膀胱平滑筋に対するボンベシンおよび GRP (Gastrin Releasing Peptide) 関連ペプチドの収縮作用

名古屋大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 三宅弘治教授)

後藤 百万 斎藤 政彦 加藤久美子 近藤 厚生

CONTRACTILE EFFECT OF BOMBESIN AND GRP (GASTRIN RELEASING PEPTIDE) RELATED PEPTIDES ON BLADDER SMOOTH MUSCLE

Momokazu Gotoh, Masahiko Saito, Kumiko Kato and Atsuo Kondo

Department of Urology, Nagoya University School of Medicine

(Director: Prof. K. Miyake)

The contractile effects and the mode of action of GRP (Gastrin Releasing Peptide)-related peptides and bombesin on the smooth muscle of the guinea-pig urinary bladder were studied *in vitro*. GRP₁₋₂₇, and two different carboxyl terminal fragments of GRP₁₋₂₇ (GRP₁₄₋₂₇ and GRP₁₈₋₂₇) caused dose-dependent contractions of the preparations with equal potency. Bombesin similarly caused dose-dependent contractions of the strips, but appeared to be more potent than the GRP-related peptides. An amino terminal fragment of GRP₁₋₂₇ (GRP₁₋₁₄), however, did not exhibit any contractile activity on the detrusor smooth muscle. The GRP₁₈₋₂₇-induced contraction was not affected by pretreatment with phentolamine, propranolol, atropine, tetrodotoxin, hexamethonium or hemicholinium-3. It is suggested that the GRP-related peptides as well as bombesin have contractile effects on the detrusor smooth muscle, and that the carboxyl terminal decapeptides (GRP₁₈₋₂₇) may be the minimal length of peptides essential for the contractile activity. It has been also demonstrated that the contractile effects of the GRP-related peptides are independent of nervous activity and not mediated through adrenergic nor cholinergic receptors, possibly directly acting on the detrusor smooth muscle cells.

要旨: モルモット膀胱体部より採取した平滑筋筋条片を用い, ボンベシンおよび GRP (Gastrin Releasing Peptide) 関連ペプチドの膀胱に対する収縮作用を, *in vitro* にて検討した。GRP₁₋₂₇ および 2 種の C 末端フラグメント GRP₁₄₋₂₇, GRP₁₈₋₂₇ は, 同程度の強さで, 筋条片の用量依存性の収縮を惹起した。しかし, GRP₁₋₂₇ の N 末端フラグメント GRP₁₋₁₄ はまったく筋条片の収縮を引き起こさなかった。ボンベシンも用量依存性の収縮を惹起したが, GRP 関連ペプチドよりやや強力であった。GRP₁₈₋₂₇ により惹起される収縮は, 筋条片の phentolamine, propranolol, atropine, tetrodotoxin, hexamethonium, hemicholinium-3 による前処置によりまったく抑制されなかった。

以上の結果より, GRP 関連ペプチドはボンベシンと同様, 膀胱平滑筋の収縮作用を有し, C 末端デカペプチド GRP₁₈₋₂₇ がこの作用に必要な最小ペプチド鎖であることが示唆された。また, この収縮作用は神経活動やアドレナリン, コリン作動性レセプターを介さず, 筋細胞への直接作用によることが示された。

緒 言

ボンベシンは1971年 Bombina Bombina (カエル) の皮膚から単離されたテトラデカペプチドアミド構造を有する活性ペプチドである¹⁾。また, 近年ブタ消化管より単離されたガストリン放出ペプチド (GRP) は27 アミノ酸残基よりなるポリペプチドであり²⁾, その C

端デカペプチド配列は, 1 アミノ酸残基を除きカエルボンベシンと一致するものである³⁾ (Fig. 1)。GRP は種々の哺乳動物の消化管や中枢神経組織に存在することが示され⁴⁾, さらにヒト胎児肺に極めて高濃度に含まれることが報告されている⁵⁾。ボンベシンと同様, ガストリン, コレシストキニン, 膵ホルモンなどのホル

Fig. 1 Structures of porcine GRP and bombesin.

