Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2026-11-04

卵巣摘出による膀胱平滑筋β_3アドレナリン受容体機能の変化

松原，重治
岡田，弘
守殿，貞夫
久野，高義

(Citation)
神戸大学医学部紀要,61(4):95-101

(Issue Date)
2001-03

(Resource Type)
departmental bulletin paper

(Version)
Version of Record

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/00044701

卵巣摘出による膀胱平滑筋β_3アドレナリン受容体機能の変化

松原重治[1)]，岡田　弘[1)]，守殿貞夫[1)]，久野高義[2)]

1）神戸大学医学部泌尿器科学教室
2）神戸大学医学部薬理学教室

連絡先：松原重治
神戸大学医学部泌尿器科学教室
650-0017 神戸市中央区楠町7丁目5-1
TEL：(078)-382-6155，FAX：(078)-382-6169

（平成12年12月4日受付）

要　約

更年期女性は頻尿や尿失禁などの不安定膀胱症状を呈することが少なくない。これは閉経による体内エストロゲンレベルの低下が原因の一つであるとの報告がある。そこで今回我々は，卵巣を摘出したラットの膀胱，および根治的膀胱全摘出術によって得られた閉経後女性の膀胱を用いて，それらの平滑筋βアドレナリン受容体発現の有無について検討を行った。その結果，RT-PCR法により，雌ラットと閉経後女性の膀胱平滑筋細胞にβ3アドレナリン受容体mRNAの発現が認められた。また，卵巣摘出後6週間エストロゲンを投与したラットと投与しなかったラットの膀胱平滑筋弛緩機能を，βアドレナリン受容体刺激薬を用いた等尺性張力測定を行い，比較検討した。その結果，投与群，非投与群ともに非選択的βアドレナリン受容体刺激薬であるisoproterenolによる膀胱平滑筋の弛緩作用は濃度依存的であったが，両群間に有意差は認められなかった。一方，選択的β3アドレナリン受容体刺激薬であるBRL37344では，膀胱平滑筋の弛緩作用は濃度依存的であり，卵巣摘出したラットの弛緩反応はコントロール群や卵巣摘出後エストロゲンを補充したラットより有意に強かった。体内エストロゲンレベルの変化が膀胱平滑筋β3アドレナリン受容体機能に影響を与えると考えられた。

緒　言

更年期女性における頻尿や尿失禁は近年社会問題の一つとなっている。日本女性の平均寿命の伸びは著しく，今後このような症状を呈する女性患者は益々増加すると思われる。これら不安定膀胱症状を呈する患者に対し，propantheline(1)，oxybutinin(2)，terodiline(3)，propiverine(4)，といった抗コリン剤や，ephedrine(5)，といったαアドレナリン受容体刺激薬，clenbuterol(6)といったβアドレナリン受容体刺激薬が用いられてきた。しかし，抗コリン剤には口渇や便秘，αアドレナリン受容体刺激薬には高血圧や動悸，βアドレナリン受容体刺激薬には振戦といった副作用があり，新たな薬剤の開発が望まれる。

Salmonら(7)は更年期女性の尿失禁にエストロゲン投与が有効であることを示した。また，エストロゲンによりアドレナリン受容体機能が影響を受けることが示されている(8,9)。卵巣摘出後の野兎尿道のαアドレナリン受容体の感受性は低下し，エストロゲン投与後は逆に上昇する(9)。しかしながら，エストロゲンは膀胱のβアドレナリン受容体機能には影響を与えないとされてきた(8)。

