

〔別紙2〕

審査の結果の要旨

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。

1. 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 PGL₂ 代謝物の産出、また後根神経節および膀胱における 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 PGL₂ 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 PGL₂ 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_s 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^{2+} 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、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。

2. 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($IC_{50}=480$ 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 μ M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ン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は膀胱内圧に影響する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。

3. 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 α -GFP および PKC θ -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 α -GFP、PKC θ -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 (PIP₂) 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 μ 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。

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。本研究は、後根神経節を介する膀胱機能調節を明らかにし、過活動膀胱治療薬の開発に繋がるものであり、博士(薬学)の学位授与に値するものと判断された。