

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：37107
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2016～2019
課題番号：16K08275
研究課題名(和文)女性の排尿機能障害、特に腹圧性尿失禁に対する新規治療標的の創出に関する基礎研究

研究課題名(英文)Basic research on the creation of novel therapeutic targets for female urinary dysfunction, especially stress urinary incontinence

研究代表者
副田 二三夫(SOEDA, Fumio)

第一薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10336216
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：雌性BALB/cマウスに4-vinylcyclohexene diepoxideを投与し作成した閉経モデルマウスの排尿機能を解析したところ、閉経周辺期以降の排尿活動に異常を認め、腹圧性尿失禁の既存薬に感受性を示し、咳誘発物質カプサイシンの低用量噴霧により排尿活動が増大した。これらのことから、このマウスは腹圧性尿失禁のモデルになり得ることが示唆された。また、エンリッチ環境はこのモデルの排尿機能障害を改善させ、その作用に関与する中枢性および末梢性の分子を見出すこともできた。本研究成果は、有効な治療薬に乏しい腹圧性尿失禁に対する新規治療標的の創出に関する重要な基礎知見になり得るものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腹圧性尿失禁は有効な医薬品が待ち望まれている疾患領域のひとつであり、加齢に伴いその患者数は急増する。本研究により、腹圧性尿失禁の病態を反映した閉経モデルマウスの作成に成功し、閉経周辺期や閉経後のモデルの排尿機能障害を改善させたエンリッチ環境は、既存の腹圧性尿失禁治療薬で報告されている振戦や動悸などの副作用はないため、有効性に加え、安全性の高い分子標的が創出できたと考えている。よって、本研究で得られた知見に基づき、研究基盤を構築し、創薬研究を展開していくことで、我が国の健康・医療戦略が掲げる「真の健康長寿社会」の実現に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：When 4-vinylcyclohexene diepoxide was administered to female BALB/c mice, and menopausal model mice were created and analyzed for micturition function, abnormal micturition activity was observed after the peri-menopause period and showed sensitivity to existing drugs for stress urinary incontinence. Low-dose nebulization of the cough inducer capsaicin increased voiding activity in the menopausal model mice. These results suggested that this mouse could be a model of stress urinary incontinence. The enriched environment could also ameliorate voiding dysfunction in this model and find the central and peripheral molecules involved in its action. The results of this research could be an important basic finding for the creation of novel therapeutic targets for stress urinary incontinence, which lacks effective therapeutic agents.

研究分野：薬学、環境衛生学

キーワード：排尿機能障害 腹圧性尿失禁 エンリッチ環境 閉経 BALB/c カプサイシン 鎮咳薬 健康長寿社会

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本排尿機能学会の大規模疫学調査において、国内の40歳以上の女性の約半数、60歳以上の約78%が下部尿路症状を有していること、また欧米の疫学調査においても40歳以上の女性の52.5%が下部尿路症状を有していることが報告されている。下部尿路症状の中でも、蓄尿症状である尿失禁は国内外を問わず女性に多く、国内における女性の尿失禁の患者数は1,500万人と言われ、その数は加齢に伴い増加する。尿失禁を訴える女性の半数が、咳やくしゃみの際に不随意に尿が漏れる腹圧性尿失禁であり、高齢女性のみならず、若年の女性においても認められる。

腹圧性尿失禁は、患者の治療満足度の低い疾患であり、薬剤の貢献度も低い疾患、いわゆるアンメット・メディカル・ニーズの高い疾患である。現在、尿道スリング手術などの手術療法や骨盤底筋訓練などの理学療法がその治療の主流であり、薬物療法においては、気管支拡張薬である β_2 アドレナリン受容体作動薬に腹圧性尿失禁の適応もあるが、ほとんど処方されていない。さらに、女性が下部尿路症状で受診する割合は20%以下と著しく低く、泌尿器科の受診率はその4割である。国民の「健康寿命」の延伸を目指す我が国において、女性の下部尿路症状に対するQOLは低下しているにも関わらず、現在の医療はその役割を果たしていないと言っても過言ではない。これらのことから、腹圧性尿失禁に有効かつ安全な新規治療薬の開発は急務であり、極めて重要な課題であると思われる。

