

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590116

研究課題名(和文)高齢者の排尿障害、特に夜間頻尿に対する根本治療薬の開発に関する基礎研究

研究課題名(英文)Basic research on the development of the fundamental treatment for dysuria, especially nocturia in the elderly

研究代表者

副田 二三夫(SOEDA, Fumio)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：10336216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者が排尿機能を改善させることを見出した、エンリッチ環境と鎮咳薬はともに老化促進マウスSAMP8の頻尿症状を改善し、エンリッチ環境飼育はマウスの休息期である明期、鎮咳薬はマウスの活動期である暗期に選択性を示した。このことからエンリッチ環境は、SAMP8の夜間頻尿様の症状を改善することが示唆された。このエンリッチ環境の夜間頻尿改善作用の中枢性の機序にケモカインのひとつであるCxcl13が関与すること、またエンリッチ環境は摘出膀胱の収縮力を増強させ、その機序に膀胱のムスカリン受容体の関与が示唆された。さらに鎮咳薬の頻尿改善作用の機序の一部にセロトニン5-HT1A受容体の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The principal investigator found that both enriched environment and antitussives improve the pollakiuria of senescence-accelerated mouse SAMP8. Enriched environment rearing showed sensitivity in the light period, which is the resting phase of mice. On the other hand, antitussives showed sensitivity in the dark period, which is the active phase of mice. Therefore, it was suggested that enriched environment improved nocturia like symptoms of SAMP8. In addition, it was suggested that central mechanisms of the improving effects on nocturia of the enriched environment may be involved in Cxcl13 of the brain. In the periphery, it was suggested that enriched environment may enhance the contraction of an isolated bladder, and its mechanism may be involved in the muscarinic receptor of the bladder. Further, it was suggested that the part of the mechanism of the improving effects on pollakiuria of antitussives may be involved in serotonin 5-HT1A receptor.

研究分野：薬理学・環境衛生学

キーワード：排尿障害 健康寿命 エンリッチ環境 非麻薬性鎮咳薬 老化促進モデルマウス ケモカイン 膀胱平滑筋 セロトニン5-HT1A受容体

## 1. 研究開始当初の背景

排尿障害は、WHO が掲げる 21 世紀に人類が克服すべき三大疾患のひとつである。我が国においても排尿機能に何らかの障害を来す患者の数は増加の一途をたどっており、日本排尿機能学会の大規模疫学調査によると、40 歳以上の 12.5% が夜間頻尿をはじめとした尿意切迫感を主症状とする過活動膀胱に罹患し、その罹患率は加齢に伴い増加する。また近年、健康日本 2 1 (第二次) に健康寿命の延伸や高齢者の健康の増進が掲げられたが、高齢者に頻発する夜間頻尿は、患者の治療満足度が低い疾患であることに加え、睡眠障害などの周辺症状も引き起こし、患者のみならず介護者の QOL (Quality Of Life) も低下させる。

これまで夜間頻尿の薬物治療には抗コリン薬が処方されてきたが、近年アドレナリン $\beta_3$ 受容体作動薬が発売され、その選択性は増えつつある。しかし、これらの薬物は自律神経系を標的にした対症療法であるため、効果は不十分である。さらに副作用や相互作用の問題も存在し、特に、高齢者に対する自律神経系薬物の使用は慎重に行われる。これらのことから、既存薬に比べて有効性と安全性に優れた高齢者の夜間頻尿に対する根本治療薬の開発は、重要な課題であると思われる。

