

博士論文

下部尿路機能における EP2 受容体の役割に関する研究

栗原 良子

略語表

本論文中では以下に示す略語を用いた。

BSA	bovine serum albumin
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cGMP	cyclic guanosine monophosphate
CHO-K1	chinese hamster ovary-K1
DMSO	dimethyl sulfoxide
FBS	fetal bovine serum
I.A.	intrinsic activity
IBMX	3-isobutyl-1-methyl-xanthine
i.p.	intraperitoneal administration
i.v.	intravenous administration
PBS	phosphate-buffered saline
PGE ₂	prostaglandin E ₂
s.c.	subcutaneous administration

目次

第 1 章 序論	4
第 2 章 CP-533,536 の薬理学的特性	8
第 3 章 尿道における EP2 受容体の役割	12
第 4 章 膀胱機能に対する EP2 受容体刺激の影響	23
第 5 章 排尿に対する EP2 受容体刺激薬の作用	29
第 6 章 総括	41
引用文献	45
謝辞	49

第1章 序論

膀胱および尿道とそれらを支配する神経から構成される下部尿路は、蓄尿と排尿の2つの相反する機能を司る [1]。蓄尿時に膀胱は弛緩し、尿道は収縮して禁制を維持し、排尿時に膀胱は収縮し、尿道は弛緩することで効率的な尿排出に寄与する [1] (図1)。尿道は、交感神経から放出されるノルアドレナリンによる α_1 受容体刺激を介して収縮する [1, 2]。前立腺肥大症を呈する患者において排尿障害を含む下部尿路症状が認められる [3, 4]。排尿障害は、前立腺の肥大に基づく尿道狭窄 (機械的閉塞) に加え、前立腺および膀胱頸部における平滑筋の過収縮に基づく尿道狭窄 (機能的閉塞) に起因すると考えられている [3, 4]。つまり、排尿時において、尿道弛緩が不十分なことにより排尿困難が惹起されると考えられる。一方、ノルアドレナリンによる尿道収縮反応に対して抑制作用を示す α_1 受容体拮抗薬は、前立腺肥大症に伴う排尿障害の治療薬として世界中で使用されている [5]。加えて、尿道弛緩作用を示すホスホジエステラーゼ5阻害薬 [6] は、前立腺肥大症患者において国際前立腺症状スコアを改善させることが報告されている [7, 8]。以上より、尿道弛緩作用を有する化合物は、尿道狭窄に起因する排尿障害を改善させる可能性が示唆される。 α_1 受容体拮抗薬は、興奮性神経伝達物質であるノルアドレナリンによる α_1 受容体刺激を介した尿道収縮を抑制することで尿道弛緩に寄与する。また、ホスホジエステラーゼ5阻害薬は、尿道弛緩作用を示す細胞内環状グアノシンーリン酸 (cGMP) の分解を阻害することで、尿道弛緩を増強する。これらの2つの尿道弛緩機構とは異なり、直接的に尿道弛緩を惹起させる新規な機序に基づく排尿障害治療薬は、新たな治療手段として期待される。

PGE₂ は、ハムスター [9]、ウサギ [10]、イヌ [11]、ヒト [12] といった様々な動物種の尿道組織を弛緩させる。PGE₂ による尿道組織の弛緩反応に環状アデノシンーリン酸 (cAMP) 依存的な経路が関与することが示唆されている [10]。PGE₂ に応答する受容体として EP1, EP2, EP3 および EP4 受容体が知られており、一般的に、EP1 および EP3 受容体は細胞内カルシウム濃度上昇に基づく平滑筋収縮反応に関与し、EP2 および EP4 受容体は

cAMP 量上昇に基づく平滑筋弛緩反応に関与する [13]。これらの知見から、尿道組織における PGE₂ 誘発弛緩反応には、EP2 および（もしくは）EP4 受容体に関与することが示唆される。

近年、ラットの前立腺組織において、電気刺激誘発収縮に対する PGE₂ の抑制反応に EP2 受容体に関与することが報告された [14]。このことから、尿道組織の弛緩反応に EP2 受容体に関与している可能性が考えられる。しかしながら、薬理的検証に用いることができる、EP2 受容体に対して十分な選択性を示す化合物に関する報告はこれまでになく、尿道における EP2 受容体の役割について薬理的に十分に解明されていない。

最近になって、CP-533,536 は EP2 受容体に対して選択的な刺激作用を有することが報告された (図 2) [15]。そこで、本研究では、主に尿道に焦点をあて、下部尿路機能における EP2 受容体の役割を解明することを目的とし、CP-533,536 を用いた薬理的検討を行った。

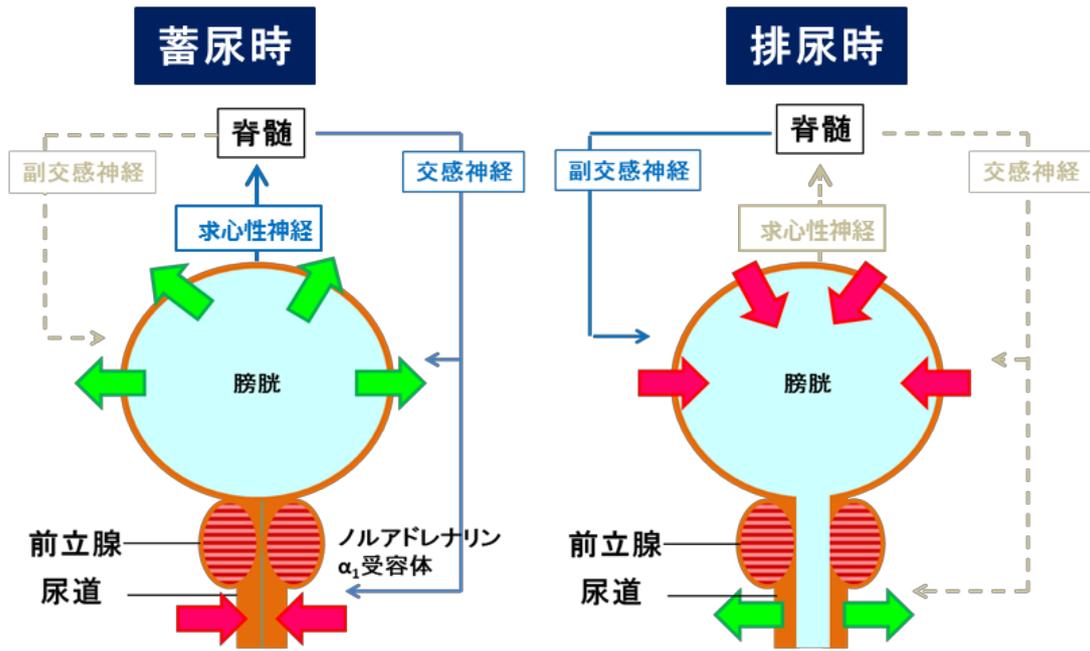


図1 蓄尿時および排尿時における下部尿路制御機構

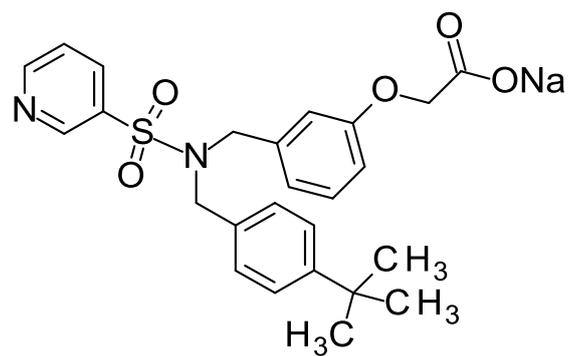


図2 CP-533,536の構造式

第2章 CP-533,536 の薬理学的特性

第1節 諸言

近年, CP-533,536 は EP2 受容体に対して選択的な刺激作用を示すことが報告された[15]。その報告によると, CP-533,536 は, EP1, EP3 および EP4 に比して EP2 受容体に対して高い親和性を示すとともに, EP2 受容体に対して刺激作用を示す。下部尿路機能における EP2 受容体の役割を薬理学的に解明することが本研究の目的であることから, ラット EP2 受容体およびラット EP4 受容体に対する CP-533,536 の刺激作用を検討した。

第2節 方法

2.1. 使用化合物および試薬

CP-533,536 ((3-{{(4-tert-butylbenzyl)-(pyridine-3-sulfonyl)-amino}-methyl}-phenoxy)-acetic acid) を, アステラス製薬株式会社 (東京) で用意した。PGE₂ をナカライテスク (京都, 日本) より購入した。

α-MEM をインビトロジェン (Carlsbad, CA, USA) より, BSA をシグマアルドリッチ (St. Louis, MO, USA) より, そして, インドメタシンおよび IBMX を和光純薬工業 (大阪, 日本) より購入した。

cAMP アッセイキットを, Cisbio Bioassays (Codolet, France) より購入した。

2.2 細胞内 cAMP 量測定

アステラス製薬株式会社研究所にて構築した, ラット EP2 あるいはラット EP4 受容体を安定的に発現するチャイニーズハムスター卵母細胞 (CHO-K1) を 96 穴プレートに 5000 細

胞ずつ播種し、10%のFBSを添加した α -MEMにて、37°Cおよび5%CO₂存在下で培養した。細胞播種約4日後に、2 μ Mのインドメタシンおよび0.1%のBSAを含む血清非添加 α -MEMに置換し、室温にて1時間培養した。その後、2 μ Mのインドメタシン、0.1%のBSAおよび1mMのIBMXを含む血清非添加 α -MEMへ培養液を置換し、PGE₂もしくはCP-533,536を添加した。

室温にて30分培養後、培養上清を除き、0.2% TritonX-100を含むPBSを添加して細胞を溶解した。細胞溶解物中のcAMP量を、アッセイキットを用いて測定した。

