

(書式12)

氏名	さたけ ようへい 佐竹 洋平
学位の種類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学 専攻
学位論文題目	膀胱平滑筋の β 刺激を介する弛緩反応における一酸化窒素合成酵素の重要な役割
論文審査委員	主査 教授 荒井 陽一 教授 神宮 啓一 教授 赤池 孝章

論文内容要旨

【背景】

一酸化窒素合成酵素(NOS)は一酸化窒素(NO)を誘導し、下部尿路機能の制御に様々な役割を担っている。特に NO は尿道と前立腺平滑筋の弛緩に大きく関与し、最近ではその効果を促進する Phosphodiesterase type-5 (PDE-5) 阻害剤が男性の下部尿路症状に対して用いられるようになった。一方で NO が膀胱平滑筋を弛緩させる作用は非常に小さく、膀胱における NOS の役割は十分に明らかにされていない。また、NOS には 神経型 (nNOS), 内皮型 (eNOS), 誘導型 (iNOS) と 3 種類の isoform が存在するが、膀胱におけるそれらの役割分担も明らかではない。これまでの NOS に関する下部尿路の薬理学的研究は、その多くが NOS 阻害薬を用いて行われてきたが、NOS 阻害薬にはその作用特異性に問題がある。nNOS knock-out (KO) マウスを用いた報告もあるが、ノックアウトされていない他の isoform の代償機構が問題となる。そこで私は、nNOS KO, eNOS KO マウスおよび n/eNOS ダブル KO マウスを用いて膀胱平滑筋の機能を解析した。

【方法と結果】

nNOS KO, eNOS KO, n/eNOS KO マウス および control として C57BL6 野生型 (WT) マウスを用いた。

蛍光免疫染色によって、WT マウスの膀胱に nNOS, eNOS および iNOS がいずれも尿路上皮と膀胱平滑筋に発現していることを確認した。次に膀胱筋片を作成し、各弛緩薬に対する弛緩反応とカルバコール(CCh)に対する収縮反応を評価した。尿路上皮を除去してもイソプロテレノールに対する弛緩反応と CCh による収縮反応への影響はみられなかったことから、尿路上皮における NOS は上記弛緩および収縮反応に関与しないことが示唆された。CCh による収縮反応は

(書式 i 2)

nNOS KO, eNOS KO, n/eNOS KO マウスいずれも WT マウスに比べて差をみとめなかった。一方で、イソプロテレノールに対する弛緩反応は、WT に比べて nNOS KO マウスにおいて有意に減弱、n/eNOS KO マウスにおいてはさらに大きく減弱していた。WT マウスにおいて Ca 依存性 K⁺(KCa)チャネルを charybdotoxin と apamin によって阻害するとイソプロテレノールによる弛緩反応は大きく減弱した。さらに NS1619 によって KCa チャネルを直接刺激すると、n/eNOS KO マウスの弛緩反応は WT マウスと同等に弛緩した。以上から nNOS および eNOS は β 受容体を介する弛緩反応において、KCa チャネルを活性化する経路に関与していることが示唆された。しかし、NO 供与剤である NONOate および 血管弛緩作用のある過酸化水素による弛緩反応はみられなかった。

【結論】

nNOS および eNOS は β 受容体を介する膀胱平滑筋の弛緩反応に関与する。しかしその機序は NO の産生とは独立しており、NOS 自体または NOS が産生する NO 以外のメディエーターが KCa チャネルの活性化に影響する経路が想定される。この機序をより詳細に検討することにより、過活動膀胱などの下部尿路機能障害に対する新たな治療の発展につながると考える。

審査結果の要旨

博士論文題目 膀胱平滑筋の β 刺激を介する弛緩反応における一酸化窒素合成酵素の重要な役割

所属専攻・分野名 医科学専攻 ・ 泌尿器科学 分野

学籍番号 B2MD5053 氏名 佐竹 洋平

膀胱は、平滑筋の弛緩により内圧の上昇をきたすことなく蓄尿し、平滑筋の収縮により尿を残りなく排出することができる。下部尿路機能は様々なメディエーターによって制御されているが、一酸化窒素(NO)も重要な因子の1つである。NOは一酸化窒素合成酵素(NOS)によって産生されるが、NOSには内皮型(eNOS)、神経型(nNOS)、および誘導型(iNOS)の3つのアイソフォームが存在する。これまで下部尿路においてNOは主に尿道や前立腺の平滑筋を弛緩させるが、膀胱平滑筋への作用は非常に弱く、膀胱平滑筋におけるNOおよびNOSの役割は十分に明らかにされていなかった。下部尿路とNOSの機能についての研究は主にNOS阻害薬やnNOS単独ノックアウト(KO)マウスを用いて行われてきたが、NOS阻害薬にはNOSの阻害作用以外にも非特異的な作用があること、また1種類のNOSをKOさせてもその機能を他のアイソフォームが代償してしまうという問題があった。そこで本研究はeNOS-KO, nNOS-KOマウスに加えて、n/eNOS-KOマウスを用いて膀胱平滑筋機能にNOSが関与するかどうかを検討した。

本研究において、nNOS-KOマウスの膀胱筋片は β 受容体刺激薬であるイソプロテレノールに対する弛緩反応がWT(野生型)マウスに比べて減弱しており、n/eNOS-KOマウスにおいてはさらに大きく減弱していた。一方、WTマウスの膀胱においてNO供与薬に対する弛緩反応が見られなかったことから、eNOSおよびnNOSはNOの作用とは独立して β 刺激を介する弛緩反応に関与していることが示された。また、各阻害薬を用いた実験からイソプロテレノールによる膀胱平滑筋の弛緩反応がカルシウム活性化型カリウム(K_{Ca})チャンネルを介することを示した。

本研究は、複数のNOSアイソフォームのKOマウスを用いた薬理学実験というユニークな方法によって、膀胱平滑筋の弛緩反応にeNOSおよびnNOSが関与していることを初めて明らかにした。また、その作用機序に K_{Ca} チャンネルが関わっていることを明らかにした。臨床的には膀胱の平滑筋弛緩障害に起因する下部尿路症状の病態解明および新規治療に寄与するという重要性の点で極めて優れていると考える。よって、本論文は博士(医学)の学位論文として合格と認める。