

令和元年6月3日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11044

研究課題名(和文) アクアポリンの尿路上皮発現と病態別尿路上皮の形態的機能的変化の解析

研究課題名(英文) The relation between expression of aquaporin within urothelium and change of morphology and function of urothelium in various diseases.

研究代表者

永井 崇 (Nagai, Takashi)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・助教

研究者番号：50514353

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)：高血圧や糖尿病が水チャネル(アクアポリン：AQP3)など尿路上皮の蛋白発現変化と尿路上皮の形態的变化、排尿機能へ及ぼす影響について検討した。両疾患ラットは対照群に比べ低酸素マーカー(HIF1a)の発現が尿路上皮において有意に高く、低酸素環境下にあった。これに伴いAQP3の発現が低下し、尿路上皮蛋白であるウロプラキン(UP)もSHRでは有意に低下していた。酢酸やATPによる膀胱刺激に対してSHRおよびGKラットは対照群に比べ有意に一回排尿量や排尿間隔の低下を認め頻尿となった。高血圧や糖尿病に伴う頻尿の要因の一つに尿路上皮の低酸素化による尿路上皮の蛋白発現、上皮機能の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高血圧や糖尿病などの生活習慣病がもたらす頻尿をはじめとした下部尿路症状について、尿路上皮の低酸素化に伴う形態的機能的変化が要因の一つになりうる事が分かった。下部尿路症状改善目的で神経系へ働きかける薬物治療が現在主に行われているが、微小組織循環の改善や尿路上皮へ働きかける治療など非神経因性の観点からの治療の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we determined if the changing of urothelial protein expression such as Aquaporin 3 (AQP3) and the histological change related with hypertension or diabetes mellitus within urothelium mediated bladder functions. The urothelium within hypertensive rats (SHRs) and diabetes rats (GKs) showed hypoxic environment compared to control rats. In addition, the expression levels of AQP3 and uroplakin (UP) in SHRs and GKs were lower than these in control rats. In SHRs and GKs, the storage functions, such as voiding interval and micturition volume were decreased by acetic acid and ATP solutions compared to control rats. Therefore, this study suggested that hypertension or diabetes mellitus might induce the hypoxic environment of urothelium, and morphological and functional changes of the urothelium might be one of the factors to effect on bladder storage functions.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：AQP3 HIF1a 下部尿路症状 尿路上皮

## 1. 研究開始当初の背景

尿意切迫感や頻尿、夜間頻尿、尿失禁などの蓄尿症状を訴える患者は多く、過活動膀胱という症状症候群の概念も広く認識されている。排尿に関しての QOL の観点から様々な治療薬も開発され、男女を問わず幅広く排尿に関しての治療がなされている。

神経を介した排尿生理の解明、臨床への応用は進んでいる一方、尿路上皮の働きについては未だ十分には解明されてはいない。膀胱の尿路上皮の主な役割の一つはバリア機能であり、この機能は特に尿路上皮の最表層に位置する umbrella cell 層とその表面の多糖層/細胞膜および細胞間の密着斑によるところが大きい。しかし近年、バリア機能の他にアクアポリン (aquaporin 水チャネル: AQP) を介して尿より水や低分子物質が組織内へと一部吸収され組織環境のホメオスタシスに関与したり、umbrella cell やその細胞膜などからは膀胱の伸展刺激などにより神経伝達物質が産生/放出され、神経や膀胱括約筋へ働きかけ蓄尿や排尿の調整に関与したりすることも報告されている。しかし尿路上皮の詳細な作用機序、各種病態による形態的/機能的変化は未だ十分には解明されていない。

## 2. 研究の目的

加齢に伴い発症が増える様々な病態が尿路上皮のホメオスタシスに変化をもたらすことが尿路上皮 (特に umbrella cell) の形態やアクアポリンなどの膜蛋白の発現に影響を与え、尿路上皮が原因の蓄尿障害をおこすという仮説を立て、高血圧及び糖尿病ラットを用いて以下の如く尿路上皮の形態的、機能的変化を解析した。

