

# 東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	膀胱平滑筋のプロスタノイドTP受容体の活性化による収縮活動の増強効果とその機序
作成者（著者）	欧, 光瀚
公開者	東邦大学
発行日	2024.03.13
掲載情報	東邦大学大学院薬学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査: 田中, 光 /
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第1107号
学位記番号	甲第138号
学位授与年月日	2024.03.13
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	<a href="https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD28225116">https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD28225116</a>

## 論文要旨

### 膀胱平滑筋のプロスタノイド TP 受容体の活性化による収縮活動の増強効果とその機序

薬物治療学分野 欧 光 瀚

#### 【背景と目的】

膀胱は、伸縮性に富む袋状の器官で、その生理的機能は尿の貯留（蓄尿）と排出（排尿）である。その中心的な役割を担っているのは膀胱平滑筋で、その収縮・弛緩機能は自律神経系によって制御されていると考えられている。自律神経のうち、交感神経が優位となっているのは蓄尿期で、膀胱平滑筋が弛緩することで尿の貯留が起こる。一般に、この反応は、交感神経から遊離されたノルアドレナリンが膀胱平滑筋のアドレナリン  $\beta_3$  受容体を刺激することでもたらされると説明されている。一方、排尿期は、膀胱に溜まった尿が膀胱平滑筋の収縮により体外へ排出される時期である。排尿期では、副交感神経が優位となり、神経終末から遊離されたアセチルコリン（ACh）及び ATP がそれぞれムスカリン  $M_3$  受容体、プリン  $P2X1$  受容体を刺激することで膀胱平滑筋を収縮させる。神経障害や加齢などの要因が加わると、膀胱平滑筋の収縮・弛緩機能が低下し、尿排出機能障害や蓄尿機能障害などの排尿障害が引き起こされる。

日本を含む先進国では、高齢化が進み、排尿障害のうち、蓄尿機能障害に分類される過活動膀胱（OAB）の患者数が急増してきた。OAB は、蓄尿機能に異常が生じることで尿意切迫感を生じ、頻尿や場合によっては尿失禁を引き起こす疾患であり、患者の QOL を著しく低下させる。OAB の治療には、薬物療法が積極的に用いられ、主として、ムスカリン受容体拮抗薬とアドレナリン  $\beta_3$  受容体刺激薬が使用されている。ただし、既存の治療薬は副作用の発現率が高く、治療効果も十分とは言い難い。そのため、既存の治療薬とは異なる作用機序を有する OAB の新たな治療薬の登場が望まれている。

OAB の発症原因は現時点においても不明な点が多いが、近年、膀胱上皮と知覚神経系の関与が指摘されるようになった。とりわけ、膀胱上皮から産生されるプロスタノイドに対する関心が高まっている。プロスタノイドは膀胱上皮のほか、膀胱平滑筋でも産生され、知覚神経に作用して膀胱から中枢神経系への求心性入力を増大させる。一方、プロスタノイドは膀胱平滑筋にも直接作用してその基礎張力や自発性収縮活動に影響を与える。しかしながら、これまでの報告では、プロスタノイド類の膀胱平滑筋の基礎張力に対する影響に主眼が置かれており、自発性収縮活動に対する影響は十分に検討されていなかった。また、プロスタノイド類の作用に関与する受容体サブタイプやその作用機序にも不明な点が多いのが現状である。

そこで、本研究では、膀胱平滑筋の収縮活動（基礎張力、自発性収縮活動）に対するプロスタノイド類の影響を明らかにする目的で、モルモット摘出膀胱平滑筋を用いて、これまでその作用がヒト及び大型動物でしか報告されていなかった U46619（トロンボキササン（TX） $A_2$  安定誘導体）、及びこれまで報告がなかったプロスタグランジン（PG） $A_2$  を含む 5 種類のプロスタノイドの作用を検討することにした。併せて、プロスタノイド類の作用に関わる受容体サブタイプとその活性化に伴う  $Ca^{2+}$  流入経路を検討した。その結果、これらプロスタノイド類の膀胱平滑筋の収

縮活動の促進効果に膀胱平滑筋に発現しているプロスタノイド TP 受容体が重要な役割を担うとともに、その刺激が複数の  $Ca^{2+}$  流入経路を活性化することを見出したので報告する。

