

排尿反射亢進と神経可塑性に注目して

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2007-10-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 横山, 修 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/1139

排尿反射亢進と神経可塑性に注目して

横山 修

はじめに

脳血管障害は本邦における死亡原因の 3 位にランクされているが、救命された後に片麻痺や、尿意切迫・頻尿・切迫性尿失禁などを含めた過活動膀胱などの神経症状を残すことも稀ではない。過活動膀胱に対する新たな治療戦略を構築するためには過活動膀胱の脳内メカニズムに対する理解が是非とも必要である。ここでは脳虚血に引き続き発生する過活動膀胱の脳分子生物学的メカニズム、特に神経可塑性に注目してグルタミン酸 (glutamate; Glu) やプロスタグランジン (prostaglandin; PG) が過活動膀胱とどのように関わっているのかについて、われわれの教室で得られた結果を中心に解説する。

過活動膀胱の動物モデル

ハロタンあるいはネプタール麻酔下に Sprague-Dawley ラットの頸部を展開する。総頸動脈が外頸動脈と内頸動脈に分枝する部位から 17 mm だけ 4-0 ナイロン糸を挿入するとその先端は中大脳動脈の起始部に位置することとなり、中大脳動脈領域のみの脳梗塞が作成される¹⁾。脳梗塞体積は 2, 3, 5-triphenyl-tetrazolium chloride を用心尖部より還流染色して評価した。膀胱機能の評価は、膀胱頂部に留置した膀胱瘻カテーテルをラット頸部背側に導出し、ここから生理食塩水を注入して膀胱内圧測定を行った²⁾。ラットをボールマニケージ内に拘束して覚醒下で膀胱内圧測定を行うと、膀胱容量は左側中大脳動脈塞栓 1 時間後から著明な低下がみられ、左側総頸動脈から内頸動脈まで周囲を剥離した偽手術ラットとの間に有意な差がみられた(図 1)。膀胱容量は偽手術ラットの 50% 以

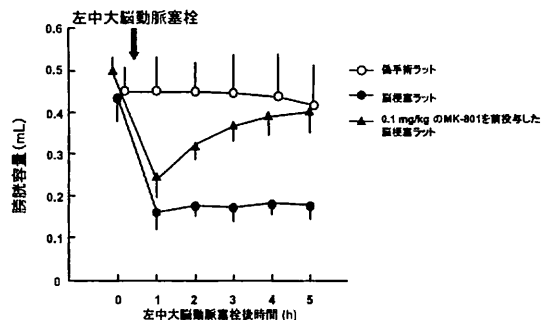


図 1 脳梗塞前に NMDA 受容体を遮断すると梗塞後排尿反射は亢進しない

Yokoyama O, et al: Am J Physiol 273: R1900, 1997

下で推移した。この減少は脳梗塞作成後 4 カ月の時点でも認められた²⁾。

排尿反射亢進と可塑性関連遺伝子

これまで過活動膀胱モデル(脳梗塞ラット)を用い、その脳内メカニズムを生理学的・遺伝学的に検討してきた。脳梗塞ラットにみられる排尿反射の亢進は、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の *N*-methyl-D aspartate (NMDA) 受容体の遮断剤 MK-802 (dizocilpine) を脳梗塞前に遮断すれば、永続的に抑制できる(図 1)³⁾。しかし、グルタミン酸 AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) 受容体遮断剤 NBQX を用いても抑制できなかった(図 2)。さらに橋排尿中枢を、グルタミン酸 NMDA 受容体のレセプターチャンネルコンプレックスの主要な構成蛋白である NMDA-R 1 に対するアンチセンス ODN (oligodeoxynucleotide) にて mRNA の発現を抑えると排尿反射の亢進が抑制されるという結果が得られた。protein kinase A は cAMP の結合により活性サブユニットを解離させ CREB といった転写因子や AMPA

