

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：13601
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2016～2020
課題番号：16K20129
研究課題名（和文）下部尿路微小循環障害の実験系確立とTRPチャンネルの微小循環に対する役割の検討

研究課題名（英文）Establishment of basic laboratory model to evaluate TRP channels and microcirculation on lower urinary tract

研究代表者
皆川 倫範（Minagawa, Tomonori）
信州大学・学術研究院医学系（医学部附属病院）・講師

研究者番号：60638873
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：われわれは、抗炎症作用や利尿作用を有し、炎症を伴う頻尿や尿路結石に対し臨床的に投与されている猪苓湯に注目した。酢酸で誘発される炎症にともなう排尿筋過活動に対する猪苓湯の薬理効果について検討を行っている。SDラットを猪苓湯混餌飼料、あるいは、通常飼料で2週間飼育した。それぞれの飼料で2週間飼育したラットに対して、膀胱内圧測定前日に、酢酸、あるいは、生理食塩水を膀胱内に30分間還流したモデルを用いた。猪苓湯混餌飼料で飼育したラットにおいて、酢酸に誘発される炎症にともなう1回排尿間隔時間、1回排尿量と膀胱容量の低下などの排尿筋過活動は、通常食で飼育したラットと比較して抑制される傾向があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

猪苓湯は日本で一般的な漢方薬である。今回、TRPチャンネルを障害すると思われる酢酸での障害モデルに対して、猪苓湯は軽減させる効果があることが示された。微小循環の改善を経由して発揮された効果と考えられ、組織内の虚血改善に寄与したと考えられる。微小循環障害は、下部尿路障害を理解するうえで、非常に重要な病理である。微小循環障害に起因するさまざまな病態（過活動膀胱や尿失禁）に対して、猪苓湯が有効である可能性が示唆され、また、実験系によりそれが評価できることも示されたので、今後の研究発展につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Choreito (CRT) is widely used for the treatment of overactive bladder (OAB) and other lower urinary tract symptoms in Japan. This study aimed to identify the effects and therapeutic mechanism of CRT on the improvement of detrusor overactivity (DO) using an experimental rat model. Sprague-Dawley rats were equally divided into three groups: intravesical saline instillation with normal food (normal group), intravesical acetic acid (AA) instillation with normal food (AA group), and intravesical AA instillation with CRT (AA with CRT group). Cystometric investigation and microcirculation was performed using a laser blood flowmeter. CRT attenuated decrease effect of AA about the bladder capacities. CRT might impart therapeutic effects on OAB via the mitigation of urothelial damage and regulation of excess blood flow.

研究分野：下部尿路機能

キーワード：下部尿路症状 微小循環 TRP チャンネル 漢方薬

1. 研究開始当初の背景

エイジングによる微小循環障害と膀胱機能

下部尿路症状(Lower urinary tract symptoms: LUTS)は、夜間頻尿などを呈して QOL を著しく低下させ、アンチエイジングの重要なテーマである。LUTS 治療の中心は薬物療法で、主に膀胱上皮に分布するアセチルコリンなどの受容体が治療ターゲットであるが十分ではない。一方、近年注目される LUTS の治療ターゲットとして、微小循環障害があげられる。微小循環障害は、生活習慣・エイジングに起因した微細な動脈の硬化や血流障害で、虚血により末梢神経等が障害されて LUTS の原因になる。近年では腸骨動脈閉塞やステロイドホルモンの投与など様々な実験動物モデルを用いた研究が報告され、臨床でも微小循環障害の観点から病態を理解する動きが広がっている。微小循環障害を改善させる前立腺肥大症の薬として、現在最も注目されているのは PDE5 阻害薬である。しかし私は PDE5 阻害薬だけが下部尿路の血流を制御できるとは考えていない。さらにいえば、微小循環障害に関わる化合物や受容体を広く研究をするべきである。そして、系統立てた微小循環障害の評価方法が確立していないことも問題である。微小循環障害とその治療に関して理解が深まれば、LUTS を含めた微小循環障害に起因するさまざまなエイジング関連の問題解決に大きく貢献できる。

