

2. クロペラスチンによる GIRK チャネル活性化電流抑制作用メカニズムの検討

ラット急性単離縫線核ニューロンにおいて、クロペラスチンの 5-HT 誘発 GIRK チャネル活性化電流抑制作用は、細胞外液の pH に依存し、クロペラスチンの pKa に近い pH 9.0 において最も強い抑制を示した。抑制が一定に達するまでのクロペラスチン前処置時間は、pH 7.4 に比べ、pH 9.0 で短縮した。さらに、pH 7.4 に比べ、pH 9.0 ではクロペラスチンによる GIRK チャネル活性化電流抑制の Hill 係数が小さくなり、より低濃度でも抑制が観察された。

ホールセルパッチクランプ法により、電極内から細胞内にクロペラスチンを作用させると、GIRK チャネル活性化電流は経時的に抑制された。さらに、50 μM の PIP_2 を電極内より細胞内に拡散させると、クロペラスチンの GIRK チャネル活性化電流抑制作用は減弱した。

これまでに検討した中枢性鎮咳薬（クロペラスチンを含む）の分配係数と GIRK チャネル活性化電流に対する IC_{50} 値の相関性を調べると、相関係数 0.89 で良い負の相関性が得られた。

また、ラット急性単離縫線核ニューロンにおいて、5-HT_{1A} 受容体アゴニストの 8-OH-DPAT はコンダクタンス 22.7 pS の GIRK チャネルを活性化した。この時 8-OH-DPAT は、開時間成分の平均開時間と二つの開時間成分の割合、および単一チャネル電流振幅を変えることなく、開確率を増加させた。一方、競合的 5-HT_{1A} 受容体拮抗薬のスピペロンは、開時間成分および単一チャネル電流振幅に影響することなく、8-OH-DPAT により増加した開確率を減少させた。これに対し、クロペラスチンは 22.7 pS の GIRK チャネルの平均開時間を短縮した。また、細胞内側からクロペラスチンを作用させても、開確率が抑制された。

3. クロペラスチンの GIRK チャネル選択性の検討

背側縫線核において、クロペラスチンは膜電位依存性 Na^+ 電流、遅延整流性 K^+ 電流、A 型 K^+ 電流を抑制した。しかし、これらに対する抑制作用は GIRK チャネル活性化電流に対する抑制作用より弱いことが明らかとなった。

D. 考察

本研究により、bregma から尾側に 7040 ~

9160 μm の PAG とその周囲に 6 種類の排尿反射関連ニューロンが存在すること、これらのニューロンの分布、ならびに存在比がはじめて明らかになった。古典的橋排尿中枢であるバリントン氏核では大部分が Type I に相当するニューロンであり、逆に蓄尿中枢では大部分が Type II に相当するニューロンであると報告されている。よって PAG は、これらの排尿中枢とは全く異なる特徴を示し、PAG が排尿反射の調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。

また我々はこれまでに、圧微量注入法によりグリシンを PAG に投与すると排尿反射が促進されることを見出している。しかし、今回のマイクロイオントフォレシス法による検討では、グリシンが排尿反射関連ニューロンを興奮させることはなかった。また、グリシンが抑制作用を示すニューロンのタイプにも偏りはなかった。さらに、ストリキニーネは排尿反射関連ニューロンを強く興奮させた。よって、排尿反射関連ニューロンにおいて、グリシンが抑制性伝達物質として働いていることが示唆された。

本研究から、PAG における排尿反射関連ニューロンの存在とその特性、分布および薬物感受性の詳細がはじめて明らかとなり、排尿反射の中枢メカニズム解明や中枢性排尿障害治療薬開発の上で貴重な基礎知見を提供したと言える。

また、クロペラスチンは、細胞内側から GIRK チャネルに作用すること、 $G_{\beta\gamma}$ による GIRK チャネルの活性化には影響しないこと、ならびに PIP_2 と GIRK チャネルとの相互作用を阻害することで GIRK チャネルの開時間を短縮することが示唆された。

さらに、クロペラスチンは比較的選択的に GIRK チャネル活性化電流を抑制することが示唆された。今後さらに、GIRK チャネル ($\text{Kir } 3$) 以外の内向き整流性 K^+ チャネル、 Ca^{2+} チャネル、G 蛋白質共役型受容体や遺伝子転写制御系などに対する作用を検討する必要がある。

E. 結論

本研究より、PAG における排尿反射関連ニューロンの特性、存在比ならびに分布がはじめて明らかになった。また、クロペラスチンが細胞内側から PIP_2 と GIRK チャネルとの相互作用を阻害することで比較的選択的に GIRK チャネルを抑制することが示唆された。これらの知見は、中枢性排尿反射調節の解明ならびに中枢性排尿障害治療薬開発の上で有用な

知見を提供するものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Soeda F, Honda A, Shirasaki T, Yamamoto G and Takahama K, Expression of Fos-like protein in the micturition center caused by bladder irritation and effect of dextromethorphan on it. 日本排尿機能学会誌 17 巻 2 号 (印刷中)

Matsumoto K, Shirasaki T, Yamamoto G, Soeda F, Takahama K. Characterization of micturition-related single neuron activities and their distribution in periaqueductal gray matter (PAG) in anesthetized rats. Journal of Pharmacological Sciences 100(Suppl. I), 251P (2006).

Shiozuka M, Shirasaki T, Soeda F, Takahama K. Effects of cloperastine on the 8-OH-DPAT-induced single K^+ channel currents. Journal of Pharmacological Sciences 100(Suppl. I), 139P (2006).

Hashitani K, Shirasaki T, Soeda F, Takahama K. Comparison of the inhibitory effects of donepezil and cloperastine on the G-protein coupled inwardly rectifying K^+ (GIRK) channel-activated currents in rat dorsal raphe neurons. Journal of Pharmacological Sciences 100(Suppl. I), 137P (2006).