GRP (Porcine)

1
Ala-Pro-Val-Ser-Val-Gly-Gly-Gly-Thr-Val-Leu-Ala-Lys-
14 18 27
Met-Tyr-Pro-Arg-Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂

Bombesin

Glu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂

モン分泌刺激作用等、種々の生物活性が認められている⁴⁾。ボンベシンは、ネコ小腸、モルモット回腸、ラット結腸、子宮等の平滑筋を収縮させることも知られている⁵⁾。尿路平滑筋に関しては、Abdel-Hakim ら⁷⁾および Mizrahi ら⁸⁾がボンベシンの膀胱平滑筋収縮作用を報告しているが、GRP についての報告は見られない。今回我々は、モルモット膀胱平滑筋を用い、ボンベシンおよび種々の GRP 関連ペプチドの収縮作用とその作用機序について in vitro にて検討した。

方 法

雌モルモット (150~200g) を頸部叩打および脱血により屠殺後、直ちに膀胱を摘出した。膀胱体部より長さ1cm、幅0.3cmの筋条片を作成し、2mlの Krebs 液 (NaCl 119, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 25, Glucose 11 m M) を満たした実験浴槽内に懸垂した。筋条片の一端は糸にて Grass FTO3 force displacement transducer に接続し、筋条片の等長張力変化を Grass 79D polygraph にて記録した。1g の一定張力を付加し、60分放置後実験を開始した。なお、浴槽内溶液は常時37℃に保ち、95% O₂, 5% CO₂ にて通気した。

(1) 筋条片を懸垂した Krebs 液中に、GRP₁₋₂₇, GRP₁₄₋₂₇, GRP₁₈₋₂₇, GRP₁₋₁₄, あるいは Bombesin を、10⁻¹¹ から 10⁻⁵ M の濃度で、cumulative に添加し、筋条片の等長張力変化を記録した。

(2) Krebs 液中に GRP₁₈₋₂₇ (10⁻⁶ M) を添加し、5分間筋条片の収縮を観察後筋条片を洗浄した。30分の equilibration 後、筋条片を phentolamine, propranolol, atropine, tetrodotoxin, hexamethonium あるいは hemicholinium-3 で前処置し、5分後 (phentolamine, propranolol, atropine) または15分後 (tetrodotoxin, hexamethonium, hemicholinium-3), 同様の濃度で GRP₁₈₋₂₇ を加え、筋条片の収縮を観察した。なお、各々の実験には、最低8筋条片を用い

た。

本実験では、薬剤として phentolamine (CIBA), propranolol (Ayerst), atropine (IMS), hemicholinium-3 (Sigma), hexamethonium (Sigma), tetrodotoxin (Sigma) を用いた。また、ペプチドとして、合成 GRP₁₋₂₇, GRP₁₋₁₄, GRP₁₄₋₂₇, およびボンベシン (Peninsula Laboratories Inc., USA) を使用した。GRP₁₈₋₂₇ は、GRP₁₋₂₇ のトリプシン消化により Endocrine Lab., Royal Victoria Hospital, McGill Univ. (Canada) にて作製されたものを使用した。使用薬剤は使用直前に希釈、調整して用いた。また、記載された薬剤濃度は浴槽内での最終濃度を示す。統計学的検討は Student's t-test にて行った。

結 果

Krebs 液中で GRP₁₋₂₇, GRP₁₄₋₂₇, GRP₁₈₋₂₇ およびボンベシンは、膀胱筋条片の収縮を惹起した。Fig. 2 に、GRP₁₈₋₂₇ による筋条片収縮の典型的なトレーシングを示す。収縮の開始は比較的速やかで、約2分後には急速に収縮が減弱するが、似後30分以上持続した。また、GRP 添加により自発収縮活動の増大も認められた。GRP₁₋₂₇, GRP₁₄₋₂₇ さらにボンベシンに関してもまったく同様の反応がみられたが、GRP₁₋₁₄ はまったく収縮反応を惹起し得なかった。Fig. 3 は 10⁻¹⁰ から 10⁻⁵ M の濃度での、GRP₁₋₂₇, GRP₁₄₋₂₇, GRP₁₈₋₂₇ およびボンベシンの cumulative な添加に対する筋条片収縮の dose-response curves である。GRP₁₋₂₇, GRP₁₄₋₂₇ および GRP₁₈₋₂₇ は筋条片の用量依存性収縮を惹起し、最大収縮の大きさ (efficacy) および potency

Fig. 2 A tracing showing a contraction of detrusor muscle strip induced by GRP₁₈₋₂₇ (10⁻⁶ M)

Fig. 3 Dose-response curves of detrusor muscle strips in response to bombesin, GRP₁₋₂₇, GRP₁₄₋₂₇ and GRP₁₈₋₂₇. Curves represent Mean±S.E. responses from 8 strips.