Transient receptor potential(TRP)は、全身に存在する侵害受容体のファミリーで、温熱・浸透圧・酸素濃度など様々な刺激を感知する役割を持つ。発見されたのが 1990 年代に入ってからで、いくつかのサブタイプに分けられる。膀胱に発現する TRP では、TRPV1, TRPV2, TRPV4, TRPM4, TRPM8, TRPA1 が注目され、主に知覚神経路での研究が盛んである。事実我々も、TRPA1 と膀胱知覚神経の関連に関して報告をしている。(Minagawa T, et al. 2013) TRP には他にも多数の種類があり、血管内皮細胞には TRPC1,3-6, TRPM2,4,7, TRPV1,4 などが発現し、血流の制御において重要な役割を担っている。(Kwan HY, et al. 2007)しかし、残念なことに、膀胱の機能・血流、TRP との関連に関しての研究は皆無である。

当科での TRP チャンネルに関する研究

当科では、TRPM8 と冷ストレス・膀胱機能との関連について研究を行っている。(Lei Z, et al. 2013, Noguch W, et al. 2013) TRPM8 は低温で活性化する寒冷受容体で、寒冷刺激を受けて尿意を催す一つのメカニズムと考えられ、冷え症との関連も示唆される。我々の検討では TRPM8 は皮膚や膀胱などに分布しており、膀胱機能と低温環境との関係に関して興味深い結果を認めている。

2. 研究の目的

下部尿路症状(Lower urinary tract symptoms: LUTS)はアンチエイジングの重要なテーマである。近年、エイジング・動脈硬化などによる微小循環障害は虚血により神経障害を起こすとされ、LUTS の発症メカニズムとして注目されている。一方で、Transient receptor potential(TRP)チャンネルと呼ばれる侵害受容体のファミリーは、現在最も注目される LUTS の治療ターゲットである。尿路における TRP は下部尿路の上皮および神経終末に分布する。他方、TRP には、血管内皮にも分布するサブタイプが多数存在し、全身の微小循環の調節に寄与するものと考えられている。しかし、TRP と膀胱血流を併せて研究した報告は現在のところ皆無である。また、血流の観点からの測定法や虚血の動物モデルに定石とされるものがないのも問題である。一方、我々はすでに 2 つの微小循環障害動物モデルの作成に成功した。「冷えモデル」と「放射線性膀胱障害モデル」である。それぞれ急性の全身的微小循環障害と慢性の局所微小循環障害のモデルとして、LUTS の病態理解および薬剤の作用機序の解明に有用である。本研究では、神経・血流・体温の虚血性変化を一連の研究で解析し、多角的に微小循環障害による LUTS 発症のメカニズムを明らかにし、その背景となる TRP の役割を検討するものである。

3. 研究の方法

微小循環障害モデルを作成し、下部尿路への影響を評価する。さらに治療的介入を行って、その対策を立案する。第一の段階として、高血圧ラットを用いて冷え頻尿モデルを作成した。高血圧は慢性の末梢微小循環障害で、冷えにより誘発される頻尿は、神経反射と血管収縮による急性の循環障害である。高血圧ラットにおける冷ストレス頻尿が確認された。また、大建中湯は冷え・便秘に効能がある漢方薬である。大建中湯には血流増進効果、頻尿改善効果が報告されている。大建中湯を経口投与したラットと、コントロールのラットを比較し、冷ストレスに対する大建中湯の治療的役割の検討を行った。冷えに対し、大建中湯を与えたラットでは、頻尿の程度が弱く、免疫染色で TRPV1(頻尿に関わる TRP チャンネルのサブチャンネル)の発現が増加していた。今後、血流における役割を、レーザー測定装置を用いて評価を行う。また、第二の段階として炎症を介した微小循環障害の作成中である。酢酸を膀胱注入し、炎症・浮腫を誘発して血流障害を起こす。抗炎症作用のある薬剤の投与を行って、血流改善と頻尿改善の様子を調査する。炎症モデルは病気のあるラットではなく、SD 雌ラットを用いる。微小循環の様子を、レーザー血流装置を用いて、定性的かつ定量的に評価を行い、微小循環障害と下部尿路の関わりを明らかにする。

4. 研究成果

膀胱内圧測定

Normal 群との比較では、AA の投与により、1 回排尿間隔時間が短縮し、1 回排尿量の低下を認めた。AA with CRT では、それらの排尿筋過活動の所見が抑制された。(Figure 1, 2)

レーザー血流測定

酢酸の膀胱内灌流により、Normal 群に比べて AA 群での膀胱血流増多を認めた。一方、AA with CRT では、血流の増多が抑制された。(Figure 3)