Honda S, Shirasaki T, Soeda F and Takahama K. Inhibition of Na^+ and K^+ currents by cloperastine in rat acutely dissociated dorsal raphe neurons, Pharmacol. Res. (in preparation)

2. 学会発表

Yamamoto G, Kuroki S, Soeda F, Shirasaki T, Takahama K. Ameliorating effects of cloperastine on urinary disturbances caused by cerebral infarction in conscious rats. 35th Annual meeting society for neuroscience.

松本健吾、白崎哲哉、山本 巖、副田二三夫、高濱和夫. 麻酔下におけるラット中脳水道中心灰白質(PAG)の排尿反射関連単一神経活動の特徴と分布. 第 79 回日本薬理学会年会

塩塚道隆、白崎哲哉、副田二三夫、高濱和夫. 5-HT_{1A}受容体アゴニスト 8-OH-DPAT 誘発シングル K^+ チャンネル電流に対するクロペラスチンの効果. 第 79 回日本薬理学会年会

橋谷華世、白崎哲哉、副田二三夫、高濱和夫. ドネペジル及びクロペラスチンの GIRK チャンネル活性化電流に対する作用の比較. 第 79 回日本薬理学会年会

山本 巖、黒木伸吾、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫. GIRK チャンネルは新規排尿障害治療薬の標的になりえるか? 日本薬学会 第 125 年会

本田宗吉、白崎哲哉、塩塚道隆、副田二三夫、高濱和夫. GIRK 電流抑制作用を有するクロペラスチンの膜電流に対する作用の解析. 日本薬学会 第 125 年会

山本 巖、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫. フリームービング動物の昼夜連続排尿測定システムの開発とその評価. 第 58 回日本薬理学会西南部会

松本健吾、白崎哲哉、山本 巖、副田二三夫、高濱和夫. ラット中脳水道中心灰白質(PAG)における排尿反射関連ニューロンの分布と特徴 第 12 回日本排尿機能学会

黒木伸吾、山本 巖、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫. 無麻酔脳梗塞モデルラットの排尿障害に対する各種抗うつ薬の作用 第 12 回日本排尿機能学会

山本 巖、黒木伸吾、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫. GIRK チャンネルと排尿障害治療薬生体機能と創薬シンポジウム 2005

3. その他

松本健吾. ラット中脳水道中心灰白質(PAG)における排尿反射関連ニューロンの分布と特徴. 熊本大学修士論文 (2006)

塩塚道隆. 脳単一 GIRK チャンネル活性化電流に対するクロペラスチンの作用に関する研究. 熊

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし。

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

老齢マウスおよびエストロゲン受容体欠損マウスの脳内における
GIRK チャネルおよび 5-HT_{1A} 受容体 mRNA レベルの解析

分担研究者 副田 二三夫 熊本大学 大学院医学薬学研究部 助手

研究要旨：昨年度の研究成果から、過活動膀胱モデルのひとつである脳梗塞モデルラットの中脳水道中心灰白質(PAG)において、GIRK2 mRNA のレベルが増加することが明らかとなり、脳内の GIRK チャネルの発現レベルの変動は、中枢性疾患に随伴する排尿機能の低下と密接に関連していることが考えられた。そこで本年度は、老齢マウスとエストロゲン受容体欠損マウスの 2 種類の排尿機能が低下したマウスを用いて、脳内の GIRK チャネルおよびそれに共役した 5-HT_{1A} 受容体の mRNA のレベルを RT-PCR 法を用いて分子生物学的に解析した。その結果、老齢マウスの海馬において GIRK1、2、3 の mRNA レベルは対照群に比べ有意に増加し、エストロゲン受容体欠損マウスの PAG においても GIRK1、2、3 および 5-HT_{1A} 受容体の mRNA のレベルは対照群に比べ増加する傾向を示した。以上のことから、脳内の GIRK チャネルおよびそれに共役した 5-HT_{1A} 受容体の増加は、排尿機能の低下と何らかの関連性を有する可能性がこれまでより強く示唆された。また、GIRK チャネルの生物学的意義を明らかにする一環として、マウス胎仔の脳内において GIRK チャネルが発現しているか否かを調べたところ、脳の発達段階である胎齢 11 日目に GIRK チャネルは発現していることをはじめて明らかにした。このことから、GIRK チャネルは排尿機能のみならず、生命機能を担う重要な分子である可能性が考えられた。

A. 研究目的

これまでに我々は、既存の鎮咳薬であるクロペラスチンが、脳梗塞モデルラットの過活動膀胱を著明に改善することを明らかにしている。このクロペラスチンは GIRK チャネルを比較的選択的に抑制することから、GIRK チャネルは排尿機能の低下に何らかの形で関与しているのではないかと考えた。昨年度は、我々が作製した脳梗塞ラットの脳内、とくに排尿反射関連核における GIRK チャネルの発現変動を調べ、GIRK チャネルのサブタイプのひとつである GIRK2 の mRNA レベルが増加すること、さらに GIRK チャネルと共役することが知られている 5-HT_{1A} 受容体の mRNA レベルも増加傾向を示すことを明らかにした。そこで本年度は、GIRK チャネルおよび 5-HT_{1A} 受容体と排尿機能の低下との関連性をさらに追究するため、無麻酔無拘束状態での排尿測定の結果、排尿機能の低下を認めた老齢マウスとエストロゲン受容体欠損マウスを用いて脳内の GIRK チャネルおよび 5-HT_{1A} 受容体の mRNA レベルを RT-PCR 法により測定した。さらに、GIRK チャネルの生物学的意義はほとんど不

明であることから、それを明らかにする一環として、GIRK チャネルは脳の発達のどの時期で発現しはじめるのかについても併せて検討を行った。

B. 研究方法

老齢マウスは ddY 系のマウスを日本 SLC (株)より購入し、熊本大学動物実験施設で飼育し、対照群には 5 週齢のもの、老齢群は 54 週齢のものを実験に用いた。また、エストロゲン受容体遺伝子改変マウスは、我々が同施設で系統維持しているものを実験に用いた。また、胎仔マウスは日本 SLC (株)より購入した妊娠マウスから帝王切開にて取り出した胎齢 8、11、15 日目の仔マウスを実験に用いた。