ところで、研究代表者は通常より広い飼育ケージに遊具を配置した、いわゆるエンリッチ環境が、環境化学物質の低用量曝露による学習障害を改善させることをはじめて報告した。この知見のように、エンリッチ環境の生体影響評価に関する報告の多くは高次脳機能の促進効果であり、排尿反射のような生命機能の維持に必須である生体反射に対してエンリッチ環境がどのような影響を及ぼすのかについては不明であった。そこで、研究代表者が所属する研究室で独自に開発した、マウスの排尿活動を無麻酔・無拘束・無侵襲条件下でリアルタイムに測定できる新規排尿活動測定システムを用いて、マウスの自然な排尿活動に対するエンリッチ環境の影響を世界に先駆け解析したところ、エンリッチ環境はマウスの加齢に伴う明期 (休息期) の排尿活動の増加 (ヒトにおける夜間頻尿様の症状) を改善させた。また、研究代表者らは、既存の鎮咳薬が脳梗塞や老化促進モデル動物の頻尿症状を改善させることも報告しており、この共通性、つまり「エンリッチ環境」と「鎮咳薬」という 2 つの頻尿改善因子に共通した作用メカニズムを明確にすることができれば、高齢者の夜間頻尿の根本治療薬を開発するための画期的な研究基盤を構築することができるのではないかと着想した。

そこで本研究では、老齢マウスの頻尿症状を改善させるエンリッチ環境と鎮咳薬の両者に共通する作用メカニズムの解明を計画するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、「エンリッチ環境および鎮咳薬

の頻尿改善作用」という研究代表者らが独自に見出した知見に基づき、エンリッチ環境と鎮咳薬の作用メカニズムの一端を解明するものである。具体的には以下に示す通りである。

研究代表者が見出したエンリッチ環境と鎮咳薬の頻尿改善作用は覚醒マウスを用いたデータであり、鎮咳薬の作用は急性処置による効果である。よって、この改善作用は、夜間頻尿に特異的なものであるのか、また、改善作用のメカニズムに中枢と末梢が如何に関与するのかなど、その詳細は不明である。そこで本研究では、まず (1) エンリッチ環境と鎮咳薬は老齢マウスの夜間頻尿様の症状を改善させるのか否かを調べ、症状を改善させた場合は、(2) 夜間頻尿改善作用を持つ環境因子に中枢性および末梢性の機序が関与するのかなどについて検討し、(3) 中枢性および末梢性の機序が示唆された場合は、それぞれの作用メカニズムを解析する。

## 3. 研究の方法

(1) 老齢マウスの排尿活動に対するエンリッチ環境と鎮咳薬の作用の詳細解析

老齢マウスのエンリッチ環境飼育と鎮咳薬の投与：以前の研究代表者らの研究で、頻尿様症状を示した 8 ヶ月齢の老化促進モデルマウス (SAMP8) を用いて、以下の 4 群 (スタンダード環境飼育群、エンリッチ環境飼育群、生理食塩水慢性皮下投与群、非麻薬性鎮咳薬クロペラスチン (10mg/kg) 慢性皮下投与群) に分け、5 週間それぞれの処置を行う。SAMP8 の対照マウスとして、正常老化を示す SAMR1 を用いた。SAMR1 は、スタンダード環境飼育群と生理食塩水慢性皮下投与群の 2 群を作製した。また、正常マウスである C57BL/6J マウス、脳血管障害モデルマウスも作製し、エンリッチ環境飼育の影響を併せて検討した。

覚醒下での排尿活動の測定：上述した新規排尿活動測定システムを用いて、覚醒下の排尿活動を明暗サイクル条件下で、24 時間測定した。また、常法に従いパッドテストにより、尿スポットの大きさを測定した。

麻酔下での排尿活動の測定：常法に従いウレタン麻酔下シングルシストメトリー法により、排尿量や残尿量、尿流率、膀胱容量、最大膀胱内圧などの排尿パラメーターを測定した。

(2) 夜間頻尿改善作用に関与する中枢性および末梢性の作用メカニズムの解析

中枢性の作用メカニズムの解析：排尿反射に関与する脳部位を切り出し、マイクロアレイ解析を行い、夜間頻尿改善作用に関与する候補分子をスクリーニングし、2 倍以上の変動を認められた分子をピックアップし、リアルタイム RT-PCR 法を用いて遺伝子発現定量解析を行い、変動分子の同定を行った。

