

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15583

研究課題名(和文) 硫化水素に着目した新規下部尿路疾患治療薬開発に向けた基礎研究

研究課題名(英文) Hydrogen sulfide has a role as an endogenous relaxation factor in the bladder and prostate of male rats

研究代表者

齊藤 源顕 (Saito, Motoaki)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・教授

研究者番号：60273893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 予め収縮させた膀胱及び前立腺に対し、NaHSはいずれも用量依存的に弛緩反応を誘発した。これら弛緩反応におけるNaHSのEC50値及び弛緩率は有意差はなかった。(2) 前立腺組織ではMPST/CAT/CBS、いずれも主に腺上皮に発現していた。膀胱組織では、上皮及び筋層いずれにおいてもMPST及びCATの発現が認められた一方、CBSの免疫陽性は観察されなかった。(3) H₂Sはいずれの組織においても検出された。(4) GYY投与群では、いずれの用量においても対照群に比して有意な排尿間隔の延長が観察された。H₂Sが膀胱及び前立腺組織において内因性の弛緩因子として機能する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that: (1) MPST and CAT were detected in the bladder and prostate and CBS was only detected in the prostate. On the other hand, CSE and DAO were not detected in both tissues. Immunoreactivities of these enzymes were mainly detected in the urothelium and smooth muscle layer of the bladder, and in the prostate glandular epithelium. (2) H₂S was detected in the bladder and prostate tissues. (3) NaHS dose-dependently induced relaxation of pre-contracted BL-D, BL-T, PR-D and PR-V strips. There were no significant differences of the EC50 values or maximal relaxation rate against the pre-contractions among any of these tissues. Intravesically instilled GYY4137 significantly prolonged intercontraction intervals compared to the vehicle-treated group, and showed, although non-significant, tendency to reduce maximal voiding pressure compared to the vehicle-treated group.

研究分野：下部尿路男性生殖器の薬理学

キーワード：硫化水素 膀胱 前立腺 弛緩

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素 (NO) は下部尿路、特に前立腺や尿道平滑筋における弛緩作用、求心性神経信号の修飾や血管拡張作用が知られている。本年になり PDE-5 阻害薬であるタダラフィルが前立腺肥大症治療薬として厚生労働省より認可されたが、その作用機序は NO による前立腺や尿道平滑筋を弛緩作用、求心性神経信号の修飾や血管拡張作用と考えられている。NO と同じガス性物質である硫化水素 (H_2S) は最近まで毒性ガスとしか認識されていなかったが、近年ガス性情報伝達物質や生理活性物質として認識されている。 H_2S の研究論文数は年々増加し、平滑筋弛緩作用のほか抗炎症作用 (FASEB J, 20: 2118, 2012)、インスリン分泌調節作用 (J Physiol, 569: 519, 2005)、血管新生作用 (Cardiovas Res, 76: 29, 2007)、酸素センサー (J Exp Biol, 209: 4011, 2006)、小胞体ストレス調節作用 (Science Sig, 4: ra86, 2011)、NF- κ B 調節を介した抗アポトーシス作用 (Mol Cell, 45: 13, 2012)、さらには細菌の抗生物質抵抗調節作用が報告されている。この様に多彩な生理作用を有する H_2S であるが、膀胱および前立腺におけるその作用はほとんど知られていない。

2. 研究の目的

本研究では外因性の H_2S が膀胱平滑筋や前立腺組織を収縮または弛緩させるのか、もし弛緩させるのならどの程度の弛緩率なのかを明らかにする。更に、膀胱平滑筋や前立腺組織における 3 種類の H_2S 合成酵素の発現量と分布を明らかにする。次に、 H_2S 合成酵素阻害薬や H_2S ドナー投与が排尿機能にどのような影響を与えるかを *in vivo* にて解明し、更にヒト膀胱・前立腺由来の培養細胞を用いてその分子メカニズムを探索する。

3. 研究の方法

Wistar 系雄性ラット (350-400 g) より膀胱頂部 (BL-D)、膀胱三角部 (BL-T)、前立腺の腹側葉 (PR-V) 及び背外側葉 (PR-D) をそれぞれ摘出した。恒温槽を用いて、カルバコール (10^{-5} M) 誘発性の膀胱収縮及びノルアドレナリン (10^{-5} M) 誘発性の前立腺収縮に対する NaHS (H_2S ドナー) (10^{-9} to 3×10^{-4} M) の弛緩作用の相違を、各部位間にて比較した。さらに組織切片を作成し、これら組織における各 H_2S 合成酵素 (cystathionine β -synthase (CBS)、cystathionine γ -lyase (CSE)、3-mercaptopyrivate sulfurtransferase

(MPST)、cysteine aminotransferase (CAT)、D-amino acid oxidase (DAO)) の発現レベルはリアルタイム PCR 法及びウエスタンブロット法により解析した。免疫組織化学染色法により CBS、CSE、MPST、CAT および DAO の発現分布を解析した。各組織における H_2S 含量はメチレンブルー法により測定した。膀胱内圧測定 (CMG) はウレタン麻酔下 (0.8 g/kg, ip) の同ラットを用いて行った。膀胱カテーテル挿入 1 時間後、生理食塩水を一定流速 (2.4 ml/h) にて注入し CMG を行い、排尿反射が 4-5 回検出された後、徐放性の H_2S 供与薬 GYY4137 (GYY: 10^{-8} , 10^{-7} or 10^{-6} M) または vehicle を持続膀胱注し、CMG を継続した。