RT-PCR 法

マウスの脳を摘出し、実体顕微鏡下で中脳水道中心灰白質 (PAG) および海馬を切り出し、液体窒素に浸け、-80°C で保存した。RNA の抽出は AGPC 法により行い、GIRK1、2、3 および 5-HT_{1A} 受容体に特異的なプライマー、RNA PCR Kit (Takara) を用いて

RT-PCRを行った。なお、内部標準として β -actinの mRNA レベルを測定した。PCR 産物は、2%アガロースゲルで電気泳動し、そのバンドを電気泳動ゲル撮影システム (Kodac Digital Science EDAS 290 LE) にてデジタル撮影した。この画像を Scion Image で解析し、各バンドの面積を数値化した。ゲル間の補正のために、分子量およびマスマーカーである Smart Ladder の DNA 量とそのバンドの面積から各バンドの DNA 量を算出した。さらに各バンドの DNA 量をそのサンプルの β -actin DNA 量で補正した値を各サンプルの GIRK1、2、3 および 5-HT_{1A} 受容体の mRNA レベルとした。統計学的処理は、老齢マウスの場合には対照群 4 例、老齢群 5 例の 2 群間で、エストロゲン受容体遺伝子改変マウスの場合にはワイルドタイプマウス (対照群) 3~4 例、欠損マウス 4 例の 2 群間で t 検定をおこない、5%以下のとき有意差ありとした。

(倫理面への配慮)

熊本大学本荘・大江地区動物実験委員会の承認を得、「動物実験に関する日本薬理学会指針」および「熊本大学動物実験指針」に従って実施した。

C. 研究結果

1. 老齢マウスにおける脳内 GIRK チャンネルおよび 5-HT_{1A} 受容体 mRNA の発現レベルの検討

老齢マウスの海馬における GIRK1 の mRNA の発現レベルは対照群に比べ 1.23 倍 ($p=0.007$)、GIRK2 は 1.26 倍 ($p=0.007$)、GIRK3 は 1.40 倍 ($p=0.003$)、5-HT_{1A} 受容体は 1.33 倍 ($p=0.005$)といずれも有意に増加した。

2. エストロゲン受容体遺伝子改変マウスにおける脳内 GIRK チャンネルおよび 5-HT_{1A} 受容体 mRNA の発現レベルの検討

エストロゲン受容体欠損マウスの PAG における GIRK1 の mRNA の発現レベルは対照群に比べ 1.10 倍 ($p=0.124$)、GIRK2 は 1.17 倍 ($p=0.070$)、GIRK3 は 1.18 倍 ($p=0.169$)、5-HT_{1A} 受容体は 1.33 倍 ($p=0.076$)といずれも有意ではないが、増加する傾向を示した。

3. 胎仔マウスにおける脳内 GIRK チャンネル mRNA の発現時期の検討

胎齢 8、11、15 日目の仔マウス 3 匹を実験に用いた。胎齢 8 日目のマウスは頭部の構造上、脳のみを取り出すことが困難であるため、皮膚および頭蓋を取り除き、頭部を切り出した。また、胎齢 11 日目および 15 日目のマウスは全脳を切り出すことができた。RT-PCR の結果、検討したすべての日齢のマウスで GIRK1、2、3 の mRNA の発現を認めた。

D. 考察

本研究により、老齢マウス、エストロゲン受容体欠損マウスの脳内においても GIRK チャンネルの発現が増加していることがはじめて明らかとなった。高濱の分担研究報告で述べたように、老齢マウス、エストロゲン受容体欠損マウスを無麻酔無拘束状態で 24 時間の排尿記録を行ったところ、いずれのマウスも対照群に比べ、排尿機能の低下を認めた。よって、本研究で用いたマウスは、昨年度検討した脳梗塞モデルラットに加え、排尿機能が低下したモデル動物と考えることができる。これら 3 種の排尿機能が低下した動物において、脳内 GIRK チャンネルの発現レベルは共通して増加する傾向を示していることから、排尿機能の低下と GIRK チャンネルの発現増加との間には何らかの関連性を有する可能性がこれまでより強く示唆される。今後は、その可能性をさらに追究するため、排尿機能が低下し、さらに脳内の GIRK チャンネルの発現レベルが増加した動物にクロペラスチンを投与することにより、排尿機能の改善とともに GIRK チャンネルの発現レベルが変動するの否かを検討するなど、詳細な解析が必要と思われる。

上述したように、GIRK チャンネルの脳内発現を老齢マウス、エストロゲン受容体欠損マウスで検討した報告は本研究がはじめてであるが、5-HT_{1A} 受容体と老齢マウスおよびエストロゲン受容体との関連性を論じた報告はいくつかある。

マウスの加齢モデルである SAM (Senescence Accelerated Mouse) を用いた受容体結合実験によると、対照群に比べ SAM の系統のひとつであり、記憶障害を引き起こす SAMP10 は、海馬と中脳の 5-HT_{1A} 受容体が増加することが報告されており、今回の結果と一致した。しかし、老齢ラットの 5-HT_{1A} 受容体 mRNA レベルを、*in situ* hybridization 法で検討した既報によると、海馬では著しい変化を認めておらず、今回の結果とは一致していない。この結果の不

一致の原因は不明であるが、老齢動物の種差や検討した時期が異なること、実験方法の違いなどが原因として考えられる。また、今回の老齢マウスの実験は、海馬における検討のみであった。よって今後は、排尿反射関連核のひとつである PAG における発現レベルも測定し、海馬の発現レベルと比較検討していく必要があると思われる。

