

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	北 雅史
-------	----	----	------

学位論文題目

Effects of bladder outlet obstruction on properties of Ca²⁺ activated K⁺ channels in rat bladder
(膀胱出口部閉塞がラット膀胱の Ca²⁺感受性 K⁺チャンネルに与える影響)

共著者名

柚木 貴和、滝本 浩一、宮里 実、北 香、William C. de Groat、柿崎 秀宏、吉村 直樹

掲載雑誌

American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 298:
R1310-R1319, 2010

研究目的

前立腺肥大症は高齢男性において、排尿困難や残尿の増加、尿意切迫といった症状をもたらし、QOLを著しく低下させる疾患の一つである。その基本的な病態は、腫大した前立腺が引き起こす膀胱出口部閉塞により尿勢が低下し、排尿症状をきたすことであるが、このような状態が長期間継続すると、膀胱にも形態的および機能的变化が持続し、尿意切迫や頻尿といった蓄尿症状も出現する。Ca²⁺感受性K⁺チャンネルは6/7回膜貫通型のイオンチャンネルで、細胞内Ca²⁺濃度または細胞膜電位依存性に細胞内K⁺濃度を変化させ、興奮性細胞の細胞膜電位の安定性を保つのに重要な役割を果たしている。これらのチャンネルはそのコンダクタンスによりlarge (BK)、intermediate (IK)、small (SK) チャンネルの3つに分けられ、膀胱においてもBKチャンネル、SKチャンネルの発現の変化が膀胱平滑筋機能に影響を及ぼすことが知られている(1)。そこで、今回我々はラットを用いた膀胱出口部閉塞モデルを作製し、その膀胱平滑筋におけるBKチャンネル、SKチャンネルの変化を検討した。

材料・方法

1) 膀胱出口部閉塞 (BOO) モデル

雌のSprague Dawley ラットの尿道を部分的に結紮し、閉塞作製から6週間後に評価した。

2) 覚醒下膀胱内圧測定

膀胱頂部に細径のカテーテルを留置し、生理食塩水を注入しつつ覚醒下に膀胱内圧を測定した。BOOモデル群においては排尿を伴わない膀胱収縮 (non voiding contraction) の有無により高度BOO、中等度BOOの2群に分け、コントロール群とともに最大排尿筋圧、基礎圧などを測定した。同時に1回排尿量、残尿量を測定し、排尿効率を算出した。

3) real time RT-PCR

膀胱内圧測定後、膀胱を摘出し、total RNA を抽出して cDNA を作製した。BK チャネル α サブユニット、 β 1, 2, 4サブユニット、SK1, 2, 3チャネルの mRNA 発現量を real time RT-PCR により評価した。また各チャネルの膀胱内局在を観察するため、一部の B00 群では膀胱壁を粘膜、筋層にわけ、同様に RT-PCR を施行した。

4) 等尺張力実験

別の群のコントロールおよび B00 モデルラットの膀胱を摘出し、粘膜を切除した膀胱平滑筋条片を作製し、通気した 37°C の Krebs-Henseleit 液を満たしたオルガンバスに設置し、下記プロトコールに従い薬剤を投与して等尺張力を測定した。

i) 膀胱自発収縮の評価

安定した自発収縮を得るために Krebs-Henseleit 液の KCL 濃度を 20 mM とし、BK チャネル拮抗薬である iberiotoxin (IbTx)、charybdotoxin (CTx) を 10, 30, 100 nM で、SK チャネル拮抗薬である Apamin を 0.1, 1, 10, 100 nM で累積投与し、自発収縮の振幅と頻度を測定した。

ii) コリン作動薬による収縮の評価

ムスカリン作動薬の1つである carbachol を 10^{-8} ~ 3×10^{-4} の濃度で累積投与し、各濃度での最大収縮反応を測定した。その後、i)と同様の拮抗薬各々 100 nM を投与した後、再度 carbachol の累積投与を行い、拮抗薬投与前後の濃度反応曲線を比較し、最大収縮反応と EC50 の変化量を評価した。拮抗薬を投与しない群も評価し、これを time-matched control (TMC) とした。

成 績

1) 膀胱内圧の変化

最大排尿筋圧は高度および中等度 B00 群においてコントロール群より有意に高値を示したが、高度 B00 群では中等度 B00 群より有意に低値であった。コントロール群に比べ、高度 B00 群では膀胱容量は有意に増加し、排尿効率は有意に低下していた。