2.3. 細胞内cAMP量上昇作用活性の算出

ラットEP2受容体、ラットEP4受容体発現CHO-K1細胞におけるcAMP量は、PGE₂により惹起される最大反応を100%として算出した。PGE₂により惹起される最大反応を1.0としてCP-533,536のcAMP量上昇作用の内因活性(I.A.)を算出した。I.A.の値が0.5を超えた場合、EC₅₀値を非線形回帰分析により算出した。

第3節 結果

PGE₂はラットEP2受容体発現細胞およびラットEP4受容体発現細胞のcAMP量を濃度依存的に上昇させた。PGE₂のラットEP2受容体およびラットEP4受容体を介したcAMP量上昇作用のEC₅₀値は、それぞれ1.3nMおよび17nMであった(表1)。CP-533,536は、ラットEP2受容体発現細胞のcAMP量を濃度依存的に上昇させ、そのI.A.は1.0であった。CP-533,536のラットEP2受容体を介したcAMP量上昇作用のEC₅₀値は3.0nMであった(表1)。一方、CP-533,536は、ラットEP4受容体発現細胞のcAMP量を10 μ Mまでの濃度において上昇させなかった(表1)。

表1 ラット EP2 受容体, ラット EP4 受容体発現 CHO-K1 細胞における,
PGE₂ および CP-533,536 の cAMP 量上昇作用

化合物	ラット EP2 受容体		ラット EP4 受容体	
	<i>EC</i> ₅₀ (nM)	<i>I.A.</i>	<i>EC</i> ₅₀ (nM)	<i>I.A.</i>
PGE ₂	1.3	1.0	17	1.0
CP-533,536	3.0	1.0	-	<0.1

-, 算出せず

第4節 考察

cAMP量を指標とした機能評価から、CP-533,536はEP2受容体に対して刺激作用を有することが報告されている [15]。また、受容体親和性実験による評価から、CP-533,536は、EP2受容体に対してIC₅₀値で50 nMの親和性を示し、EP1、EP3およびEP4受容体に対する親和性に比して50倍以上の選択性を示すことが示されている [15]。これらの結果から、CP-533,536はEP2受容体に対して選択的な刺激作用を示すと考えられている [15]。しかしながら、CP-533,536の、EP4受容体刺激作用と比較したEP2受容体刺激作用の選択性は明らかになっていない。

本実験では、cAMP量を指標とした機能評価系において、PGE₂はラットEP2およびラットEP4の両受容体に対して刺激作用を示すことを確認した。一方、CP-533,536はラットEP4受容体に比してラットEP2受容体に選択的な刺激作用を示すことを検証した。以上より、ラットを用いて下部尿路機能におけるEP2受容体の役割を解明するにあたり、CP-533,536はEP2受容体選択的な刺激薬として有用なツール化合物になりうるさらなる根拠が提示された。

第3章 尿道における EP2 受容体の役割

第1節 諸言

CP-533,536 はラット EP4 受容体に比してラット EP2 受容体に選択的な刺激作用を示すことが検証された。本章では、ラットの尿道における EP2 受容体の役割に明らかにすることを目的に、ラットの摘出尿道におけるフェニレフリン誘発収縮反応に対する CP-533,536 の弛緩作用、ラットの尿道組織における cAMP 量に対する CP-533,536 の作用、および麻酔ラットの尿道内圧に対する CP-533,536 の作用について検討を行ったので以下に報告する。

第2節 方法

2.1. 使用化合物および試薬

CP-533,536 をアステラス製薬株式会社（東京）で用意した。PGE₂ をナカライテスク（京都，日本）より購入した。

フェニレフリン ((*R*)-(-)-phenylephrine hydrochloride), IBMX をシグマアルドリッチ (St. Louis, MO, USA) より、ジメチルスルホキシド (DMSO), トリクロロ酢酸, ジメチルホルムアミドを和光純薬工業（大阪，日本）より、クレモフォル EL をナカライテスク（京都，日本）より購入した。

cAMP アッセイキットを、PerkinElmer (Waltham, MA, USA) より購入した。DC プロテインアッセイキットを、Bio-Rad (Hercules, CA, USA) より購入した。

2.2. 尿道組織における弛緩反応測定

アステラス製薬株式会社動物実験委員会の承認を得て動物実験を実施した。イソフルラン麻酔下, Sprague-Dawley 系雄性ラット (413-482 g, 日本チャールスリバー, 横浜, 日本) から尿道組織を摘出した。横紋筋部分を取り除き, 輪層方向に尿道標本を作製した。作製した尿道標本は, 95% O₂, 5% CO₂ 混合ガスを十分に通気させた 37°C の Krebs-Henseleit 液 (pH 7.4) (118.4 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 25.0 mM NaHCO₃, 11.1 mM glucose) を満たしたマグヌス管に懸垂した。尿道標本の等尺性張力を, トランスデューサー (TB-611T; 日本光電, 東京, 日本) および圧アンプ (AP-621G; 日本光電, 東京, 日本) を介し, パワーラボおよびラボチャート (ADInstruments Japan, 名古屋, 日本) を用いて記録した。

尿道標本に 0.5 g の張力を負荷し, 約 1 時間の安定期間をおいた。その後, 60 mM の KCl による収縮反応を観察した。尿道標本を Krebs-Henseleit 液で数回洗浄し, 30 分経たのちにフェニレフリン 10 μM を添加することで, 収縮反応を惹起させた。フェニレフリンによる収縮反応がプラトーに達した後, PGE₂ (0.01-10 μM), CP-533,536 (0.01-10 μM) または溶媒を累積的に添加した。なお, PGE₂ および CP-533,536 は DMSO にて溶解し, 各化合物の 1 mM および 10 mM の溶液を調製した。適宜, これらの溶液を蒸留水で希釈して実験に供することで, マグヌス管内の Krebs-Henseleit 液中の DMSO の最終濃度を, 0.2%未満とした。

フェニレフリン添加前の張力を 0%, 1 回目の被験化合物添加直前の, フェニレフリンにより惹起された収縮反応を 100%とした。被験化合物による弛緩反応を, フェニレフリンにより惹起された収縮反応の割合として算出した。各数値は, 平均値±標準誤差で表した。

2.3. 尿道組織中 cAMP 量測定

アステラス製薬株式会社動物実験委員会の承認を得て動物実験を実施した。イソフルラン麻酔下, Sprague-Dawley 系雌性ラット (197-238 g, 日本エスエルシー, 浜松, 日本) から尿道組織を摘出した。摘出した尿道組織を四分分割することで尿道切片を作製し, 各切片

を異なる実験群に割り当てた。作製した尿道切片を、95% O₂, 5% CO₂ 混合ガスを通気させた 37°C の Krebs-Henseleit 液中で、30 分間培養した。10 μM の IBMX を添加し、さらに 20 分間培養後、PGE₂, CP-533,536 または DMSO を添加した。被験化合物存在下で 60 分間の培養後、尿道切片を速やかに液体窒素にて凍結した。

凍結した尿道切片に、5%のトリクロロ酢酸を 200 μL 添加し、Tissue Lyser (QIAGEN, Venlo, Netherland) を用いてホモジナイズした。組織懸濁液を、4°C にて、9000 g で 10 分間遠心した。上清を 1 mL の水飽和ジエチルエーテルで 3 回洗浄し、冷却トラップ (UT-2000 ; 東京理科器械, 東京, 日本) を備えた遠心エバポレーター (CVE-3100 ; 東京理科器械, 東京, 日本) を用いて濃縮乾燥した。その乾燥物を cAMP 測定用の溶液で再構築し、アッセイキットを用いて cAMP 量を測定した。一方、遠心後に得られた沈殿物を 1 M の NaOH で溶解し、組織切片のタンパク質の定量に用いた。なお、タンパク質の定量は、BSA をスタンダードとし DC プロテインアッセイキットを用いて行った。そして、測定した cAMP 量をタンパク質の量で補正することで、尿道組織中の cAMP 量を求めた。各数値は、平均値±標準誤差で表した。

2.4. 尿道内圧測定

アステラス製薬株式会社動物実験委員会の承認を得て動物実験を実施した。実験には、Sprague-Dawley 系雌性ラット (216-287 g, 日本エスエルシー, 浜松, 日本) を用いた。ラットをウレタン (1.2 g/kg, i.p.) にて麻酔した。下腹部を正中切開し、膀胱および近位尿道を露出させた。膀胱を切開し、先端を炎で広げたポリエチレン製カテーテル (PE-50) を切開部位から挿入した。カテーテルの先端を近位尿道で留置し、カテーテルを近位尿道にて絹糸を用いて結紮した。カテーテルは、三方活栓を介してシリンジポンプ (STC-525 ; テルモ, 東京, 日本) および圧トランスデューサー (DX-100 ; 日本光電, 東京, 日本) に接続した。生理食塩水を 4.5 mL/h の速度でシリンジポンプよりカテーテルを経由して尿道内に持続的に灌流し、灌流圧を尿道内圧として測定した。圧トランスデューサーから圧アンプ

(AP-601G ; 日本光電, 東京, 日本) を介し, パワーラボおよびラボチャート (ADInstruments Japan, 名古屋, 日本) を用いて尿道内圧を記録した。化合物投与用に PE-50 を左大腿静脈に挿入した。

30 分以上の安定期間を経て, 生理食塩水にて溶解したフェニレフリン (0.03 mg/kg) を静脈内投与した。フェニレフリン (0.03 mg/kg) により尿道内圧が 5 mmHg 以上上昇したラットを評価に用いた。PGE₂ (0.003-0.3 mg/kg), CP-533,536 (0.003-0.3 mg/kg) もしくは溶媒を, 20 分の間隔で増加用量にて静脈内投与した。なお, 両化合物は 20%ジメチルホルムアミドおよび 10%クレモフォール EL を含む生理食塩水で溶解し実験に供した。