βアドレナリン受容体は分子生物学的手法によりβ1，β2，β3のサブタイプに分類されている(10,11)。β3アドレナリン受容体は脂肪細胞より同定され(12)，現在では大腸(13)，回腸(14)，食道(15)，膀胱(16,17)などの平滑筋に存在することが示されている。膀胱平滑筋におけるβアドレナリン受容体の分布には種差があり，野兎ではβ2アドレナリン受容体が多く分布しているのに対し，ラットではβ3アドレナリン受容体が多く分布している(18)。一方，ヒト膀胱平滑筋ではβ1およびβ2以外のアドレナリン受容体の存在が指摘されていたが(19)，近年ヒト男性膀胱平滑筋よりβ3アドレナリン受容体mRNAの発現が示された(20)。しかしながら，女性膀胱平滑筋におけるβ3アドレナリン受容体の分布，特に閉経期における発現については殆ど知られていない。そこで我々は，雌ラットおよびヒト女性膀胱平滑筋のβ3アドレナリン受容体mR

キーワード：不安定膀胱，閉経，エストロゲン，β3アドレナリン受容体，膀胱平滑筋

NAの発現について検討した。さらに，β3アドレナリン受容体刺激薬による膀胱平滑筋弛緩反応に，エストロゲンが与える影響についても調べたので報告する。

方　法

①動物

生後11週の成熟雌Sprague-Dawleyラット20匹を用いた。sodium pentobarbital (0.5mg／kg) (Sigma, St. Louis, USA) 腹腔内注射にて麻酔後，10匹から卵巣摘出した。他の10匹には偽手術を行った。卵巣摘出一週間後，5匹にcottonseed oil (Sigma, St. Louis, USA) に溶解したβ-estradiol 17-cypionate (250mg／kg) (Sigma, St, Louis, USA) を週一回腹腔内注射した。6週間後屠殺し，膀胱を採取した（A群)。他の5匹はcottonseed oilのみを腹腔内注射した（B群)。偽手術を行った10匹にはcottonseed oilのみを腹腔内注射した（C群)。

②ヒト膀胱

神戸大学泌尿器科にて浸潤性膀胱腫瘍により根治的膀胱全摘出術を施行された78歳男性患者と60歳女性患者の膀胱より平滑筋切片（約100mg）を採取した。患者より研究目的にて膀胱組織切片を使用する許可を得た。

③RNAの抽出

定型的手技によりヒト膀胱平滑筋，ラット膀胱平滑筋，およびラット脂肪細胞より全RNAを抽出した(21)。genome DNAの混入を防ぐためDNase (Takara, Tokyo, Japan) 処理後，spectrophotometerでRNA量を測定した。

④ Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR法)

1μgのRNAに対し，0.125μM oilgo dT-adaptor primer (Takara, Tokyo, Japan), 5 mM $MgCl_2$, lxRT buffer, 1 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTP)；(dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 20 u avian myeloblastosis virus reverse transcriptaseを全量20μlとなるように用いた。ラット膀胱RNAには42℃45分。95℃5分のサイクルで逆転写させた。ヒト膀胱RNAには25℃10分，42℃45分，95℃10分のサイクルで逆転写させた。

次に，逆転写によって得られたDNAに2.5 u Taq polymerase (Takara, Tokyo, Japan), 100 pmol forward primer, 100 pmol reverse primerを用い，10 mM Tris HCI (pH.8.3), 50 mM KCI, 2.5 mM $MgCl_2$, 200 μM dNTPが含まれた溶液内で，PCR反応によってDNAを増幅させた。ラット膀胱平滑筋には，5'-TAGTCCTGGTGTGGATCGTGTCCGC-3'をforward primerに，5'-GCGATGAAAACTCCGCTGGGAACTA-3' をreverse primerとして用いた(22)。95℃30秒，66℃30秒，72℃30秒を1サイクルとする40サイクルのPCR反応を行い，DNAを増幅させた。ヒト膀胱平滑筋には，5'-GCTCCGTGGCCTCACGAGAA-3' を forward primerに，5'-CCCAACGGCCAGTGGCCAGTCAGCG-3'をreverse primerとして用いた(23)，94℃60秒，57℃90秒，72℃90秒を1サイクルとする35サイクルのPCR反応を行い，DNAを増幅させた。1.2%アガロースゲルを用い，これらDNAを電気泳動し，β3アドレナリン受容体mRNAの発現を調べた。

