

KAKEN
2001
23

金沢大学

脳卒中後遺症としての尿失禁における橋排尿中 中枢シグナル伝達機構と遺伝子治療について

(12470331)

平成12年度～13年度科学研究費補助金（基盤研究（B）（2））研究成果報告書

平成14年（2002）3月

研究代表者 横山 修
（金沢大学・医学部附属病院・講師）

金沢大学附属図書館



8011-05265-9

著 者 寄 贈

はしがき

本書は平成12年度～13年度科学研究費補助金（基盤研究（B）（2）：課題番号12470331）による「脳卒中後遺症としての尿失禁における橋排尿中枢シグナル伝達機構と遺伝子治療について」の研究成果報告である。

老年人口（65歳以上）は現在総人口の15%を越え、2020年には26.9%に達すると報告されている。このような高齢化社会において老人の自立は重要な課題であるが、食事摂取および排尿の障害がしばしばその自立を妨げている。高齢者の排尿障害は患者自身のQOLの低下だけでなく、周囲の介護者の生活にも多大なる影響・弊害をもたらす。さらに脳梗塞などの神経疾患では尿路管理の良悪が生命予後にも関係してくる。脳血管障害に伴う尿失禁は、患者の社会復帰に向けての大きな障害となり、またこの時期の排尿管理は多額の医療費と多くのマンパワーを必要とするきわめて重大な問題である。しかしながら脳血管障害に伴う神経因性膀胱の本態の解明はこれまで全くなされておらず、現在行っている治療は満足のものではない。当施設ではこれまで世界に先駆けて頻尿・尿失禁の動物モデル（脳梗塞ラット）を考案し、その脳内メカニズムを生理学的・遺伝子的に検討してきた。これまでの一連の研究により、脳血管障害に伴い生ずる頻尿・尿失禁は記憶／学習に関与すると推測されている海馬の長期増強（long-term potentiation, LTP）に非常に類似していることが解明された。すなわち脳梗塞時脳幹部の橋排尿中枢では、興奮性神経伝達物質である glutamate の *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体開口に始まる一連のシグナル伝達と最終的には新たな mRNA と蛋白質の合成が必要と推測された。本研究では protein kinase A inhibitor によるシグナル伝達や核内遺伝子の転写が、どのように排尿反射亢進に関与し、*c-fos* や *zif268* などの神経可塑性関連遺伝子の発現が NMDA 受容体とどのようにリンクしているのかを検討した。また転写因子としての *c-fos* や *zif268* で制御される下流遺伝子、COX-2／nNOS が尿失禁遺伝子である可能性についても検討した。

なお、本研究の実施に際し、貴重な御示唆・御協力をいただいた金沢大学医学部泌尿器科教室の諸先生方、金沢大学大学院薬学研究科の諸先生方に深く謝意を表したい。

今後とも今回の研究で得られた結果をもとに、中枢性の神経障害に起因する神経因性

膀胱の成因解明、治療に関して研究を進めて行きたい。

平成14年3月

研究代表者 横山 修

研究組織

研究代表者： 横山 修（金沢大学・医学部附属病院・講師）
研究分担者： 並木幹夫（金沢大学・医学部・教授）
研究分担者： 小松和人（金沢大学・医学部附属病院・助手）
研究分担者： 中村靖夫（金沢大学・医学部附属病院・助手）