尿道内圧の投与前値として, 被験化合物ないし溶媒の初回の投与前における尿道内圧を測定した。また, 各用量の化合物投与 1 分後以降の最小尿道内圧を測定し, 被験化合物の尿道内圧に対する作用を投与前値からの変化量として表した。各数値は, 平均値±標準誤差で表した。

2.5 統計学的処理

ラット摘出尿道を用いた弛緩作用検討, および麻酔ラットを用いた尿道内圧に対する被験化合物の作用検討では, 被験化合物添加前もしくは投与前の各測定指標の群間の差異を, 一元配置分散分析により判定した。また, 被験化合物群と溶媒群の評価指標の差異を, 二元配置分散分析を行った後 Bonferroni 多重比較検定を行うことにより判定した。尿道組織中 cAMP 量に対する作用検討では, 被験化合物群と溶媒群の評価指標の差異を, 一元配置分散分析を行った後 Dunnett's 多重比較検定を行うことにより判定した。P 値が 0.05 未満の場合, 統計学的に有意差ありと判定した。これらの統計学的処理には Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用した。

第3節 結果

3.1 尿道組織における弛緩作用

溶媒を添加した時間経過対照群（溶媒群），PGE₂群，およびCP-533,536群において，フェニレフリン（10 μM）により誘発される収縮反応の平均値は，それぞれ 0.47, 0.40, 0.42 g であり，これらの値に統計的有意差は認められなかった。

溶媒を添加した時間経過対照群（溶媒群）のラット摘出尿道標本において，フェニレフリン（10 μM）により誘発される収縮反応はわずかに減衰したものの，最終値は 85.8 ± 5.7% と維持されていた。ラット摘出尿道標本において，PGE₂（0.01-10 μM）および CP-533,536（0.01-10 μM）は，フェニレフリン誘発収縮反応を濃度依存的に弛緩させた（図 3）。PGE₂（10 μM）および CP-533,536（10 μM）は，フェニレフリン誘発の収縮反応を，それぞれ -1.4 ± 1.2%, 8.7 ± 9.7%まで減弱させ，これらの反応は溶媒を添加した時間経過対照群（溶媒群）に比して有意であった。

3.2 尿道組織中 cAMP 量に対する作用

DMSO 処置した尿道組織中 cAMP 量は 5.0 ± 0.3 pmol/mg protein であった。PGE₂（0.1-10 μM）および CP-533,536（0.1-10 μM）は尿道組織中の cAMP 量を濃度依存的に上昇させた（図 4）。1 μM ないし 10 μM の PGE₂を処置した尿道組織中の cAMP 量は，それぞれ，7.7 ± 0.8, 10.3 ± 1.3 pmol/mg protein であった。また，10 μM の CP-533,536 を処置した尿道組織中の cAMP 量は，7.0 ± 0.7 pmol/mg protein であった。これら PGE₂（1 および 10 μM）および CP-533,536（10 μM）による尿道組織中の cAMP 量の上昇は DMSO 群に比して有意であった。

3.3 尿道内圧に対する作用

溶媒群，PGE₂群，およびCP-533,536群における尿道内圧の投与前値は，それぞれ 13.0 ± 1.7,

14.4 ± 0.7, 15.2 ± 0.9 mmHg であり, これらの値に統計的有意差は認められなかった。

溶媒の 5 回の繰り返し投与による尿道内圧の低下は, 0.5 ± 0.6 mmHg 以上

1.4 ± 0.9 mmHg 以下であった (図 5)。PGE₂ (0.003-0.3 mg/kg, i.v.) により, 麻酔ラットの尿道内圧は用量依存的に低下し, その低下は, 2.5 ± 0.4 (0.003 mg/kg, i.v.), 5.1 ± 1.0 (0.01 mg/kg, i.v.), 9.0 ± 0.6 (0.03 mg/kg, i.v.), 9.9 ± 0.6 (0.1 mg/kg, i.v.), 10.0 ± 0.6 mmHg (0.3 mg/kg, i.v.) であった (図 5)。同様に, CP-533,536 (0.003-0.3 mg/kg, i.v.) により, 麻酔ラットの尿道内圧は用量依存的に低下し, その低下は, 1.6 ± 1.0 (0.003 mg/kg, i.v.), 3.0 ± 1.2 (0.01 mg/kg, i.v.), 5.5 ± 0.9 (0.03 mg/kg, i.v.), 9.2 ± 0.9 (0.1 mg/kg, i.v.), および 10.3 ± 0.9 mmHg (0.3 mg/kg, i.v.) であった (図 5)。PGE₂ (0.01-0.3 mg/kg, i.v.) および CP-533,536 (0.03-0.3 mg/kg, i.v.) による尿道内圧の低下は溶媒群の各測定時間における値に比して有意であった。

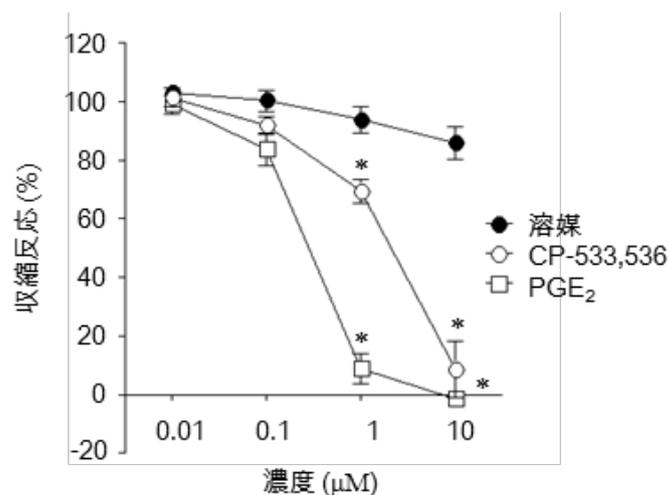


図3 ラット摘出尿道におけるフェニレフリン誘発収縮反応に対する

PGE₂およびCP-533,536の弛緩作用

結果は、フェニレフリンにより惹起された収縮反応の割合として示した。データは、6尿道標本の平均値±標準誤差で表した。被験化合物群と溶媒群の値の差異を、二元配置分散分析を行った後 Bonferroni 多重比較検定を行うことにより判定した。P 値が 0.05 未満の場合、統計学的に有意差ありと判定し、*で表した。

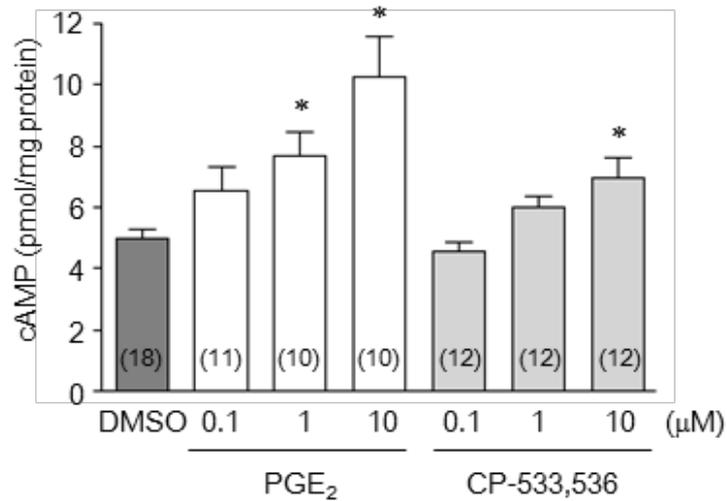


図4 ラット尿道組織における PGE₂ および CP-533,536 の cAMP 量上昇作用

データは、10-18 の尿道切片の平均値±標準誤差で示した。括弧内の数値は、切片数を表す。被験化合物群と DMSO 群の値の差異を、一元配置分散分析を行った後 Dunnett's 多重比較検定を行うことにより判定した。P 値が 0.05 未満の場合、統計学的に有意差ありと判定し、*で表した。

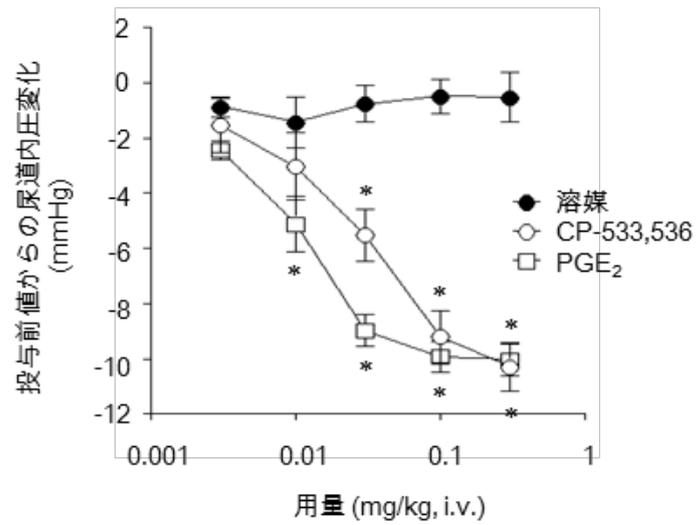


図5 麻酔ラットにおける尿道内圧に対する PGE₂ および CP-533,536 の作用

結果は、投与前値からの変化として表した。データは、5匹のラット（溶媒群）もしくは6匹のラット（PGE₂群およびCP-533,536群）の平均値±標準誤差で示した。被験化合物群と溶媒群の値の差異を、二元配置分散分析を行った後 Bonferroni 多重比較検定を行うことで判定した。P値が0.05未満の場合、統計学的に有意差ありと判定し、*で表した。