末梢性の作用メカニズムの解析：覚醒下における血圧や脈拍数の測定、麻酔下における

血流量の測定、酸化ストレスマーカーである尿中 8-OHdG の測定、マグヌス法による膀胱平滑筋の収縮実験を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 新規排尿活動測定システムによる老齢マウスの覚醒下の排尿活動に対するエンリッチ環境と鎮咳薬の作用解析

24 時間の最大尿流率は、スタンダード環境飼育群に比べ、エンリッチ環境飼育群で有意に低下した。明時間の 1 回排尿量、平均尿流率、最大尿流率は、スタンダード環境飼育群に比べ、エンリッチ環境飼育群で有意に低下した。暗時間の総排尿量、1 回排尿時間は、生理食塩水投与群に比べ、クロペラスチンの慢性皮下投与群で有意に低下した。これらのことから、エンリッチ環境と鎮咳薬はともに SAMP8 の排尿活動を抑制するが、その抑制作用の詳細は異なり、エンリッチ環境飼育は明時間、鎮咳薬は暗時間に選択性を示す可能性が考えられた。よって、これ以降の解析は、夜間頻尿様の症状を改善させることが示唆されたエンリッチ環境飼育の作用を中心に解析した。

(2) 正常マウスの排尿活動に対するエンリッチ環境の作用解析

8 週齢の C57BL/6J マウスを用いて、4 週間のエンリッチ環境飼育またはスタンダード環境飼育を行い、ウレタン麻酔下シングルシストメトリーにより排尿活動を測定した結果、2 群間に有意な変化を認めなかった。以前の検討により、覚醒下における排尿活動は、4 週間のエンリッチ環境飼育により影響を認めた。よって、マウスの排尿機能に対する 4 週間のエンリッチ環境飼育効果は、中枢性の機序が関与している可能性が示唆された。8 週齢の C57BL/6J マウスを用いて、5 週間以上のエンリッチ環境飼育を行い、排尿機能に対する種々の基礎検討を行った結果、1. 無麻酔・無拘束下における排尿活動に対するエンリッチ効果は、飼育期間を 72 週間まで延長しても持続して認められた。2. パッドテストの結果、失禁状態であることを示唆する直径が 0.2cm 未満の小さいスポット尿の数は、72 週間飼育したスタンダード群に比べ、エンリッチ群で有意に減少した。3. 麻酔下シングルシストメトリーの結果、40 週間および 72 週間の環境飼育は、スタンダード群に比べ、エンリッチ群で排尿量および尿流率が有意に増加し、残尿量は有意に低下した。これらの結果から、マウスの排尿機能に対するエンリッチ効果は、5 週間以上の長期においても認められ、失禁状態を改善させる可能性が考えられた。さらに、中枢機能が低下した麻酔下の知見から、排尿機能に対するエンリッチ効果は、飼育期間を延長させることで、中枢のみならず末梢性の機序も関与する可能性が示唆された。

(3) 夜間頻尿改善作用に関与する中枢性の作用メカニズムの解析

マイクロアレイ解析によるスクリーニングの結果、22 遺伝子をピックアップした。

22 遺伝子について、リアルタイム RT-PCR 法による発現定量解析を行ったところ、排尿関連中枢における Cxcl13 mRNA の発現レベルは、スタンダード環境飼育した SAMR1 群 (SAMP8 のコントロール) に比べ、スタンダード環境飼育した SAMP8 群で有意に増加し、スタンダード環境飼育した SAMP8 群に比べ、エンリッチ環境飼育した SAMP8 群で有意に減少した。このことから、エンリッチ環境飼育による夜間頻尿改善作用の中枢性の機序にケモカインのひとつである Cxcl13 が関与することが示唆された。