さて、TP 受容体の刺激は、膀胱以外の平滑筋組織、特に血管平滑筋の基礎張力を上昇させるのみならず、血管収縮因子による収縮反応を増強させるエンハンサーとして働く可能性が報告されている。同様の結果はヒト膀胱平滑筋でも報告されており、U46619 が副交感神経の活性化を介した収縮反応を増強させることが示された。この報告では、U46619 が副交感神経の TP 受容体を刺激することにより神経終末からの ACh の遊離を亢進させる可能性が示唆されている。一方、申請者は本研究で TP 受容体が膀胱平滑筋にも発現していることを見出したので、膀胱平滑筋の TP 受容体に対する刺激も ACh や ATP による収縮反応を増強する可能性があると考えた。しかし、これまでのところ、この可能性については検討されていなかった。

そこで、本研究では、膀胱平滑筋の TP 受容体への刺激が ACh 及び ATP 誘発性収縮を増強するという仮説についても検証した。その結果、U46619 が ACh 及び ATP アナログ ( $\alpha, \beta$ -methylene ATP ;  $\alpha\beta$ -MeATP) による膀胱平滑筋の収縮反応を相乗的に増強することを見出すとともに、後者の機序にプロテインキナーゼ C (PKC) が関与することを見出したので報告する。

## 【実験方法】

1. 筋の収縮反応の記録：雄性 Hartley 系モルモットから膀胱を摘出し、膀胱平滑筋標本を作製した。標本の張力変動を等尺性又は等張性に記録した。
2. mRNA の発現量の測定：膀胱組織から抽出した RNA を用いて、RT-qPCR により各種プロスタノイド受容体、SOCC 関連分子の mRNA の発現量を測定した。
3. TP 受容体の分布の検討：膀胱切片を作製し、蛍光免疫染色を行い、膀胱組織中の TP 受容体の発現部位を観察した。

## 【結果及び考察】

### 1. 基礎張力及び自発性収縮活動に対する U46619 及び 5 種類のプロスタノイドの影響

モルモット摘出膀胱平滑筋を用いて U46619 及び 5 種類のプロスタノイドの作用を検討した。1) 検討したプロスタノイド類のうち、U46619、 $PGE_2$ 、 $PGF_{2\alpha}$  及び  $PGA_2$  は膀胱平滑筋の基礎張力及び自発性収縮活動を増強した。2)  $PGD_2$  は膀胱平滑筋の実質的な基礎張力上昇効果を示さず、自発性収縮活動を完全に消失させた。3)  $PGI_2$  は膀胱の基礎張力及び自発性収縮活動に顕著な影響を与えなかった。以上の結果から、モルモット摘出膀胱平滑筋標本において、U46619、 $PGE_2$ 、 $PGF_{2\alpha}$  及び  $PGA_2$  により基礎張力及び自発性収縮活動が増強されることが明らかとなり、モルモット摘出膀胱平滑筋標本がプロスタノイド類の作用及びその機序を検討するのに非常に適した標本であることが示された。

### 2. U46619 及び 3 種類のプロスタノイドの増強効果に関与するプロスタノイド受容体の検討

U46619、 $PGE_2$ 、 $PGF_{2\alpha}$  及び  $PGA_2$  による収縮活動の増強に関与する受容体サブタイプを明らかにする目的で、RT-qPCR を用いて膀胱組織における各プロスタノイド受容体の mRNA の発現量を測定した。その結果、プロスタノイド受容体の発現量は、 $TP \approx EP_3 > EP_4 > EP_2 \approx DP_1 \approx$

DP<sub>2</sub> ≈ IP >> FP > EP<sub>1</sub> の順に多かったことから、TP 受容体、EP<sub>3</sub> 受容体の関与が考えられた。しかし、EP<sub>3</sub> 受容体は基本的には G<sub>s</sub>/G<sub>i</sub> 共役型受容体であることから、本研究では、G<sub>q</sub> 共役型受容体である TP 受容体に焦点を当てることにした。実際、TP 受容体は組織免疫染色により膀胱平滑筋細胞での発現が認められた。次に、TP 受容体拮抗薬である SQ 29,548 を用いて、U46619、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub> 及び PGA<sub>2</sub> による収縮活動の増強効果に対する TP 受容体の関与を検討した。その結果、基礎張力の上昇は SQ 29,548 によりいずれのプロスタノイド類による場合も有意に抑制された (U46619/PGF<sub>2α</sub>、80–100% ; PGA<sub>2</sub>/PGE<sub>2</sub>、30–50%)。したがって、程度は異なるものの、TP 受容体はいずれのプロスタノイド類による基礎張力の上昇効果にも関与し、特に U46619、PGF<sub>2α</sub> では主たる受容体となっていることが明らかとなった。また、自発性収縮 (振幅) の増強については、PGA<sub>2</sub>/PGE<sub>2</sub> では SQ 29,548 によって有意に抑制されなかったものの、U46619、PGF<sub>2α</sub> では 60–100% 抑制されたことから、U46619、PGF<sub>2α</sub> による自発性収縮 (振幅) の増強に対する TP 受容体の強い関与が示された。以上のことから、TP 受容体は、内因性プロスタノイドによる膀胱の収縮活動の増強において、重要な役割を担うプロスタノイド受容体のひとつであり、特に、TXA<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub> の主たる標的となる可能性が示された。