第4節 考察

近年、下部尿路組織における EP2 受容体の果たす役割が示唆されている。ラットの前立腺組織において、電気刺激誘発収縮に対する PGE₂ の抑制反応に EP2 受容体が関与することが報告され [14]、また、イヌの尿道において EP2 受容体が発現することが報告された [16]。本実験では、ラットの尿道組織において、PGE₂ および EP2 受容体に対して選択的な刺激作用を示す CP-533,536 が、フェニレフリン誘発収縮反応を濃度依存的に弛緩させることを示した。ラットの摘出尿道標本におけるこれら 2 化合物の弛緩作用活性の順列は、細胞評価系における EP2 受容体刺激作用の EC₅₀ 値の順列と一致していると考えられた。加えて、本実験における CP-533,536 により惹起される最大弛緩反応は、PGE₂ により惹起される最大弛緩反応と同程度であった。これらのことから、ラットの尿道組織における弛緩反応に EP2 受容体刺激が寄与することが示唆された。

尿道の弛緩反応において、cAMP 依存的な経路が関与することが報告されている [17, 18]。PGE₂ に応答する受容体として EP1, EP2, EP3 および EP4 受容体が知られており、これら 4 つのサブタイプの中で、EP2 および EP4 受容体が cAMP 量上昇に関与する [13]。本実験において、PGE₂ および EP2 受容体選択的刺激性薬 CP-533,536 がともに、ラットの尿道組織中 cAMP 量を濃度依存的に上昇させることを示した。さらに、ラットの摘出尿道における PGE₂ および CP-533,536 による弛緩反応は、これら 2 化合物が尿道組織中 cAMP 量を上昇させる濃度範囲において認められた。これらの結果から、EP2 受容体刺激は尿道組織中 cAMP 量を上昇させる経路と関連すること、および EP2 受容体刺激に基づく尿道弛緩反応に cAMP 依存的な経路が関与することが示唆された。

PGE₂ は、ハムスター、ウサギ、イヌ、ヒトといった様々な動物種の尿道組織を弛緩させる [9-12] だけでなく、イヌおよびヒトの尿道内圧を低下させることが報告されている [19,

20]。しかしながら、尿道内圧低下に対する EP2 受容体刺激の寄与に関する知見は少ない。本実験において、PGE₂に加え EP2 受容体選択的刺激薬である CP-533,536 が麻酔ラットにおける尿道内圧を低下させた。このことから、EP2 受容体刺激は尿道内圧の低下に寄与することが示唆された。

第4章 膀胱機能に対する EP2 受容体刺激の影響

第1節 諸言

PGE₂は尿道のみならず膀胱機能にも関与することが報告されている [1, 21]。特に, PGE₂の膀胱機能亢進作用に EP1 および EP3 受容体に関与することが示唆されている [21]。しかしながら, 膀胱機能における EP2 受容体の役割に関する知見は少ない [21]。そこで, 本章では, 膀胱機能における EP2 受容体の役割を考察することを目的として, 麻酔ラットにおける排尿反射に対する EP2 受容体選択的刺激性薬 CP-533,536 の影響を評価したので, 以下に報告する。

第2節 方法

2.1. 使用化合物および試薬

CP-533,536 をアステラス製薬株式会社 (東京) で用意した。CP-533,536 は, 20%ジメチルホルムアミド (和光純薬, 大阪, 日本) および 10%クレモフォル EL (ナカライテスク, 京都, 日本) を含む生理食塩水で溶解し, 実験に供した。

2.2. 膀胱内圧測定

アステラス製薬株式会社動物実験委員会の承認を得て動物実験を実施した。実験には, Sprague-Dawley 系雌性ラット (221-306 g, 日本エスエルシー, 浜松, 日本) を用いた。ラットをウレタン (1.2 g/kg, s.c.) にて麻酔した。下腹部を正中切開し, 膀胱を露出させた。膀胱頂部を小切開し, 先端を炎で広げたポリエチレン製カテーテル (PE-50) を切開部位から膀胱内へ挿入した。カテーテルの先端を膀胱頂部で留置するよう調整し, 絹糸を用いて結

繋した。このカテーテルを、三方活栓を介してシリンジポンプ（STC-525；テルモ，東京，日本）および圧トランスデューサー（DX-100；日本光電，東京，日本）に接続した。生理食塩水を6.0 mL/hの速度でシリンジポンプよりカテーテルを経由して膀胱内に持続注入し，排尿反射を惹起させた。膀胱内圧を，圧トランスデューサーから圧アンプ（AP-601G；日本光電，東京，日本）を介し，パワーラボおよびラボチャート（ADInstruments Japan，名古屋，日本）を用いて記録した。化合物投与用にPE-50を左大腿静脈に挿入した。

1時間以上生理食塩水を膀胱内へ持続的に注入し，排尿反射を繰り返し惹起させた。排尿反射が安定したことを確認した後，CP-533,536（0.03，0.1，または0.3 mg/kg）もしくは溶媒を静脈内投与した。

膀胱内圧曲線から，最大排尿圧，排尿間隔，および排尿閾値圧を測定した。化合物投与前後の各指標の値は，2回の排尿反射から得られた平均値を用いた。投与後値は，投与前値を100%として算出し，投与後値から投与前値を差し引くことで変化量を求めた。各数値は，平均値±標準誤差で表した。

2.3. 統計的処理

各群における測定指標の投与前値の差異を，一元配置分散分析により判定した。各指標の投与前後の変化量に関する被験化合物群と溶媒群の差異を，一元配置分散分析を行った後Dunnett's多重比較検定を行うことで判定した。*P*値が0.05未満の場合，統計学的に有意差ありと判定した。これらの統計学的処理にはPrism（GraphPad Software，San Diego，CA，USA）を使用した。

第3節 結果

麻酔ラットの排尿反射における最大排尿圧，排尿間隔，排尿閾値圧の投与前値は，それぞれ 22.8 ± 0.8 cmH₂O (n=20)， 557 ± 37 sec (n=20)， 6.2 ± 0.3 cmH₂O (n=20) であった。各群間におけるこれらの値に統計的有意差は認められなかった。溶媒投与後の最大排尿圧，排尿間隔，排尿閾値圧の変化は，それぞれ 3.4 ± 2.2 ， 9.5 ± 10.4 ， $10.0 \pm 10.7\%$ であった (図 6, 7)。CP-533,536 (0.03-0.3 mg/kg, i.v.) は，最大排尿圧，排尿間隔，および排尿閾値圧に対して顕著な影響を及ぼさず，CP-533,536 (0.03-0.3 mg/kg, i.v.) によるこれら指標の変化は，溶媒に比して統計的有意差は認められなかった (図 6, 7)。

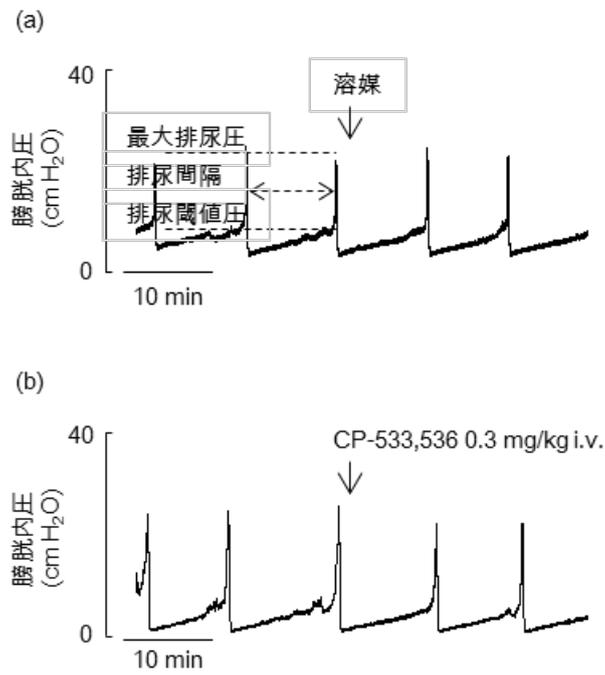


図 6 麻醉ラットにおける膀胱内圧曲線 (典型チャート)

