

脊髄反射を介した泌尿生殖器の機能制御  
に關与するセロトニン（5-HT）受容体と  
そのメカニズムに關する研究

2021年1月

石上 隆雄

脊髄反射を介した泌尿生殖器の機能制御  
に關与するセロトニン（5-HT）受容体と  
そのメカニズムに關する研究

筑波大学大学院  
理工情報生命学術院  
生命地球科学研究群  
生命産業科学学位プログラム  
博士（生物工学）学位論文

石上 隆雄

|   |     |
|---|-----|
| 目次  | i   |
| 略語一覧  | ii  |
| 序論  | 1   |
| 本論  | 13  |
| 第一章 雄性ラットの射精反射における末梢性のセロトニンの影響とそのメカニ<br>ズムに関する薬理学的研究                |     |
| 第一節 背景  | 14  |
| 第二節 実験項   | 17  |
| 第三節 結果  | 22  |
| 第四節 考察  | 25  |
| 第二章 新規のセロトニン 2C 受容体アゴニスト ASP2205 の雌性ラット尿道機能<br>に対する作用とそのメカニズムに関する検討 |     |
| 第一節 背景  | 41  |
| 第二節 実験項   | 44  |
| 第三節 結果  | 50  |
| 第四節 考察  | 53  |
| 総括  | 65  |
| 参考文献  | 77  |
| 謝辞  | 101 |
| 発表論文目録  | 102 |

## 略語一覽

|                  |                                   |
|------------------|-----------------------------------|
| 5-HT             | 5-Hydroxytryptamine (Serotonin)   |
| AC               | Adenylate cyclase                 |
| Accumb.          | Nucleus accumbens                 |
| ANOVA            | Analysis of variance              |
| ASP2205          | ASP2205 fumarate                  |
| BSM              | Bulbospongiosus muscle            |
| CGRP             | Calcitonin gene-related peptide   |
| CHO              | Chinese hamster ovary             |
| DGC              | Dorsal grey commissure            |
| DH               | Dorsal horn                       |
| DL               | Dorsolateral nucleus              |
| DM               | Dorsomedial nucleus               |
| DMF              | <i>N,N</i> -dimethylformamide     |
| DMSO             | Dimethyl sulfoxide                |
| EC <sub>50</sub> | Effective concentration 50        |
| ED               | Erectile dysfunction              |
| ELRs             | Ejaculation-like responses        |
| EUS              | External urethral sphincter       |
| FLIPR            | Fluorometric imaging plate reader |
| i.d.             | Intraduodenal                     |
| IML              | Intermediolateral nucleus         |
| IU               | Intraurethral                     |

|       |   |
|-------|---|
| i.p.  | Intraperitoneal                             |
| i.v.  | Intravenous                                 |
| IVP   | Intravesical pressure                       |
| LPP   | Leak point pressure                         |
| MRN   | Median raphe nucleus                        |
| MUI   | Mixed urinary incontinence                  |
| PE    | Premature ejaculation                       |
| PLC   | Phospholipase C                             |
| QoL   | Quality of life                             |
| SEG   | Spinal ejaculatory generator                |
| SEM   | Standard error of mean                      |
| SNRI  | Serotonin norepinephrine reuptake inhibitor |
| SP    | Substance P                                 |
| SPN   | Spinal parasympathetic nucleus.             |
| SSRI  | Selective serotonin reuptake inhibitor      |
| SUI   | Stress urinary incontinence                 |
| TRPV1 | Transient receptor potential vanilloid 1    |
| UCR   | Urethral closure response                   |
| UGR   | Urethrogenital reflex                       |
| UP    | Urethral pressure                           |
| UPP   | Urethral perfusion pressure                 |
| UUI   | Urge urinary incontinence                   |

## 序論

セロトニン (5-hydroxytryptamine; 5-HT) は、生体内で必須アミノ酸の一つであるトリプトファンから生合成される中枢神経系の伝達物質である。セロトニンは中枢神経のみならず末梢でも豊富に発現しており、自律神経の調節をはじめ生体における種々の生理機能の制御に関与している。例えば、セロトニンの分泌や受容体の機能の異常は、うつや不安などの精神疾患、片頭痛、さらに便秘や下痢といった消化管症状に関与することが知られている (Gershon, 2004; Gordon and Hen, 2004; Filip and Bader, 2009; Di Giovanni, 2013; Segelcke and Messlinger, 2017; Yohn et al., 2017)。

セロトニン受容体は 5-HT<sub>1</sub>~5-HT<sub>7</sub> のサブファミリーからなり、ヒトでは 13 のサブタイプが存在する (Table 1) (Hoyer et al., 1994; Barnes and Sharp, 1999; Pauwels, 2003)。例えば 5-HT<sub>1</sub> 受容体には、5-HT<sub>1A</sub>、5-HT<sub>1B</sub>、5-HT<sub>1D</sub>、5-HT<sub>1E</sub>、5-HT<sub>1F</sub> の 5 つのサブタイプがあり、いずれも G タンパク共役型受容体で、Gi/o タンパクを介して細胞内の cAMP の産生を抑制する。5-HT<sub>1A</sub> 受容体は中枢神経系に広く分布しており、受容体刺激によって抗不安や体温の低下、食欲増進などの生理作用が誘導される。一方、5-HT<sub>1B</sub> 及び 5-HT<sub>1D</sub> 受容体は、血管平滑筋にも発現が認められており、血管収縮に関与することが知られている。5-HT<sub>2</sub> 受容体には、5-HT<sub>2A</sub>、5-HT<sub>2B</sub>、及び 5-HT<sub>2C</sub> の 3 つのサブタイプがある。これら 3 つのサブタイプはいずれも Gq/11 タンパクと共役する G タンパク共役型受容体であり、受容体刺激によってホスホリパーゼ C (PLC) の活性化を介した細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を引き起こす。5-HT<sub>2A</sub> 受容体は、中枢神経の他に血管平滑筋や血小板にも発現している。5-HT<sub>2A</sub> 受容体の刺激は、神経細胞の脱分極や体温の上昇、血管収縮、血小板凝集に関与している。5-HT<sub>2B</sub> 受容体は、脳や胃底部での発現が認められ、不安や胃底部の収縮に関与する。5-HT<sub>2C</sub> 受容体は主に中枢神経系に発現し、食欲や運動量の低下、不安への関与が報告されている。また、5-HT<sub>3</sub> 受容体は 5-HT 受容体の中で唯一のイオンチャンネル型受容体であり、不安・認知といった神経系の作用以外に消化管機能

の調節にも関与している。その他、5-HT<sub>4</sub>、5-HT<sub>5</sub>、5-HT<sub>6</sub>及び5-HT<sub>7</sub>受容体は、cAMPの産生を促進もしくは抑制的に制御し、中枢の神経機能の調節や末梢において平滑筋の弛緩などに関与している (Table 1)。

近年、セロトニンが泌尿生殖器の機能の調節に関与していることが明らかにされつつある。ヨーロッパでは選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) である dapoxetine が男性の性機能障害の一つである早漏 (premature ejaculation; PE) の治療薬、またセロトニン・ノルエピネフリン再取り込み阻害薬 (SNRI) である duloxetine が下部尿路疾患の一つである腹圧性尿失禁 (stress urinary incontinence; SUI) の治療薬として承認されている。これらの薬剤はいずれも日本では未承認ではあるものの、セロトニンの再取り込み阻害作用を有する薬剤が早漏及び SUI の治療に有効であることが臨床試験で証明されている (Kerrebroeck et al., 2004; Buvat et al., 2009)。すなわち、セロトニンが泌尿生殖器の機能制御に関わっていることがすでにヒトで確認されている。

早漏は 2008 年の米国泌尿器科学会総会において「男性における性機能障害で、性交時に毎回またはほぼ毎回、女性器への男性器挿入後 1 分以内もしくは挿入前に射精してしまうこと。射精をコントロールできないことによるストレス、精神的な負担を感じていること。あるいは、性行為自体を避けていること。」と定義された (Sharlip et al., 2008)。つまり、性交時に射精をコントロールできないことによって精神的負担を感じる疾患である。原因は心因性によるものが多いとされているが、甲状腺ホルモンなどの内分泌機能異常や前立腺炎といった泌尿器疾患もリスク因子であることが示唆されている (McMahon et al., 2016)。罹患率は疾患の定義によって幅があり、罹患率が低い報告では 3% (射精潜時が 1 分未満で定義した場合)、逆に罹患率が高い報告では 83.7% (意図しない射精と定義した場合) と報告されている (Patrick et al., 2005; Pereira-Lourenço et al., 2019)。

射精には emission と呼ばれる精液の尿道内への排出、及び expulsion と呼ばれる



精液の外尿道口からの射出の 2 つのフェーズがある (Saitz and Serefoglu, 2015; Clement and Giuliano, 2016)。Emission は自律神経により制御される反射で、陰茎刺激に伴う求心性の陰部神経の興奮が胸腰髄 (T10-L2) に伝わり、興奮が閾値に達すると腰髄 (L3-L4) の脊髓射精中枢 (spinal ejaculatory generator; SEG) を介した遠心性の下腹神経 (交感神経) の興奮によって、精巣上体、精管、精嚢、前立腺の活動が促進されることにより誘導される。Expulsion は体性神経を介する反射で、陰茎刺激及び尿道内圧の上昇に伴う求心性の陰部神経・骨盤神経の興奮が脊髄にもたらされ、SEG における反射を介して仙髄 (S2-S4) から伸びる陰部神経の運動ニューロンが活性化し、球海綿体筋を含む会陰筋群が律動的に収縮することで最終的に精液が体外へ射出される。上位中枢である脳は、通常は脊髄の SEG における一連の射精反射を抑制的に制御している (Fig. 1)。

セロトニンは、主に中枢神経系において 5-HT<sub>1A</sub>、5-HT<sub>1B</sub> 及び 5-HT<sub>2C</sub> 受容体を介して射精反射を制御することが知られている (Giuliano and Clement, 2005)。脳及び脊髄において 5-HT<sub>1A</sub> 受容体の刺激は射精反射を促進するのに対して、5-HT<sub>1B</sub> 及び 5-HT<sub>2C</sub> 受容体に対する刺激は射精反射を抑制的に制御することが報告されている (Table 2) (Giuliano and Clement, 2005b)。SSRI である dapoxetine は、中枢性にシナプス間隙のセロトニン量を増加させることで脊髓射精中枢 (SEG) を抑制すると考えられている (Giuliano and Clement, 2006)。一方、末梢におけるセロトニンが射精反射にどのように関与するかについてはまだ明らかにされていない。

腹圧性尿失禁 (SUI) は女性に多く認められる疾患で、せき、くしゃみ及び体動などにより腹圧が上昇した際に膀胱内圧が尿道抵抗を上回ることで不随意に尿が漏れる症状である (Fig. 2)。SUI は尿意や膀胱の収縮を伴わない尿漏れであり、頻尿を伴う切迫性の尿失禁 (urge urinary incontinence; UII) とは区別される。ヨーロッパ数か国のデータをまとめた報告によると、30 歳以上の女性の約 10% に単一の症状として SUI が認められ、さらに UII と SUI の混合型の尿失禁 (mixed urinary

incontinence; MUI) の罹患率 (約 30%) と合わせると、女性全体の約 40% に SUI の症状が認められる (Aoki et al., 2017)。

下部尿路の生理的な禁制維持の機序は次の通り知られている。膀胱内に尿が貯留するフェーズ (蓄尿期) では、膀胱内の尿量の増加や腹圧によって膀胱内圧が高くなると求心性の骨盤神経を介して脊髄に興奮が伝わり、脊髄における反射によって下腹神経 (交感神経) を介した尿道平滑筋の収縮、ならびに陰部神経 (体性神経) を介した外尿道括約筋 (external urethral sphincter; EUS) の収縮が惹起される (Fig. 3)。通常、これらの尿道の収縮反射が正常に機能することで、急激に腹圧が上昇した場合でも尿禁制が維持される。

SUI は尿道の支持機構である骨盤底筋の機能低下や尿道括約筋の収縮性の低下によって上記の尿禁制維持の機構が十分に機能していない状態であり、加齢、出産、肥満などが危険因子と報告されている。男性では、前立腺切除術などの外科手術によって SUI の症状が現れることがある。治療方法としては、骨盤底筋群の機能を改善するための骨盤底筋体操といった運動療法が広く行われている。重症度の高い患者に対しては、尿道を吊り上げる尿道スリング術などの外科手術が用いられている。SNRI である duloxetine は中枢性に作用し、脊髄のセロトニン・ノルエピネフリン量の増加による陰部神経の運動ニューロンの活性化、及びそれに続く EUS の収縮反射を促進することで SUI の症状を改善すると報告されている (Thor, 2003; Schuessler, 2006)。

早漏及び SUI はいずれも致死性の疾患ではないものの、これらの疾患を有する患者はその症状のために不自由な社会生活を強いられる懸念がある。実際、早漏や SUI は患者に精神的ストレスや日常活動性の低下といった影響を与えることが明らかとなっており (Educational Committee of the ESSM, 2015; Krhut et al., 2018)、治療に対するニーズは高いと考えられる。しかしながら、これら生活の質 (quality of life; QoL) に関する疾患の治療においては、より重篤な疾患の治療に比較して

高い安全性が求められる傾向がある。早漏の治療に用いられる dapoxetine (SSRI) 及び SUI の治療に用いられる duloxetine (SNRI) は、いずれも中枢性に作用するセロトニン関連の薬剤であり、臨床試験においてプラセボ群と比較して中枢作用に関連するめまいや吐き気などの副作用の発生頻度の有意な上昇が認められている (Kerrebroeck et al., 2004; McMahon 2012)。さらに性欲減退などの性機能に関する副作用もあると言われている。欧州医薬品庁に提出された duloxetine の 4 つの臨床試験、計 1,913 例の試験成績を用いて臨床効果 (ベネフィット) と有害事象の比較したメタ解析の結果では、duloxetine はプラセボに比して尿失禁に対する有意な改善を示しているものの、個々の患者ではベネフィットよりも有害事象の頻度が上回っていると報告されている (Maund et al., 2017)。また、SSRI 及び SNRI は抗うつ作用を有する薬剤であり、向精神作用による躁転化 (興奮) や自殺企図のリスクの増大も重大な懸念事項となっている。実際、日本及びアメリカではこれらの薬剤は早漏及び腹圧性尿失禁患者への適応が認められていない。

Dapoxetine (SSRI) 及び duloxetine (SNRI) はセロトニンの再取り込み阻害により中枢性のセロトニンによる神経伝達を非選択的に賦活させることで早漏及び SUI に対する治療効果をもたらす。これら薬剤の臨床効果にドミナントに寄与するセロトニン受容体のサブタイプを明らかにすることができれば、その責任受容体に対する選択的な薬物を見出すことで向精神作用の副作用リスクが軽減した、より安全性の高い治療薬の開発につながる可能性がある。またセロトニンは末梢においても多くの生理作用に関わる分子であることから、末梢におけるセロトニンの泌尿生殖器の制御機構を明らかにすることで中枢作用による副作用懸念のない新規治療薬の開発につながる可能性が考えられる。

以上の通り、射精及び尿道の収縮反射におけるセロトニン受容体の役割を明らかにすることは、現行治療の満足度が決して高くない泌尿生殖器の QoL 疾患である早漏及び SUI の新規治療薬の開発につながる可能性がある。QoL 疾患はそれ自体

が生死に関わる疾患ではないものの、疾患に伴うストレスや日常の活動性低下は他の慢性疾患のリスク増加につながる可能性があることから、健康で豊かな生活を送るためにこれらの疾患の治療法を開発する意義は大きいと考えられる。本研究では、早漏及び SUI に対する新規の治療標的の探索を目的として、ラットの射精及び尿道の閉鎖反応を惹起する評価モデルを用いて、脊髄反射による射精及び尿道収縮の制御におけるセロトニン受容体の役割について検証した。

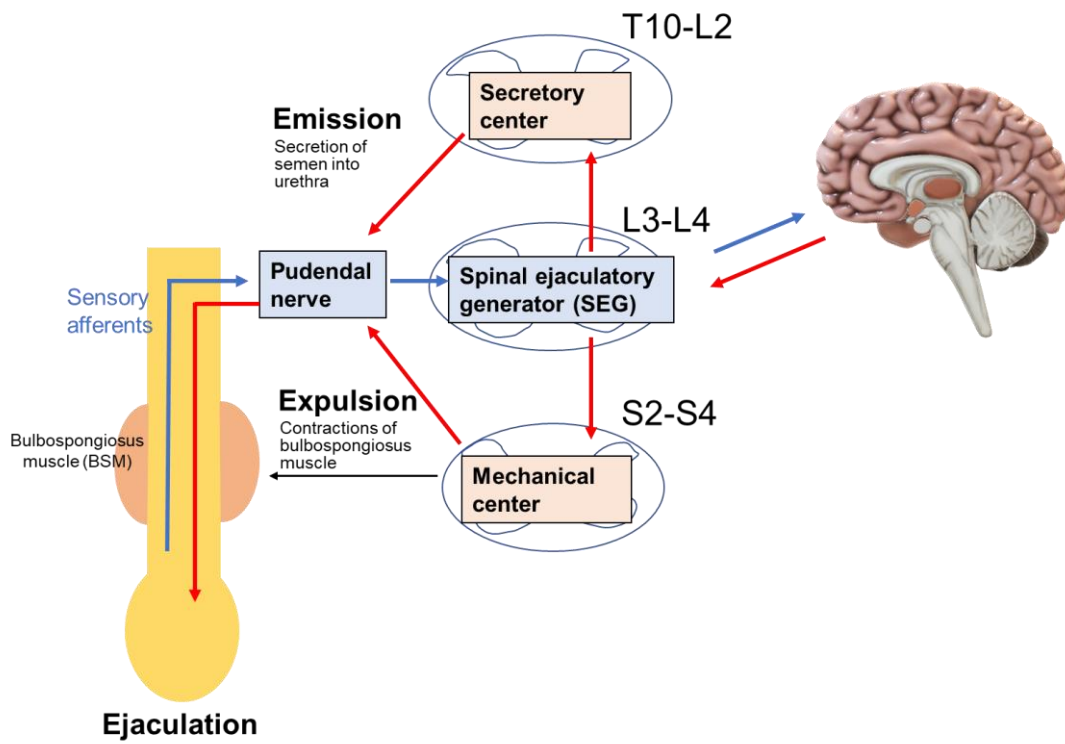


Fig. 1 Physiological regulation of ejaculation.

(This illustration is edited based on the previous report by Saitz and Serefoglu [2015]).

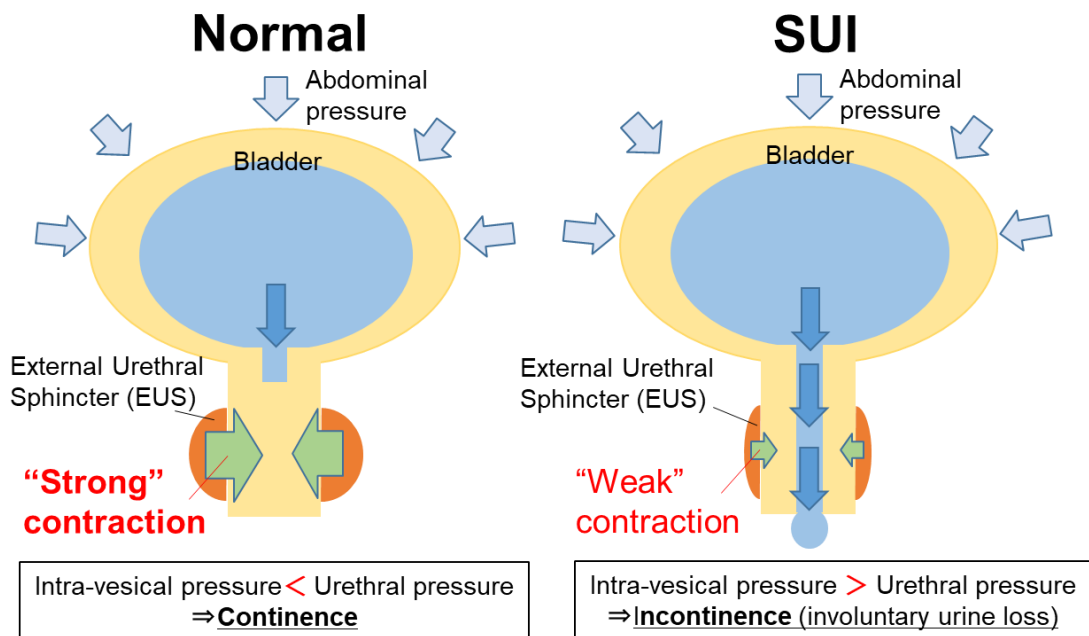


Fig. 2 Pathophysiology of stress urinary incontinence (SUI).

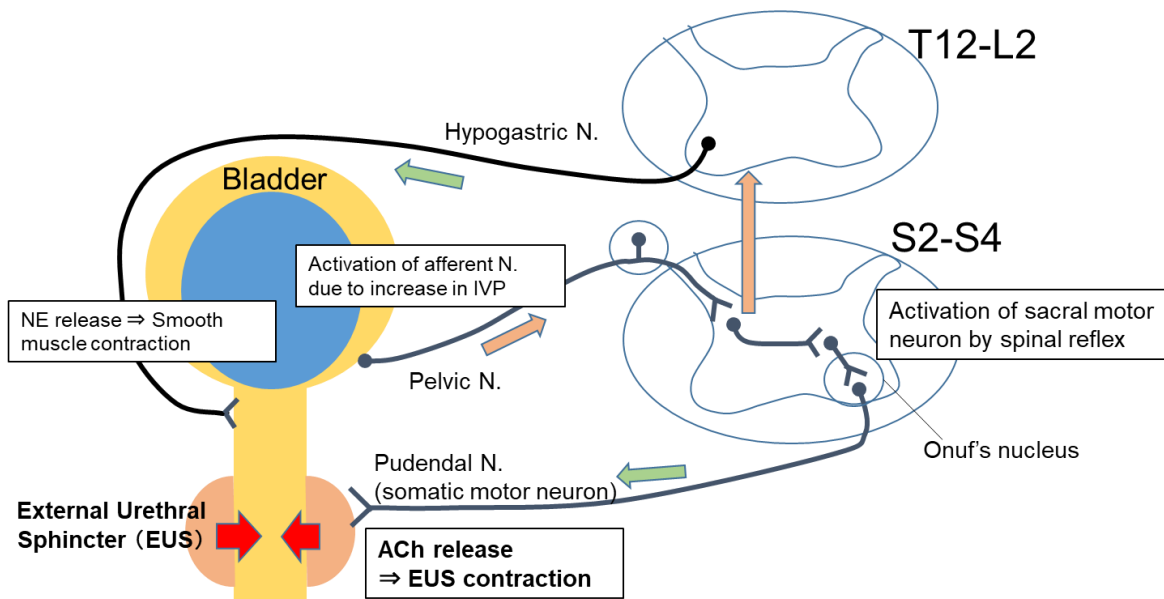


Fig. 3 Mechanism of urethral closure response (UCR) induced by increase in bladder pressure.