⑤張力測定

卵巣摘出7週間後，各群のラット膀胱より平滑筋切片を採取し，20mlのKrebs Henseleit solution; 〔(mM) NaCl 113, KCI 14.8, $CaCl_2$ 2.5, KH_2PO_4 1.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.2, $NaHCO_3$ 25, dextrose 5.6〕を満たしたorgan bath内に留置した。実験中はKrebs Henseleit solutionを37℃に保ち，95%O_2，5 %CO_2を通気した。筋切片をforce transducer (TB-611; Nihon Koden, Tokyo, Japan) に接続し，0.5gの初期張力を与え，1時間静置した。全ての測定においてαアドレナリン受容体の影響を防ぐため，10^{-6}Mのphentolamine (Sigma, St. Louis, USA) をorgan bath内に投与した。3 x 10^{-7}Mのcarbachol (Sigma, St.Louis, USA) を投与し，筋切片の収縮が平衡状態となった後，βアドレナリン受容体刺激薬をorgan bath内に累積的に投与し，弛緩反応を調べた。

非選択的βアドレナリン受容体刺激薬であるisoproterenol (Sigma, St.Louis, USA) による弛緩反応を調べた。次に，β1およびβ2アドレナリン受容体遮断薬である10^{-7}Mのpropranolol (Sigma, St.Louis, USA) 存在下で，選択的β3アドレナリン受容体刺激薬であるBRL37344 (Tocris, Ballwin, USA) による弛緩反応を調べた。統計学的検討にはMann-WhitneyのU検定を用いた。$P<0.05$を有意とした。

結　果

①β3アドレナリン受容体mRNAの発現

RT-PCR反応によって，雌ラット膀胱平滑筋にβ3アドレナリン受容体mRNAの発現が認められた（図1)。ラット脂肪細胞 (lane2)，雌ラット平滑筋細胞

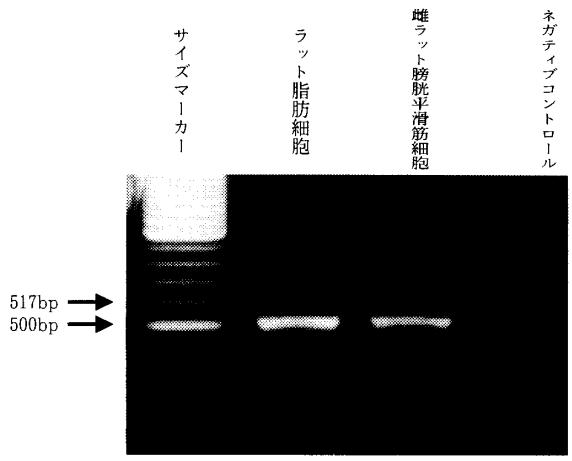


図1　雌ラット膀胱平滑筋細胞のβ3アドレナリン受容体mRNAの発現

RT-PCRにより増幅されたDNAを電気泳動した。lane1: サイズマーカー，lane2: 雌ラット脂肪細胞，lane3: 雌ラット膀胱平滑筋細胞，lane4: negative control。

(lane3)に517bpのバンドが認められた。

また，根知的膀胱全摘出術によって得られた閉経期女性の膀胱平滑筋においても，β3アドレナリン受容体mRNAの発現が認められた(図2)。ヒト女性膀胱平滑筋細胞（lane2），ヒト男性膀胱平滑筋細胞(lane3) に314bpのバンドが認められた。