2) mRNA 発現量の変化

BK チャネル α サブユニットの発現は各群に差は認めなかった。コントロール群に比べ、高度および中等度 B00 群において β 1 サブユニットの発現は有意に増加し、 β 4 サブユニットの発現は有意に減少していた。SK チャネルでは、SK3 チャネルの発現が高度および中等度 B00 群において有意に増加していた。

平滑筋層と粘膜層を分離して評価した検討では、BK チャネル α 、 β 1、 β 4 サブユニット、SK2、SK3 チャネルが主に平滑筋層で発現していた。この検討では、B00 群において SK2 および SK3 チャネル発現の増加が認められたが、BK チャネル α 、 β 1、 β 4 サブユニットの発現に関しては全層標本の検討と同様の結果となった。

2) 平滑筋収縮機能の変化

自発収縮の振幅、頻度ともに各拮抗薬にて増加した。頻度の増加率は、コントロール群と B00 群で

差を認めなかったが、振幅の増加率は全ての拮抗薬投与において B00 群で有意に高値であった。各拮抗薬の投与により carbachol 収縮は増強され、最大収縮反応は増加する傾向にあった。その増加率を TMC と比べると、コントロール群では各拮抗薬で有意差を認めなかったが、B00 群では IbTx, CTx 投与により有意に増加した。また各拮抗薬の投与により EC50 も減少し、IbTx, CTx 投与によりコントロール群、B00 群とも TMC 群に比べ有意に減少したが、その減少率は B00 群の方が大きかった。

考 案

平滑筋細胞においては、細胞膜上の電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャンネルを介した細胞外 Ca^{2+} の流入や、細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出によってもたらされる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により筋収縮反応が惹起されるが、同時に Ca^{2+} 感受性 K^+ チャンネルを開口し、細胞膜電位を安定化させる方向に働く。BK チャンネルは pore を構成する α サブユニットと、その働きを修飾する β サブユニットから構成される。 $\beta 1$ サブユニットは BK チャンネルの α サブユニットの Ca^{2+} 感受性および電位依存性を上昇させることにより、BK チャンネルの作用に促進的に働くことが知られている (2)。一方 $\beta 4$ サブユニットは α サブユニットの電位依存性を低下させ反応速度を鈍化させることにより、BK チャンネルの作用に抑制的に働くことが知られている (3)。本研究では、6 週間の B00 により膀胱平滑筋における BK チャンネルの α サブユニットの発現に有意な変化は認められなかったが、 $\beta 1$ サブユニット発現は増加し、 $\beta 4$ サブユニット発現は低下した。この結果から、B00 に伴い BK チャンネルの機能としては促進的な方向に変化していたと考えられる。さらに SK チャンネルに関しても、主として膀胱平滑筋で発現を認めた SK2、SK3 チャンネルのうち、特に SK3 チャンネルにおいて B00 に伴う有意な発現の増加を認めた。

等尺張力実験の結果から、これらの Ca^{2+} 感受性 K^+ チャンネルは、平滑筋細胞の自発的な電気活動に伴う収縮のみならず、ムスカリン M3 レセプターを介した筋小胞体からの Ca^{2+} 流出によって活性化される平滑筋収縮にも関与し、拮抗薬を用いて Ca^{2+} 感受性 K^+ チャンネルを抑制することにより収縮反応が増強されることが示された。さらに B00 モデルの膀胱平滑筋では Ca^{2+} 感受性 K^+ チャンネルの作用が増強されており、RT-PCR の結果と統合すると、6 週間の B00 によりこれらのチャンネルの発現、機能は促進され、膀胱平滑筋細胞の興奮性を押さえる方向に働くことが示された。

B00 に伴う Ca^{2+} 感受性 K^+ チャンネルの発現と機能の促進は、臨床的には前立腺肥大症に伴う畜尿症状の発生を抑制する方向に作用する可能性がある半面、膀胱収縮力を低下させて排尿症状の増悪につながる可能性があることが示唆される。

結 論

長期間の尿道部分閉塞により、膀胱平滑筋における Ca^{2+} 感受性 K^+ チャンネルの発現および機能は増強され、平滑筋細胞の興奮性を抑制する方向に作用する可能性が示唆された。