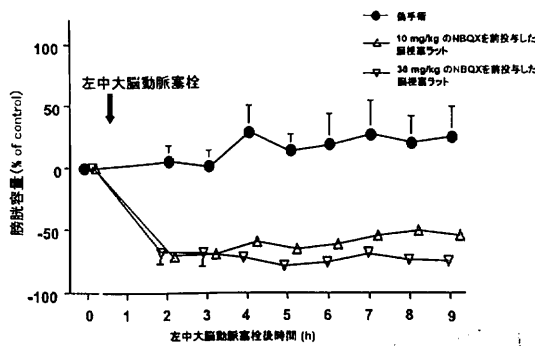


図2 脳梗塞前にAMPA受容体を遮断しても梗塞後排尿反射は亢進
Yokoyama O : J Urol 171 : 1709, 2004

受容体をリン酸化することで可塑性を生じさせる酵素であるが、脳梗塞作成前に橋背外側被蓋 (dorsal pontine tegmentum ; DPT) に protein kinase A の inhibitor (H-89) を microinjection してシグナル伝達の阻害を行ったり、actinomycin D を注入し DNA から RNA への転写を阻害すると排尿反射の亢進はみられないという結果も得ている⁴⁾。この時、fos family や zif 268 といった神経可塑性関連遺伝子の発現も抑えられていた。すなわち橋排尿中枢における遺伝子の転写が排尿反射亢進、すなわち過活動膀胱には必要であることが解明され、従って転写因子としての c-fos や zif 268 で制御される下流遺伝子の存在が示唆されたわけである。

c-fos, zif 268, c-jun のような最初期遺伝子 (immediate early gene) は海馬に加わった刺激に反応して、数分から1時間ほどの間に一過性にその転写が増大し、長期増強 (long-term potentiation ; LTP) の導入に関与していると報告されている⁵⁾⁶⁾。高頻度刺激により海馬における c-fos, c-jun, jun-B の mRNA の発現は増加するが、この発現は NMDA 受容体 antagonist により抑制される。また LTP も同様に阻害される。さらに LTP において brain-derived neurotrophic factor (BDNF) や tissue plasminogen activator (tPA) の発現も NMDA 受容体を介していると言われている⁷⁾⁸⁾。脳梗塞後にみられる排尿反射の亢進が海馬における LTP と同様の機序で生じているならば、神経可塑性に関連したこれらの遺伝子の幾つかが発現が亢進している可能性がある。脳梗塞時排尿反射亢進と共に DPT で発現の増加している遺伝子を同定することは、過活

動膀胱関連遺伝子という意味からも重要である。c-fos, zif 268, c-jun, BDNF, NGF, tPA の DPT における発現を mRNA のレベルで検討した⁹⁾。また、アラキドン酸カスケードの key enzyme である cyclooxygenase-2 (COX-2) も長期に持続するシナプス可塑性の形成に関与していると報告され¹⁰⁾、DPT における発現についても検討した¹¹⁾。

脳梗塞とアラキドン酸カスケード

DPT より 2×2 mm の脳組織を採取し、RNA 抽出後逆転写した。Real-time PCR にて mRNA の定量を行うと、c-fos は脳梗塞作成1時間後に強発現を認めたが、3時間後までにはコントロールレベルにまで回復していた (図3)。Zif 268 も脳梗塞作成3時間にピークを認めたが、5時間後にはコントロールレベルにまで回復していた。次にあらかじめ NMDA 受容体 antagonist である dizocilpine を投与してから脳梗塞を作成すると、1時間目にピークを持つ c-fos, 3時間目にピークを持つ zif 268 の発現はともに抑えられていた。

