

令和元年5月20日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11048

研究課題名(和文)膜融合性リポソームを用いた新規受容体SNSRアゴニスト膀胱内注入療法の確立

研究課題名(英文)Bladder instillation of liposome formulation sensory neuron-specific receptor agonist for lower urinary tract dysfunction

研究代表者

本田 正史 (HONDA, Masashi)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：20362890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000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の膀胱内注入が正常ラット排尿反射を抑制することを見出した。また、BAM8-22膀胱内注入のシクロホスファミド誘発膀胱炎に対する効果は、カプサイシン感受性C線維の求心性神経経路を介して排尿反射を抑制することを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の成果から新しい受容体であるsensory neuron-specific receptors (SNSRs)を抑制する薬剤の膀胱内注入は正常排尿機能のみならず、排尿障害に対しても一定の効果をもつ可能性が示唆された。膀胱内注入は、全身投与の際に注意すべき副作用を軽減できる可能性があり、より効率的に膀胱組織に効果を発揮する事が可能となる。本成果は過活動膀胱などの排尿障害に対する新しい薬物療法を確立していく上で、重要な基盤になると考えている。

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). In urethane-anesthetized rats, intravesical administration of BAM8-22, a selective rat SNSR1 agonist, can inhibit the micturition reflex. Moreover, intravesical administration of BAM8-22 can ameliorate cyclophosphamide-induced bladder overactivity via suppression of capsaicin sensitive C-fiber afferent pathways.

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 膀胱内注入 膀胱内圧測定

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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、また過活動膀胱の症状は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β3アゴニスト製剤であるが、効果が不十分な場合や副作用で内服継続が困難な症例も少なくない。実際、抗コリン薬の6ヶ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安全で、長期間の継続が可能な新規治療薬および治療法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、神経伝達物質等の究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、神経ペプチドの基礎研究を行ってきた。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、ガラニンのラット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取り組んできた。rSNSR1 は G タンパク質共役受容体で、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 選択的アゴニストである bovine adrenal medulla 8-22 (BAM8-22) を Sprague-Dawley (SD) ラットに経静脈的および脊髄腔内へ投与し、カプサイシン感受性 C 線維以外の経路を介して正常排尿反射を抑制すること、シクロホスファミド誘発排尿筋過活動に対して BAM8-22 の経静脈的および脊髄腔内投与が改善効果を示すことを解明してきた。

(4) しかし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。それと比較して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、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。また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

(1) 本研究課題では、ラット正常下部尿路機能およ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、現在までに得た知見に基づき、効率的で安全性にも優れた SNSR 膀胱内注入の確立を目指し、rSNSR1 アゴニスト膀胱内注入の有効性について詳細な検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 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 ラットを用いた。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した。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した。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) を施行した。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 6 頭) を同様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 日前に全身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 (threshold pressure: TP)、最大排尿圧 (maximum pressure: MP) 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) 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 ラットを用いた。2%イソフルレン麻酔下にシクロホスファミド (200 mg/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した。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行った。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した。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した。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) を施行した。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) を同様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 (threshold pressure: TP)、最大排尿圧 (maximum pressure: MP) 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) 正常ラット排尿反射に対する rSNSR1 アゴニスト膀胱内注入の効果 (図 1 および表 1)

BAM8-22 膀胱内注入は排尿間隔 (intercontraction interval: ICI) を容量依存性に有意に増加させた。また BAM8-22 膀胱内注入は排尿閾値圧 (threshold pressure: TP) も容量依存性に有意に増加させた。しかし BAM8-22 膀胱内注入は静止時膀胱圧 (baseline pressure: BP) および最大排尿圧 (maximum pressure: MP) には有意な影響を与えなかった。vehicle (生理食塩水) の膀胱内注入は排尿間隔 (intercontraction interval: ICI)、静止時膀胱圧 (baseline pressure: BP)、排尿閾値圧 (threshold pressure: TP)、最大排尿圧 (maximum pressure: MP) には有意な影響を与えなかった。BAM8-22 膀胱内注入による排尿反射抑制効果はカプサイシン前処置群においても同様に認められた。以上よりウレタン麻酔下正常ラットにおいて rSNSR1 アゴニストである BAM8-22 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事が示唆された。