Table 1 Antagonistic Effects of Various Drugs on GRP₁₈₋₂₇-induced Contraction

Drugs	Control (%)	After pretreatment with antagonist (10 ⁻⁶ M) (% of control)
atropine	100	107 ± 5
propranolol	100	99 ± 5
phentolamine	100	96 ± 3
hemicholinium-3	100	100 ± 3
hexamethonium	100	91 ± 4
tetrodotoxin	100	101 ± 3

(Mean±SE)

において有意な差を認めなかった: PD₂ (-log ED₅₀)=GRP₁₋₂₇; 7.3, GRP₁₄₋₂₇; 7.3, GRP₁₈₋₂₇; 7.45). ボンベシンは同様に, 筋条片の用量依存性収縮を惹起し, 最大収縮の大きさについては GRP 関連ペプチドに比べ有意の差を示さなかったが, potency はより強力な傾向を示した (PD₂=8.0). 他方, GRP₁₋₁₄ はいずれの濃度においても収縮作用を示さなかった.

Table 1 に, 種々の薬剤による筋条片前処置の, GRP₁₈₋₂₇ 収縮に対する作用を示す. 表に示すごとく, atropine, propranolol, phentolamine, hemicholinium-3, hexamethonium, tetrodotoxin による筋条片の前処置は, GRP₁₈₋₂₇ 収縮をまったく抑制し得な

かった. また, 他の GRP フラグメントについても同様の結果であった.

考 察

骨盤神経刺激による膀胱収縮はアトロピンにより完全には抑制されず⁹⁾, このアトロピン抵抗性収縮に関与する伝達物質として, プロスタグランディン E₂, F₂ α¹⁰⁾, プロスタサイクリン¹¹⁾, ヒスタミン¹²⁾, ATP¹³⁾, セロトニン¹⁴⁾等の関与が推定されている. 消化管平滑筋においては, 多種のペプチドニューロンの存在が認められているが, 近年尿管, 膀胱, 尿道等の下部尿路平滑筋においても種々の神経ペプチドの伝達物質としての役割が注目されるようになってきた. 免疫組織化学的に, モルモット, ネコ, ラット等の下部尿路組織において, VIP¹⁵⁾¹⁶⁾, enkephalin¹⁷⁾, substance P¹⁸⁾, somatostatin¹⁹⁾様の免疫活性が報告されている. Hökfelt¹⁹⁾はモルモット膀胱で, これらすべてのペプチド神経線維の局在を示し, 上皮層に substance P 陽性神経線維, 上皮下固有層と平滑筋層に VIP, substance P, somatostatin, enkephalin 陽性神経線維が存在することを免疫組織化学的に証明した. これらのペプチドの下部尿路における生理的意義はまだ明らかではないが, 近年尿路平滑筋収縮活動に対する作用が報告されるようになった. Klarskov ら²⁰⁾はヒトおよびブタの膀胱体部, 三角部, 頸部, 尿道より採取した筋条片で, VIP がトームスおよび自発収縮活動を低下させることを示した. また Sjögren ら²¹⁾は, 家兎膀胱および尿道の筋条片において, VIP が電気刺激, アセチルコリン (膀胱) およびノルアドレナリン (尿道) による収縮を抑制することを報告している. Substance P は, ラット膀胱筋条片で, 電気刺激による収縮のうち, アトロピン抵抗性のものを抑制することが示され²²⁾, Enkephalin に関しても, ヒト, ブタ膀胱平滑筋のアトロピン抵抗性収縮を抑制することが報告されている²³⁾. 以上のごとき事実にもとづき, これらのペプチドは神経ペプチドとして, 下部尿路の収縮活動調節に関与することが推定されている.

本実験の結果より, GRP 関連ペプチドはボンベシンと同様, モルモット膀胱平滑筋の収縮作用を有することが示された. 平滑筋収縮作用に関しては, ボンベシンはネコ小腸, モルモット回腸, ラット結腸, ラット子宮等の平滑筋を収縮させることが知られている⁶⁾. 尿路平滑筋では, ラットおよびモルモット膀胱平滑筋に対するボンベシンの収縮作用が報告されているが⁷⁾⁸⁾, GRP に関しての報告は見られず, 我々の報告が

初めてのものと思われる。Abdel-Hakim ら⁷⁾は、ボンベシンのラット膀胱平滑筋収縮作用は、adrenergic, cholinergic レセプター、あるいは神経活動を介せず、平滑筋細胞への直接作用によることを示した。我々の実験において GRP 関連ペプチドによる収縮は、phentolamine, propranolol, atropine, tetrodotoxin, hexamethonium, さらに hemicholinium-3 により抑制されず、GRP 関連ペプチドも同様に膀胱平滑筋細胞に直接作用をおよぼすことが明らかとなった。

