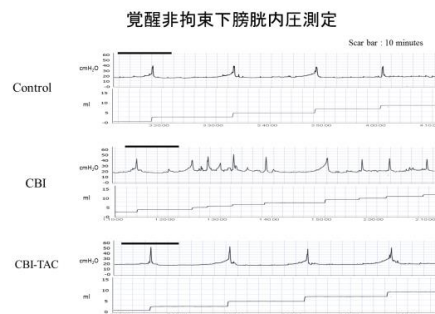


図1 膀胱内圧測定結果

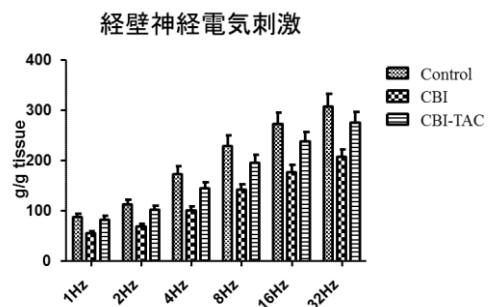


図2 経壁神経電気刺激に対する収縮反応性

Substance P (SP) 陽性神経は CBI 群で減少したが、これらの神経の減少は TAC-302 によって抑えられた (図 3)。Ach 放出量は CBI 群で有意に減少した。一方、TAC-302 投与は Ach の放出量をコントロールと同程度に維持した (図 4)。NGF の発現は、CBI 群と CBI+TAC-302 群では有意差がなかった (図 5)。膀胱および胃における Ghrelin mRNA の発現量は、TAC-302 投与の投与によっても変化を示さなかった (図 6)。

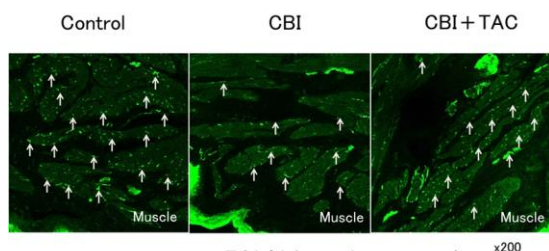


図 3 PGP9.5 陽性神経 (矢印で示す)

【考察】

TAC-302 の予防投与は、CBI ラットの膀胱過活動の発生を防止した。また、TAC-302 は CBI 群における求心性神経の減少、および経壁電気刺激による遠心性神経を介する縮反応の低下も抑えた。以上の所見は、遠心性および求心性神経を含めて膀胱支配神経の保護が、膀胱過活動の発生予防に繋がることを示唆している。

