

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09428

研究課題名(和文) ガス状情報伝達物質一酸化炭素の排尿機能への作用機序解明に向けた基盤研究

研究課題名(英文) The role of carbon monoxide in the regulation of Lower Urinary tract function

研究代表者

齊藤 源顕 (Saito, Motoaki)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・教授

研究者番号：60273893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱瘻に一酸化炭素ドナーを入れる実験から外因性の一酸化炭素投与は膀胱にて排尿反射を抑制させる事がわかった。恒温槽を用いた機能実験から、一酸化炭素は膀胱頂部と膀胱三角部において弛緩作用を有するがその作用は非常に弱いことが判明した。側脳室に一酸化炭素ドナーを入れる実験から脳内一酸化炭素はGABAAおよびGABAB受容体を介して内因性に排尿反射を抑制することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一酸化炭素は致死性のガスとして知られているが、一方情報伝達物質としても知られている。しかし、その生体内の役割は一酸化窒素や硫化水素に比べてあまり知られていない。本研究で、排尿反射における末梢性および中枢性の一酸化炭素の役割を明らかにした。本研究の成果は排尿障害治療薬開発の基礎資料になるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：1.Exogenously intravesical administered CO suppresses the rat micturition reflex independently of bladder smooth muscle relaxation. Thus, CO in the bladder might be a new therapeutic target for lower urinary tract dysfunctions such as overactive bladder. 2.Endogenous CO in the brain centrally suppresses the micturition reflex through brain GABA receptors in rats. Thus, brain endogenous CO could be a novel therapeutic target for patients who cannot obtain sufficient therapeutic effects from conventional medications on lower urinary tract dysfunctions.

研究分野：排尿科学

キーワード：一酸化炭素 排尿反射 脳 膀胱

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

一酸化炭素(CO)は中毒性のガスとして知られているが、下部尿路でのその役割は不明な点が多い。下部尿路及び前立腺組織におけるガス状情報伝達物質の生理機能については、NOが尿道及び前立腺において平滑筋弛緩作用を示す事との報告がある(World J Urol 1994;12:274-80)。代表者らは近年、H<sub>2</sub>Sが膀胱及び前立腺において平滑筋弛緩作用を示す事を明らかにした(NeuroUrol Urodyn 2018;37:2519-26)。下部尿路組織は心血管系、消化器系など他の自律神経器官と比べて随意的なコントロール機構がより発達しており、正常な排尿機能を維持するためには末梢組織、末梢神経系に加え中枢神経系(CNS)を介する複雑な制御が必要となる。CO、NOおよびH<sub>2</sub>Sは脳内でも合成され、シナプス可塑性、神経伝達調節などに関与する事が報告されている(Neuron 1992;8:3-11; Neurochem Int 2013;63:492-7; Br J Pharmacol 2015;172:1533-45)。これら脳内ガス状情報伝達物質がneuromodulatorとして排尿機能制御に何らかの役割を担う可能性が考えられる。代表者らは最近、脳内NOが排尿促進に、脳内H<sub>2</sub>Sが排尿抑制に、それぞれ関与する事を報告した(NeuroUrol Urodyn 2020;39:1687-99; Nitric Oxide 2020;104-105:44-50)。一方で、排尿機能制御におけるCOの役割については、以前尿道平滑筋弛緩作用が報告されたのみであり(Br J Pharmacol 1997;120:312-8)、下部尿路・前立腺組織及びCNS、各レベルにおける詳細なCOの役割は不明である。加えて、排尿機能制御におけるCO-NO/H<sub>2</sub>S間の相乗作用・Crosstalkについても明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では「一酸化炭素が排尿機能制御に果たす役割は何か？」を根本の問いとし、排尿機能制御における脳内及び下部尿路・前立腺組織のCOの生理機能を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) 下部尿路組織におけるCOの役割

ウレタン麻酔下(0.8 g/kg, ip)にて雄性Wistar系ラット(350-450 g)に対し膀胱内圧測定(CMG)用カテーテルを膀胱に挿入した。生理食塩水およびCORM-3(COドナー)溶液( $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  および  $10^{-6}$  M)を4 ml/hの速度で膀胱内に注入し排尿間隔(ICI)および最大膀胱排尿圧(MVP)の変化を観察した。

