

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462513

研究課題名(和文)新規受容体SNSRを介する排尿機能調節機構の解明

研究課題名(英文)The role of sensory neuron-specific receptor in the regulation of micturition reflex

研究代表者

本田 正史 (HONDA, Masashi)

鳥取大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20362890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：最近同定された新規受容体sensory neuron-specific receptor (SNSR)はG蛋白質共役受容体であり、脊髄後根神経節および三叉神経節の小型細胞で同定されており、侵害受容反応に関与することが報告されている。本研究課題では、選択的rSNSR1アゴニストであるBAM8-22の経静脈的、脊髄腔内投与は有意に正常ラット排尿反射を抑制することを解明した。また、BAM8-22膀胱内注入は正常ラット排尿反射を抑制し、シクロホスファミド誘発膀胱過活動に改善効果を示すことを見出した。SNSRは排尿障害治療における新しい治療標的になりうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A novel family of G-protein-coupled receptors has been identified in rat dorsal root ganglia and named as sensory neuron-specific receptors (SNSRs). Intravenous or intrathecal administration of BAM8-22, a selective rat SNSR1 agonist, can suppress cyclophosphamide-induced bladder overactivity, probably due to suppression of bladder afferent activity. In urethane-anesthetized rats, intravesical administration of BAM8-22 can ameliorate cyclophosphamide-induced bladder overactivity via suppression of capsaicin sensitive C-fiber afferent pathways in rats. Thus, SNSRs could be an effective target for the treatment of bladder dysfunction such as overactive bladder and bladder pain syndrome/interstitial cystitis, for which C-fiber afferent hyperexcitability has been proposed to be an important pathophysiological basis.

研究分野：神経泌尿器科

キーワード：下部尿路機能障害 新規受容体 SNSR シクロホスファミド誘発膀胱炎 膀胱内圧測定

## 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患者は810万人と推定されており、生活の質に大きく影響を与えることが知られている。過活動膀胱の主たる治療は抗コリン薬や $\alpha$ 3アゴニスト製剤であるが、効果が不十分であったり、副作用で内服継続が困難な症例も多い。実際、抗コリン薬の6か月以上の内服継続率は18~28%と非常に低い。以上より、慢性疾患である過活動膀胱に対する治療として、より有効性が高く、安全で、長期間の治療継続が可能な新規治療薬の開発が求められている。そのためには、正常排尿機能に関わる反射経路およびそれに関わる新しい受容体、神経伝達物質、神経ペプチド等の解明と過活動膀胱を引き起こす各種病態でのそれらの機能的変化について包括的に基礎研究を進めていくことが必要である。

(2) 研究代表者および研究分担者は、正常ラットの下部尿路機能に関わる受容体、神経伝達物質、神経ペプチドの研究を行ってきており、これまでに、ソマトスタチン受容体サブタイプ4、グルタミン酸トランスポーター、グリシントランスポーター、アナンダマイドトランスポーター、ガラニンの下部尿路機能における役割について解明し、国内および国際学会、国際学術雑誌で報告してきた。

(3) 研究代表者は最近同定された sensory neuron-specific receptor (SNSR) のうち rSNSR1 に着目し、この受容体がラット排尿反射に果たす役割について先駆的に基礎研究に取り組んできた。rSNSR1 は G 蛋白質共役受容体で、脊髄後根神経節および三叉神経節の小型細胞で同定されており、侵害受容反応に関与することが報告されている。研究代表者は、rSNSR1 の選択的アゴニストである bovine adrenal medulla 8-22 (BAM8-22) をウレタン麻酔下に Sparague-Dawley (SD) ラットに経静脈的および脊髄腔へ投与し、容量依存的に排尿間隔および排尿閾値圧を増加させ、また、BAM8-22 の抑制効果はカプサイシン前処置ラットでも同様に認められることを見出した。このことは rSNSR1 の活性化はカプサイシン感受性 C 線維以外の経路を介してラット正常排尿反射を抑制する作用を有することを示している。

(4) しかし、下部尿路機能における rSNSR1 の役割について、排尿筋過活動を起こす病態モデルでの rSNSR1 の機能的変化など、解明すべき点も多く存在する。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、ラット正常下部尿路機能及び下部尿路機能障害における rSNSR1 の役割を包括的に解明することを目的に、シクロホスファミド誘発膀胱炎モデルにみられる排尿筋過活動に対する rSNSR1 アゴニスト投

