

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791518

研究課題名（和文） ヒト前立腺平滑筋の収縮機能の検討—前立腺肥大症の新たな治療薬開発を目指して—

研究課題名（英文） Functional analyses of human prostate smooth muscle- Strategy for development of new drugs for benign prostatic hyperplasia

研究代表者

高田 麻沙 (TAKADA MASA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：60468254

研究成果の概要（和文）：

前立腺肥大症は、加齢に伴う前立腺体積の増加に伴い、排尿困難や残尿感、頻尿等を呈する一般的な疾患であり、高齢化が進むにつれ有効な薬剤開発の必要性が高まっている。前立腺肥大症の諸症状は、①前立腺体積の増加、②前立腺平滑筋の過緊張の二つの要素により増悪されている。現在、薬物治療にあたっては、 $\alpha 1$ 受容体阻害薬が first choice となっているが、 $\alpha 1$ 受容体サブタイプの一つである $\alpha 1d$ 受容体の役割を含め、前立腺平滑筋の収縮機構に関しては不明な点が多い。そこで、この疾患に有効な薬剤の開発を目指して、主に②の要素に着目し、前立腺平滑筋の収縮機構について検討したいと考えた。私達は前立腺生検組織を用いて前立腺の自発収縮を検討し、phenylephrine により自発収縮が増強することを見いだした。この収縮は各種 $\alpha 1$ 受容体遮断薬のみならず、様々な薬剤によって収縮の増強もしくは抑制されることがわかった。これらの検討をさらに進めることにより前立腺肥大症の新しい治療薬の開発が期待された。

研究成果の概要（英文）：

We examined the cellular mechanisms of human prostate contraction by using prostate biopsy specimens. Phenylephrine increased the amplitude and the frequency of the spontaneous contractions. SIN-1 decreased the excitability. Nifedipine blocked all spontaneous contractions. Cyclopiazonic acid caused a transient excitation followed by blockade of all contractions. Charybdotoxin increased the excitability due to blockade of BK channels probably causing an increase of action potential discharge. From these results, we suggest that spontaneous contractions of human prostate depend on both the influx of calcium through L type calcium channels and calcium release from the sarcoplasmic reticulum. BK channel openings were inhibitory in terms of excitation of human prostate smooth muscle. Prostate biopsy specimens are a useful means of investigating the mechanisms of human prostate contraction and development of new drugs for benign prostatic hyperplasia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺平滑、 $\alpha 1$ 受容体、NO、細胞内カルシウム濃度

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト前立腺平滑筋の自発収縮の制御機構について

ヒト前立腺組織において、他の平滑筋と同様、自発収縮が起こっていることが報告されている (Kitada et al. 1987.)。一般に、平滑筋の収縮はL型カルシウムチャンネルを介した外部からのカルシウムイオンの流入と、G蛋白を介する系によって起こる。さらに平滑筋細胞内にはカルシウム貯蔵部位である筋小胞体が存在し、外部から流入したカルシウムイオンが筋小胞体のリアノジン受容体に結合することによって筋小胞体からのカルシウムイオンの遊離が促進される、「Ca²⁺-induced Ca²⁺-release」といわれる機構や、ホスホリパーゼCの活性化によって産生されるイノシトール三リン酸が筋小胞体上のIP₃受容体に結合することで同様にカルシウムイオンの遊離が促進されることも、平滑筋細胞内のカルシウム濃度をさらに高め、平滑筋の収縮を促進させている。また、一般に平滑筋の収縮には細胞内のカルシウム濃度だけでなく、収縮蛋白のカルシウムに対する感受性も深く関与することが知られているが、最近では培養ヒト前立腺標本において Endothelin1 によって誘発された収縮が Y-27632 や Fasudil といった Rho-kinase 阻害剤によって抑制されたことから、RhoA/Rho-kinase 系を介するカルシウム感受性の調節が、ヒト前立腺平滑筋の収縮に関与していることを示唆する報告もある (Takahashi et al. 2007.)。また、ヒト前立腺組織への興奮性および抑制性神経伝達物質の作用について、 $\alpha 1$ 刺激薬である Phenylephrine によって収縮が増強し (Kitada et al. 1987.)、NO 供与体である SNP によって (Takeda et al. 1995.) 弛緩したという報告がある。しかしヒト前立腺平滑筋の自発収縮における受容体レベルでの細胞学的な機序についての報告はほとんど無く、上記の機序のうちいずれの過程の関与が強く影響しているのか、また、他の平滑筋の収縮機構との共通点や相違点については、不明な点が多い。そこで本研究では、前立腺針生検で得られたヒト前立腺組織を用いて等尺性張力実験を行い、上記に挙げたイオンチャンネルや受容体の拮抗薬または作動薬を投与することにより、前立腺平滑筋の収縮機序について受容体レベルで検討したいと考えた。