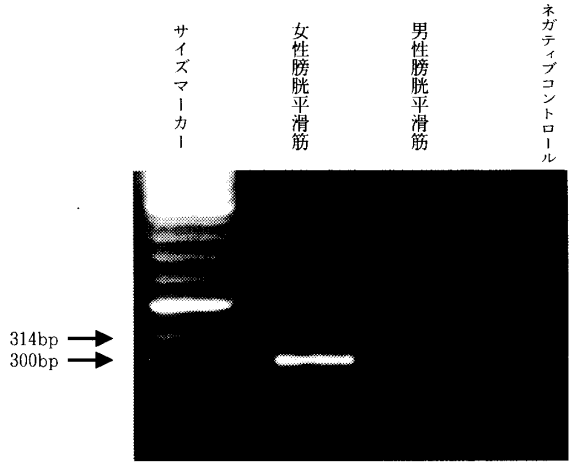


図2　閉経期女性膀胱平滑筋細胞のβ3アドレナリン受容体mRNAの発現

RT-PCRにより増幅されたDNAを電気泳動した。lane1: サイズマーカー，lane2: 閉経期女性の膀胱平滑筋細胞，lane3: 男性の膀胱平滑筋細胞，lane4: negative control。

②ラット膀胱に対する非選択的βアドレナリン受容体刺激薬および選択的β3アドレナリン受容体刺激薬の効果

非選択的βアドレナリン受容体刺激薬であるisoproterenolおよび選択的β3アドレナリン受容体刺激薬であるBRL37344のいずれもcarbacholによって収縮した膀胱平滑筋を濃度依存的に弛緩させた。(図3，4)。isoproterenolの弛緩作用はA,B,C群の間に有意差は認められなかった（図3)。各群のisoproterenolのEC50値は有意差が認められなかった（表1)。

BRL37344の弛緩作用はB群がA,C群と較べ有意に高かった（図4)。各群のBRL37344のEC50値は，B群がA,C群に較べ有意に低かった（表1)。

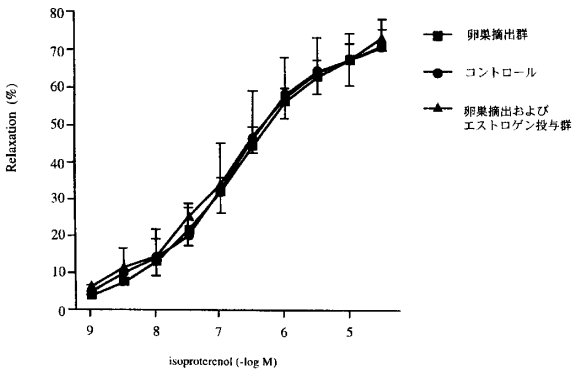


図3　非選択的βアドレナリン受容体刺激薬isoproterenolによるラット膀胱のdose-response curve

A群：卵巣摘出およびエストロゲン補充ラット，B群：卵巣摘出ラット，C群：コントロール。

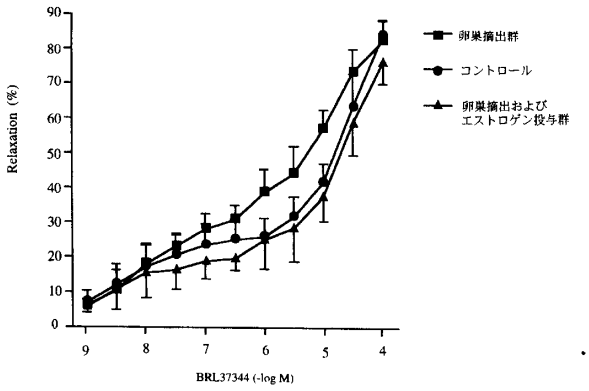


図4　選択的β3アドレナリン受容体刺激薬BRL37344によるラット膀胱のdose-response curve

A群：卵巣摘出およびエストロゲン補充ラット，B群：卵巣摘出ラット，C群：コントロール。

表1　βアドレナリン受容体刺激薬のEC50値

	Isoproterenol(M)	BRL37344(M)	
卵巣摘出群	$(5.58\pm2.08)\times10^{-7}$	$(5.76\pm2.96)\times10^{-6}$	*
卵巣およびエストロゲン投与群	$(4.54\pm2.01)\times10^{-7}$	$(2.12\pm0.84)\times10^{-5}$	*
コントロール	$(3.62\pm2.81)\times10^{-7}$	$(1.73\pm0.95)\times10^{-5}$	