TAC-302 の投与が CBI における PGP9.5 陽性神経の減少を抑えると共に、Ach の放出量も正常レ

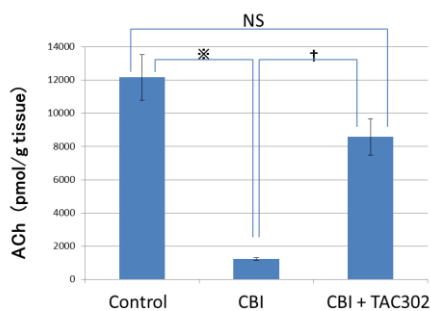


図 4 Ach の放出量

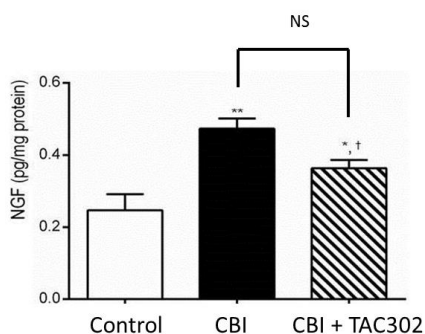


図 5 NGF の発現

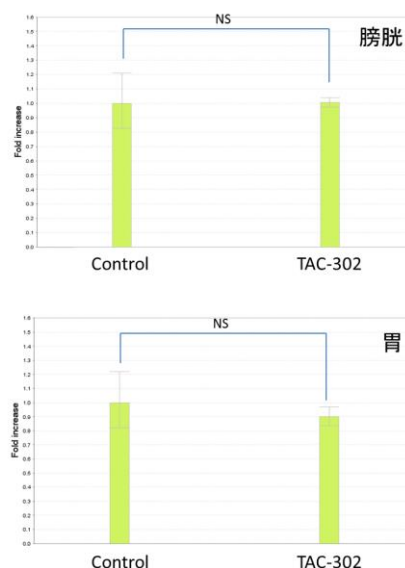


図 6 膀胱及び胃における Ghrelin mRNA の発現

レベル近くまで維持したことから、TAC-302 は遠心性および求心性神経を含めた膀胱壁内神経に対する保護効果を有することが明らかとなった。この作用機序として NGF や Ghrelin の関与を検討したが、TAC-302 の投与は膀胱および胃において両者の発現を促進しなかった。このように、TAC-302 には明らかに神経保護作用があるにもかかわらず、その作用機序には未知の部分が多く解明に向けた更なる研究が必要である。

3. 水素水による OAB の改善効果

下部尿路閉塞による OAB の発症には、膀胱の慢性虚血と酸化ストレスが関与すると考えられている。そこで、優れた抗酸化作用を有し、近年様々な疾患予防効果が報告されている水素水 (H₂-Water) に着目し、水素水の摂取による OAB 改善効果および、その分子メカニズムを検討した。

下部尿路閉塞 (BOO) ラットに水素水 (HW) を 4 週間与え、通常水 (OW) を与えた群および Sham 群 (コントロール群) と比較した。通常水を与えた下部尿路閉塞ラット (BOO+OW) では、排尿間隔が短縮すると共に、残尿量の増加と排尿効率の低下が観察された (図 7)。一方、水素水を摂取させた群 (BOO+HW) では、排尿間隔がほぼ正常に戻り、排尿効率も残尿量の減少に伴い上昇した (図 7)。

膀胱組織中の酸化ストレスマーカー (8-OHdG と MDA) は、通常水を与えた群 (BOO+OW) で著しい上昇を示した (図 8)。また、膀胱求心性神経の感受性を高める NGF の発現も亢進していた。ところが、水素水を与えた群 (BOO+HW) では、8-OHdG および MDA の上昇が抑えられ NGF の発現も低下した (図 8)。

以上のように、下部尿路閉塞ラットにおいて、

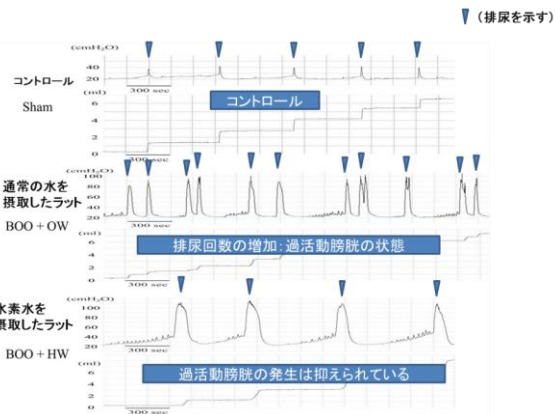


図7 水素水による過活動膀胱の症状の改善

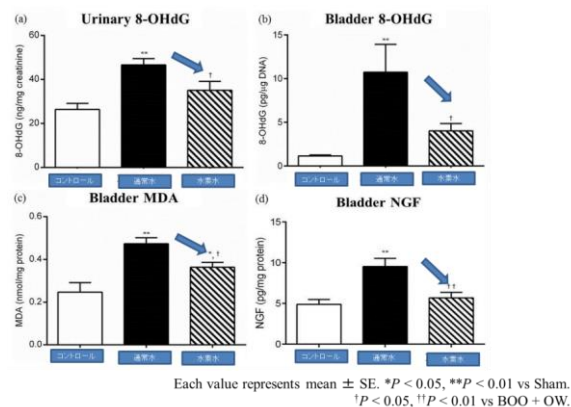


図8 水素水による酸化ストレスマーカーの減少

水素水の摂取はその抗酸化作用によって OAB の発生のみならず排出障害の悪化も抑えることが明らかとなり、今後臨床への応用が期待される。

4. 廃用性膀胱萎縮のメカニズム

腎不全などで尿産生が行われなくなり膀胱に尿が輸送されなくなると、膀胱は尿を貯め排出するという本来の活動を停止する。このように活動が停止した膀胱は廃用性萎縮を起こすことが知られている。ところが、腎移植によって尿産生が再開しても進行した膀胱萎縮は回復しないことが多く、移植医療における問題の一つになっている。本研究では、タンパク質を分解する機序の中で、ユビキチン・プロテアソーム径路に着目し、廃用性膀胱萎縮の機序を検討した。

