

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 21 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2014

課題番号：22591802

研究課題名(和文) 脊髄における下部尿路機能を制御する神経伝達物質の網羅的解析と新規治療薬の探求

研究課題名(英文) Analysis of spinal neurotransmitters in the control of urinary voiding and continence reflexes

研究代表者

古田 昭 (FURUTA, AKIRA)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：90349613

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)：2アドレナリン受容体(2-AR)に作用する薬剤のなかにはイミダゾリン受容体(1-R)にも作用する薬剤がある。そこで、本研究では脊髄内の2-ARと1-R(脊髄内には11-Rと12-Rが存在する)の排尿機能へ及ぼす影響について検討した。その結果、脊髄内の膀胱求心路には2-ARが存在し、排尿閾値圧を制御している可能性が示唆された。また、脊髄内の11-Rの作用として、尿禁制に關与する尿道平滑筋あるいは外尿道括約筋や骨盤底筋群(横紋筋)の活動を制御し、尿道抵抗をコントロールしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：2-adrenoceptor (AR) agonists and antagonists additionally have varying affinity for imidazoline receptors (1-Rs). It has been reported that intrathecal (i.t.) administration of 2-AR agonists such as dexmedetomidine induces the sedative and analgesic effects and that i.t. application of 11-R agonists such as clonidine has the hypotensive effect. In this study, we investigated the role of spinal 2-ARs, 11-Rs and 12-Rs in the control of voiding and continence reflexes in rats. The results of our study suggest that sensory transduction from the bladder (represented by threshold pressure changes) are in part mediated by 2-ARs in the spinal cord and that urethral smooth and/or striated muscle sphincter (represented by leak point pressure changes) are partly controlled by spinal 11-Rs. These findings would be useful to develop the new treatments for lower urinary tract dysfunction.

研究分野：医歯薬学

キーワード：2アドレナリン受容体 イミダゾリン受容体 脊髄 膀胱機能 尿道機能

1. 研究開始当初の背景

下部尿路機能(蓄尿と尿排出)は橋より上位の排尿中枢と下位の仙髄によって制御されているが、その神経伝達物質はまだ十分に解明されていない。本研究では下位排尿中枢である脊髄に焦点を絞り、覚醒したラットの排尿筋と外尿道括約筋の機能を同時に測定することによって、(1)蓄尿や尿排出時における興奮性ならびに抑制性神経伝達物質の個々の作用ならびに相互作用を網羅的に解析すること、(2)それら神経伝達物質の分泌をシナプス前後で調整し得る薬剤を探索することにより、中枢における下部尿路機能障害治療薬を新規に確立することを目的とした。

2. 研究の目的

Clonidine や tizanidine など α_2 アドレナリン受容体 (α_2 -AR) に作用する薬剤のなかにはイミダゾリン受容体 (I-R) にも作用する薬剤がある。 α_2 -AR 作用薬 (dexmedetomidine など) には鎮静・鎮痛作用があることが報告されている。また、 I_1 -R 作用薬 (clonidine や tizanidine など) には中枢性の降圧作用や筋弛緩作用が認められている。そこで、本研究では脊髄内の α_2 -AR と I-R (脊髄内には I_1 -R と I_2 -R が存在する) の排尿機能へ及ぼす影響について検討した。膀胱痛症候群/間質性膀胱炎の病態のひとつとして、骨盤内臓器間の相互感作が示唆されている。そこで、侵害刺激受容体のひとつである Transient Receptor Potential (TRP) チャンネルに着目し、胃、大腸、子宮内の TRP 刺激時の膀胱機能を評価した。大腸や子宮の TRPA1 受容体を刺激すると間質性膀胱炎様症状が誘発されることをわれわれは以前に報告した。今回、TRPA1 を介する大腸膀胱の相互感作についてさらに検討した。

3. 研究の方法

SD 雌ラットを用いて、検査3日前にイソフルレン麻酔下で髄腔内カテーテルを L6/S1 レベルに留置した。覚醒拘束下で clonidine (I_1 -R/ α_2 -AR agonist)、idazoxan (I_1 -R/ α_2 -AR antagonist, I_2 -R ligand)、benazoline (I_2 -R ligand)、B-HT933 (α_2 -AR agonist)、yohimbine (α_2 -AR antagonist) を髄腔内に 0.3, 3, 30nmol ずつ累積投与した時の膀胱内圧、尿漏出圧、血圧の変化をそれぞれ測定した。雌 SD ラットを用いて、イソフルレン麻酔下に胃、大腸または子宮と膀胱内に PE カテーテルを留置後、拘束覚醒下に以下の条件で膀胱機能を評価した。1) TRPV1 刺激には Capsaicin (1, 3, 10, 30mM) 刺激には R1747 (1, 3, 10, 30mM)、