＊卵巣摘出群とエストロゲン投与群，コントロールの値には有意差が認められる（$P<0.01$）

考　察

更年期女性の30%が頻尿や尿失禁といった不安定膀胱症状を呈するといわれている。これら症状に対して抗ムスカリン薬が有効であるという報告がある(24)。しかしながら，抗ムスカリン薬は口渇，便秘などの抗コリン作用による副作用がある(24)。この様な副作用のない薬剤こそが不安定膀胱症状のある更年期女性のQOLの向上を導くと思われる。

野兎およびヒト膀胱平滑筋βアドレナリン受容体には，β1およびβ2のサブタイプがあるとされてきた(25)。その後，β3アドレナリン受容体がクローニングされ，ラットおよびヒトの膀胱平滑筋にβ3アドレナリン受容体mRNAの発現が認められた(20)。β3アドレナリン受容体刺激による膀胱平滑筋の弛緩作用は，雄ラットやヒト男性においてはβ1およびβ2アドレナリン受容体刺激による弛緩作用を上回っているとの報告もある(20)。しかし，雌ラットやヒト女性におけるβ3アドレナリン受容体の機能についての報告は今までなされていない。今回我々は初めてRT-PCRにより，雌ラットおよび閉経期女性の膀胱平滑筋のβ3アドレナリン受容体mRNAの発現を示した。

次に，我々は雌ラットを用い，体内エストロゲンレベルの変化がβアドレナリン受容体刺激による膀胱平滑筋の弛緩反応に与える影響について調べた。A群は女性ホルモン補充療法（HRT）を施行された閉経期女性のモデルとして用いた。B群はHRTを施行されていない閉経期女性のモデル，C群はコントロールとして用いた。ATP，carbachol，KClによる膀胱平滑筋の収縮反応は，卵巣摘出後2カ月では変化がないが，4カ月後には有意に低下する(26)。そのため，我々は卵巣摘出後7週の雌ラット膀胱を用いた。

各群のラット膀胱は，非選択的βアドレナリン受容体刺激薬であるisoproterenolではほぼ同様のdose-response curveを示した。一方，選択的β3アドレナリン受容体刺激薬であるBRL37344では，B群のラット膀胱の弛緩反応が有意に高かった。卵巣摘出後，エストロゲン投与されたラット（A群）の膀胱のBRL37344に対する弛緩反応は，コントロール群（C群）の弛緩反応とほぼ同様であった。以上のことから，膀胱平滑筋に対する選択的β3アドレナリン受容体刺激薬の効果は，エストロゲンによって影響を受けていると思われた。BRL37344は，主にGs蛋白を介したcyclic AMP依存的なメカニズムによって膀胱平滑筋を弛緩させているとされている(27)。今後，cyclic AMPを介したβ3アドレナリン受容体刺激による膀胱平滑筋の弛緩反応と体内のエストロゲンレベルの関係に関する研究が必要となると思われる。

β3アドレナリン受容体はヒトの脂肪細胞，血管平滑筋，消化器の平滑筋などに分布するが，呼吸器系の器官平滑筋にはβ3アドレナリン受容体の分布の報告はないことから，β3アドレナリン受容体刺激薬はβ1およびβ2アドレナリン受容体刺激薬や非選択的βアドレナリン受容体刺激薬と較べ，呼吸器系の副作用は殆どないと思われる。

今後，体内エストロゲンレベルの低下によるβ3アドレナリン受容体の機能変化と更年期女性の膀胱機能への影響について，さらに詳細に調べることが必要であると思われる。

謝　辞

この研究においてこれまで御支援，御指導いただきました神戸大学医学部薬理学教室ならびに同泌尿器科学教室の諸先生方に深謝致します。

文　献

1. Beck, R, P., Amusch, D, King, C.: Results in treating 210 patients with detrusor overactivity incontinence of urine. Am.j.Obster, Gynecol. 125:593-596, 1976.
2. Hooper, P., Tincello, D.G., Richmond, D.H.: The use of salivary stimulant pastilles to improve compliance in woman taking oxybutinin hydrochloride for detrusor instability; a pilot study.

