

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861421

研究課題名(和文) EAATを介する中枢性排尿調節メカニズムの包括的解明

研究課題名(英文) Elucidation of central urination regulatory mechanisms through the EAAT

研究代表者

引田 克弥 (Hikita, Katsuya)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：50403407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ウレタン麻酔下ラットに、グルタミン酸トランスポーターの非選択的阻害剤を髄腔内投与、脳室内投与し、排尿反射を抑制することを確認した。グルタミン酸トランスポーターのサブタイプ毎に同様の実験を施行したが、薬剤親和性の問題で至適投与量の決定に難渋した。興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸が排尿反射に影響を与えるには抑制性神経伝達物質であるグリシンのシナプス間物質の関与も報告されており、こちらを検討することとした。グリシントランスポーターGlyT-1の選択的阻害剤であるALX5407を用い、脳室内投与、髄腔内投与を行い、GlyT-1の脊髄レベルでの抑制が、排尿反射を抑制することを解明した。

研究成果の概要(英文)：Intrathecal and intraventricular administration of nonselective glutamate transporters inhibitors were confirmed to suppress the micturition reflex in urethane anesthetized rats. We performed a similar experiment for each of the sub-type of glutamate transporters, but were difficult to determining the optimal dose in the drug affinity. It was reported that glutamic acid is an excitatory neurotransmitter in the micturition reflex and glycine is an inhibitory neurotransmitter. In synapse of central nervous system, the concentration of the glutamic acid and glycine are involved in urinary reflex. So, we used ALX5407, a selective inhibitor of glycine transporter GlyT-1, to access the effect of the micturition reflex in urethane anesthetized rats. Intraventricular administration of ALX5407, there were no significant change in the micturition reflex. On the other hand, intrathecal administration, inhibition at GlyT-1 in the spinal level was elucidated to suppress the micturition reflex.

研究分野：排尿機能

キーワード：トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

(1) 蓄尿と排尿の相反する機能を円滑に行うため、膀胱と尿道は、末梢神経路と中枢神経路を介した複雑な制御を受けている。蓄尿反射は主として脊髄レベルの反射によって制御され、交感神経と体性神経の興奮によりそれぞれ膀胱の弛緩、尿道の収縮が起こる。排尿反射は膀胱の伸展刺激が中枢に伝達され、脳幹部橋排尿中枢の興奮が起き、副交感神経の興奮を介する膀胱の収縮と尿道の弛緩が起きると考えられている。

(2) グルタミン酸は中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質として知られている。排尿反射において、グルタミン酸は、興奮と抑制両者の制御に関与していると考えられている。グルタミン酸は、神経伝達を効率的に行うため、シナプスにおけるグルタミン酸濃度は細胞膜上に存在するグルタミン酸輸送体 (Excitatory Amino Acid Transporter: EAAT) により常に低濃度に維持されている。これまでに5種類のEAATのサブタイプ (GLAST:EAAT1, GLT-1:EAAT2, EAAC-1:EAAT3, EAAT4, EAAT5) が同定されている。主としてEAAT1は小脳のペルクマンガリアに、EAAT2は大脳皮質やアストロサイトに、EAAT3は大脳皮質や海馬の神経細胞に、EAAT4は小脳プルキンエ細胞に、EAAT5は網膜に存在している。EAATの機能、発現制御は様々な神経疾患 (脳卒中、てんかん、アルツハイマー病、エイズ関連痴呆、Huntington 舞蹈病、筋萎縮性側索硬化症、悪性神経膠腫など) との関連が示唆されている。しかし現在までのところ、EAATが排尿反射を制御する神経機構の調節に関与しているかについて詳細な報告は無い。

(3) これまでに研究代表者らは、EAATの非選択的阻害剤であるL-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid (L-trans-PDC)を用い、ウレタン麻酔下ラットにおけるEAATの排尿に関する影響を検討してきた。ウレタン麻酔下ラットに対し、L-trans-PDCを髄腔内、脳室内にそれぞれ投与することにより、排尿反射を抑制する可能性を報告している。しかし、EAATサブタイプすべてを抑制することより、排尿反射以外の反射経路に影響を与えている可能性があり、その結果として排尿反射が抑制されている可能性もある。また、麻酔薬のグルタミン酸伝達に関する影響も指摘されており、覚醒時には異なる反応を示す可能性もあり解明すべき点も多く存在する。

2. 研究の目的

本研究では、ウレタン麻酔下ラット、覚醒

ラット両群で、網膜に存在するEAAT5を除くEAAT1-4におけるそれぞれの阻害剤を投与し、排尿反射に与える影響を検討するとともに、排尿反射以外への影響について検討をおこなった。

3. 研究の方法

(1) 髄腔内カテーテルの留置 (髄腔内投与群)

250gの雌Sprague-Dawleyラットを使用。実験3日前に麻酔下 (ウレタン使用) に腰部背部を正中切開し、第11胸椎椎弓を切開し、硬膜に小孔を開け、ヘパリン加生理食塩水を満たしたカテーテル (PE-10) を仙髄レベルに留置。カテーテルは皮下に埋没

(2) 膀胱内圧測定用カテーテルの留置

麻酔下 (ウレタン使用) に下腹部正中切開を行い、膀胱頂部にヘパリン加生理食塩水を満たしたカテーテル (PE-60) を留置。圧力変換器とアンプを接続し、膀胱内圧測定。