(a) 麻醉ラットの膀胱内圧曲線に対する溶媒の影響 (b) 麻醉ラットの膀胱内圧曲線に対する CP-533,536 の影響

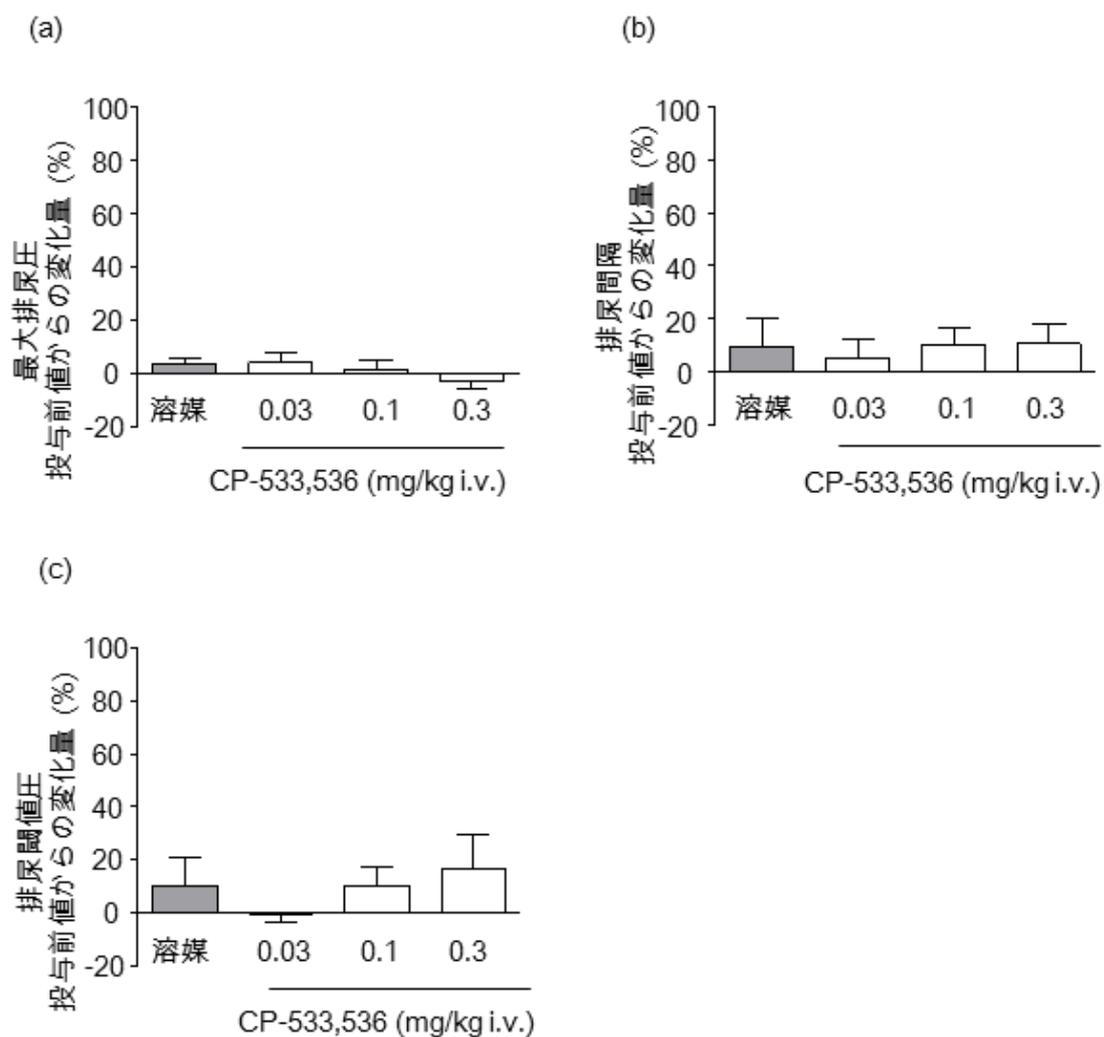


図7 麻醉ラットにおける最大排尿圧 (a), 排尿間隔 (b), および排尿閾値圧 (c) に対する CP-533,536 の作用

結果は、投与前値を 100%として、投与前値からの変化として表した。データは、5 匹のラットの平均値±標準誤差で示した。

第4節 考察

PGE₂に応答する受容体として EP1, EP2, EP3 および EP4 受容体が知られており [13], これら4つのサブタイプの中で, EP1, EP3 および EP4 受容体の膀胱機能への関与が報告されている [21]。ラットにおける膀胱機能に対する PGE₂ の亢進作用は, EP1 受容体拮抗薬により阻害されることが報告されている [22]。また, EP3 ノックアウトマウスを用いた別の報告では, PGE₂ の膀胱機能亢進作用が抑制されることが示されている [23]。ラットにおいて, シクロホスファミドにより誘発された過活動膀胱状態が, EP4 受容体拮抗薬により抑制されたことから, 膀胱機能における EP4 受容体の役割に関しても示唆されている [24]。しかしながら, 下部尿路閉塞ラットにおいては, EP4 受容体刺激薬が膀胱活動を抑制させたとの報告もある [25]。膀胱機能における EP4 受容体の役割については議論の余地があり, その役割の解明には, さらなる研究が必要であると考えられる。

膀胱における EP2 受容体の関与について, モルモットを用いた実験から膀胱組織に EP2 受容体が発現することが示唆されている [26, 27]。しかしながら, 膀胱機能における EP2 受容体の役割に関する知見は見当たらない [21]。本実験では, 麻酔ラットの排尿反射において, EP2 受容体選択的刺激薬である CP-533,536 は, 実験に用いた用量範囲 (最高用量 0.3 mg/kg, i.v.) で, 最大排尿圧, 排尿間隔, 排尿閾値圧に影響を及ぼさないことを示した。膀胱機能における EP2 受容体の役割を解明するには, 排尿反射に対する影響の検討のみならず, さらなる研究が必要であると考えられる。しかしながら, 本研究では, CP-533,536 (0.03-0.3 mg/kg, i.v.) が尿道内圧を有意に低下させることを明らかにしていることから, ラットの下部尿路組織において, EP2 受容体刺激による尿道機能への作用は, 膀胱と比較して選択的に発現することが示唆された。

第5章 排尿に対するEP2受容体刺激薬の作用

第1節 諸言

膀胱および尿道とそれらを支配する神経から構成される下部尿路は、蓄尿と排尿の2つの相反する機能を司る [1]。蓄尿時に膀胱は弛緩し、尿道は収縮して禁制を維持し、排尿時に膀胱は収縮し、尿道は弛緩することで効率的な尿排出に寄与する [1]。尿道は、交感神経から放出されるノルアドレナリンによる α_1 受容体刺激を介して収縮する [1, 2]。前立腺肥大症を呈する患者において排尿障害を含む下部尿路症状が認められる [3, 4]。排尿障害は、前立腺の肥大に基づく尿道狭窄（機械的閉塞）に加え、前立腺および膀胱頸部における平滑筋の過収縮に基づく尿道狭窄（機能的閉塞）に起因すると考えられている [3, 4]。つまり、排尿時において、尿道弛緩が不十分なことにより排尿困難が惹起されると考えられる。一方、 α_1 受容体拮抗薬は、前立腺肥大症に伴う排尿障害の治療薬として、世界中で使用されている [5]。加えて、尿道弛緩作用を示すホスホジエステラーゼ5阻害薬 [6] は、前立腺肥大症患者において国際前立腺症状スコアを改善させることが報告されている [7, 8]。以上より、尿道弛緩作用を有する化合物は、尿道狭窄に起因する排尿障害を改善させる可能性が示唆される。

本研究では、EP2受容体に選択的な刺激作用を示すCP-533,536が、 α_1 受容体刺激薬であるフェニレフリンにより収縮させた尿道標本を弛緩させることを示した。このことは、EP2受容体選択的の刺激薬が尿道狭窄を緩和し、排尿障害を改善する可能性を示唆する。本章では、排尿に対するEP2受容体刺激薬の作用を明らかにすることを目的に、 α_1 受容体刺激により機能的な尿道狭窄を誘発することで排尿動態に変化を惹起させたラットを用いて、尿道狭窄に基づく残尿量の増加および排尿効率の低下に対する、EP2受容体選択的の刺激薬CP-533,536の作用を検討したので、以下に報告する。

第2節 方法

2.1. 使用化合物および試薬

CP-533,536 をアステラス製薬株式会社（東京）で用意した。CP-533,536 は、20%ジメチルホルムアミド（和光純薬，大阪，日本）および10%クレモフォル EL（ナカライテスク，京都，日本）を含む生理食塩水で溶解し実験に供した。ミドドリン（Midodrine hydrochloride）（図8）をシグマアルドリッチ（St. Louis, MO, USA）より購入した。ミドドリンは、生理食塩水で溶解し実験に供した。

2.2. 尿道内圧測定

アステラス製薬株式会社動物実験委員会の承認を得て動物実験を実施した。実験には、Sprague-Dawley 系雌性ラット（196-232 g, 日本エスエルシー，浜松，日本）を用いた。ラットをウレタン（1.2 g/kg, i.p.）にて麻酔した。下腹部を正中切開し，膀胱および近位尿道を露出させた。膀胱を切開し，先端を炎で広げたポリエチレン製カテーテル（PE-50）を切開部位から挿入した。カテーテルの先端を近位尿道で留置し，カテーテルを近位尿道にて絹糸を用いて結紮した。カテーテルを，三方活栓を介してシリンジポンプ（STC-525；テルモ，東京，日本）および圧トランスデューサー（DX-100；日本光電，東京，日本）に接続した。生理食塩水を4.5 mL/h の速度でシリンジポンプよりカテーテルを経由して尿道内に持続的に灌流し，灌流圧を尿道内圧として測定した。尿道内圧を，圧トランスデューサーから圧アンプ（AP-601G；日本光電，東京，日本）を介し，パワーラボおよびラボチャート（ADInstruments Japan，名古屋，日本）を用いて記録した。化合物投与用に PE-50 を左大腿静脈に挿入した。

30 分以上の安定期間を経て，ミドドリン（1 mg/kg）を静脈内投与した。ミドドリン投与前の尿道内圧を基底値，ミドドリン投与10分後の尿道内圧をプレ値とした。ミドドリン投与10分後に，CP-533,536（0.03，0.1，または0.3 mg/kg）もしくは溶媒を静脈内投与した。

CP-533,536 もしくは溶媒投与 5 分後の尿道内圧を測定し、プレ値からの変化量を算出した。各数値は、平均値±標準誤差で表した。

2.3. 残尿量の測定

アステラス製薬株式会社動物実験委員会の承認を得て動物実験を実施した。実験には、Sprague-Dawley 系雄性ラット (275-320 g, 日本エスエルシー, 浜松, 日本) を用いた。イソフルラン麻酔下, 下腹部を正中切開し, 膀胱を露出させた。膀胱腹側中央部に小切開を加え, ポリエチレン製カテーテル (PE-160) を切開部位から膀胱内へ挿入し, 結紮留置した。カテーテル (PE-160) のもう一端は, 下腹部切開部より導出し, 下腹部を縫合した。このカテーテル (PE-160) を介して, 生理食塩水を膀胱内へ注入するとともに, 膀胱内圧変化および残尿量を測定した。また, 化合物投与用に PE-50 を頸静脈に挿入した。カテーテルのもう一端を, 皮下をくぐらせ, 背側頸部より体外へ導出した。その後頸部を縫合した。ラットをボールマンゲージ (夏目製作所, 東京, 日本) に保定し, 1 時間以上の安定期間をおくことで麻酔から覚醒させた。