引 用 文 献

1. Herrera GM, Pozo MJ, Zvara P, Petkov GV, Bond CT, Adelman JP, and Nelson MT. Urinary bladder instability induced by selective suppression of the murine small conductance calcium-activated potassium (SK3) channel. *J Physiol* 551: 893-903, 2003.
2. McManus OB, Helms LM, Pallanck L, Ganetzky B, Swanson R, and Leonard RJ. Functional role of the beta subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron* 14: 645-650, 1995.
3. Weiger TM, Holmqvist MH, Levitan IB, Clark FT, Sprague S, Huang WJ, Ge P, Wang C, Lawson D, Jurman ME, Glucksmann MA, Silos-Santiago I, DiStefano PS, and Curtis R. A novel nervous system beta subunit that downregulates human large conductance calcium-dependent potassium channels. *J Neurosci* 20: 3563-3570, 2000.

参 考 论 文

1. Numata A, Iwata T, Iuchi H, Taniguchi N, Kita M, Wada N, Kato Y, Kakizaki H. Micturition-suppressing region in the periaqueductal gray of the mesencephalon of the cat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:1996-2000. 2008
2. Furuta A, Kita M, Suzuki Y, Egawa S, Chancellor MB, de Groat WC, Yoshimura N. Association of overactive bladder and stress urinary incontinence in rats with pudendal nerve ligation injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: 1510-1516. 2008

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	北 雅 史
<p>審査委員長 <u>岩崎 寛</u> </p> <p>審査委員 <u>高井 章</u> </p> <p>審査委員 <u>谷口 隆彦</u> </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Effects of bladder outlet obstruction on properties of Ca²⁺ activated K⁺ channels in rat bladder (膀胱出口部閉塞がラット膀胱の Ca²⁺感受性 K⁺チャンネルに与える影響)</p>			
<p>本研究の目的は、Ca²⁺感受性 K⁺チャンネル (BK、SK チャンネル) は興奮性細胞の膜電位を安定化し、その興奮を抑制する方向へ働くことが知られており、これらのチャンネルの発現の増減が、膀胱機能に影響を及ぼすことが知られている。そこで長期の尿道部分閉塞 (BOO) が膀胱平滑筋細胞の BK、SK チャンネルの発現及び機能的変化に及ぼす影響を検討することである。</p> <p>方法として、メス、SD ラットを使用して、尿道部分閉塞術後 6 週間目に評価した。膀胱内圧測定 (CMG) 後、膀胱を採取し一部は全層のまま、一部は膀胱粘膜および筋層に分け RNA を抽出し real time RT-PCR を施行した。別の群では膀胱平滑筋条片を作成し自発収縮、およびカルバコールによるムスカリン受容体刺激に対する BK チャンネル拮抗薬、SK チャンネル拮抗薬の反応性を測定した。</p>			

結果：CMG 上排尿筋過活動を示す BOO ラットにおいては膀胱容量が増加し排尿効率が低下し非代償性の変化をきたしているものと思われた。これらのラットの膀胱において BK チャンネル $\beta 1$ サブユニットおよび SK 3 チャンネルの発現が増強しており、一方 $\beta 4$ サブユニットの発現は低下していた。BK チャンネル α サブユニットの発現は変化していなかった。これらのチャンネルおよびサブユニットの mRNA は主に筋層に発現していた。各種拮抗薬により膀胱自発収縮の振幅は増強されたが、その増加率は BOO ラットにおいてより大きかった。また BK チャンネル拮抗薬はカルバコール刺激による収縮をも増強し、その増加率は BOO ラットにおいてより大きかった。

次の結論が得られた。尿道部分閉塞モデルラットの膀胱平滑筋においては Ca^{2+} 感受性 K^+ チャンネルの働きは増強し平滑筋細胞の活動性を抑制する方向に働くと思われた。その結果、頻尿、尿意切迫感といった蓄尿症状には抑制的に働き、排尿困難、残尿の増加といった排尿症状には促進的に働いているものと考えられた。以上については *Am J Physiol Regul Integr Com Physiol* 298:R1310-R1319:2010 に掲載されている。また、各委員からの関連領域に関する質疑に対しても適切に返答しており学位（医学）に値する研究と判断した。