組織学的検討・免疫組織学的検討

HE 染色での観察では、AA による炎症細胞の増多は明らかでなかったが、粘膜の浮腫を認めた。HIF1 α の発現に明らかな違いを認めなかった。

以上の結果より、AA の投与は排尿筋過活動のモデルとして妥当であると考えられる。また、AA の投与によって誘発された排尿筋過活動は、猪苓湯の投与により抑制された。排尿筋過活動の抑制として考えられるメカニズムは、AA により惹起された過剰な膀胱血流や浮腫を抑制することが考えられた。抗炎症作用と低酸素・虚血との関連は明らかでなかった。

FIGURE 1

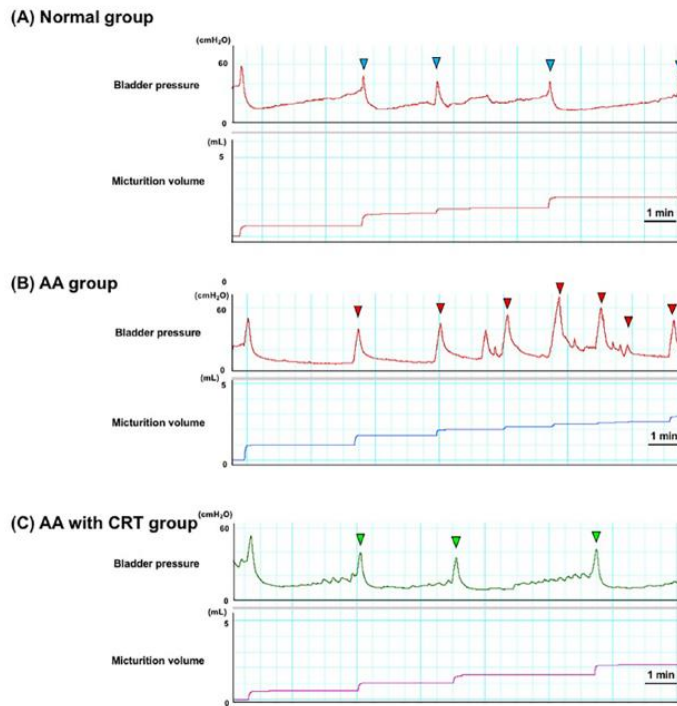


FIGURE 1 Cystometric investigation. Representative micturition charts of the (A) normal group, (B) AA group, and (C) AA with CRT group. Arrowheads indicate micturition. While the rats in the normal group did not show increased urinary frequency (blue arrowheads), those in the AA group exhibited increased urinary frequency with shorter voiding intervals and smaller micturition volumes (red arrowheads). This increase in urinary frequency was attenuated by CRT (green arrowheads). In each panel, the upper chart is bladder pressure and the bottom chart is micturition volume. AA, acetic acid; CRT, Choreito [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

FIGURE 2

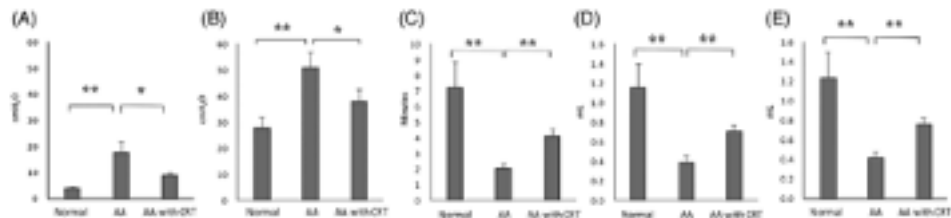


FIGURE 2 Summary of cystometric investigation results for (A) basal pressure (cmH₂O), (B) micturition pressure (cmH₂O), (C) voiding interval (minutes), (D) micturition volume (mL), and (E) bladder capacity (mL). AA, acetic acid; CRT, Choreito. **P* < .05; ***P* < .01 (Student unpaired *t* test)