### 3. TP 受容体を介した収縮活動の増強効果に関与する Ca<sup>2+</sup>流入経路の検討

一般に、膀胱平滑筋の化学的刺激によって誘発される収縮反応は細胞外からの Ca<sup>2+</sup>流入、特に電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャンネル (VDCC) を介した Ca<sup>2+</sup>流入に強く依存することが報告されてきた。そこで、TP 受容体刺激による膀胱平滑筋の収縮活動の増強効果に対する VDCC の関与を明らかにする目的で、U46619 による基礎張力及び自発性収縮活動の増強効果に対する外液 Ca<sup>2+</sup>除去や verapamil (VDCC 抑制薬) の影響を検討し、以下の結果を得た。1) U46619 による基礎張力及び自発性収縮活動の増強効果は、外液 Ca<sup>2+</sup>除去によりいずれも完全に抑制された。2) U46619 による基礎張力の増強効果は verapamil により完全に抑制された。一方、自発性収縮活動の増強効果については、頻度の増強は verapamil により非常に強力に抑制されたが、振幅の増強は抑制されなかった。以上の結果から、TP 受容体刺激によってもたらされる基礎張力及び自発性収縮活動の頻度の増強効果は細胞外からの Ca<sup>2+</sup>流入に依存し、VDCC がその主たる経路であることが示された。一方で、verapamil 存在下で残存した自発性収縮活動は、LOE-908 (受容体作動性 Ca<sup>2+</sup>チャンネル (ROCC) 抑制薬) により抑制されず、SKF-96365 (ROCC 及びストア作動性 Ca<sup>2+</sup>チャンネル (SOCC) 抑制薬) により完全に抑制されたことから、自発性収縮活動の振幅の増強効果には SOCC の活性化が関与する可能性が示された。さらに、RT-qPCR を用いて膀胱組織における SOCC 関連分子 (*Orai*、*Stim*) の mRNA の発現量を測定した結果、*Orai1*、*Orai3*、*Stim2* の発現を認めたことから、これらの分子によって構成される SOCC が膀胱平滑筋の収縮活動を制御することが強く示唆された。

### 4. ACh 及び αβ-MeATP による収縮反応に対する U46619 の増強効果とその機序

U46619 は、経壁電気刺激による収縮反応を増強し、その増強効果は SQ 29,548 により消失した。また、U46619 は、ACh 及び αβ-MeATP による収縮反応をいずれも増強し、この増強効果も SQ 29,548 により完全に抑制された。以上の結果から、副交感神経を介した収縮反応の U46619 による増強効果の一部は、膀胱平滑筋側の TP 受容体の刺激を介したものであり、ACh 及び ATP

による収縮反応の増強によりもたらされることが示された。引き続き、その機序を検討し、以下の結果を得た。1) ①U46619によるACh誘発性収縮の増強効果はPKC阻害薬を含むいずれのリン酸化酵素阻害薬によっても抑制されなかった。②U46619はACh誘発性収縮のdiltiazem感受性・非感受性収縮成分のいずれに対しても増強効果を示した。以上の結果から、U46619によるACh誘発性収縮の増強効果は、VDCC依存性・非依存性収縮成分の両者の増強によるものの、これらの増強には少なくとも見かけ上、今回検討したいずれのリン酸化酵素も関与しない可能性が示唆された。2) ①U46619による $\alpha\beta$ -MeATP誘発性収縮の増強効果はPKC阻害薬(Gö 6983とsotrastaurin)によって抑制された。②PKC活性化薬であるphorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)は $\alpha\beta$ -MeATP誘発性収縮を増強し、その増強効果はPKC阻害薬で完全に抑制された。③U46619は $\alpha\beta$ -MeATP誘発性収縮のdiltiazem感受性・非感受性収縮成分のいずれに対しても増強効果を示した。④U46619とPMAは50 mM KCl誘発性収縮を増強し、その増強効果はPKC阻害薬で抑制された。以上の結果から、U46619による $\alpha\beta$ -MeATP誘発性収縮の増強効果の一部に、PKCの活性化を介したVDCCシグナリングの増強が関与することが示唆された。

