

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580365

研究課題名（和文） 過活動膀胱におけるP2X受容体の役割解明とその受容体を標的とした治療薬の応用

研究課題名（英文） The role of P2X receptor in overactive bladder and application of drugs targeting the receptor

研究代表者

伊藤 勝昭（ITO KATSUAKI）

宮崎大学・農学部・名誉教授

研究者番号：70136795

研究成果の概要（和文）：

ラットで4種の頻尿モデル（尿道の部分狭窄による慢性的な過活動膀胱、シクロホスファミド皮下注射による膀胱炎、カプサイシンあるいは酢酸の膀胱内注入による急性頻尿）を作成し、各疾患の頻尿及び排尿痛にATP受容体であるP2X₃やバニロイド受容体であるTRPV1がいかなる役割を果たしているかを検討した。尿道狭窄モデルを除く頻尿モデルでは、排尿は排尿痛を伴い、排尿痛が排尿頻度を増加させる要因となっていることが示された。それぞれのモデルでP2X₃あるいはTRPV1の関与は異なることが示された。以上より、頻尿のタイプによって関与する活性物質及び受容体は異なり、病態に応じて治療薬を選択する必要がある。

研究成果の概要（英文）：

We examined the involvement of ATP receptor P2X₃ and vanilloid receptor TRPV1 in frequent voiding and pain accompanied with voiding in 4 models of frequent micturition of rats. Major findings are that pain during micturition increases the frequency of voiding and that the involvement of P2X₃ or TRPV1 varies depending of the type of micturition. Therefore, a drug targeting frequent voiding has to be determined depending on the pathogenesis of overactive bladder.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：薬理、獣医、頻尿、膀胱痛、P2X受容体、TRPV1受容体、ATP、尿道

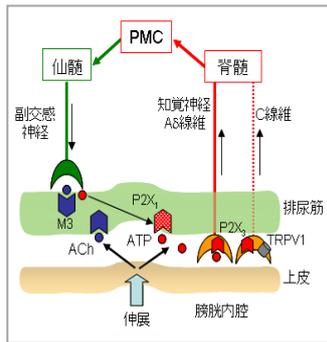
1. 研究開始当初の背景

尿意切迫感、頻尿、残尿感に特徴付けられる過活動膀胱はヒトのみならず小動物においてもQOLを損なう大きな問題となっている。また上記症状に加えて排尿痛を伴うことが多い膀胱炎は広義の過活動膀胱の一つと

見なすことができる。これらの頻尿疾患においては求心性の知覚神経、脳幹・橋にある排尿中枢、遠心性神経である副交感神経を介する排尿反射が亢進している（図1参照）。

膀胱から上行する知覚神経の中でC線維は健康な状態では特に生理的役割を持たな

い silent fiber であるが、膀胱炎や過活動膀胱のときは膀胱内圧に対する感受性が増大して、排尿反射を過敏にすると考えられている。この神経は、本来は痛覚を伝える神経であるので、頻尿と排尿痛の間には何らかの関連性が推測される。排尿時に痛みが存在すると排尿行為を中断し、残尿を増加するという影響も考えられる。C 線維には ATP の受容体である P2X₃ やバニロイド受容体の TRPV1 が存在することが分かっているため、各種の頻尿疾患に P2X₃ や TRPV1 がどのように関わっているかを明らかにすることは過活動膀胱や膀胱炎時の頻尿、排尿痛を治療する戦略を考える上で重要である。



《図 1：排尿反射に関わる受容体（これまでに分かっている事実）
 充滿した尿で膀胱壁が伸展されると上皮からアセチルコリン（ACh、●）や ATP（●）が放出され、ATP が知覚神経上にある

P2X₃ 受容体を活性化し、その情報が脊髄を通じて橋の排尿中枢（PMC）に伝わる。すると反射的に副交感神経が興奮し、放出された ACh は主に排尿筋の M₃ 受容体を介して収縮を起こす。ACh と共に放出される ATP は排尿筋の P2X₁ 受容体を興奮させ、これも収縮に寄与する。知覚神経 C 線維のバニロイド受容体（TRPV1）も排尿反射に関与すると言われているが、詳細は不明である。》