FIGURE 3

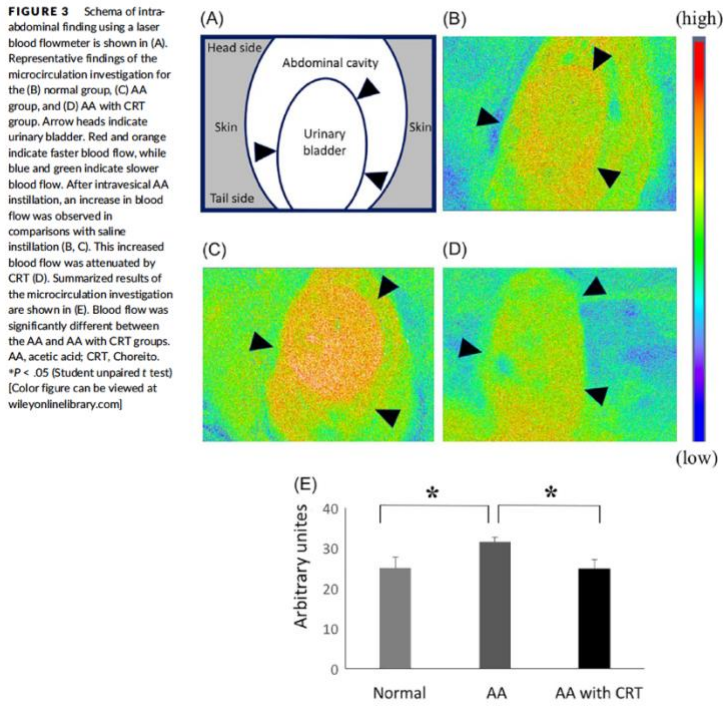


Figure 4

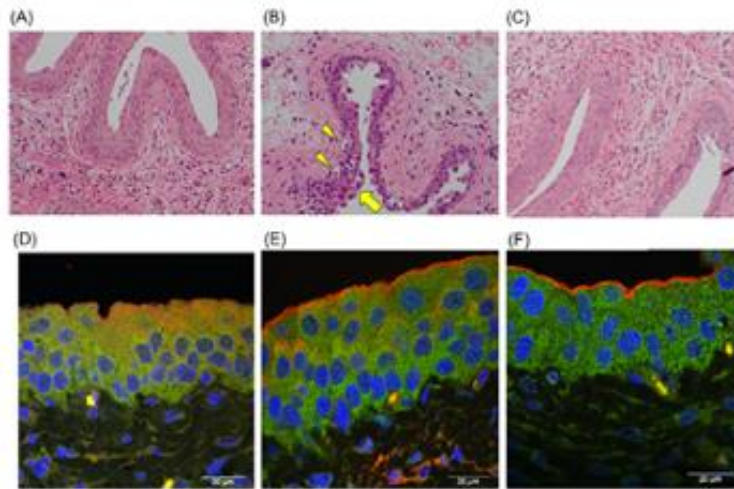


FIGURE 4 Representative histopathological findings of hematoxylin-eosin staining (200 \times). Compared with the (A) normal group, (B) AA group, and (C) AA with CRT group, the interstitium under the urothelium was more edematous in the (B) AA group, with vacuolization of urothelial cells (arrowheads) and detachment of the urothelium (arrow). Representative immunohistopathological findings of HIF1- α are shown for the (D) normal group, (E) AA group, and (F) AA with CRT group. No changes in the expression of HIF1- α (green) and UPIII (red) within the urothelium layers were detectable. Nuclei are stained blue. AA, acetic acid; CRT, Choreito; HIF1- α , hypoxia-inducible factor 1 α ; UPIII, uroplakin III [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|------------------------------|
| 1. 著者名 Ueno Manabu, Minagawa Tomonori, Saito Tetsuichi, Imamura Tetsuya, Nagai Takashi, Ogawa Teruyuki, Ishizuka Osamu | 4. 巻 ahead of print |
| 2. 論文標題 Therapeutic effects of Choreito, a traditional Japanese (Kampo) medicine, on detrusor overactivity induced by acetic acid in rats | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 LUTS: Lower Urinary Tract Symptoms | 6. 最初と最後の頁 ahead of print |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/luts.12302 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Imamura T, Shimamura M, Ogawa T, Minagawa T, Nagai T, Silwal Gautam S, Ishizuka O | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 Biofabricated Structures Reconstruct Functional Urinary Bladders in Radiation-Injured Rat Bladders | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Tissue Eng Part A | 6. 最初と最後の頁 1574-1587 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Minagawa T, Saitou T, Suzuki T, Domen T, Yokoyama H, Ishikawa M, Hirakata S, Nagai T, Nakazawa M, Ogawa T, Ishizuka O. | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 Impact of ao-dake-humi, Japanese traditional bamboo foot stimulator, on lower urinary tract symptoms, constipation and hypersensitivity to cold: a single-arm prospective pilot study | 5. 発行年 2016年 |
| 3. 雑誌名 BMC Complement Altern Med. | 6. 最初と最後の頁 513 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12906-016-1494-1 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Imamura T, Ogawa T, Minagawa T, Nagai T, Suzuki T, Saito T, Yokoyama H, Nakazawa M, Ishizuka O | 4. 巻 36 |
| 2. 論文標題 Combined treatment with a α_3 -adrenergic receptor agonist and a muscarinic receptor antagonist inhibits detrusor overactivity induced by cold stress in spontaneously hypertensive rats | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 NeuroUrol Urodyn | 6. 最初と最後の頁 1026-1033 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/nau.23061 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Minagawa T, Suzuki T, Domen T, Yokoyama H, Ishikawa M, Hirakata S, Nagai T, Nakazawa M, Ogawa T, Ishizuka O | 4. 巻 43 |