与の効果、および rSNSR1 アゴニスト膀胱内注入がラット正常排尿反射、下部尿路機能障害に与える影響について詳細な検討を行った。

## 3. 研究の方法

(1) シクロホスファミド誘発膀胱炎モデルに対する rSNSR1 アゴニストの経静脈的および脊髄腔内投与の効果に関する検討

実験動物として、雌 SD ラット (体重 235-258g) を用いた。2%イソフルレン麻酔下にシクロホスファミド (200mg/kg) を腹腔内投与し、シクロホスファミド誘発膀胱炎モデルを作成。シクロホスファミドまたはコントロール群として同量の生理食塩水を腹腔内投与した 48 時間後に連続膀胱内圧測定を施行した。ウレタン麻酔下に 2%イソフルレン麻酔下に PE-60 カテーテルを膀胱頂部に留置。この PE-60 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。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。排尿状態が安定するまで約 1.5-2 時間の膀胱内圧測定を行い、その後選択的 rSNSR1 アゴニストである BAM8-22 (Tocris Cookson 社) を経静脈的 (10, 30, 100  $\mu$ g、各 6 頭) もしくは脊髄腔 (0.03, 0.1, 0.3  $\mu$ g、各 6 頭) に投与し、投与前後の膀胱内圧測定の各パラメーターを測定した。経静脈的投与は PE-10 カテーテルを右頸静脈に留置して施行した。脊髄腔内投与のための PE-10 カテーテルは膀胱内圧測定の 3 日前にイソフルレン麻酔下に第 11 胸椎の高さから第 6 腰椎から第 1 仙椎の高さのクモ膜下腔に留置した。脊髄腔内へは BAM8-22 投与量を生理食塩水 2  $\mu$ l に溶解して投与し、投与後にカテーテルを 7  $\mu$ l でゆっくりとフラッシュした。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 (pressure threshold: PT)、最大排尿圧 (maximum voiding pressure: MVP) 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。

(2) ラット正常排尿反射に対する rSNSR1 アゴニスト膀胱内注入の効果に関する検討

実験動物として、雌 SD ラット (体重 238-250g) を用いた。ウレタン麻酔下に 2%イソフルレン麻酔下に PE-60 カテーテルを膀胱頂部に留置。この PE-60 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。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。排尿状態が安定するまで約 1.5-2 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 BAM8-22 (100, 300, 1000 nM、各 8 頭) を 0.04 ml/min の注入速度で持続注入し、投与前後の膀胱内圧測定の各パラメーターを測定した。また、BAM8-22 の効果がカプサイシン感受性 C 線維を介するかどうかを評価する目的で、膀胱内圧測定 4 日前にカプサイシン前処置 (125 mg/kg、皮下注) を行った SD ラットを用いて同様の実験を行った。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 (pressure threshold: PT)、最大排尿圧 (maximum voiding pressure: MVP) 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。

(3) シクロホスファミド誘発膀胱炎モデルに対する rSNSR1 アゴニスト膀胱内注入の効果に関する検討

実験動物として、雌 SD ラット (体重 230-246g) を用いた。2%イソフルレン麻酔下にシクロホスファミド (200mg/kg) を腹腔内投与し、シクロホスファミド誘発膀胱炎モデルを作成。シクロホスファミドまたはコントロール群として同量の生理食塩水を腹腔内投与した 48 時間後に連続膀胱内圧測定を施行した。ウレタン麻酔下に 2%イソフルレン麻酔下に PE-60 カテーテルを膀胱頂部に留置。この PE-60 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。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。排尿状態が安定するまで約 1.5-2 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 BAM8-22 (300, 1000, 3000 nM、各 6 頭) を 0.04 ml/min の注入速度で持続注入し、投与前後の膀胱内圧測定の各パラメーターを測定した。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 (pressure threshold: PT)、最大排尿圧 (maximum voiding pressure: MVP) 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) シクロホスファミド誘発膀胱炎モデルに対する rSNSR1 アゴニストの経静脈的および脊髄腔内投与の効果