(2) ヒト前立腺 $\alpha 1d$ 受容体の自発収縮への関与についての検討

現在、前立腺肥大症の薬物治療として $\alpha 1$ 受容体阻害薬が first choice として使用されており、それらの中には、 $\alpha 1a$ 受容体に対する拮抗作用が強いもの、 $\alpha 1d$ 受容体への拮抗作用が強いものが含まれていて、それぞれ

の薬剤の効果には個人差が認められている。また、ヒト前立腺組織の $\alpha 1$ 受容体のサブタイプに関しては、 $\alpha 1a$ 受容体と $\alpha 1d$ 受容体が多く存在することが知られている。しかし、現在のところ、 $\alpha 1d$ 受容体がヒト前立腺平滑筋の収縮に関与しているかどうかについてはわかっていない。そこで、 $\alpha 1d$ 受容体の拮抗薬にヒト前立腺平滑筋の収縮を抑制する作用があるかどうか、収縮抑制作用があった場合その効果は $\alpha 1a$ 受容体の拮抗薬の収縮抑制作用と比べてどうであるのか、さらには、両者の阻害薬の効果には個体差がみられるのかどうかについても検討したいと考えた。

2. 研究の目的

ヒト前立腺針生検標本を用いて等尺性張力実験法を行うことで、前立腺平滑筋の収縮機構を以下の事項について研究し明らかにすること。

(1) ヒト前立腺平滑筋の自発収縮に対する NO の作用

前述のように、NO 供与体が前立腺平滑筋全体の張力を減少させたという報告があるが、自発収縮への作用について言及した報告はない。そこで、自発収縮を確認できる標本を用いて、NO が自発収縮の頻度や張力に影響を及ぼすかどうか明らかにする。

(2) ヒト前立腺平滑筋における L 型カルシウムチャンネルの作用

L 型カルシウムチャンネルの拮抗薬である Nifedipine が、ウサギ前立腺被膜の自発収縮を抑制したという報告がある (Seki et al. 1988.)。膀胱平滑筋などでは、L 型カルシウムチャンネルからのカルシウムの流入を契機に自発収縮が起こることが知られているが、ヒト前立腺平滑筋でも L 型カルシウムチャンネルが収縮に関与しているのかどうかについて明らかにする。

(3) ヒト前立腺平滑筋における筋小胞体からのカルシウム遊離の位置付け

現在のところ、前立腺平滑筋に関しては筋小胞体からのカルシウム遊離が収縮に関与しているのかどうかについて検討した報告はない。筋小胞体へのカルシウム取り込みを阻害する作用を持つ Cyclopiazonic acid を投与して自発収縮の変化を観察し、筋小胞体からのカルシウム遊離が前立腺平滑筋の収縮に関与しているのかどうかについて検討し、明らかにする。

(4) ヒト前立腺平滑筋における大コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャンネルの役割

膀胱平滑筋においては、自発収縮の際、L 型カルシウムチャンネルからのカルシウム流入および筋小胞体からのカルシウム遊離によって細胞内のカルシウム濃度が上昇する

と、細胞膜上の大コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャンネルが開口し、細胞内のカリウムイオンを細胞外へ放出することで細胞膜電位が陰転化し、興奮性が抑制する方向へ働くことが知られている。これまでのところ、前立腺平滑筋におけるカリウムチャンネルの役割についての報告はない。そこで、大コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャンネルの阻害剤である Charybdotoxin を前立腺平滑筋に投与して、自発収縮の変化を確認し、その役割について検討する。

(5) ヒト前立腺平滑筋における $\alpha 1d$ 受容体の収縮への関与

$\alpha 1d$ 受容体の拮抗薬を用いて、ヒト前立腺平滑筋の収縮に $\alpha 1d$ 受容体が関与しているのかどうか、明らかにしたい。また、その関与が認められた場合、同一個体の標本を用いて $\alpha 1a$ 受容体拮抗薬の作用との比較を行うことで、どちらの作用がより強力であるのか、またその作用に個体差がみられるのかどうかについても明らかにする。

3. 研究の方法

名古屋市立大学病院泌尿器科にて、直腸診や PSA 高値などで臨床的に前立腺癌を疑われ、前立腺針生検を行うもののうち、組織を研究目的に用いることに同意を得られたものを対象とする。前立腺移行領域より採取した組織を 1 針用いて、等尺性張力実験を行う。なお、実験に用いた検体は他の検体と同様ホルマリン固定後 HE 染色にて病理診断を行うものとする。