膀胱内へ挿入されたカテーテル (PE-160) は, 三方活栓を介してシリンジポンプ (STC-525 ; テルモ, 東京, 日本) および圧トランスデューサー (DX-100 ; 日本光電, 東京, 日本) に接続した。シリンジポンプを用いて生理食塩水を 4.2 mL/h の速度でカテーテルを介して膀胱内に注入し, 排尿反射を惹起させるとともに膀胱内圧を測定した。膀胱内圧は, 圧トランスデューサーから圧アンプ (AP-601G ; 日本光電, 東京, 日本) を介して, パワーラボおよびラボチャート (ADInstruments Japan, 名古屋, 日本) を用いて記録した。尿道口から排出される尿量, および膀胱カテーテル (PE-160) から排出される尿量を, ボールマンゲージの下に設置した電子天秤 (GX-200 ; A and D, 東京, 日本) を用いて測定した。電子天秤により測定された尿量は, パワーラボおよびラボチャート (ADInstruments Japan, 名古屋, 日本) により記録した。

約 1 時間生理食塩水を膀胱内へ持続的に注入し, 安定期間を置いた。安定期間を経た後,

排尿反射が起きた直後に膀胱内への生理食塩水注入を停止した。また、排尿反射に伴い尿道口から排出される尿量を排尿量として測定した。その後、膀胱カテーテルを三方活栓からはずし、膀胱カテーテルから排出される尿を残尿量として測定した。

排尿量および残尿量の投与前値を測定後、CP-533,536 (0.03, 0.1, または 0.3 mg/kg) もしくは溶媒を静脈内投与した。5 分後にミドドリン (1 mg/kg) を静脈内投与し、さらに 5 分後、生理食塩水の膀胱内への注入を再開した。再度排尿反射が起きた直後に膀胱内への生理食塩水注入を停止し、化合物投与後の排尿量および残尿量を同様に測定した。

本実験では 1 g の尿量を 1 mL と換算した。排尿効率を下記の計算式、

$$\text{排尿効率 (\%)} = \text{排尿量 (mL)} / [\text{排尿量 (mL)} + \text{残尿量 (mL)}] \times 100$$

を用いて算出した。残尿量および排尿効率について、投与後値から投与前値を差し引くことで変化量を求めた。各数値を平均値±標準誤差で表した。

2.3 統計学的処理

各群における残尿量および排尿効率の投与前値の差異を、一元配置分散分析により判定した。被験化合物群と溶媒群における残尿量および排尿効率の投与前後の変化量の差異を、一元配置分散分析を行った後 Dunnett's 多重比較検定を行うことにより判定した。P 値が 0.05 未満の場合、統計学的に有意差ありと判定した。これらの統計学的処理には Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用した。

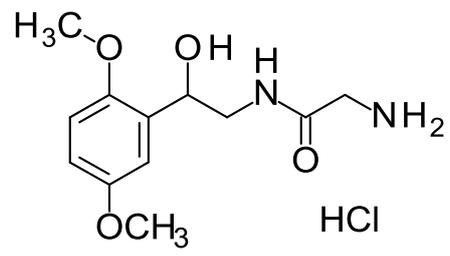


図8 ミドドリン塩酸塩の構造式

第3節 結果

3.1. ミドドリン処置ラットにおける尿道内圧に対する CP-533,536 の作用

ミドドリン (1 mg/kg, i.v.) の投与により、ラットの尿道内圧は 14.2 ± 0.5 mmHg (基底値) (n=20) から、 20.0 ± 0.6 mmHg (プレ値, 投与 10 分後) (n=20) へ顕著に上昇した (図 9)。ミドドリンによる尿道内圧上昇に、実験群間で統計的有意差は認められなかった。

溶媒は、ミドドリンにより上昇した尿道内圧をわずかに低下させた (2.1 ± 0.6 mmHg の低下) (図 9, 10)。CP-533,536 (0.03-0.3 mg/kg, i.v.) はミドドリンにより上昇した尿道内圧を用量依存的に低下させた (図 9, 10)。本化合物の 0.1 および 0.3 mg/kg (i.v.) による尿道内圧低下作用は、それぞれ 7.8 ± 1.0 , 13.6 ± 1.3 mmHg であり、これらの変化は溶媒群に比して有意であった (図 10)。

3.2. ミドドリン処置ラットにおける残尿量および排尿効率に対する CP-533,536 の作用

残尿量の投与前値は 0.043 ± 0.005 mL (n=20) であり、溶媒群および CP-533,536 群の間で統計的有意差は認められなかった。溶媒群において、ミドドリン (1 mg/kg, i.v.) は残尿量を顕著に増加させ、投与前後の変化量は 0.159 ± 0.027 mL であった (図 11)。CP-533,536 (0.03-0.3 mg/kg, i.v.) は、ミドドリンにより惹起される残尿量の増加を用量依存的に抑制した (図 11)。CP-533,536 の 0.1 および 0.3 mg/kg の用量における残尿量の変化は、それぞれ 0.047 ± 0.023 mL, 0.021 ± 0.001 mL であり、これらの値は溶媒群と比較して有意に低値であった (図 11)。

排尿効率の投与前値は $94.0 \pm 0.6\%$ (n=20) であり、溶媒群および CP-533,536 群の間で統計的有意差は認められなかった。溶媒群において、ミドドリン (1 mg/kg, i.v.) は排尿効率を顕著に低下させ、投与前後の変化量は $19.9 \pm 3.1\%$ であった (図 11)。CP-533,536 (0.03-0.3 mg/kg, i.v.) はミドドリンにより惹起される排尿効率の低下を用量依存的に改善した (図 11)。CP-533,536 の 0.1 および 0.3 mg/kg の用量における排尿効率の変化量はそれ

ぞれ, $8.4 \pm 3.6 \%$, $4.6 \pm 1.4 \%$ であり, これらの変化量は溶媒群と比較して有意に小さかった (図 11)。

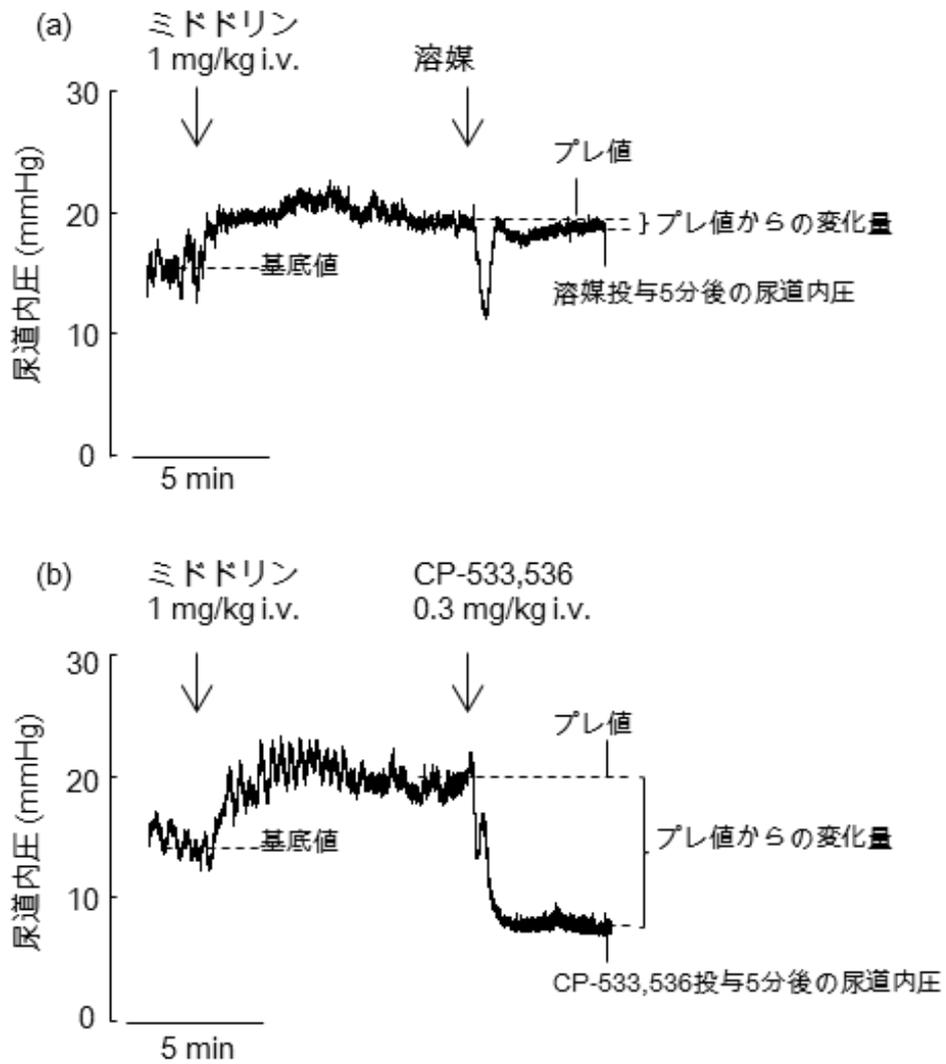


図9 麻酔ラットにおける尿道内圧 (典型チャート)

(a) 麻酔ラットにおける尿道内圧に対するミドドリンの作用, およびミドドリン処置ラットにおける尿道内圧に対する溶媒の作用 (b) 麻酔ラットにおける尿道内圧に対するミドドリンの作用, およびミドドリン処置ラットにおける尿道内圧に対する CP-533,536 の作用

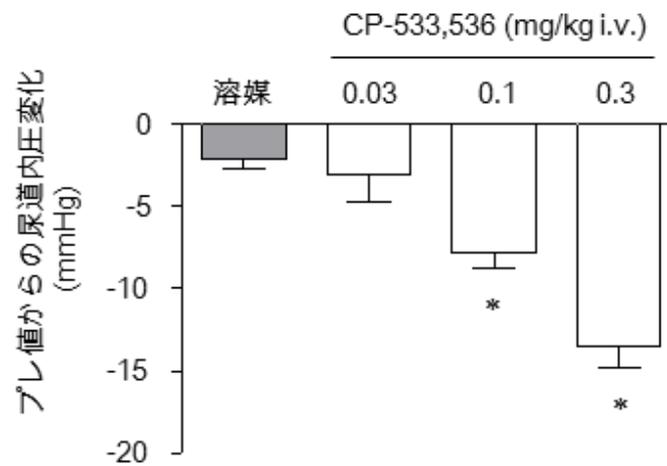


図 10 ミドドリン処置ラットにおける尿道内圧に対する CP-533,536 の作用

結果は、プレ値（ミドドリン投与 10 分後における尿道内圧）からの尿道内圧変化として表した。データは、5 匹のラットの平均値±標準誤差で示した。CP-533,536 群と溶媒群の値の差異を、一元配置分散分析を行った後 Dunnett's 多重比較検定を行うことにより判定した。 P 値が 0.05 未満の場合、統計学的に有意差ありと判定し、*で表した。