ペントバルビタール麻酔下(80 mg/kg, ip)にて雄性Wistar系ラットから膀胱頂部、膀胱三角部、肝臓および視床下部を摘出し、定量的PCR法でHO-1およびHO-2のmRNA発現量を測定した。

上記方法で摘出した膀胱頂部および膀胱三角部を用いて1 x 5 mmの筋切片を作成した。恒温槽を用いてカルバコール( $10^{-5}$  M)で前収縮させた筋切片に対して、CORM-3 ( $1 \times 10^{-8}$  から  $3 \times 10^{-5}$  M)の弛緩反応を観察した。

#### 2) 排尿制御における脳内COの役割についての検討

ウレタン麻酔下(0.8g/kg, ip)の雄性Wistar系ラットを用いた。膀胱内圧測定(CMG)のために、カテーテルを膀胱に挿入し生理食塩水を膀胱内に持続注入(12 ml/h)した。脳室内

投与のための開頭、また静脈内投与のため的大腿静脈カテーテル挿入を行った。連続 CMG は施術 2 時間後に開始し、その 1 時間後に CORM-3 (1 または 10 nmol/rat) または ZnPP (非選択的 HO 阻害薬、10 または 30 nmol/rat) を脳室内投与した。一部のラットでは、CORM-3 (10 nmol/rat) または ZnPP (30 nmol/rat) を静脈内投与した。連続 CMG は、薬物投与後 120 分継続した。

ZnPP (30 nmol / rat) を脳室内投与し、単回 CMG を実施した。加えて、脳室内投与された ZnPP (30 nmol/rat) による反応に対する CORM-3 (10 nmol/rat) 脳室内前処理の効果を評価した。

脳室内投与された CORM-3 (10 nmol/rat) による反応に対する GABA<sub>A</sub> 受容体遮断薬 SR95531 (0.1 nmol/rat) あるいは GABA<sub>B</sub> 受容体遮断薬 SCH50911 脳室内前処置の影響を検討した。ICI および MVP の評価は以下の様に行った：CORM-3 または ZnPP 投与 30 分前から投与直前 (-30~0 分)、および投与直後から 30 分間隔 (0~30 分、30~60 分、60~90 分、90~120 分) の ICI および MVP の平均値を求め、そこから薬物投与前後での変化率を算出し比較検討した。

#### 4. 研究成果

##### 結果

##### 1) 下部尿路組織における CO の役割

膀胱内に注入した CORM-3 ( $10^{-6}$  M) は生食注入と比べて明らかに ICI を有意に延長させたが、MVP に関しては変化がなかった。(下図 1)

ラット膀胱組織には構成型アイソザイムの HO-2 が発現している一方、誘導型アイソザイム HO-1 の発現は低レベルであった。(下図 2)

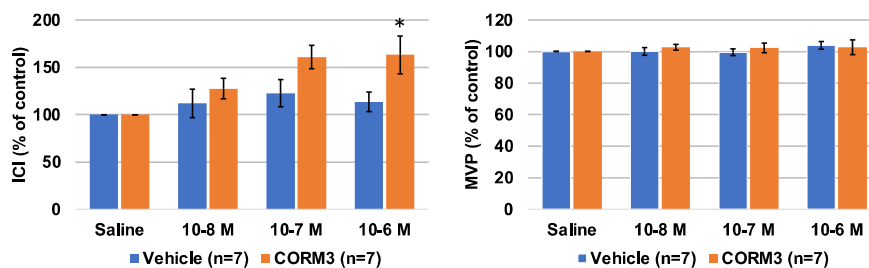


Fig. 1. Effect of intravesically instilled CORM3 (CO donor,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  and  $10^{-6}$  M) on ICI and MVP. \* $P < 0.05$ , when compared with an unpaired Student *t*-test to the Vehicle (saline)-treated control group. Data were calculated as the ratio to the pre-instillation of saline. Values are means  $\pm$  SEM. Instillation of the next higher concentration of CORM3 was started after detecting 4 micturition reflexes induced by CORM3 at a lower concentration. CO, carbon monoxide; ICI, intercontraction intervals; MVP, maximal voiding pressure.

