ボンベシン 3 型受容体欠損マウスの膀胱・前立腺における 自律神経受容体機能の変化

東邦大学 医学部 泌尿器科学講座

上 村 修 一, 中 島 耕 一, 小 林 秀 行, 原 啓
森 田 隆, 石 井 延 久

FUNCTIONAL CHANGES IN THE AUTONOMIC RECEPTORS DISTRIBUTED IN SMOOTH MUSCLE OF THE URINARY BLADDER AND PROSTATE OF THE BOMBESIN RECEPTOR TYPE 3 KNOCKOUT MICE

Department of Urology, Toho University School of Medicine

Shuichi KAMIMURA, Koichi NAKAJIMA, Hideyuki KOBAYASHI, Hiroshi HARA,
Takashi MORITA and Nobuhisa ISHII

(受付日 平成 22 年 2 月 26 日 : 受理日 平成 22 年 5 月 26 日)

Urinary symptoms such as urinary urgency and dysuria, which are commonly found in patients with prostatic hyper-trophy, are also associated with the development of diabetes mellitus. Mice which lack the expression of bombesin type-3 receptors (BRS-3 deficient mice) are known to develop obesity, hypertension or hyperinsulinemia, similar to that seen in patients suffering from diabetes mellitus. Experiments were carried out to investigate the possible alteration of the mechanical properties of smooth muscle of the urinary bladder and prostate in response to stimulation of muscarinic and adrenergic receptors, in BRS-3 deficient mice, in comparison to the results obtained in similar preparations from wild type mice. In isolated smooth muscle preparations from the urinary bladder, the amplitude of contractions produced by carbachol and the relaxation induced by isoproterenol in preparations pre-constricted with carbachol were significantly larger in BRS-3 deficient mice compared to wild type mice, although there was no significant difference in the tension developed by high-potassium (high-K) solutions between BRS-3 deficient and wild type mice. In smooth muscle preparations isolated from the prostate, the amplitude of contraction produced by phenylephrine was not significantly different between BRS-3 deficit and wild type mice. Experiments using RT-PCR methods revealed that the expression of muscarinic M2 and M3 receptors in the urinary bladder tended to increase in BSR-3 deficient mice in comparison with wild type mice. These results suggested that urinary symptoms developed during diabetes mellitus may have a causal relation to the dysfunction of autonomic receptors distributed in smooth muscle of the urinary bladder but not in the prostate.

Key word : bombesin receptor 3 knockout mouse, diabetes mellitus, urinary urgency, smooth muscle, autonomic receptor

上村 修一
東邦大学医学部泌尿器科学講座
〒143-8541 東京都大田区大森西 6-11-1
電話 : 03-3762-4151 内線 6695 E-メール : hachi046@yahoo.co.jp

Correspondence to : Dr. Shuichi Kamimura, Department of Urology, Toho University School of Medicine, 6-11-1 Omori-nishi, Ota-ku, Tokyo 143-8541, Japan
Phone : 03-3762-4151 (ext. 6695)

はじめに

糖尿病による排尿障害は、糖尿病の経過により病型が種々に変化することが知られている（大橋，2000；佐藤，2001）。初めは、知覚神経が障害されるため尿意が減弱し、排尿回数が減少し1回排尿量が増加する。この段階では膀胱排尿筋の収縮力は保たれているので、残尿無く膀胱の尿を排出できるが、神経障害が更に進行すると、重度の前立腺肥大症のように膀胱が過伸展となって収縮力が低下し残尿が出現するようになる。神経障害の末期には膀胱収縮が不能となり、多量の残尿のため溢流性尿失禁や腎機能障害が起こる（市野ら，2008）。

しかし、糖尿病患者においてはそのような典型的な症状ばかりではなく、尿意切迫のような過活動膀胱や排尿時に括約筋の弛緩が見られない排尿筋括約筋協調不全など様々な異常が認められる事も報告されるようになり（榊原ら，2008），2型糖尿病においてはそれらの排尿異常が特に高頻度に起こる事も知られるように