| 2. 論文標題 Modified sonourethrography assists urethral catheterization | 5. 発行年 2016年 |
| 3. 雑誌名 J Med Ultrason | 6. 最初と最後の頁 443-448 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10396-016-0699-8 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 永井崇 今村哲也 上野学 鈴木都史郎 齋藤徹一 皆川倫範 道面尚久 小川典之 竹田裕 小川輝之 石塚修 |
| 2. 発表標題 ニコチンは膀胱における尿路上皮の低酸素化とバリア機能の変化をもたらす頻尿をきたす |
| 3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 齋藤徹一、皆川倫範、今村哲也、永井崇、小川輝之、石塚修 |
| 2. 発表標題 Impact of Dai-ken-chu-tou on urinary frequency induced by cold stress in rats. American Urological Association. |
| 3. 学会等名 American Urological Association. 2017/5/13, Boston USA (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 永井崇、今村哲也、上野学、鈴木都史郎、齋藤徹一、皆川倫範、道面尚久、小川典之、竹田裕、小川輝之、石塚修 |
| 2. 発表標題 ニコチンは膀胱における尿路上皮の低酸素化とバリア機能の変化をもたらす頻尿をきたす |
| 3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 皆川倫範 |
| 2. 発表標題 信州大学における超音波検査～解剖・病態を理解し患者の安全を確保する～ |
| 3. 学会等名 第81回日本泌尿器科学会東部総会（招待講演） |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 皆川倫範 |
| 2. 発表標題 尿失禁治療における標準的保存療法とオプション～プロピペリン塩酸塩の新たな役割～ |
| 3. 学会等名 第23回日本排尿機能学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tomonori MINAGAWA, Momokazu GOTOH, Osamu YOKOYAMA, Kimio SUGAYA, Takashi KIKUCHI, Tomonori YAMANISHI, Kazuya KAWAHARA, Kanya KAGA, Emiko UNO, Kouichi YAMASHIRO, Osamu NISHIZAWA, and on behalf of the FRESH study group. |
| 2. 発表標題 Therapeutic effect of propiverine hydrochloride on mixed-type urinary incontinence in female. the Female Urgency and Stress Urinary Incontinence Study of Propiverine Hydrochloride (FRESH trial) |
| 3. 学会等名 Nagoya-Shinshu-Forum 2016（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Tomonori MINAGAWA, Tetsuichi SAITOU, Takahisa DOMEN, Hitoshi YOKOYAMA, Masakuni ISHIKAWA, Shiro HIRAKATA, Takashi NAGAI, Masaki NAKAZAWA, Teruyuki OGAWA, Osamu ISHIZUKA. |
| 2. 発表標題 Impact of ao-dake-humi, Japanese traditional bamboo foot stimulator, on lower urinary tract symptoms, constipation, and hypersensitivity to cold: a single-arm prospective pilot study |
| 3. 学会等名 International continence society, annual meeting 2016 |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Tomonori MINAGAWA, , Momokazu GOTOH, Osamu YOKOYAMA, Kimio SUGAYA, Takashi KIKUCHI, Tomonori YAMANISHI, Kazuya KAWAHARA, Kanya KAGA, Emiko UNO, Kouichi YAMASHIRO, Osamu NISHIZAWA, and on behalf of the FRESH study group |
| 2. 発表標題 Therapeutic effects of propiverine hydrochloride on mix-type urinary incontinence in female:a multicenter, single arm and open label study |
| 3. 学会等名 International continence society, annual meeting 2016 |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 皆川倫範、小川輝之、石塚修 |
| 2. 発表標題 青竹踏みの下部尿路症状・冷え・便秘・睡眠に及ぼす治療効果 |
| 3. 学会等名 第105回日本泌尿器科学会総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|