研究協力者： 平鍋恵理（金沢大学・大学院自然科学研究科医療薬学専攻）

研究経費

平成12年度	8,400 千円	間接経費	0 千円
平成13年度	3,000 千円	間接経費	0 千円
計	11,400 千円		

研究発表

(1) 学会誌等

1. Yokoyama O, Yoshiyama M, Namiki M, de Groat WC: Changes in dopaminergic and glutamatergic excitatory mechanisms of micturition reflex after middle cerebral artery occlusion in conscious rats. *Exp Neurol* 173: 129-135, 2002
2. Kodama K, Yokoyama O, Komatsu K, Namiki M: Contribution of cerebral nitric oxide to bladder overactivity following cerebral infarction in rats. *J Urol*, 167: 391-396, 2002
3. Yokoyama O, Ootsuka N, Komatsu K, Kodama K, Yotsuyanagi S, Niikura S, Nagasaka Y, Nakada Y, Kanie S, Namiki M: Forebrain muscarinic control of micturition reflex in rats. *Neuropharmacology*, 41: 629-638, 2001
4. Yotsuyanagi S, Yokoyama O, Komatsu K, Kodama K, Niikura S, Namiki M: Expression of neural plasticity-related genes in pontine tegmental area in rats with overactive bladder following cerebral infarction. *J Urol*, 166: 1148-1155, 2001
5. Yokoyama O, Yoshiyama M, Namiki M, de Groat WC: Interaction between dopaminergic and glutamatergic excitatory influences on lower urinary tract function in normal and cerebral infarcted rats. *Exp Neurol*, 169: 148-155, 2001.
6. Ishiura Y, Yoshiyama M, Yokoyama O, Namiki M, de Groat WC: Central muscarinic mechanisms regulating voiding in rats. *J Pharmacol Exp Therapeu*, 297: 933-939, 2001.
7. Nakada M, Yokoyama O, Komatsu K, Kodama K, Yotsuyanagi S, Niikura S, Nagasaka Y, Namiki M: Effects of aniracetam on bladder overactivity in rats with cerebral infarction. *J Pharmacol Exp Therapeu* 293: 921-926, 2000.
8. Yokoyama O, Yoshiyama M, Namiki M, deGroat W: Role of the forebrain in bladder overactivity following cerebral infarction in the rat. *Exp Neurol* 163: 469-476, 2000.
9. Yokoyama O, Komatsu K, Kodama K, Yotsuyanagi S, Niikura S, Namiki M: Diagnostic value of intravesical lidocaine for overactive bladder. *J Urol* 164: 340-343, 2000.
10. Kanie S, Yokoyama O, Komatsu K, Kodama K, Yotsuyanagi S, Niikura S, Nagasaka Y, Miyamoto K, Namiki M: GABAergic contribution to rat bladder hyperactivity following middle cerebral artery occlusion. *Am J Physiol*, 279: R1230-R1238, 2000.

(2) 口頭発表

1. Kodama K, Yokoyama O, Komatsu K, Namiki M: Contribution of cerebral nitric oxide to bladder overactivity following cerebral infarction in rats. The 95th Annual Meeting of the American Urological Association, Atlanta (May 4, 2000)
2. Yokoyama O, Kanie S, Komatsu K, Kodama K, Yotsuyanagi S, Niikura S, Nagasaka Y, Namiki M: GABA-ergic contribution to rat bladder overactivity following middle

cerebral artery occlusion. International Continence Society, 30th Annual Meeting, Tampere, Finland (August 28, 2000)

3. Komatsu K, Yokoyama O, Otsuka N, Kodama K, Yotsuyanagi S, Niikura S, Nagasaka Y, Namiki M: Central muscarinic mechanism of bladder overactivity associated with Alzheimer type senile dementia. International Continence Society, 30th Annual Meeting, Tampere, Finland (August 28, 2000)

4. Yokoyama O, Komatsu K, Kodama K, Yotsuyanagi S, Niikura S, Nagasaka Y, Namiki M: Influence of actinomycin D, a RNA synthesis inhibitor, on bladder overactivity induced by middle cerebral artery occlusion in the rat. 25th Congress of the Societe Internationale d'Urologie, Singapore(October 29, 2000)

5. Yokoyama O, Yoshiyama M, Namiki M, de Groat WC: Interaction between dopaminergic and glutamatergic excitatory influences on rat urinary bladder and urethral sphincter activity. 25th Congress of the Societe Internationale d'Urologie, Singapore(October 29, 2000)

6. Komatsu K, Yokoyama O, Kodama K, Namiki M: Transvaginal sling using vesica bone anchors and autologous fascia for the treatment of stress incontinence. 25th Congress of the Societe Internationale d'Urologie, Singapore(October 29, 2000)

7. Komatsu K, Yokoyama O, Namiki M: Endoscopic subureteral collagen injection for the treatment of vesicoureteral reflux in neurogenic bladder cases. 25th Congress of the Societe Internationale d'Urologie, Singapore(October 29, 2000)