エストロゲン受容体と 5-HT_{1A} 受容体に関する知見としては、卵巣摘出したラットの縫線核や海馬歯状回において、5-HT_{1A} 受容体の発現が有意に増加するという、今回の成績を支持する報告がある。しかしこの既報では、大脳皮質の 5-HT_{1A} 受容体の発現レベルは変化しないことも報告している。本研究では、エストロゲン受容体遺伝子をすべて欠損したマウスを用いているため、卵巣摘出したラットと全く同じ結果が得られるか否かは不明であるが、エストロゲン受容体欠損マウスにおいても脳部位の違いにより、5-HT_{1A} 受容体の発現変動が異なる可能性も考えられる。これまでエストロゲン受容体欠損マウスを用いたそのような検討はほとんど報告されていないため、今後は脳各部位の発現レベルを測定するなどの基礎的研究も必要と思われる。

以上のことから、5-HT_{1A} 受容体も GIRK チャンネルと同様に排尿機能と何らかの関連性を有する可能性が、これまでよりも強く示唆された。

今回は、胎仔マウスにおける GIRK チャンネル mRNA の発現時期の検討も行ったが、*in situ* hybridization 法で検討した既報によると、マウスの脳における GIRK チャンネルの発現は、胎齢 15 日目から生後 20 日目までの期間で、その発現が報告されているのみであった。本研究では、頭部では胎齢 8 日目、脳内では胎齢 11 日目で GIRK チャンネルが発現することをはじめて明らかにしており、GIRK チャンネルというひとつの脳内物質の生物学的意義を考える上で有用な基礎知見になり得ると思われる。推測に過ぎないが、このチャンネルは、脳の発達過程における比較的早い時期で発現していることから、排尿機能のみならず、生命機能を担う重要な分子である可能性が考えられる。しかし、この GIRK チャンネルが胎仔の脳でどのような機能を担っているのかは全く不明である。GIRK チャンネルの生物学的意義をさらに解明するためにも、今後の GIRK チャンネルに関する基礎研究は必須と思われる。

E. 結論

老齢マウスおよびエストロゲン受容体欠損マウスの脳内において GIRK チャンネルおよび 5-HT_{1A} 受容体の mRNA レベルは増加傾向を示すこと、GIRK チャンネルは、脳の発達段階である胎仔期 11 日目の脳において既に発現していることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamamoto G, Kuroki S, Soeda F, Shirasaki T and Takahama K, Ameliorating effects of cloperastine on urinary disturbances caused by cerebral infarction in conscious rats. Society for Neuroscience 2005 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Program No.218.10 (2005)

Yamamoto G, Kuroki S, Soeda F, Shirasaki T and Takahama K, G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel and therapeutic drugs for urinary disturbance. Journal of the Pharmaceutical Society of Japan. 125(Suppl.2) 20-23 (2005)

Matsumoto K, Shirasaki T, Yamamoto G, Soeda F and Takahama K, Characterization of micturition-related single neuron activities and their distribution in periaqueductal gray matter (PAG) in anesthetized rats. Journal of Pharmacological Sciences. 100(Suppl.1) 251P (2006)

Shiozuka M, Shirasaki T, Soeda F and Takahama K, Effects of cloperastine on the 8-OH-DPAT-induced single K⁺ currents. Journal of Pharmacological Sciences. 100(Suppl.1) 138P (2006)

Hashitani K, Shirasaki T, Soeda F and Takahama K, Comparison of the inhibitory effects of donepezil and cloperastine on the G-protein coupled inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channel-activated currents in rat dorsal raphe neurons. Journal of Pharmacological Sciences.

100(Suppl.I) 137P (2006)

Honda S, Shirasaki T, Shiozuka M, Soeda F and Takahama K, (in preparation)

Yamamoto G, Kuroki S, Soeda F, Shirasaki T and Takahama K, (in preparation)

黒木伸吾, 山本 巖, 副田二三夫, 白崎哲哉, 高濱和夫, 無麻酔脳梗塞モデルラットの排尿障害に対する各種抗うつ薬の作用—クロペラスチンの作用との比較—. 日本排尿機能学会誌 16 巻 1 号 151 (2005).

松本健吾, 白崎哲哉, 副田二三夫, 山本 巖, 高濱和夫, ラット中脳水道中心灰白質 (PAG) における排尿反射関連ニューロンの分布と特徴. 日本排尿機能学会誌 16 巻 1 号 114 (2005).

Soeda F, Honda A, Shirasaki T, Yamamoto G and Takahama K, Expression of Fos-like protein in the micturition center caused by bladder irritation and effect of dextromethorphan on it. 日本排尿機能学会誌 17 巻 2 号 (印刷中)

2. 学会発表

Yamamoto G, Kuroki S, Soeda F, Shirasaki T and Takahama K, Ameliorating effects of cloperastine on urinary disturbances caused by cerebral infarction in conscious rats. Society for Neuroscience 2005

山本 巖, 黒木伸吾, 副田二三夫, 白崎哲哉, 高濱和夫, GIRK チャネルと排尿障害治療薬. 生体機能と創薬シンポジウム

松本健吾, 白崎哲哉, 山本 巖, 副田二三夫, 高濱和夫, 麻酔下におけるラット中脳水道中心灰白質 (PAG) の排尿反射関連単一神経活動の特徴と分布. 第 79 回日本薬理学会年会

塩塚道崇, 白崎哲哉, 副田二三夫, 高濱和夫, 5-HT_{1A} 受容体アゴニスト 8-OH-DPAT 誘発シングル K⁺チャネル電流に対するクロペラスチンの効果. 第 79 回日本薬理学会年会

橋谷華世, 白崎哲哉, 副田二三夫, 高濱和夫, ドネペジル及びクロペラスチンの GIRK チャネル活性化電流に対する作用の比較. 第 79 回日本薬理学会年会

山本 巖, 副田二三夫, 白崎哲哉, 高濱和夫,

フリームービング動物の昼夜連続排尿測定システムの開発とその評価. 第 58 回日本薬理学会西南部会

山本 巖, 黒木伸吾, 副田二三夫, 白崎哲哉, 高濱和夫, GIRK チャネルは新規排尿障害治療薬の標的になりえるか? 日本薬学会第 126 年会

本田宗吉, 白崎哲哉, 塩塚道崇, 副田二三夫, 高濱和夫, GIRK 電流抑制作用を有するクロペラスチンの膜電流に対する作用の解析. 日本薬学会第 126 年会