ボンベシンと GRP 関連ペプチドの最大収縮効果 (efficacy) は有意差を示さなかったが、potency に関してはボンベシンでは PD_2 8.0, GRP 関連ペプチドでは PD_2 7.3~7.45 とボンベシンがやや強力であった。Abdel-Hakim⁷⁾の報告では、ラット膀胱平滑筋収縮作用においてボンベシンの PD_2 は 7.63 と我々の報告と類似している。さらに彼等は、ボンベシンの efficacy はカルバコールの約 1/4 と弱いものの、potency においてはカルバコール (PD_2 : 5.8) に比べ有意に強力であることを示した。すなわち、ボンベシンは最大収縮効果ではカルバコールより弱い、閾値濃度においてはより低濃度であることが示唆された。

GRP 関連ペプチド間 (GRP₁₋₂₇, GRP₁₄₋₂₇, GRP₁₈₋₂₇) では、収縮効果において efficacy, potency に有意な差は認められなかったが、GRP₁₋₁₄ はまったく収縮作用を示さなかった。ブタ GRP₁₋₂₇ のトリプシン消化により GRP₁₈₋₂₇ が得られることより⁵⁾、GRP の C 端フラグメント GRP₁₈₋₂₇ が収縮作用に関与する最小ペプチド鎖であろうと推察された。

ボンベシン、GRP 様免疫活性は種々の動物において、主に消化管や脳組織に検出され⁴⁾、またヒト胎児肺抽出物より極めて高濃度の GRP が分離されており⁵⁾、これらのペプチドの分布の多彩さが確認されている。しかしながら、これらのペプチドの下部尿路組織における局在についての報告は未だみられない。

従来報告されている VIP, Substance P, Enkephalin 等のペプチドの、膀胱収縮への作用は抑制的であるのに対し、GRP およびボンベシンが収縮作用を有することは極めて興味深い。膀胱平滑筋に対するボンベシン、GRP 関連ペプチドの収縮作用の生理的意義は未だ不明であるが、今後の研究でこれらのペプチドの局在が下部尿路で証明されれば、伝達物質としての生理的役割に関する興味ある研究の展開がみられよう。

結 語

モルモット膀胱体部より得た平滑筋筋条片を用い、

ボンベシンおよび GRP 関連ペプチドの膀胱に対する収縮作用を in vitro にて検討し、以下の結果を得た。

(1) ボンベシンおよび GRP 関連ペプチドは膀胱平滑筋筋条片の、開始が速く、30分以上持続する収縮を惹起した。

(2) ボンベシン、GRP₁₋₂₇ および 2 種の C 末端フラグメント GRP₁₄₋₂₇, GRP₁₈₋₂₇ は 10^{-11} から 10^{-5} M の濃度で筋条片の用量依存性の収縮を惹起した。

(3) GRP₁₋₂₇, GRP₁₄₋₂₇, GRP₁₈₋₂₇ は同程度の強さの収縮作用を示したが、GRP₁₋₁₄ はまったく収縮作用を示さなかった。ボンベシンの収縮作用は GRP 関連ペプチドに比べやや強力であった。

(4) GRP₁₈₋₂₇ により惹起される収縮は、筋条片の phentolamine, propranolol, atropine, tetrodotoxin, hexamethonium, hemicholinium-3 による前処置により抑制されなかった。

以上の結果より、GRP 関連ペプチドはボンベシンと同様、膀胱平滑筋収縮作用を有し、C 末端デカペプチド GRP₁₈₋₂₇ が作用発現に必要な最小ペプチド鎖であることが示唆され、またこの作用は神経活動やアドレナリン、コリン作動性レセプターを介さない平滑筋細胞への直接作用によることが示された。

稿を終えるにあたり、種々の御教示、御協力をいただいた高井一郎博士 (京都大学医学部産婦人科学教室)、Prof. M. M. Elhilali (Dept. of Urology, Royal Victoria Hospital, McGill University, Montreal) さらに Prof. S. Solomon (Endocrine Laboratory, Royal Victoria Hospital, McGill University, Montreal) に心から感謝の意を表します。

本論文の要旨は第29回日本平滑筋学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Anastasi, A., Ersparmer, V. and Bucci, M.: Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous peptides from the skin of the european amphibians bombina and alytes. *Experimentia*, 27, 166—171, 1971.
- 2) McDonald, T.J., Nilsson, G. and Vagne, M.: A gastrin releasing peptide from the porcine non-antral gastric tissue. *Gut*, 19, 767—774, 1978.
- 3) McDonald, T.J., Jorvall, H. and Nilsson, G.: Characterization of a gastrin releasing peptides from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 90, 227—233, 1979.
- 4) 矢内原昇, 山下裕一, 印久保正士, 岩原邦宏: ボン