シクロホスファミド投与群はコントロール (生理食塩水) 投与群と比較して有意に静止時膀胱圧 (BP) が上昇し、排尿間隔 (ICI) が減少した。シクロホスファミド投与群に対する BAM8-22 の経静脈的投与は、容量依存的に有意に排尿間隔 (ICI) を増加させた (図 1、図 2、表 1)。また、シクロホスファミド投与群に対する BAM8-22 の脊髄腔内投与は、容量依存的に有意に排尿間隔 (ICI) を増加させた (図 1、図 2、表 1)。

図 1. 連続膀胱内圧測定図: シクロホスファミド誘発膀胱炎モデルに対する BAM8-22 の (A) 経静脈的、(B) 脊髄腔内投与の効果

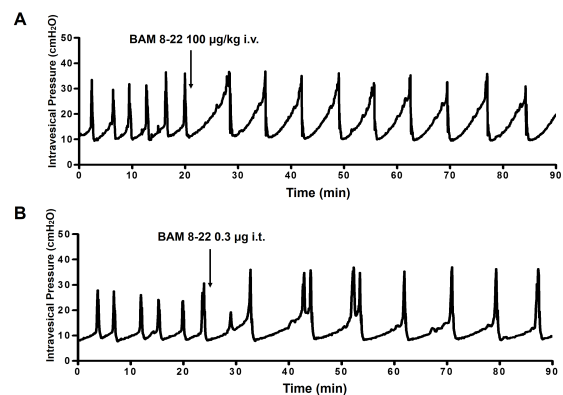


図 2. シクロホスファミド誘発膀胱炎モデルの排尿間隔 (ICI) に対する BAM8-22 の (A) 経静脈的、(B) 脊髄腔内投与の効果

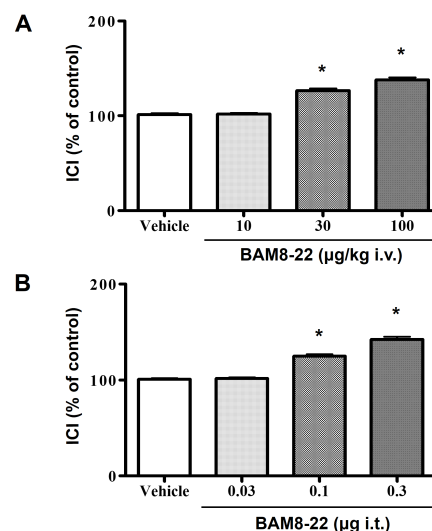


表 1. シクロホスファミド誘発膀胱炎モデルに対する BAM8-22 の (A) 経静脈的、(B) 脊髄腔内投与の効果

**A**

Variable	Vehicle	BAM8-22, $\mu\text{g}/\text{kg}$		
		10	30	100
Number of rats	6	6	6	6
Mean $\pm$ SD				
ICI, min				
before treatment	3.44 $\pm$ 0.60	3.52 $\pm$ 0.56	3.79 $\pm$ 0.52	3.64 $\pm$ 0.39
after treatment	3.48 $\pm$ 0.55	3.58 $\pm$ 0.55	4.81 $\pm$ 0.81 <sup>†</sup>	5.00 $\pm$ 0.44 <sup>†</sup>
BP, $\text{cmH}_2\text{O}$				
before treatment	7.45 $\pm$ 1.12	7.58 $\pm$ 0.65	7.50 $\pm$ 0.99	7.55 $\pm$ 0.96
after treatment	7.46 $\pm$ 1.06	7.57 $\pm$ 0.76	7.60 $\pm$ 0.97	7.60 $\pm$ 0.94
PT, $\text{cmH}_2\text{O}$				
before treatment	10.41 $\pm$ 0.93	10.80 $\pm$ 1.17	10.70 $\pm$ 1.11	10.71 $\pm$ 1.43
after treatment	10.75 $\pm$ 0.92	11.36 $\pm$ 0.92	13.25 $\pm$ 1.56 <sup>†</sup>	15.40 $\pm$ 1.65 <sup>†</sup>
MVP, $\text{cmH}_2\text{O}$				
before treatment	39.2 $\pm$ 5.27	39.2 $\pm$ 4.81	39.3 $\pm$ 2.70	39.4 $\pm$ 4.98
after treatment	38.9 $\pm$ 5.79	39.6 $\pm$ 4.93	40.5 $\pm$ 3.55	40.6 $\pm$ 5.82

