

マウス膀胱機能におけるムスカリン受容体の役割

— 覚醒下膀胱内圧測定における検討 —

学位論文内容の要旨

緒言：膀胱は交感神経および副交感神経の二重支配を受けている。蓄尿時、交感神経は noradrenaline を放出し β アドレナリン受容体を介して膀胱平滑筋を弛緩させる。一方、排尿時には副交感神経が acetylcholine と adenosine-triphosphate (ATP) を放出しそれぞれムスカリン受容体とプリン受容体を介して膀胱平滑筋を収縮させる。膀胱平滑筋にはムスカリン受容体のうちサブタイプ M_2 および M_3 が存在し、数のうえでは M_2 受容体が有意に多いが平滑筋収縮は主に M_3 受容体を介しておこされる。 M_3 受容体は G_q タンパクを介して phosphoinositide 系を活性化し、細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出を促し膀胱平滑筋を収縮させる。一方、 M_2 受容体は G_i および G_o タンパクを介して adenylyl cyclase 系を抑制し、細胞内 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) を減少させる。逆に β アドレナリン受容体は G_s タンパクを介して adenylyl cyclase 系を活性化し、細胞内 cAMP を増加させる。細胞内 cAMP の増加は最終的に膀胱平滑筋の弛緩を促すため、 M_2 受容体は膀胱平滑筋のトーンスを高める方向へ、 β アドレナリン受容体は膀胱平滑筋を弛緩させる方向へ働き、お互いに adenylyl cyclase 系を介して相反作用を有している。また、ATP はプリン受容体を介してイオンチャンネルを開口し脱分極を促し、L 型 Ca カルシウムチャンネルを開口させ、細胞外カルシウムの流入から膀胱平滑筋を収縮させる。ラットにおいては排尿収縮が二相性を示し、初期のプリン性収縮と後期のコリン性収縮によって構成されていることが *in vivo* でも報告されているが、排尿収縮におけるプリン性排尿収縮と β アドレナリン受容体の関係についての報告はない。さらに、臨床上前立腺肥大症に代表される下部尿路閉塞疾患の動物実験モデルとしてラットのモデルが広く用いられており、この部分的下部尿路閉塞 (Bladder outlet obstruction: BOO) モデルにおいて膀胱平滑筋のムスカリン受容体数が変化することが報告されている。しかし、マウスの BOO モデルにおいてはプリン性収縮やコリン性収縮に対する影響についての *in vivo* での報告はない。

本研究においては、特に M_2 受容体と β アドレナリン受容体の関係を評価することを目的とし、野生型 (WT) および M_2 受容体欠損マウス (M_2 KO) に対する β 作動薬の効果を覚醒下膀胱内圧測定にて検討した。加えて、部分的下部尿路閉塞がマウス膀胱機能におけるプリン性排尿収縮とコリン性排尿収縮に与える影響を評価することを目的に、BOO モデルマウスに対する抗コリン薬の効果を覚醒下膀胱内圧測定にて検討した。

方法：(実験1) M_2 受容体欠損 (M_2 KO) マウスおよび野生型 (WT) マウス (8 - 10 週齢、

雄性)に覚醒下膀胱内圧測定を施行し、 β 作動薬 isoproterenol 10, 100, 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 加算投与の膀胱機能に与える影響を比較検討した。また、atropine および $\alpha\beta$ -Methylene-Adenosine-triphosphate ($\alpha\beta$ -Me-ATP) に対する感受性から、二相性排尿収縮をプリン性初期排尿収縮とコリン性後期排尿収縮に区別し、それぞれに対する isoproterenol の排尿収縮圧抑制効果も比較検討した。

(実験2) 7週齢雌性マウスに部分的下部尿路閉塞作成 (BOO) もしくは偽手術 (SHAM) を施行した。5週間後に覚醒下膀胱内圧測定を行い、atropine 0.1, 1.0 mg/kg 加算投与の膀胱機能に与える影響を比較検討した。

結果：(実験1) 投薬前の覚醒下膀胱内圧測定結果では両群間に有意差がなかった。野生型においては排尿圧のみが、 M_2 受容体欠損マウスにおいては排尿圧、基礎圧、排尿閾値圧がそれぞれ isoproterenol 投与により低下した。両群間における isoproterenol 加算投与による効果の差は排尿圧および排尿閾値圧において認められ、 $M_2\text{KO}$ で isoproterenol の膀胱内圧抑制効果が増強していた。特に排尿圧については isoproterenol 100, 1000 mg/kg 皮下投与時それぞれにおいて、両群間に差を認めた (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$: WT 26.3 \pm 1.6 cmH_2O vs. $M_2\text{KO}$ 21.8 \pm 1.2 cmH_2O , $p<0.05$; 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$: WT 24.7 \pm 1.5 cmH_2O vs. $M_2\text{KO}$ 18.0 \pm 1.0 cmH_2O , $p<0.01$)。覚醒下膀胱内圧測定において排尿収縮は二相性を呈し、全てのマウスで atropine 1 mg/kg 皮下投与により後期排尿収縮は徐々に抑制され同定されなくなった。引き続き $\alpha\beta$ -Me-ATP 3 mg/kg を腹腔内投与したところ膀胱内圧の一過性上昇ののち排尿収縮は消失した。これによりマウスの二相性排尿収縮が初期のプリン性収縮と後期のコリン性収縮から構成されることが示された。WT および $M_2\text{KO}$ 各群において二相性排尿収縮が観察され、投薬前にはプリン性およびコリン性排尿収縮ともに両群間に差を認めなかった。両群ともに isoproterenol は初期のプリン性排尿収縮に影響を与えず、後期のコリン性排尿収縮を抑制していたが、その効果は $M_2\text{KO}$ で有意に増強した (isoproterenol 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$: WT 22.5 \pm 1.4 cmH_2O vs. $M_2\text{KO}$ 14.6 \pm 1.5 cmH_2O , $p<0.01$)