図 1. 連続膀胱内圧測定図: 正常ラット排尿反射に対する BAM8-22 膀胱内注入の効果 (A) とカプサイシン前処置ラットの排尿反射に対する BAM8-22 膀胱内注入の効果 (B)

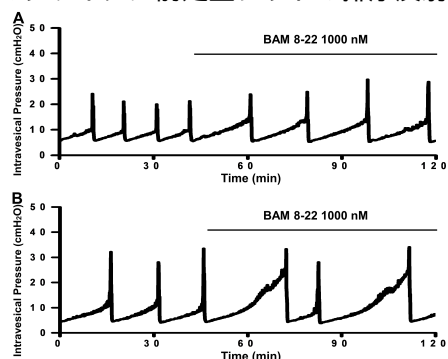


表 1. 正常ラットに対する BAM8-22 膀胱内注入の効果

Variable	Vehicle	BAM8-22 (100 nM)	BAM8-22 (300 nM)	BAM8-22 (1000 nM)	Capsaicin Pretreatment
					BAM8-22 (1000 nM)
Number of rats	6	6	6	6	6
Mean ± SD					
ICI, mins					
before	11.6 ± 3.45	10.5 ± 3.18	10.2 ± 5.73	10.8 ± 4.67	10.4 ± 2.62
after	11.8 ± 4.56	10.6 ± 2.85	11.7 ± 6.56 [*]	12.8 ± 7.67 [*]	12.5 ± 6.78 [*]
%ICI, %					
	102.6 ± 5.1	101.2 ± 4.8	115.5 ± 8.7 [†]	119.4 ± 10.5 [†]	123.5 ± 12.6 [†]
BP, cmH ₂ O					
before	4.67 ± 1.56	3.78 ± 1.23	3.67 ± 1.52	4.26 ± 2.18	4.01 ± 0.86
after	4.59 ± 0.92	3.82 ± 1.37	3.78 ± 1.38	4.29 ± 1.92	3.98 ± 0.67
TP, cmH ₂ O					
before	5.35 ± 1.78	5.48 ± 1.28	5.05 ± 1.23	5.81 ± 1.56	7.02 ± 3.27
after	5.28 ± 1.61	5.83 ± 1.35	8.85 ± 2.16 [*]	8.96 ± 2.74 [*]	11.6 ± 6.78 [*]
MP, cmH ₂ O					
before	25.1 ± 3.95	26.1 ± 3.28	25.9 ± 3.28	26.3 ± 4.27	26.5 ± 4.78
after	25.0 ± 4.19	28.5 ± 4.78	28.1 ± 5.18	27.8 ± 4.86	29.0 ± 8.46

^{*} p < 0.01 (paired t-test); [†] p < 0.01 vs vehicle injection (Dunnett's multiple comparison test)

(2) 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 (図2 および表2)

シクロホスファミド誘発膀胱炎群ではコントロール群と比較して、有意な静止時膀胱圧 (baseline pressure: BP) の増加と、有意な排尿間隔 (intercontraction interval: ICI) の減少を認めた。BAM8-22 膀胱内注入はシクロホスファミド誘発膀胱炎群の排尿間隔 (intercontraction interval: ICI) を容量依存性に有意に増加させた。しかし BAM8-22 膀胱内注入はシクロホスファミド誘発膀胱炎群の静止時膀胱圧 (baseline pressure: BP) および最大排尿圧 (maximum pressure: MP) には有意な影響を与えなかった。vehicle (生理食塩水) の膀胱内注入はシクロホスファミド誘発膀胱炎群の排尿間隔 (intercontraction interval: ICI)、静止時膀胱圧 (baseline pressure: BP)、排尿閾値圧 (threshold pressure: TP)、最大排尿圧 (maximum pressure: MP) に有意な影響を与えなかった。BAM8-22 膀胱内注入のシクロホスファミド誘発膀胱炎に対する効果は、カプサイシン感受性 C 線維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。