**Table 1 Localization and physiological functions of 5-HT receptor subtypes.**

| Subtype            | Cell signaling  | Localization  | Function   |
|--------------------|---|---|--|
| 5-HT <sub>1A</sub> | ↓ AC<br>(Gi/o)  | Limbic system (hippocampus, lateral septum, cortical areas), mesencephalic raphe nuclei                                 | Hyperpolarization, modulation of neurotransmitter release, anxiolysis, hypothermia, hyperphagia  |
| 5-HT <sub>1B</sub> | ↓ AC<br>(Gi/o)  | Basal ganglia, striatum, amygdala, trigeminal ganglion, vascular smooth muscle  | Autoreceptor, locomotion, hypophagia, hypothermia, modulation of neurotransmitter release, vasoconstriction                                    |
| 5-HT <sub>1D</sub> | ↓ AC<br>(Gi/o)  | Basal ganglia, hippocampus, cortex, spinal cord, vascular smooth muscle   | Autoreceptor, modulation of neurotransmitter release   |
| 5-HT <sub>1E</sub> | ↓ AC<br>(Gi/o)  | Cortex, caudate putamen, claustrum, hippocampus, amygdala   | Unknown  |
| 5-HT <sub>1F</sub> | ↓ AC<br>(Gi/o)  | Hippocampus, cortex, dorsal raphe nucleus, uterus   | Speculative role in visual and cognitive function  |
| 5-HT <sub>2A</sub> | ↑ PLC<br>(Gq/11)  | Forebrain, caudate nucleus, nucleus accumbens, hippocampus, olfactory tubercle, vascular smooth muscle, blood platelets | Neuronal depolarization, head twitch, hyperthermia, modulation of neurotransmitter release smooth muscle contraction, platelet activation      |
| 5-HT <sub>2B</sub> | ↑ PLC<br>(Gq/11)  | Brain, stomach fundus (rat), gut, heart, kidney, lung   | Contraction of the stomach fundus, anxiety   |
| 5-HT <sub>2C</sub> | ↑ PLC<br>(Gq/11)  | Choroid plexus, cortex, limbic system, basal ganglia  | Hypolocomotion, hypophagia, penile erection, hyperthermia, anxiety, ↓ noradrenalin and dopamine release  |
| 5-HT <sub>3</sub>  | Ion channel<br>(Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> ) | Dorsal vagal complex, hippocampus, amygdala, caudate, cerebral cortex, heart, intestines                                | Anxiety, cognition, pain, reward/withdrawal, vomiting reflex, vasodilation, intestinal tone and secretion                                      |
| 5-HT <sub>4</sub>  | ↑ AC<br>(Gs)  | Cerebral cortex, limbic areas, hippocampus, colliculus, intestines  | Learning and memory, visual perception, anxiety, motor coordination, arousal, smooth muscle relaxation, modulation of neurotransmitter release |
| 5-HT <sub>5A</sub> | ↓ AC<br>(Gi/o)  | Amygdala, hippocampus, caudate nucleus, cerebellum, hypothalamus, thalamus, substantia nigra, spinal cord               | Modulation of exploratory behavior and locomotion  |
| 5-HT <sub>6</sub>  | ↑ AC<br>(Gs)  | Striatum, olfactory tubercles, nucleus accumbens, hippocampus, stomach, adrenal glands                                  | Memory and learning, modulation of neurotransmitter release  |
| 5-HT <sub>7</sub>  | ↑ AC<br>(Gs)  | Thalamus, hypothalamus, hippocampus, cerebral cortex, amygdala, GI and vascular smooth muscle, heart                    | Circadian rhythms, smooth muscle relaxation, nociception, hypotension, modulation of REM sleep, learning and memory, LH release                |



**Table 2 Serotonin receptor subtypes involved in the regulation of ejaculation.**

| <b>5-HT receptor subtype</b> | <b>Localization</b>  | <b>Effect on ejaculation</b> |
|------------------------------|--|------------------------------|
| 5-HT <sub>1A</sub>           | Brain (MRN, Accumb.)<br>Spinal (DH, DGC, DL, IML, SPN)     | Facilitation                 |
| 5-HT <sub>1B</sub>           | Brain (Hypothalamus)<br>Spinal (DH, DGC, DL, DM, IML, SPN) | Inhibition                   |
| 5-HT <sub>2C</sub>           | Brain (Hypothalamus)<br>Spinal (DGC, SPN)                  | Inhibition                   |

(This table was edited based on the previous report by Giuliano and Clement [2005b].)

## 本論

# 第一章 雄性ラットの射精反射における末梢性のセロトニン (5-HT) の影響とそのメカニズムに関する薬理学的研究

## 第一節 背景

動物の射精のメカニズムとして、生理学的には emission (精液が後部尿道へ排出される過程) 及び expulsion (後部尿道に排出された精液が体外へ射出される過程) の 2 つのフェーズがあることが知られている (Giuliano and Clement, 2005b; Giuliano, 2011)。Emission の過程では、骨盤神経や下腹神経といった自律神経を介して精囊・精管・前立腺からの尿道への精液の分泌が促進される。Expulsion の過程では、尿道内に分泌された精液が会陰部の横紋筋である球海綿体筋 (BSM) や坐骨海綿体筋の収縮によって外尿道口より排出される。Expulsion は精液の尿道内への分泌や陰茎刺激による機械的刺激が引き金となり、会陰部の求心性神経が興奮することにより誘導される (Shafik and El-Sibai, 2000; Giuliano and Clement, 2005a; Shafik et al., 2009; Giuliano, 2011; Tanahashi et al., 2012)。尿道生殖器反射 (urethro-genital reflex; UGR) 評価系は、この expulsion のフェーズを模した動物モデルであり、射精の神経生理学的な制御機構を解明する方法として用いられている (McKenna et al., 1991a; Marson and McKenna, 1992; Marson and Gravitt, 2004; Staudt et al., 2010; Staudt et al., 2012; Tanahashi et al., 2012)。これまでの研究において、UGR は尿道の伸展受容器及び陰茎の求心性神経の活性化を介して BSM の律動的な収縮が惹起される反射であることが確認されている。

射精に関連する障害はあらゆる年代の男性で見られる。勃起障害 (ED) に対してはすでにいくつかの薬剤が広く使われているものの、遅漏・早漏・逆行性射精・無オルガスム症といった疾患では有効な治療法が確立されていない (Patel and Hellstrom, 2009; Althof et al., 2010; Linton and Wylie, 2010; Rowland et al., 2010;

Zhou et al., 2010; Feige et al., 2011; Wyllie and Hellstrom, 2011)。射精に関する末梢の生理的なメカニズムを解明することは、これらの疾患に対する理解を深め、新規治療法の探索に大きく寄与するものであると考えられる。

セロトニンが性機能の制御において重要な役割を担っていることは、これまでの研究から広く示唆されている。例えば、ヒト及び動物において選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (selective serotonin reuptake inhibitor; SSRI) が射精までの時間を延長することが確認されている (Rosen et al., 1999; McMahon et al., 2004; de Jong et al., 2005b; Giuliano and Clement, 2005b)。SSRI によるこれらの性機能への影響は、中枢神経におけるセロトニン受容体を介していると考えられており、特に 5-HT<sub>1A</sub> 受容体及び 5-HT<sub>2C</sub> 受容体の脱感作による作用である可能性が示唆されている (Li et al., 1997; Foreman et al., 1989; Ahlenius and Larsson, 1991, Fernandez-Guasti and Escalante, 1991)。一方で、5-HT<sub>1B</sub> 受容体及び 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の性機能における関与を示唆する報告もある。ラットやノックアウトマウスを用いた検討から、脳の 5-HT<sub>1B</sub> 受容体の刺激は雄の性機能に抑制的に寄与することが知られている (Fernandez-Guasti et al., 1989, 1992; Fernandez-Guasti and Rodriguez-Manzo, 1992; Rodriguez-Manzo et al., 2002)。5-HT<sub>2A</sub> 受容体はラットのコルチコステロンによる性行動への関与、及び BSM を支配する運動ニューロンの起始部における発現が確認されている (Gorzalka et al., 2001; Xu et al., 2007)。中枢神経におけるセロトニンによる性機能の制御に関しては、脳及び脊髄レベルで様々な受容体サブタイプに関する報告がある (Marson and McKenna, 1992; Lorrain et al., 1998, 1999; Clement et al., 2007; Patel and Hellstrom, 2009; Chan et al., 2011)。特に 5-HT<sub>1A</sub> 受容体に関しては、アゴニストである 8-OH-DPAT 及びアンタゴニストである WAY-100635 を用いた研究により、中枢の 5-HT<sub>1A</sub> 受容体の刺激が射精を促進することが明らかにされている (Coolen et al., 1997; Fernandez-Guasti and Rodriguez-Manzo, 1997; de Jong et al., 2005a, 2006)。しかしながら、末梢のセロトニンが射精にどの

ように関与しているのかほとんど分かっていない。ヒト及びラットを含む様々な動物種において、セロトニンを含む神経内分泌細胞が尿道の内皮細胞に存在することが確認されている (Iwanaga et al., 1994; Hanyu et al., 1987; Arrighi et al., 2008; Czaja et al., 1996; Arrighi et al., 2004, 2008)。またセロトニンは内臓求心性神経の重要なメディエータであり、いくつかのセロトニン受容体サブタイプがラットの求心性神経において発現することが知られている (Nitanda et al., 2005; Nakajima et al., 2009; Van Steenwinckel et al., 2009; Lin et al., 2011; Nascimento et al., 2011; Loyd et al., 2013; Pierce et al., 1996; Chen et al., 1998)。McKenna らはこれまでに、雌性ラットの UGR が尿道内へのセロトニン溶液の灌流によって亢進されることを報告している (McKenna et al., 1991b)。それゆえセロトニンは、末梢において尿道からの機械的もしくは感覚刺激を調節することによって射精の制御に関与している可能性がある。

本研究では、末梢のセロトニンの射精反射における役割を解明するため、ラットの尿道内へのセロトニン溶液の灌流による UGR への影響について検討した。さらにセロトニンによる末梢の射精反射の制御のメカニズムについて、セロトニンの各受容体サブタイプ選択的な阻害剤を用いて薬理的な機序検討を実施した。

## 第二節 実験項

### 1) 実験動物

実験には体重 290–400 g の雄性の Sprague-Dawley ラット (Charles River) を使用した。ラットは自由飲水及び自由飲食の条件下で 12 時間ごとの明暗サイクルにより飼育した。本章の全ての実験は、AAALAC インターナショナル (国際実験動物管理公認協会) の認証施設である Urogenix Inc. 及びアステラス製薬株式会社の動物実験委員会の承認を受けて実施した。

### 2) 手術及びデータ記録

尿道生殖器反射 (UGR) の評価は、過去の論文報告の実験を参考にした (Tanahashi et al., 2012)。本実験における動物の手術及び UGR の測定は、全てウレタンによる麻酔下で実施した。ウレタン 1.2 g/kg の皮下投与により麻酔したラットを伏臥位にし、中部胸椎の位置における皮膚の切開及び筋層剥離、さらに椎弓切除により脊髄を露出させた後に胸髄 (T8-T10) を切断した。この脊髄の切断は、少なくとも UGR 評価の 90 分前に実施した。ラットを仰臥位にした後、頸部の皮膚を切開して頸動脈を露出し、ヘパリン (50 U/mL) を添加した生理食塩水を充填したカテーテル (PE50) を挿入して固定した。血圧を測定するため、動脈カテーテルの他端は圧トランスデューサー (CDX Transducer, Argon Medical Devices, Athens, TX, USA) に接続した。また薬物投与のためのカテーテルを頸静脈に挿入して固定した。腹部の皮膚及び筋層を切開し、UGR 実験で尿道を閉塞した際に生理食塩水が精嚢に逆流するのを防止するため、両側の精嚢の起始部を糸で固く結紮した。先端を炎で軽くあぶって先端に返しをつけたカテーテル (PE50, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) に生理食塩水を満たし、切開した膀胱頂部から尿道側に挿入し、先端が膀胱頸部にあることを確認してカテーテルを糸で固定

した。カテーテルの他端は三方活栓に接続して、インフュージョンポンプ（PHD2000 infusion、Harvard Apparatus、Holliston、MA、USA）及び圧トランスデューサー（CDX Transducer、Argon Medical Devices、Athens、TX、USA）にそれぞれ接続した。UGR 評価時にはインフュージョンポンプを用いて尿道内への生理食塩水を灌流した（0.3 mL/min）。また UGR 実験において、陰茎を露出させてクランプできるようにするため、陰茎の先端に細い糸（6-0 silk suture with a 26 mm ½ circle、cutting needle）を通して、陰茎組織を圧迫しないように緩い輪を作って糸を固定した。会陰部の皮膚を切開し、球海綿体筋（BSM）を露出させた。BSM の筋電図（bulbospongiosus muscle-electromyogram; BSM-EMG）を測定するため、一对の電極（0.05 mm in diameter、MT GIKEN、Japan）を BSM に挿入して固定した。実験中に BSM に薬液が触れるのを防ぐため、電極を挿入した BSM をサラップ（3 x 3 cm）で覆った。筋電図の電気信号は、増幅器（P511 AC amplifier、Grass Instruments Division、Astro-Med、Inc.、West Warwick、RI、USA）により 2,000 倍に増幅し、フィルター（½ amp low pass at 10Hz and ½ amp high pass at 10 kHz）によりノイズを除去した。尿道内圧及び BSM-EMG は、LabChart（Version 7、ADI Instruments Inc.、Colorado Springs、CO、USA）を用いて連続的に PC に記録した。

### 3) 尿道の閉塞

本実験では、尿道内へ生理食塩水を灌流しながら、陰茎の伸展に伴う尿道閉塞による尿道内圧の上昇、及びクリップを用いた陰茎の機械的刺激（clamping force of 120 g、AL-1-120、Natsume、Tokyo、Japan）によって UGR を誘発した（Tanahashi et al., 2012）。尿道内圧が閾値に達し、BSM-EMG が活性化して UGR が惹起されたことを確認した後、素早く陰茎のクリップを外して陰茎への刺激を解除した。さらに陰茎の伸展を解除することによって尿道を開放状態とした。本実験では、この

一連の操作を動物の手術 30 分後から 15 分間隔で繰り返し実施した。

本実験で得られる指標は次の通りである (Fig. 4) : Basal UPP ; 尿道閉塞前の尿道内灌流圧、Threshold UPP ; UGR が惹起される閾値の尿道内圧、Delta UPP ; Threshold UPP と Basal UPP の差、Number of ELR (ELR 回数) ; 射精様反射の回数。

#### 4) セロトニン (5-HT) 尿道内灌流の UGR に対する影響 (用量依存性の検討)

本実験では、同一個体で 6 回の UGR を繰り返し惹起した。生理食塩水もしくはセロトニン溶液は、0.3 mL/min の流速で尿道内に灌流した。まず生理食塩水を尿道内にインフュージョンして UGR を 2 回惹起し、2 回目の数値をプレ値として採用した。コントロール群は、3-6 回目の各 UGR の 10 分前から尿道内に生理食塩水をインフュージョンした。セロトニン灌流群では、3-6 回目の各 UGR の 10 分前から、各濃度のセロトニン溶液 (1-1,000  $\mu$ M) をインフュージョンした。5-HT 濃度は同一個体で段階的に濃度を上げて検討し、コントロール群と比較した (Fig. 5A)。

#### 5) セロトニン (5-HT) による UGR 亢進の薬理的機序検討

セロトニン溶液の尿道内灌流による UGR への影響について、セロトニンのサブタイプ選択的なツール化合物を用いて薬理的検討を実施した (Fig. 5B)。本実験では、同一個体で 3 回の UGR を繰り返し惹起した。生理食塩水もしくはセロトニン溶液は、0.3 mL/min の流速で尿道内に灌流した。まず生理食塩水を尿道内にインフュージョンして UGR を 2 回惹起し、2 回目の数値をプレ値として採用した。2 回目の UGR の直後に各用量の被験化合物もしくは溶媒を静脈内投与した。3 回目の UGR の 10 分前にセロトニン溶液 (300  $\mu$ M) の尿道内へのインフュージョンを開始した。3 回目の UGR の各指標のプレ値からの変化量を溶媒群と化合物投与群で比較した。生理食塩水のみを尿道内灌流した群をコントロール群とした。



#### 6) 生理食塩水条件下の UGR に対する 5-HT<sub>2</sub>受容体阻害剤の影響

本実験では、同一個体で 5 回の UGR を繰り返し惹起した (Fig. 5C)。生理食塩水は 0.3 mL/min の流速で尿道内に灌流した。生理食塩水を尿道内にインフュージョンして 15 分間隔で UGR を 2 回惹起し、2 回目の数値をプレ値として採用した。3,4 及び 5 回目の各 UGR の 5 分前に溶媒もしくは xylamidine 溶液 (0.01–1 mg/kg) を静脈内投与し、生理食塩水の灌流下で UGR を惹起した。Xylamidine 投与群及び溶媒投与群で UGR の各指標のプレ値からの変化量を比較した。

#### 7) 被験化合物

セロトニン塩酸塩 (5-HT) (Sigma, MO, USA)、tropisetron (5-HT<sub>3</sub>アンタゴニスト、Sigma, MO, USA)、ramosetron (5-HT<sub>3</sub>アンタゴニスト、Santa Cruz Biochemistry, CA, USA)、SB269970 塩酸塩 (5-HT<sub>7</sub>アンタゴニスト、TOCRIS, Bristol, UK)、WAY-100635 マレイン酸塩 (5-HT<sub>1A</sub>アンタゴニスト、Sigma, MO, USA) 及び xylamidine トシル酸塩 (5-HT<sub>2</sub>アンタゴニスト、Kemprotec Limited, Middlesbrough, UK) は生理食塩水で溶解ならびに希釈を行った。Ritanserin (5-HT<sub>2</sub>アンタゴニスト、Tocris, Bristol, UK) は 10%ジメチルアセトアミド及び 5%クレモフォール® EL を含む生理食塩水にて溶解した。被験化合物はいずれも静脈内から 1 mL/kg の容量で投与した。また各化合物の投与量は塩係数を考慮し、フリー体に換算した用量にて投与した。

#### 8) 統計解析

全ての実験結果は mean ± SEM で表記した。統計解析には Prism 5 (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を用いた。多群の比較は one-way ANOVA もしくは two-way ANOVA 及び Bonferroni 多重比較検定にて行った。2 群間の比較

は unpaired *t*-test で検定を行った。P < 0.05 の場合に統計的有意差有り と判断した。

### 第三節 実験結果

#### 1) UGR の各パラメーターの基準値

生理食塩水を尿道内に灌流した条件下における UGR の各パラメーターの値は、basal UPP が  $35.4 \pm 0.6$  mmHg、threshold UPP が  $102.2 \pm 1.7$  mmHg、delta UPP が  $66.9 \pm 1.7$  mmHg、ELR 回数が  $4.2 \pm 0.2$  回、及び 1st burst までの時間が  $31.1 \pm 1.1$  秒であった。

#### 2) セロトニン (5-HT) 尿道内灌流の UGR に対する影響 (用量依存性の検討)

コントロール群 (生理食塩水) とセロトニン灌流群で UGR の各指標のプレ値に有意な差はなかった。コントロール群では、UGR を繰り返して惹起しても各指標に顕著な変化はなく、実験を通して安定した値を示した。セロトニン ( $1-1,000 \mu\text{M}$ ) の尿道内灌流は、basal UPP の値には影響を与えなかった (Fig. 6 及び Fig. 7A)。射精反射が惹起される閾値の指標である threshold UPP 及び delta UPP の値はセロトニンの用量依存的に低下し、 $100 \mu\text{M}$  以上のセロトニン濃度においてコントロール群と有意な差が認められた (Fig. 7B 及び C)。射精反射 (ELRs) の回数は、セロトニン ( $100$  及び  $1,000 \mu\text{M}$ ) により濃度依存的に上昇し、 $1,000 \mu\text{M}$  において統計的な有意差が認められた (Fig. 7D)。これらの結果から、セロトニン溶液を尿道内へ灌流することにより射精様の反射である UGR が亢進することが示された。一方、全身性の作用である血圧は、セロトニンの尿道内灌流による顕著な変化は認められなかった [各群 6 例、コントロール群：プレ値  $86.2 \pm 4.5$  mmHg、ポスト値 (6 回目の UGR 後)  $94.3 \pm 3.3$  mmHg、5-HT 群 (5-HT  $1,000 \mu\text{M}$ )：プレ値  $80.6 \pm 4.0$  mmHg、ポスト値  $75.5 \pm 5.8$  mmHg]。

#### 3) セロトニン (5-HT) による UGR 亢進の薬理的機序検討

セロトニン溶液の尿道内灌流による UGR の亢進がいずれの 5-HT 受容体サブタイプを介した作用であるか、サブタイプ選択的なアンタゴニストを用いて薬理的に検証した。本実験では尿道に灌流するセロトニン溶液の濃度を 300  $\mu$ M に設定し、セロトニンによる UGR の各指標の変化に対する被験化合物の影響を評価した。被験化合物もしくは溶媒を投与する前の UGR の各指標（プレ値）は、各群で差はなかった。溶媒投与群において、セロトニン(300  $\mu$ M)の尿道内灌流によって threshold UPP と delta UPP はプレ値に対してそれぞれ約 18%及び 33%低下、さらに ELRs 回数は約 90%上昇した。これらはいずれもコントロール群（生理食塩水の尿道内灌流、かつ化合物投与なし）に比して有意な変化であった。