(実験1) Hematoxylin/Eosin (HE) 染色及び免疫組織染色を用いて尿路上皮の形態変化及び膜蛋白発現の解析をした。また病態変化が起こる原因の一つとして微小组織の低酸素化が起こっていることを仮定し低酸素マーカーである hypoxia inducible factor 1 (HIF1a) の発現についても免疫組織染色にて画像解析した。

(実験2) 尿路上皮の形態的变化が及ぼす機能的変化を解析するため膀胱内へ酢酸や ATP を灌流し排尿への影響を解析した。

(実験3) 血流障害をきたす因子の一つであるニコチンを投与したモデルを作成し、膀胱血流の変化が、尿路上皮の構造的変化や排尿機能変化を同様に起こすか確認した。

## 3. 研究の方法

(一般的な準備と方法)

用いたラットは1) spontaneous hypertensive rat (SHR) とその対照群となる Wistar Kyoto rat、2) Goto-Kakizaki rat (GK) とその対照群となる Wistar rat である。それぞれ10週齢雌性ラットを購入し、4週にわたって1)は8%食塩餌を与えて飼育、2)は高脂肪餌を与えて飼育した上で実験に用いた。また、ニコチン投与モデルラットについては10週齢雌性SDラットを用い、13日間にわたり、1日2回一回当たり2mg/kgのニコチン酒石酸塩を皮下投与し、投与終了翌日に各種実験を行った。なお対照群は溶媒である生食(PSS)のみを皮下投与した。各モデルにおいて膀胱内圧測定(CMG測定)実験を行い、終了後に全身麻酔下で膀胱を摘出し組織標本を作製して画像解析に用いた。

(実験 1: 病態モデルによる排尿機能の変化の評価)

膀胱内圧測定 (CMG) を行う 7 日前に膀胱頂部へ膀胱内圧測定用カテーテルを留置した。実験として前日に 0.08% 酢酸 (A.A) / 生理食塩液を 30 分間持続灌流し、翌日に無麻酔覚醒下にて CMG 測定を行った。実験として膀胱内へ生理食塩水 (PSS) 灌流による CMG 測定後、濃度の異なる ATP / 生理食塩液 (pH7.0) を灌流して CMG 測定を行い、その変化率を比較した。

(実験 2: 病態モデルによる尿路上皮の形態的变化及び膜蛋白発現変化の解析)

組織標本を HE 染色したほか、尿路上皮の蛋白発現変化を見るために Uroplakin (UP), Aquaporin 3 (AQP3) について免疫組織染色を行い、その発現を画像解析ソフト (Image Pro plus J) を用いて解析した。また、尿路上皮の低酸素化の状況について Hypoxia inducible factor 1 (HIF1a) の免疫組織染色を行い、同様に画像解析した。

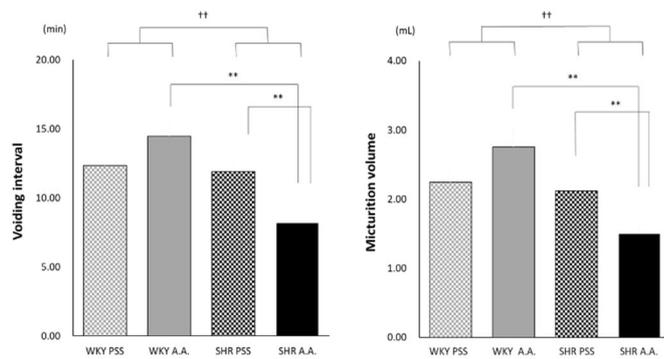
(実験 3: ニコチン投与モデルによる血流障害の評価と各病態モデルにおける尿路上皮の形態変化 / 機能変化との比較)

ニコチン投与モデルラットをセボフルラン吸入麻酔下に下腹部開創し、膀胱頸部の血流についてレーザー血流測定器 (オメガゾーン 2) を用いて測定した。また、実験 1 及び 2 を同様にを行い解析した。