(4) 夜間頻尿改善作用に関与する末梢性の作用メカニズムの解析

(2) の麻酔下の知見から、排尿機能に対するエンリッチ効果は、飼育期間を延長させることで、末梢性の機序が関与する可能性が示唆されたため、そのメカニズムを C57BL/6J マウスを用いて解析した。麻酔下における下部尿路 (前立腺、膀胱、尿道) 腎臓の血流量をマイクロスフェア法で測定したところ、52 週間飼育したスタンダード群とエンリッチ群の間で有意な変化を認めなかった。なお、脳においても同様の検討を行ったが、有意な変化はなかった。尿中 8-OHdG の量は、35-37 週間飼育したスタンダード群とエンリッチ群の間で有意な変化を認めなかった。覚醒下における脈拍数は、38 週間飼育したスタンダード群に比べ、エンリッチ群で有意に低下した。覚醒下における血圧は、有意な変化を認めなかった。これらのことから、長期間のエンリッチ環境飼育は、血流や血圧には影響を与えないこと、脈拍数を低下させたことから、その作用メカニズムの一部に副交感神経系の亢進が考えられる。そこで、膀胱平滑筋の収縮力を調べたところ、14~15 週間および 81~82 週間のエンリッチ環境飼育群は、スタンダード環境飼育群に比べ、膀胱収縮力を増加させた。14~15 週間の飼育では、ムスカリン性アセチルコリン受容体刺激薬であるカルバコールによる収縮と 32Hz の経壁電気刺激による収縮を増加させ、81~82 週間の飼育では 2, 4, 8, 16Hz の経壁電気刺激による収縮を増加させた。このことから、14~15 週間以降のエンリッチ環境飼育は、摘出膀胱の収縮力を増強させることがはじめて明らかとなった。その機序として、ムスカリン性アセチルコリン受容体の関与が示唆され、81~82 週間の飼育では ATP が関与している可能性も考えられた。

(5) 脳血管障害モデルマウスの排尿活動に対するエンリッチ環境の作用解析

SAMP8 を用いた検討により、エンリッチ環境飼育は、いわゆる夜間頻尿の根本治療薬を開発するための有力な研究ツールとなり得る可能性があり、さらに夜間頻尿以外の排尿障害モデルにも有用である可能性を秘めている。そこで、臨床現場でしばしば問題となる、

脳血管障害に伴う排尿障害に着目し、エンリッチ環境飼育は、この排尿障害に対しても改善作用を示すのか否かについて検討を行った。その結果、脳血管障害モデル群は、偽手術群に比べ、1回排尿量、1回排尿時間、最大尿流率が低下すること、この低下に対し、エンリッチ環境飼育は改善作用を示した。これらのことから、エンリッチ環境飼育は、頻尿のような排尿機能の過活動モデルに加え、排尿困難のような排尿機能が低下したモデルに対しても改善作用を示すことが示唆され、排尿障害治療薬の研究ツールとして、エンリッチ環境飼育は有用である可能性が考えられた。

(6) 老齢マウスおよび膀胱内酢酸注入マウスの排尿活動に対する非麻薬性鎮咳薬ペントキシペリンの作用とその作用メカニズムの解析

クロペラスチン以外の非麻薬性鎮咳薬であるペントキシペリン(40mg/kg)の急性皮下投与は、覚醒下におけるSAMP8の排尿回数を有意に抑制した。ペントキシペリン(10, 20, 25mg/kg)の尾静脈内投与は、対照群に比べ、過活動膀胱モデルである膀胱内酢酸注入マウスの頻尿を用量依存的に抑制した。また、セロトニン5-HT<sub>1A</sub>受容体拮抗薬WAY100635(3mg/kg)は、ペントキシペリン(20mg/kg)の作用を有意に抑制した。これらのことから、非麻薬性鎮咳薬ペントキシペリンは、膀胱の過活動を呈する複数のモデルにおいて、鎮咳有効量で改善作用を示すこと、さらにその機序の一部にセロトニン5-HT<sub>1A</sub>受容体の活性化が関与することが示唆された。