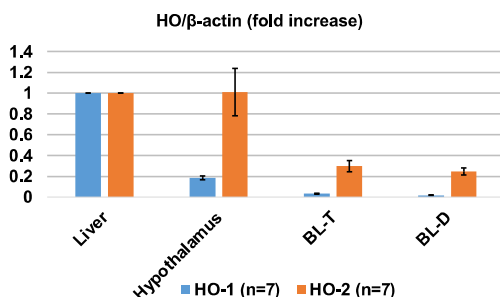


Fig. 2. Expression levels of HO in the rat bladder. The amount of mRNA for HO-1 and HO-2 was normalized to the amount of mRNA for  $\beta$ -actin. Values present as means  $\pm$  SEM. Liver and hypothalamus are positive controls. BL-D, bladder dome; BL-T, bladder trigone; HO, heme oxygenase.

膀胱頂部および膀胱三角部筋切片において CORM-3 単独では収縮反応も弛緩反応も示さ

なかった。カルバコール( $10^{-5}$  M)で前収縮させた筋切片に対して、CORM-3はわずかに弛緩反応を示したが、vehicle投与群と比べ有意な差は認めなかった。(表1)

Table 1. Data from organ bath studies in bladder strips from rats

Group	Relaxation rate (%)	EC <sub>50</sub> (M)
<b>BL-D</b>		
Vehicle	18.2 ± 1.7	1.3 ± 0.5 (× 10 <sup>-6</sup> )
CORM3	23.0 ± 3.4	6.3 ± 0.2 (× 10 <sup>-6</sup> )
<b>BL-T</b>		
Vehicle	23.1 ± 4.3	1.1 ± 0.3 (× 10 <sup>-6</sup> )
CORM3	28.4 ± 3.3	1.3 ± 0.6 (× 10 <sup>-6</sup> )

Values are means ± SEM (n=14). CORM3 (CO donor,  $1 \times 10^{-6}$  to  $3 \times 10^{-5}$  M) or vehicle was administered on the BL-D and BL-T strips pre-contracted by carbachol ( $10^{-6}$  M). BL-D, bladder dome; BL-T, bladder trigone.

以上の結果から外因性のCO投与は膀胱にて排尿反射を抑制させたが、CO自体の膀胱平滑筋の弛緩反応は極めて弱いことが判明した。

## 2) 排尿制御における脳内COの役割についての検討

CORM-3脳室内投与は用量依存性にICIを延長させた一方、MVPには影響を与えなかった。(下図A)

ZnPP脳室内投与は用量依存性にICIを短縮させたが、MVPには影響を与えなかった。(下図B)