(3) 脳室内投与のためのインジェクター留置 (脳室内投与群)

250gの雌Sprague-Dawleyラットを使用。麻酔下 (ウレタン使用) に脳定位保定装置に保定し、頭蓋骨を露出させる。側脳室投与 (ブレグマと頭蓋骨よりL+0.8, H-3.5, AP-0.8) とし、10 μ lのハミルトンシリンジを取り付けた30G定位マイクロインジェクターを留置。

(4) 呼吸、血圧モニター

ラットの尾にパルスオキシメーター用のプローベを巻き、動脈血酸素飽和度を測定。(THC-31, Softron社) 5分間毎に血圧測定を行い、モニタリング。

(5) EAAT 1-4 投与

EAAT 1 阻害剤であるUCPH-102、EAAT 2の投与阻害剤であるWAY-213,613、EAAT 3阻害剤であるL-thero-benzyl-aspartate ammonium salt、EAAT 4 阻害剤であるab41650をそれぞれ脳室内投与、髄腔内投与。

(6) 膀胱内圧測定

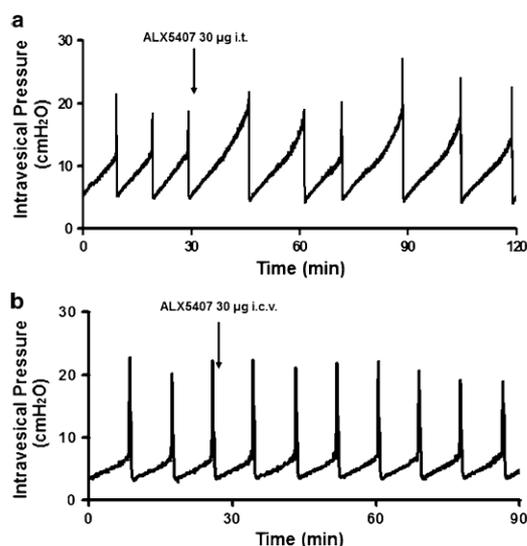
薬剤前後でそれぞれ膀胱内圧測定を施行。パラメーターは排尿間隔、最大排尿時圧、排尿時閾値圧、膀胱容量、コンプライアンス。

4. 研究成果

(1) 本研究では、ウレタン麻酔下ラット、覚醒ラット両群で、網膜に存在するEAAT5を除くEAAT1-4におけるそれぞれの阻害剤を投与し、排尿反射に与える影響を検討するとともに、排尿反射以外への影響について検討をおこなった。しかし、それぞれの薬剤の親和性の問題で、適切な投与量の設定に難渋し

た。そこで、他のメカニズムによる排尿反射に与える影響も併せて検討することとした。中枢神経系において興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸が排尿反射に影響を与えるためには抑制性の神経伝達物質であるグリシンのシナプス間濃度の関与があることも報告されている。そのためグリシントランスポーター GlyT-1 の選択的阻害剤である ALX5407 を用いてウレタン麻酔下のラットにおける排尿反射に与える影響を検討することとした。ALX5407 の脊髄内投与、脳室内投与をそれぞれ 1.3.10.30 μg 投与施行し、膀胱内圧測定を実施した。脊髄内投与群では容量依存的に排尿間隔、排尿閾値圧を有意に上昇させた。(図 1-a) 一方、脳室投与群では膀胱内圧に影響を与えず(図 1-b) GlyT-1 の脊髄レベルでの抑制は、ウレタン麻酔下ラットの排尿反射を抑制することを確認した。

図 1



(2) 本研究により、グリシントランスポーター GlyT-1 がラット排尿反射に関与することが解明できた。また、これまでの研究で、中枢神経において、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸と抑制性神経伝達物質であるグリシンには相互作用があることが知られている。これらの知見をあわせて考えると、グリシントランスポーターとグルタミン酸トランスポーターの間でも、何らかの作用を発揮する場合には、相互作用がある可能性がある。そのため、現在は、EAAT 1 阻害剤である UCPH-102、EAAT 2 の阻害剤である WAY-213.613、EAAT 3 阻害剤である L-thero-benzyl-aspartate ammonium salt、EAAT 4 阻害剤である ab41650 の各種薬剤と、グリシントランスポーター GlyT-1 の選択的阻害剤である ALX5407 を組み合わせて、脳室内もしくは髄腔内投与することで、ウレタン麻酔下ラットの連続膀胱内圧測定にどのような影響が表れるのかについて研究を進

めている。これらの研究が進むことにより、グルタミン酸トランスポーターとグリシントランスポーターの排尿調節機構における役割についてより詳細な解析が可能になってくると考えている。

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, Hikita K, Kawamoto B, Muraoka K, Simizu S, Saito M, Sejima T, Chancellor MB, Yoshimura N, Takenaka A:

Spinal glycine transporter-1 inhibition influence the micturition reflex in urethane-anesthetized rats. 査読有, Int. Urol. Nephrol. 48; 349-354, 2016. DOI:10.1007/s11255-015-1148-0

[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

引田 克弥 (HIKITA , Kastuya)

鳥取大学・医学部・医学部・講師

研究者番号： 5 0 4 0 3 4 0 7

(2)連携研究者

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