なった（Kebapci *et al.*, 2007）。

ボンベシン受容体サブタイプ3（bombesin receptor subtype-3：BRS-3）欠損マウスは肥満、高血圧、高インスリン血症などを呈し（Ohki-Hanazaki *et al.*, 1997），糖負荷試験によって高血糖や高インスリン血症が誘発され、インスリン負荷試験では血糖値の降下が減弱することが報告されている（和田ら，2003）。そこで、BSR-3 欠損マウスは2型糖尿病モデルとして使えるのではないかと考えた。

排尿は副交感の骨盤神経により膀胱のムスカリン様受容体が刺激されて起こり、一方、尿道や前立腺平滑筋の収縮は交感神経受容体の刺激によって惹起される（森田，2002）。そこで、2型糖尿病における排尿障害に自律神経受容体がどのように関与しているかを検討するため、月齢14-16ヶ月のBRS-3欠損マウスを用いて、下部尿路（膀胱・前立腺）の平滑筋の自律神経受容体の機能的変化を調べた。

実験方法

実験には月齢14-16カ月のBRS-3欠損マウス（以下KOと略す）8匹および同様の月齢の正常（Wild）マウス（以下Wと略す）10匹を使用した。エーテル麻酔下に頸椎を捻転し、体重を測定し、血糖値および血中レプチン値を測定するため採血した後、膀胱・前立腺を摘出した。これらの実験は東邦大学実験動物倫理規定に基づいて行った。

膀胱組織より平滑筋切片（長さ10 mm，幅3 mm），前立腺組織より平滑筋切片（長さ5 mm，幅3 mm）を作成し、95%O₂+5%CO₂を通気した37°C Krebs液（NaCl 133 mM，KCl 5.7 mM，CaCl₂ 2.5 mM，NaHPO₄ 1.4 mM，MgCl₂ 1.2 mM，NaHCO₃ 21.4 mM，Glucose 11.5 mM）を満たした20 mlの恒温槽内に懸垂固定し、張力変換器（T7-8-240，Orientic社製）を介して張力変化を等尺性に測定し、ポリグラフ（RECTI-HORIZ8K，三栄社）を用いて記録し、さらにコンピューターに収録し（chart 3,6 software，

MacLab），後の解析に用いた。収縮張力の記録においては静止張力を0.5 gとし、安定するまで放置した後に実験を開始し、実験開始後はKrebs液を15分毎に交換した。高K⁺液（[K⁺]_o：20~100 mM）はNaClとKClを種々入れ替えることにより作成した。

前立腺平滑筋においては、高K⁺液とphenylephrine（10⁻⁷~10⁻⁴ M）により誘発される収縮反応、およびα1A受容体阻害薬であるWB-4101（10⁻⁷ M）存在下におけるphenylephrine（10⁻⁶~10⁻⁴ M）により誘発される収縮反応を測定した。

膀胱平滑筋においては、高K⁺液およびcarbachol（10⁻⁸~10⁻⁵ M）により誘発される収縮反応を測定した。また、carbachol（3×10⁻⁶ M）により収縮させた筋におけるisopreterenolによる弛緩反応を測定した。用いた薬物は全てSigma社製（St. Louis, USA）のものを用いた。

収縮実験に使用した組織と同時に採取した膀

膀胱平滑筋組織におけるムスカリン受容体 (M2, M3) の発現量を, RT-PCR 法によって確認した. ムスカリン受容体 (M2) に対するプライマーは 5'-TGG CTA TCCTGT TGG CTT TC-3' 及び 5'-GCA GGG TTGATGGTG GTG CTA TT-3' を使用した. ムスカリン受容体 (M3) に対するプライマーは 5'-CCT TGA TGAGCG ACA TCC TT-3' 及び 5'-CAC AGC CAAGAC CTC TGA CA-3' を使用した. 対照には G3PDH を

結

月齢 14-16 カ月の正常マウス (W) と BRS-3 欠損マウス (KO) の体重, 血糖値, レプチン値の結果を Table 1 に示す. BRS-3 欠損マウスは正常マウスと比較して有意に体重が低く, また血糖値とレプチン値は高かった.