まず組織を実体顕微鏡下に約 10mm の長さで切断し、両端を絹糸で結ぶ。95%酸素 5%二酸化炭素の混合ガスに通気しておよそ pH7.4 に調整した 37°C の Krebs 液 (in mM: Na+137.5, K+4.7, Ca+2.5, Mg2+1.2, HCO₃-15.5, H₂PO₄-1.2, Cl-134, glucose15) 2ml/min 灌流下で、一端の絹糸を標本張力 transducer に固定し、反対側は chamber に固定して、1ml の organ bath 内に組織を浮遊させ、張力のかからない状態で約 1 時間~1.5 時間 incubation した後に、実験を開始する。transducer から amplifier を介して増幅された張力の信号を、pen-recorder およびコンピュータ上に記録する。約 1mN の張力をかけて、自発収縮の有無を確認する。自発収縮が見られたものについて、基線が安定したところで頻度および張力の観察を十分に行った後、種々の薬剤を投与する。各薬剤の溶解液については、蒸留水、エタノール、DMSO のうち、それぞれの最も溶解度の高いものを用いる。結果は、病理診断で悪性を否定されたものを用いて解析する。

4. 研究成果

PSA 高値により前立腺癌が疑われ前立腺生検を施行し、前立腺肥大症と診断された患者の組織 24 検体を用いた。この検体を用いて等尺性張力実験を行った。

前立腺は消化管や膀胱と同様に自発収縮を有した。また Phenylephrine, ($\alpha 1$ -受容体刺激薬) にて自発収縮の張力と頻度を増加させた。

一方、NO donor である SIN-1 による興奮性を減弱させた。また Nifedipine は前立腺の自発収縮を減弱させた。筋小胞体へのカルシウムの uptake を遮断する Cyclopoazonic は前立腺の自発収縮を減弱させた。さらに BK channel blocker である Charybdotoxin, BK channel の遮断による興奮性を増加させた。

さらに $\alpha 1a$ 受容体特異的遮断薬である RS17053 と $\alpha 1d$ 受容体特異的遮断薬である BMY7378 による前立腺の自発収縮は抑制された。

前立腺の自発収縮は L 型カルシウムチャンネルを通じたカルシウムの細胞内への流入と筋小胞体からのカルシウムの流出による発生するものと考えられた。また BK channel が開くことにより前立腺平滑筋の興奮性が遮断されることが考えられた。また前立腺収縮の抑制は $\alpha 1a$ 受容体のみならず $\alpha 1d$ 受容体を介して行われることが考えられた。

前立腺針生検組織は、前立腺の生理学的特徴を捉えるとともに、前立腺肥大症の新しい治療の開発に用いる material としては有用であると考えられた。

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 3 件)

- ① Kojima Yoshiyuki, Hayase Masa, Sasaki Shoichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: New pharmacologic horizons in the treatment of benign prostatic hyperplasia. Current Drug Therapy, 5:262-270, 2010 査読有
- ② Hayase Masa, Hashitani Hikaru, Kohri Kenjiro, Suzuki Hikaru: Role of K⁺ channels in regulating spontaneous activity in detrusor smooth muscle in situ in the mouse bladder. The Journal of Urology, 181:2355-2365, 2009 査読有
- ③ Kojima Yoshiyuki, Sasaki Shoichi, Shibata Yasuhiro, Imura Makoto,

Hayase Masa, Okada Shinsuke, Kubota Yasue, Hayashi Yutaro, Tsujimoto Gozoh, Kohri Kenjiro: Beyond the Abstract- Subtypes of alpha(1)-adrenoreceptors in BPH: future prospects for personalized medicine. UroToday, March 11, 2009
査読有

〔学会発表〕（計3件）

- ① 小島 祥敬、柴田 泰宏、井村 誠、早瀬 麻沙、窪田 泰江、佐々木 昌一、林 祐太郎、郡 健二郎：前立腺肥大症に対する $\alpha 1$ 遮断薬の長期有効性の予測因子。第60回日本泌尿器科学会中部総会、2010.11.30-12.2、名古屋市
- ② Kojima Yoshiyuki, Shibata Yasunori, Imura Makoto, Hayase Masa, Kubota Yasue, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Correlation between expression of alpha1-adrenoceptor subtype mRNA and severity of lower urinary tract symptoms or bladder outlet obstruction in benign prostatic hyperplasia patients. Annual Meeting of the International Continence Society, 2010.8.23-27, Toronto(Canada)
- ③ Kojima Yoshiyuki, Sasaki Shoichi, Oda Nobuyuki, Hayase Masa, Kubota Yasue, Hayashi Yutaro, Kiniwa Mamoru, Kohri Kenjiro: Prostate growth inhibition by subtype-selective alpha1-adrenoceptor antagonist naftopidil in benign prostatic hyperplasia. AUA 2009 Annual Meeting, 2009.4.25-30, Chicago(USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 麻沙 (TAKADA MASA)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：60468254