TRPA1 刺激には Allyl isothiocyanate (AITC: 1, 3, 10, 30%v/v) TRPM8 刺激には Menthol (3, 10, 30, 100%v/v) を用いて、胃、大腸、子宮内に 50ul ずつ 30 分間隔で注入し、膀胱感作の有無を検討した。2) 大腸あるいは子宮内に 30%AITC 注入後、膀胱が感作されるまでの時間を 30 分間隔で経時的に評価した。また、大腸内に 30%AITC 注入 30 分前に Ruthenium Red (RR: TRPA1 阻害薬) 3mg/kg 静脈内投与時、注入 120 分後に RR を 0.03ug 髄腔内あるいは 3mg/kg 静脈内投与時の膀胱機能の変化についても検討した。

SD 雌ラットを用いて、イソフルレン麻酔下に大腸の肛門側より 4cm と 6cm の部位を結紮、両側尿管を結紮切断後、大腸と膀胱内にそれぞれカテーテルを留置した。1) 覚醒拘束下に大腸膀胱感作では大腸内、膀胱大腸感作では膀胱内にそれぞれ TRPA1 刺激薬のイソチオシアン酸アリル (AI: 100mM) を 300ul ずつ注入し、大腸と膀胱内圧を経時的に測定した。大腸膀胱感作では膀胱内に 0.04ml/min で生食を持続注入した。また、選択的 TRPA1 遮断薬である HC-030031 (HC: 3mg/kg、静注) の前投与で大腸膀胱感作が抑制されるか検討した。2) イソフルレン麻酔下に両側下腹神経 (0.04ml/min で生食持続膀胱注) または骨盤神経 (300ul 生食膀胱注) を切断したラットを用いて、TRPA1 を介する大腸膀胱感作を比較検討した。3) 別のラットを用いて、エバンスブルーの血管外漏出量より大腸膀胱の相互感作(炎症)を評価した。

4. 研究成果

Clonidine は排尿閾値圧を有意に上昇させ、30nmol 投与で 3 匹が尿閉となった。同様に B-HT933 も排尿閾値圧を有意に上昇させた。一方、idazoxan と yohimbine は排尿閾値圧と排尿間隔を有意に低下させた。次に、clonidine は尿漏出圧を有意に低下させ、idazoxan は尿漏出圧を有意に上昇させた。また、clonidine は血圧を有意に低下させ、idazoxan と benazoline は血圧を有意に上昇させた。その他のパラメーターに有意差は認められなかった。以上の結果より、おそらく脊髄内の膀胱求心路には α_2 -AR が存在し、排尿閾値圧を制御している可能性が示唆された。また、われわれが以前報告した知見も踏まえて (J Urol 181: 1467-73, 2009) 脊髄内の I_1 -R の作用として、尿禁制に関与する尿道平滑筋あるいは外尿道括約筋や骨盤底筋群(横紋筋)の活動を制御し、尿道抵抗をコントロールしている可能性が示唆された。但し、脊髄内の I_1 -R、 I_2 -R を介する血圧の変動が膀胱・尿道機能へ及ぼす影響に

関しては、今後さらなる検討が必要と考えられた。最後に、本研究結果は今後の下部尿路機能障害に対する創薬研究の一助になるものと思われた。

大腸と子宮の TRPV1、V4、M8 を刺激しても膀胱機能に有意な変化は認められなかった。一方、TRPA1 を刺激すると大腸では 10%AITC、子宮では 30%AITC 注入時より voiding threshold pressure (TP) と intercontraction interval (ICI) は有意に低下した。また、胃に関してはすべての TRP 刺激において膀胱機能に変化は認められなかった。また、大腸では 30%AITC 注入 30 分後より TP、60 分後より ICI が有意に低下し、子宮では注入 60 分後より TP と ICI が有意に低下していき、120 分以降で膀胱機能はほぼ一定化した。一方、RR を前投与すると 30%AITC 注入 150 分後まで膀胱は感作されなかったが、膀胱感作後(注入 120 分後)に RR を投与すると髄腔内投与では TP、ICI の有意な増加が認められたが、静脈内投与では変化は認められなかった。以上の結果より、大腸や子宮など骨盤内臓器の TRPA1 が刺激されると、30-60 分後より膀胱が感作された。一方、骨盤外の胃と膀胱の間に相互感作は認められなかった。膀胱感作後に RR を髄腔内投与すると膀胱の感作が抑制されたことから、TRPA1 を介する骨盤内臓器間の感作には中枢性感作が関与していることが示唆された。また、骨盤内臓器間の感作に TRPV1、V4、M8 刺激は関与していなかった。

