

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17981

研究課題名(和文)n-3系多価不飽和脂肪酸は新たな過活動膀胱治療薬となりうるか？

研究課題名(英文)Can n-3 polyunsaturated fatty acids be new therapeutic agents for overactive bladder?

研究代表者

小原 圭将(OBARA, Keisuke)

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号：90637422

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、膀胱及び消化管平滑筋に対するドコサヘキサエン酸(DHA)、エイコサペンタエン酸(EPA)の影響を検討するとともに、プロスタノイドTP受容体を介した収縮反応機構についても検討し、以下の研究成果を得た:1)収縮性プロスタノイドは膀胱のTP受容体を刺激することで膀胱の収縮活動を増加させた;2)膀胱のTP受容体の刺激による収縮活動の亢進は、Ca<sup>2+</sup>チャネルの活性化により引き起こされることが示された;3)TP受容体の刺激は膀胱の経壁電気刺激による収縮を増強し、この増強はDHAにより抑制された;4)EPAは膀胱の収縮活動を増加させた;5)DHA、EPAは消化管の収縮反応を非選択的に抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかとなった収縮性プロスタノイド類のTP受容体を介した膀胱平滑筋の収縮活動を亢進させる性質やTP受容体を介した膀胱収縮活動亢進機構は、膀胱の生理機能の理解や下部泌尿器疾患治療薬の開発に役立つと考えられる。また、EPAが膀胱の収縮活動を亢進する可能性を考慮すると、過活動膀胱患者に対しては魚油の摂取は必ずしも推奨されるものではない可能性が示唆された。さらに、DHA、EPAは消化管平滑筋の収縮を抑制することから、消化管運動が過剰に亢進した状態(例えば炎症性腸疾患)を改善する可能性を有することが示された。

研究成果の概要(英文):This study was carried out to investigate the effects of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) on urinary bladder smooth muscle (UBSM) and gastrointestinal smooth muscle (GISM) and the intracellular signal transduction via prostanoid TP receptors in UBSM. The results were as follows: 1) Contractile prostanoids stimulate the UBSM TP receptors, and enhanced the UBSM mechanical activities; 2) The UBSM mechanical activities enhanced by TP receptor stimulations were elicited via the activation of Ca<sup>2+</sup> channels; 3) The UBSM contractions induced by electrical field stimulation (EFS) was enhanced by a prostanoid TP receptor agonist, and this augmentation was suppressed by DHA; 4) EPA enhances the UBSM mechanical activities; 5) DHA and EPA non-selectively suppressed the GISM contractions.

研究分野：薬理学

キーワード：ドコサヘキサエン酸(DHA) エイコサペンタエン酸(EPA) 膀胱平滑筋 消化管平滑筋 プロスタノイドTP受容体

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 過活動膀胱 (Overactive Bladder: OAB) は、排尿機能に異常が生じることで尿意切迫感を生じ、頻尿や場合によっては尿失禁を引き起こす疾患である。これらの症状は、日常生活に支障をきたすだけでなく、外出先でのトイレの心配や尿失禁を引き起こすのではないかという心理的負担から患者の quality of life (QOL) を著しく低下させてしまう疾患として注目されている。また、過活動膀胱は、加齢とともに有病率が上昇することが知られており、2003 年の調査の時点で、本邦では 40 歳以上の 8 人に 1 人が過活動膀胱の症状を有し、約 810 万人の過活動膀胱患者がいると推定されている。したがって、超高齢社会に突入した本邦ではこの排尿機能障害を訴える患者数はさらに増加すると予想される。

(2) 正常な排尿機能は、尿をためる蓄尿期と尿を排出する排尿期から成り立つ。この排尿機能は自律神経系により制御されており、蓄尿期には交感神経が興奮しノルアドレナリンが放出されることで、 $\beta$ -受容体を介して膀胱が弛緩し収縮が抑制されるとともに、 $\alpha_1$ -受容体を介して尿道が収縮することで蓄尿が可能となる。一方、排尿期では交感神経の抑制により尿道の収縮が抑制され開口するとともに、副交感神経が興奮することでアセチルコリン (ACh) が放出され、ムスカリン受容体を介して膀胱が収縮することで排尿が可能になる。過活動膀胱は、膀胱の異常収縮により、蓄尿期が障害される疾患であり、その治療は、排尿期に働く副交感神経の機能を抑え、排尿期の到達を遅らせ、蓄尿期を維持する抗コリン薬による治療が主流である。ただし、口渇などの抗コリン作用に起因する副作用の問題から患者の服薬アドヒアランスが低下することが問題であった。近年は、膀胱選択性を高めた抗コリン薬の開発や膀胱の  $\beta$ -受容体に作用する薬物 (ミラベグロン) の開発により、この副作用は軽減されてきたが、これらの薬物は多くの臓器を司る自律神経系に作用するという性質から、副作用が生じてしまうのが現状である。