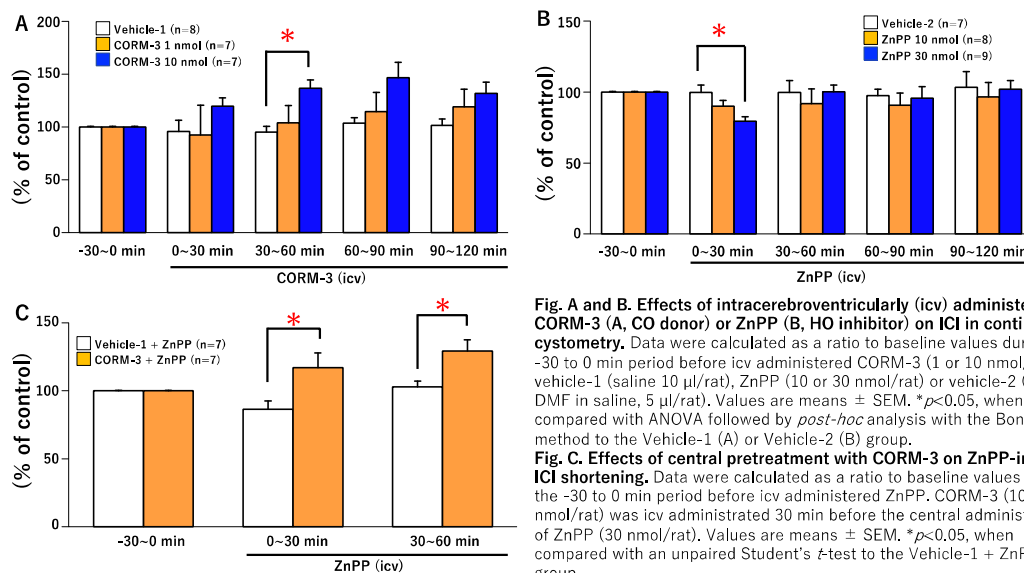


Fig. A and B. Effects of intracerebroventricularly (icv) administered CORM-3 (A, CO donor) or ZnPP (B, HO inhibitor) on ICI in continuous cystometry. Data were calculated as a ratio to baseline values during the -30 to 0 min period before icv administered CORM-3 (1 or 10 nmol/rat), vehicle-1 (saline 10  $\mu$ l/rat), ZnPP (10 or 30 nmol/rat) or vehicle-2 (1% DMF in saline, 5  $\mu$ l/rat). Values are means ± SEM. \* $p$ <0.05, when compared with ANOVA followed by *post-hoc* analysis with the Bonferroni method to the Vehicle-1 (A) or Vehicle-2 (B) group.

Fig. C. Effects of central pretreatment with CORM-3 on ZnPP-induced ICI shortening. Data were calculated as a ratio to baseline values during the -30 to 0 min period before icv administered ZnPP. CORM-3 (10 nmol/rat) was icv administered 30 min before the central administration of ZnPP (30 nmol/rat). Values are means ± SEM. \* $p$ <0.05, when compared with an unpaired Student's *t*-test to the Vehicle-1 + ZnPP group. CO: carbon monoxide; HO: haem oxygenase; ICI: intercontraction interval.

CORM-3およびZnPPの静脈内投与では、ICIおよびMVPへの影響は見られなかった。

ZnPP脳室内投与時の単回CMGでは、ZnPPは排尿効率に影響を与えず、残尿を増加させなかった一方、一回排尿量と膀胱容量を減少させた。(表2)

**Table 2. Effects of intracerebroventricularly administered ZnPP on urodynamic parameters in single cystometry**

	Before icv	After icv 0~30 min (%)
Vv	100.0 ± 0.0	84.2 ± 4.4*
Rv	100.0 ± 0.0	89.4 ± 8.5
BC	100.0 ± 0.0	89.7 ± 4.3*
VE	100.0 ± 0.0	95.8 ± 3.3

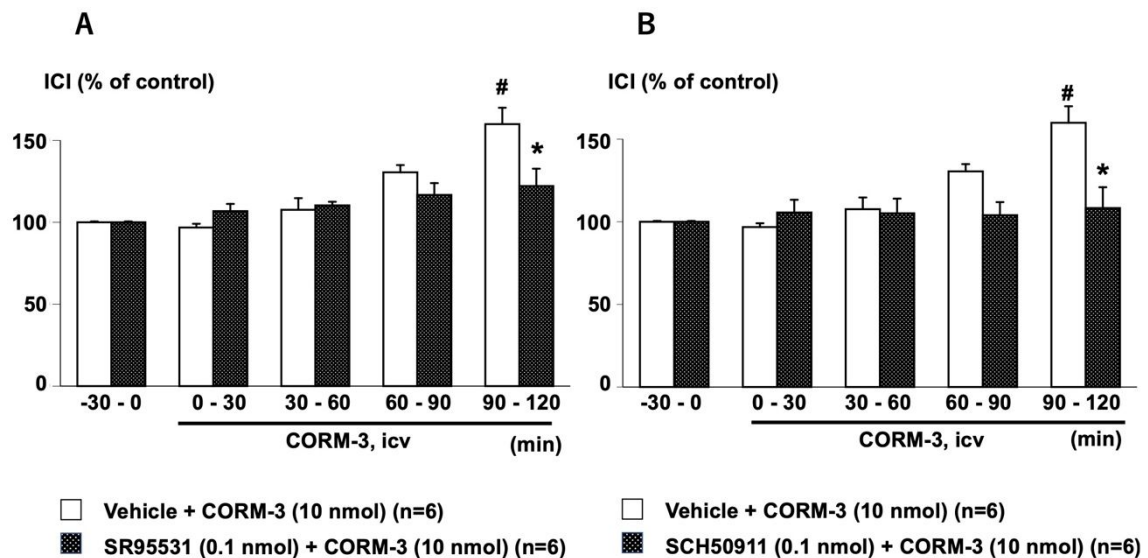
Data are calculated as a ratio to baseline values before intracerebroventricular administration of ZnPP (30 nmol/rat) (n=9). Values are means ± SEM.