前立腺平滑筋の phenylephrin および高 K^+ 液 ($[K^+]_o$: 20~100 mM) に対する収縮力は, BRS-3 欠損マウス (KO) と正常マウス (W) とほぼ同じで, 両者の間に有意差は認められなかった (Fig. 1, Fig. 2). また, 前立腺平滑筋の phenylephrin による収縮に対する $\alpha 1A$ 受容体阻害薬 WB4101 の収縮力抑制効果も, BRS-3 欠損マウス (KO) と正常マウス (W) の間で有意差は認められなかった (Fig. 3).

Carbachol により誘発される膀胱平滑筋の収縮張力は BRS-3 欠損マウス (KO) の方が正常マウス (W) より有意に大きかった (Fig. 4). 一方, 高 K^+ 液により誘発される平滑筋の収縮張力には, BRS-3 欠損マウス (KO) と正常マウス (W) には有意差が見られなかった (Fig. 5). また, carbachol (3×10^{-6} M) によって収縮さ

Table 1. Physical properties of experimental animals in Wild type (W) and BRS-3 deficit mice (KO). Mean $\pm$ S.E.M. are shown (n =number of observations). *, $P < 0.05$

	Wild type (W) ($n=10$)	BRS-3 欠損 (KO) ($n=8$)
体重 (g)	37.2 ± 1.4	34.7 ± 1.5 *
血糖 (mg/dl)	208 ± 25	230 ± 25 *
レプチン (ng/ml)	4.6 ± 1.6	4.9 ± 1.1 *

使用した. G3PDH に対するプライマーは 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' 及び 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3' を使用した.

実験終了後, 組織切片の重量を測定し, 収縮力 (tension) は組織切片重量 (g tissue) あたりの張力 (g) として表示した. 結果は平均値標準誤差 (means $\pm$ S.E.M) で示し, t 検定を行い $P < 0.05$ を有意差ありと判断した.

果

せた膀胱平滑筋に isoproterenol を投与して惹起される弛緩反応は, BRS-3 欠損マウス (KO) の方が正常マウス (W) より有意に大きかった (Fig. 6).

Fig. 1. Phenylephrine-induced contractions produced in prostate smooth muscles. Amplitude of contractions produced by phenylephrine (10^{-7} - 10^{-4} M) is shown by the mean $\pm$ S.E.M. Filled squares, wild type mice; filled diamonds, BRS-3 deficit mice.

Fig. 2. KCl-induced contractions produced in prostate smooth muscles. Amplitude of contractions produced by high KCl solutions (10-100 mM) is shown by the mean $\pm$ S.E.M. Filled squares, wild type mice; filled diamonds, BRS-3 deficit mice.

Fig. 3. Phenylephrine-induced contraction of prostate smooth muscles produced in the presence of $\alpha 1$ -adrenoceptor antagonist. Amplitude of contractions produced by phenylephrine (10^{-6} - 10^{-4} M) is shown by the mean $\pm$ S.E.M. Filled squares, wild type mice ; filled diamonds, BRS-3 deficit mice. WB4101 (10^{-7} M) was present throughout.

Fig. 4. Carbachol-induced contractions of urinary bladder smooth muscles. Amplitude of contractions produced by carbachol (10^{-8} - 10^{-5} M) is shown by the mean $\pm$ S.E.M. Filled squares, wild type mice ; filled diamonds, BRS-3 deficit mice. *, $P < 0.05$

Fig. 5. High-K-induced contractions of urinary bladder smooth muscles. Amplitude of contractions produced by high-K solutions (10-100 mM) is shown by the mean $\pm$ S.E.M. Filled squares, wild type mice ; filled diamonds, BRS-3 deficit mice.

Fig. 6. Isoproterenol-induced relaxations of urinary bladder smooth muscles. Bladder smooth muscles were pre-contracted with 3×10^{-6} M carbachol, and isoproterenol (10^{-7} - 10^{-5} M) was added cumulatively. The amplitude of relaxation produced by isoproterenol was measured as relative to the amplitude of carbachol-induced contraction (mean $\pm$ S.E.M.). Filled squares, wild type mice ; filled diamonds, BRS-3 deficit mice. *, $P < 0.05$

RT-PCR 法によりムスカリン様受容体 M2, M3 の遺伝子発現量を測定すると, 正常マウス

(W) と比較して BRS-3 欠損マウス (KO) の方がより強い発現傾向を示した (Fig. 7).