2. 研究の目的

本研究では、知覚神経に存在する ATP の受容体 P2X（特に P2X₃）、および P2X と並んで重要視されているバニロイド受容体 TRPV1 が各種頻尿モデルにおける排尿行動及び排尿痛に関してどのような役割を果たしているかを解明し、これら受容体の拮抗薬が治療薬となり得るかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各種頻尿モデルにおける排尿行動と排尿痛及び各種薬物の効果

雌性 SD ラットを用いて以下の①から④に述べる 4 種の頻尿モデルを作成した。膀胱と大腿静脈にカニューレを留置し、2 日後に無麻酔・拘束条件下でシストメトリー実験（膀胱内に一定速度で生理食塩水を持続注入し、膀胱内圧、排尿回数、排尿量を観察する）を行った。その際、排尿に伴う痛み行動（侵害受容反応：頭を振る、ケージを噛む、体を屈曲させる、後ろを振り返る、前肢または後肢

を突っ張るなど）をスコア化し、排尿痛の指標とした。各モデルでの膀胱内圧、排尿行動、排尿痛を観察した後、各種薬物、特に P2X 拮抗薬及び TRPV1 拮抗薬を静脈内注射し、薬物の効果を観察した。

頻尿モデル

①部分的尿道狭窄モデル（BOO モデル） 麻酔下でラットの尿道を部分的に狭窄した。狭窄手術後一定期間（2、3、4 週目）に無麻酔、無拘束条件下で 24 時間の排尿回数、排尿量を観察した。それを観察した直後にカニューレ留置手術を施し、その 2 日後にシストメトリー実験を行った。

②シクロホスファミド膀胱炎モデル 抗がん薬であるシクロホスファミド（CYP）は代謝物アクロレインが膀胱粘膜を損傷し、膀胱炎を惹起する。CYP を皮下注射すると 2 日後に膀胱炎が起き、頻尿となることを予備実験で確認した。CYP を投与して 2 日後に無麻酔下で BOO モデルと同様のシストメトリー実験を行った。

③急性カプサイシン膀胱内注入頻尿モデル カプサイシンを膀胱内に投与すると TRPV1 受容体を刺激して、頻尿を起こすことが知られている。実験 2 日前に膀胱と静脈内にカニューレを留置したラットを用いて、カプサイシン 30 μM を持続注入し、シストメトリー実験を行った。

④急性酢酸膀胱内注入頻尿モデル ③の実験と同じ要領で、カプサイシンの代わりに酢酸 0.2% を持続注入し、同様の観察を行った。

(2) 膀胱及び尿道に発現する P2X 受容体とその機能

①膀胱及び尿道の収縮における P2X 受容体及び TRPV1 受容体の関与 ラットから摘出した膀胱及び尿道標本を用い、器官内に内在する神経を電気刺激したときの収縮を測定し、それに対する各種薬物の影響を観察した。
 ②膀胱に発現する P2X 受容体の局在 ラット膀胱の上皮及び排尿筋に発現する P2X₁ 及び P2X₃ 受容体の存在を RT-PCR 法、ウエスタンブロット法及び免疫染色法で観察した。