8. Chuang YC, Fraser MO, Yu Y, Chancellor MB, de Groat WC, Yokoyama O, Yoshimura N: The role of bladder afferent pathways in the bladder hyperactivity induced by intravesical administration of nerve growth factor. 30th Annual Meeting, Society for Neuroscience, New Orleans (November 4, 2000)

9. Yokoyama O, Komatsu K, Yotsuyanagi S, Kodama K, Niikura S, Nagasaka Y, Namiki M: RNA synthesis in the pons is necessary for the maintenance of bladder overactivity following cerebral infarction. The 96th Annual Meeting of the American Urological Association, Anaheim (June 2, 2001)

10. Yotsuyanagi S, Yokoyama O, Komatsu K, Kodama K, Namiki M: Neural plasticity-related genes in pontine tegmental area in rats with overactive bladder following cerebral infarction. The 96th Annual Meeting of the American Urological Association, Anaheim (June 2, 2001)

11. Yokoyama O, Yoshiyama M, Namiki M, de Groat WC: Changes in dopaminergic and glutamatergic excitatory mechanisms of micturition reflex after middle cerebral artery occlusion in conscious rats. 2nd International Consultation on Incontinence, Paris (July 1, 2001)

12. Yokoyama O: Overactive bladder - experimental aspects-. The fifth Oslo Biennial Symposium on Lower Urinary Tract Physiology and Pathophysiology (November 9, 2001)

研究成果

1. 研究目的

脳梗塞ラットにみられる排尿反射の亢進は、グルタミン酸の NMDA 受容体が重要で、前脳から脳幹部橋に投射する抑制性入力の障害 (downregulation) と脳幹部に存在する促進制入力の upregulation が関与している。また、NMDA 受容体を脳梗塞前に遮断 (MK-801) すれば、排尿反射亢進を永続的に抑制できる。しかし AMPA/KA 受容体を遮断しても抑制できない。また、ウレタン麻酔下で脳梗塞を作成したり、プロスタグランジン E1 により脳内 cAMP を抑えると排尿反射亢進を発生時点から抑制可能であるという結果も得られた。これらの結果より、脳梗塞後の排尿反射亢進は、海馬における記憶、学習のメカニズムである長期増強 (long-term potentiation; LTP) と非常に似た現象であると思われる。

LTP との関連で注目されている protein kinase A (PKA) は、転写因子の 1 つである cAMP responsive element-binding protein (CREB) をリン酸化し、核内遺伝子の転写を促進するが、この酵素の阻害剤 (H89) はシグナル伝達を遮断し、排尿反射を抑制する可能性がある。また脳梗塞作成前に橋背外側被蓋に actinomycin D (ACD) を注入し DNA から RNA への転写を阻害すると排尿反射はどうか。fos family や zif268 といった神経可塑性関連遺伝子の発現、さらにはこれらの遺伝子によって制御される下流の遺伝子は何であろうか。

本研究では左内頸動脈をナイロン糸にて塞栓した脳梗塞ラットを作成し、H89 や ACD を用いたシグナル伝達の阻害、橋背外側被蓋での遺伝子発現およびその蛋白活性遮断により、脳梗塞後の排尿反射亢進のメカニズムを検討した。

2. 研究方法

2-1 使用動物

12 週齢の Sprague-Dawley 系雌性ラット (220~240 g) を日本 SLC (浜松) より購入、23~24℃ の恒温で 12 時間の明暗サイクルにて飼育した。

2-2 膀胱瘻作成

ラットを 1.5% halothane 吸入麻酔にて導入維持した。仰臥位にて下腹部を

正中切開した後、膀胱を露出して膀胱頂部に小切開を加えた。ポリエチレンカテーテルの膀胱側は加熱の上、襟を作成して膀胱内に挿入した。カテーテルの他端は皮下トンネルを経由し、ラット頸の背部切開創へ通した。膀胱瘻カテーテルを固定の上、膀胱切開部を縫合、皮膚切開部を閉創した。