考

高 K^+ 液により惹起される膀胱平滑筋の収縮張力には BRS-3 欠損マウスと正常マウスにおいて差が無かったのに対し, carbachol により惹起される膀胱平滑筋の収縮張力には BRS-3 欠損マウスの方が有意に大きかった事は, BRS-3 欠損マウス膀胱においてはムスカリン様受容体の機能が有意に亢進していること

察

を示唆している. そして, BRS-3 欠損マウス膀胱において M2 受容体と M3 受容体の遺伝子発現量が多い傾向が観察された事は, ムスカリン様受容体を介する膀胱平滑筋の収縮亢進が受容体量の増加に起因する事を示唆していると考えた. また, isoproterenol により惹起される弛緩反応が BRS-3 欠損マウス膀胱平滑筋におい

Fig. 7. Muscarinic M2 and M3 receptors PCR products from urinary bladder smooth muscle. Agarose gel showing amplicons obtained from the urinary bladder smooth muscles. PCR products for muscarinic M2 and M3 receptors in wild type (W) and BRS-3 deficient mice (KO).

て有意に大きかった事は、BRS-3 欠損マウス膀胱平滑筋においては β 受容体の機能亢進も起きていることを推測させた。それに対して、phenylephrine により惹起される前立腺平滑筋の収縮張力には BRS-3 欠損マウスと正常マウスで有意差が認められなかったので、糖尿病は前立腺平滑筋の受容体機能に対してはほとんど影響しないと考えた。

尿は腎臓で作られ尿管蠕動で能動的に膀胱に運ばれ、膀胱に一定量の尿が溜まると排出される。従って、膀胱は尿の貯留（蓄尿）と尿の排出（排尿）といった相反する機能を併せ持っている。蓄尿は、胸腰交感神経核からの遠心性刺激が下腹神経を経由し、 β 作用により膀胱が弛緩する事によって起こり、排尿は、骨盤神経にあるコリン作動性神経の興奮によって膀胱平滑筋のムスカリン様受容体が刺激されることによって生じる。膀胱平滑筋に分布するムスカリン様受容体のサブタイプはヒトやマウスでは M2 受容体と M3 受容体が主に関与していると報告されており (Eglen *et al.*, 1996), M3 受容体活性化は電位依存性カルシウムチャネルを介するカルシウムイオン流入の促進とミオシンのカルシウム感受性増加により平滑筋の収縮を増強し (Hegde, 2006), また M2 受容体活性化は β 受容体に連関したアデニレートシクラーゼの抑制 (Hedge, 2006) やカリウムチャネル開口を阻害して筋収縮亢進に働く (Felder, 1995; 宍戸ら, 1996; Nakamura *et al.*, 2002). Kim ら

(2008) は、ラットの膀胱頸部を狭窄させて過活動膀胱症状を発生させると、膀胱平滑筋の M2 および M3 受容体発現が増加する事を報告している。したがって、本実験で認められた BRS-3 欠損マウスにおける M2・M3 受容体の発現量増大は、2 型糖尿病で時に起こる過活動膀胱の症状を説明する根拠になると考えて良いと思われる。

これまで、糖尿病による排尿障害は初めに知覚神経が障害される事によって尿意が現弱あるいは消失するために、1 回排尿量が増える事によって排尿回数が減少し、さらに糖尿病が進行すると残尿が増加し 1 回排尿量が減少するため頻尿となると言われてきたが、最近、2 型糖尿病においては、これまで言われてきた典型的な症状ばかりでなく、尿意切迫のような過活動膀胱や排尿時に括約筋の弛緩が見られない排尿筋括約筋協調不全など様々な異常が高頻度に認められる事が報告されるようになり (Kebapc *et al.*, 2007), 本実験において、それらの症状には M2 受容体および M3 受容体の発現増加が関与する事が示された。一方、臨床的には 2 型糖尿病の末期になると残尿が多くなって膀胱収縮力は低下する事が知られている (Hill *et al.*, 2008). 本実験の結果からはその理由を説明できないが、インスリンの効果が低下している糖尿病では筋における蛋白合成が低下するため、膀胱平滑筋の収縮力増強にも一定の限界があるのではないかとと思われる。