COX-2 の発現についても同様な検討を行ったが、COX-2 は脳梗塞作成後1~5時間で有意に増加していた (図4)¹¹⁾。しかし12時間後にはコントロールレベルにまで回復していた。dizocilpine を脳梗塞作成の30分前に投与しておくとも膀胱容量の減少は観察されず、また COX-2 の発現も抑えられていた。次に、COX-2 が脳梗塞後の排尿反射亢進に本質的か否かを検討する目的で、COX-2 選択的阻害剤である NS-398 を脳梗塞作成の30分前に経静脈的に投与し、その後中大脳動脈を塞栓した (図5)。NS-398 は用量依存性に膀胱容量の低下を抑制した。COX-2 阻害剤である NS-398 を前投与して脳梗塞を作成しても排尿反射の亢進が認められないこと、また COX-2 の下流遺伝子である PGES の発現はグルタミン酸 NMDA 受容体の制御下にあることなど報告した (未掲載)。

COX-2 あるいは PGES により合成される PG 類が、脳梗塞後、実際 DPT において増加しているのか検討する必要がある。そこで脳梗塞作成後、ラット脳に microwave 照射後脳組織を採取し、大脳皮質、中脳中心灰白質から橋背外側被蓋にかけて PGE₂, PGD₂, 6-keto PGF_{1α}, PGF_{2α}, TXB₂ など PG 類の経時的変化を EIA 法にて測定した。その結果、PGE₂ と 6-keto PGF_{1α} が有意に増加していることが観察された (未掲載)。さらに PGE₂ の受容体 EP1 遮断剤である ONO 8711 をあらかじめ脳内に投与しておくとも排尿反射は長期にわ

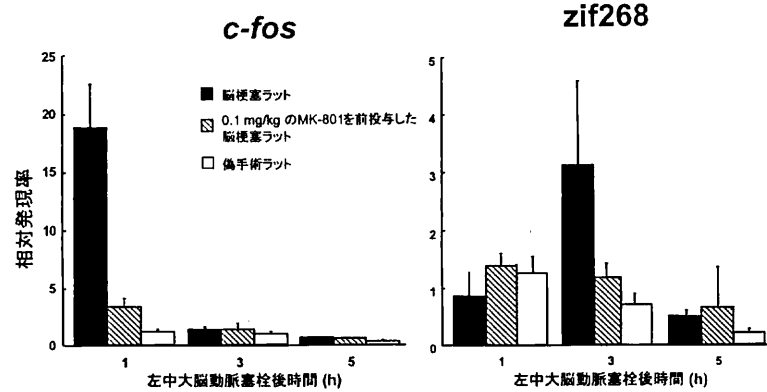


図3 脳梗塞作成前NMDA 受容体遮断(MK-801)が *c-fos*/zif268 発現におよぼす影響
Yotsuyanagi S : J Urol 166 : 1148, 2001

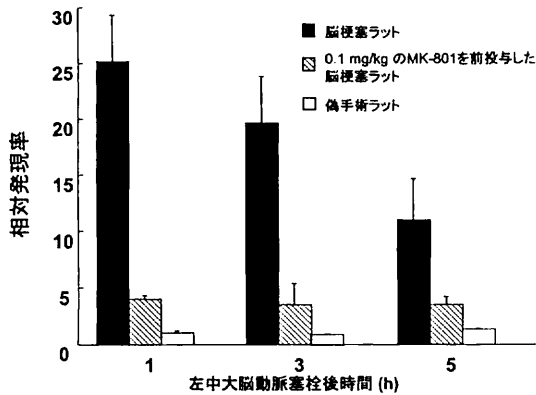


図4 脳梗塞作成前NMDA 受容体遮断 (MK-801) が COX-2 発現におよぼす影響
Yotsuyanagi S, et al : J Urol 174 : 365, 2005

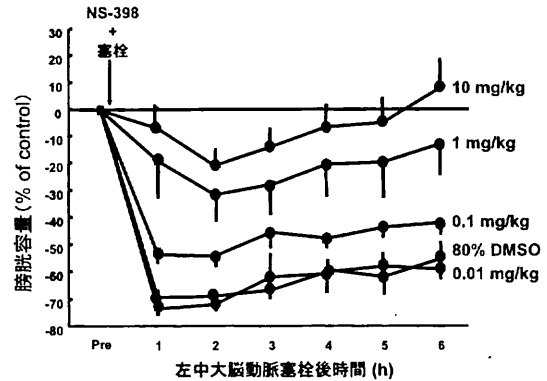


図5 NS-398 前投与は脳梗塞に伴う過活動膀胱の発生を用量依存性に阻害した
Yotsuyanagi S, et al : J Urol 174 : 365, 2005