- ベンシンとガストリン放出ペプチド, 日本臨床, 40, 114—120, 1982.
- 5) Yoshizaki, K., Bock, V. and Solomon, S.: Origin of bombesin-like peptides in human fetal lung. *Life Science*, 34, 835—843, 1984.
 - 6) Erspamer, V., Erspamer, G.F. and Inselvini, M.: Occurrence of bombesin and alytesin in extracts of the skin of three european discoglossid frogs and pharmacological actions of bombesin on extravascular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 45, 333—348, 1972.
 - 7) Abdel-Hakim, A., Rioux, F. and Elhilali, M.M.: The contractile effect of bombesin on the rat isolated urinary bladder. *Europ. J. Pharmacol.*, 70, 167—173, 1981.
 - 8) Mizrahi, J., Dion, S., D'orleans-Juste, D. and Regoli, D.: Activities and antagonism of bombesin on urinary smooth muscle. *Europ. J. Pharmacol.*, 111, 339—345, 1985.
 - 9) Dumsday, B.: Atropine-resistance of the urinary bladder innervation. *J. Pharm. Pharmacol.*, 23, 222—235, 1971.
 - 10) Abram, P.H. and Feneley, R.C.L.: The actions of prostaglandins on the smooth muscle of the human urinary tract in vitro. *Br. J. Urol.*, 47, 909—915, 1976.
 - 11) Gotoh, M., Hassouna, M. and Elhilali, M.M.: Mode of action of prostaglandin E_2 , F_2 -alpha and prostacyclin on the vesourethral smooth muscle. *J. Urol.*, 135, 431—437, 1986.
 - 12) Khanna, O.P., DeGregorio, G.J., Sample, K.G. and McMichael, R.F.: Histamine receptors in urethrovesical smooth muscle. *Urology*, 10, 375—381, 1977.
 - 13) Burnstock, G., Dumsday, B. and Smythe, A.: Atropin-resistant excitation of the urinary bladder: The possibility of transmission via nervous releasing a purine nucleotide. *Br. J. Pharmacol.*, 44, 451—461, 1972.
 - 14) Samm, W.R. and DeGroat, W.C.: The actions of 5-hydroxytryptamine on the urinary bladder and on vesical autonomic ganglia in the cat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 185, 70—77, 1973.
 - 15) Alm, P., Alumets, J., Hakanson, R. and Sundler, F.: Peptidergic (Vasoactive Intestinal Polypeptide) nerves in the genitourinary tract. *Neuroscience*, 2, 751—754, 1977.
 - 16) Alm, P., Alumets, J., Hakanson, R., Owman, Ch., Sjoberg, N.O., Sundler, F. and Walles, B.: Origin and distribution of VIP (Vasoactive Intestinal Polypeptide) nerves in the genitourinary tract. *Cell Tissue Res.*, 205, 337—347, 1980.
 - 17) Alm, P., Almets, J., Hakanson, R., Owman, Ch., Sjoberg, N.O., Stjernquist, M. and Sundler, F.: Enkephalin-immunoreactive nerve fibers in the feline genito-urinary tract. *Histochemistry*, 72, 351—355, 1981.
 - 18) Alm, P., Alumets, J., Brodin, E., Hakanson, R., Nilsson, G., Sjoberg, N.O. and Sundler, F.: Peptidergic (Substance P) nerves in the genitourinary tract. *Neuroscience*, 3, 419—425, 1978.
 - 19) Hökfelt, T., Schultzberg, M., Elde, R., Nilsson, G., Terenius, L., Said, S. and Goldstein, M.: Peptide neurons in peripheral tissues including urinary tract: Immunohistochemical studies. *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 43, 79—89, 1978.
 - 20) Klarskov, P., Gerstenberg, T. and Hald, T.: Vasoactive intestinal polypeptide influence on lower urinary tract smooth muscle from human and pig. *J. Urol.*, 131, 1000—1004, 1984.
 - 21) Sjogren, C., Andersson, K.E. and Mattiasson, A.: Effects of vasoactive intestinal polypeptide on isolated urethral and urinary bladder smooth muscle from rabbit and man. *J. Urol.*, 133, 136—140, 1985.
 - 22) Dveksler, G., Gimeno, M.F. and Gimeno, A.L.: Non-cholinergic innotropic responses evoked by electric field stimulation in the isolated rat urinary bladder, possible participation of substance P. *Pharmacol. Res. Commun.*, 17, 1109—1119, 1985.
 - 23) Klarskov, P.: Enkephalin inhibits presynaptically the contractility of urinary tract smooth muscle. *Brit. J. Urol.*, 59, 31—35, 1987.

(1987年11月10日受理)