

## 論文の内容の要旨

論文題目 後根神経節細胞におけるプロスタサイクリンレセプターの機能解析と過活動膀胱治療薬への可能性に関する研究

氏名 中榮 功一

膀胱機能の異常を伴う疾患の一つである過活動膀胱は切迫性尿失禁の有無に関わらず、通常頻尿および夜間頻尿を伴う尿意切迫感を有する症状として国際禁制学会において定義された疾患であり、Quality of Lifeを害するとして注目されている。現在までこの過活動膀胱に対する薬剤としてムスカリン性アセチルコリン受容体拮抗剤が開発されているが、副作用等もみられることから、新しい作用機序をもつ薬剤の開発が望まれている。近年、一次求心性線維のなかでも主に無髄 C 線維が過活動膀胱に関与している可能性が示唆されたことから、本研究では後根神経節 (DRG) 神経細胞において機能的な役割を担っている分子について検討することとした。

### 第一章: 後根神経節細胞におけるプロスタサイクリンレセプターの機能解析

まず DRG neuron 初代培養系において、多検体の試料評価に対応した cAMP の産生および細胞内カルシウム濃度の上昇を検出可能な系を構築し、様々な刺激によって誘導される変化について評価した。その結果、プロスタサイクリンレセプター (IP レセプター) アゴニストである iloprost が顕著に cAMP の産生を誘導することを見出したことから、以下では知覚神経における IP レセプターの機能的役割について解析した。

ラットに抗癌剤である cyclophosphamide (CYP) を投与すると膀胱容量の低下や頻尿が誘起されることが知られており、過活動膀胱病態モデルとして利用されている。そこで CYP 投与ラットにおける膀胱での PGI<sub>2</sub> 代謝物の産出、また後根神経節および膀胱に

における IP レセプターの発現と CYP 投与ラットにおけるその発現量の変化について検討した。その結果、CYP 投与ラットでは膀胱において PGI<sub>2</sub> 代謝物の産出増加が認められた。また、膀胱における IP レセプターの mRNA 発現量は非常に少なく、後根神経節に発現が顕著に認められ、その発現量は CYP を投与しても変化することはなかった。このことから CYP 投与時において PGI<sub>2</sub> は膀胱内で産出され、知覚神経の終末に作用していると考え、DRG neuron において更なる検討を行うこととした。IP レセプターは G 蛋白質共役受容体 (GPCR) ファミリーに属し、G<sub>αs</sub> サブユニットとカップリングしていることからリガンドが作用すると cAMP の産生が期待されるが、プロスタノイドアゴニストの中で IP レセプターアゴニストは最も cAMP 産生を誘導した。神経細胞内において cAMP の産生は神経組織の過敏化を誘導することが報告されている。そこで DRG neuron においても神経伝達物質の放出に影響を及ぼす可能性があると考え、プロスタグランジンと同様に炎症時に分泌されると考えられている lys-bradykinin とプロスタノイドアゴニストを併用し、興奮性神経伝達物質であるサブスタンス P の放出について検討を行った。その結果、各種アゴニストは濃度依存的にサブスタンス P の放出を引き起したが、中でも iloprost が最も効果的なアゴニストとして作用することが明らかとなった。更に capsaicin をリガンドとする transient receptor potential cation channel (TRPV1) は非特異的な陽イオンチャネルとして知られており、ATP は P2X、P2Y レセプター (非特異的陽イオンチャネル、GPCR) のリガンドとして、また高濃度 KCl は voltage gated Ca<sup>2+</sup> channel を介しサブスタンス P の放出を促すと報告されている。Iloprost 処理後、上記三種類の刺激に対するサブスタンス P の放出を検出した結果、iloprost はいずれの刺激に対してもサブスタンス P の放出を相乗的に増加させたことから、IP レセプターは様々な刺激によって誘導されるサブスタンス P の放出を亢進させることが明らかとなった。以上の結果から、様々なレセプターの中でも IP レセプターは DRG neuron において機能的役割を果たしており、知覚神経の感受性を亢進し、cAMP 産生を介して神経伝達物質放出亢進に関与することが示唆された。

## 第二章: IP レセプターアンタゴニストの解析

これまで多くのプロスタノイドレセプターに対するアゴニスト、アンタゴニストが開発され、既に臨床で用いられている薬剤もある。しかしながら IP レセプターのアンタゴニストについてはほとんど報告がなく、わずかに特許情報として存在しているのみであり詳細な解析がされていなかった。そこで特許情報に記載されていた IP レセプター抑制作用を持つとされる 2-[4-(1*H*-indol-4-ylloxymethyl)-benzyloxycarbonylamino]-3-phenyl-propionic acid (compound A) について詳細な解析を行うと共に、DRG neuron に対する影響について検討した。