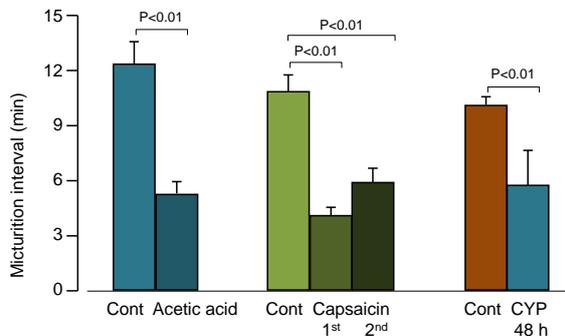
4. 研究成果

(1) 各種頻尿モデルにおける排尿行動と排尿痛及び各種薬物の効果

慢性及び急性の頻尿モデルラットについて無麻酔下でシストメトリー実験を行い、排尿動態及び排尿に伴う痛みに反応する行動（侵害受容反応）を観察した。

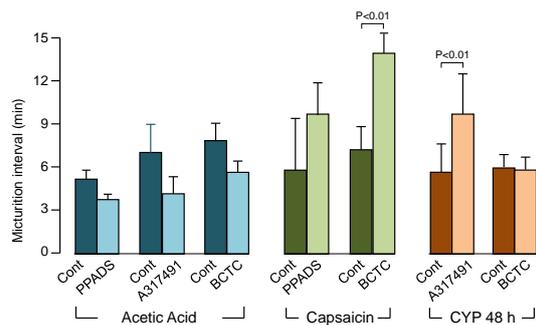
①部分的尿道狭窄（BOO）モデルでは狭窄後 2 週目から頻尿傾向となり、残尿量も増加し、典型的な過活動膀胱の症状を呈した。しかし、排尿に伴って侵害受容反応は認められなかった。P2X₃ 受容体拮抗薬 A-317491 および非選択的 P2X 受容体拮抗薬 PPADS は BOO 2

週目だけ排尿回数を有意に減少させたが、BOO 3~4 週目は効果がなかった。
 ②CYP 誘発膀胱炎のラットでは顕著な排尿回数と残尿量の増加が認められ、排尿の直前に侵害受容反応が観察された。P2X₃ 受容体拮抗薬 A23187 は頻尿及び排尿痛行動を抑制したが、TRPV1 拮抗薬 BCTC は頻尿には影響せず、排尿痛をわずかに抑制した (図 2~5 を参照)。



《図 2 酢酸注入(左)、カプサイシン注入(中)、CYP 投与(右)による頻尿それぞれの刺激物質により排尿間隔の短縮(頻尿)が認められた。酢酸(0.2%)は1時間膀胱内に持続注入した。カプサイシンは脱感作を起こすことがあるため、30分間の注入を2回反復した。》

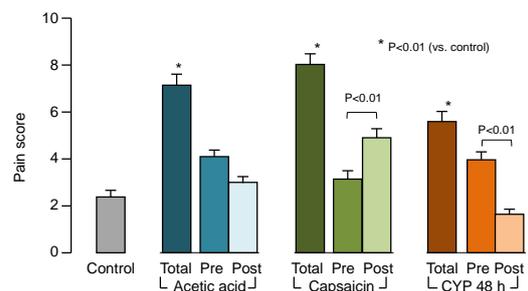
③カプサイシンを膀胱内に持続注入したラットでは排尿回数の増加と侵害受容反応が認められた。CYP 膀胱炎と異なる点は、排尿前より排尿直後の方が、侵害受容反応が多かった。このモデルで P2X 拮抗薬は頻尿及び排尿痛には影響しなかった。一方、TRPV1 拮抗薬は頻尿及び排尿痛を有意に抑制した (図 2~5 を参照)。



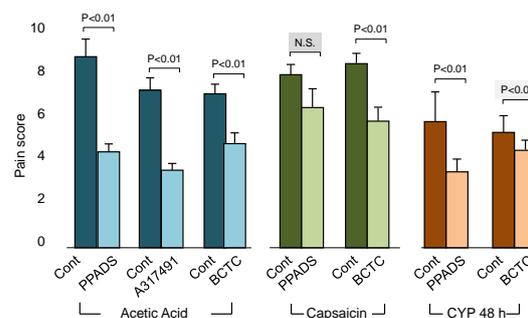
《図 3 酢酸、カプサイシン、CYP による頻尿に対する P2X 拮抗薬 (A317481 あるいは PPADS) 及び TRPV1 拮抗薬 (BCTC) の効果
 A317481 は選択的 P2X₃ 拮抗薬であり、PPADS は非選択的 P2X 拮抗薬である。》

④酢酸を膀胱内に持続注入したラットではカプサイシン注入ラットと同様、排尿回数の増加と侵害受容反応が認められた。排尿痛は

排尿の前後で同程度に起こっていた。P2X 拮抗薬及び TRPV1 拮抗薬は頻尿には影響しなかったが、侵害受容反応は有意に抑制した (図 2~5 を参照)。



《図 4 各頻尿モデルにおける排尿痛スコア
 排尿が起こる前 1 分間 (Pre)、排尿後 1 分間 (Post) 及び排尿前後の 2 分間 (Total) の痛みに対する侵害受容反応のスコアを示す。カプサイシンによる排尿痛は排尿後が強く、CYP による排尿痛は排尿直前が強い傾向があった。》