Vv: single-voiding volume, Rv; post-voiding residual volume, BC: bladder capacity, VE: voiding efficacy.

\* $p < 0.05$ , when compared with paired *t*-test to Before icv.

ZnPP 脳室内投与で見られた ICI 短縮は、CORM-3 の脳室内前投薬で有意に抑制され、この ICI 短縮が ZnPP による HO 阻害を介した内因性 CO 産生低下に起因することが示された。(上図 C)

CORM-3 脳室内投与で見られた ICI 延長は、SR95531 あるいは SCH50911 の脳室内前投薬で有意に抑制された。(下図 A, B)



以上の結果から脳内 CO は GABA<sub>A</sub> および GABA<sub>B</sub> 受容体を介して内因性に排尿反射を抑制することが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamoto M, Shimizu T, Shimizu N, Fujieda M, Saito M	4. 巻 In press
2. 論文標題 Brain carbon monoxide can suppress the rat micturition reflex through brain GABA receptors	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Int J Urol	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 齊藤源顕, 山本雅樹, 清水孝洋	4. 巻 85
2. 論文標題 脳から見た排尿制御	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 西日泌尿	6. 最初と最後の頁 284-291
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 清水孝洋, 齊藤源顕	4. 巻 29
2. 論文標題 脳内ガス状伝達物質と排尿機能	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Urology Today	6. 最初と最後の頁 204-210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto M, Shimizu T, Zou S, Shimizu S, Higashi Y, Fujieda M, Saito M	4. 巻 2 supp2
2. 論文標題 Carbon monoxide in the brain suppresses the micturition reflex in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Continence	6. 最初と最後の頁 100209
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cont.2022.100209	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yamamoto M, Shimizu T, Zou S, Shimizu S, Higashi Y, Fujieda M, Saito M
2. 発表標題 Carbon monoxide in the brain suppresses the micturition reflex in rats
3. 学会等名 ICS2022 (International Continence Society 52nd Annual Meeting) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本雅樹, 清水孝洋, Zou Suo, 清水翔吾, 東洋一郎, 藤枝幹也, 齊藤源顕
2. 発表標題 脳内一酸化炭素がラット排尿反射へおよびす影響の薬理的解析
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会・第43回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齊藤源顕, 山本雅樹, 清水孝洋
2. 発表標題 脳から見た排尿制御
3. 学会等名 第74回西日本泌尿器科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本雅樹, 清水孝洋, Zou Suo, 清水翔吾, 東洋一郎, 藤枝幹也, 齊藤源顕
2. 発表標題 脳内一酸化炭素が排尿機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第29回日本排尿機能学会
4. 発表年 2022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
研究分担者	清水 孝洋  (Shimizu Takahiro)  (00363276)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・准教授   (16401)	
研究分担者	山本 雅樹  (Yamamoto Masaki)  (20571037)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師   (16401)	
研究分担者	東 洋一郎  (Higashi Youichirou)  (80380062)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・講師   (16401)	
研究分担者	清水 翔吾  (Shimizu Shogo)  (90721853)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教   (16401)	

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