4. 研究成果

(1) 排尿機能の評価

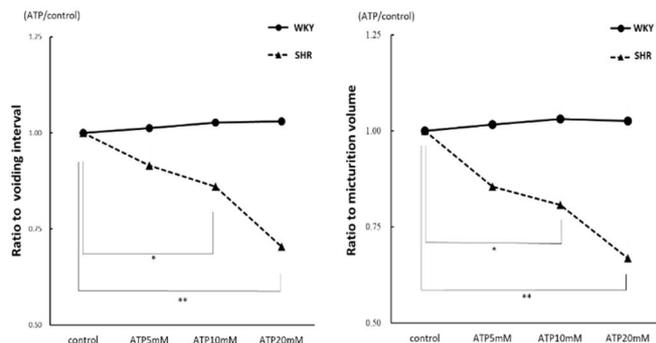
前日酢酸処理を行ったうえでの排尿機能変化をみると膀胱基底圧、排尿圧に有意な変化を認めなかった一方、SHR 群では対照群に比べて排尿間隔や一回排尿量の有意な低下を認めた (図 1)。GK 群と対照群ではいずれのパラメーターも有意な差を認めなかった。



(図 1) 高血圧ラットにおける酢酸灌流処理後の排尿変化 (排尿間隔、一回排尿量)

(Bonferroni test. \*\*; p < 0.01 Unpaired t-test. ††; P < 0.01)

ATP 膀胱灌流実験では膀胱基底圧、排尿圧に有意な変化を認めなかった一方、排尿間隔及び一回排尿量が SHR で対照群に比べて有意な低下をきたした (図 2)。GK 群と対照群ではいずれのパラメーターも有意な差を認めなかった。



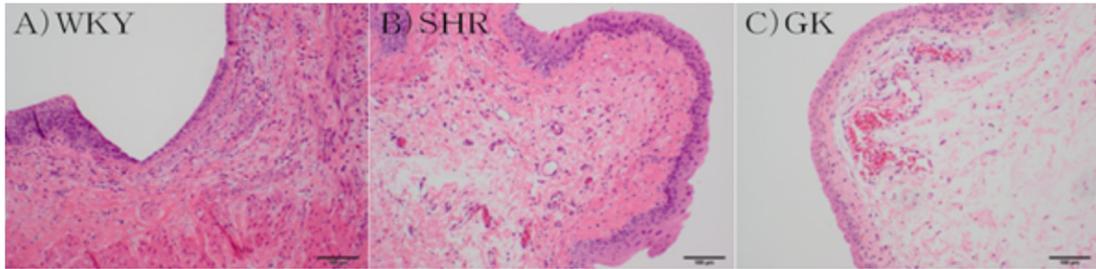
(図 2) 高血圧ラットにおける ATP 濃度と排尿変化

(排尿間隔、一回排尿量)

(Bonferroni test. \*; p < 0.05 \*\*; p < 0.01)

