

令和 5 年 4 月 16 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09710

研究課題名（和文）新規ドラッグデリバリーシステムを用いたKv7チャンネル開口薬膀胱内注入の確立

研究課題名（英文）Intravesical Kv7 channel opener using new drug delivery system

研究代表者

本田 正史（Honda, Masashi）

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：20362890

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：電位依存性カリウム7（Kv7）チャンネル開口薬の下部尿路機能に果たす役割を検討する一連の研究の過程で、ghrelin経静脈投与のラット排尿反射への効果を検討した。

ウレタン麻酔下に連続膀胱内圧測定を行った。Ghrelinを経静脈的に投与し、投与前後の膀胱機能の変化を評価した。また、ghrelinの作用がopioid系を介するかどうか検討するため、ghrelinとnaloxoneの併用でも同様の研究を行った。Ghrelin投与は排尿間隔を延長し、この効果はnaloxoneで抑制された。以上よりghrelinは排尿反射をopioid系を介して抑制する事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の成果から、未だにその作用が十分に解明されていないghrelinが正常排尿反射に果たす役割が解明された。神経ペプチドghrelinの経静脈投与は、ラット正常排尿反射をopioidメカニズムを介して抑制する可能性が示唆された。

Ghrelinの経静脈投与による下部尿路機能以外の全身への作用は十分には判明していないものの、本研究成果は過活動膀胱などの下部尿路機能障害に対する新しい薬物療法を確立していく上で、重要な基盤になる知見であると考えている。

研究成果の概要（英文）：In a series of studies investigating the role of voltage-gated potassium 7 (Kv7) channel openers on lower urinary tract function, we investigated the effects of intravenous administration of ghrelin on the micturition reflex in rats.

Continuous cystometrograms were performed under urethane anesthesia. Ghrelin was administered intravenously to evaluate changes in bladder activity. Intravenous administration of ghrelin increased intercontraction interval. These inhibitory effects of ghrelin were antagonized by intravenous naloxone administration. These results show that ghrelin inhibits the micturition reflex through an opioid-dependent mechanism in rats.

研究分野：神経泌尿器科

キーワード：下部尿路機能 膀胱内圧測定 受容体 神経ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本における40歳以上の過活動膀胱 (overactive bladder : OAB) 患者は1,040万人と推定されており、またOABは生活の質に大きく影響を与えることが知られている。OABの主たる治療は抗コリン薬や β_3 受容体作動薬であるが、効果が不十分な場合や副作用で内服継続が困難な症例も少なくない。実際、抗コリン薬の6ヶ月以上の内服継続率は18~28%と非常に低い。以上より、慢性疾患であるOABに対する治療として、安全で長期間の継続が可能な新規治療薬および治療法の開発が求められている。

(2) 研究代表者は、OAB等の下部尿路機能障害に対する新規治療薬および治療法の臨床応用を目指し、下部尿路機能に関与する受容体等に関する基礎研究を行ってきた。これらの一連の成果として、sensory neuron specific receptor (SNSR)、somatostatin受容体サブタイプ4 (sst4)、glutamate transporter、glycine transporter、anandamide transporter、galaninの正常下部尿路機能および下部尿路機能障害における役割を解明してきた。

(3) これらの基礎研究を進める中で、研究代表者は電位依存性カリウム7 (Kv7) チャンネルに着目した。電位依存性カリウム (Kv) チャンネルは、筋細胞、神経細胞等の興奮性細胞において、自動能、興奮の発生・維持および再分極相の形成に大きな役割を担っており、平滑筋細胞の興奮の制御に最も重要な役割を持っている。また、膀胱平滑筋にはKvチャンネルのうちKv7チャンネルが分布し、Kv7チャンネル開口薬が膀胱平滑筋収縮に影響を与える可能性があることが等尺性張力実験で示されている。このように過活動膀胱等の下部尿路機能障害の治療標的としてKv7チャンネルは大きな可能性を有していると考えている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、申請者が現在まで行ってきた正常下部尿路機能および下部尿路機能障害に関する基礎研究手法を用いて、膜融合性リポソームを用いた新規ドラッグデリバリーシステムによる電位依存性カリウム7 (Kv7) チャンネル開口薬膀胱内注入の有効性を包括的に明らかにする事であり、この研究を推進するために必要な過程として、既に予備実験で実験系が確立し、一定の効果が確認されていた神経ペプチドghrelinを用いて、ghrelinの正常下部尿路機能への影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 使用動物