黒木伸吾, 山本 巖, 副田二三夫, 白崎哲哉, 高濱和夫, 無麻酔脳梗塞モデルラットの排尿障害に対する各種抗うつ薬の作用—クロペラスチンの作用との比較—. 第 12 回日本排尿機能学会

松本健吾, 白崎哲哉, 副田二三夫, 山本 巖, 高濱和夫, ラット中脳水道中心灰白質 (PAG) における排尿反射関連ニューロンの分布と特徴. 第 12 回日本排尿機能学会

3. その他

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

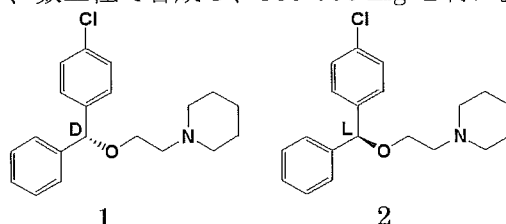
なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

光学活性 cloperastine の合成

分担研究者 大川原 正 熊本大学 大学院医学薬学研究部 助教授

研究要旨： 我々はこれまでに、既存の医薬品であるクロペラスチンが、脳梗塞モデルラットが呈する過活動膀胱を著明に改善することを見いだした。しかし、この化合物は不斉炭素をもつため、ラセミ体として存在している。そこで過活動膀胱治療薬の候補物質を作製する一環として、昨年度に引き続きクロペラスチンを L 体と D 体に分割することを試み、光学活性な L および D-cloperastine(1-2) を各々、数工程で合成し、500-700 mg を得た。



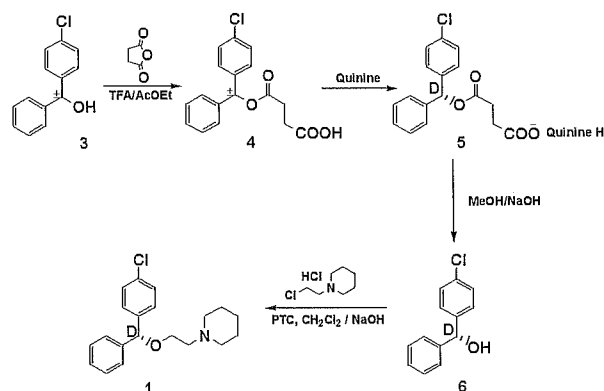
A. 研究目的

我々はこれまでに、クロペラスチンが、脳梗塞モデルラットの過活動膀胱を著明に改善することを見いだした。この化合物は既に臨床で用いられている非麻薬性の鎮咳薬であり、ヒトに対する安全性は確立されている。よってこの化合物は過活動膀胱の治療薬となり得る可能性は高い。しかしこのクロペラスチンは、ラセミ体であるため、D 体のクロペラスチンに比べ、過活動膀胱の改善作用は弱いことが予想される。

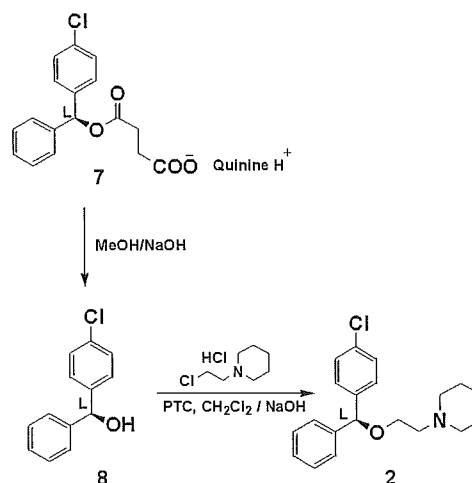
そこで本年度は昨年度に引き続き、過活動膀胱治療薬の候補物質を作製する一環として、ラセミ体として存在するクロペラスチンを L 体と D 体に分割することを試みた。

B. 研究方法

4-chlorobenzhydrol (3) を無水コハク酸で処理し、エステル酸 (4) とし、ついでそのアセトン溶液に等量のキニーネを加えて、放置すると、(4) のキニーネ塩 (5) が析出した。NaOH で処理、生成する D (+)-4-chlorobenzhydrol (6) を tetrabutyl ammonium bisulfate, 30% NaOH 存在下、N-chloroethyl-piperidine で処理し、(1) を得た。施光度は $[\alpha]_D = +439$ (c=0.56 l=5) を示した。



L-エナンチオマー (2) はエステル酸キニーネ塩 (7) のアセトン溶液から上記と同様に処理して得た。施光度は $[\alpha]_{20} = -430$ (c=0.8, l=5) を示した。



C. 研究結果

ラセミ 4-chlorobenzhydrol (3) をエステル酸 (4) とし、そのキニーネ塩の一方は析出し、他は溶解することより、(6) と (8) に分割し、L および D-cloperastine (1, 2) に導いた。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