(3) 過活動膀胱治療薬の開発は、上記のように排尿制御機構が明らかになっていることから自律神経系に着目して行われてきたが、近年ではその発症には自律神経系だけではなく、膀胱に存在する伸張受容体等の知覚神経系の関与が重要と考えられてきている。膀胱には平滑筋とともに、上皮細胞が存在し、膀胱の伸張等の知覚刺激に伴いプロスタグランジン (PG) 類、セロトニン、ニューロキニンなどの収縮性伝達物質を放出することが知られている。過活動膀胱患者ではこの機構が亢進していることが明らかになってきており、現在、知覚神経系に働く新たな治療薬の開発が検討され、その登場が望まれている。そのなかでも PG 類が作用するプロスタノイド受容体は、膀胱運動の制御に寄与していることが報告されており (Root et al., Eur J Pharmacol 769: 274-279, 2015)、トロンボキサン  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>) 受容体 (TP 受容体) や PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  受容体 (FP 受容体)、PGE 受容体 (EP 受容体) をはじめとするプロスタノイド受容体は過活動膀胱治療の新たな創薬ターゲットとして注目されており、実際にその拮抗薬が治療薬として開発・研究が進められている。このプロスタノイド受容体の性質に関して、研究代表者らは、まぐろやいわしなどの魚油に含有される n-3 系多価不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) の循環保護効果の機序を解明する目的でラット血管平滑筋に対する n-3 系多価不飽和脂肪酸の効果を検討したところ、DHA や EPA が比較的低濃度で、TP 受容体刺激薬である U46619 や PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  による収縮を非常に強力に抑制すること、DHA や EPA による収縮抑制効果は、 $\alpha$ -受容体や高カリウムによる脱分極性収縮等のプロスタノイド受容体以外を介した収縮反応に対してはほとんど認められないことを見出した。また、n-6 系多価不飽和脂肪酸であるリノール酸 (LA) では、DHA や EPA のような効果は認められないことも合わせて明らかにした (Sato, Obara et al., Pharmacology, 93, 229-243, 2014; Sato, Obara et al., J Smooth Muscle Res, 49, 63-77, 2013)。加えて、全動物を用いた血圧測定においても、DHA 及び EPA は TP 受容体を介した異常な昇圧成分のみを選択的に抑制することも見出した (Chino, Obara et al., Br J Pharm Res 15, 1-12, 2017)。さらに、DHA の作用機序を検討する過程で、DHA の作用は DHA 本体によるものだけでなく、その代謝物を介した作用も重要であり、DHA の代謝物の作用には TP 受容体と機能的に関連した K チャネルが重要な役割を果たすことを明らかにした (Sato, Obara et al., Biol Pharm Bull, 37, 394-403, 2014)。

(4) これらの一連の実験結果から、研究代表者は n-3 系多価不飽和脂肪酸である DHA や EPA が、TP 受容体をはじめとするプロスタノイド受容体を介した平滑筋収縮 (異常収縮) の選択的な抑制作用を有することから、「n-3 系多価不飽和脂肪酸は、従来の合成された有機化合物 (治療薬) とは異なり、食品成分に由来する安全で副作用の少ない新たな過活動膀胱治療薬となり得るのではないかと考えるに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、過活動膀胱をはじめとする下部尿路疾患などの平滑筋の異常収縮により引き起こされる疾患に対して n-3 系多価不飽和脂肪酸が有益な効果をもたらす新たな治療薬となる可

能性を検討することを主たる目的とし、以下の検討を行った：1) 各種プロスタノイドの膀胱平滑筋の収縮活動に対する効果とそれらの効果にTP受容体が関与する可能性を明らかにするとともに、TP受容体を介した膀胱収縮活動増強機構についても検討を行った；2) 膀胱平滑筋の収縮活動に対するDHA、EPAの効果を実験的にするとともに、TP受容体を介した増強反応に対するDHAの抑制効果についても検討を行った；3) 膀胱で認められた性質が他の平滑筋でも成り立つ可能性を明らかにするため、各種消化管平滑筋に対するDHA、EPAの効果を検討した。

### 3. 研究の方法

Hartery系雄性モルモットから膀胱または胃、回腸、結腸を摘出した。摘出した組織は、脂肪や結合組織を除去した後、膀胱は上皮付きの短冊状標本を作製し、消化管に関しては、組織から縦走筋のみを単離し、胃底平滑筋、回腸縦走筋、結腸縦走筋標本をそれぞれ作成した。標本は、95%O<sub>2</sub> + 5%CO<sub>2</sub>で通気したLocke-Ringer液（膀胱のみ組成の一部を変更）で満たした器官槽内に懸垂して、張力変動を等張性または等尺性に記録した。また、膀胱組織・胃底平滑筋における各種プロスタノイド受容体、膀胱組織におけるORAI、STIM(stromal interaction molecule)のmRNA発現量をreal-time PCRにより測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 膀胱平滑筋の基礎張力及び自発性収縮活動に対する各種プロスタノイドの効果