(2) 研究代表者らのグループは、無麻酔・無拘束・無侵襲下でマウスの排尿活動を測定する昼夜連続排尿活動測定システムを独自に開発し、様々な系統のマウスの自然な排尿活動をリアルタイムに測定した。その結果、BALB/cマウスは、オスに比べメスの排尿量や尿流率(尿の排出速度)が増加すること、メスのBALB/cマウスはオスに比べカプサイシン誘発の咳に伴い排尿する個体の数が増加することを見出した。これらの知見から研究代表者は、メスのBALB/cマウスは腹圧性尿失禁のモデル動物になり得るのではないかと着想した。また、研究代表者は、通常より広い飼育ケージに遊具を配置したエンリッチ環境や既存の鎮咳薬であるクロペラスチンが、オスの老化促進マウスやオスの脳血管障害モデル動物の下部尿路症状を改善することを見出し、さらにヒトの閉経過程を反映した化学物質誘発性の閉経モデルを用いて、脳内分子の遺伝子発現定量解析を行ってきた。以上の背景を踏まえ、研究代表者は腹圧性尿失禁の有効かつ安全な新規治療薬を開発するためには、まずヒトの閉経過程などの病態を反映した、臨床予測性の高い腹圧性尿失禁のモデルを確立すること、さらに下部尿路機能の改善因子であるエンリッチ環境やクロペラスチンの作用メカニズムを解析し、明確な基礎知見を積み重ねていくことが重要であると考え、本研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、女性の排尿機能障害の中でも、腹圧性尿失禁に対する新規治療標的を創出し、治療薬開発の研究基盤を構築することを目指し、研究期間内に以下の3点を明らかにする。

(1) メスのBALB/cマウスを用いた化学物質誘発性の閉経モデルを作製し、排尿機能の詳細解析、既存の腹圧性尿失禁治療薬に対する感受性を評価し、臨床予測性の高い腹圧性尿失禁モデル動物を作製する。

(2) (1)で作製した腹圧性尿失禁モデル動物の排尿機能障害に対して、排尿機能改善因子であるエンリッチ環境や鎮咳薬は有効性を示すのか否かを解析する。

(3) (2)の解析で、上記の排尿機能改善因子に有効性が認められた場合は、腹圧性尿失禁モデ

ルの排尿機能改善作用に関与する中枢性および末梢性の分子、特に神経活動に関与する受容体やチャネル、トランスポーター、神経栄養因子について網羅的解析を行い、排尿機能改善作用に関与する分子を探索する。

3. 研究の方法

(1) BALB/c マウスを用いた閉経モデルの作製と排尿機能の解析

閉経モデルの作製：BALB/c メスマウスに 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) または Vehicle を 3 週間（連続 5 日間/週）腹腔内に投与した。この VCD モデルは、VCD の投与開始日から 24 日後は閉経前、52 日後は閉経周辺期、127 日後は閉経後の状態をそれぞれ反映しており、ヒト女性の加齢に伴うホルモンの変化を反映したモデルであると考えられている。

昼夜連続排尿活動測定と既存薬感受性の評価：上述した閉経前、閉経周辺期、閉経後の時点で、昼夜連続排尿活動測定システムを用いて、覚醒下における VCD および Vehicle 投与マウスの 24 時間の排尿活動を測定した。また、VCD マウスの排尿活動に対する既存の腹圧性尿失禁治療薬クレムテロールの影響についても調べた。

パッドテスト：常法に従い、マウスが紙の上で排尿した尿のスポットの大きさを測定した。

咳反射に伴う排尿活動の測定：咳誘発物質であるカプサイシンを閉経モデルに吸入させ、排尿回数を測定した。

膀胱平滑筋の等尺性収縮実験：マグヌス法を用いて、カルパコール誘発性の刺激、経壁電気刺激に対する影響を調べた。

(2) 閉経モデルの排尿機能障害に対するエンリッチ環境の作用の解析

上述した VCD の投与終了の翌日よりエンリッチ環境または通常の飼育環境であるスタンダード環境で飼育を開始し、閉経周辺期および閉経後の時期に昼夜連続排尿活動測定システムを用いて 24 時間の排尿活動を測定した。

(3) 正常マウスおよび閉経モデルの排尿機能に対するクロペラスチンの作用の解析

正常（雌性 BALB/c）マウス：クロペラスチン 20 mg/kg を 1 日 1 回 14 日間の経口投与を行い、昼夜連続排尿活動測定システムによる 24 時間の排尿活動測定、麻酔下シングルシストメトリによる膀胱内圧の測定を行った。

VCD マウス：閉経周辺期および閉経後の時期にクロペラスチン 20 mg/kg を 1 日 1 回 14 日間、経口投与を行い、昼夜連続排尿活動測定システムを用いて 24 時間の排尿活動を測定した。

(4) 排尿機能改善作用に関与する中枢性および末梢性分子の探索

マウスから排尿反射に関与する前頭前皮質および膀胱を摘出し、常法に従い RNA を抽出、逆転写を行い、RT² Profiler PCR Array（キアゲン社）を用いて、神経活動に関与する受容体や神経栄養因子などについて、遺伝子発現定量解析を行った。