5-HT<sub>3</sub>受容体アンタゴニスト：雌性ラットでは 5-HT<sub>3</sub>受容体刺激が UGR の亢進に関わると報告されている (McKenna et al., 1991b) ことから、5-HT<sub>3</sub>受容体の関与について検討を行った。本実験では 2 種の 5-HT<sub>3</sub>受容体アンタゴニスト、tropisetron (1 及び 3 mg/kg, i.v.) 及び ramosetron (0.1 及び 1 mg/kg, i.v.) の作用を評価した。Tropisetron 及び ramosetron はいずれも basal UPP に影響を与えなかった (Fig. 8A)。これら両化合物は、いずれもセロトニンによる threshold UPP 及び delta UPP の低下作用に対する抑制作用を示さず (Fig. 8B 及び C)、さらに ELRs 回数の上昇に対しても影響を与えなかった (Fig. 8D)。

5-HT<sub>1A</sub>受容体及び 5-HT<sub>7</sub>受容体アンタゴニスト：5-HT<sub>1A</sub>受容体及び 5-HT<sub>7</sub>受容体に対してそれぞれ選択的なアンタゴニストである WAY-100635 (5-HT<sub>1A</sub>受容体アンタゴニスト) 及び SB269970 (5-HT<sub>7</sub>受容体アンタゴニスト) の作用を評価した。WAY-100635 (1 mg/kg, i.v.) 及び SB269970 (3 mg/kg, i.v.) はいずれも basal UPP に影響を与えなかった (Fig. 9A)。WAY-100635 はセロトニンによる UGR 亢進作用 (thresholds UPP 及び delta UPP の低下、ELRs 回数の上昇) を抑制しなかった (Fig. 9B-D)。同様に、SB269970 もセロトニンによる UGR 亢進を抑制しなかった (Fig. 9B-D)。

5-HT<sub>2</sub>受容体アンタゴニスト：2つの異なるタイプの5-HT<sub>2</sub>受容体アンタゴニスト、ritanserin 及び xylamidine の作用を評価した。Ritanserin は中枢及び末梢のいずれにも作用する5-HT<sub>2</sub>受容体アンタゴニスト作用である。一方、xylamidine は中枢移行性が低く、末梢選択的に作用する5-HT<sub>2</sub>受容体アンタゴニストである (Fuller et al., 1986; Pehek and Bi, 1997; Johnson et al., 2003)。これらの5-HT<sub>2</sub>受容体アンタゴニストはいずれも basal UPP には影響を与えなかった (Figs. 11A 及び 13A)。Ritanserin (1 mg/kg, i.v.) はセロトニンによる threshold UPP 及び delta UPP の低下をいずれも有意に抑制した ( $P < 0.001$  vs vehicle, unpaired *t*-test) (Figs. 10, 11B 及び C)。さらに、セロトニンによる ELRs 回数の上昇も ritanserin の投与によって有意に抑制された ( $P < 0.05$  vs vehicle, unpaired *t*-test) (Fig. 11D)。

もう一方の5-HT<sub>2</sub>受容体アンタゴニストである xylamidine (0.01–1 mg/kg, i.v.) は、セロトニンによる threshold UPP 及び delta UPP の低下を用量依存的に抑制し、0.1 及び 1 mg/kg において統計的な有意差が認められた ( $P < 0.05$  at 0.1 mg/kg,  $P < 0.01$  at 1 mg/kg vs vehicle, one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test) (Figs. 12, 13B 及び C)。また5-HTによるELRsの回数の上昇に対して、xylamidine は用量依存的な抑制傾向を示した (Fig. 13D)。Xylamidine (0.01–1 mg/kg, i.v.) は生理食塩水の尿道灌流下では UGR の各指標に対しては影響を与えなかった (Fig. 14)。

#### 第四節 考察

本研究において、セロトニンの尿道内灌流によって雄性ラットの UGR が亢進すること、すなわち尿道及び陰茎の刺激に伴う射精反射が促進されることが確認された。さらに、セロトニンによるこの UGR の亢進は 2 つのタイプの 5-HT<sub>2</sub> 受容体アンタゴニストにより抑制されたことから、尿道の 5-HT<sub>2</sub> 受容体への刺激がセロトニンによる UGR の亢進に関与することが示唆された。

セロトニンは作用部位及び受容体サブタイプによって、射精において様々に関与している。例えば、セロトニンを内側視索前核または前脳のセロトニン投射部位にセロトニンを投与すると雄性ラットの性行動は抑制されるが、背側もしくは内側縫線核に投与すると逆に性行動の抑制が認められる (Hillegaart et al., 1989; Verma et al., 1989; Hillegaart et al., 1991; Fernandez-Guasti et al., 1992)。過去の研究では、脳及び脊髄における 5-HT<sub>1A</sub> 受容体の刺激は性行動を促進する一方、5-HT<sub>1B</sub> 受容体の刺激は性行動を抑制すると報告されている (Ahlenius et al., 1989; Fernandez-Guasti et al., 1989, 1992; Fernandez-Guasti and Escalante, 1991; Ahlenius and Larsson, 1998; Hillegaart and Ahlenius, 1998)。また 5-HT<sub>2C</sub> 受容体は、5-HT<sub>1B</sub> 受容体と同様に受容体刺激による性行動を抑制すると報告されている (Foreman et al., 1989; Gorzalka et al., 1990)。末梢では、セロトニンは精囊及び精管を収縮させる自律神経の機能を抑制し、尿道への精液の分泌、すなわち emission を抑制する (Kim et al., 2000; Kim et al., 2004; Hsieh et al., 2011)。ヒトの精囊平滑筋を用いた実験において、セロトニン及び SSRI はノルエピネフリンによる精囊平滑筋の収縮作用を抑制することが報告されている (Birowo et al., 2009)。しかしながら、射精の expulsion において、末梢のセロトニンがどのように関与するかについてはまだ明らかにされていない。

本研究では、雄性ラットの尿道内にセロトニン溶液を灌流することで、UGR の

亢進、すなわち射精反射を惹起する閾値の尿道内圧 (threshold UPP) の低下と射精反射の回数 (ELRs 回数) の上昇が認められた (Figs. 6 及び 7)。セロトニンはベースの尿道内圧 (basal UPP) には影響しなかったことから、セロトニンの尿道内灌流は尿道平滑筋及び外尿道括約筋の収縮には影響しないと考えられる。また、セロトニンの全身投与は血圧の変動をもたらすが (Villalon and Centurion, 2007)、本研究ではセロトニンの尿道内灌流による顕著な血圧の変動は認められなかったため、セロトニンは尿道の局所において作用しているものと示唆される。セロトニンの尿道灌流により雄性ラットの UGR が亢進するという今回の結果は、雌性ラットで検討を行った McKenna らの報告と一致するものである (McKenna et al., 1991b)。しかしながら、雌性ラットでは 0.1–100  $\mu\text{M}$  のセロトニン溶液で UGR の亢進が認められたのに対して、雄性ラットを用いた本研究では UGR の亢進により高い濃度のセロトニン溶液 (100–1,000  $\mu\text{M}$ ) が必要であった。この用量の違いは、雌雄の尿道における神経叢の構造的な違いや実験方法の違いが原因と考えられる。生理食塩水の尿道灌流条件下で UGR を惹起する閾値の尿道内圧は雌性ラットの方が雄に比べて低いことから、UGR を惹起する求心性神経の内因性の活性化機構に雌雄間で違いがある可能性もある (McKenna et al., 1991a; Vathy and Marson, 1998)。

McKenna らは、雌性ラットを用いた UGR 実験において、セロトニンの尿道内灌流による UGR の閾値尿道内圧 (threshold UPP) の低下は 5-HT<sub>3</sub> 受容体の刺激に基づく作用と報告している (McKenna et al., 1991b)。5-HT<sub>3</sub> 受容体は種々の内臓感覚神経に発現しており、求心性神経の興奮に関与することが知られている (Kilpatrick et al., 1990; Pierce et al., 1996; Chen et al., 1998)。これらの知見から、当初、雄性ラットでも 5-HT<sub>3</sub> 受容体の刺激が UGR の亢進に関与すると仮定してセロトニンの尿道内灌流による UGR 亢進に対する 5-HT<sub>3</sub> 受容体アンタゴニストの作用について検証した。しかしながら、2 種の 5-HT<sub>3</sub> 受容体アンタゴニスト、tropisetron 及び ramosetron はいずれも 5-HT による UGR 亢進を抑制しなかった。

本研究において、検討したこれら両化合物の投与量 (tropisetron; 1 及び 3 mg/kg、ramosetron; 0.1 及び 1 mg/kg、いずれも静脈内投与) は、5-HT<sub>3</sub> 受容体に対する阻害作用を示すのに十分な用量と考えられることから (McKenna et al., 1991b; Miyata et al., 1998; Okamoto et al., 2004)、雄性ラットのセロトニンによる UGR 亢進には 5-HT<sub>3</sub> 受容体の刺激は関与しないと結論付けた。

5-HT<sub>1A</sub> 受容体アゴニストである 8-OH-DPAT は、全身投与によって脊髄切断した雄性ラットの射精反射を促進するとの報告がある (Lee et al., 1990; Carro-Juarez and Rodriguez-Manzo, 2001; Carro-Juarez et al., 2003)。8-OH-DPAT は 5-HT<sub>1A</sub> 受容体の他に、5-HT<sub>7</sub> 受容体に対しても刺激作用を有することが示唆されている (Hedlund et al., 2004; Sprouse et al., 2004)。そこで、セロトニンによる末梢性の射精反射の亢進に 5-HT<sub>1A</sub> 及び 5-HT<sub>7</sub> 受容体の関与があるかどうかを検証するため、WAY-100635 (5-HT<sub>1A</sub> 受容体アンタゴニスト) 及び SB269970 (5-HT<sub>7</sub> 受容体アンタゴニスト) の影響について検討した。しかしながら、これらの化合物はいずれも 5-HT による UGR の亢進を抑制しなかったことから、セロトニンによる UGR 亢進には 5-HT<sub>1A</sub> 及び 5-HT<sub>7</sub> 受容体の刺激はいずれも関与しないと考えられた。

本研究の結果は、セロトニンの尿道内灌流による雄性ラットの UGR の亢進に 5-HT<sub>2</sub> 受容体の刺激が関与することを明確に示唆している。2 種の異なるプロファイルを有する 5-HT<sub>2</sub> 受容体アンタゴニスト、ritanserin 及び xylamidine を用いて 5-HT<sub>2</sub> 受容体の関与について検討を実施した。Ritanserin は中枢及び末梢のいずれでも作用するのに対し、xylamidine は中枢移行性が低く末梢において選択的に作用する 5-HT<sub>2</sub> 受容体アンタゴニストである (Fuller et al., 1986; Pehek and Bi, 1997; Johnson et al., 2003)。つまり、本実験において ritanserin (1 mg/kg, i.v.) はセロトニンの尿道内灌流による UGR 亢進を有意に抑制したが、この作用は末梢作用だけでなく中枢における 5-HT<sub>2</sub> 受容体の阻害が影響している可能性も否定できない。ラットの交尾行動試験において、DOI などの 5-HT<sub>2</sub> 受容体アゴニストが雄性ラッ

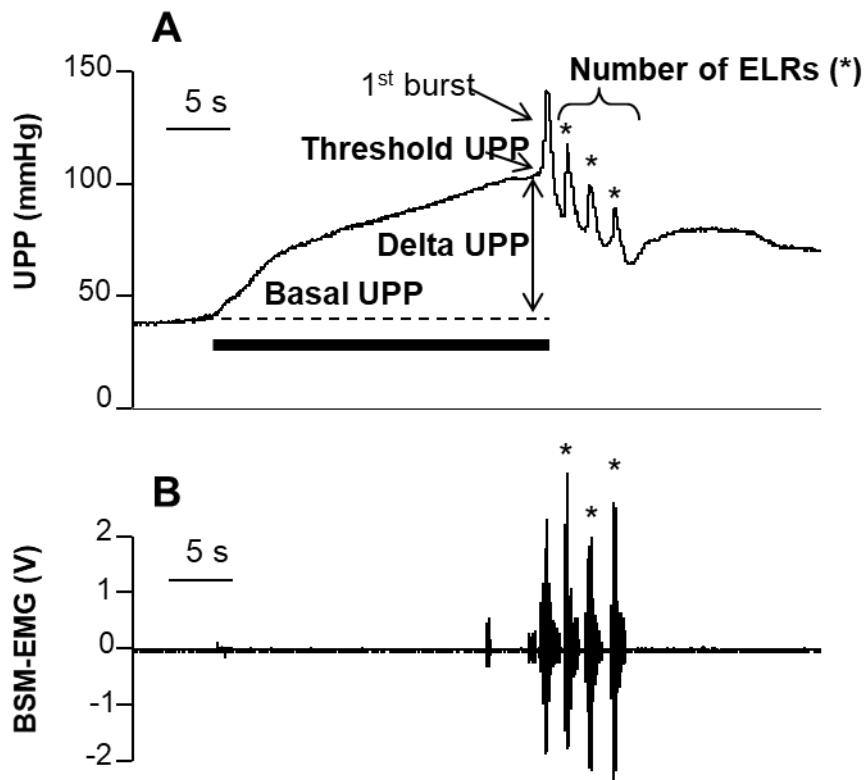


トの射精を抑制し、この抑制作用は ritanserin などの 5-HT<sub>2</sub> 受容体アンタゴニストにより阻害されるとの報告がある (Foreman et al., 1989; Watson and Gorzalka, 1991)。しかし、本研究では ritanserin に加えて末梢選択性の 5-HT<sub>2</sub> 受容体アンタゴニストである xylamidine (0.01–1 mg/kg, i.v.) が用量依存的にセロトニンによる UGR の亢進を抑制することを確認した。本結果から、セロトニンによる UGR 亢進作用は、末梢の 5-HT<sub>2</sub> 受容体の阻害によって抑制されることが示唆された。Xylamidine の作用は、尿道上皮や平滑筋への直接作用の可能性、もしくは陰茎や尿道の感覚神経終末・後根神経節の感覚神経を介した作用の可能性が考えられる (Fuller et al., 1986; Klarskov and Horby-Petersen, 1986; Pierce et al., 1996; Chen et al., 1998; Nicholson et al., 2003)。セロトニンが、末梢のどの部位の 5-HT<sub>2</sub> 受容体を介して UGR を亢進するかは今後の検討課題であり、尿道における 5-HT<sub>2</sub> 受容体の発現部位を免疫染色やウエスタンブロットで確認する必要がある。尿道に灌流したセロトニンは、直接もしくは間接的に尿道における一次求心性神経を活性化するか、もしくは尿道における血流変化などの別のメカニズムで UGR を活性化しているかもしれない。または UGR の活性化そのものが尿道や前立腺の神経内分泌細胞からのセロトニンの遊離を誘導するかもしれない。これらの可能性については、今後さらなる検討が必要と考えられる。

本研究において、神経内分泌細胞から遊離した内因性のセロトニンの 5-HT<sub>2</sub> 受容体刺激による UGR の亢進があるどうかを検証するため、生理食塩水を灌流した条件下の UGR 実験で xylamidine の作用を評価した。Xylamidine は生理食塩水の灌流条件では UGR のいずれの指標にも影響を与えなかったことから、末梢の 5-HT<sub>2</sub> 受容体は通常の生理条件では UGR の亢進に関与しない可能性が考えられ、さらに尿道の神経内分泌細胞から遊離したセロトニンが UGR の亢進に寄与する可能性が低いことが示唆された。しかしながら、病態時には神経内分泌細胞からのセロトニンの遊離が亢進し、射精に関与する尿道の感受性も変化している可能性はある。例

えば、ラットにおいて感覚神経における 5-HT<sub>2A</sub> 受容体は炎症性疼痛の増悪に関与している (Okamoto et al., 2002)。射精障害を引き起こすものとして、いくつかの要因が報告されており (Donatucci, 2006; Buvat, 2011)、例えば陰茎の感覚神経の感受性の増大は早漏の要因となると報告されている (Xin et al., 1997; Wyllie and Hellstrom, 2011)。しかしながら、今回ラットで認められたセロトニンによる UGR の亢進がヒトの射精障害の病態とどのように関連しているのかについては、さらなる検討が必要である。今後、感覚神経・後根神経節・尿道・陰茎・前立腺・陰茎海綿体の各部位におけるセロトニン受容体のサブタイプの発現について検討することにより、末梢のセロトニンによる射精の制御についてより深く理解し、病態との関連についても明らかとなる可能性がある。

以上、本研究において、尿道へのセロトニンの灌流によって麻酔下の雄性ラットの射精反射反応が亢進されること及びその射精反射の亢進は末梢の 5-HT<sub>2</sub> 受容体の阻害によって抑制されることが確認された。すなわち、尿道における末梢の 5-HT<sub>2</sub> 受容体の刺激が雄性ラットの射精反射の亢進に寄与することが示唆された。



**Fig. 4** Example of penile clamping-induced UGR and the parameters measured.

A, Urethral perfusion pressure (UPP). B, bulbospongiosus muscle electromyogram (BSM-EMG). When UPP reaches threshold pressure, a brief large amplitude BS-EMG burst and a sharp increase in UPP, are seen. At this point the clamping is immediately released, the urethral pressure drops and the number of the additional bursts are counted as number of ejaculation-like responses (ELRs\*). Basal UPP: UPP just before penile occlusion. Delta UPP: Difference between threshold UPP and basal UPP. Thick horizontal bar indicates the occlusion period or latency to 1st burst.

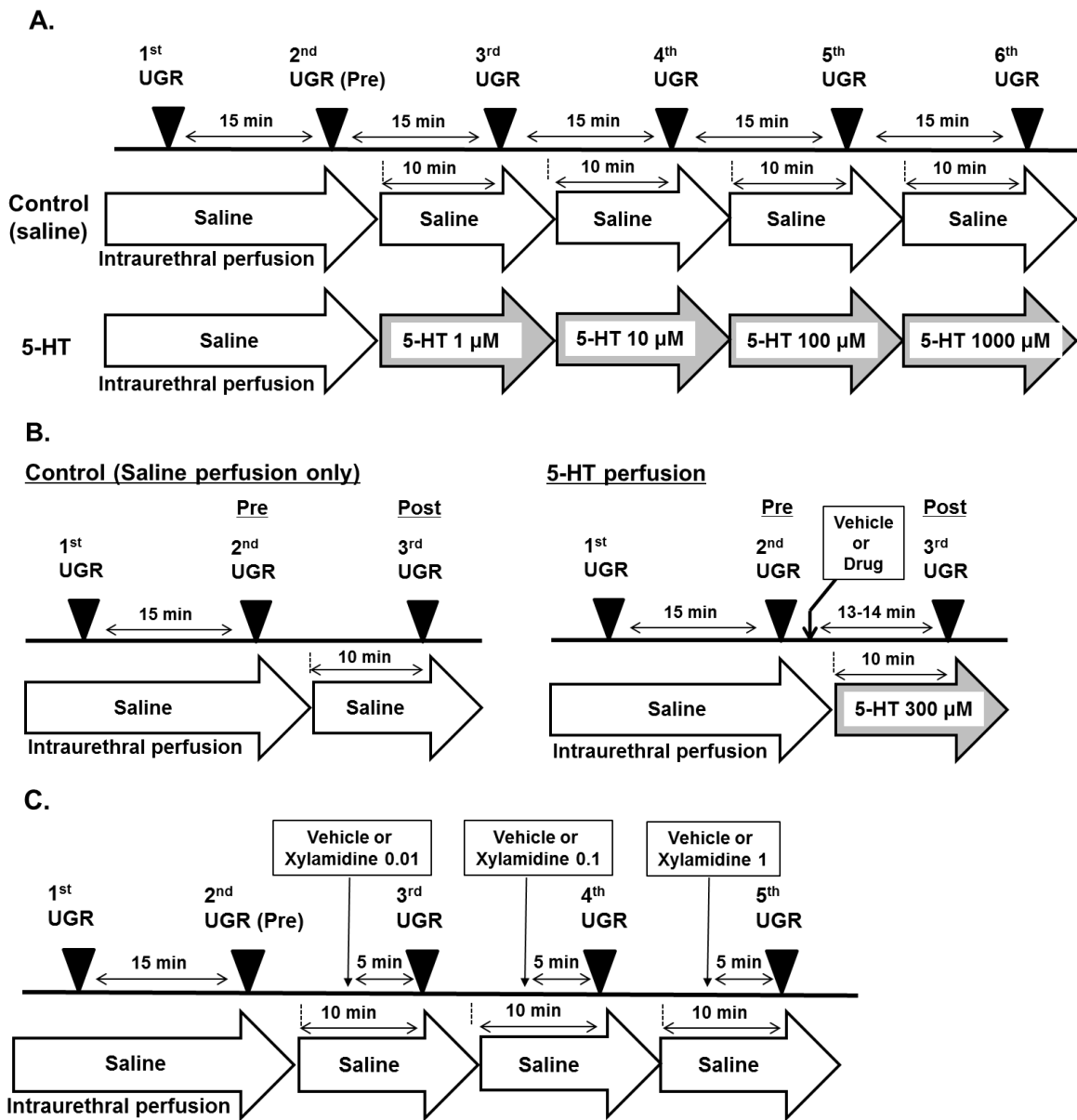
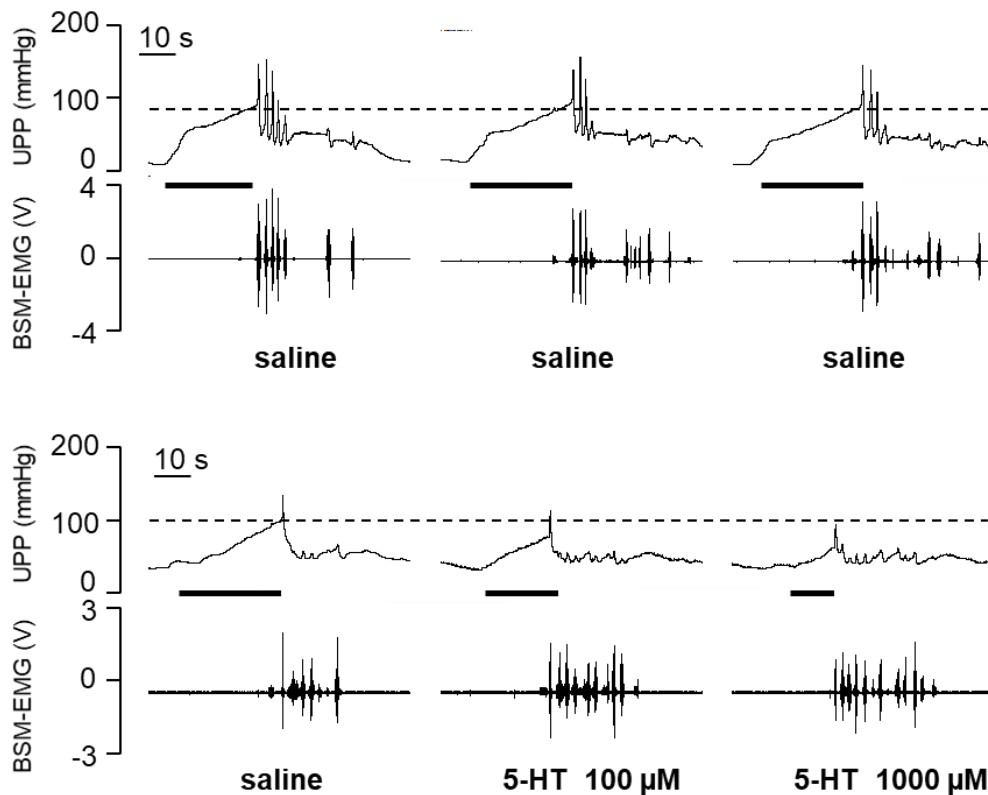


Fig. 5 Schematic protocol for urethro-genital reflex (UGR) studies.