なし

F. 知的所有権の出願・登録状況

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
G. Yamamoto, S. Kuroki, F. Soeda, T. Shirasaki, K. Takahama	Ameliorating effects of cloperastine on urinary disturbances caused by cerebral infarction in conscious rats	Society for Neuroscience 2005 Abstract Viewer/Itinerary Planner		Program No. 218.10	2005
F. Soeda, A. Honda, T. Shirasaki, G. Yamamoto, K. Takahama	Expression of Fos-like protein in the micturition center caused by bladder irritation and effect of dextromethorphan on it	日本排尿機能学会誌	17巻2号	印刷中	2006
G. Yamamoto, S. Kuroki, F. Soeda, T. Shirasaki, K. Takahama	G-protein-gated inwardly rectifying K ⁺ channel and therapeutic drugs for urinary disturbance	Journal of the Pharmaceutical Society of Japan	125(Suppl. 2)	20-23	2005
K. Matsumoto, T. Shirasaki, G. Yamamoto, F. Soeda, K. Takahama	Characterization of micturition-related single neuron activities and their distribution in periaqueductal gray matter (PAG) in anesthetized rats	Journal of Pharmacological Sciences	100(Suppl. I)	251P	2006
M. Shiozuka, T. Shirasaki, F. Soeda, K. Takahama	Effects of cloperastine on the 8-OH-DPAT-induced single K ⁺ currents	Journal of Pharmacological Sciences	100(Suppl. I)	138P	2006
K. Hashitani, T. Shirasaki, F. Soeda, K. Takahama	Comparison of the inhibitory effects of donepezil and cloperastine on the G-protein coupled inwardly rectifying K ⁺ (GIRK) channel-activated currents in rat dorsal raphe neurons	Journal of Pharmacological Sciences	100(Suppl. I)	137P	2006
山本 巖、 副田二三夫、 白崎哲哉、 高濱和夫	フリームービング動物の昼夜連続排尿測定システムの開発とその評価	第58回日本薬理学会西南部会プログラム/抄録集		35	2005
山本 巖、 黒木伸吾、 副田二三夫、 白崎哲哉、 高濱和夫	GIRK チャネルは新規排尿障害治療薬の標的になりえるか？	日本薬学会第126年会要旨集1		255	2006
本田宗吉、 白崎哲哉、 塩塚道崇、 副田二三夫、 高濱和夫	GIRK 電流抑制作用を有するクロペラスチンの膜電流に対する作用の解析	日本薬学会第126年会要旨集3		116	2006

黒木伸吾、 山本 巖、 副田二三夫、 白崎哲哉、 高濱和夫	無麻酔脳梗塞モデルラットの排尿障害に対する各種抗うつ薬の作用—クロペラスチンの作用との比較—	日本排尿機能学会誌	16 巻 1 号	151	2005
松本健吾、 白崎哲哉、 副田二三夫、 山本 巖、 高濱和夫	ラット中脳水道中心灰白質(PAG)における排尿反射関連ニューロンの分布と特徴	日本排尿機能学会誌	16 巻 1 号	114	2005
松本健吾	ラット中脳水道中心灰白質 (PAG) における排尿反射関連ニューロンの分布と特徴	熊本大学 修士論文			2006
塩塚道崇	脳単一 GIRK チャネル活性化電流に対するクロペラスチンの作用に関する研究	熊本大学 修士論文			2006
S. Honda, T. Shirasaki, F. Soeda, K. Takahama	Inhibition of Na ⁺ and K ⁺ currents by cloperastine in rat acutely dissociated dorsal raphe neurons	Pharmacol. Res.			in preparation

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Program Number: 218.10

Day / time: Sunday, Nov. 13, 9:00 AM – 10:00 AM

Presentation Type: Poster

Presentation Location: Washington Convention Center – Hall A–C, Board # UU16

AMELIORATING EFFECTS OF CLOPERASTINE ON URINARY DISTURBANCES CAUSED BY CEREBRAL INFARCTION IN CONSCIOUS RATS

G. Yamamoto*; S. Kuroki; F. Soeda; T. Shirasaki; K. Takahama

Environmental & Molecular Hlth Sci, Graduate School of Pharmaceutical Sci, Kumamoto, Japan

Stroke frequently results in incontinence by reducing suprapontine micturition control. Intraluminal occlusion of the middle cerebral artery (MCA), which produces overactive bladder and dysuria, has been introduced as a useful model of stroke-induced urinary disturbances. We have previously reported that dextromethorphan (DM) and cloperastine (CP), centrally acting antitussives, reduced the frequency of micturition reflex and increased the threshold pressure of the reflex in anesthetized rats. Antidepressants have been employed for the treatment of enuresis or nocturia in clinics.

In this study, we comparatively investigated effects of DM, CP and two types of antidepressants on urinary disturbances caused by cerebral infarction (CI) in conscious rats. As antidepressants, amitriptyline (AMI), a reuptake inhibitor of noradrenaline and serotonin, and maprotiline (MP), a selective noradrenaline reuptake inhibitor, were used.

[Method] First of all, single cystometrogram was performed in conscious male S.D. rats (250–280g) restrained using the Ballman cage. Then, CI was induced by occlusion of the left MCA using a monofilament nylon thread. At 24hr after CI, effect of each drug on urinary disturbances was estimated for seven parameters: bladder capacity (BC), maximum pressure (P_{max}), threshold pressure (P_{th}), micturition latency (T_L), flow rate (R_f), urethral resistance (R_u) and bladder compliance (C_b).

[Result] CI significantly reduced BC, P_{th} , T_L , R_f and C_b , and increased R_u . After CI, intravenous dosing of saline and MP (10mg/kg, i.v.) had little effect on these parameters. But, DM (10 or 20mg/kg, i.v.), CP (5mg/kg, i.v.) and AMI (10mg/kg, i.v.) significantly increased BC and T_L . Interestingly, CP, unlike DM and AMI, blocked a decrease in R_f and an increase in R_u caused by CI. Only AMI decreased P_{max} and had residual urine after micturition reflex. These results suggest that CP might become a seed of new drugs for treatment of urgency associated with OAB and dysuria.

Citation:

G. Yamamoto, S. Kuroki, F. Soeda, T. Shirasaki, K. Takahama. AMELIORATING EFFECTS OF CLOPERASTINE ON URINARY DISTURBANCES CAUSED BY CEREBRAL INFARCTION IN CONSCIOUS RATS

Program No. 218.10. 2005 Abstract Viewer/Itinerary Planner.
Washington, DC: Society for Neuroscience, 2005. Online.