Br.J.Urol. 80:414-416, 1997.

3. Gerstenberg, T.C., Klarskov, P., Ramire, D., Hald, T.: Terodiline in the treatrment of women with urgebcy and motor urge incontinence. Br.J.Urol. 58:129-133, 1986.
4. Mazur, D., Wehnert, J., Dorschner, W., Schubert, G., Herfurth, G., Alken, R.G.: Clinical and urodynamic of propiverine in patients suffering from urgency and utge incontinece. a multiventre dose-optimizing study. Scand.J.Urol.Nephrol. 29:289-294, 1995.
5. Castleden, C.M., Duffin, H.M., Briggs, R.S., Ogden, B.M.: Clilical and urodynamic effects of ephedrine in incontinent patients.J.Urol. 128:1250-1252, 1982.
6. Yamanishi T.Yasuda, K., Nagashima, K, Murayama, N., Tojo, M., Shimazaki, J.: Clinical effects of clenbuterol-HCI in urge incontinenve and stress incontinece.Acta Urol.Jpn. 36:207-211, 1990.
7. Salmon, U.J., Walter, R.I., Geist S.H.: The use of estrogens in the treatment of dysuria and incontinence postmenopausal women. Am.J.Obstet, Gynecol. 42:845-851, 1941.
8. Levin.R.M., Shofer, F.S., Wein, A.J.: Esrogen-induced alterations in the autonomic responses of the rabbit urinary bladder. J. Pharmacol. Exp. Ther. 215:614-618, 1980.
9. Hodgson, B.J., Dumas, S., Bolling, D.R., Heesch, C.M.: Effect of estrogen on sensitivity of eabbit bladder and urethra, to phenylephrine. Invest. Urol. 16 : 67-69, 1978.
10. Emorine, L.J., Marullo, S.Marie-M., Briend-S., Patey, G., Tate, K., Klutchko, C.J., Stroberg., A.D.: Molecular characterization of the human 3-adrenergic receptor. Science 245:1118-1121, 1989.
11. Granneman, J.G., Lahners, K.N., Chaudhry, A.: Molecular cloning and expression of the rat 3-adrenergic receptor. Mol. Pharmacol. 40:895-899, 1991.
12. Wilson, C., Wilson, S., Piercy, V., Sennitt, M.V., J.R.S.: The rat lipolytic -adrenoceptor: studies using novel -adrenoceptor agonists. Eur. J.Pharmacol. 100:309-319, 1984.
13. McLaughlin D.P., Macdonald, A.: Evidence for existence of 'atypical' -adrenoceptors (3-adrenoceptors) mediating in the rat distal colon in vitro. Br. J. Pharmacol. 101:569-574, 1990.
14. Growcott, J.W., Hollyway, B., Green, M.Wilson, C.: Zeneca ZD7114 acts as an antagonist at 3-adrenoceptors in rat isolated ileum. Br. J. Pharmacol. 110 : 1375-1380, 1993.
15. Lezama, E.J., Konkar, A.A., Bookaman, M.M.S., Miller, D.D., Feller, D.R.: Pharmacological study of atypical -adrenoceptors in rat esophageal smooth muscle.Eur.J.Pharmacol. 308:69-80, 1996.
16. Oshita, M., Hiraoka, Y., Watanabe, Y,: Characterization of -adrenoceptors in urinary bladder: comparison between rat and rabbit.Br.J.Pharmacol. 122:1720-1724, 1997.
17. Seguchi, H., Nishimura, J.Zhou, Y., Niiro, N., Kumazawa, J., Kanaide, H.: Expression of 3-adrenoceptors in rat detrusor smooth muscle. J. Urol. 159:2197-2201, 1998.
18. Yamazaki, Y., Takeda , H., Akahane, M.Igawa, Y., Nishizawa, O., Ajisawa, Y.: Species differences in the distribution of -adrenoceptor subtypes in bladder smooth muscle.Br, J.Pharmacol. 124:593-599, 1998.
19. Larsen, J.J.: -and -adreniceptors in the detrusor muscle and bladder base of the pig and -adrenoceptors in the detrusor muscleof man. Br. J. Pharmacol. 65:215-222, 1979.
20. Fujimura, T., Tamura, K., Tsutsumi, T., Yamamoto, T., Nakamura, K., Koibuchi, Y., Kobayashi, M., Yamaguchi, O.: Expression and possible functional role of the 3-adrenoceptor in human and rat detrusor muscle. J.Urol. 161:680-685, 1999.