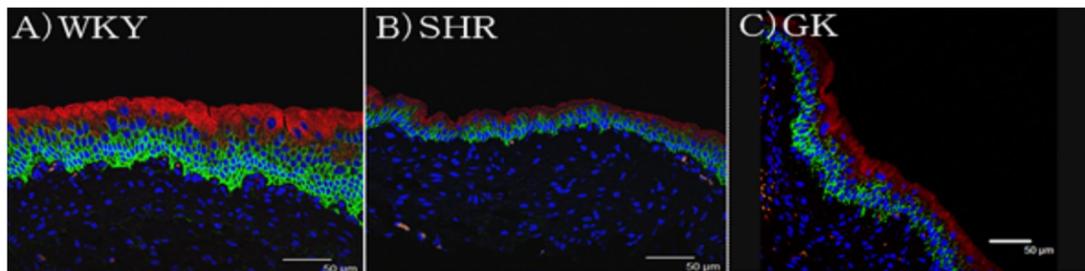
(2) 尿路上皮の形態的变化と膜蛋白発現変化の解析

HE染色では対照群に比べ高血圧ラット(SHR)や糖尿病ラット(GK)では粘膜下の結合織が粗となっていた(図3)。

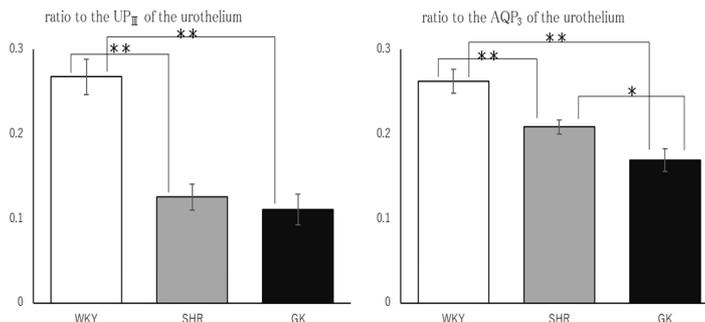


(図3) 各病態モデルの膀胱組織(HE): A)対照群 B)高血圧ラット群 C)糖尿病ラット群

尿路上皮のUP<sub>III</sub>やAQP<sub>3</sub>発現は対照群に比べSHR及びGKラットで有意に低下していた(図4A,B)。



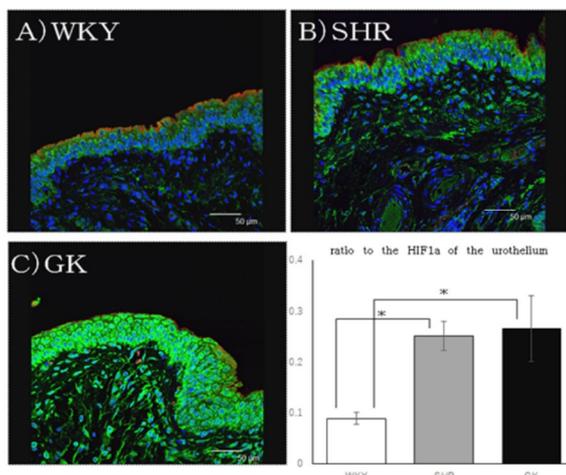
(図4A) UP<sub>III</sub>及びAQP<sub>3</sub>の免疫組織染色(赤;UP<sub>III</sub> 緑;AQP<sub>3</sub> 青;核)



(図4B) 尿路上皮におけるUP<sub>III</sub>及びAQP<sub>3</sub>の発現比率  
(Non repeated ANOVA;  $p < 0.01$  Student-Newman-Keuls test ; \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$ )

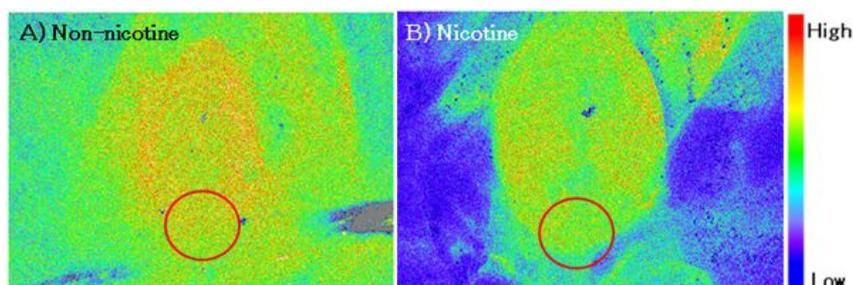
HIF1aの発現は対照群に比べてSHR、GK両ラット共に尿路上皮において有意に発現が高くなっていた(図5)。なお、膀胱排尿筋においてHIF1aの発現に有意差はなかった。

(図5) 尿路上皮におけるUP<sub>III</sub>及びHIF1aの免疫組織染色(赤;UP<sub>III</sub> 緑;AQP<sub>3</sub> 青;核)及び尿路上皮に対するHIF1aの発現比率(Non repeated ANOVA;  $p < 0.01$  Student-Newman-Keuls test ; \*  $p < 0.05$ )



(3) ニコチン投与による血流障害と形態学的/機能的変化の解析

膀胱頸部での血流を画像解析すると対照群に比べてニコチン投与群で有意に血流の低下を認め(図6)、尿路上皮におけるHIF1aの発現が有意に高まっていた。尿路上皮の蛋白発現変化及び酢酸、ATPを用いた排尿機能評価