《図 5 排尿痛に対する P2X 拮抗薬及び TRPV1 拮抗薬の効果
 酢酸による排尿痛 (侵害受容反応) は P2X 拮抗薬及び TRPV1 拮抗薬で抑制された。カプサイシンによる排尿痛は TRPV1 拮抗薬で抑制されたが、P2X 拮抗薬は無効であった。CYP による排尿痛は P2X 拮抗薬で抑制され、TRPV1 拮抗薬でもわずかに抑制された。》

なお、排尿痛を伴う場合は排尿後に膀胱の収縮を伴わない尿の漏洩が観察されたことから、排尿痛は排尿行動を中断させ、その後の尿漏れを招くことが示唆された。

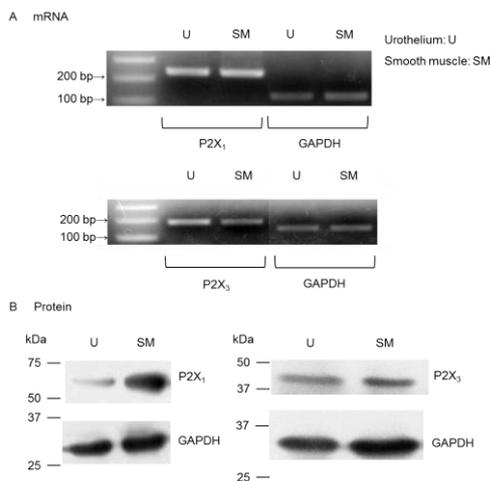
以上の結果から、i) CYP 膀胱炎では頻尿及び排尿痛に P2X (特に P2X₃) が関与する可能性が高いが、TRPV1 の関与は小さい。ii) カプサイシン頻尿モデルの頻尿、排尿痛には TRPV1 が関与する。P2X の関与は小さい。iii) 酢酸頻尿モデルにおける頻尿は P2X 拮抗薬、TRPV1 拮抗薬のいずれでも抑制されず、排尿痛は抑制されたことから頻尿には P2X や TRPV1 受容体以外の機構 (酸感受性イオンチャンネル ASIC) の関与も考えられる。

P2X拮抗薬によって排尿痛、残尿が抑制されたことから酸刺激で二次的にATPが放出されている可能性がある。

このように、頻尿はその原因によって排尿痛を伴う場合と伴わない場合があり、頻尿及び排尿痛の治療は頻尿の原因を特定して治療薬を選択すべきであると結論した。本研究によりP2X₃受容体拮抗薬は新たな頻尿治療薬としての可能性が開かれた。

(2) 膀胱及び尿道に発現するP2X受容体とその機能

摘出膀胱(排尿筋)及び尿道に内在する神経をフィールド電気刺激したときの収縮に対するP2X₁拮抗薬あるいはP2X₃拮抗薬の影響を観察した。排尿筋の収縮はP2X₁拮抗薬及びP2X₃拮抗薬で抑制された。神経を介さず直接P2X受容体を活性化する α,β -methylene ATPによる収縮もP2X₁拮抗薬、P2X₃拮抗薬は抑制した。P2X₁受容体は排尿筋に存在し、収縮に寄与することはすでに報告されているが、本実験でP2X₃受容体も直接収縮に寄与している可能性が考えられた。

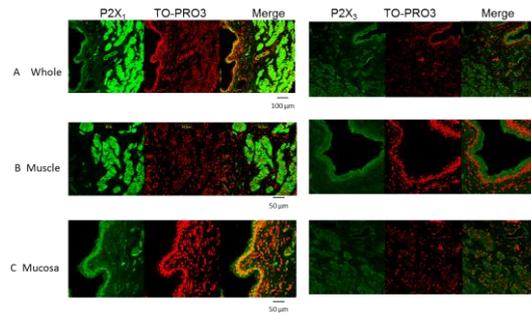


《図6 膀胱の上皮(urothelium, U)及び筋層(SM)に発現するP2X₁及びP2X₃受容体のmRNA(A)及びタンパク質(B)》

そこで排尿筋を粘膜と筋層に分けて、RT-PCR法でP2X₃のmRNA発現を、ウエスタンブロット法でP2X₃タンパク質の発現を調べたところ、筋層にもP2X₃のmRNA及びタンパク質が発現している結果が得られた(図6)。