研究には12週齢の雌Sprague-Dawley (SD) ラットを用いた。体重は228~252gであった。

(2) 使用薬剤

Ghrelin (Tocris Bioscience社) を使用した。経静脈投与の際はghrelinを生理食塩水 (0.9% NaCl) へ溶解した。

(3) 正常ラット排尿反射に対するghrelin経静脈投与の効果に関する検討

2%イソフルレン麻酔下にPE-50カテーテルを膀胱頂部に留置した。このPE-50カテーテルに三方活栓を接続し、一方に膀胱内に生理食塩水を持続注入するためのシリンジを接続し、もう一方に膀胱内圧を測定するための圧トランスデューサーを接続した。この圧力はPowerlab (AD Instruments社) を介して記録した。引き続きウレタン麻酔 (1.2 g/kg、皮下注) 下に連続膀胱内圧測定 (生理食塩水注入速度: 0.04 mL/min) を施行した。排尿状態が安定するまで約2時間の膀胱内圧測定を行い、引き続きvehicle (生理食塩水) またはghrelin (300、600、900 μ g/kg、各6頭) を経静脈投与し、投与前後の膀胱内圧測定の各パラメーターを測定した。Ghrelinは1回の投与量を0.1 mL/100gの生理食塩水に溶解し経静脈的に投与した。またghrelinの効果がおpioidメカニズムを介して作用するかどうかを評価する目的で、ghrelin (900 μ g/kg) を経静脈投与する前にnaloxone hydrochloride (3 mg/kg、Tocris Bioscience社) を投与し、上記と同様に投与前後の膀胱内圧測定の各パラメーターを測定した。膀胱内圧測定のパラメーターは排尿間隔 (intercontraction interval: ICI)、静止時膀胱圧 (baseline pressure: BP)、排尿閾値圧 (threshold pressure: TP)、最大排尿圧 (maximum pressure: MP) とし、投与前後のパラメーターの比較にはstudent's paired *t* test、vehicle投与群と薬剤投与群の比較にはone-way ANOVAを用いて検定を行い、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

(4) 正常ラット排尿反射へのghrelinの効果に対するnaloxoneの影響に関する検討

2%イソフルレン麻酔下にPE-50カテーテルを膀胱頂部に留置した。このPE-50カテーテルに三方活栓を接続し、一方に膀胱内に生理食塩水を持続注入するためのシリンジを接続し、もう一方に膀胱内圧を測定するための圧トランスデューサーを接続した。この圧力はPowerlab (AD Instruments社) を介して記録した。引き続きウレタン麻酔 (1.2 g/kg、皮下注) 下に連続膀胱

内圧測定（生理食塩水注入速度：0.04 mL/min）を施行した。排尿状態が安定するまで約2時間の膀胱内圧測定を行い、引き続き vehicle（生理食塩水）または ghrelin（300、600、900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、各6頭）を経静脈投与し、投与前後の膀胱内圧測定の各パラメーターを測定した。Ghrelin は1回の投与量を 0.1 mL/100 g の生理食塩水に溶解し経静脈的に投与した。また ghrelin の効果が opioid メカニズムを介して作用するかどうかを評価する目的で、ghrelin（900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）を経静脈投与する前に naloxone hydrochloride（3 mg/kg、Tocris Bioscience 社）を投与し、上記と同様に投与前後の膀胱内圧測定の各パラメーターを測定した。膀胱内圧測定のパラメーターは排尿間隔（intercontraction interval: ICI）、静止時膀胱圧（baseline pressure: BP）、排尿閾値圧（threshold pressure: TP）、最大排尿圧（maximum pressure: MP）とし、投与前後のパラメーターの比較には student's paired *t* test、vehicle 投与群と薬剤投与群の比較には one-way ANOVA を用いて検定を行い、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 正常ラット排尿反射に対する ghrelin 経静脈投与の効果（表1および図1）