A, Dose-response study of intraurethral perfusion of 5-HT solution. B, Mechanistic studies for 5-HT-induced enhancement of UGR. C, Evaluation of the effect of xylamidine on UGR with saline infusion.



**Fig. 6** Physiological traces showing the effects of intraurethral serotonin (5-HT) on the urethro-genital reflex (UGR).

The top traces show saline infusion; the bottom traces show the 5-HT-induced decrease in urethral perfusion pressure (UPP) and increase in number of bulbospongious muscle electromyogram (BSM-EMG) bursts. The dotted line shows level of threshold pressure at control UGR. Note the decrease in UPP and increase in number of BSM-EMG bursts with 5-HT. The thick horizontal bar indicates the occlusion period or latency to first burst.

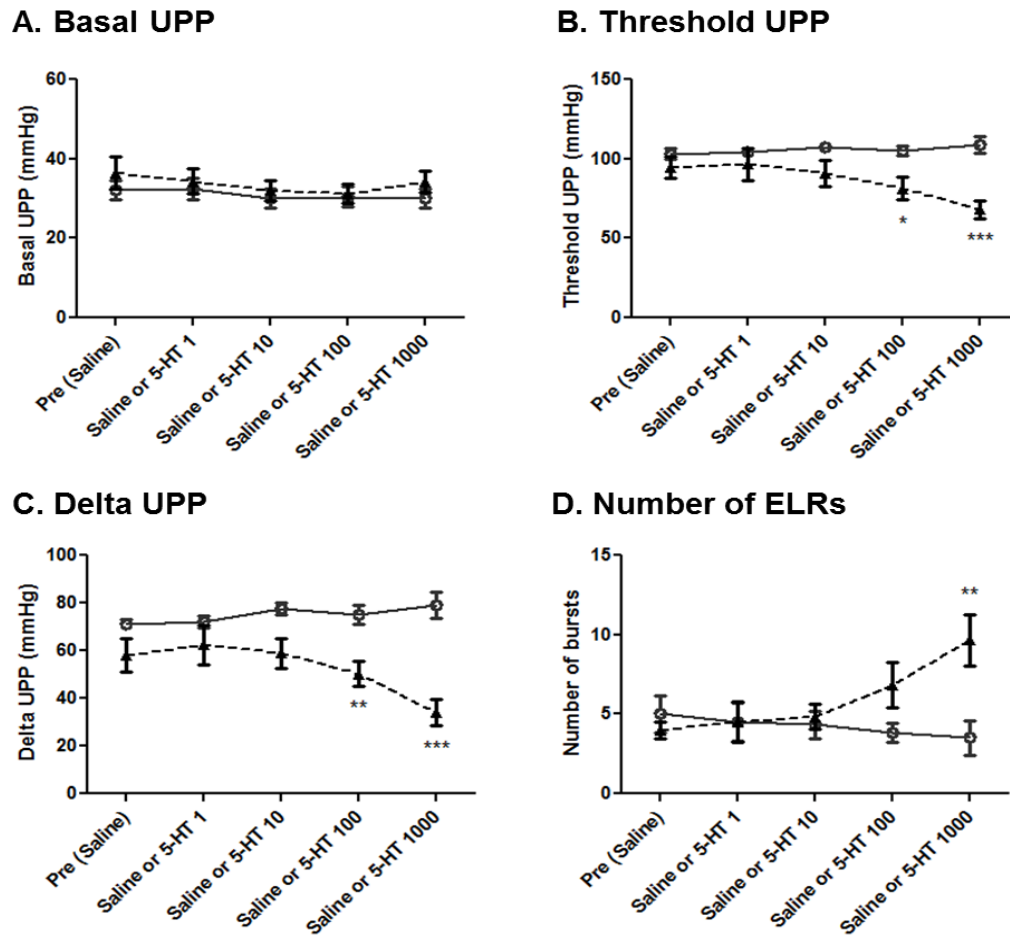
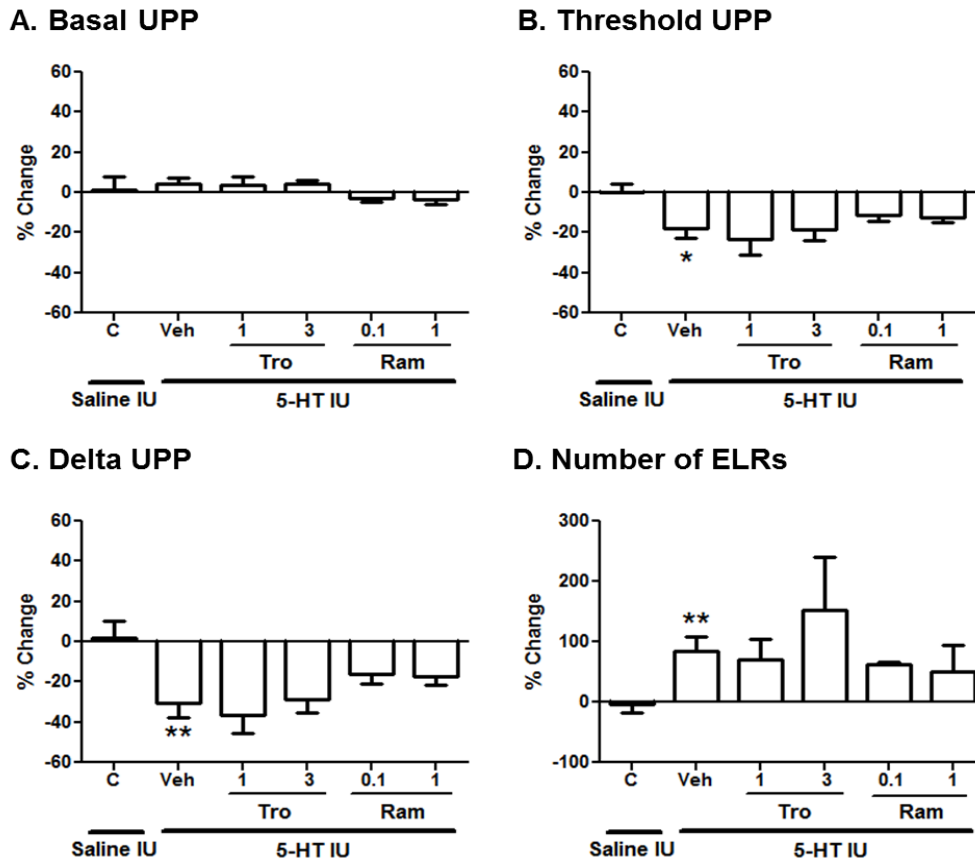


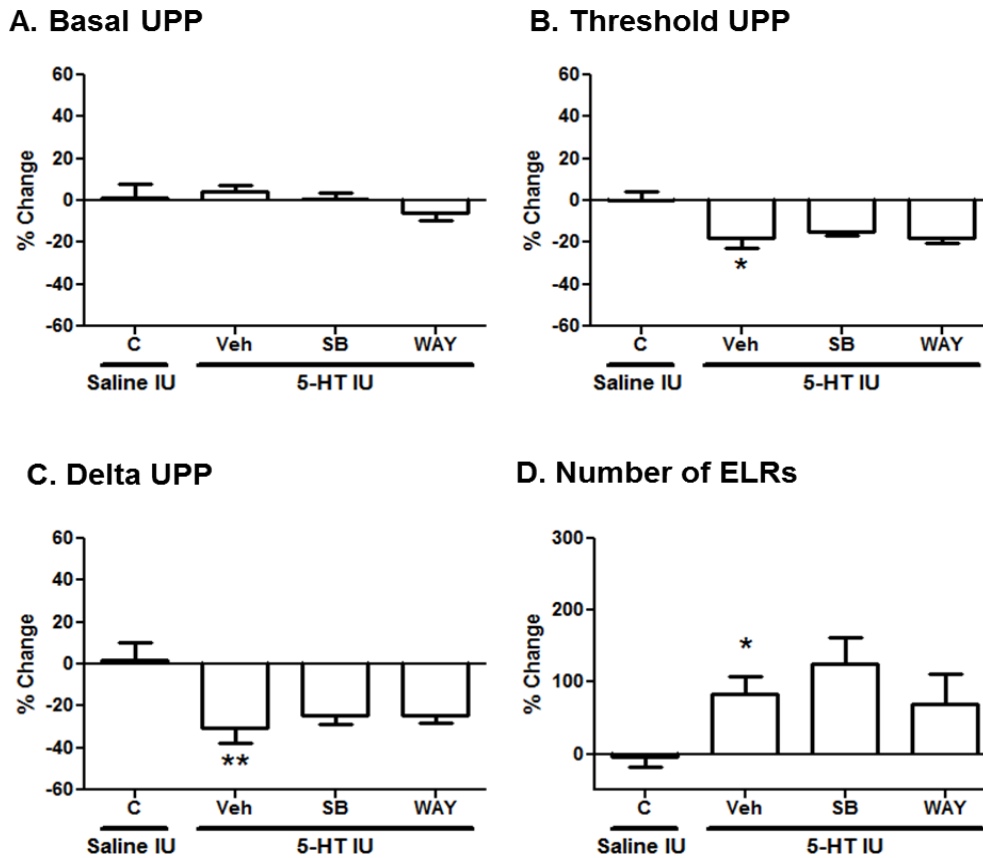
Fig. 7 Dose-dependent facilitation of the urethro-genital reflex (UGR) with intraurethral perfusion of serotonin (5-HT).

A, B, C and D shows each parameter obtained in UGR studies (see Fig. 4). Repeated UGRs were performed at 15-minute intervals. The infusion solutions (both saline and 5-HT) were changed 10 minutes before each UGR. 5-HT (1–1,000  $\mu$ M) was infused into the urethra in increasing doses;  $n = 6$  for both saline and 5-HT groups. The straight line represents the saline group. The dotted line represents the 5-HT intraurethral infusion group. \* $P < 0.05$  vs control, \*\* $P < 0.01$  vs control, \*\*\* $P < 0.001$  vs control (two-way ANOVA followed by Bonferroni's comparison test).



**Fig. 8** Effects of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists on the 5-HT-induced facilitation of the urethro-genital reflex (UGR).

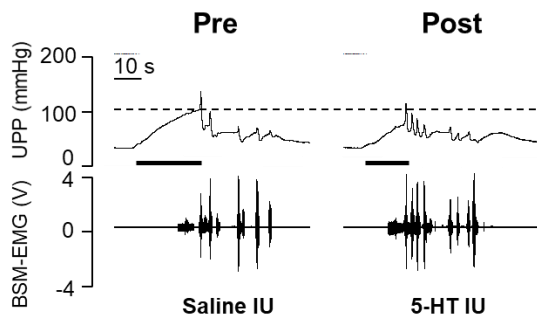
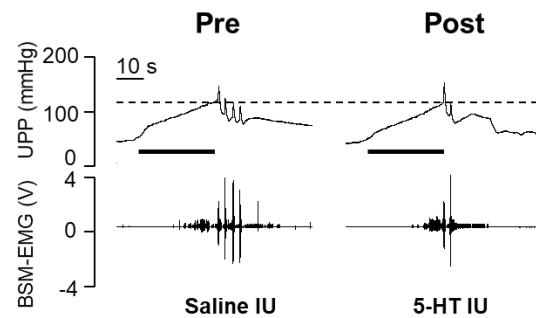
A, B, C and D shows each parameter obtained in UGR studies (see Fig. 4). Vehicle or each 5-HT<sub>3</sub> antagonist, tropisetron (1 and 3 mg/kg) or ramosetron (0.1 and 1 mg/kg), was intravenously administered 15 minutes before the third UGR. Intraurethral infusion of 5-HT (300 μM) started 10 minutes before the third UGR. C = control (saline intraurethral infusion and no drug, n = 8); Veh = vehicle (saline, n = 8); Tro = tropisetron, 1 and 3 mg/kg (n = 5, each); Ram = ramosetron, 0.1 (n = 5) and 1 mg/kg (n = 6). \*P < 0.05 vs control, \*\*P < 0.01 vs control (unpaired *t*-test). No statistical differences were found between vehicle and any each compound groups (one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test).



**Fig. 9** Effects of 5-HT<sub>7</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonists on the 5-HT-induced facilitation of the urethro-genital reflex (UGR).

A, B, C and D shows each parameter obtained in UGR studies (see Fig. 4). Vehicle, SB269970 (3 mg/kg, i.v.), a 5-HT<sub>7</sub> antagonist, or WAY-100635 (1 mg/kg, i.v.), a 5-HT<sub>1A</sub> antagonist, was administered 15 minutes before the third UGR. Intraurethral infusion of 5-HT (300  $\mu$ M) started 10 minutes before the 3<sup>rd</sup> UGR. C = control (saline intraurethral infusion and no drug, n = 8); Veh = vehicle (saline, n = 8); SB = SB269970, 3 mg/kg (n = 4); WAY = WAY-100635, 1 mg/kg (n = 5). \*P < 0.05 vs control, \*\*P < 0.01 vs control (unpaired *t*-test). No statistical differences were found between vehicle and any compound treatment group (unpaired *t*-test).



**Vehicle (i.v.)****Ritanserin (1 mg/kg, i.v.)**

**Fig. 10** Physiological tracings showing ritanserin attenuated the 5-HT-induced facilitation of the urethro-genital reflex (UGR).

Vehicle group shows 5-HT-induced facilitation of the UGR (a decrease in urethral perfusion pressure [UPP] and increase in number of bulbospongiosus muscle electromyogram [BSM-EMG] bursts). Pre = saline infusion, second UGR; Post = third UGR, with 5-HT infused 10 minutes before the third UGR. Ritanserin or vehicle (10% dimethylacetamide and 5% cremophor in saline) was given immediately after the second UGR. The thick horizontal bar indicates the occlusion period or latency to first burst.

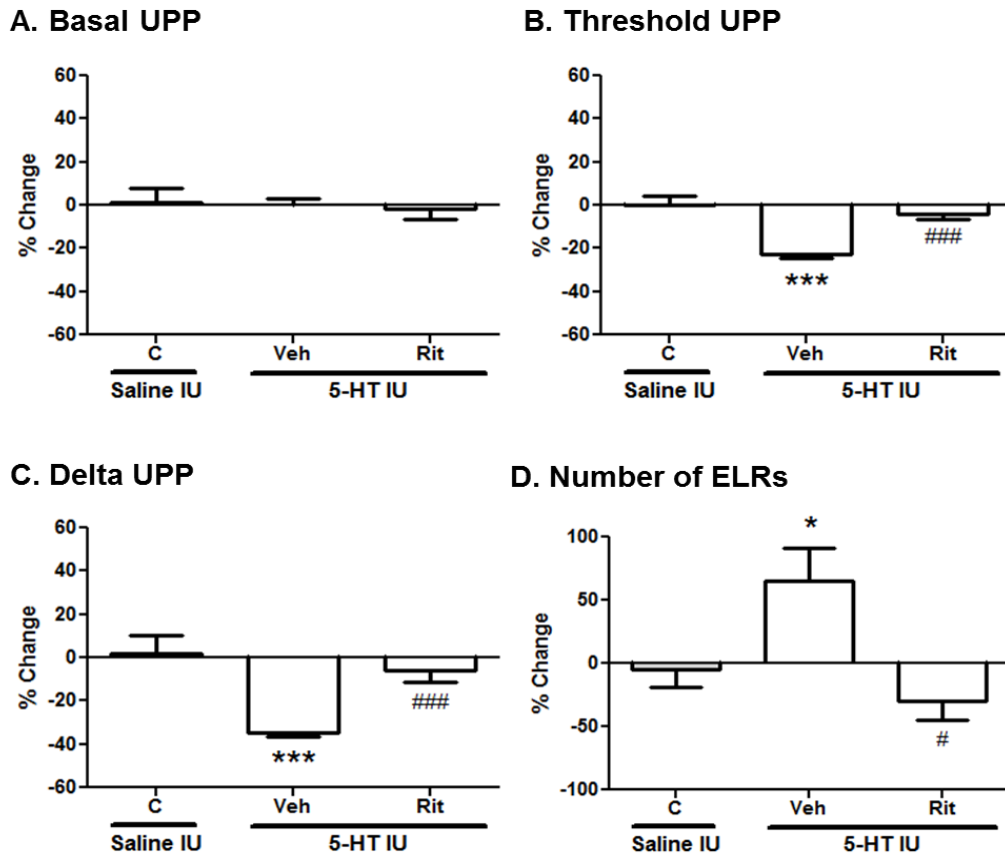
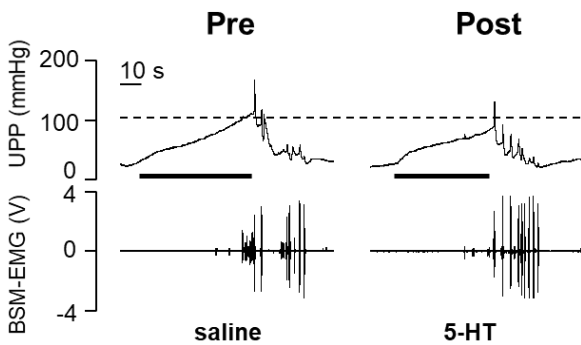
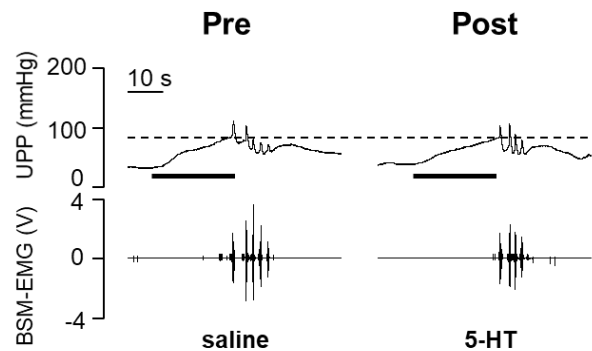


Fig. 11 Ritanserin blocked the 5-HT-induced facilitation of the urethrogeital reflex (UGR).

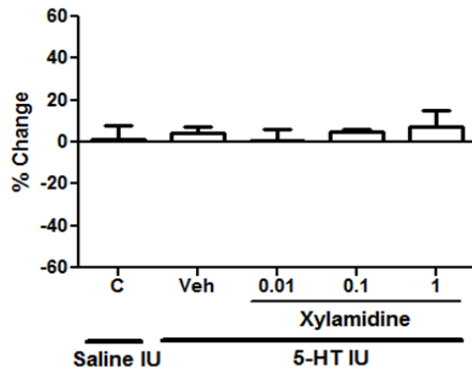
A, B, C and D shows each parameter obtained in UGR studies (see Fig. 4). Vehicle or ritanserin (1 mg/kg, i.v.), a 5-HT<sub>2</sub> antagonist, was administered 15 minutes before the third UGR. Intraurethral perfusion of 5-HT solution (300  $\mu$ M) started 10 minutes before the second UGR. C = control (saline intraurethral perfusion and no drug, n = 8); Veh = vehicle (10% dimethylacetamide and 5% cremophor in saline, n = 8). The thick horizontal bar indicates the occlusion period or latency to first burst. Rit = ritanserin 1 mg/kg (n = 6). \*P < 0.05 vs control, \*\*\*P < 0.001 vs control (unpaired *t*-test). #P < 0.05, ###P < 0.001 Ritanserin vs Vehicle (unpaired *t*-test).

**Vehicle (i.v.)****Xylamidine (1 mg/kg, i.v.)**

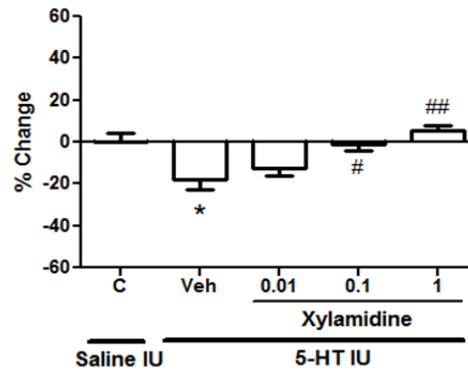
**Fig. 12** Physiological tracings showing xylamidine attenuated the 5-HT-induced facilitation of the urethro-genital reflex (UGR).