【対象と方法】

雄 SD ラットに両側尿管を膀胱から遊離し背部に開口固定する尿路変更を行い、尿が膀胱に輸送されない廃用膀胱モデルを作成した。類似の sham 手術を行ったラットをコントロールとした。尿路変更後、1日目、2日目、3日目および7日目で膀胱を摘出し、膀胱重量測定後に凍結保存した。尿路変更後に萎縮を誘導する蛋白質を調べるため、蛋白分解系として MuRF-1 と Atrogin-1, アポトーシス系として Bcl-2 のそれ

ぞれの発現を定量的 RT-PCR により解析した。

【結果】

膀胱重量は、尿路変更後1日目から減少し始め、7日目で約30%の有意の減少を示した(図9)。MuRF-1 は、尿路変更後の1日目から有意に上昇し、2日目に最大となり、3日目まで有意の上昇を維持し、以後7日目まで徐々に減少した(図10)。Atrogin-1 も同様に、1日目から有意に上昇し、2日目に最大となり、3日目まで高値を維持し、7日目で sham と同レベルまで減少した(図10)。Bcl-2 については、2日目から上昇傾向を示したが、有意の変化は認められなかった。

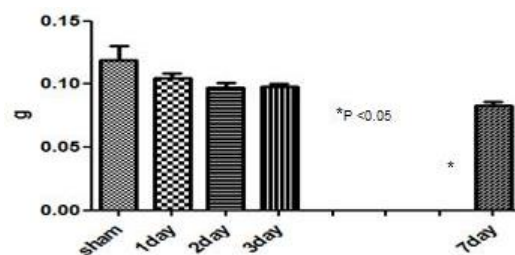


図9 尿路変更後の膀胱重量の推移

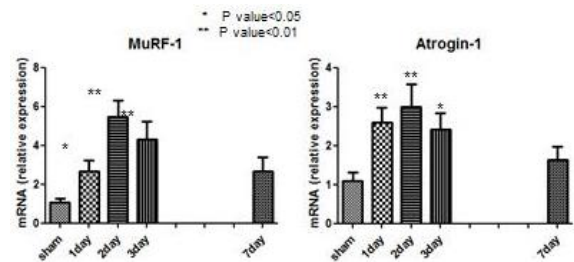


図10 尿路変更後のユビキチンリガーゼの発現

【考察】

運動不足や寝たきりの状態が続くと筋肉が萎縮することは良く知られている。平滑筋臓器である膀胱も使われなくなると廃用性萎縮を起こすが、今回の実験で膀胱重量が尿路変更後1週目で有意に減少(約3割の減少)したことは、膀胱の廃用性萎縮がかなり早い時期から始まることを示している。さらに、尿路変更後3日以内に、ユビキチン化を誘導する酵素である MuRF-1 と Atrogin-1 の発現(mRNA)が増大していることが明らかとなった。したがって、廃用性膀胱萎縮の機序として、MuRF も Atrogin も筋特異的なリガーゼであるから、両者が膀胱平滑筋を構成するタンパク質と結合、ユビキチン化を誘導し、ユビキチン・プロテオソーム径路による分解が進行しているものと思われる。今後、蛋白質のユビキチン化を防ぐ食品や薬剤の開発は、廃用性膀胱萎縮のみならず老化による筋萎

縮（サルコペニア）の予防に役立つことが期待される。

5. 水素水による食塩感受性高血圧の予防効果

食塩感受性高血圧は日本国内において、高血圧患者全体の4割を占める。血圧調節には Na^+ が重要な役割を果たしており、腎臓遠位尿細管細胞の上皮型ナトリウムチャンネル（ENaC）を介して尿からの再吸収が行われることにより人体の電解質濃度を一定に保っている。食塩感受性高血圧では、ENaCによる Na^+ 再吸収が増進することによって血圧の上昇が引き起こされる。

本研究では Dahl salt sensitive rat (DSS ラット) を用いて H_2 水摂取による食塩感受性高血圧に対する抑制効果を検討した。また、水素水による ENaC 遺伝子の転写抑制効果の解析を行った。また、血圧制御因子である with-no-lysine kinase 4 (WNK4) は ENaC の発現を抑制することが報告されているので、WNK4 の発現についても解析した。