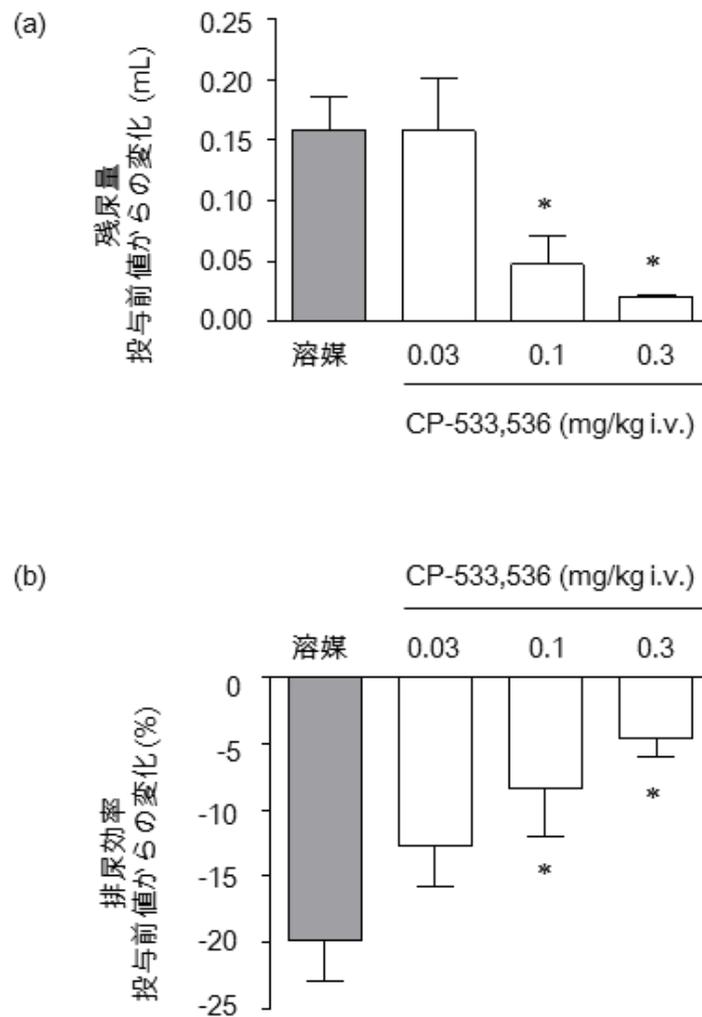


図 11 ミドドリン処置ラットにおける残尿量 (a) および排尿効率 (b) に対する

CP-533,536 の作用

結果は、投与前値からの変化量として表した。データは、5 匹のラットの平均値±標準誤差で示した。CP-533,536 群と溶媒群の値の差異を、一元配置分散分析を行った後 Dunnett's 多重比較検定を行うことにより判定した。P 値が 0.05 未満の場合、統計学的に有意差ありと判定し、*で表した。

第4節 考察

本実験から、麻酔ラットにおいて、ミドドリンは尿道内圧を上昇させることが観察された。この結果は、イヌで報告されているこれまでの知見と同様の結果であった [28, 29]。ミドドリンは生体内で活性代謝物に変換され、 α_1 受容体刺激作用を示す。このことから、本実験で観察されたミドドリンによる尿道内圧上昇は、 α_1 受容体刺激を介した尿道狭窄の結果、惹起された反応であると考えられた。

本実験において、EP2 受容体選択的刺激薬である CP-533,536 は、ミドドリンにより上昇した尿道内圧を低下させた。CP-533,536 は、 α_1 受容体刺激薬であるフェニレフリンにより惹起される尿道収縮反応を弛緩させることを本研究で明らかにしている。これらの知見から、EP2 受容体刺激薬は、 α_1 受容体刺激に基づく尿道狭窄を緩和することで尿道内圧を低下させると考えられる。

モルモットにおいて、フェニレフリンの静脈内持続的投与は用量依存的に排尿効率を低下させることが報告されており [30]、 α_1 受容体刺激は機能的な尿道狭窄を介して排尿障害をもたらすことが示唆される。先の実験から、ラットにおいて、ミドドリンの静脈内投与による尿道内圧の上昇が認められたことから、ラットにおいて α_1 受容体刺激に基づく尿道狭窄により尿道内圧の上昇が惹起されると考えられた。そこで、本研究では、ラットにおいてミドドリンにより尿道狭窄を引き起こし、排尿障害を誘発することを試みた。ラットにおいて、ミドドリンの静脈内単回投与は、残尿量を増加させるとともに排尿効率を低下させた。ミドドリンの静脈内単回投与は、機能的な尿道狭窄に基づいた、残尿量の増加および排尿効率の低下という排尿障害状態を惹起することが示唆された。

ミドドリン誘発排尿障害ラットにおいて、EP2 受容体刺激薬である CP-533,536 は、残尿量を減少させ、排尿効率を改善させた。効率的な尿排出には、協調のとれた尿道の弛緩および膀胱の収縮が必要であると考えられている [1]。CP-533,536 (0.1, 0.3 mg/kg, i.v.) は、

ミドドリンにより上昇した尿道内圧に対して、有意な低下作用を示した。一方、膀胱機能に対して、CP-533,536は0.3 mg/kg (i.v.)の用量まで影響を及ぼさないことを本研究で明らかにしている。従って、機能的な尿道狭窄に起因する排尿障害に対するEP2受容体刺激薬の改善作用は、膀胱収縮に対する増強作用ではなく、尿道の弛緩作用に基づく尿道狭窄緩和を介した反応であると考えられた。

第6章 総括

本研究では、下部尿路機能における EP2 受容体の役割の一端を薬理的に解明した。EP2 受容体刺激は、ラットにおいて尿道弛緩反応を惹起し、尿道内圧を低下させた。また、その経路に cAMP が関与する可能性を示した (図 12)。一方、膀胱機能における EP2 受容体刺激の役割は尿道のそれに比して顕著でないことが示された (図 12)。さらに、EP2 受容体刺激薬は、ミドドリンによって誘発された排尿障害ラットにおける残尿量の増加および排尿効率の低下を改善させることを示した。その機序として、EP2 受容体刺激が、 α_1 受容体刺激に基づく尿道狭窄を緩和することが示唆された (図 13)。

前立腺肥大症に伴う下部尿路症状は、下部尿路閉塞の原因となる 2 つの関連する病態を要因として引き起こされる [4]。ひとつは、前立腺の肥大に関係した静的な要素、機械的閉塞であり、もうひとつは、前立腺および膀胱頸部における平滑筋の過収縮に関連した動的な要素、機能的閉塞である [4]。本研究から、EP2 受容体刺激薬は、 α_1 受容体刺激に基づく機能的尿道狭窄を示すラットにおいて、排尿障害を緩和させることが示された。このことから、EP2 受容体刺激薬は、動的な要素、機能的閉塞に基づいた下部尿路閉塞に起因する排尿障害を改善させることが示唆された。

前立腺肥大症に伴う排尿障害の治療薬として、 α_1 受容体拮抗薬は世界中で使用されている [5]。 α_1 受容体拮抗薬は、興奮性神経伝達物質であるノルアドレナリンによる α_1 受容体刺激を介した尿道収縮を抑制することで尿道弛緩に寄与する。近年、ホスホジエステラーゼ 5 阻害薬は、前立腺肥大症患者における国際前立腺症状スコアを改善させることが報告された [7, 8]。ホスホジエステラーゼ 5 阻害薬は、尿道弛緩作用を示す cGMP の分解を阻害することにより尿道弛緩を増強する。本研究結果から、EP2 受容体刺激薬は、 α_1 受容体拮抗薬およびホスホジエステラーゼ 5 阻害薬の尿道弛緩機構とは異なり、EP2 受容体の刺激に基づき尿道弛緩に寄与する cAMP の量を増加させることで、直接的に尿道弛緩を導くこと