また、本実験において α 受容体を介する前立腺平滑筋の収縮がBRS-3欠損マウスと正常マウスにおいて有意差が認められなかったので、糖尿病患者において見られる前立腺肥大症類似の排尿障害には、前立腺肥大症に見られるような α 受容体を介する前立腺平滑筋の収縮張力の増加は関与していないと考えて差し支えないと思われる。

糖尿病はそれ自体が血管の障害による様々な病態を合併することが多く、例えば、多発性脳

梗塞においては高頻度に尿意切迫や頻尿などの過活動膀胱症状を発症する事は広く知られている(榊原ら, 2008)。従って、本研究において、糖尿病における排尿障害の一因として膀胱平滑筋の自律神経受容体機能異常の存在が明らかになったが、糖尿病性排尿障害の治療においては、末梢神経障害のみならず中枢神経障害の関与など様々な排尿機能に関する知識を念頭に置く事も肝要であろうと思われる。

謝

本実験を御指導いただいた文京学園大学

文

- Eglen, R.M., Hegde, S.S. and Watson, N. (1996). Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol. Rev.* **48**: 531-565.
- Felder, C.C. (1995). Muscarinic acetylcholine receptors: Signal transduction through multiple effectors. *FASEB J.* **9**: 619-625.
- Hegde, S.S. (2006). Muscarinic receptors in the bladder: from basic research of therapeutics. *Br. J. Pharmacol.* **147**: S80-S87.
- Hill, S.R., Fayyad, A.M. and Jones, G.R. (2008). Diabetes mellitus and female lower urinary tract symptoms. *Neurourol. Urodyn.* **27**: 362-367.
- 市野みどり, 井川靖彦, 小川輝之, 石塚 修, 西沢 理 (2008). 糖尿病性下部尿路機能障害の概念・特徴・診断・治療. 日本臨床 **66** 巻 増刊号 **9**: 436-440.
- Kebapci, N., Yenilmez, A., Efe, B., Entok, E. and Demirustu, C. (2007). Bladder dysfunction in type 2 diabetic patients. *Neurourol. Urodyn.* **26**: 814-819.
- Kim, J.C., Yoo, J.S., Park, E.Y., Hong, S.H., Seo, S.I. and Hwang, T.K. (2008). Muscarinic and purinergic receptor expression in the urothelium of rat with detrusor overactivity induced by bladder outlet obstruction (BOO). *Br. J. Urol.* **101**: 371-375.
- Nakamura, T., Kimura, J. and Yamaguchi, O. (2002).

辞

坂井 泰 教授に深謝いたします。

献

- Muscarinic M2 receptors inhibit Ca^{2+} -activated K^{+} channels in rat bladder smooth muscle. *Int. J. Urol.* **9**: 689-696.
- Ohki-Hamazaki, H., Watase, K., Yamamoto, K., Ogura, H., Yamano, M., Yamada, K., Maeno, H., Imaki, J., Kikuyama, S., Wada, E. and Wada, K. (1997). Mice lacking bombesin receptor subtype-3 develop metabolic defects and obesity. *Nature* **390**: 165-169.
- 森田 隆 (2002). 糖尿病性膀胱尿道機能障害. 日本臨床 **60** 巻増刊号 **10**: 69-374.
- 大橋輝久 (2000). 糖尿病性排尿障害の病態. 排尿障害プラクティス **8**: 38-42.
- 佐藤 稔 (2001). 糖尿病による排尿障害診断におけるウロダイナミックスタディの検討. *J. Smooth Muscle Res.* **5**: J59-J67.
- 榊原隆次, 山口千晴, 内山智之, 伊藤敬志, 劉 志, 山本達也, 阿波裕輔, 岸 雅彦, 山西友典, 服部孝道 (2008). 糖尿病における過活動膀胱: 中枢および末梢の関与. 自律神経 **45**: 92-97.
- 宍戸啓一, 山口 脩, 中村隆行, 細井隆之 (1996). Rat 膀胱平滑筋収縮における muscarinic receptor subtype の機能に関する検討. 日泌尿会誌 **87**: 338-342.
- 和田恵津子, 山田一之, 和田圭司 (2003). ボンベシンファミリーとニューロメジン U. 日本臨床 **61**, Suppl. **6**: 77-81.