2-3 膀胱内圧測定

膀胱内圧測定は、ラットが halothane 麻酔より覚醒していることを確認した上で行った。ラットをボールマンケージ 3 型（夏目製作所）内に覚醒下で拘束した。膀胱瘻先端に T 字管を連結の上、シリンジポンプ及び圧トランジェューサーにそれぞれ接続した。0.04 mL/min の注入速度で連続的に生理食塩水を膀胱内に注入し、膀胱収縮を誘発して経時的に膀胱内圧測定を行った。また、排尿ごとに排尿量を計測し、膀胱容量とした。注入量より排尿量の方が少ないときは残尿があるとみなし注入量を膀胱容量とした。

2-4 橋背外側被蓋への薬剤注入

1.5% halothane 麻酔下にて脳定位固定装置にラットの頭部を固定し、頭頂部皮膚を切開して頭蓋骨を露出した。Paxinos and Watson の脳地図に従い左右の橋背外側被蓋へ先細のカテーテルを刺入し、H89 (10 μ g/rat) および ACD (4 nmol/rat) の注入を行った。

2-5 静脈内薬物投与

本研究では、COX-2 阻害薬として、N-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]-methanesulfonamide (NS-398) を使用した。溶解希釈は、80% dimethylsulfoxide (DMSO) を使用した。内頸静脈を露出し、細径カテーテルを留置した。

2-6 左側中大脳動脈塞栓による脳梗塞の作成

1.0% halothane 麻酔下にて頸部正中切開後、左側総頸動脈を迷走神経から慎重に剥離した上で露出した。内頸および外頸動脈分岐点まで剥離し、外頸動脈を結紮後、双極性凝固器を用いて凝固切断した。さらに内頸動脈にそって末梢側を剥離し、翼突口蓋動脈を露出し 5-0 絹糸で結紮した。総頸動脈を 4-0 絹糸にて結紮切断後、内外頸動脈分岐部近傍に糸をかけ、血液の逆流を防ぐために杉田式クリップで内頸動脈の起始部をはさんだ。最後に、総頸動脈の内頸動脈分岐部近傍に切開を加え、4-0 monofilament nylon thread を挿入し、杉田式クリップをはずして外頸動脈分岐部から末梢側へ 17mm 挿入し留置した。なお血管壁の穿通防止および左側前大脳動脈からの血液遮断を目的として、4-

0 monofilament nylon thread の先端は加熱により鈍化させた。以上より、左側中大脳動脈領域の脳梗塞が作成された。なお、偽手術群として頸部正中切開し、外頸内頸動脈まで剥離した群を採用した。

2-7 橋背外側被蓋における c-fos、zif268 mRNA の測定

断頭屠殺にて摘出した脳の小脳と上丘の間を分けて、第四脳室に達する。その底部を形成する橋背外側部被蓋から 2×2 mm の脳切片を採取した。RNA を抽出し、Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA)への逆転写反応を行った。各種遺伝子に特異的なプライマーをラット cDNA sequence (GenBank)をもとに作製した。

デザインしたプライマーによる PCR の反応性をラット橋背外側被蓋 cDNA を鋳型として、通常のサーマルサイクラー (PC707-02; 株式会社アステック) を用いて、Polymerase chain reaction (PCR) を行った。Real-time quantitative PCR法は、二本鎖DNAに特異的に結合する蛍光色素SYBR Green 1 (Roche) を用いて PCR の増幅過程をリアルタイムにモニタリングすることによって、プラトー効果の見られない、指数対数増幅期でのデータをもとに Crossing Point 法によって定量、解析した。

3. 結果

3-1 H-89 の排尿反射に対する影響

protein kinase A の inhibitor である H-89 を直接橋背外側被蓋に microinjection し、この後脳梗塞を作成して膀胱内圧の動きを経時的に観察すると、排尿反射の亢進が最初から抑制される群と全く抑制されない群とに分けられた。相反する2群がみられたのは、梗塞という刺激によって排尿反射が亢進するメカニズムが完成するのに少々時間がかかり、その時点ですでに H-89 が washout されている可能性がある。そこで次に脳梗塞作成後 1、2 および 4 時間経過した時点で H-89 を microinjection して検討した。その結果、1 時間後ではやはり排尿反射の亢進が抑制されないラットが存在したが、2 時間後に microinjection した群ではそのほとんどが半永続的に排尿反射の亢進が抑制された。しかし、4 時間後では排尿反射亢進は抑制されなかった。