Ghrelin 経静脈投与は排尿間隔（intercontraction interval: ICI）を容量依存性に有意に増加させた。また Ghrelin 経静脈投与は排尿閾値圧（threshold pressure: TP）も容量依存性に有意に増加させた。しかし Ghrelin 経静脈投与は静止時膀胱圧（baseline pressure: BP）および最大排尿圧（maximum pressure: MP）には有意な影響を与えなかった。vehicle（生理食塩水）の経静脈投与は排尿間隔（intercontraction interval: ICI）、静止時膀胱圧（baseline pressure: BP）、排尿閾値圧（threshold pressure: TP）、最大排尿圧（maximum pressure: MP）に有意な影響を与えなかった。

(2) 正常ラット排尿反射への ghrelin の効果に対する naloxone の影響（表1および図2）

Ghrelin 経静脈投与による排尿反射抑制効果は、naloxone hydrochloride の前投与により抑制された。以上よりウレタン麻酔下正常ラットにおいて ghrelin 経静脈投与は、opioid メカニズムを介して排尿反射を抑制する事が示唆された。

(3) 以上の結果より、ghrelin 経静脈投与は正常下部尿路機能に対して一定の効果をもつことが示唆され、ghrelin は、OAB などの下部尿路機能障害のための新しい治療標的になる可能性をもつと考えられた。

表1 正常ラット排尿反射に対する ghrelin 単独、ghrelin と naloxone 併用の効果

Variable	Placebo	Ghrelin (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ghrelin (600 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ghrelin (900 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	Naloxone (3 mg/kg) and ghrelin (900 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
Number of rats					
Mean \pm SD					
ICI, %	98.9 \pm 1.3	121.0 \pm 3.4 [†]	143.3 \pm 3.4 [†]	157.4 \pm 11.5 [†]	101.8 \pm 4.2
BP, cmH ₂ O					
before treatment	2.84 \pm 0.47	2.85 \pm 0.37	2.78 \pm 0.27	2.96 \pm 0.47	3.11 \pm 0.33
after treatment	2.88 \pm 0.39	2.73 \pm 0.12	2.81 \pm 0.16	2.93 \pm 0.45	3.10 \pm 0.22
TP, cmH ₂ O					
before treatment	6.94 \pm 1.16	7.05 \pm 1.15	6.92 \pm 0.90	6.95 \pm 1.20	6.96 \pm 1.46
after treatment	6.99 \pm 1.06	11.1 \pm 0.76 ^{*†}	15.0 \pm 1.33 ^{*†}	18.3 \pm 2.07 ^{*†}	7.09 \pm 1.15
MP, cmH ₂ O					
before treatment	28.5 \pm 6.20	30.5 \pm 4.34	28.6 \pm 5.01	28.6 \pm 3.97	28.7 \pm 4.13
after treatment	28.5 \pm 5.95	30.1 \pm 2.83	28.3 \pm 3.66	29.7 \pm 7.3	28.4 \pm 5.31

SD – standard deviation; ICI – intercontraction interval; BP – basal pressure; TP – threshold pressure; MP – maximum pressure
 $p < 0.01$ (paired *t*-test); [†] $p < 0.05$ vs placebo injection (Dunnett's multiple comparison test)