Xylamidine, a peripherally restricted 5-HT<sub>2</sub> antagonist, inhibited the intraurethral 5-HT-induced facilitation of the UGR. The left panel shows 5-HT-induced facilitation of the UGR (decrease in urethral perfusion pressure [UPP] and increase in number of bulbospongiosus muscle electromyogram [BSM-EMG] bursts) with vehicle. Right panel shows the lack of 5-HT-induced facilitation of the UGR with xylamidine. Pre = saline infusion, second UGR; Post = third UGR, with 5-HT infused 10 minutes before the third UGR. Xylamidine or vehicle (Saline) was given immediately after the second UGR. The thick horizontal bar indicates the occlusion period or latency to first burst.

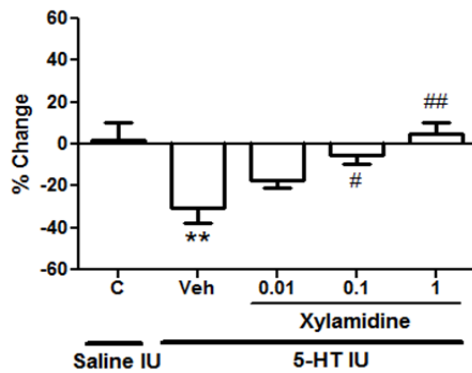
### A. Basal UPP



### B. Threshold UPP



### C. Delta UPP



### D. Number of ELRs

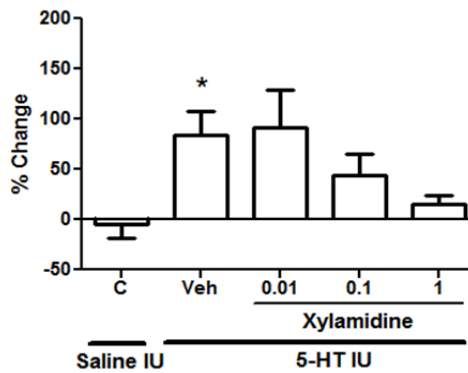


Fig. 13 Xylamidine dose-dependently inhibited the 5-HT-induced facilitation of the urethrogeital reflex (UGR).

A, B, C and D shows each parameter obtained in UGR studies (see Fig. 4). Vehicle or xylamidine (0.01, 0.1, and 1 mg/kg, i.v.;  $n = 5$  for each group) was administered 15 minutes before the third UGR. Intraurethral perfusion of 5-HT solution (300  $\mu$ M) started 10 minutes before the second UGR. C = control (saline intraurethral perfusion and no drug treatment,  $n = 8$ ); Veh = vehicle (saline,  $n = 8$ ). The thick horizontal bar indicates the occlusion period or latency to first burst. \* $P < 0.05$  vs control, \*\* $P < 0.01$  vs control (unpaired  $t$ -test). # $P < 0.05$  vs vehicle, ## $P < 0.01$  vs vehicle (one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test).

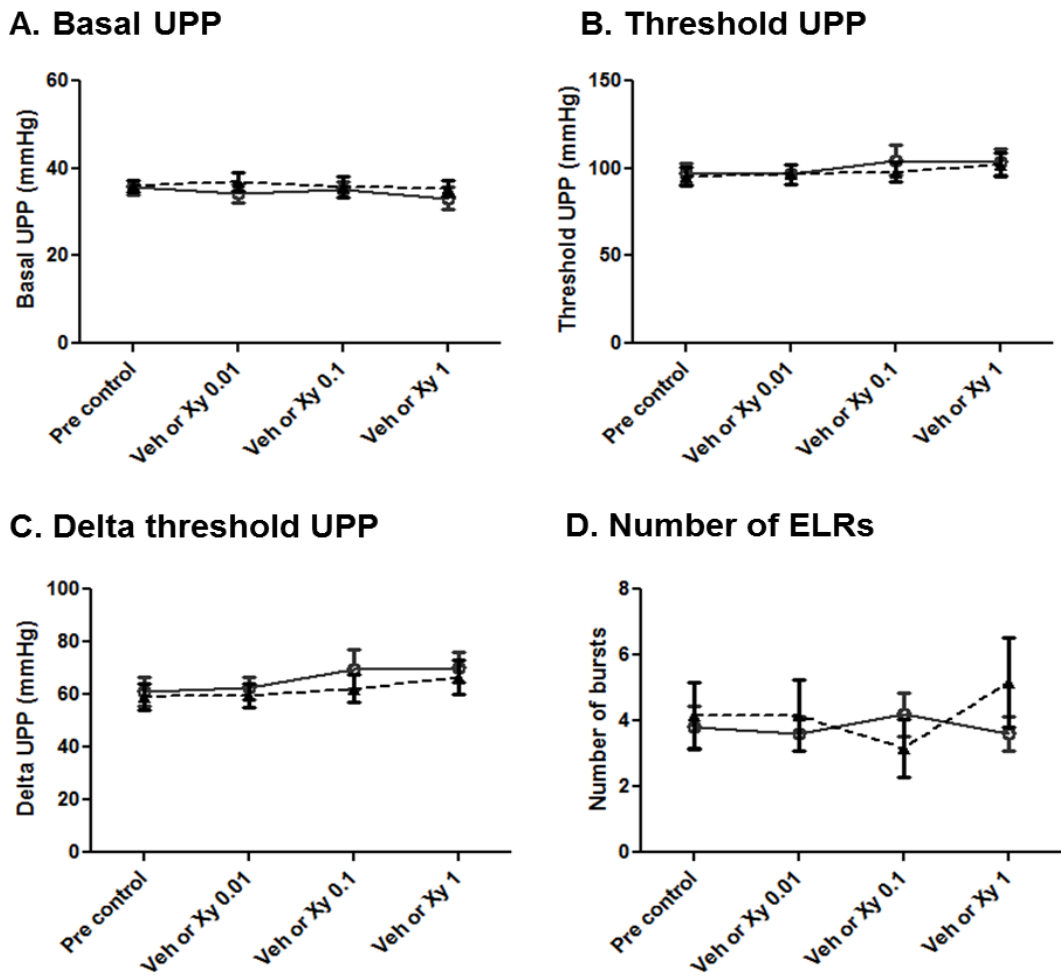


Fig. 14 Xylamidine did not alter the normal urethro-genital reflex (UGR).

A, B, C and D shows each parameter obtained in UGR studies (see Fig. 4). Saline was continuously infused through the urethra. Vehicle (saline) or xylamidine (0.01, 0.1 and 1 mg/kg, i.v.) was administered in increasing doses 5 minutes before third, fourth, and fifth UGR, respectively. Pre control was second UGR. Veh = saline; Xyl = xylamidine (both n = 6). The straight line represents the vehicle treatment group. The dotted line represents the xylamidine treatment group. No statistically significant differences were found (two-way ANOVA followed by Bonferroni's comparison test).

## 第二章 新規のセロトニン 2C (5-HT<sub>2C</sub>) 受容体アゴニスト ASP2205 の 雌性ラット尿道機能に対する作用とそのメカニズムに関する検 討

### 第一節 背景

腹圧性尿失禁 (stress urinary incontinence; SUI) は特に女性に多く見られ、咳やくしゃみ、重い荷物を持った時、運動時などに腹部に強く圧力がかかることによって、膀胱の収縮を伴わずに不随意に尿が漏れ出る疾患である。病態生理学的には、蓄尿期において、腹圧によって上昇した膀胱内圧 (IVP) が尿道抵抗を上回ることが尿漏れの原因となる。通常は、腹圧の上昇時には尿道抵抗が反射によって上昇するため、尿禁制が保たれるが、SUI の患者では骨盤内臓器を支持する骨盤底筋群の脆弱化による尿道過可動 (urethral hypermobility) や内因性括約筋不全 (intrinsic sphincter deficiency) による尿道括約筋の機能低下によって尿道抵抗が低下していることが知られている (Delancey et al., 2004; de Vries et al., 2018)。そのため、薬剤によって腹圧上昇時の尿道抵抗を上昇させることが SUI の疾患の改善につながると考えられている (Thor, 2003)。

尿道抵抗の上昇に重要な役割を果たしている尿道括約筋は平滑筋と横紋筋の2種類の筋肉から成り立っており、それぞれ自律神経と体制神経により収縮反応が制御されている。蓄尿期には、膀胱内の尿量の増加及び IVP の上昇で求心性神経 (骨盤神経) が活性化し、脊髄における反射を介して尿道抵抗が上昇する。すなわち、交感神経 (下腹神経) を介した尿道平滑筋の収縮、ならびに体性神経 (陰部神経) を介して横紋筋である外尿道括約筋 (external urethral sphincter; EUS) の収縮反応が惹起されることによって尿道抵抗が上昇する (Chancellor and Yoshimura, 2004)。下腹神経の神経終末から遊離したノルアドレナリンが、アドレナリン  $\alpha 1$  受容体の

刺激を介して尿道平滑筋の収縮に関与することは広く知られている (Andersson, 2004; Fry et al., 2010)。EUS の収縮反応は、陰部神経の起始核である仙髄のオヌフ核におけるグルタミン酸シグナルを介した運動ニューロンの活性化、そしてその結果として陰部神経の神経終末から遊離したアセチルコリンによって惹起される (Thor, 2003; Chancellor and Yoshimura, 2004; Kawamorita et al., 2015)。オヌフ核にはセロトニン及びノルアドレナリン神経及びそれらの受容体が豊富に発現していることから、セロトニン及びノルアドレナリンが EUS の収縮反応の制御に寄与することが示唆されている (Thor, 2003; Schuessler, 2006)。さらに、SUI の治療薬としてヨーロッパで承認されているセロトニン・ノルエピネフリン再取り込み阻害薬 (serotonin/norepinephrine reuptake inhibitor; SNRI) の duloxetine は、オヌフ核においてシナプス間隙のセロトニン及びノルエピネフリンの量を上昇させて、 $\alpha_1$  受容体や 5-HT<sub>2c</sub> 受容体を刺激することにより、脊髄のグルタミン酸シグナルを活性化すると報告されている (Thor, 2003; Schuessler, 2006; Kawamorita et al., 2015)。これまでの研究によると、オヌフ核に 5-HT<sub>2c</sub> 受容体が発現しており、さらに脊髄の 5-HT<sub>2c</sub> 受容体の刺激がラットのくしゃみモデルにおける尿道の閉鎖反応 (UCR) の増強に関与することから、5-HT<sub>2c</sub> 受容体は前述のオヌフ核におけるグルタミン酸シグナルの活性化に関わっていることが示唆されている (Fonseca et al., 2001; Miyazato et al., 2009)。これらの知見から、5-HT<sub>2c</sub> 受容体アゴニストは SUI 患者の尿道抵抗を高めることによって、腹圧上昇時の尿漏れを抑制する効果が期待される。近年では、抗肥満薬として承認されている選択的 5-HT<sub>2c</sub> 受容体アゴニストである lorcaserin の静脈内投与によってラットの尿道閉鎖反応 (urethral closure response; UCR) が増強したという報告もある (Ouchi et al., 2018)。しかしながら、lorcaserin を用いた過去の研究では、lorcaserin による UCR の増強作用のメカニズムについては検討されていない。

ASP2205 フマル酸 (以下、ASP2205 と記す) はアステラス製薬株式会社にて見

出された新規の選択的 5-HT<sub>2C</sub> 受容体アゴニストである (Fig. 15)。本研究では、この ASP2205 の *in vitro* プロファイルを明らかにし、さらにラットの尿道機能の評価系により尿漏れに対する抑制効果の可能性について検討した。また、ASP2205 の尿道機能に対する作用メカニズムに関する検証を実施した。



## 第二節 実験項

### 1) 実験動物

全ての実験には雌性 Sprague-Dawley ラット (200–320 g, Japan SLC, Hamamatsu, Japan) を使用した。ラットは自由飲水及び自由飲食の条件下で 12 時間ごとの明暗サイクルにより飼育した。本章の全ての実験は、AAALAC インターナショナル (国際実験動物管理公認協会) の認証施設であるアステラス製薬株式会社の動物実験委員会の承認を受けて実施した。

### 2) 細胞内カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 濃度変化を指標とするアゴニスト作用評価

本実験には human 5-HT<sub>2A</sub>、human 5-HT<sub>2B</sub>、human 5-HT<sub>2C</sub> (INI isoform) 受容体もしくは rat 5-HT<sub>2C</sub> (INI isoform) 受容体をそれぞれ過剰発現させたチャイニーズハムスター卵巣細胞 (Chinese hamster ovary; CHO) 細胞を使用した。評価の前日、上記の細胞をそれぞれ 8 mM の L-グルタミンを添加した CHO 細胞の専用培地 (CD-CHO) に懸濁し、ポリ-D-リジンでコーティングされた透明底の黒色 96 ウェルプレートに  $3.0 \times 10^4$  cells/well の密度で播種した後、CO<sub>2</sub> インキュベータを用いて一晩培養した (37°C)。実験当日、プレートから培地を除去した後、Ca<sup>2+</sup> の蛍光プローブである Fluo 4-AM を含むアッセイバッファー [20 mM HEPES (pH 7.4)、0.1% ウシ血清アルブミン、2.5 mM プロベネシドを含有するハックス平衡塩液] を細胞プレートに添加し、室温で 3 時間インキュベートした。アッセイバッファーで細胞を洗浄した後、FLIPR TETRA® (Molecular Devices Corporation Japan, Tokyo, Japan) を用いて、被験化合物を添加後の蛍光強度の変化 (細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の変化) を指標にアゴニスト作用を評価した。化合物を添加後の蛍光強度の最大変化 (励起波長: 470–495 nm、蛍光波長: 515–575 nm) を記録した。被験化合物のアゴニスト作用は、10 μM のセロトニン溶液による反応を 100%、0.1% のジメチルスルホ

キシド (DMSO) 溶液による反応を 0% と設定して、各濃度における反応の大きさを % で表記した。

### 3) ASP2205 の血漿中濃度の測定

被験化合物の消化管吸収における食餌の影響を除くため、実験に使用するラットを実験の前日より絶食した。ペントバルビタール (50 mg/kg, i.p.) により麻酔し、ASP2205 を投与するためのカテーテル (PE100) を十二指腸内に挿入して糸で固定した。また経時的に血液を採取するため、ヘパリン (50 U/mL) を含有した生理食塩水を満たしたカテーテル (PE50) を、ラットの頸動脈に挿入して糸で固定した。ASP2205 (0.3 mg/kg) の十二指腸内への投与後、10、20、30、60 及び 120 分の各時点において、各個体から経時的に血液を採取した。採取した血液を遠心分離し、ASP2205 の濃度測定のための血漿サンプルを得た。これら血漿サンプルをタンパク沈降で処理した後、HPLC tandem mass spectrometry 法によって血漿中の ASP2205 の濃度を求めた。

### 4) 尿漏出時圧 (Leak point pressure; LPP) の測定

尿漏出時圧 (LPP) の評価方法は、過去の実験方法に従った (Yanai-Inamura et al., 2017)。被験化合物の消化管吸収における食餌の影響を除くため、実験に使用するラットを実験の前日より絶食した。ペントバルビタール (50 mg/kg, i.p.) により麻酔した後、仰臥位にて手術ならびに LPP の評価を実施した。ASP2205 を投与するためのカテーテル (PE100) を十二指腸内に挿入して糸で固定した。さらに、その他の被験化合物を投与するためのカテーテル (PE50) を大腿静脈に挿入して同様に固定した。次に、膀胱へのカテーテル留置のために腹部を切開して膀胱を露出させた。先端を炎であぶって返しをつけたカテーテル (PE100) を膀胱頂部から膀胱に挿入して糸で固定した後、筋層及び皮膚をそれぞれ縫合して閉腹した。膀胱内

圧 (intravesical pressure; IVP) を測定するため、膀胱カテーテルの他端は三方活栓を介して、一方はシリンジポンプ、他方は圧トランスデューサーを介してひずみ圧アンプ (AP-621G、日本光電、Tokyo、Japan) に接続した。膀胱内の尿を排出させて膀胱内を空の状態にした後、膀胱カテーテルを介して生理食塩水を膀胱にゆっくりと注入し、各個体の膀胱容量 (本実験条件下で膀胱内に貯留可能な最大の容量) を求めた。再度、膀胱を空にした後、個体ごとに膀胱容量の 75% の量の生理食塩水を膀胱内に注入した。膀胱内圧 (IVP) の測定を開始して IVP の基礎値が安定していることを確認した後、腹部を 50 mL 遠心チューブの蓋の平らな面でゆっくりと押し、外尿道口から漏れが認められるまで IVP を上昇させた。腹圧は外尿道口からの漏れを確認した直後に解除した。漏れが認められた時点の IVP を尿漏出時圧 (LPP) とした (Conway et al., 2005)。被験化合物の評価の前に、この LPP 測定の手続きを 1 分間隔で 5 回以上繰り返した。各個体で繰り返し安定した LPP の値が得られていることを確認し、最後の 3 回の LPP の平均値を各個体のプレ値とした。ASP2205 (0.1–1 mg/kg) もしくは溶媒 (生理食塩水) を十二指腸内に投与後、30 分の時点において 1 分間隔で LPP を 3 回測定し (投与後 29、30、31 分の 3 回)、その平均値を薬剤投与後の LPP のポスト値とした。アンタゴニストを用いた実験では、ASP2205 (0.3 mg/kg) の十二指腸内投与の 2 分前に、5-HT<sub>2C</sub> 受容体アンタゴニストである SB242085 (0.3 mg/kg) を静脈内投与した。本実験で得られる圧データは PowerLab® (software LabChart®, ADInstruments, Australia) を用いて PC に記録した。LabChart® を用いてそれぞれの LPP の値を算出し、個体ごとに LPP のプレ値とポスト値の差を算出して統計解析を行った。

#### 5) 膀胱内圧上昇による尿道閉鎖反応 (UCR) の評価

膀胱内圧 (IVP) の急激な上昇によって誘導される尿道の閉鎖反応 (urethral closure response; UCR) は過去に報告された実験手法に従って実施した (Kamo et

al., 2004)。ラットをペントバルビタール (50 mg/kg, i.p.) により麻酔した後、仰臥位で実験台に寝かせて、手術ならびに評価を実施した。まず、被験化合物を投与するためのカテーテル (PE50) を大腿静脈に挿入し固定した。次に、開腹して膀胱を露出させた後、本評価で IVP を上昇させた際に膀胱から尿道へ生理食塩水が流入しないように膀胱頸部を糸で結紮した。IVP の測定及び膀胱への生理食塩水のインフュージョンのために、先端を炎であぶって返しをつけたカテーテル (PE100) を膀胱頂部より挿入して糸で固定した。尿道内圧 (urethral pressure; UP) の測定には、Millar 社のマイクロチップ・トランスデューサー付きカテーテル (3.5-Fr, SPR-524, Millar Instruments, Houston, TX, USA) を使用した。このカテーテルを外尿道口より挿入し、トランスデューサーのセンサー部分が中部尿道 (外尿道口から 12.5–15 mm の位置) の内側の 3 時の方向に当たる位置でカテーテルを固定した (Kamo et al., 2004)。カテーテルの位置及び向きが実験中にずれないように注意した。膀胱カテーテルの他端は三方活栓を介して、生理食塩水を膀胱内にインフュージョンするためのリザーバー、及び IVP 測定のための圧トランスデューサーと圧アンプ (AP-601G、日本光電、Japan) にそれぞれ接続した。リザーバーには生理食塩水を満たし、リザーバーの水面が動物の膀胱から 40 cm の高さとなる位置で実験用スタンドに固定した。本評価では、尿道閉鎖反応 (UCR) を惹起しない間はリザーバーと膀胱の間のコックを閉鎖した上で膀胱を空にして膀胱への圧負荷がかからないように保ち、UCR を惹起する際には膀胱とリザーバーを連結するコックを開くことで、急激な IVP 上昇 (40 cmH<sub>2</sub>O) を誘導した。実験のセットアップが完了したところで、まず膀胱を一旦空にしてリザーバーと連結する三方活栓のコックを開き、IVP を 40 cmH<sub>2</sub>O に上昇させることによって膀胱尿道反射を惹起した。本研究では、この膀胱尿道反射による尿道内圧 (UP) の上昇反応を尿道閉鎖反応 (UCR) と定義した。40 cmH<sub>2</sub>O の IVP を 30 秒間保持した後、リザーバーに連結する三方活栓のコックを閉じて膀胱内の生理食塩水を排出した。これら一連の操作を、UCR

の大きさが安定するまで 5 分間隔で実施した。UCR の程度が安定していることを確認した後、膀胱が空の状態 ASP2205 (0.3 mg/kg) もしくは溶媒を静脈内に投与した。投与 5 分後に再びリザーバーに連結するコックを開いて UCR を惹起した。アンタゴニストを用いた実験では、5-HT<sub>2C</sub> 受容体アンタゴニストである SB242084 (0.3 mg/kg, i.v.) を ASP2205 投与の 2 分前に投与した。外尿道括約筋 (external urethral sphincter; EUS) を支配する運動神経である陰部神経に対する ASP2205 の影響を検討する実験では、評価を開始する前に両側の陰部神経を切断した個体を陰部神経切断群 (pudendal nerve transection; PNT)、神経を切断しない群を健常群 (Intact) として評価に使用した。

本実験における尿道内圧のデータは PowerLab<sup>®</sup>を用いて PC に記録した。UCR を惹起する直前及び直後のそれぞれ 10 秒間の平均尿道内圧を LabChart<sup>®</sup>を用いて解析した。UCR による尿道内圧の上昇の大きさを各群で比較した。また、膀胱が空の状態測定した尿道内圧の 10 秒間の平均値を静止時尿道内圧 (resting UP) と定義した。

## 6) 被験化合物

ASP2205 フマル酸塩 (Fig. 15) 及び lorcaserin 塩酸塩 (Smith et al., 2008) はアステラス製薬において合成されたものを実験に使用した。セロトニン (5-HT) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。SB242084 は TOCRIS Bioscience (Bristol, UK) 及び Sigma-Aldrich より購入したものをを用いた。