が示唆された。

選択的な EP2 受容体刺激薬に関するさらなる研究は、新規な機序に基づく排尿障害治療薬を提供する可能性を持つと考えられる。

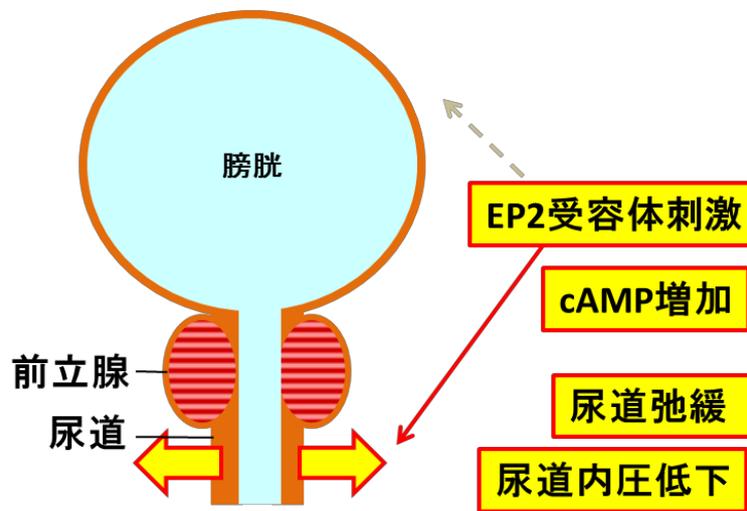


図 12 本研究結果から示唆される，下部尿路組織における EP2 受容体の役割

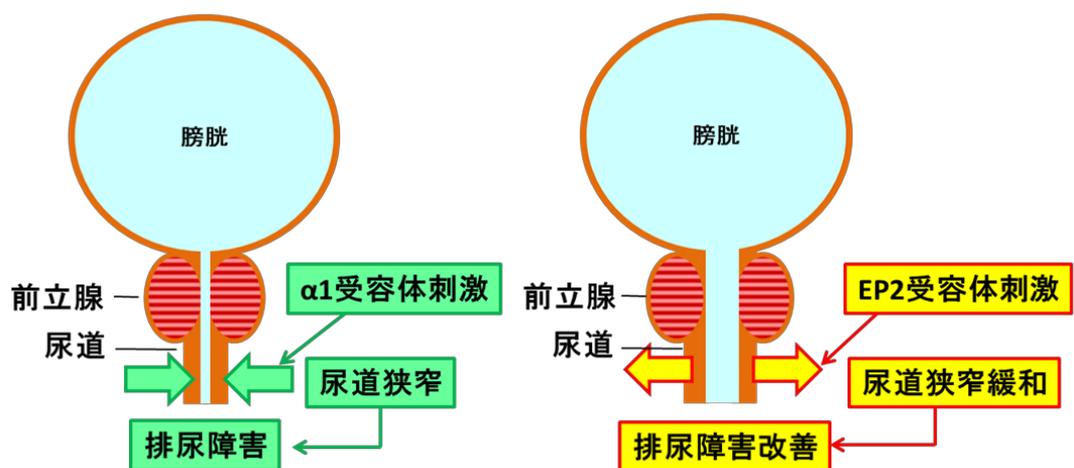


図 13 本研究結果から示唆される，排尿に対する EP2 受容体刺激薬の作用

引用文献

1. Andersson KE, Wein AJ. Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. *Pharmacol Rev* 2004; **56**: 581-631.
2. Michel MC, Vrydag W. Alpha1-, alpha2- and beta-adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. *Br J Pharmacol* 2006; **147**: S88-119.
3. Ventura S, Oliver V, White CW, Xie JH, Haynes JM, Exintaris B. Novel drug targets for the pharmacotherapy of benign prostatic hyperplasia (BPH). *Br J Pharmacol* 2011; **163**: 891-907.
4. Roehrborn CG, Schwinn DA. Alpha1-adrenergic receptors and their inhibitors in lower urinary tract symptoms and benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 2004; **171**: 1029-35.
5. Chapple CR. Pharmacological therapy of benign prostatic hyperplasia/lower urinary tract symptoms: an overview for the practising clinician. *BJU Int* 2004; **94**: 738-44.
6. Tinel H, Stelte-Ludwig B, Hutter J, Sandner P. Pre-clinical evidence for the use of phosphodiesterase-5 inhibitors for treating benign prostatic hyperplasia and lower urinary tract symptoms. *BJU Int* 2006; **98**: 1259-63.
7. Roehrborn CG, McVary KT, Elion-Mboussa A, Viktrup L. Tadalafil administered once daily for lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia: a dose finding study. *J Urol* 2008; **180**: 1228-34.
8. Dmochowski R, Roehrborn C, Klise S, Xu L, Kaminetsky J, Kraus S. Urodynamic effects of once daily tadalafil in men with lower urinary tract symptoms secondary to clinical benign prostatic

hyperplasia: a randomized, placebo controlled 12-week clinical trial. *J Urol* 2010; **183**: 1092-7.

9. Pinna C, Puglisi L, Burnstock G. ATP and vasoactive intestinal polypeptide relaxant responses in hamster isolated proximal urethra. *Br J Pharmacol* 1998; **124**: 1069-74.

10. Morita T, Ando M, Kihara K, et al. Effects of prostaglandins E1, E2 and F2 alpha on contractility and cAMP and cGMP contents in lower urinary tract smooth muscle. *Urol Int* 1994; **52**: 200-3.

11. Mutoh S, Ueda S, Yano S, Ikegami K, Sakanashi M. Effects of some prostaglandins on urinary bladder and urethra isolated from the dog. *Urol Int* 1983; **38**: 219-22.

12. Andersson KE, Ek A, Persson CG. Effects of prostaglandins on the isolated human bladder and urethra. *Acta Physiol Scand* 1977; **100**: 165-71.

13. Woodward DF, Jones RL, Narumiya S. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. *Pharmacol Rev* 2011; **63**: 471-538.

14. Tokanovic S, White CW, Malone DT, Exintaris B, Ventura S. Characterisation of the prostanoid receptor mediating inhibition of smooth muscle contractility in the rat prostate gland. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2010; **381**: 321-8.

15. Paralkar VM, Borovecki F, Ke HZ, et al. An EP2 receptor-selective prostaglandin E2 agonist induces bone healing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; **100**: 6736-40.

16. Ponglowhapan S, Church DB, Khalid M. Expression of prostaglandin E(2) receptor subtypes in the canine lower urinary tract varies according to the gonadal status and gender. *Theriogenology* 2010; **74**: 1450-66.

17. Kedia GT, Oelke M, Sohn M, Kuczyk MA, Uckert S. Pharmacologic characterization of human male urethral smooth muscle: an in vitro approach. *Urology* 2013; 82: 1451 e13-9.
18. Garcia-Pascual A, Triguero D. Relaxation mechanisms induced by stimulation of nerves and by nitric oxide in sheep urethral muscle. *J Physiol* 1994; 476: 333-47.
19. Kondo A, Kobayashi M, Takita T, Narita H. Effect of prostaglandin on urethral resistance and micturition. *Urol Res* 1983; 11: 19-22.
20. Andersson KE, Henriksson L, Ulmsten U. Effects of prostaglandin E2 applied locally on intravesical and intraurethral pressures in women. *Eur Urol* 1978; 4: 366-9.
21. Rahnama'i MS, van Kerrebroeck PE, de Wachter SG, van Koeveringe GA. The role of prostanoids in urinary bladder physiology. *Nat Rev Urol* 2012; **9**: 283-90.
22. Lee T, Hedlund P, Newgreen D, Andersson KE. Urodynamic effects of a novel EP(1) receptor antagonist in normal rats and rats with bladder outlet obstruction. *J Urol* 2007; **177**: 1562-7.
23. McCafferty GP, Misajet BA, Laping NJ, Edwards RM, Thorneloe KS. Enhanced bladder capacity and reduced prostaglandin E2-mediated bladder hyperactivity in EP3 receptor knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; **295**: F507-14.
24. Chuang YC, Yoshimura N, Huang CC, Wu M, Tyagi P, Chancellor MB. Expression of E-series prostaglandin (EP) receptors and urodynamic effects of an EP4 receptor antagonist on cyclophosphamide-induced overactive bladder in rats. *BJU Int* 2010; **106**: 1782-7.
25. Beppu M, Araki I, Yoshiyama M, Du S, Kobayashi H, Zakoji H, et al. Bladder outlet obstruction induced expression of prostaglandin E2 receptor subtype EP4 in the rat bladder: a possible

counteractive mechanism against detrusor overactivity. *J Urol* 2011; **186**: 2463-9.

26. Rahnama'i MS, van Koeveringe GA, Essers PB, et al. Prostaglandin receptor EP1 and EP2 site in guinea pig bladder urothelium and lamina propria. *J Urol* 2010; **183**: 1241-7.

27. Rahnama'i MS, Biallostowski BT, de Wachter SG, Van Kerrebroeck PE, van Koeveringe GA. The distribution of the prostaglandin E receptor type 2 (EP2) in the detrusor of the guinea pig. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2012; **99**: 107-15.

28. Takahashi S, Moriyama N, Homma Y, et al. The urodynamic effects of an alpha 1-adrenoceptor agonist on the bladder and urethra of female dogs. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1991; **82**: 1292-8.

29. Takahashi S, Moriyama N, Yamazaki R, Kawabe K. Urodynamic analysis of age-related changes of alpha 1-adrenoceptor responsiveness in female beagle dogs. *J Urol* 1996; **156**: 1485-8.

30. Nagabukuro H, Hashimoto T, Iwata M, Doi T. Effects of TAK-802, a novel acetylcholinesterase inhibitor, and tamsulosin, an alpha1-adrenoceptor antagonist, and their synergistic effects on the urodynamic characteristics in a guinea-pig model of functional bladder outlet obstruction. *BJU Int* 2005; **95**: 1071-6.

謝辞

本論文の作成にあたり，終始ご懇切なるご指導，ご高配を賜りました東京大学大学院薬学系研究科，堅田利明教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究の機会を賜り，ご便宜およびご配慮を賜りましたアステラス製薬株式会社 内田渡研究本部長，増田典之研究統括部長，岩井晃彦リサーチポートフォリオ&サイエンス部長，武田全弘泌尿器研究ユニット長に深く感謝申し上げます。また，本研究の遂行にあたり，適切なるご助言ならびにご支援を賜りましたアステラス製薬株式会社 増田典之博士，石津健一郎博士，今住克則博士，高松肇博士，吉野泰司博士に心より感謝いたします。

以下の論文をもとに本論文を執筆した。

Kurihara R, Ishizu K, Takamatsu H, Yoshino T, Masuda N. Study on Physiological Roles of Stimulation of Prostaglandin E₂ Receptor Subtype EP2 in Urethral Function in Rats. *LUTS in press*; doi: 10.1111/luts.12077

Kurihara R, Imazumi K, Takamatsu H, Ishizu K, Yoshino T, Masuda N. Effect of Selective Prostaglandin E₂ EP2 Receptor Agonist CP-533,536 on Voiding Efficiency in Rats with Midodrine-Induced Functional Urethral Obstruction. *LUTS in press*; doi: 10.1111/luts.12080