以上、本研究で得られた成果は、排尿機能改善因子であるエンリッチ環境と非麻薬性鎮咳薬の作用メカニズムの一端を明らかにしたものであり、特に夜間頻尿様症状を改善させたエンリッチ環境の中樞性の機序にケモカインのひとつであるCxcl13が関与すること、末梢性のメカニズムとして膀胱に発現するムスカリン性アセチルコリン受容体やATP受容体の活性化が関与する可能性が示唆された。これらの基礎知見は、患者数が増大している高齢者の夜間頻尿など、排尿障害に悩む患者やその家族が求める根本治療薬の開発基盤の構築に貢献し得ると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

N. Goto, F. Soeda, S. Misumi, K. Takahama. Pentoxifyverine possessing GIRK channel currents inhibiting action improves urinary dysfunction partly through activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in mice. J. Pharmacol. Sci. 査読無 131(Suppl):1-P-55 (2016)  
DOI: ISSN 1347-8613

F. Soeda, N. Goto, S. Sameshima, S. Misumi, K. Takahama. Enriched environment improves micturition activity in awake freely moving aged mice. Soc. Neurosci. Abstr. 査読無 307.27:E38 (2015)

副田二三夫, 三隅将吾, 高濱和夫. マウスの排尿機能に対する長期間のエンリッチ環境飼育の影響. 日本排尿機能学会誌. 査読無 26:218 (2015)  
DOI: ISSN 1347-6513

副田二三夫, 後藤夏美, 鮫島慎乃介, 三隅将吾, 高濱和夫. 老化促進モデルマウスの排尿活動に対するエンリッチ環境の影響. 日本排尿機能学会誌. 査読無 25:241 (2014)  
DOI: ISSN 1347-6513

〔学会発表〕(計6件)

後藤夏美, 副田二三夫, 三隅将吾, 高濱和夫. GIRKチャネル活性化電流抑制作用を持つペントキシペリンは一部5-HT<sub>1A</sub>受容体の活性化を通してマウスの排尿障害を改善する. 第89回日本薬理学会. 2016年3月9日 パシフィコ横浜会議センター(神奈川県・横浜市)

鮫島慎乃介, 副田二三夫, 浜崎亮太, 三隅将吾, 高濱和夫. GIRKチャネル阻害作用を持つpentoxifyverineと抗コリン系排尿障害治療薬の併用に関する研究. 第8回排尿障害モデル動物研究会. 2015年12月4日 グランディエールブuketーカイ(静岡県・静岡市)

F. Soeda, N. Goto, S. Sameshima, S. Misumi, K. Takahama. Enriched environment improves micturition activity in awake freely moving aged mice. 第45回北米神経科学学会. 2015年10月19日 シカゴ市(アメリカ合衆国)

副田二三夫, 三隅将吾, 高濱和夫. マウスの排尿機能に対する長期間のエンリッチ環境飼育の影響. 第22回日本排尿機能学会. 2015年9月11日 京王プラザホテル札幌(北海道・札幌市)

副田二三夫, 後藤夏美, 鮫島慎乃介, 三隅将吾, 高濱和夫. 老化促進モデルマウスの排尿活動に対するエンリッチ環境の影響. 第21回日本排尿機能学会. 2014年9月18-19日 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

副田二三夫. 脳血管障害に伴う排尿障害を改善する環境因子の同定とその分子機構の解明. 第28回熊本県産学官技術交流

会・2014年1月21日 熊本県産業技術  
センター（熊本県・熊本市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://researchmap.jp/read0106717/>

（researchmap）

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/emhs/research/r3/>（熊本大学大学院生命科学研究部環境分子保健学分野 研究内容）

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

副田 二三夫（SOEDA, Fumio）

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：10336216

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

高濱 和夫（TAKAHAMA, Kazuo）

熊本保健科学大学・保健科学部・教授

研究者番号：80150548

### (4)研究協力者

後藤 夏美（GOTO, Natsumi）

鮫島 慎乃介（SAMESHIMA, Shinnosuke）