

研究テーマ 「光応答性 NO 放出剤と光照射の技術を用いた新たな下部尿路機能障害治療の開発」

研究責任者	所属機関名	名古屋市立大学大学院薬学研究科
	官職又は役職	講師
	氏名	堀田祐志 メールアドレス yhotta@phar.nagoya-cu.ac.jp
共同研究者	所属機関名	名古屋市立大学大学院医学研究科
	官職又は役職	講師
	氏名	片岡智哉
	所属機関名	名古屋市立大学大学院薬学研究科
	官職又は役職	講師
	氏名	家田直弥
	所属機関名	名古屋市立大学大学院医学研究科 名古屋市立大学大学院薬学研究科
	官職又は役職	教授
	氏名	木村和哲

《様式B》

(平成 29 年度募集) 第 30 回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1, 000 字程度)

※産業技術として実用化の可能性や特許出願 (予定も含む) の有無についてもご記載ください。

2. 実施内容および成果の説明 (A4 で、5 ページ以内)

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要（1, 000字程度）

本研究では、下部尿路機能障害モデルを用いて、光応答性 NO ドナーと光照射による NO 産生の制御技術の有効性を薬理的および生理学的手法から検討した。我々はこれまでに光応答性 NO ドナーを複数作成してきた。本研究では、組織透過性を考慮し、作成したドナー中で最も長波長で NO を放出する NORD-1 を用いて研究を進めることとした。10-11 週齢、Wistar-ST ラットから膀胱頸部および尿道を摘出し、等尺性張力測定により膀胱頸部および尿道の弛緩反応を光応答性 NO ドナーと光照射により制御可能か検討を行った。摘出した頸部、尿道組織を Krebs 溶液で満たした organ bath 内に静置した。NO ドナーである NORD-1 を添加し、Carbachol で全収縮させたのち光照射を行った。その結果、膀胱頸部の張力は、光照射に反応して低下（弛緩）した。また光照射を止めることで、張力は速やかに戻った。光照射による弛緩反応は、NO の下流であるグアニル酸シクラーゼの阻害剤である ODQ を添加することで消失した。次に臨床応用を見据え、あらかじめ膀胱内に NORD-1 を注入した個体を作成した。11-13 週齢のラットに経尿道カテーテルを留置し NORD-1 を膀胱内へ注入、保持し、その後、膀胱頸部を摘出した。前述と同様の条件下で膀胱頸部における光照射の反応性を観察した。In vivo での評価は、膀胱内圧測定法を用いて行った。無処置の 10 週齢の Wistar-ST ラットの膀胱に留置したカテーテルから生理食塩水を一定流速で持続注入し、排尿を人工的に誘発した。途中で、カニューレから NORD-1 を注入、浸透させ、その後の光照射による影響を観察した。光照射に反応し、わずかに排尿間隔が延長した。しかし、正常なラットを用いて行ったため、変化が観察しづらく、評価が困難であった。今後、膀胱頸部、尿道が弛緩不全になるモデル、あるいは神経の過剰な発火を伴う膀胱炎モデルなどを用いて検討することで、顕著な効果が得られるかもしれない。病態モデルにおいて効果が得られれば、実用化の可能性も有しており、特許出願を行いたいと考えている。

本研究では、世界で初めて、光応答性 NO ドナーと光照射による膀胱頸部の弛緩制御が可能であることを見出した。膀胱頸部の機能不全時の下部尿路機能障害に対して、本研究で用いた光応答性 NO ドナーは有用な治療法につながることを期待される。

2. 実施内容および成果の説明 (A 4 で、5 ページ以内)

【背景】

一酸化窒素 (NO) は様々な組織の機能維持において重要な役割を担っている。NO は副交感神経終末や血管内皮細胞から産生され、平滑筋の弛緩に関与することが知られている。NO は細胞内受容体である可溶性グアニル酸シクラーゼ (soluble guanylate cyclase : sGC) に結合し、cGMP の産生を活性化することで平滑筋を弛緩させる。

下部尿路機能は蓄尿機能と排尿機能からなる。蓄尿時には膀胱排尿筋が弛緩、膀胱頸部および尿道の括約筋が収縮し、排尿時には排尿筋の収縮および括約筋の弛緩が生じる。下部尿路組織のうち、排尿平滑筋には sGC は存在しないが、内尿道括約筋をふくむ膀胱頸部には存在し、膀胱頸部の弛緩制御に NO が関与することが報告されている (Lies B. *et al. J Physiol.* 2013.)。また、膀胱や尿道の機能不全である下部尿路機能障害の病態時には NO 産生の低下がみられる。そのため、これまでに NO の補充療法が検討されてきたが、低血圧や頭痛といった全身性の副作用が避けられず安全な治療薬には至らなかった。そこで本研究は、光応答性 NO ドナー「NORD-1」を用いて膀胱頸部の局所的な弛緩制御が可能であるか検討することを目的とした。