図1 連続膀胱内圧測定：正常ラット排尿反射に対する ghrelin 単独の効果

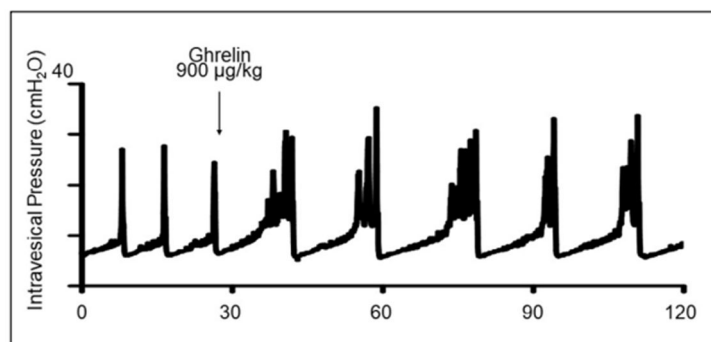
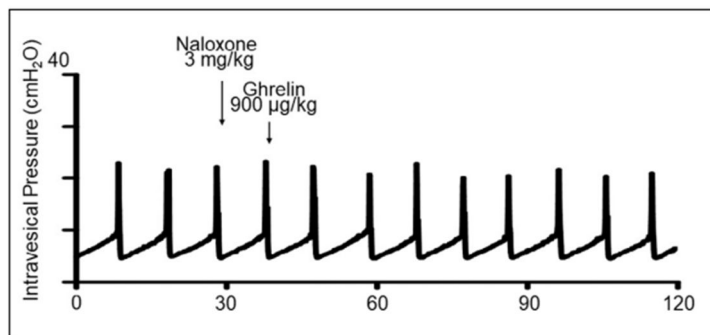


図2 連続膀胱内圧測定：正常ラット排尿反射に対する ghrelin と naloxone 併用の効果



< 引用文献 >

- Honda M, et al. BJU Int 109: 628-633, 2012.
- Honda M et al. Neurourol Urodyn 32: 1026-1030, 2013.
- Honda M et al. Urology 82: 1188.e9-13, 2013.
- Honda M et al. Int Urol Nephrol 46: 1953-1959, 2014.
- Honda M et al. Int Urol Nephrol 48: 349-354, 2016.
- Honda M et al. Int Urol Nephrol 48: 1407-1412, 2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Honda M, Tsounapi P, Teraoka S, Kimura Y, Hikita K, Takenaka A	4. 巻 72
2. 論文標題 Effects of intravesical administration of sensory neuron-specific receptor agonist on voiding function in rats with cyclophosphamide-induced cystitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cent European J Urol	6. 最初と最後の頁 142-148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5173/ceju.2019.1949.	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 Honda M, Shimizu R, Nishikawa R, Teraoka S, Tsounapi P, Kimura Y, Morizane S, Hikita K, Takenaka A	4. 巻 74
2. 論文標題 Potential role of ghrelin on the micturition reflex in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cent European J Urol	6. 最初と最後の頁 185-189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5173/ceju.2021.0022	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Honda M, Shimizu R, Teraoka S, Nishikawa R, Kimura Y, Tsounapi P, Iwamoto H, Morizane S, Hikita K, Takenaka A
2. 発表標題 Activation of group I and III metabotropic glutamate receptors influences the micturition reflex in urethane-anesthetized rats
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Honda M, Shimizu R, Teraoka S, Nishikawa R, Kimura Y, Tsounapi P, Iwamoto H, Morizane S, Hikita K, Takenaka A
2. 発表標題 Inhibitory effect of ghrelin on micturition reflex in urethane-anesthetized rats
3. 学会等名 35th Annual European Urological Association Congress 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Honda M, Teraoka S, Kimura Y, Panagiota T, Shimizu S, Shimizu T, Morizane S, Hikita K, Saito M, Takenaka A
2. 発表標題 Supraspinal and spinal effects of group I and III metabotropic glutamate receptor agonists on the micturition reflex in rats
3. 学会等名 International Continence Society Annual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Honda M, Kimura Y, Tsounapi P, Hikita K, Saito M, Takenaka A
2. 発表標題 Ghrelin-mediated regulation of the micturition reflex in urethane anesthetized rats
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	武中 篤 (Takenaka Atsushi) (50368669)	鳥取大学・医学部・教授 (15101)	
研究分担者	引田 克弥 (Hikita Katsuya) (50403407)	鳥取大学・医学部附属病院・特命准教授 (15101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------