(実験2) 体重は両群間で差を認めなかったが、膀胱重量は BOO で約 1.8 倍に有意に増加した。投薬前の比較では、SHAM に対して BOO において排尿量の減少、残尿量の増加、膀胱容量の減少、排尿効率の低下が認められた。atropine 皮下投与により、両群において排尿圧の低下、排尿量の減少、残尿の増加膀胱容量の増加、排尿効率の低下が認められた。閉塞濃霧と atropine 加算投与の交互作用は残尿量、膀胱容量、排尿効率の3項目でのみ認められ、BOO において atropine の効果が増強していた。

結語：膀胱機能におけるムスカリン受容体の機能について覚醒下膀胱内圧測定にて検討した。 β 作動薬 isoproterenol のコリン性排尿収縮圧抑制効果はムスカリン M_2 受容体欠損マウスにおいて増強しており、adenylyl cyclase 系を介したムスカリン M_2 受容体と β アドレナリン受容体の相反作用は膀胱機能の調整に重要な役割を持っているものと考えられた。また、軽度な部分的下部尿路閉塞マウスにおいては、残尿量の増加、一回排尿量および膀胱容量の減少、排尿効率の低下が認められ、さらに残尿量、膀胱容量、排尿効率に対する atropine 感受性が亢進しており、コリン性排尿収縮の増強が下部尿路閉塞に対する代償作用として重要であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野々村 克 也
副 査 教 授 吉 岡 充 弘
副 査 教 授 佐々木 秀 直

学 位 論 文 題 名

マウス膀胱機能におけるムスカリン受容体の役割

— 覚醒下膀胱内圧測定における検討 —

学位論文のなかで、覚醒下膀胱内圧測定による検討において野生型と M_2 受容体欠損マウスのベースラインの膀胱機能に差がなく、 β 作動薬が排尿圧を低下させ、特にプリン性前期収縮には影響を与えずコリン性後期収縮を抑制していること、さらにその作用がムスカリン M_2 受容体欠損マウスで増強することが報告された。加えて下部尿路閉塞マウスにおいて尿排出機能の低下が認められ、atropine は下部尿路閉塞群および偽手術群の両者において尿排出機能を抑制すること、閉塞の有無と atropine 投与による交互作用が残尿量、膀胱容量、排尿効率において認められること、閉塞群において atropine の尿排出抑制効果が増強していることが報告された。

質疑応答では、副査の吉岡充弘教授から M_2 受容体欠損マウスの特徴・下部尿路閉塞モデルで予想される変化、ヒトにおける排尿収縮波形の評価、部分的下部尿路閉塞モデルにおける代償機能としてのコリン性収縮増強の機序に関して質問された。これに対して申請者は、 M_2 受容体ホモ欠損マウスで実験を行っていること、ムスカリン受容体サブタイプ別の欠損マウスはいずれも生存可能であること、 M_2 受容体欠損マウスの下部尿路閉塞モデルでは膀胱重量の増加や一回排尿量、残尿量の増加など野生型とは異なった結果が予備実験では得られつつあること、マウスで評価可能な二相性排尿収縮はヒトでの評価は難しいこと、下部尿路閉塞モデルではムスカリン受容体サブタイプの構成比率にも変化が認められることが回答された。また、副査の佐々木秀直教授からは排尿収縮における ATP、ACh の寄与、薬物投与濃度について質問された。副交感神経末端からは排尿時に ATP および ACh がともに放出され膀胱平滑筋に作用すること、ATP および ACh を介したシグナル伝達のなかで特に M_3 受容体を介したイノシトール三リン酸系での ACh の作用が膀胱平滑筋収縮に重要であること、薬物投与濃度は比較的高めで臨床量としては多めであることが回答された。次いで主査の野々村克也教授より臨床上過活動膀胱に有用な薬物療法について質問され、尿排出抑制の副作用が少ないと考えられている β 作動薬の治験が現在進行中であること、最近相次いでサブタイプ選択性や組織移行性に違いのある抗コリン薬が臨床応用されていること、その効果の違いについては今後検討を要することが回答された。最後に改めて主査の野々村克也教授より下部尿路閉塞モデルにおける代償作用としてコリン性排尿収縮の増強が認められる点について、閉塞強度および測定条件、投薬条件等の問題を解決し、 M_2 受容体欠損マウスでの下部尿路閉塞モデルの研究を進めていくことが望まれるとのコメントで終了した。

この論文は、いままで完全なサブタイプ選択性のある抗コリン薬がなかったため難しかった膀胱機能における排尿時のムスカリン M₂ 受容体の役割を *in vivo* で評価している点、下部尿路閉塞モデルで基本的な排尿収縮構成要素であるコリン収縮圧の代償増強を確認している点等で高く評価され、今後疾患モデルへの応用や得られた知見に基づいた臨床治療薬開発などの発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。