図2. 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 膀胱内注入の効果

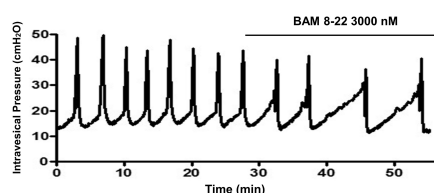


表2. シクロホスファミド誘発膀胱炎モデルに対する BAM8-22 膀胱内注入の効果

Variable	CYP-treated rats				Control rats
	Vehicle	BAM8-22 (300 nM)	BAM8-22 (1000 nM)	BAM8-22 (3000 nM)	Vehicle
Number of rats	6	6	6	6	6
Mean ± SD					
ICI, mins					
before	3.21 ± 0.81	3.06 ± 0.67	3.57 ± 1.24	3.07 ± 0.98	11.8 ± 4.58
after	3.25 ± 0.75	3.25 ± 0.98	4.16 ± 1.01 [†]	3.71 ± 1.16 [†]	11.9 ± 5.21
%ICI, %					
before	101.6 ± 4.7	98.6 ± 5.8	115.6 ± 7.2 [†]	120.5 ± 7.6 [†]	100.6 ± 8.1
BP, cmH ₂ O					
before	9.67 ± 3.56	8.96 ± 3.21	9.56 ± 4.51	10.2 ± 4.37	4.38 ± 1.12
after	9.59 ± 4.05	9.14 ± 2.78	9.41 ± 3.78	9.95 ± 3.95	4.19 ± 0.98
TP, cmH ₂ O					
before	13.7 ± 6.89	14.7 ± 6.19	15.7 ± 4.89	14.4 ± 5.99	7.67 ± 4.38
after	13.5 ± 7.51	15.1 ± 5.78	16.5 ± 6.81	15.7 ± 8.17	7.55 ± 3.78
MP, cmH ₂ O					
before	43.6 ± 9.56	40.6 ± 7.81	43.7 ± 11.7	38.7 ± 8.78	32.8 ± 6.39
after	41.9 ± 8.78	41.8 ± 9.16	45.1 ± 10.6	37.5 ± 9.18	31.8 ± 7.61

[†] p < 0.05 (paired t-test); [†] p < 0.05 vs vehicle injection (Dunnett's multiple comparison test)

(3) 以上の結果より rSNSR1 アゴニスト膀胱内注入は正常下部尿路機能のみならず、下部尿路機能障害に対しても一定の効果をもつことが示唆され、SNSR は過活動膀胱などの下部尿路機能障害のための新しい治療標的になる可能性をもつと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

Honda M, Yoshimura N, Kawamoto B, Hikita K, Muraoka K, Shimizu S, Saito M, Chancellor MB, Takenaka A: Anandamide transporter-mediated regulation of the micturition reflex in urethane-anesthetized rats. 査読有, Int. Urol. Nephrol. 48(9); 1407-1412, 2016. DOI:10.1007/s11255-016-1329-5

[学会発表](計4件)

Honda M, Tsounapi P, Kimura Y, Kawamoto B, Shimizu S, Hikita K, Shimizu T, Saito M, Takenaka A: The inhibitory effects of ghrelin on micturition reflex in urethane-anesthetized rats. International Continence Society Annual Meeting, 2018.

Honda M, Kimura Y, Kawamoto B, Tsounapi P, Hikita K, Shimizu S, Shimizu T, Saito M, Takenaka A: Group III metabotropic glutamate receptor-mediated regulation of micturition reflex in urethane-anesthetized rats. American Urological Association Annual Meeting, 2017.

Honda M, Yoshimura N, Kawamoto B, Tsounapi P, Shimizu S, Hikita K, Muraoka K, Shimizu T, Sejima T, Saito M, Chancellor MB, Takenaka A: Supraspinal and spinal effects of dopamine uptake inhibitor on the micturition reflex in urethane-anesthetized rats. American Urological Association Annual Meeting, 2016.

Honda M, Yoshimura N, Kawamoto B, Tsounapi P, 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.

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：武中 篤

ローマ字氏名：(TAKENAKA, atsushi)

所属研究機関名：鳥取大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：50368669

研究分担者氏名：齊藤 源顕

ローマ字氏名：(SAITO, motoaki)

所属研究機関名：高知大学

部局名：教育研究部医療学系基礎医学部門

職名：教授

研究者番号(8桁)：60273893

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、研究者個人に帰属されます。