4. 研究成果

(1) VCD マウスの昼夜連続排尿活動の測定

閉経前を反映する VCD 投与開始日から 24 日後において、マウスの安静期である明期の排尿量は Vehicle 群に比べ VCD 群で有意に増加した。閉経周辺期を反映する VCD 投与開始日から 52 日後において、24 時間およびマウスの活動期である暗期の 1 回排尿量は Vehicle 群に比べ VCD 群で有意に減少し、明期の排尿回数は Vehicle 群に比べ VCD 群で有意に増加した。閉経後を反映する VCD 投与開始日から 127 日後において、最大尿流率は、24 時間、明期において、

Vehicle 群に比べ VCD 群で有意に減少、暗期においても減少傾向 ($p=0.051$) を示した。 体重および 24 時間の飲水量は、排尿活動を測定したすべての期間において、Vehicle と VCD の 2 群間で有意な変化はなかった。

(2) VCD マウスの昼夜連続排尿活動に対するクレンプテロールの影響

クレンプテロールの慢性経口投与 ($100 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、1 日 1 回 14 日間) は、閉経周辺期および閉経後を反映する VCD マウスの排尿活動に感受性を示し、閉経周辺期では、明期の総排尿量が対照群に比べ有意に増加した。閉経後では、24 時間および明期の 1 回排尿時間が対照群に比べ有意に減少した。

(3) VCD マウスのパッドテスト

失禁様症状を反映する小さな尿スポットの数は、Vehicle 群に比べ、VCD 投与開始日から 52 日後の閉経周辺期を反映する VCD 群の 66.7%において増加する傾向を示した。

(4) カプサイシン誘発性の咳反射に伴う VCD マウスの排尿活動の測定

咳誘発物質であるカプサイシンまたはその溶媒をこの閉経モデル (VCD 群) と対照群に噴霧し、咳及び排尿の回数を測定した結果、カプサイシン噴霧による咳の回数は、溶媒噴霧時に比べ、VCD 群と対照群の両方で増加した。一方、カプサイシン噴霧による排尿回数は、対照群に比べ、VCD 群で増加した。これらの結果から、カプサイシン刺激により誘発された排尿は、VCD 群に感受性を示すことがわかった。

(5) VCD マウスの膀胱平滑筋における等尺性収縮の測定

低周波数の電気刺激による平滑筋収縮は、対照群に比べ VCD 群で増強する傾向を示した。一方、カルバコールによる平滑筋収縮は、両群間で変化を認めなかった。

(6) VCD マウス膣スメアのギムザ染色

膣スメア採取法にて、VCD 投与開始日から 212 ~ 218 日後の性周期をギムザ染色および鏡検にて判定したところ、性周期が正常である個体の割合は、Vehicle 群 85.7%、VCD 群 0%と既報とほぼ同様の結果が得られ、本研究で作成した VCD モデルは閉経モデルとして妥当であることが確認された。

(7) VCD マウスの排尿機能に対するエンリッチ環境の作用の解析

エンリッチ環境飼育群は、対照群であるスタンダード環境飼育群に比べ、閉経周辺期では明期中期から後期、閉経後では明期に加え、暗期中期において、VCD マウスの排尿回数を減少させることがわかった。

(8) 雌性 BALB/c マウスの排尿機能に対するクロペラスチンの作用の解析

クロペラスチンの慢性経口投与は、雌性 BALB/c マウスの覚醒下の排尿機能に感受性を示し、24 時間と暗期の排尿回数および総排尿量は対照群に比べクロペラスチン投与群で増加した。

麻酔下シングルシストメトリーによる膀胱内圧測定の結果、膀胱内圧は、対照群に比べクロペラスチン慢性経口投与群で低下した。

(9) VCD マウスの排尿機能に対するクロペラスチンの作用の解析

クロペラスチンの慢性経口投与は、VCD マウスの暗期中期における排尿活動に対して感受性を示し、閉経周辺期では、総排尿量が対照群に比べクロペラスチン投与群で増加傾向を示した。一方、閉経後では、1 回排尿時間が対照群に比べクロペラスチン投与群で有意に減少した。

(10) VCD マウスの排尿機能障害に対するエンリッチ環境の改善作用に関する中枢性および末梢性分子の探索

前頭前皮質において、Mef2c および Nr1i2 は、対照群に比べ VCD を投与しスタンダード環境で飼育した群（VCD-SE 群）で発現の増加を認め、VCD-SE 群に比べ VCD を投与しエンリッチ環境で飼育した群（VCD-EE 群）でその発現は低下した。一方、Crh は、対照群に比べ VCD-SE 群で発現の低下を認め、VCD-SE 群に比べ VCD-EE 群でその発現は増加した。