I. 等尺性張力測定 (in vitro)

I-1. 無処置ラットからの摘出組織を用いた検討

【方法】

雌性、雄性それぞれ 10-11 週齢の Wistar-ST ラットを用いた。無処置のラットより膀胱を摘出し、4°C に冷やした Krebs 溶液 (mM: NaCl 119, KCl 4.6, CaCl₂ 1.5, MgCl₂ 1.2, NaHCO₃ 15, D-glucose 11 and NaHPO₄ 1.2) 中で膀胱頸部および尿道のリング標本を作製した。95% O₂-5% CO₂ で通気した 37°C の Krebs 溶液で満たした organ bath に固定し、薬物による張力変動を測定した。静止張力は 0.6 g とし、定常状態に達するまで 1 時間安定化させた。80 mM high potassium solution (mM: NaCl 36.7, KCl 80, CaCl₂ 2.2, MgCl₂ 1.2, NaHCO₃ 25, D-glucose 14 and KH₂PO₄ 1.2) を用いて収縮させ、wash 後 NO 合成酵素阻害剤である L-NG-Nitroarginine Methyl Ester (L-NAME) 10⁻⁵ M を添加した。続いて NORD-1 10⁻⁵ M を organ bath 内に添加したのち、膀胱頸部は 10⁻⁵ M carbachol (Cch) を、尿道は 3×10⁻⁵ M phenylephrine (Phe) を用いてそれぞれ前収縮させた。張力が定常状態に達してから標本に赤色光を照射した。照射強度は 10%、30%、50%、100%とした。各強度での照射が終了したのち、グアニル酸シクラーゼ阻害剤である 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) 10⁻⁵ M を添加した。ODQ が組織に浸透するのを待ち、再び赤色光を照射した。対照群として、NORD-1 の添加を行わない標本も用意し、同様の検討を行った。

【結果】

Organ bath に NORD-1 を添加した群では、膀胱頸部組織に赤色光を照射すると、照射開始と

同時に張力の低下が観察された。照射を止めると張力は速やかに元に戻った。この張力の低下は、光の照射強度に応じた強さで観察された。また、グアニル酸シクラーゼ阻害剤である ODQ を添加したのちに赤色光を照射すると、弛緩反応は見られなかった。対照群では、光の照射に伴う張力の変化は観察されなかった。これらの反応は、雌性ラット、雄性ラットともに同様の結果が得られた。

雌性ラットの尿道組織では、Phe による前収縮がほとんど観察されず、その後の張力変化の評価が不可能であった。一方、雄性ラットの尿道組織では、Phe による前収縮は観察されたものの、赤色光の照射に伴う弛緩はわずかであり、評価は困難であった。

【考察】

膀胱頸部標本に NORD-1 を添加し、赤色光を照射することで、光の強度に応じた弛緩反応を得られた。この弛緩反応は NORD-1 を添加していない群では観察されなかった。また、光照射に応答した膀胱頸部の弛緩反応はグアニル酸シクラーゼ阻害剤である ODQ の添加により消失した。これらのことから、NORD-1 と赤色光による膀胱頸部標本の弛緩制御は、NO の受容体であるグアニル酸シクラーゼを介した反応であることが示された。また、一連の反応は、雌性ラット、雄性ラットともに同様の結果が得られ、NORD-1 の反応性には性差が見られないことが示唆された。

一方、雌性ラットの尿道組織では、Phe による前収縮がほとんど観察されなかった。尿道組織の神経支配には性差があり、雄性ラットに比べて雌性ラットでは $\alpha 1$ 支配が極めて小さいことが報告されている (Alexandre EC. *et al. Am J Physiol Renal Physiol.* 2017.)。そのため、雄性ラット尿道を用いた評価を試みたが、雄性ラットにおいても安定した結果は得られなかった。下部尿路機能に関与する尿道の筋肉は外尿道括約筋と内尿道括約筋の 2 種類が挙げられる。内尿道括約筋は膀胱～尿道の移行部位の平滑筋であり、本実験においては膀胱頸部標本に含まれていると考えられる。一方、外尿道括約筋はより尿道口側に存在する横紋筋であり、グアニル酸シクラーゼを介した弛緩制御は受けない。我々が作製を試みた尿道標本は内尿道括約筋と外尿道括約筋が混在する移行部位であったため、正確な評価ができなかったと考えられる。したがって、本研究では内尿道括約筋を含む膀胱頸部のみを評価対象とした。