FLIPR を用いた *in vitro* 評価では、ASP2205、lorcaserin 及びセロトニンは DMSO で溶解後に蒸留水及びアッセイバッファーを用いて希釈した (評価時の最終 DMSO 濃度は 0.1%)。

LPP 及び血漿中濃度測定実験では、ASP2205 は生理食塩水で溶解及び希釈し、5 mL/kg の容量で十二指腸内に投与した。SB242084 は 10% *N,N*-ジメチルホルムア

ミド(DMF)及び5% クレモフォル® EL を含む生理食塩水に溶解して0.3 mg/mL 溶液を調製し、1 mL/kg の容量を静脈内に投与した。

尿道の閉鎖反応に関する実験では、ASP2205 は5% DMF を含む生理食塩水に溶解して0.3 mg/mL 溶液を調製し、1 mL/kg の容量を静脈内に投与した。SB242084 はLPPの実験と同様に調製した。

## 7) 統計解析

実験データの統計解析には、SAS software (SAS Institute Japan Ltd., Tokyo, Japan) 及び GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を使用した。

FLIPR を用いた *in vitro* 実験では、SAS のシグモイド-Emax 型非線形回帰分析により、50%効果濃度 (EC<sub>50</sub>) 及び最大反応 (Emax) を算出した。

*In vivo* 実験のデータは全て mean±SEM で表記した。データの統計解析については、2群間の比較には Student's *t*-test、多群の比較には、one-way ANOVA 及び Dunnett's multiple comparison を用いた。P<0.05 の場合に統計的な有意差有りと判断した。

### 第三節 実験結果

#### 1) 5-HT<sub>2A</sub>、5-HT<sub>2B</sub>及び5-HT<sub>2C</sub>受容体に対するアゴニスト作用

ASP2205 の 5-HT<sub>2C</sub> 受容体に対するアゴニスト作用、ならびに 5-HT<sub>2A</sub> 及び 5-HT<sub>2B</sub> 受容体との選択性について、ヒト 5-HT<sub>2</sub> 受容体の各サブタイプ及びラット 5-HT<sub>2C</sub> 受容体をそれぞれ過剰発現させた CHO 細胞に化合物を添加した際の細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の変化を指標に評価した。本実験では、ASP2205 以外に比較対照化合物として lorcaserin 及びセロトニンについても評価を実施した。今回の評価系において、lorcaserin 及びセロトニンの 5-HT<sub>2</sub> 受容体の各サブタイプに対するアゴニスト作用及び選択性はこれまでに報告されている値と同程度であることを確認した (Thomsen et al., 2008; Cheng et al., 2016)。ASP2205 は 5-HT<sub>2C</sub> 受容体に対するフルアゴニストであり、その EC<sub>50</sub> の値は human 5-HT<sub>2C</sub> 受容体に対して 0.85 nM 及び rat 5-HT<sub>2C</sub> 受容体に対して 2.5 nM とヒト及びラットの 5-HT<sub>2C</sub> 受容体に対して同程度の活性を有することを確認した (Fig. 17 and Table 3)。ASP2205 は human 5-HT<sub>2A</sub> 受容体に対しては部分アゴニスト作用を示し、その活性値は E<sub>max</sub> が 79%、EC<sub>50</sub> が 96 nM であった (Fig. 17 and Table 3)。ASP2205 の human 5-HT<sub>2B</sub> 受容体に対する作用は、検討した最大濃度の 10 µM で 19%の刺激作用であった (Table 3)。5-HT<sub>2B</sub> 受容体に対する作用については、SAS の非線形回帰分析が困難なこと、及び検討濃度よりも高い EC<sub>50</sub> 値について信頼性に欠けることから EC<sub>50</sub> 値は算出不可とした。

#### 2) ASP2205 の血漿中濃度検討

*In vivo* 薬効評価 (LPP 評価) 条件における ASP2205 の体内の暴露量を確認するため、ASP2205 (0.3 mg/kg) を十二指腸内に投与した後の血漿中濃度について検討した。ASP2205 の濃度は、ラットにおける ASP2205 の血漿中タンパク非結合形

分率 (fp) を用いて血漿中のフリー体の濃度として表記した。十二指腸内投与後の ASP2205 の血漿中フリー体濃度は投与 30 分後にピークを示し、その濃度は  $1.3 \pm 0.39$  nM であった (Fig. 18)。

### 3) 雌性ラットの尿漏出時圧 (LPP) に対する ASP2205 の作用

ASP2205 の LPP に対する作用をペントバルビタール麻酔した雌性ラットを用いて評価した。前述の実験において ASP2205 の十二指腸内投与 (i.d.) 後の血中濃度のピークは投与 30 分後の時点であったことから、本実験では ASP2205 (0.1–1 mg/kg) もしくは溶媒 (生理食塩水) の十二指腸内投与 30 分後における LPP 値の投与前置 (プレ値) との差を薬効評価の指標とした。LPP のプレ値は、溶媒群で  $46.5 \pm 3.1$  mmHg、ASP2205 の 0.1、0.3、1 mg/kg の各用量の投与群ではそれぞれ  $47.7 \pm 2.0$ 、 $47.7 \pm 2.4$ 、 $46.9 \pm 1.3$  mmHg であり、各群間で有意な差は無かった。ASP2205 の十二指腸内投与により LPP は用量依存的に上昇した (Fig. 19A 及び B)。ASP2205 による LPP の上昇幅は、0.3 mg/kg で  $6.2 \pm 0.71$  mmHg、1 mg/kg で  $8.2 \pm 2.3$  mmHg であり、これらの用量ではいずれも溶媒群に比して有意な LPP の上昇を示した ( $P < 0.05$  at 0.3 mg/kg、 $P < 0.01$  at 1mg/kg、Fig. 19B)。5-HT<sub>2C</sub> 受容体アンタゴニストである SB242084 (0.3 mg/kg) の静脈投与は、通常の LPP には影響を与えなかったものの、ASP2205 (0.3 mg/kg、i.d.) による LPP の上昇に対しては有意な抑制作用を示した ( $P < 0.01$ 、Fig. 19C)。

### 4) 膀胱内圧 (IVP) 上昇による尿道閉鎖反応 (UCR) に対する ASP2205 の作用

IVP の急激な上昇時の尿道内圧 (UP) の変化量を評価した。陰部神経の機能が正常なラットでは、膀胱が空の状態における静止時の尿道内圧 (resting UP) は  $16.3 \pm 3.2$  mmHg ( $n = 5$ ) であり、IVP を 40 cmH<sub>2</sub>O に急上昇させることによる尿道内圧の上昇幅は  $6.7 \pm 1.0$  mmHg ( $n = 5$ ) であった。ASP2205 (0.3 mg/kg、i.v.)



の投与は resting UP に対しては影響しなかった (Fig. 20A)。一方、IVP の上昇に伴う尿道内圧の上昇作用は、ASP2205 の投与によって溶媒群に比して有意に増大した ( $P < 0.05$ , Fig. 20B)。ASP2205 による、この UCR の増強作用は、SB242084 (0.3 mg/kg, i.v.) の前投与によって消失した (Fig. 20C)。

#### 5) 陰部神経切断ラットにおける尿道閉鎖反応 (UCR)

IVP の急激な上昇時の UCR に対する ASP2205 の増強作用における陰部神経の関与について検討するため、両側の陰部神経を切断したラットを用いて、前述の実験と同様に IVP 上昇時の尿道内圧の変化について検討した。陰部神経切断ラットの resting UP は  $14.6 \pm 1.3$  mmHg ( $n = 4$ ) であり、陰部神経を切断していないラットとの間に顕著な差は認められなかった。陰部神経切断ラットでは IVP の急激な上昇による尿道内圧の上昇反応が消失した ( $P < 0.01$ , Fig. 21A)。さらに、これらの陰部神経切断ラットでは、ASP2205 (0.3 mg/kg, i.v.) の投与による UCR の増強作用も認められなかった (Fig. 21B)。

#### 第四節 考察

本研究では、5-HT<sub>2</sub>受容体の各サブタイプをそれぞれ過剰発現させた CHO 細胞を用いて新規の 5-HT<sub>2C</sub>受容体アゴニストである ASP2205 の *in vitro* 作用のプロファイルを明らかにした。また、雌性ラットの LPP を指標に尿漏れに対する抑制作用に関する検証を行った。さらに、ASP2205 による尿漏れの抑制作用のメカニズムを検証するため、IVP の急激な上昇による尿道の閉鎖反応 (UCR) に尿道内圧を指標に評価した。

これまでに、lorcaserin を含むいくつかのベンザゼピン化合物が 5-HT<sub>2C</sub>受容体の選択的アゴニストとして報告されている (Smith et al., 2008)。ASP2205 (Fig. 15) はアステラス製薬によって発見された新規のベンザゼピン化合物である (アステラス製薬特許化合物、特許番号: WO2011111817)。Lorcaserin と ASP2205 の 5-HT<sub>2C</sub>受容体アゴニスト作用及び他のサブタイプとの選択性について、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の変化を指標とした同一の評価系を用いて直接比較した結果、lorcaserin に比較して ASP2205 はヒト及びラットの 5-HT<sub>2C</sub>受容体に対してそれぞれ 2.7 倍及び 2.1 倍強い効力を示した (Table 3)。ASP2205 と lorcaserin は、いずれも 5-HT<sub>2A</sub>受容体に対しては部分アゴニストで同等の効力を示した一方で、5-HT<sub>2B</sub>受容体に対して lorcaserin は ASP2205 よりも強力な活性を示した (Table 3)。これらの結果は、ASP2205 がすでに臨床で用いられている薬剤である lorcaserin と比較して、効力及びサブタイプ選択性の観点で改善した化合物であることを示唆している。

過去の研究によると、ラットで 5-HT<sub>2C</sub>受容体の刺激はくしゃみ反射などで誘発されるアクティブな尿道閉鎖反応 (UCR) に関与することが示唆されている (Miyazato et al., 2009; Ouchi et al., 2018; Suzuki et al., 2018)。宮里らは、5-HT<sub>2B/2C</sub>アゴニストである mCPP の脊髄内投与によってラットのくしゃみ誘発尿道内圧上昇作用が増強されること、さらにその増強作用は 5-HT<sub>2C</sub>受容体阻害剤である RS-

102221 の投与によって阻害されたことから、脊髄における 5-HT<sub>2C</sub> 受容体刺激が腹圧上昇による UCR の増強に寄与することを報告している (Miyazato et al., 2009)。くしゃみ反射による尿道内圧の上昇反応は陰部神経を介した EUS の収縮によるものであるとの実験結果があることから (Kamo et al., 2003)、5-HT<sub>2C</sub> 受容体の刺激は EUS の収縮を増強することによって尿道抵抗の上昇に寄与すると考えられる。

ASP2205 の腹圧上昇時の尿漏れに対する抑制効果は、膀胱に生理食塩水を貯留した条件下で腹部に圧をかける方法 (Crede 法) で得られる LPP の値を指標に評価した (Conway et al., 2005)。Crede 法による LPP の測定では両側の陰部神経の切断によって LPP が著しく低下することから、陰部神経を介する EUS の収縮が LPP に大きく寄与することが分かっている (Conway et al., 2005; Jiang et al., 2009, 2011)。LPP に寄与する因子の定量的な検討結果によると、EUS の収縮による尿道抵抗は単一の成分として LPP の 40%以上の割合を占めており、残りの 60%は尿道平滑筋や尿道粘膜のシール効果、上位中枢神経の関与などのその他の因子が関与することが示唆されている (Jiang et al., 2011)。これらの知見から、本方法による LPP 評価は、EUS の収縮を増強する薬剤の尿漏れに対する効果を評価するのに適した方法であると考えられる。本研究において、ASP2205 (0.1–1 mg/kg) の十二指腸内投与により、雌性ラットの LPP が用量依存的に上昇することが確認された (Fig. 19A 及び B)。これらの結果は、ASP2205 が尿道抵抗を上昇させることで膀胱収縮を伴わない不随意の尿漏れを抑制する可能性を示唆しており、lorcaserin による雌性ラットの LPP の上昇を確認した過去の研究成果と一致する結果である (Ouchi et al., 2018)。

次に、ASP2205 が実際に尿道抵抗の上昇に寄与すること、及びそのメカニズムを明らかにするため、膀胱内圧 (IVP) を急激に上昇させることにより誘導される、膀胱尿道反射を介した尿道閉鎖反応 (UCR) に対する ASP2205 の作用について検証した。本評価において、両側の陰部神経を切断したラットでは静止時尿道内圧

(resting UP)が正常のラットと変わらないものの、急激な IVP の上昇(40 cmH<sub>2</sub>O)による UCR が消失していることを確認した (Fig. 21A)。この結果は、以前の報告 (Kamo et al., 2004) と同様、本評価で惹起される UCR は、大部分が陰部神経を介した尿道の収縮反射に伴う尿道抵抗の上昇であることを示唆している。ASP2205 (0.3 mg/kg, i.v.) は、resting UP には影響せずに陰部神経が正常な雌性ラットの UCR を増強した (Fig. 20B)。一方で、陰部神経を切断したラットでは ASP2205 による UCR の増強は認められなかった (Fig. 21B)。Resting UP は主に交感神経を介した尿道平滑筋の緊張によって調節されることが知られていることから (de Vries et al., 2018)、上記の結果は、ASP2205 が尿道平滑筋の緊張に対しては影響を与えずに、陰部神経を介した EUS の収縮反応を増強していることを示唆している。また、ASP2205 の LPP 及び UCR に対する作用は、いずれも選択的 5-HT<sub>2C</sub> 受容体アンタゴニストである SB242084 (0.3 mg/kg, i.v.) によって抑制されたことから、ASP2205 の尿道に対するこれらの作用は 5-HT<sub>2C</sub> 受容体の刺激に基づく反応であると考えられる。本研究において、SB242084 は ASP2205 の非存在下では LPP 及び UCR に対して顕著な影響を及ぼさなかった (Figs. 19C 及び 20C)。この結果は、ラットの生理的条件下では、ASP2205 の作用部位におけるセロトニン濃度が、今回の評価モデルの LPP もしくは UCR に寄与するのに十分な濃度ではない可能性を示唆している。内因性のセロトニンの UCR に対する寄与に関しては、今後さらなる検討が必要である。

本研究は ASP2205 を全身性に投与した結果であることから、ASP2205 の作用部位に関しては特定していない。ラットのくしゃみ反射による UCR が脊髄の 5-HT<sub>2C</sub> 受容体の刺激により増強され (Miyazato et al., 2009)、さらに 5-HT<sub>2C</sub> 受容体が仙髄のオヌフ核に発現している (Fonseca et al., 2001) というこれまでの報告を踏まえると、脊髄における 5-HT<sub>2C</sub> 受容体刺激が UCR の増強に関与する可能性がある。一方で、これまでの知見として、脳、末梢神経、もしくは筋に対する直接作用によっ

て UCR が増強されるというエビデンスは見つかっていない。ASP2205 の体内動態に関する検討では、ASP2205 の単回投与により良好な中枢移行性が確認されている (data not shown)。これらの事実を考慮すると、ASP2205 による UCR の増強は脊髄の 5-HT<sub>2C</sub> 受容体を刺激することによる作用であると推察される。ASP2205 の作用部位に関するこの仮説を証明するためには、今後、脊髄内投与やオヌフ核における 5-HT<sub>2C</sub> 受容体の活性を確認するための磁気共鳴機能画像法 (functional MRI) といった検討が必要と考えられる。

尿道の収縮反応の低下は SUI の主な原因の一つである (Delancey et al., 2004; de Vries et al., 2018)。SNRI である duloxetine は、ヒト及び動物で尿道の収縮反射を増強することが確認されており (Thor, 2003; Miyazato et al., 2008; Boy, 2006)、EUS の収縮増強が SUI 患者における不随意の尿失禁の抑制に寄与すると考えられている (Thor, 2003; Schuessler, 2006)。本研究では、ASP2205 が雌性ラットにおいて膀胱内圧の上昇による UCR を増強し、かつ LPP を上昇させることを明らかにした。すなわち、ASP2205 は duloxetine と同様に SUI 患者の不随意の尿失禁に対する抑制作用を示すことが示唆される。加えて、ASP2205 は 5-HT<sub>2C</sub> 受容体に対する選択的な化合物であることから、duloxetine と比較して、非選択的なセロトニン受容体の刺激やノルアドレナリン受容体の刺激による副作用の懸念が低いことが期待される。

以上、本研究では ASP2205 が強力かつ選択的な 5-HT<sub>2C</sub> 受容体アゴニストであることを示した。また、ASP2205 は麻酔下の雌性ラットにおいて陰部神経を介する尿道の閉鎖反応を増強することを確認した。すなわち、ASP2205 は 5-HT<sub>2C</sub> 受容体を介して腹圧上昇時の EUS の収縮を増強することで、SUI 患者の尿失禁の症状を改善する新規の治療薬となる可能性が示唆された。

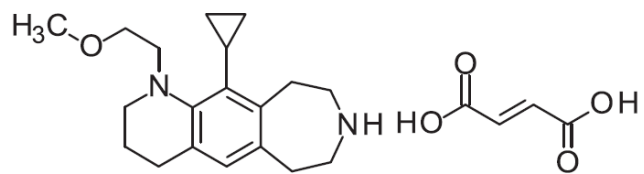
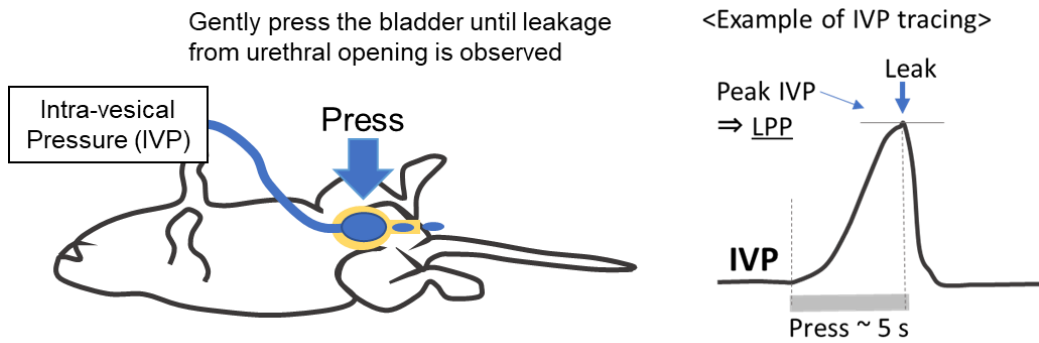
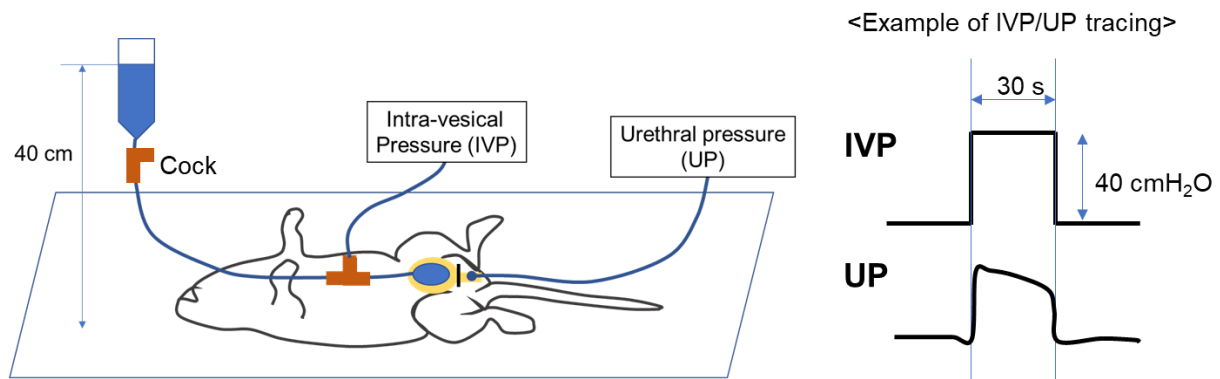


Fig. 15 Chemical structure of ASP2205 fumarate.

A.

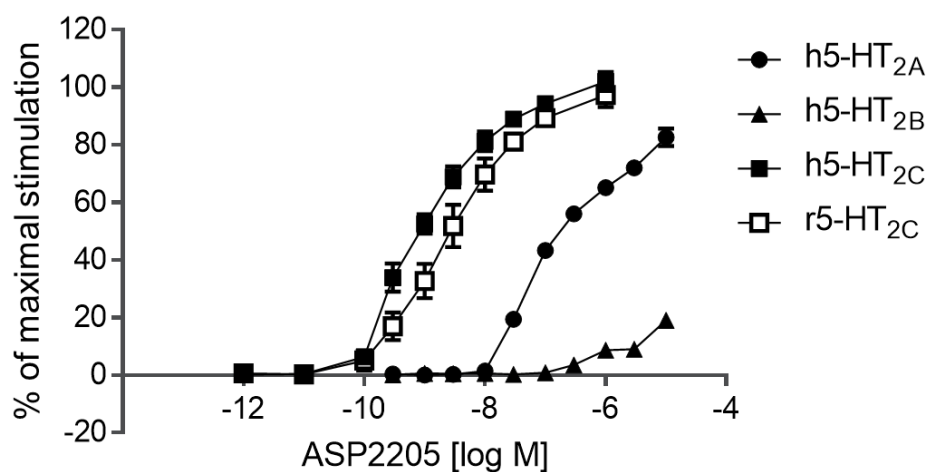


B.



**Fig. 16** Illustration of *in vivo* studies using female rats.

A, leak point pressure (LPP) measurement with Crede method (left) and example of LPP tracing (right). B, urethral closure responses (UCR) induced by intravesical pressure (IVP) loading (left) and example of IVP and urethral pressure (UP) tracing (right).



**Fig. 17** Agonistic effect of ASP2205 on 5-HT<sub>2</sub> receptors.

Agonistic action on human 5-HT<sub>2A</sub>, <sub>2B</sub>, <sub>2C</sub> (h5-HT<sub>2A</sub>, h5-HT<sub>2B</sub>, h5-HT<sub>2C</sub>) or rat 5-HT<sub>2C</sub> (r5-HT<sub>2C</sub>) receptors was evaluated using the Ca<sup>2+</sup> mobilization assay in CHO cells expressing each 5-HT<sub>2</sub> receptor. Responses are expressed as a percentage of the maximal response induced by 10 μM 5-HT. Values are expressed as the mean ± SEM for 4 independent experiments.