4. 研究成果

予め収縮させた膀胱及び前立腺に対し、NaHS はいずれも用量依存的に弛緩反応を誘発した。これら弛緩反応における NaHS の EC_{50} 値及び弛緩率を組織・部位間で比較したが、有意差は見られなかった。mRNA 及びタンパク質レベルにおいて、CBS 発現は前立腺においてのみ観察された (部位間の発現レベル: PR-V > PR-D)。一方、MPST 及び CAT の発現はいずれの組織・部位でも認められた。MPST は部位間の発現レベルに差が見られた (PR-D > PR-V > BL-D=BL-T) が、CAT では有意な差はなかった。これに対し両組織における CSE 及び DAO の発現は検出されなかった。前立腺組織では MPST/CAT/CBS、いずれも主に腺上皮に発現していた。膀胱組織では、上皮及び筋層いずれにおいても MPST 及び CAT の発現が認められた一方、CBS の免疫陽性は観察されなかった。 H_2S はいずれの組織においても検出された。GYY 投与群では、いずれの用量においても対照群に比して有意な排尿間隔の延長が観察された。また有意な差ではないものの、対照群に比して GYY 投与群の最大排尿圧が低下する傾向が認められた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Shimizu T, Zou S, Shimizu S, Higashi Y, Nakamura K, Ono H, Aratake T, Yamamoto M, Honda M, Saito M: Hydrogen sulfide has a role as an endogenous relaxation in the bladder and prostate of male rats. *NeuroUrol Urodyn*, In

Press

〔学会発表〕(計10件)

1. Shimizu T, Zou S, Shimizu S, Higashi Y, Ono H, Nakamura K, Aratake T, Yamamoto M, Hamada T, Nagao Y, Honda M, Saito M. Hydrogen sulfide can function as an endogenous relaxation factor in the rat bladder and prostate. American Urological Association, 112th Annual Meeting 5.18-21, 2018. Moscone Center (San Francisco, CA, USA)
2. 清水孝洋、Zou Suo、清水翔吾、東洋一郎、尾野秀彬、中村久美子、新武享朗、山本雅樹、濱田朋弥、長尾佳樹、齊藤源顕：硫化水素は膀胱および前立腺における内因性の弛緩因子である。第9回排尿障害モデル動物研究会 12.1, 2017 於：グランディエールブuketーカイ(静岡)
3. Zou S, Shimizu T, Shimizu S, Higashi Y, Ono H, Nakamura K, Aratake T, Yamamoto M, Hamada T, Nagao Y, Saito M: Endogenous hydrogen sulfide can function as a relaxation factor in the rat bladder and prostate. 第70回日本薬理学会西南部会 11.18, 2017. かがしま県民交流センター(鹿児島)
4. 清水孝洋、Zou Suo、清水翔吾、東洋一郎、中村久美子、新武享朗、山本雅樹、濱田朋弥、長尾佳樹、上羽佑亮、本田正史、齊藤源顕：ラット膀胱および前立腺における弛緩因子・硫化水素の生合成酵素群の発現解析。第24回日本排尿機能学会 9.28-30, 2017. 東京ファッションタウン(TFT)ホール(東京)
5. Shimizu T, Zou S, Shimizu S, Higashi Y, Nakamura K, Aratake T, Yamamoto M, Hamada T, Nagao Y, Saito M. Hydrogen sulfide can be an endogenous relaxation factor in the rat bladder and prostate. ICS2017 (International Continence Society 47th Annual Meeting) 9.12-15, 2017. Firenze Fiera Congress Centre Fortezza Da Basso (Florence, Italy)
6. 中村久美子、清水孝洋、清水翔吾、東洋一郎、山本雅樹、齊藤源顕：Wistar 雄性ラットにおける膀胱および前立腺に対する硫化水素の弛緩作用と硫化水素合成酵素の発現。第89回日本薬理学会年会

3.9-11, 2016. パシフィコ横浜(神奈川)

7. 中村久美子、清水孝洋、清水翔吾、東洋一郎、齊藤源顕：硫化水素によるラット膀胱および前立腺に対する弛緩作用と硫化水素産生酵素の発現分布。第68回日本薬理学会西南部会 11.21, 2015 於：海峡メッセ下関(山口)
8. 清水孝洋、清水翔吾、中村久美子、本田正史、井上啓史、齊藤源顕：硫化水素は膀胱ならびに前立腺における強力な弛緩因子である。第22回日本排尿機能学会 9.9-11, 2015 京王プラザホテル札幌(札幌)
9. Shimizu T, Shimizu S, Nakamura K, Honda M, Inoue K, Yoshimura N, Saito M: Endogenous hydrogen sulfide can function as a potent relaxing factor in the rat bladder and prostate. The 10th Pan-Pacific Continence Society Meeting, 9.7-8, 2015. Sapporo Convention Center (Sapporo, Japan)
10. Shimizu T, Shimizu S, Nakamura K, Honda M, Inoue K, Saito M: Hydrogen sulfide is a potent relaxing factor in the rat bladder and prostate. American Urological Association, 110th Annual Meeting, 5.15-19, 2015. New Orleans Morial Convention Center (New Orleans, LA, USA)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://www.kochi-ms.ac.jp/~ff_phrmc/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 源顕 (SAITO, Motoaki)
高知大学・教育研究部医療学系
基礎医学部門・教授
研究者番号：60273893

(2) 研究分担者

清水 孝洋 (SHIMIZU, Takahiro)
高知大学・教育研究部医療学系
基礎医学部門・准教授
研究者番号：00363276

(3) 研究分担者

東 洋一郎 (HIGASHI, Youichirou)
高知大学・教育研究部医療学系
基礎医学部門・助教
研究者番号：80380062

(4) 研究分担者 (SHIMIZU, Shogo)

清水 翔吾
高知大学・教育研究部医療学系
基礎医学部門・助教
研究者番号：90721853