I-2. NORD-1 の膀胱内注入後の摘出組織を用いた検討

【方法】

雌性、11-13 週齢の Wistar-ST ラットを用いた。イソフルラン麻酔下において無処置のラットに経尿道カニューレを留置した。膀胱内の尿を抜いたのち、 10^{-4} M NORD-1 を膀胱内に注入し、20 分間静置した。静置後、ラットを放血死させたのちに膀胱を摘出し、膀胱頸部標本を作製した。その後、I-1.と同様の条件で評価を行った。

【結果】

I-1.の結果と同様、赤色光を照射すると、照射開始と同時に照射強度に応じた張力の低下が観察され、照射を止めると張力は速やかに元に戻った。また、この光に応答した弛緩反応はグアニル酸シクラーゼ阻害剤である ODQ の添加により消失した (Fig. 1)。

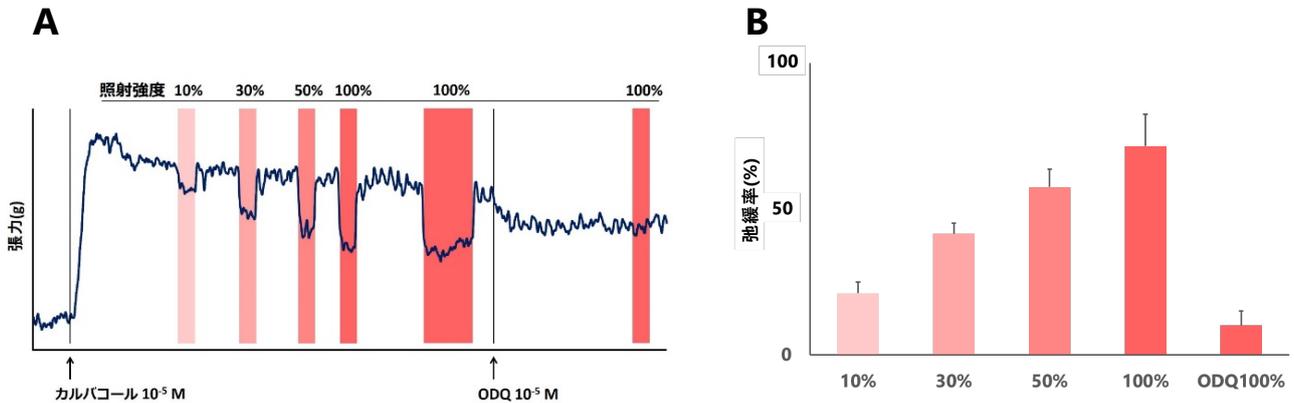


Fig. 1 等尺性張力測定結果

A. 代表的なチャート B. 解析結果

【考察】

臨床応用に近い条件での評価を行うため、あらかじめ膀胱内に NORD-1 を注入してから組織を摘出し、検討を試みた。その結果、I-1.と同様に、NORD-1 と赤色光を用いた膀胱頸部標本の弛緩制御に成功した。これより、NORD-1 を経尿道的に膀胱内に注入、静置することで、生体内において膀胱頸部組織への NORD-1 の十分な浸透が得られることが確認された。

II. 膀胱内圧測定 (in vivo)

【方法】

雌性、10 週齢の Wistar-ST ラットを用いた。イソフルラン麻酔下において、無処置のラットの膀胱にカニューレを留置し、圧トランスデューサーを介してシリンジポンプに接続した。ラットは固定器を用いて拘束した。麻酔の覚醒を待ち、シリンジポンプから一定速度で膀胱内に生理食塩水を持続注入し、膀胱内圧を連続的に測定した。赤色光を照射した状態と照射を止めた状態での排尿パターンをそれぞれ記録した。次に、膀胱内の尿を抜いたのち、膀胱に留置したカニューレから 10⁻⁴ M NORD-1 を膀胱内に注入して、20 分間静置した。その後、膀胱内への生理食塩水の注入を再開し、再び赤色光を照射した状態と照射を止めた状態における排尿パターンを記録した。

【結果】

NORD-1 を膀胱内に注入する前では、赤色光の照射前、照射中、照射後における排尿間隔に違いは見られなかった。一方、NORD-1 の注入後においては、僅かに排尿間隔が延長する様子が観察されたが、有意な差は見られなかった (Fig. 2)。