(図6) 膀胱血流の様子 (○:膀胱頸部)

(膀胱頸部 The arbitrary units:

非ニコチン投与群  $30.7 \pm 0.5$ 、ニコチン投与群  $22.7 \pm 0.7$ )

では SHR 群でみられた傾向と同様に対照群に比べて尿路上皮における UP や AQP<sub>3</sub> 発現が有意に低下し、排尿間隔や一回排尿量が酢酸処理や ATP 灌流によって有意に低下した。

## 考察

尿路上皮において高血圧や糖尿病、ニコチン摂取により低酸素化をきたし尿路上皮における膜蛋白の発現低下が認められた。酢酸灌流処理や ATP 膀胱内灌流による排尿機能評価では高血圧モデルラット及びニコチン投与ラットで有意に一回排尿量や排尿間隔の低下を認めた。一方、糖尿病モデルラットでは ATP 灌流に対しては前者と同様の傾向を認めたが、酢酸灌流処理による有意な排尿変化は見られなかった。

## 結語

高血圧症や糖尿病、ニコチン摂取により、膀胱組織の低酸素化が尿路上皮において起こり、尿路上皮における蛋白発現の変化をきたした。高血圧症やニコチン摂取者では特に蓄尿障害の一因なりうることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 3 件)

- 1) Takashi Nagai, Tetsuya Imamura, Teruyuki Ogawa, Tomonori Minagawa, Takahisa Domen, Toshiro Suzuki, Manabu Ueno, and Osamu Ishizuka: Nicotine-induced hypoxia in rat urothelium deteriorates bladder storage functions. *Neurourol Urodyn.* In press (査読あり)
- 2) Imamura T, Shimamura M, Ogawa T, Minagawa T, Nagai T, Silwal Gautam S, Ishizuka O.: Biofabricated Structures Reconstruct Functional Urinary Bladders in Radiation-Injured Rat Bladders. *Tissue Eng Part A.* 2018 Nov;24(21-22):1574-1587. doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0533.(査読あり)
- 3) Imamura T, Ogawa T, Minagawa T, Nagai T, Suzuki T, Saito T, Yokoyama H, Nakazawa M, Ishizuka O.: Combined treatment with a  $\alpha_3$ -adrenergic receptor agonist and a muscarinic receptor antagonist inhibits detrusor overactivity induced by cold stress in spontaneously hypertensive rats. *Neurourol*

Urodyn. 2017 Apr;36(4):1026-1033. doi: 10.1002/nau.23061.(査読あり)

(学会発表)(計 5 件)

- 1) Takashi Nagai et al.; Effect of tadalafil on improving hypoxic environment of urothelium and on restoring bladder storage function in the nicotine-treated rat; Pan Pacific Continence Society annual meeting 2018
- 2) 永井 崇 他; ニコチン投与がもたらす膀胱血流低下は尿路上皮で、より低酸素化をきたし、機能的構造的影響を受ける; 第 25 回日本排尿機能学会総会 2018
- 3) 永井 崇 他; 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し頻尿をきたす; 第 106 回日本泌尿器科学会総会 2018
- 4) 永井 崇 他; Hypertension brings about the hypoxic change of the bladder urothelium and causes the histological change of bladder urothelium and suburothelial tissue.; 第 105 回日本泌尿器科学会総会 2017
- 5) Takashi Nagai et al.; The hypoxic environment decreases both aquaporin3 and uroplakin expressions and bladder storage functions in spontaneous hypertensive rats.; International Continence society annual meeting 2017

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 今村 哲也

ローマ字氏名: Imamura Tetsuya

所属研究機関名: 信州大学

部局名: 学術研究院医学系

職名: 助教

研究者番号(8桁): 00467143

研究分担者氏名: 石塚 修

ローマ字氏名: Ishizuka Osamu

所属研究機関名: 信州大学

部局名: 学術研究院医学系

職名: 教授

研究者番号(8桁): 20184541