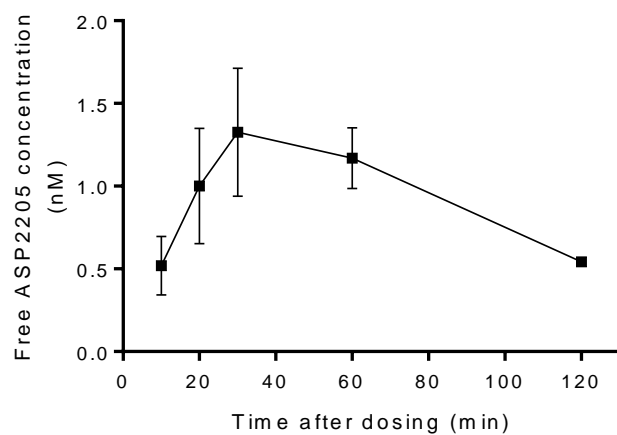
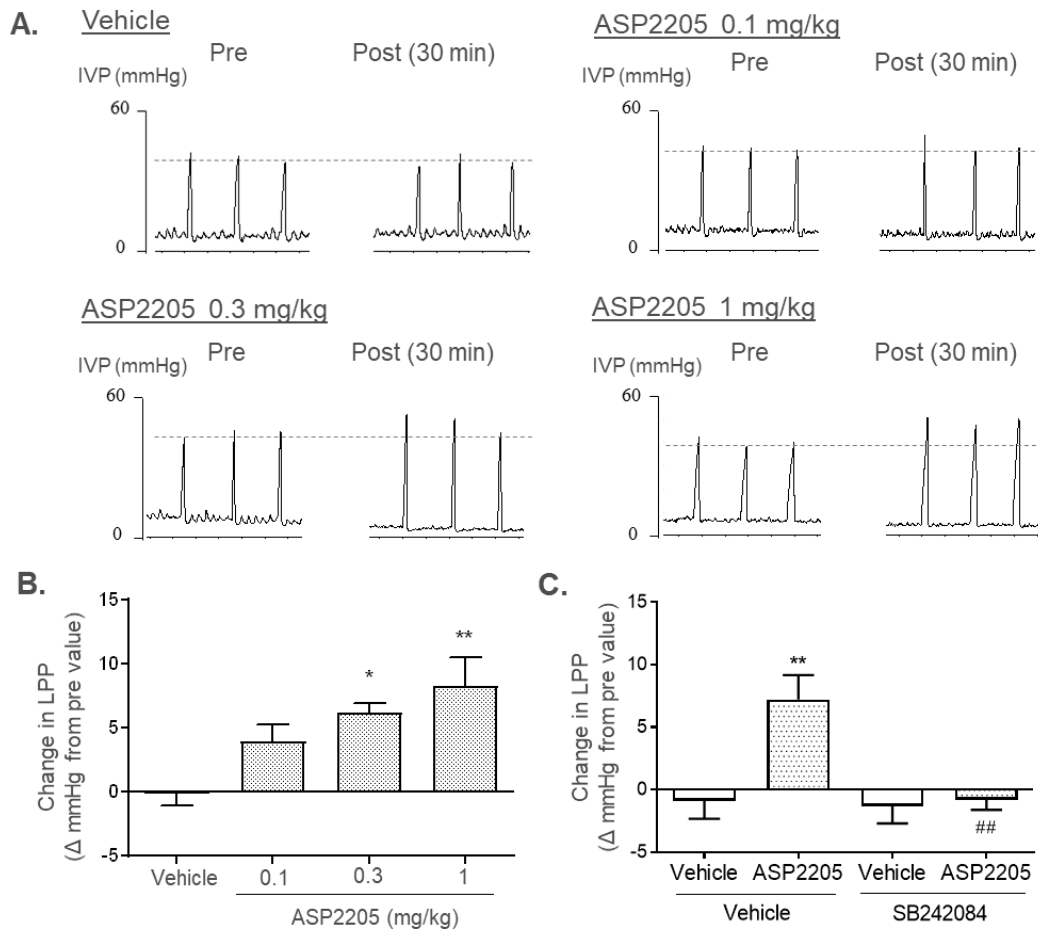


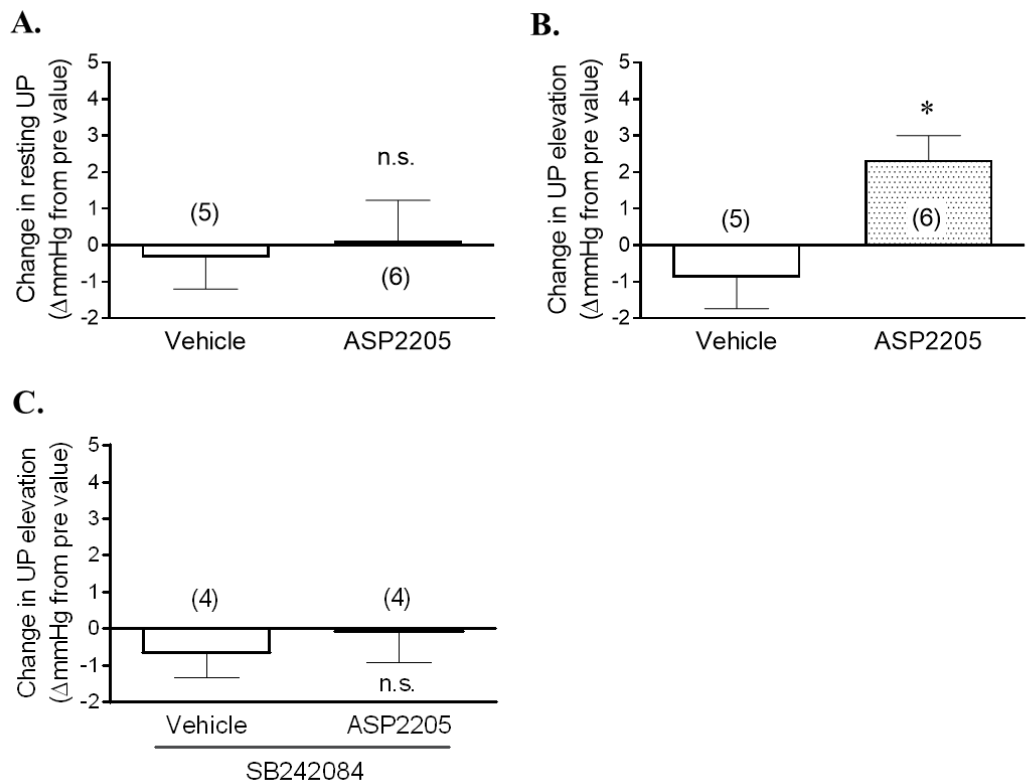
Fig. 18 ASP2205 plasma concentration after intraduodenal administration of ASP2205 (0.3 mg/kg) in rats.

The plasma concentrations of unbound ASP2205 are expressed as the mean  $\pm$  SEM for 5 animals.



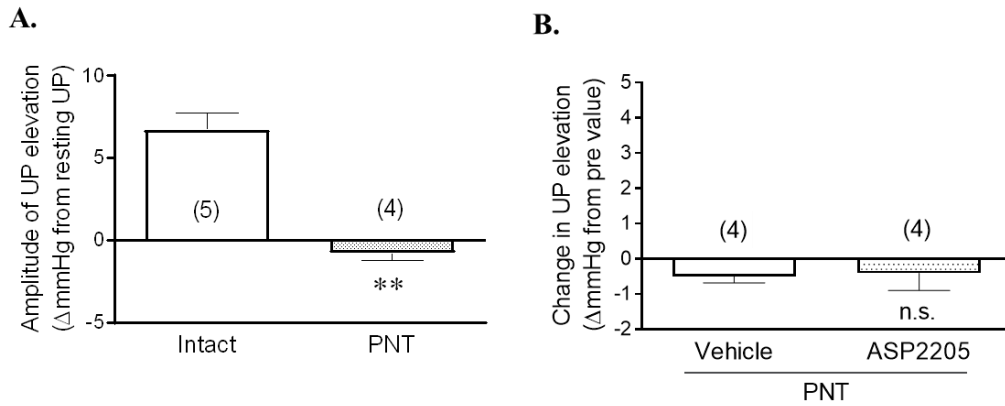
**Fig. 19 Effect of ASP2205 on the leak point pressure (LPP) in rats.**

LPP was evaluated by measuring the intravesical pressure (IVP) when leakage from the urethral opening was observed. A, Representative physiological traces from LPP measurements. B, Mean change in amplitude of LPP, defined as the difference between before and 30-min after vehicle or ASP2205 (0.1 - 1 mg/kg, i.d.) treatment in each animal. C, Effect of SB242084 (0.3 mg/kg, i.v.), a selective 5-HT<sub>2C</sub> antagonist, on the ASP2205 (0.3 mg/kg, i.d.)-induced elevation of LPP. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM for 8 animals. Dotted line indicates the pre-value of LPP. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs vehicle-treated control group, ##  $P < 0.01$  vs vehicle (i.v.) followed by ASP2205 (0.3 mg/kg, i.d.) treatment group, one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test or unpaired  $t$ -test.



**Fig. 20** Effect of ASP2205 on resting urethral pressure and reflexive urethral pressure elevation in rats with intact pudendal nerves.

Reflexive urethral pressure (UP) elevation was induced by IVP loading. A, Change in resting UP after intravenous administration of vehicle or ASP2205 (0.3 mg/kg). B, Effect of ASP2205 (0.3 mg/kg, i.v.) on the reflexive UP elevation. C, Effect of ASP2205 (0.3 mg/kg, i.v.) on the reflexive UP elevation in the presence of SB242084 (0.3 mg/kg, i.v.), a selective 5-HT<sub>2C</sub> antagonist. \* P < 0.05 vs vehicle, student's *t*-test. n.s., not significant. The numbers in parentheses indicate the number of experiments for each group.



**Fig. 21 Contribution of the pudendal nerve to reflexive urethral pressure (UP) elevation in rats.**

Reflexive UP elevation was induced by IVP loading. A, Amplitude of the reflexive UP elevation in rats with intact pudendal nerves (Intact) and transected pudendal nerves (PNT). B, Effect of ASP2205 (0.3 mg/kg, i.v.) on the reflexive UP elevation in PNT rats. \*\*  $P < 0.01$  vs Intact, Student's *t*-test. n.s., not significant. The numbers in parentheses indicate the number of experiments for each group. n.s., not significant.

**Table 3** EC<sub>50</sub> and E<sub>max</sub> values of ASP2205, lorcaserin and 5-HT on 5-HT<sub>2</sub> receptors.

| Test compound | human 5-HT <sub>2A</sub> |                  | human 5-HT <sub>2B</sub> |                  | human 5-HT <sub>2C</sub> |                  | rat 5-HT <sub>2C</sub> |                  |
|---------------|--------------------------|------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|------------------|------------------------|------------------|
|               | EC <sub>50</sub>         | E <sub>max</sub> | EC <sub>50</sub>         | E <sub>max</sub> | EC <sub>50</sub>         | E <sub>max</sub> | EC <sub>50</sub>       | E <sub>max</sub> |
|               | nM<br>[95% CI]           | %<br>[SEM]       | nM<br>[95% CI]           | %<br>[SEM]       | nM<br>[95% CI]           | %<br>[SEM]       | nM<br>[95% CI]         | %<br>[SEM]       |
| ASP2205       | 96<br>[63-150]           | 79<br>[2.4]      | -                        | 19 *<br>[0.92]   | 0.85<br>[0.46-1.6]       | 98<br>[2.3]      | 2.5<br>[0.99-6.2]      | 97<br>[2.9]      |
| 5-HT          | 1.2<br>[0.84-1.6]        | 97<br>[0.97]     | 0.54<br>[0.45-0.66]      | 96<br>[2.2]      | 0.091<br>[0.076-0.11]    | 100<br>[2.1]     | 0.15<br>[0.055-0.39]   | 95<br>[2.4]      |
| Lorcaserin    | 120<br>[92-150]          | 85<br>[3.0]      | 260<br>[170-380]         | 75<br>[2.8]      | 2.3<br>[1.8-2.9]         | 100<br>[2.3]     | 5.2<br>[3.0-8.9]       | 98<br>[2.5]      |

EC<sub>50</sub> and E<sub>max</sub> values were calculated using sigmoid-E<sub>max</sub> non-linear regression analysis. EC<sub>50</sub> values were expressed as the geometric mean and 95% confidence interval (CI) of 4 independent experiments. E<sub>max</sub> values were expressed as the arithmetic mean and standard error (SEM) of 4 independent experiments. -, EC<sub>50</sub> value was not calculated due to the inability to fit a regression curve or unreliable EC<sub>50</sub> values that were larger than the maximum concentration of the test compound. \*, % at 10 μM.

## 総括

本研究では、泌尿生殖器の QoL 疾患である早漏及び腹圧性尿失禁 (SUI) の新規の創薬アプローチの探索を目的として、生殖器及び泌尿器における脊髄反射を介した機能制御の観点から、射精反射における末梢のセロトニン受容体、及び尿道の収縮反射における選択的 5-HT<sub>2C</sub> 受容体刺激の影響について薬理的な検証を実施した。

射精及び尿道の収縮はそれぞれ異なる生理反応であるものの、いずれの生理反応も下部尿路及び生殖器における圧及び感覚刺激によって惹起される求心性神経の興奮と、それに続く脊髄反射を介した体性神経及び自律神経の活性化が関与する反応であるという点で共通している (Chancellor and Yoshimura, 2004; Giuliano and Clement, 2005b; Giuliano, 2011; Tanahashi et al., 2012)。早漏及び SUI の治療薬として、シナプスにおけるセロトニンの再取り込み阻害作用を有する dapoxetine (SSRI) 及び duloxetine (SNRI) の臨床における有効性が確認されていることから、シナプス間隙のセロトニンが射精及び尿道収縮反射の調節に関与する可能性が示唆されている (Thor, 2003; Schuessler, 2006; Giuliano and Clement, 2006)。しかしながら、SSRI 及び SNRI はいずれも中枢性に作用して向精神作用をもたらす作用機序であるため、QoL 改善を目的とする薬剤としては、中枢性の副作用に対する懸念が実際の使用の際の課題となっている。これら SSRI 及び SNRI と同等以上の効果を有しながら、中枢性の副作用懸念を軽減した安全性の高い薬剤を開発することによって、より広い患者層に治療機会をもたらす QoL の改善に寄与できると期待される。そのためには、末梢性に脊髄反射を調節する薬剤、もしくはセロトニンによる薬効をもたらす責任受容体に選択的に作用する薬剤を開発するといったアプローチが考えられる。本研究ではセロトニンによる射精及び尿道収縮反射の制御機構に着目し、末梢性の調節機構またはサブタイプ選択的な作用の影響を検証することで、早漏及び腹圧性尿失禁の新規の創薬アプローチの可能性について検討した。

第一章では、雄性ラットを用いた射精様反射の評価系 (UGR) により、尿道内の

セロトニン刺激によって射精反射が亢進されることを確認した。さらに各種アンタゴニストを用いた薬理的なメカニズム検討により、セロトニンの尿道内刺激による射精反射の亢進には末梢の 5-HT<sub>2</sub> 受容体の刺激が関与することを示した。

通常、上位中枢である脳は射精を抑制的に制御しているが、射精反射時にはその抑制が解除されることによって腰髄の脊髓射精中枢 (SEG) を介した一連の射精反射が惹起される (Saitz and Serefoglu, 2015, Clement and Giuliano, 2016)。本研究で使用したラットの尿道生殖器反射 (UGR) 評価系は、脊髓を介する射精反射を麻酔下の動物で惹起する評価系であり、神経生理学に基づく射精のメカニズムを解明するための有用なモデルとして確立されている (McKenna et al., 1991a; Marson and McKenna, 1992; Marson and Gravitt, 2004; Staudt et al., 2010; Staudt et al., 2012; Tanahashi et al., 2012)。このモデルはラットの胸髄 (T8-T10) を切断することで上位中枢による射精への影響が無視できる条件下であるものの、腰髄における脊髓射精中枢の機能は維持されていることから、尿道及び陰茎の刺激に伴う脊髓を介した射精反射の検討が可能である。

本研究では、雄性ラットの尿道に灌流したセロトニンが末梢の 5-HT<sub>2</sub> 受容体を介して、UGR すなわち射精反射を亢進することを示した。雌性ラットを用いた過去の類似の実験では 5-HT<sub>3</sub> 受容体が UGR の亢進に関与することが示唆されている (McKenna et al., 1991b)。Kullmann らは雌性マウスの尿道において、セロトニン陽性細胞は尿道の全長にわたって CGRP や Substance P (SP) 及び TRPV1 陽性の感覚神経に近接するパラニューロンに発現しており、セロトニンは尿道の一次求心性神経の 5-HT<sub>2</sub> もしくは 5-HT<sub>3</sub> 受容体を刺激することで、機械的刺激により惹起される尿道の求心性神経の活性化を増強すると報告している (Kullmann et al., 2018)。雄性ラットを用いた今回の研究では、2 種の 5-HT<sub>3</sub> 受容体アンタゴニスト (tropisetron 及び ramosetron) がいずれも十分量を投与してもセロトニンの尿道内灌流による射精反射の亢進に影響を与えなかったことから (Fig. 8)、5-HT<sub>3</sub> 受容



体はセロトニンによる射精反射の亢進に寄与しないと結論付けた。本結果に関して、哺乳動物では一般的に雌雄で尿道の構造が大きく異なることから、尿道のセロトニンの機能についても雌雄間で違いがある可能性が考えられる。実際、雌性マウスの尿道ではセロトニン陽性細胞は尿道の全長で偏りなく発現しているという報告がある一方、雄性ラットではセロトニン陽性細胞は前立腺部尿道に高密度に発現しており、海綿体部など、尿道のその他の部位では発現が少ないとの報告がある (Yokoyama et al., 2017; Kullmann et al., 2018)。また、雄性ラットを用いた今回の検討で射精反射の亢進に必要なセロトニンの濃度は 100  $\mu$ M 以上 (Fig. 9) であったのに対して、雌性ラットでは 1  $\mu$ M のセロトニンで UGR の亢進が認められている (McKenna et al., 1991b)。これらは尿道におけるセロトニンの感覚神経の活性化への寄与の雌雄間の違いを示唆するエビデンスではあるが、現時点では尿道に発現するセロトニン受容体のサブタイプや分布について雌雄の違いを直接的に示した報告は見当たらない。雌雄間の尿道の感覚神経におけるセロトニンの寄与の違いに関しては今後の検討の必要があると考えられる。また本検討では、射精反射の亢進に関わる尿道の 5-HT<sub>2</sub> 受容体について、5-HT<sub>2A</sub>、5-HT<sub>2B</sub> 及び 5-HT<sub>2C</sub> 受容体のいずれのサブタイプがドミナントに寄与しているかの結論は出ていない。これまでの知見によると、5-HT<sub>2A</sub> 受容体がラットの一次感覚神経に発現しており、炎症性疼痛の増強に関与するとの報告がある (Pierce et al., 1996; Okamoto et al., 2002; Ohta et al., 2006)。また本研究の予備検討において 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の選択的阻害剤である MDL11,939 (0.1 及び 1 mg/kg, i.v.) の投与により、セロトニンの尿道内灌流による雄性ラットの UGR の亢進が抑制されることを確認している (data not shown)。これらを踏まえると 5-HT<sub>2A</sub> 受容体が末梢において射精反射の亢進にドミナントに寄与している可能性が考えられるが、最終的に結論を出すためには 5-HT<sub>2B</sub> 及び 5-HT<sub>2C</sub> 受容体の関与の可能性を排除できるかどうか、追加の検証が必要である。

本研究において明らかとなった末梢のセロトニンによる射精反射亢進のメカニ

ズムを Fig. 22 に図示した。尿道の 5-HT<sub>2</sub> 受容体刺激によって脊髄の射精反射が亢進する結果は、末梢の 5-HT<sub>2</sub> 受容体阻害による早漏の治療の可能性を示唆しており、dapoxetine で課題となる中枢性の副作用の懸念を改善した治療薬につながる可能性がある。しかしながら、本研究ではこの 5-HT<sub>2</sub> 受容体を介するメカニズムが実際に早漏の原因となっているか否かについては検討していない。ヒトにおける射精時の尿道内のセロトニン量と早漏の関連性は、創薬標的としての 5-HT<sub>2</sub> 受容体の妥当性を示すための今後の課題である。

第二章では、雌性ラットの腹圧上昇によって惹起される尿漏れが選択的な 5-HT<sub>2C</sub> 受容体刺激によって抑制されることが示唆された。さらに、この作用には膀胱内圧の上昇による尿道の収縮反射の増強が関与しており、この尿道の収縮反射は陰部神経を介した外尿道括約筋 (EUS) の収縮増強が関与することを示した。

尿道の収縮反射に関してはこれまでの動物を用いた研究報告から、セロトニンによる尿道収縮増強の機序の一つとして、脊髄における 5-HT<sub>2C</sub> 受容体の刺激が関与することが示唆されている (Miyazato et al., 2009; Ouchi et al., 2018; Suzuki et al., 2018)。しかしながら、選択的な 5-HT<sub>2C</sub> 受容体アゴニストによる尿道収縮の増強作用ならびにその作用機序について併せて検討した研究報告はない。これまでの研究で SUI に対する新規治療薬の開発を目指し、ベンザゼピン構造を持つ新規の 5-HT<sub>2C</sub> 受容体アゴニストである ASP2205 (Fig. 15) を見出した。ASP2205 は、臨床で抗肥満薬として使用されている lorcaserin に比して 5-HT<sub>2C</sub> 受容体に対する強い効力を示し、同等以上の選択性を有する化合物であることから、尿道作用を検証するツールとして適した化合物と考えられた。腹圧上昇に伴う尿漏れに対する作用の指標として、ペントバルビタール麻酔した雌性ラットを用いた尿漏出時圧 (LPP) の評価を行った。通常、哺乳動物の蓄尿及び排尿は脳幹橋部にある排尿中枢によってコントロールされており、蓄尿期に膀胱内圧が上昇すると排尿中枢を介した排尿反射、つまり膀胱の収縮と尿道の弛緩が惹起される (de Groat et al., 2015)。ペントバル

