

氏名・(本籍)	奥山 枝里子 (秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1060 号
学位授与の日付	令和 4 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	<b>The nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway inhibits the bladder ATP release in response to a physiological or pathological stimulus</b>  (一酸化窒素-環状グアノシンーリン酸経路は生理的および病的な刺激に応じた膀胱からの ATP 分泌を抑制する)
論文審査委員	(主査) 渡邊 博之 教授 (副査) 山田 武千代 教授      板東 良雄 教授

## 学位論文内容要旨

The nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway inhibits the bladder ATP release in response to a physiological or pathological stimulus (一酸化窒素-環状グアノシンーリン酸経路は生理的および病的な刺激に応じた膀胱からの ATP 分泌を抑制する)

申請者氏名 奥山枝里子

### 研究目的

膀胱上皮は蓄尿による生理的な伸展などの機械的刺激や化学的刺激に応じて ATP を分泌し、求心性神経終末の  $P_2X_{2/3}$  受容体を介して内臓知覚を中枢神経系に伝達することで排尿反射を制御している。間質性膀胱炎や過活動膀胱では膀胱上皮からの ATP の分泌亢進やプリン受容体の発現上昇が報告されている。膀胱上皮からの ATP 分泌は生理的、病的な状況下での尿意の伝達に重要な役割を担っている。

一酸化窒素 (nitric oxide; NO) - 環状グアノシンーリン酸 (cyclic guanosine monophosphate; cGMP) 経路は消化管での末梢での知覚伝達に関わり、膀胱では平滑筋の弛緩や求心性神経の発火を抑制し蓄尿を維持しているとの報告があるが、膀胱上皮の ATP 分泌への詳細な作用機序は不明である。本研究では生理的な伸展刺激、また LPS による病的な刺激に応じた膀胱上皮からの ATP 分泌に NO-cGMP 経路の関与があるか検討することを目的とした。

### 研究方法

NO-cGMP 経路の生理的な伸展刺激に応じた粘膜側への ATP 分泌への影響を検討するため、摘出・展開した 6-10 週齢の雄マウスの膀胱をウッシングチャンバーに挟み、生理的な蓄尿時の圧 (5 cmH<sub>2</sub>O) を 40 分間漿膜側より与え、粘膜側の ATP 量をルシフェリン-ルシフェラーゼ法にて測定した。病的な状態での粘膜側への ATP 分泌に対する NO-cGMP 経路の作用の検討には、炎症反応により膀胱上皮からの ATP 分泌を亢進させ過活動を引き起こす大腸菌由来リポ多糖 (LPS) による刺激を用いた。上記と同様にウッシングチャンバーに挟んだマウス膀胱の粘膜側に 40 分間 LPS を曝露させ、粘膜側の ATP 量をルシフェリン-ルシフェラーゼ法にて測定した。いずれの解析でも NO-cGMP 経路を賦活または抑制する試薬は粘膜側のチャンバーに投与した。

統計学的解析は有意水準を 5%未満とする対応のない t 検定により実施した。

### 研究成績

生理的な伸展刺激に応じた粘膜側の ATP 分泌への作用を検討した。NO の前駆体である L-Arginine (2 mM) や NO のドナーである 1-hydroxy-2-oxo-3-(N-ethyl-2-aminoethyl)-3-ethyl-1-triazene (NOC 12; 10  $\mu$ M) を加えると刺激 20 分後の ATP 分泌が有意に抑制された (L-Arginine 群: 0.13 nM 対対照群: 0.23 nM、NOC 12 群: 0.04 nM 対対照群: 0.26 nM)。NO 合成酵素を阻害する NG-nitro-l-arginine methyl ester (L-NAME; 3, 10, 30  $\mu$ M) を加えると、30  $\mu$ M 群で 40 分後に ATP 分泌を有意に抑制した (30  $\mu$ M 群: 0.44 nM 対対照群: 0.23 nM)。cGMP の代謝する phosphodiesterase-5 の阻害薬である sildenafil (0.01, 0.1, 1, 10  $\mu$ M) を加えると、20 分後の ATP 分泌を 0.1  $\mu$ M 以上の濃度で有意差をもって、濃度依存的に抑制した (0.1  $\mu$ M 群: 0.10 nM、1  $\mu$ M 群: 0.06 nM、10  $\mu$ M 群: -0.09 nM 対対照群: 0.19 nM)。NO-cGMP 経路は特に蓄尿後期に ATP 分泌を抑制することが示された。