膀胱において、Crhbp、Crhr1、Lif および Npffr2 は、対照群に比べ VCD-SE 群で発現の増加を認め、VCD-SE 群に比べ VCD-EE 群でその発現は低下した。一方、Fgf9 および Fos は、対照群に比べ VCD-SE 群で発現の低下を認め、VCD-SE 群に比べ VCD-EE 群でその発現は増加した。

以上の結果から、VCD は雌性 BALB/c マウスの排尿機能に影響を及ぼすことが初めて明らかとなり、閉経周辺期以降の VCD マウスは、腹圧性尿失禁のモデル動物になり得る可能性が示唆された。さらに、エンリッチ環境の改善作用を指標とした探索実験で見出した分子は、腹圧性尿失禁に対する中枢性および末梢性の治療標的分子になり得る可能性も考えられ、今後は、これらの分子が排尿機能に如何に関与するのかについて詳細に検討していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 副田 二三夫、木村 一郎、工藤 寿未礼、佐藤 亜紀、古賀 貴之、戸田 晶久	4. 巻 30
2. 論文標題 薬物誘発性閉経モデルマウスの排尿機能に対するエンリッチ環境飼育の影響	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本排尿機能学会誌	6. 最初と最後の頁 247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 副田 二三夫、木村 一郎、工藤 寿未礼、佐藤 亜紀、古賀 貴之、廣村 信、三隅 将吾、高濱 和夫、戸田 晶久	4. 巻 29
2. 論文標題 薬物誘発性閉経モデルマウスの排尿機能に対するcapsaicinの影響	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本排尿機能学会誌	6. 最初と最後の頁 215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 副田 二三夫、戸田 晶久、橋本 龍昇、若山 晃祐、久保田 樹、古賀 貴之、廣村 信、三隅 将吾、高濱 和夫	4. 巻 28
2. 論文標題 マウス膀胱平滑筋条片の等尺性収縮反応に対するエンリッチ環境飼育の影響	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本排尿機能学会誌	6. 最初と最後の頁 205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 副田 二三夫、木村 一郎、工藤 寿未礼、佐藤 亜紀、古賀 貴之、戸田 晶久
2. 発表標題 薬物誘発性閉経モデルマウスの排尿機能に対するエンリッチ環境飼育の影響
3. 学会等名 第26回日本排尿機能学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田代 明寛、副田 二三夫、工藤 寿未礼、木村 一郎、佐藤 亜紀、江藤 祐里、古賀 貴之、戸田 晶久
2. 発表標題 薬物誘発性閉経モデルマウスの排尿機能に対する既存薬の影響
3. 学会等名 フォーラム2019：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村 一郎、副田 二三夫、工藤 寿未礼、佐藤 亜紀、古賀 貴之、三隅 将吾、高濱 和夫、戸田 晶久
2. 発表標題 マウスの排尿反射に対するクロペラスチンの経口投与の影響
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 若山 晃祐、副田 二三夫、橋本 龍昇、古賀 貴之、三隅 将吾、高濱 和夫、戸田 晶久
2. 発表標題 薬物誘発性閉経モデルマウスの排尿機能の解析
3. 学会等名 フォーラム2018：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 副田 二三夫、木村 一郎、工藤 寿未礼、佐藤 亜紀、古賀 貴之、廣村 信、三隅 将吾、高濱 和夫、戸田 晶久
2. 発表標題 薬物誘発性閉経モデルマウスの排尿機能に対するcapsaicinの影響
3. 学会等名 第25回日本排尿機能学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本 龍昇、副田 二三夫、若山 見祐、古賀 貴之、廣村 信、三隅 将吾、高濱 和夫、戸田 晶久
2. 発表標題 腹圧性尿失禁の新規モデルマウスの開発に関する基礎研究
3. 学会等名 第34回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 副田 二三夫、戸田 晶久、後藤 夏美、鮫島 慎乃介、古賀 貴之、三隅 将吾、高濱 和夫
2. 発表標題 エンリッチ環境効果を指標とした老齢マウスの夜間頻尿様症状の改善に關与する脳内分子の探索
3. 学会等名 フォーラム2017：衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 副田 二三夫、戸田 晶久、橋本 龍昇、若山 見祐、久保田 樹、古賀 貴之、廣村 信、三隅 将吾、高濱 和夫
2. 発表標題 マウス膀胱平滑筋条片の等尺性収縮反応に対するエンリッチ環境飼育の影響
3. 学会等名 第24回日本排尿機能学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	古賀 貴之 (KOGA Takayuki)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	戸田 晶久 (TODA Akihisa) (80172162)	第一薬科大学・薬学部・教授 (37107)	
連携研究者	高濱 和夫 (TAKAHAMA Kazuo) (80150548)	熊本保健科学大学・保健科学部・教授 (37409)	
連携研究者	三隅 将吾 (MISUMI Shogo) (40264311)	熊本大学・大学院生命科学研究部（薬）・教授 (17401)	