膀胱侵害刺激による Fos タンパクの脳内排尿反射関連核における
発現とそれに対するデキストロメトルファン の作用

副田二三夫、本田 淳、白崎哲哉、山本 巖、高濱和夫

熊本大学大学院 医学薬学研究部 環境分子保健学分野

連絡先： 〒862-0973 熊本市大江本町 5-1
熊本大学大学院 医学薬学研究部 環境分子保健学分野
高 濱 和 夫
TEL/FAX 096-371-4334
takahama@gpo.kumamoto-u.ac.jp

Expression of Fos-like protein in the micturition center caused by bladder irritation and effect of dextromethorphan on it

Fumio Soeda, Atsushi Honda, Tetsuya Shirasaki, Gen Yamamoto,
Kazuo Takahama

Department of Environmental and Molecular Health Sciences,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kumamoto Univ., Kumamoto 862-0973, Japan

キーワード

日本語：Fos タンパク, 膀胱侵害刺激, デキストロメトルファン

英語：Fos-like protein, bladder irritation, dextromethorphan

要 約

神経活動マーカーである Fos タンパクの脳内発現を指標として、排尿機能やこれに対する薬物の作用が評価できるか否かについて検討した。SD 系ラットをウレタン麻酔下に用いた。膀胱内に 0.1%酢酸溶液を持続注入することにより律動性の膀胱収縮を惹起させると、排尿反射に関与するといわれる橋のバリントン核と青斑核に Fos タンパクの強い発現が認められた。この発現は排尿反射抑制作用をもつデキストロメトルファン (DM) の静脈内投与により有意に抑制された。これらの成績から、0.1%酢酸溶液の膀胱内持続注入による Fos タンパクの脳内発現は、排尿機能やそれに対する薬物の作用を評価するための一つの指標になり得ることが示唆される。

In this study, we investigated whether or not expression in the brain of Fos-like protein caused by bladder irritation is useful to estimate micturition function. Male rats (SD strain, 250~300g) were used under anesthesia with urethane (1.2g/kg, i.p.), following bladder irritation by injection of 0.1% acetic acid solution into the bladder, Fos-like protein positive cells were found in the barrington's nucleus and locus coeruleus. The number of Fos-like protein positive cells in the both nucleus was significantly decreased by dextromethorphan that has an inhibitory effect on micturition reflex in rats.

These results suggest that the expression of Fos-like protein caused by the bladder irritation may be useful to study central mechanisms of micturition reflex and to evaluate effect of drugs affecting the reflex.

緒 言

排尿反射に関する研究は、古典的な Barrington（排尿反射の発見）の研究^{1),2)}以来、橋の背外側被蓋に排尿中枢が存在すること、青斑核や中脳水道中心灰白質などもその機能を持つこと^{3),4)}、橋の背外側被蓋から脊髄のオヌフ核への投射が存在すること⁵⁾などが明らかにされている。しかし、排尿反射に関する中枢内神経伝達機構については、なお、多くの検討課題が残されている。このような中で、1997年に Gestreau らは咳反射に関与する脳幹の神経核を同定するために、上喉頭神経を電気刺激して咳を誘発させたネコの脳幹において、神経活動マーカーである Fos タンパクの発現を検討したところ、孤束核や後疑核など呼吸に関連した延髄の特異的な部位に Fos タンパクの発現が認められることを報告した。さらにその発現は麻薬性鎮咳薬コデインにより抑制されたと報告している⁶⁾。この Gestreau らの咳反射弓に関する研究手法は、同じく脳幹に反射中枢をもつ排尿反射の中枢内神経伝達の解明にも応用できるのではないかと考えた。

ところで、我々はこれまでに中枢性の非麻薬性鎮咳薬、デキストロメトルファン (DM) が麻酔下ラットにおいて、排尿流速、尿道抵抗、排尿閾値、収縮時間および排尿潜時といった排尿反射のパラメーターに影響を与え、排尿反射に対して抑制的に作用するということを報告した¹⁾。

そこで、本研究において、排尿反射の中枢内神経伝達を解明する糸口を得るために、今回は排尿反射を抑制する DM を用い、まず膀胱内侵害刺激により排尿反射関連核であるバリントン核や青斑核に Fos タンパクが発現するのか否かについて検討し、この発現に対する DM の作用を調べた。

方 法

I. 試薬

Fos タンパクの 1 次抗体は Santa Cruz 社、臭化水素酸デキストロメトルファン (DM) は SIGMA 社より購入した。その他の試薬はすべて市販の特級規格品を用いた。

II. 実験動物

九動 (株) より購入した 250~300g の SD 系雄性ラットを、熊本大学薬学部実験動物施設にて 1 週間ハンドリングをおこない実験に用いた。

III. 膀胱内圧の測定および薬物の投与

ラットをウレタン麻酔 (1.2 g/kg, i.p.) 後、膀胱頂部から膀胱内部に刺入したカテーテル (PE50 のポリエチレンチューブの先端に 23G の注射針を付けたもの) を圧トランスデューサーに接続した。酢酸の 0.1% 生理食塩液 (0.1% 酢酸溶液) をシリンジポンプ (Razel Scientific Instruments, INC.) により、0.106 ml/min の注入速度で膀胱内に 2 時間持続注入した。DM は酢酸溶液の注入前 15 分に 10 mg/kg を静脈内投与した。コントロール群には同じ用量の生理食塩液を DM と同じスケジュールで投与した。

IV. 免疫組織染色法による Fos タンパクの発現

0.1% 酢酸溶液の膀胱内注入終了後、4% パラホルムアルデヒドによる灌流固定をおこない脳を摘出をおこなった。標本はクリオスタット (CM3050, LEICA) を用いて、厚さ 40 μ m の冠状凍結切片を作製した。免疫組織染色は、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体法 (ABC 法) によりおこない、Fos タンパクの発現を調べた。