たり阻害され、PGE₂ は脳梗塞後の過活動膀胱発生に大きく関与していることが示唆された。

脳梗塞と一酸化窒素

海馬における LTP 成立の過程で逆行性シグナル伝達を担うとされる NO (一酸化窒素) について、脳梗塞後の排尿反射における機能的役割を検討した¹²⁾。非選択的な NOS 阻害剤を脳室内に投与すると膀胱容量の減少は抑えられたが、投与時間依存性であり、梗塞作成 5 時間までの投与が有効であった。また nNOS 選択的な阻害剤ではその効果は不十分で、eNOS の関与も示唆された。

まとめ

以上の結果より、脳梗塞後の排尿反射の亢進には橋背外側被蓋におけるグルタミン酸 NMDA 受容体開口に始まる一連のシグナル伝達と可塑性関連遺伝子の発現を伴っており、また NOS や COX-2 の酵素活性が神経回路網において排尿閾値をシフトさせた形で再構築することで排尿反射を亢進させるものと思われた。海馬における LTP は 2~3 分から数時間持続する短期増強 (short-term potentiation) と、数日、数週、あるいはそれ以上持続する長期増強とから成っている¹³⁾。前者は NMDA 受容体の開口と protein kinase A あるいは C による蛋白リン酸化が必要であるが、後者は

cAMP 依存性に遺伝子の発現や新しい蛋白の新生が必要である。今後われわれは COX-2 あるいは NOS の下流にある排尿反射亢進に本質的な遺伝子の同定と解析を行う予定である。

§ 文 献

- 1) Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al : Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats. *Stroke* 20 : 84—91, 1989
- 2) Yokoyama O, Komatsu K, Ishiura Y, et al : Change in bladder contractility associated with bladder overactivity in rats with cerebral infarction. *J Urol* 159 : 577—580, 1998
- 3) Yokoyama O, Ishiura Y, Komatsu K, et al : Effects of MK-801 on bladder overactivity in rats with cerebral infarction. *J Urol* 159 : 571—576, 1998
- 4) Yokoyama O, Yotsuyanagi S, Akino H, et al : RNA synthesis in the pons necessary for maintenance of bladder overactivity following cerebral infarction in the rat. *J Urol* 169 : 1878—1884, 2003
- 5) Cole AJ, Saffen DW, Baraban JM, et al : Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature* 340 : 474—476, 1989
- 6) Dragunow M, Abraham WC, Goulding M, et al : Long-term potentiation and the induction of *c-fos* mRNA and proteins in the dentate gyrus of unanesthetized rats. *Neurosci Lett* 101 : 274—280, 1989
- 7) Dragunow M, Beilharz E, Mason B, et al : Brain-derived neurotrophic factor expression after long-term potentiation. *Neurosci Lett* 160 : 232—236, 1993
- 8) Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, et al : Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* 361 : 453—457, 1993
- 9) Yotsuyanagi S, Yokoyama O, Komatsu K, et al : Expression of cyclooxygenase isoform in the pontine tegmental area of rats with overactive bladder following cerebral infarction. *NeuroUrol Urodyn* 20 : 40—41, 2001
- 10) Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, et al : COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 : 2317—2321, 1996
- 11) Yotsuyanagi S, Yokoyama O, Komatsu K, et al : Role of cyclooxygenase-2 in the development of bladder overactivity after cerebral infarction in the rat. *J Urol* 174 : 365—369, 2005
- 12) Kodama K, Yokoyama O, Komatsu K, et al : Upregulation of neuronal nitric oxide synthase gene expression in rat brain with bladder overactivity after cerebral infarction. *J Urol* 167
- 13) Nguyen PV, Abel T, Kandel ER : Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* 265 : 1104—1107, 1994