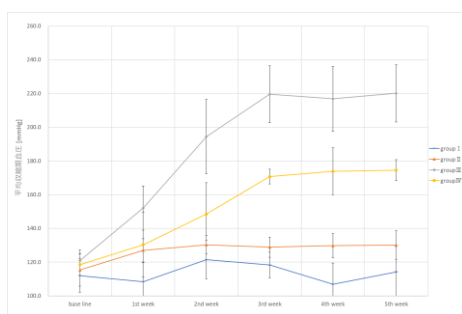


図 11 収縮期血圧の推移

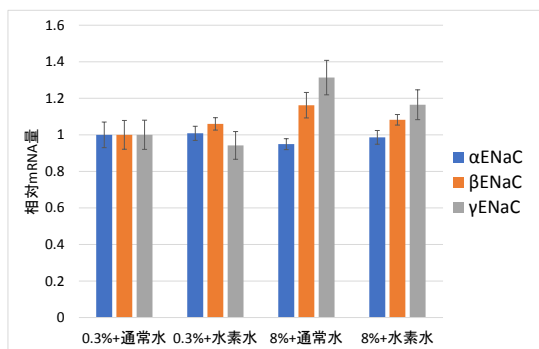


図 12 ENaC の発現

【方法】

8週令のDSSラットを4群に分けて、ベースライン(0週)、1週目、2週目、3週目、4週目および5週目に、収縮期血圧を測定した。血圧の測定は非観血的測定法であるTail-Cuff法を用いた。I群には0.3%の低食塩食と普通水(水道水)、II群には低食塩食と H_2 水、III群には8%の高食塩食と普通水、IV群には高食塩食と H_2 水をそれぞれ

与えた。III群では、2週間前より予防投与ということでの H_2 水の飲水を開始した。個体数はI群4頭、II群6頭、III群6頭およびIV群6頭である。各群のラットは5週目の血圧測定後に安楽死させ、腎臓を摘出した。腎臓の髄質からRNAを抽出し、逆転写反応により得られたcDNAを用いてリアルタイムPCRを行い、合成量が一定の β -ActinとENaC- α 、 β 、 γ サブユニットの増幅曲線を比較して相対的なmRNA量を求めた。また、WNK4の発現量についても同様の方法で解析した。

【結果】

低食塩食を与えたI群とII群は、普通水および水素水の摂取でも血圧の上昇が見られず、5週間を通じて安定した値を示した。高食塩食と普通水を与えたIII群では、血圧は1週目から上昇を開始し、3週以降は約220 mmHgの最大値を維持した。高食塩食と水素水を与えたIV群では、血圧上昇が著明に抑制され、1週目以降からIII群とIV群の間に有意差が生じた(図11)。ENaC mRNA量については、ENaC α の発現は各群で変化を示さなかった。ENaC β と ENaC γ の発現は高食塩食と普通水を与えたIII群でそれぞれ増加した。一方、高食塩食と水素水を与えたIV群では、ENaC β と ENaC γ の発現量の平均値はIII群のENaC β と ENaC γ より減少したが、それぞれの発現量に両群間で有意差を認めなかった(図12)。WNK4のmRNA量は、低食塩食を与えた場合は普通水摂取と水素水摂取で差がみられなかった。高食塩食を与えた場合には、水素水を摂取したIV群の方が普通水を摂取したIII群よりも約1.3倍の増加を示し、III群の発現量との間には有意差がみられた。

【考察】

本研究から、高食塩食でDSSラットに発生する高血圧は、水素水の摂取により抑制されることが明らかとなった。また、水素水の食塩感受性高血圧に対する抑制効果の機序を探るため、ENaCとWNK4発現量を解析した。水素水および普通水を摂取した群を比較すると、ENaCは減少傾向を示したが、両群間に有意差は認められなかった。一方、WNK4発現には有意差がみられた。

これらの遺伝子発現を解析した時期は、血圧上昇が頭打ちになる高食塩食摂取開始から5週目に限られていたので、水素水によるENaC発現抑制効果はもっと早い時期に現れていた可能性がある。ENaCやWNK4の発現については、高食塩食摂取から早期における解析も含め、今後の検討を要する。