### 【結 語】

本研究では、モルモット膀胱平滑筋を用いて、プロスタノイド類による収縮活動の増強効果におけるTP受容体の役割と機序を検討し、以下の知見を得た。

- ① プロスタノイド類による膀胱平滑筋の収縮活動の増強効果にTP受容体が重要な役割を担う。
- ② TP受容体を介した膀胱平滑筋の収縮活動の増強効果にVDCC/SOCCを介した細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入が関与する。
- ③ 膀胱平滑筋のTP受容体の活性化は、ACh、ATPによる収縮反応を増強する。
- ④ U46619によるATP誘発性収縮の増強効果の機序の一部にPKCを介したVDCCシグナリングの増強が関与する。
- ⑤ TP受容体を介した膀胱平滑筋の収縮活動の増強は排尿筋の過活動ならびに過活動膀胱の一因となる可能性がある。

### 【対象論文】

1) Ou G, Fujisawa M, Yashiro A, Xu K, Yoshioka K, Obara K, Tanaka Y. Prostanoid TP receptor stimulation enhances contractile activities in guinea pig urinary bladder smooth muscle through activation of Ca<sup>2+</sup> entry channels: Potential targets in the treatment of urinary bladder contractile dysfunction. *Life Sci.* 287, 120–130, 2021.  
<http://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120130>.

2) Ou G, Komura A, Hojo M, Kato R, Ikeda M, Fujisawa M, Xu K, Yoshioka K, Obara K, Tanaka Y. Pharmacological study on the enhancing effects of U46619 on guinea pig urinary bladder smooth muscle contraction induced by acetylcholine and  $\alpha,\beta$ -methylene ATP and the possible involvement of protein kinase C. *J Pharmacol Sci.* 153(3), 119–129, 2023.  
<http://doi.org/10.1016/j.jphs.2023.08.007>.

# 学位論文審査報告書

報告書記載：2024年2月15日

学位申請者名	欧 光瀚
論文題目	膀胱平滑筋のプロスタノイドTP受容体の活性化による収縮活動の増強効果とその機序
審査委員名	主査 田中 光 副査 高原 章 副査 宮内 正二
<p>学位論文の審査結果の要旨：</p> <p>我が国を含む先進国では高齢化が進み、排尿障害のうち、蓄尿機能障害に分類される過活動膀胱の患者数が急増してきた。過活動膀胱の発症原因の一端として、膀胱上皮や膀胱平滑筋から産生されるプロスタノイドに役割が注目されているが、膀胱平滑筋の収縮機能に関する情報は限られている。特に自発性収縮活動の機序やプロスタノイド類の作用に関する受容体タイプや作用機序については不明の点が多い。</p> <p>本研究では、摘出モルモット膀胱平滑筋を用いて、プロスタノイド類による収縮活動の増強効果におけるTP受容体の役割と機序を検討した。プロスタノイド誘導体U46619およびPGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、PGA<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub>による収縮反応を詳細に検討し、以下の知見を得た。①プロスタノイド類による膀胱平滑筋の収縮活動の増強効果にはTP受容体が重要な役割を担う。②TP受容体を介した膀胱平滑筋の収縮活動の増強効果にVDCC/SOCCを介した細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入が関与する。③膀胱平滑筋のTP受容体の活性化は、ACh、ATPによる収縮反応を増強する。④U46619によるATP誘発性収縮の増強効果の一部にPKCを介したVDCCシグナリングの増強が関与する。⑤TP受容体を介した膀胱平滑筋の収縮活動の増強は排尿筋の過活動ならびに過活動膀胱の一因となる可能性がある。</p> <p>本研究は膀胱の運動機能調節機構を分子レベルで理解する上で重要な情報を含んでおり、研究の進展により薬物治療戦略の構築への貢献が期待される。研究目的は明確であり、その目標に向けた研究計画を論理的に組み立て、適切に実施している。得られた結果は公正に判断され、それに基づいて次なる実験を計画して研究成果を積み重ねてきたことが学位論文から判断される。手法としては精密な収縮力測定を用いた薬理学的手法を主体とし、それにRT-PCR法や免疫組織学的手法を併用して結論の信頼度を高めている。審査委員との面談においても実験内容や結果の解釈についての説明は丁寧かつ科学的根拠に基づいていた。研究に対する姿勢は好感が持てるものであり、学術的な知識を含め審査委員全員が評価している。</p> <p>欧光瀚氏の研究成果は過活動膀胱に対する今後の薬物治療戦略構築に向けた新しい情報と知見を与えうるものである。この学位論文の内容は既に学術論文英文誌に公表されている。以上より、本審査論文は博士（薬学）の学位に十分に値するものと評価する。</p>	