**B**

Variable	Vehicle	BAM8-22, $\mu\text{g}$		
		0.03	0.1	0.3
Number of rats	6	6	6	6
Mean $\pm$ SD				
ICI, min				
before treatment	3.63 $\pm$ 0.73	3.60 $\pm$ 0.80	3.21 $\pm$ 0.48	3.33 $\pm$ 0.66
after treatment	3.66 $\pm$ 0.75	3.66 $\pm$ 0.79	3.98 $\pm$ 0.50	4.74 $\pm$ 0.90 <sup>††</sup>
BP, $\text{cmH}_2\text{O}$				
before treatment	7.68 $\pm$ 0.99	7.78 $\pm$ 1.05	7.67 $\pm$ 0.97	7.37 $\pm$ 0.84
after treatment	7.75 $\pm$ 0.92	7.81 $\pm$ 1.07	7.94 $\pm$ 0.86	7.67 $\pm$ 0.92
PT, $\text{cmH}_2\text{O}$				
before treatment	9.87 $\pm$ 0.78	9.25 $\pm$ 1.50	8.95 $\pm$ 1.27	10.52 $\pm$ 0.98
after treatment	9.77 $\pm$ 0.58	9.19 $\pm$ 1.40	11.62 $\pm$ 1.83 <sup>†</sup>	15.28 $\pm$ 1.68 <sup>†</sup>
MVP, $\text{cmH}_2\text{O}$				
before treatment	40.1 $\pm$ 3.54	40.2 $\pm$ 4.89	39.5 $\pm$ 3.10	42.4 $\pm$ 5.35
after treatment	40.1 $\pm$ 3.36	40.3 $\pm$ 4.75	41.5 $\pm$ 3.52	43.7 $\pm$ 5.41

<sup>†</sup> p < 0.01 (paired t-test); <sup>††</sup> p < 0.01, <sup>†††</sup> p < 0.05 vs. vehicle injection (Dunnett's multiple comparison test).

シクロホスファミド投与群に対する vehicle (生理食塩水) の経静脈的もしくは脊髄腔内投与では、膀胱内圧測定各パラメーターに有意な変化は認められなかった。

#### (2) ラット正常排尿反射に対する rSNSR1 アゴニスト膀胱内注入の効果

BAM8-22 の膀胱内注入では、排尿間隔 (ICI) および排尿閾値圧 (pressure threshold: PT) を有意に増加した。しかし、BAM8-22 の膀胱内注入は、それ以外の静止時膀胱圧 (BP)、最大排尿圧 (MVP) には有意な変化を示さなかった。また、BAM8-22 膀胱内注入の排尿反射抑制効果は、カプサイシン前処置ラット群にもおいても同様に認められた。これらの結果より、ウレタン麻酔下ラットにおいて、rSNSR1 選択的アゴニストである BAM8-22 の膀胱内注入は、カプサイシン感受性 C 線維以外の求心性神経経路を介して排尿反射を抑制する可能性が示唆された。

#### (3) シクロホスファミド誘発膀胱炎モデルに対する rSNSR1 アゴニスト膀胱内注入の効果

シクロホスファミド投与群はコントロール (生理食塩水) 投与群と比較して有意に静止時膀胱圧 (BP) が上昇し、排尿間隔 (ICI) が減少した。シクロホスファミド投与群に対する BAM8-22 の膀胱内注入では、1000 nM 以上の投与で排尿間隔 (ICI) を有意に増加した。しかし、BAM8-22 の膀胱内注入は、静止時膀胱圧 (BP)、最大排尿圧 (MVP) には有意な変化を示さなかった。また、シクロホスファミド投与群に対する vehicle (生理食塩水) の膀胱内注入では、排尿間隔 (ICI)、静止時膀胱圧 (BP)、排尿閾値圧 (pressure threshold: PT)、最大排尿圧 (MVP) に有意な変化がみられなかった。BAM8-22 膀胱内注入のシクロホスファミド誘発膀胱過活動に対する効果は、カプサイシン感受性 C 線維以外の求心性神経経路を介して排尿反射を抑制する可能性が示唆された。この結果および結果 (1) より、rSNSR1 は下部尿路機能障害においても一定の役割を持つことが考えられ、SNSRs は過活動膀胱や間質性膀胱炎等の下部尿路機能障害に対する新規の治療標的になりうる可能性が示唆された。