3-2 ACD の排尿反射に対する影響

脳梗塞作成直前に ACD を吻側部橋の背外側被蓋野に microinjection して DNA から mRNA への転写を阻害すると脳梗塞作成 4 時間後より排尿反射の亢進は抑制された。この結果は排尿反射亢進に本質的な、頻尿/尿失禁遺伝子ともいべき遺伝子が橋背外側被蓋に存在することを示唆している。

3-3 ACD による神経可塑性関連遺伝子の発現の変化

c-fos や zif268 といった神経可塑性関連遺伝子は吻側部橋の背外側被蓋において脳梗塞に伴い発現が増加するが、脳梗塞作成前に ACD を背外側被蓋に注入しておくとも発現の増加はみられないことが判明した。

3-4 脳梗塞に伴う COX-2 発現の変化

脳梗塞作成 1 時間後より橋背外側被蓋における COX-2 発現は有意に増加し、5 時間後まで持続していた。

3-5 脳梗塞前 COX-2 inhibitor 投与の排尿反射に対する影響

COX-2 inhibitor である NS398 を脳梗塞作成前に静脈内投与しておくとも脳梗塞作成して排尿反射は亢進しなかった。NS398 による効果には用量依存性が認められた。

4. 結論および今後の展望

ヒトが新たに習慣を獲得するという事は、脳に新たなシグナル経路が形成されたことを意味する。脳はこのように柔軟で経験に応じて機能が変化しうるが、この神経系の可変的な性質は可塑性 (plasticity) と呼ばれている。大脳皮質、海馬、小脳などの神経細胞では、シナプス活動に応じて、可塑的に変化することが知られている。神経活動によって、シナプスの伝達効率およびシナプスの形態学的変化が生じ、それが長期に持続することになる。その典型は海馬における長期増強 (LTP; long-term potentiation) として知られている。LTP は、初期相・中期相・後期相の 3 相に分けられることが報告されている。初期相は、NMDA 受容体の開口と Ca^{2+} の流入、中期相はタンパクのリン酸化、そして後期相は、新しいタンパク合成や遺伝子発現が必要と考えられている。つまり、神経活動によって、遺伝子発現・タンパク合成が活性化され、新たにできたタンパクが伝達効率の増強を長期に持続させていると考えられている。興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の NMDA 受容体をラットの脳梗塞作成前に遮断しておくとも、脳梗塞を作成しても排尿反射亢進は認められない。しかし、同じグルタミン酸の AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) /kinate 受容体を遮断しても排尿反射亢進は抑制できない。この研究成果から端を発し、脳梗塞の際の橋排尿中枢に起こるシナプス可塑性は、記憶、学習に関与すると推測されている LTP に非常に類似していることが解明された。

protein kinase A は転写因子の 1 つである cAMP responsive element-

binding protein (CREB)をリン酸化し、核内遺伝子の転写を促進する。この酵素の阻害剤 (H-89) を橋背外側被蓋に microinjection すると排尿反射を抑制することが可能であった。さらにこの抑制は脳梗塞後 2 時間の時点で 1 番効果的である。従って protein kinase A 依存性の反応が橋背外側被蓋において脳梗塞 2 時間以後に排尿反射の亢進をもたらし、脳梗塞 4 時間以後には作用していないことが明らかになった。LTP において、刺激の 3 ~ 5 時間後に始まるその後期相は、遺伝子転写や蛋白質合成への依存性、protein kinase A 依存性が知られているが、本研究で得られた protein kinase A に関する結果は、脳梗塞後にみられる排尿反射亢進が LTP と同様の機序で生じている可能性を示唆するものである。

actinomycin D を背外側被蓋野に microinjection して DNA から RNA への転写を阻害すると排尿反射の亢進は抑制されるという結果、さらに神経可塑性関連遺伝子の発現が抑制されるという結果は、排尿反射亢進に本質的な脳部位は吻側部橋の背外側被蓋野で、ここに頻尿/尿失禁遺伝子ともいべき遺伝子が存在することを意味している。その候補の 1 つとして COX-2 が挙げられると思われるが、COX-2 inhibitor が脳梗塞作成後でも排尿反射の抑制に有効か、あるいは COX-2 の下流に存在する遺伝子は何か、など今後検討すべき課題は多いと考えられる。