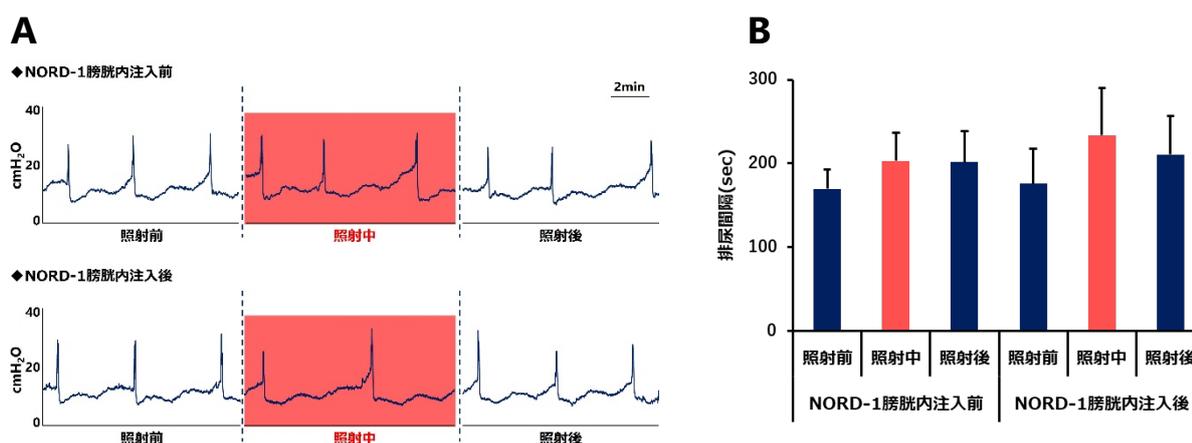


Fig. 2 膀胱内圧測定結果

A. 代表的なチャート B. 解析結果

【考察】

NORD-1 を添加する前では、赤色光照射前と照射後で排尿間隔に変化は観察されず、赤色光の照射がラットの排尿間隔に影響を及ぼさないことが確認された。次に、NORD-1 を添加して再度赤色光を照射すると、わずかに排尿間隔が延長する様子が観察された。In vitro と同様に NORD-1 が NO による膀胱頸部の弛緩を惹起していると仮定すると、蓄尿よりも排尿を誘導するため、排尿間隔は短縮することが予想され、本実験での結果と矛盾する。排尿平滑筋を含む膀胱体部には NO 受容体である sGC が存在しないことが報告されており、NORD-1 から放出された NO が直接排尿平滑筋を弛緩させ、蓄尿を誘導する反応は起こらないと考えられる。一方、膀胱において、NO がコリン作動性神経に作用し、アセチルコリンの放出量を減少させることで、弛緩制御や活動性の抑制に関与することも報告されている (Miyamoto Y. *et al. Eur J Pharmacol.* 2001.)。したがって、本実験においても、神経系への NO の作用が排尿間隔の延長を引き起こしている可能性が考えられる。

【総括】

等尺性張力測定により、in vitro において光応答性 NO ドナー「NORD-1」および赤色光照射を用いた膀胱頸部の弛緩制御が可能であることが示された。実験I-1.では、Organ bath への NORD-1 添加による弛緩制御に成功した。実験I-2.ではより臨床応用に近い条件での評価のため、あらかじめ膀胱内に経尿道的に NORD-1 を注入してから、組織を摘出した。この条件において

も赤色光の照射による弛緩制御に成功した。これらの反応は NO の受容体であるグアニル酸シクラーゼ阻害剤である ODQ の添加により消失したことから、NO による弛緩反応であることが示された。雄性ラットでは経尿道カニューレの挿入が困難であることから、生体内に NORD-1 を添加する実験は雌性ラットを用いて行ったが、organ bath 内に添加する実験では雌雄のラットで弛緩制御が可能であり、NORD-1 の反応性には性差がないことが示唆された。

一方、in vivo における検討では、雌性ラットにおいて、NORD-1 の添加と赤色光照射によりわずかに排尿間隔が延長する様子が観察された。この結果は、NORD-1 に赤色光を照射することで放出される NO が sGC を介した反応だけでなく、神経系への作用を介して下部尿路機能に影響を及ぼしている可能性を示唆している。しかし、今回の検討では正常なラットを用いたため、排尿間隔の変化が観察しづらかったと考えられる。今後の検討においては、脊髄損傷モデルのような尿道、膀胱頸部の弛緩不全を伴うモデル、あるいは膀胱炎モデルのような神経の過剰な発火を伴うモデルを用いることによって、顕著な効果が得られるかもしれない。

本研究により、光応答性 NO ドナーと光照射を用いた膀胱頸部の弛緩制御が可能であることを世界で初めて明らかにした。今後、さらに研究を続けることで、本研究で用いた光応答性 NO ドナーが下部尿路機能障害の有用な治療法につながることを期待される。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、多大なる研究助成を賜りました一般財団法人東海産業技術振興財団並びに関係各位に深謝致します。また、共同研究者の木村和哲教授、片岡智哉講師、家田直弥講師にも感謝致します。