(4) 新規薬剤の臨床応用を考えた場合、経静脈的または経口投与では全身性の副作用が危惧され、脊髄腔内投与は侵襲的治療となる。一方、下部尿路機能障害に対する膀胱内注入は、標的臓器 (膀胱) に直接吸収されることで効果を示し、全身性の副作用の軽減を図ることも可能なため、理想的な薬剤投与方法の一つと考えられる。しかし、今回の研究では、rSNSR1 の選択的アゴニスト膀胱内注入が排尿反射に影響を与えるためには高用量の薬剤を必要とする点が克服すべき課題となっている。そのため、SNSR 膀胱内注入の臨床応用を考えていく上で、膀胱組織内に効率的に吸収される方法を今後、多角的、系統的に解明していくことが課題であると考えられる。

#### 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)

Honda M, Yoshimura N, Kawamoto B, Kobayashi N, Hikita K, Muraoka K, Saito M, Sejima T, Chancellor MB, Takenaka A: Effects of sensory neuron-specific receptor agonist on bladder function in a rat model of cystitis induced by cyclophosphamide. 査読有, Int. Urol. Nephrol. 46(10); 1953-1959, 2014. DOI:10.1007/s11255-014-0734-x

[学会発表] (計 5 件)

Honda M, Yoshimura N, Kawamoto B, Panagiota T, Shimizu S, Morizane S, Hikita K, Muraoka K, Shimizu T, Sejima

T, Saito M, Chancellor MB, Takenaka A:  
Intravesical administration of sensory  
neuron-specific receptor agonist  
suppresses cyclophosphamide-induced  
bladder overactivity. American  
Urological Association Annual Meeting  
2016, 2016.5.9, San Diego (USA)  
Honda M, Yoshimura N, Hirano S, Kawamoto  
B, Shimizu S, Tsounapi P, Hikita K,  
Muraoka K, Saito M, Chancellor MB,  
Takenaka A: Effects of intravesical  
administration of sensory  
neuron-specific receptor agonist on  
voiding function in rats with  
cyclophosphamide induced-cystitis.  
44th Annual Meeting of the International  
Continence Society, 2014.10.23, Rio de  
Janeiro (Brazil)  
Honda M, Hirano S, Kawamoto B, Shimizu  
S, Kobayashi N, Hikita K, Muraoka K,  
Saito M, Sejima T, Takenaka A,  
Chancellor MB, Yoshimura N:  
Intravesical administration of sensory  
neuron-specific receptor agonist  
inhibits the micturition reflex of  
anesthetized rats. American Urological  
Association Annual Meeting 2014,  
2014.5.17, Orland (USA)  
Honda M, Yoshimura N, Kawamoto B, Inoue  
S, Kobayashi N, Hikita K, Muraoka K,  
Saito M, Chancellor MB, Sejima T,  
Takenaka A: Inhibitory effects of  
intravesical administration of sensory  
neuron-specific receptor agonist on the  
micturition reflex in rats. 43rd Annual  
Meeting of the International Continence  
Society, 2013.8.30, Barcelona (Spain)  
本田 正史、吉村 直樹、川本 文弥、井  
上 誠也、引田 克弥、日向 信之、村岡  
邦康、Tsounapi Panagiota、磯山 忠広、  
Michael Chancellor、武中 篤：  
Cyclophosphamide 誘発膀胱過活動に対す  
る sensory neuron-specific receptor  
agonist の効果。第 101 回日本泌尿器科学  
会総会、2013 年 4 月 26 日、さっぽろ芸術  
文化の館（北海道・札幌市）

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

本田 正史 (HONDA, Masashi )  
鳥取大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号： 2 0 3 6 2 8 9 0

### (2)研究分担者

武中 篤 (TAKENAKA, Atsushi )  
鳥取大学・医学部・教授  
研究者番号： 5 0 3 6 8 6 6 9

齊藤 源顕 (SAITO, Motoaki )

高知大学・医歯学系・教授  
研究者番号： 6 0 2 7 3 8 9 3