神経が密に分布する上皮ではP2X₁タンパク質の発現が少なかったことから、P2X₁は神経では発現が少ないことが考えられた。P2X₃が筋層に発現することはP2X₃抗体を用いた免疫染色法によっても確かめられた(図7)。これにより、P2X₃は神経のみならず平滑筋にも発現し、平滑筋に存在するP2X₃は収縮を

起こすよう機能していることが示唆された。



《図7 膀胱標本のP2X₁受容体(左)及びP2X₃受容体(右)の発現(免疫染色法) A:上皮及び筋層を含む標本。B:筋層。C:上皮。TO-PRO3は核染色》

一方、尿道の神経刺激による収縮はP2X₁拮抗薬あるいはP2X₃拮抗薬でほとんど影響を受けず、尿道には両受容体は存在しないか、機能しておらず、尿道では主としてムスカリン受容体が収縮に寄与するデータが得られた。このことから尿道知覚神経の頻尿への関与は小さいことが示唆された。

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2件)

- ① 伊藤勝昭、岩見暁人、飯田真志、桂裕美、池田正浩 二種のラット頻尿(過活動膀胱および膀胱炎)モデルにおける排尿行動、排尿動態の比較. 宮崎大学農学部研究報告(査読あり) 56, 153-161 (2010)
- ② Takahashi, S., Hirai, N., Shirai, M., Ito, K., Asai, F. Comparison of the blood coagulation profiles of ferrets and rats. J. Vet. Med. Sci. (査読あり) 73, 953-956 (2011) DOI: JST.JSTAGE/jvms/10-0489

[学会発表](計5件)

- ① 伊藤勝昭、飯田真志、岩見暁人、桂裕美、池田正浩. ラット各種頻尿モデルにおける排尿頻度、残尿、膀胱痛の関連性とP2X受容体の役割. 第147回日本獣医学会学術集会 平成21年4月4日
- ② 伊藤勝昭、飯田真志、岩見暁人、桂裕美、池田正浩. ラット頻尿モデルにおける排尿頻度、排尿痛、残尿に対するP2X受容体拮抗薬およびTRPV1拮抗薬の効果. 第16回日本排尿機能学会 平成21年9月12日

- ③ 伊藤勝昭、飯田真志、岩見暁人、桂 裕美、池田正浩. ラット各種頻尿モデルにおける排尿動態、排尿痛および残尿の特徴と薬物の効果. 第 2 回排尿障害モデル動物研究会 平成 21 年 11 月 27 日
- ④ 桂 裕美、池田正浩、伊藤勝昭. 摘出ラット尿道のフィールド電気刺激による収縮の薬理的性質. 第 83 回日本薬理学会年会 平成 22 年 3 月 17 日
- ⑤ 伊藤勝昭、飯田真志、岩見暁人、桂 裕美、池田正浩. ラット各種頻尿モデルにおける排尿痛反応の相違と P2X 拮抗薬および TRPV1 拮抗薬の効果. 第 83 回日本薬理学会年会 平成 22 年 3 月 18 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 勝昭 (ITO KATSUAKI)
宮崎大学・農学部・名誉教授
研究者番号：70136795

(2) 研究分担者

伊藤 薫 (ITO KAORU)
南九州大学・健康栄養学部・教授
研究者番号：70341633

浅井 史敏 (ASAI FUMITOSHI)
麻布大学・獣医学部・教授
研究者番号：00511677
(平成 22～23 年度のみ)

阿野 仁志 (ANO HITOSHISHI)
宮崎大学・農学部・助教
研究者番号：50372800
(平成 21～22 年度のみ)

(3) 連携研究者

なし ()