まず compound A の様々なエイコサノイドによって誘導されるセカンドメッセンジャーの変動に及ぼす影響を検討した。Compound A はラット骨肉腫細胞 UMR-108 において iloprost によって誘導される cAMP の産生を濃度依存的に阻害した (IC<sub>50</sub>= 480 nM)。しかしながら他の 5 種類のエイコサノイドアゴニストによって誘導されるセカンドメッセンジャーの変動に compound A は 10 μM まで影響を及ぼさなかったことから、compound A は IP レセプターシグナリングを選択的に阻害することが明らかとなった。

またレセプターバイディングアッセイの系を構築し化合物を評価したところ、compound A はアンタゴニストとして作用することが明らかとなった。次に DRG neuron に及ぼす compound A の影響について検討を行った。Compound A は DRG neuron においても cAMP 産生を濃度依存的に阻害し、IP レセプターを介したサブスタンス P の放出亢進を抑制した。また protein kinase A (PKA) の阻害剤である H89 の影響についても併せて検討を行った結果、H89 はサブスタンス P の放出亢進を抑制することが明らかとなり、IP レセプターを介したサブスタンス P 放出亢進は PKA を介していることが明らかとなった。更に DRG neuron において IP レセプターが機能的な役割を果たしていることが明らかとなったことから、compound A を CYP 誘発過活動膀胱モデルラットにて評価した。その結果、compound A は膀胱内圧に影響に及ぼすことなく膀胱容量を有意に増加させた。このことから IP レセプターは過活動膀胱において重要な役割を果たしており、そのアンタゴニストは過活動膀胱治療薬となりうる可能性が示唆された。

### 第三章: G 蛋白質共役型受容体アゴニストによって誘導されるカルシウムシグナリング阻害物質の探索

GPCR アゴニストによって誘導される細胞内カルシウムイオン濃度上昇の阻害物質探索を様々な有用な物質を作り出すとされる微生物二次代謝産物より行った。

阻害活性が確認された微生物培養液より各種クロマトグラフィーを用い、活性物質の単離精製および各種スペクトルより構造解析を行った結果、活性物質は新規物質 14-O-(N-acetylglucosaminyl) teleocidin A (GlcNAc-TA) であった。Teleocidin 類は多様な活性が知られているが、その標的蛋白質は protein kinase C (PKC) であり、PKC activator として作用することから、PKC $\alpha$ -GFP および PKC $\theta$ -GFP を細胞に安定的に発現させ、GlcNAc-TA の与える影響について検討した。その結果、GlcNAc-TA は PKC $\alpha$ -GFP、PKC $\theta$ -GFP をそれぞれ細胞膜へと移行させ、PKC の activator として作用することが示唆された。PKC activator である phorbol ester を用いた実験により、PKC を活性化させると phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) の加水分解を抑制し、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を阻害すると報告されている。GlcNAc-TA も様々なアゴニストによって誘導される細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を 2-5  $\mu$ M で阻害することから、GlcNAc-TA が他の PKC activator と同様の作用を持つことが明らかとなった。

近年、PKC は TRPV1 をリン酸化すると報告された。また capsaicin は DRG neuron よりサブスタンス P の放出を誘導することから、DRG neuron を用いて GlcNAc-TA の capsaicin によって誘導されるサブスタンス P 放出に与える影響について検討した。その結果、GlcNAc-TA はサブスタンス P の放出を相乗的に増加させた。更に GlcNAc-TA 単独処理における影響を検討した結果、GlcNAc-TA はサブスタンス P の放出を濃度依存的に誘導したことから、PKC の活性化は capsaicin によって誘導されるサブスタンス P の放出を増加させるのみならず、直接サブスタンス P の放出を引き起こすことが明らかとなった。

### まとめ

過活動膀胱がその原因の一部として、知覚神経の異常亢進を伴うことによって生ずる疾患であることが明らかとなったことから、一次求心性線維である後根神経節細胞に焦点を当て、研究を行った。その結果、IP レセプターは DRG neuron において機能的に作用しており、知覚神経の感受性を亢進し、cAMP 産生を介して様々な刺激によって誘導される神経伝達物質放出を亢進することが明らかとなった。さらに compound A は IP レセプターのアンタゴニストとして作用し、過活動膀胱動物モデルにおいても有効であったことから、IP レセプターは知覚神経の亢進によって誘導される過活動膀胱の治療標的分子となる可能性が示唆された。