大腸 膀胱感作では AI 投与 30 分後より大腸内圧の有意な上昇、また、90 分後より排尿間隔の有意な低下を認めた。この相互感作は HC の前投与により 120 分後まで完全に抑制された。一方、膀胱 大腸感作では AI 投与 30 分後より膀胱内圧の有意な上昇を認めたが、大腸内圧は 30 分後より有意に低下した。一方、大腸 膀胱感作は下腹神経切断動物で誘発されたが、骨盤神経切断動物で誘発されなかった。また、大腸 膀胱感作では膀胱の炎症が認められたが、膀胱 大腸感作では大腸の炎症は認められなかった。以上の結果より、TRPA1 を介する大腸 膀胱の相互感作に関して、大腸の骨盤神経求心路に発現する TRPA1 刺激を介して膀胱が感作されることが本研究で証明された。このことから骨盤内臓器の求心路における侵害刺激受容体の発現に差異があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Furuta A, Suzuki Y, Naruoka T, Asano K, Egawa S, Yoshimura N. Cross-sensitization mechanisms

between colon and bladder via transient receptor potential A1 stimulation in rats. *Int Urogynecol J* 25 査読有 1575-81 (2014) doi: 10.1007/s00192-014-2405-y

Yoshimura N, Ogawa T, Miyazato M, Kitta T, Furuta A, Chancellor MB, Tyagi P. Neural mechanisms underlying lower urinary tract dysfunction. *Korean J Urol* 55 [査読有] 81-90 (2014) doi: 10.4111/kju.2014.55.2.81

Koike Y, Furuta A, Suzuki Y, Honda M, Naruoka T, Asano K, Egawa S, Yoshimura N. Pathophysiology of urinary incontinence in murine models. *Int J Urol* 20 査読有 64-71 (2013) doi: 10.1111/j.1442-2042.2012.03225.x

Furuta A, Suzuki Y, Hayashi N, Egawa S, Yoshimura N. TRPA1 receptor-mediated neural cross-talk and afferent sensitization induced by oxidative stress: Implication for the pathogenesis of interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Int J Urol* 19 査読有 429-36 (2012) doi: 10.1111/j.1442-2042.2012.02966.x

Furuta A, Suzuki Y, Asano K, de Groat WC, Egawa S, Yoshimura N. Urethral compensatory mechanisms to maintain urinary continence after pudendal nerve injury in female rats. *Int Urogynecol J* 22 査読有 963-70 (2011) doi: 10.1007/s00192-011-1403-6

Furuta A, Suzuki Y, Honda M, Koike Y, Naruoka T, Asano K, Chancellor MB, Egawa S, Yoshimura N. Time-dependent changes in bladder function and plantar sensitivity in a rat model of fibromyalgia induced by hydrochloric acid injection into the gluteus. *BJU Int* 109 査読有 306-10 (2012) doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10258.x

〔学会発表〕(計 6 件)

Furuta A, Kimura S, Honda M, Naruoka T, Furuta N, Suzuki Y, Yoshimura N, Egawa S. Role of α_2 -adrenoceptors and imidazoline receptors in the control of voiding and continence reflexes in conscious rats. 109th American Urological Association 2014 Orlando USA

古田 昭、木村章嗣、本田真理子、小池祐介、成岡健人、浅野晃司、鈴木康之、吉村直樹、瀬川 晋. 脊髄内 α_2 アドレナリン受容体とイミダゾリン受容体の排尿機能へ及ぼす影響. 第 102 回日本泌尿器科学会総会 2014 神戸

Furuta A, Koike Y, Naruoka T, Furuta N, Suzuki Y, Egawa S, Yoshimura N. Analysis of the mechanism of

cross-sensitization between the colon and bladder via TRPA1 receptor stimulation in the colon or bladder in rats. 108th American Urological Association 2013 San Diego USA

Furuta A, Egawa S, Chancellor MB, Yoshimura N. Analysis of TRP receptors involved in pelvic organ cross-sensitization in rats. 107th American Urological Association 2012 Atlanta USA

古田 昭、小池祐介、成岡健人、鈴木康之、穎川 晋、吉村直樹. TRPA1 受容体を介する大腸 膀胱の相互感作に関する検討. 第 19 回日本排尿機能学会 名古屋

Furuta A, Egawa S, Chancellor MB, Yoshimura N. Analysis of TRP receptors involved in pelvic organ cross-sensitization in rats. Society for Urodynamics and Female Urology New Orleans USA

6 . 研究組織

(1)研究代表者

古田 昭 (FURUTA, Akira)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 90349613