21. Chomczynsky, P., Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem, 162:156-159, 1987.
22. Evans, B.A., Papaioannou, M.Bonazzi, V.R., Summers, R.J.: Expression of 3-adrenoceptor mRNA in rat tissues. Br.J.Pharmacol. 117:210-216, 1996.
23. Klief, S., Lonnqvist, F., Raimbault, S., Baude, B., Van-Spronsen, A., Arner, P., Strosberg, A.D., Ricquier, D., Emorine, L.J.: Tissue, distribution of 3-adrenergic receptor mRNA in man. J.Clin.invest. 91:344-349, 1993.
24. Yarker, Y.E., Goa, K.L., Fitton, A.: Oxybutynin.: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic use indetrusor instability. Drugs Aging 6:243-262, 1995.
25. Levin, R.M., Ruggieri, M.R., Wein, A.J.: Identification of receptor subtypes in the rabbit and human urinary by selective radio-ligand binding.J.Urol. 139:844-848, 1988.
26. Longhurst, P.A., Kauer, J., Leggett, R.E., Levin, R.M.: The influence of ovariectomy and estradiol replacement on urinary bladder function in rats.J. Urol. 148:915-919, 1992.
27. Murphy, G.J., Kirkham, D.M., Cawthorne, M.A., Young, P.: Correlation of b3-adrenoceptor-induced activation of cyclic AMP-dependent protein kinase with activation of lipolysis in rat white adipocytes. Biochem. Pharmacol. 46:575-581, 1993.

Ovariectomy enhances β_3-adrenoceptor-mediated relaxation of the detrusor muscle

Shigeji Matsubara[1], Hiroshi Okada[1]
Sadao Kamidono[1], Takayoshi Kuno[2]

[1] Department of Urology, Kobe University School of Medicine

[2] Depaetment of Pharmacology, Kobe University School of Medicine

ABSTRACT

Oestrogen replacement somerimes benefits postmenopausal women with urinary frequency or incontinence. To better understand postmenopausal bladder function, particularly adenergic aspects, we first performed a reverse transcription polymerase chain reaction that demonstrated mRNA encoding the β_3-adrenoceptor (AR) to be present in bladder smooth muscle from female rats and from a cystectomy specimen from postmenopausal woman. We then performed pharmacologic studies with a force transducer in bladder smooth muscle prpartions from female rats with and without ovariectomy performed 6 weeks previously. A nonselective -AR agonist dose-dependently relaxed precontracted detrusor muscle irrespective of ovariectomy or oestrogen replacement, while a selective β_3-AR agonist relaxed detrusor muscle more in ovariectomised rats than ovariectomused rats with oestrogen replacement or control rats. Such selective β_3-agonists may have therapeutic benefit for unstable bladder in postmenopausal women not receiving hormonal replacement.