TP受容体刺激薬であるU46619及び各種プロスタノイドの膀胱平滑筋の基礎張力及び自発性収縮活動に対する効果を検討したところ、U46619、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、PGA<sub>2</sub>が膀胱平滑筋の基礎張力及び自発性収縮活動を亢進させることを明らかにした。これらのターゲットとなるプロスタノイド受容体を推定するため、real-time PCRにより、膀胱の各種プロスタノイド受容体のmRNAの発現を検討したところ、TP受容体のmRNAが最も多く発現していたことが明らかとなった。また、免疫染色によりTP受容体が平滑筋層に存在することも確認した。U46619、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、PGA<sub>2</sub>による膀胱平滑筋の基礎張力及び自発性収縮活動増強効果に対するTP受容体の関与を検討するため、これらの増強効果に対する選択的TP受容体拮抗薬であるSQ 29,548の抑制作用を検討したところ、SQ 29,536は、U46619による増強反応を完全に抑制し、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、PGA<sub>2</sub>による増強反応を部分的に抑制した。したがって、TXA<sub>2</sub>や収縮性プロスタノイドがTP受容体を刺激することで膀胱の収縮機能を亢進させることが明らかになった。

#### (2) TP受容体を介した膀胱平滑筋の基礎張力の上昇及び自発性収縮活動の亢進に関わるCa<sup>2+</sup>チャンネルの検討

TP受容体の刺激が膀胱平滑筋の基礎張力の上昇及び自発性収縮活動の亢進を引き起こす機序についてCa<sup>2+</sup>シグナリングに着目して検討を行ったところ、U46619による増強反応は、栄養液をEGTAを含有するCa<sup>2+</sup>-free溶液に置換することで完全に消失した。また、U46619による増強反応のうち、基礎張力の上昇効果と自発性収縮活動の頻度に対する増強効果は、電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネル(VDCC)抑制薬であるverapamilにより強力に抑制されたが、自発性収縮活動の振幅の増強に対しては影響を与えなかった。Verapamilにより抑制されなかったU46619による自発性収縮活動の振幅の増強効果は、受容体作動性Ca<sup>2+</sup>チャンネル(ROCC)抑制薬であるLOE-908では抑制されなかったが、ROCCとストア依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネル(SOCC)抑制薬であるSKF-96365により抑制されることを明らかにした。また、SOCCの候補となるORAIチャンネル及びその活性化をもたらすSTIMの分子種を推定するため、膀胱組織のORAI及びSTIMのmRNA発現量を検討したところ、Orai 1 ~ Stim 2 > Orai 3 >> Stim 1 ~ Orai 2であった。したがって、TP受容体の刺激はVDCC/SOCC(おそらくORAI 1/3、STIM 2)を介して膀胱の収縮性を亢進させる可能性が明らかとなった。これらの結果は、膀胱の生理機能の理解や過活動膀胱などの下部泌尿器疾患治療薬の開発に役立つと考えられる。

#### (3) 膀胱平滑筋に対するDHA、EPAの効果の検討

経壁電気刺激(EFS)による収縮反応は、U46619により増強され、この増強反応はDHAにより抑制される可能性が示された。一方、EPAは、膀胱の自発活動を増強させるとともに、経壁電気刺激(EFS)により生じる収縮反応を増強した。したがって、EPAが膀胱の収縮活動を亢進する可能性を考慮すると、過活動膀胱患者に対しては魚油の摂取は必ずしも推奨されるものではない可能性が示唆された。

#### (4) 回腸・結腸縦走筋の収縮反応に対するDHA、EPAの効果

DHA、EPAは、回腸・結腸縦走筋のACh、ヒスタミン、PGF<sub>2α</sub>、PGD<sub>2</sub>(結腸縦走筋のみ)による収縮反応を抑制した。これらの収縮はいずれもVDCC抑制薬であるverapamilにより完全に消失した。また、DHAやEPAは高カリウム溶液による収縮反応や脱分極下での塩化カルシウムによる収縮反応を抑制したことから、DHAやEPAはVDCC依存性の回腸・結腸縦走筋の収縮反応を抑制することで、腸管運動を抑制する可能性が明らかとなった。これらの結果は、DHA、EPAが消化管活動の過剰な亢進を引き起こす炎症性腸疾患に対して予防・改善効果を示すことを示唆するものである(Obara et al., Biol Pharm Bull, in press)。