V. データ解析

Fos タンパクが発現している細胞 (Fos タンパク陽性細胞) は正立型顕微鏡にて観察した。画像の取得には顕微鏡デジタル画像解析システム (DP70, OLYMPUS) を用いておこなった。また、Fos タンパク陽性細胞の計測には二次元画像解析ソフト WinROOF (ver5.01 三谷商事) を用いて、橋レベルである Bregma-10040 μ m の部位とその前後、計 3 枚の脳切片から Fos タンパク陽性細胞数を計測し、データは平均値 \pm 標準誤差で表わした。なお、統計処理は unpaired t-test にておこない、 $p < 0.05$ のとき有意とみなした。

本研究は熊本大学大学院医学薬学研究部の動物実験倫理委員会により承認され、日本薬理学会の「実験動物のケアと使用に関するガイドライン」に基づいて実施された。

結 果

橋排尿中枢における0.1%酢酸溶液の膀胱内注入によるFosタンパクの発現およびDMの影響

図1に示すように、Fosタンパク陽性細胞は排尿反射に関与するといわれる青斑核とバリントン核で観察された。その数は青斑核で 101.3 ± 4.6 個、バリントン核で 60.8 ± 11.5 個であった。中枢性鎮咳薬DMの静脈内投与により、Fosタンパク陽性細胞の数は青斑核では 52.8 ± 6.7 個、バリントン核では 26 ± 6.4 個となり、いずれの神経核においても有意に減少した。

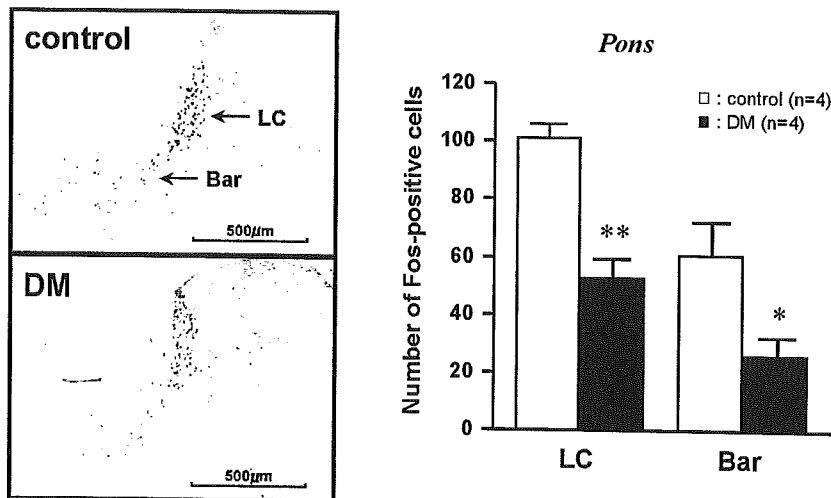


図1. 橋における膀胱内酢酸溶液注入によるFosタンパクの発現に対するDMの影響
橋 (Bregma -10040µm) におけるFosタンパクの発現は、DM (10mg/kg) の静脈内投与により青斑核およびバリントン核において有意に減少した。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$. LC: 青斑核, Bar: バリントン核

考 察

我々は排尿反射の中枢内神経伝達を解明するにあたり、まず排尿反射に関わる諸核を同定し、諸核の神経連絡とその機能的関連を明らかにする必要があると考えた。過去にいくつかの神経連絡に関する知見はあるが、その機能的な関連性までを明らかにしたものは少ない。排尿反射に関わる Fos タンパクの発現実験のほとんどは、脊髄レベルでおこなわれており、脊髄 L6 レベルの脊髄後角、背側交連、仙髄副交感神経核において Fos タンパクの発現が認められている¹²⁾。今回結果には示していないが、我々の予備実験でも脊髄レベルでは同じ結果が得られた。

本研究においては、橋レベルにおける Fos タンパクの発現は青斑核およびバリントン核で見られ、さらに排尿反射に対して抑制的に作用する DM の静脈内投与により、これら二つの神経核における Fos タンパクの発現は有意に抑制された。青斑核およびバリントン核は排尿反射に関与する脳部位であることから、今回観察された Fos タンパク陽性細胞は排尿に関連している可能性が高いと思われる。

また、これらの発現が排尿反射を抑制する用量の DM の静脈内投与により抑制されたことから、膀胱侵害刺激による Fos タンパクの脳内発現を指標として排尿機能やそれに対する薬物の作用を評価することは有用であることが示唆された。

本研究では、膀胱の侵害刺激により青斑核とバリントン核で Fos タンパクが発現することを見出したが、Rizvi らは、排尿反射に関与するといわれる内側視索前野の電気刺激や化学刺激により、青斑核やバリントン核で Fos タンパクが発現することを既に報告している¹³⁾。既報も雄性の SD ラット (250-350g) を用いているが、いずれの刺激においても、Fos 陽性細胞数はバリントン核に比べ青斑核で 3 倍多いという結果であった。本研究では、バリントン核に比べ青斑核で 1.7 倍多いという結果であり、既報よりもバリントン核の発現レベルが高いことがわかる。この違いについての原因は不明であるが、既報は特定の排尿反射関連核の刺激であり排尿反射を測定していないのに対し、本研究は酢酸溶液の膀胱内注入によりラットの膀胱を収縮、弛緩させ排尿反射を引き起こしている。この違いがバリントン核の発現レベルに影響を与えている可能性も考えられる。

また、本研究で見いだされた DM の効果が末梢なのか中枢なのかは、現在のところ不明である。しかし、DM は中枢性鎮咳薬であること、さらに今回用いた DM の濃度は鎮咳効果を発現する濃度であることから、DM が中枢に作用していることは十分考えられる。今後は、DM を脳内に投与し、Fos タンパク発現に対する効果を検証する必要があると思われる。

ところで、橋レベルでは青斑核、バリントン核以外に排尿機能に関連する中枢部位として蓄尿中枢が知られている。しかし、今回の検討では橋レベルにおいて上記の二つの核以外における Fos タンパクの発現は認められなかった。このことは、我々が確認した Fos タンパク陽性細胞は排尿相と蓄尿相からなる排尿機能のうち排尿相に関連したニューロンである可能性を示唆する。しかし、詳細についてはさらなる検討が必要である。