貯蔵作動性  $Ca^{2+}$ 流入を遮断する 1-(5-chloronaphthalene-1-sulfonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepine (ML-9; 100  $\mu$ M) を加えると伸展刺激 20 分後の ATP 分泌は有意に促進された (ML-9 群: 0.35 nM 対対照群: 0.19 nM) が、sildenafil (10  $\mu$ M) を同時に加えると ML-9 による ATP 分泌促進が有意に抑制された (ML-9+sildenafil 群: 0.14 nM)。貯蔵作動性  $Ca^{2+}$ 流入は adenylyl cyclase 6 型を抑制すると知られているが、ML-9 と adenylyl cyclase 阻害薬の SQ22536 (100  $\mu$ M) を同時に加えても ML-9 群と比べ有意な変化は認められなかった (ML-9+SQ22536 群: 0.28 nM)。

LPS (0.5 mg/ml) による病的な刺激時の粘膜側からの ATP 分泌を検討した。LPS 曝露により 40 分後に有意な ATP 分泌が認められた (LPS 群: 0.48 nM 対対照群: 0.09 nM) が、sildenafil (10  $\mu$ M) を加えると、LPS 刺激に応じた ATP 分泌は有意に減少した (LPS+sildenafil 群: 0.27 nM)。病的な刺激に応じた ATP 分泌においても cGMP 増加は抑制効果を示したが、生理的な伸展刺激時の sildenafil の ATP 分泌抑制効果と比較すると、その作用は限定的であった。

### 結論

NO-cGMP 経路は膀胱の生理的な伸展刺激に応じた粘膜側からの ATP 分泌を有意に抑制した。さらに LPS の刺激による病的な ATP 分泌も限定的ながら有意に減少させたことから、NO-cGMP 経路は膀胱の内臓感覚過敏に対する治療標的となりうると考えられた。

## 学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主査：渡邊 博之申請者：奥山 枝里子

論文題名：The nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway inhibits the bladder ATP release in response to a physiological or pathological stimulus

(一酸化窒素-環状グアノシン一リン酸経路は生理的および病的な刺激に応じた膀胱からのATP分泌を抑制する)

## 要旨

著者の研究は、論文内容要旨に示すように、膀胱からの知覚伝達機構のはじまりであり、過活動膀胱など知覚過敏症状の病態に関連している膀胱上皮細胞からのATP分泌に注目し、この分泌を抑える機構として一酸化窒素(NO)-環状グアノシン一リン酸(cGMP)経路の検討を行ったものである。摘出展開されたマウスの膀胱をウッシングチャンバーに挟み、生理的な伸展刺激および大腸菌由来リポ多糖(LPS)による病的な刺激時を加え、粘膜側からのATP分泌量を測定し、NO-cGMP経路が膀胱上皮からのATP分泌への抑制的に働くことをはじめて示した。

本研究の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下のとおりである。

## 1) 斬新さ

NO-cGMP経路が生理的な伸展刺激に応じた膀胱粘膜側からのATP分泌を、特に蓄尿後期で抑制すること、Phosphodiesterase 5 (PDE5) 阻害薬が生理的な伸展刺激および病的な刺激に応じた膀胱上皮からのATP分泌を有意に抑制することをはじめて明らかにした報告である。また著者らが過去に報告しているATP分泌の抑制シグナル経路である貯蔵作動性Ca<sup>2+</sup>流入阻害によるATP分泌の促進が、cGMP濃度の上昇で抑制されるが、adenylyl cyclaseの阻害では抑制されないことも初めて報告した。

## 2) 重要性

近年の高齢者社会とそれにあわせた健康寿命の維持が求められてきた中で、過活動膀胱という症状疾患名が注目され、その創薬と新規治療法の開発が望まれている。過活動膀胱では、膀胱が機械的・化学的刺激されることで知覚神経を刺激する物質が分泌され、畜尿神経機構が活性化していると考えられる。膀胱上皮からのATP分泌が生理的・病的な状況下で末梢の内蔵知覚伝達を担っていることがこれまでに明らかとなっている。著者らはNO-cGMP経路による伸展刺激およびLPS刺激に応じた膀胱粘膜側からのATP分泌の抑制をはじめて明らかにし、PDE5阻害薬が平滑筋の弛緩に加え、膀胱上皮からのATP分泌の抑制により求心性神経終末の活動を抑制することで、膀胱の知覚過敏症状を改善する可能性を示した。今後の過活動膀胱の新規治療薬開発を進めるうえで、本研究の結果は、临床上重要である。

## 3) 実験方法の正確性

本研究では、筆者らや他の研究者が行った過去の研究と同様の手順で行われた。評価に使用したすべての検体は同様の手順で摘出・展開され、すべての試薬は同様の手順で加えられている。全ての結果には統計学的検討が加えられており、実験方法は客観的で正確性がある。

## 4) 表現の明瞭さ

本研究の持つ意味、実験手順、ATP量の測定方法、得られた結果、考察は簡潔、明瞭に記載されており、問題はない。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定する。