#### (5) 胃底平滑筋の収縮反応に対する DHA、EPA の効果

DHA、EPA は、胃底平滑筋の各種プロスタノイド及び U46199 による収縮反応を抑制した。胃底平滑筋の各種プロスタノイド及び U46199 による収縮反応に關与するプロスタノイド受容体を検討するため、胃底平滑筋における収縮性プロスタノイド受容体の mRNA 発現量を検討したところ、それらの発現量は  $TP \sim EP_3 \gg FP \sim EP_1$  の順に多かった。そのため、各種プロスタノイド及び U46199 による収縮反応に対する TP 受容体拮抗薬である SQ 29,548 の効果を検討したところ、PGA<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub>、U46619 による収縮反応は SQ 29,548 により 25–75% 抑制された。また、SQ 29,548 存在下での各種プロスタノイドによる収縮反応に対する EP<sub>3</sub> 受容体拮抗薬である L-798,106 の効果を検討したところ、PGA<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub> による収縮反応は L-798,106 により 40–75% 抑制された。また、各種プロスタノイド及び U46619 による収縮反応は VDCC 拮抗薬である verapamil により 50–80% 抑制され、DHA、EPA も 80 mM KCl による収縮反応を有意に抑制した。したがって、DHA、EPA がプロスタノイド類による胃底平滑筋の収縮反応に対しても有意な抑制効果を示すことが明らかとなった。また、TP 受容体のみならず、EP<sub>3</sub> 受容体や TP/EP<sub>3</sub> 受容体によって活性化される VDCC も DHA、EPA の標的となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 徐可悦、欧光瀚、工藤玲奈、吉岡健人、八巻史子、小原圭将、田中芳夫
2. 発表標題 下部消化管の収縮反応に対する n-3 系多価不飽和脂肪酸の影響（1） モルモット摘出回腸縦走筋を用いた検討
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 欧光瀚、徐可悦、川口純奈、倉田朱里、吉岡健人、八巻史子、小原圭将、田中芳夫
2. 発表標題 下部消化管の収縮反応に対する n-3 系多価不飽和脂肪酸の影響（2） モルモット摘出結腸縦走筋を用いた検討
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小原圭将、徐可悦、欧光瀚、稲葉理花子、川北美礼、川口純奈、工藤玲奈、倉田朱里、吉岡健人、八巻史子、田中芳夫
2. 発表標題 モルモット下部消化管の収縮反応に対するドコサヘキサエン酸（DHA）、エイコサペンタエン酸（EPA）の影響の検討
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉岡健人、上村洸平、山口明奈、欧光瀚、徐可悦、八巻史子、小原圭将、田中芳夫
2. 発表標題 ブタ冠動脈および脳血管の収縮反応に対するドコサヘキサエン酸（DHA）による抑制効果の検討
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 欧光瀚、徐可悦、梅村美穂、金子千尋、小林加奈美、吉岡健人、八巻史子、小原圭将、田中芳夫
2. 発表標題 モルモット膀胱平滑筋及び胃底平滑筋の収縮反応に対するドコサヘキサエン酸（DHA）の影響の評価
3. 学会等名 第61回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 徐可悦、川口純奈、小林加奈美、吉岡健人、八巻史子、小原圭将、田中芳夫
2. 発表標題 消化管の収縮反応に対するn-3系多価不飽和脂肪酸の効果
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 欧光瀚、梅村美穂、金子千尋、吉岡健人、八巻史子、小原圭将、田中芳夫
2. 発表標題 膀胱平滑筋の収縮反応に対するn-3系多価不飽和脂肪酸の効果
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 徐可悦、村井千佳、川口純奈、倉田朱里、工藤玲奈、山口莉佳、山下春菜、小林加奈美、吉岡健人、八巻史子、小原圭将、田中芳夫
2. 発表標題 モルモット消化管平滑筋の収縮反応に対するドコサヘキサエン酸（DHA）、エイコサペンタエン酸（EPA）の影響の評価
3. 学会等名 第16回東邦大学5学部合同学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 欧光瀚、佐藤楓、梅村美穂、金子千尋、吉岡健人、八巻史子、小原圭将、田中芳夫
2. 発表標題 モルモット膀胱平滑筋の収縮反応及び基礎張力に対するドコサヘキサエン酸 (DHA)、エイコサペンタエン酸 (EPA) の影響の評価
3. 学会等名 第16回東邦大学5学部合同学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 徐可悦、欧光瀚、八巻史子、小原圭将、田中芳夫
2. 発表標題 モルモット胃底平滑筋及び膀胱平滑筋のプロスタノイド受容体を介した収縮反応に対するドコサヘキサエン酸 (DHA) の影響の検討
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 欧光瀚、徐可悦、金子千尋、小林加奈美、八巻史子、小原圭将、田中芳夫
2. 発表標題 プロスタノイド受容体を介した消化管・膀胱平滑筋の収縮とn-3系多価不飽和脂肪酸による抑制について
3. 学会等名 第15回東邦大学5学部合同学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------