ビタール麻酔下のラットでは排尿中枢を介する排尿反射が抑制される一方、脊髓反射による尿道の収縮反応は維持されることから、腹圧上昇時における LPP を評価することが可能である (Yanai-Inamura et al., 2017)。全身性に投与した ASP2205 は 5-HT<sub>2C</sub> 受容体を介してラットの LPP を上昇させた (Fig. 19)。さらにリザーバーで膀胱内圧を急激に上昇させた際の尿道内圧の上昇作用を測定することで、ASP2205 が尿道の閉鎖反応を増強していることを確認した (Fig. 20)。また、ASP2205 による尿道の閉鎖反応の増強は陰部神経を切断したラットで消失した (Fig. 21) ことから、ASP2205 は陰部神経を介した外尿道括約筋 (EUS) の収縮を増強することが示唆された。第二章で考察した通り、本研究では ASP2205 は全身性に投与しているため、作用部位を特定する実験は実施していない。しかしながら、陰部神経の運動ニューロンの起始核である仙髄オヌフ核における 5-HT<sub>2C</sub> 受容体の発現 (Fonseca et al., 2001)、mCPP (5-HT<sub>2</sub> 受容体アゴニスト) の脊髓内投与の報告 (Miyazato et al., 2009)、さらに ASP2205 の良好な中枢移行性プロファイルより (data not shown)、ASP2205 の尿道機能に対する効果は脊髓の 5-HT<sub>2C</sub> 受容体刺激による作用であると推察される。ASP2205 の作用機序の検討により示唆された 5-HT<sub>2C</sub> 受容体アゴニストによる尿道の収縮増強の作用の機序を Fig. 23 に示した。

尿道に対する上記の作用は、新規の 5-HT<sub>2C</sub> 受容体アゴニストである ASP2205 が SUI の新規治療薬として有望な薬理プロファイルを有することを示唆している。すでに SUI 治療薬としてヨーロッパで承認されている duloxetine (SNRI) は、薬剤の添付文書中に抗うつ作用に基づく自殺企図のリスクに関する警告が記載されている。一方、5-HT<sub>2C</sub> アゴニストは抗うつ薬には分類されず、臨床で唯一使用されている 5-HT<sub>2C</sub> アゴニストである抗肥満薬の lorcaserin の添付文書にも自殺企図に関する警告はない。すなわち duloxetine で懸念されている中枢性の副作用に関して、5-HT<sub>2C</sub> 受容体アゴニストは安全性の面で差別化が可能と考えられる。本研究において ASP2205 は雌性ラットの LPP を 0.3 mg/kg で  $6.2 \pm 0.71$  mmHg、1 mg/kg で

8.2 ± 2.3 mmHg 上昇させた (Fig. 19)。この上昇幅は薬剤の投与前置に対して、それぞれ 13.0% 及び 17.5% の上昇率であった。Duloxetine (1 mg/kg, i.v.) は正常な雌性 Sprague-Dawley ラットにおいて、LPP を 52.2 cmH<sub>2</sub>O から 59.1 cmH<sub>2</sub>O に上昇させたとの報告がある (Miyazato et al., 2015)。Duloxetine (1 mg/kg, i.v.) によるこの LPP の上昇幅(6.9 cmH<sub>2</sub>O)は投与前置に対して 13.2% の上昇率であり、本研究における ASP2205 (0.3 mg/kg, i.v.) 投与時の LPP の上昇率 (13.0%) とほぼ同等であった。これらのエビデンスより、新規の 5-HT<sub>2C</sub> 受容体アゴニストである ASP2205 は duloxetine (SNRI) と同等以上の尿失禁に対する作用を有し、さらに中枢性の副作用懸念が低下した薬剤となる可能性が期待される。

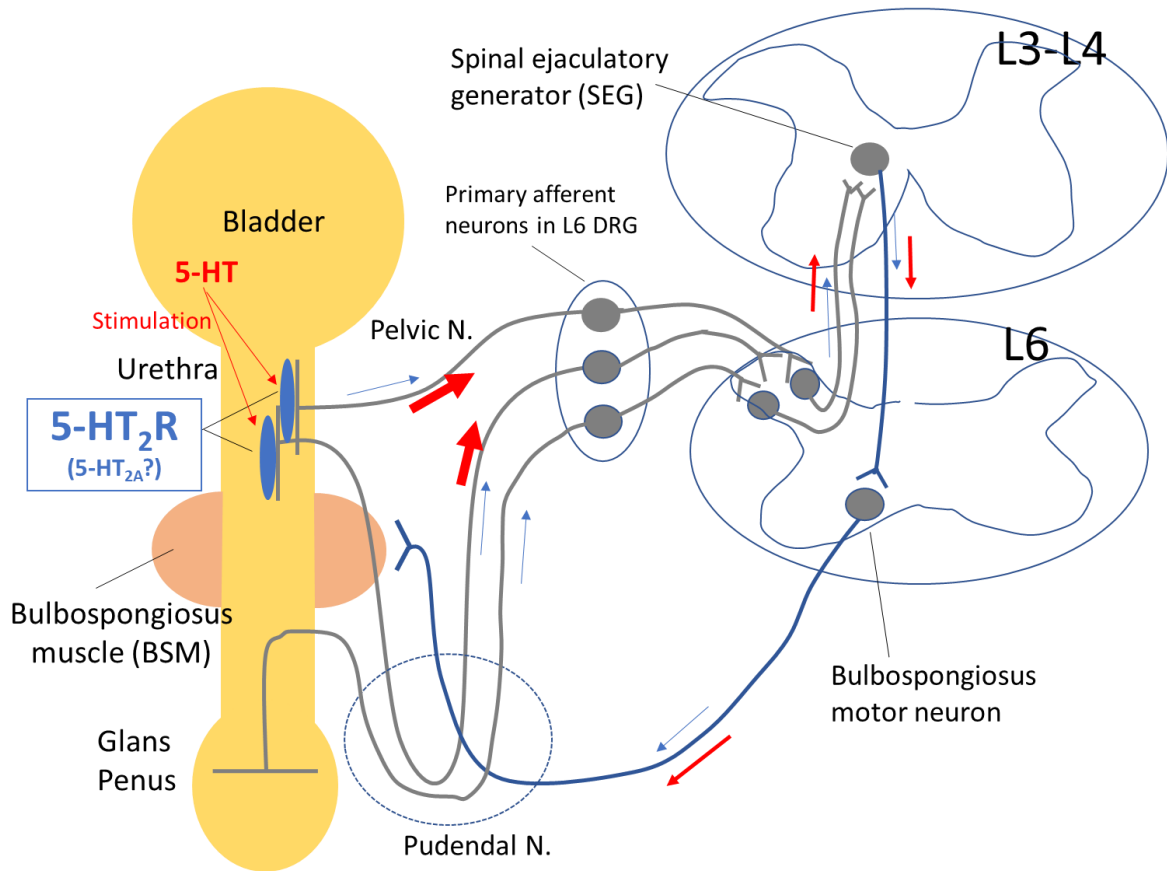
これまでに述べた通り、泌尿生殖器の機能を正常にコントロールする上で脊髄反射は重要な役割を担っている。本研究では、脊髄を介する射精及び尿道収縮反射という異なる生理作用において、いずれも 5-HT<sub>2</sub> 受容体サブファミリーが関与することが示唆された。射精反射に関しては、尿道の 5-HT<sub>2</sub> 受容体が求心性の感覚神経の活性化を増強することによって脊髄の反射を亢進することを示した (Fig. 22)。一方、尿道機能に関しては、膀胱からの求心性の刺激により惹起される脊髄反射において 5-HT<sub>2C</sub> 受容体アゴニストは陰部神経の運動ニューロンの活性化を促進することで尿道括約筋の収縮を増強することを示した (Fig. 23)。つまり、5-HT<sub>2</sub> 受容体は泌尿生殖器の脊髄反射において、求心性及び遠心性のいずれの経路にも関与することが示唆された。尿道で射精反射の亢進に関与するドミナントな 5-HT<sub>2</sub> 受容体のサブタイプは特定されていないものの、今後、ドミナントに制御しているサブタイプを特定することで、射精及び尿道の収縮のそれぞれの脊髄反射における 5-HT<sub>2</sub> 受容体の役割をサブタイプごとに明確に区別できるものと考えられる。今後、5-HT<sub>2</sub> 受容体による泌尿生殖器の脊髄反射のメカニズムをより深く理解することにより、射精及び尿道の収縮を選択的にコントロールする薬剤の開発が可能となることが期待される。

セロトニン受容体は全身の組織に発現し、各サブタイプが中枢及び末梢で多様な生理機能に関与することを序論で述べた (Table 1)。つまり、非選択的にセロトニン受容体を刺激する薬剤は、目的とする作用以外の副作用が発現するリスクが考えられる。セロトニン症候群は、薬物による中枢神経のセロトニン作動活性の亢進によって生じる病態であり、精神状態の変化、高体温、自律神経及び神経筋の活動亢進といった症状を呈し生命を脅かすことがある症状である (Boyer and Shannon, 2005; Sun-Edelstein et al., 2008; Bartlett, 2017)。この症状の原因となる薬剤の多くは抗うつ薬であり、SSRI が 42.1%で最も割合が高く、SNRI が 9.1%、三環系抗うつ薬が 8.6%、その他のモノアミン酸化酵素阻害薬が 6.2%と報告されている (Abadie et al., 2015)。すなわち、SSRI や SNRI といった中枢神経のセロトニン量を増加させて非選択的にセロトニン受容体を刺激する薬剤には重篤な副作用の懸念がある。これらの事実を踏まえると、セロトニン受容体のサブタイプ選択的な薬剤を開発することで、より安全で使いやすい治療薬を提供できる可能性がある。また末梢でコントロール可能な生理作用であれば、血液脳関門の透過性が低い薬剤を開発することで中枢性の作用を回避することが可能となるため、さらに安全性を高めることが可能である。早漏及び SUI に対して、すでにヨーロッパで承認されている dapoxetine (SSRI) 及び duloxetine (SNRI) は中枢神経に作用し、前述の通りセロトニン症候群のリスクが懸念される作用機序の薬剤である。本研究では、尿道の 5-HT<sub>2</sub> 受容体の刺激が射精反射の亢進に関与することを示した。この結果は、末梢選択的な 5-HT<sub>2</sub> 受容体阻害剤が早漏治療に有効である可能性を示唆している。つまり、中枢神経に対する作用がなく、かつその他のサブタイプを介した副作用の懸念が少ない早漏治療薬として、dapoxetine (SSRI) に比べて安全性が大きく向上した薬剤を開発できる可能性が期待される。一方、尿道の収縮反射を増強する ASP2205 は作用点が脊髄と考えられるため中枢移行性が必要であるものの、5-HT<sub>2C</sub> 受容体に選択的に作用する化合物であることから、duloxetine (SNRI) と比べると他のサ

ブタイプを介する全身性の副作用の懸念は少ない。また先に述べた通り、5-HT<sub>2C</sub> 受容体アゴニストは現時点では精神症状に関する大きな懸念は報告されていない。つまり、本研究で見出された治療アプローチは、既存のセロトニン関連薬剤による早漏及び SUI 治療の安全性懸念を克服できるものと考えられる。

早漏及び SUI はいずれも直接生命を脅かす疾患ではないものの、QoL に大きく関わる症状である。例えば早漏は、患者本人及びパートナーのいずれに対しても精神的なストレスをもたらし、パートナーとの関係の維持に影響を与える。また、患者本人の自尊心の低下や不安の増大につながると言われている (Montorsi, 2005; Lindau et al., 2007; Educational Committee of the ESSM, 2015)。SUI の患者では、運動や重いものを持ち上げる動作やくしゃみなどに伴って尿漏れが起こってしまうため、特に日常の活動に対する QoL が低下することが報告されている (Minassian et al., 2015; Krhut et al., 2018; Sawaqed et al., 2020)。すなわち早漏及び SUI の患者では、心理的なストレスや日常生活における活動性の低下が QoL 低下の原因となっていると考えられる。こうした心理的なストレスや日常の活動性の低下は、心血管系や免疫疾患、その他の生活習慣病のリスクの上昇と関連することが示唆されている (Nakanishi et al., 2004; Nakanishi and Suzuki, 2005; Stojanovich and Marisavljevich, 2008; Lagraauw et al., 2015; Albert et al., 2017)。これらを踏まえると、QoL 疾患である早漏及び SUI に対して副作用懸念の小さい治療薬を開発することは、より多くの患者に治療の機会をもたらす、患者の心理的ストレスや活動性の改善することによって種々の疾患の発症のリスクを低下させることにつながる可能性がある。また早漏の治療はパートナーとの良好な関係の維持に寄与することによって、少子化問題の解決にも貢献できるかもしれない。つまり、これら QoL 疾患に対して有効な治療の機会を拡大することは、多くの患者の健康寿命の延長につながる可能性が期待され、超高齢化を迎える日本社会にとっても意義の大きなものであると思われる。

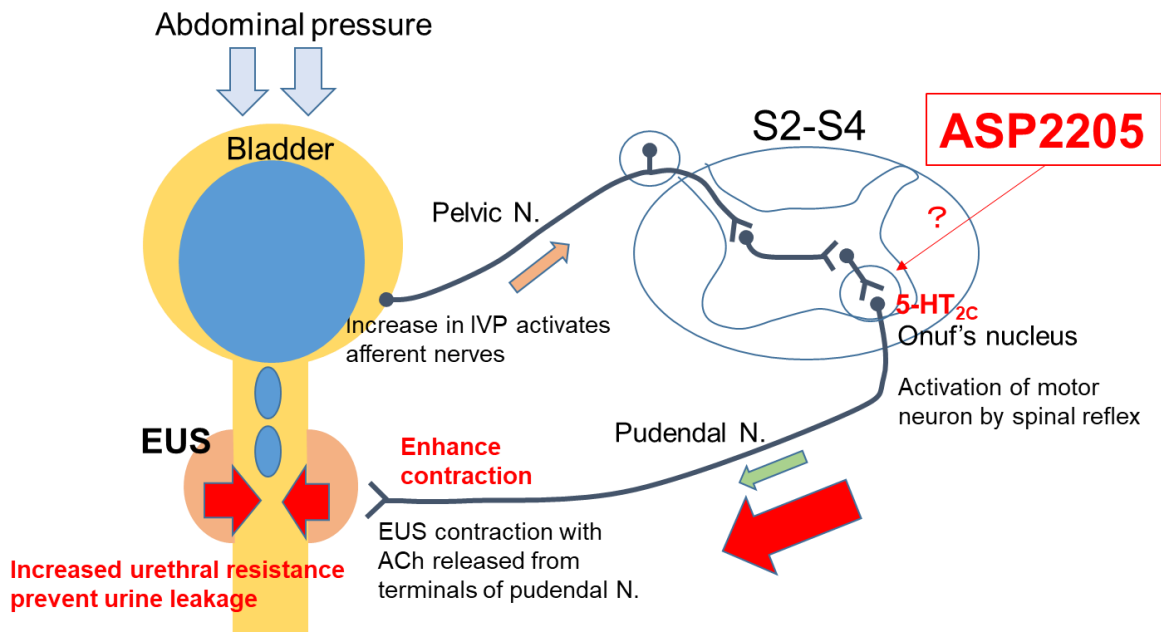
以上、本研究ではラットの射精及び尿道機能の脊髄反射という生理作用にフォーカスし、5-HT<sub>2</sub>受容体サブファミリーがこれらの制御に関わることを報告した。これは5-HT<sub>2</sub>もしくは5-HT<sub>2C</sub>受容体がそれぞれ早漏及びSUIの治療標的となり得る可能性を示唆している。今後、これらの受容体の機能とヒトの疾患との関連性に関する検討がさらに進展し、創薬標的としての妥当性を明らかにすることによって新規治療法の実用化につながることを期待される。



**Fig. 22 Hypothesis of mechanism of 5-HT-induced facilitation of urethro-genital reflex (UGR) in male rats.**

The present study indicates 5-HT stimulates 5-HT<sub>2</sub> receptors at urethra, leading to facilitation of pelvic and pudendal sensory nerves followed by the enhancement of spinal reflex for expulsion.





**Fig. 23 Hypothesis of mechanism of action of ASP2205, a 5-HT<sub>2c</sub> receptor agonist, in enhancement of urethral closure response (UCR) induced by increase in abdominal pressure.**

The present study indicates ASP2205 stimulates 5-HT<sub>2c</sub> receptors presumably at spinal cord, which leads to the enhancement of spinal reflex-mediated contractions of EUS with the activation of pudendal motor neurons. EUS; external urethral sphincter.

## 参考文献

- Abadie D, Rousseau V, Logerot S, Cottin J, Montastruc JL, Montastruc F. (2015) Serotonin syndrome: analysis of cases registered in the French pharmacovigilance database. *J. Clin. Psychopharmacol.* 35:382-388.
- Ahlenius S, Larsson K. (1991) Physiological and pharmacological implications of specific effects of 5HT1A agonists on rat sexual behavior. *In* 5HT1A agonists 5HT3 antagonists and benzodiazepines. Their comparative behavioral pharmacology. New York: John Wiley & Sons.
- Ahlenius S, Larsson K. (1998) Evidence for an involvement of 5-HT1B receptors in the inhibition of male rat ejaculatory behavior produced by 5-HTP. *Psychopharmacology* (Berl) 137:374-382.
- Ahlenius S, Larsson K, Arvidsson LE. (1989) Effects of stereoselective 5-HT1A agonists on male rat sexual behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 33:691-695.
- Albert MA, Durazo EM, Slopen N, Zaslavsky AM, Buring JE, Silva T, Chasman D, Williams DR. (2017) Cumulative psychological stress and cardiovascular disease risk in middle aged and older women: Rationale, design, and baseline characteristics. *Am. Heart J.* 192:1-12.
- Althof SE, Abdo CH, Dean J, Hackett G, McCabe M, McMahon CG, Rosen RC, Sadovsky R, Waldinger M, Becher E, Broderick GA, Buvat J, Goldstein I, El-

Meliegy AI, Giuliano F, Hellstrom WJ, Incrocci L, Jannini EA, Park K, Parish S, Porst H, Rowland D, Se Graves R, Sharlip I, Simonelli C, Tan HM. (2010) International Society for Sexual Medicine's guidelines for the diagnosis and treatment of premature ejaculation. *J. Sex. Med.* 7:2947-2969.

Andersson KE, Wein AJ. (2004) Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. *Pharmacol. Rev.* 56:581-631.

Aoki Y, Brown HW, Brubaker L, Cornu JN, Daly JO, Cartwright R. (2017) Urinary incontinence in women [published correction appears in *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Nov 16;3:17097]. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 3:17042.

Arrighi S, Bosi G, Cremonesi F, Domeneghini C. (2008) Immunohistochemical study of the pre- and postnatal innervation of the dog lower urinary tract: morphological aspects at the basis of the consolidation of the micturition reflex. *Vet. Res. Commun.* 32:291-304.

Arrighi S, Cremonesi F, Bosi G, Domeneghini C. (2004) Endocrine-paracrine cells of the male urogenital apparatus: a comparative histochemical and immunohistochemical study in some domestic ungulates. *Anat. Histol. Embryol.* 33:225-232.

Bartlett D. (2017) Drug-induced serotonin syndrome. *Crit. Care Nurse.* 37:49-54.

Barnes NM, Sharp T. (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083-1152.

Birowo P, Uckert S, Kedia GT, Scheller F, Meyer M, Taher A, Rahardjo D, Jonas U, Kuczyk MA. (2009) Evaluating the role of the serotonergic system in the control of human seminal vesicle smooth muscle-an *in vitro* approach. *J. Sex. Med.* 6:2672-2679.

Boy S, Reitz A, Wirth B, Knapp PA, Braun PM, Haferkamp A, Schurch B. (2006) Facilitatory neuromodulative effect of duloxetine on pudendal motor neurons controlling the urethral pressure: a functional urodynamic study in healthy women. *Eur. Urol.* 50:119-125.

Boyer EW, Shannon M. (2005). The serotonin syndrome. *N. Engl. J. Med.* 352:1112-1120.

Buvat J, Tesfaye F, Rothman M, Rivas DA, Giuliano F. (2009) Dapoxetine for the treatment of premature ejaculation: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial in 22 countries. *Eur. Urol.* 55:957-967.

Buvat J. (2011) Pathophysiology of premature ejaculation. *J. Sex. Med.* 8 (Suppl. 4):316-327.

Carro-Juarez M, Cruz SL, Rodriguez-Manzo G. (2003) Evidence for the involvement of a spinal pattern generator in the control of the genital motor pattern of

ejaculation. *Brain Res.* 975:222-228.

Carro-Juarez M, Rodriguez-Manzo G. (2001) Exhaustion of the coital reflex in spinal male rats is reversed by the serotonergic agonist 8-OH-DPAT. *Behav. Brain Res.* 118:161-168.

Chan JS, Snoeren EM, Cuppen E, Waldinger MD, Olivier B, Oosting RS. (2011) The serotonin transporter plays an important role in male sexual behavior: a study in serotonin transporter knockout rats. *J. Sex. Med.* 8:97-108.

Chancellor MB, Yoshimura N. (2004) Neurophysiology of stress urinary incontinence. *Rev. Urol.* 6 (Suppl. 3):S19-28.

Chen JJ, Vasko MR, Wu X, Staeva TP, Baez M, Zgombick JM, Nelson DL. (1998) Multiple subtypes of serotonin receptors are expressed in rat sensory neurons in culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287:1119-1127.

Cheng J, McCorvy JD, Giguere PM, Zhu H, Kenakin T, Roth BL, Kozikowski AP. (2016) Design and discovery of functionally selective serotonin 2C (5-HT<sub>2C</sub>) receptor agonists. *J. Med. Chem.* 59:9866-9880.

Clement P, Bernabe J, Gengo P, Denys P, Laurin M, Alexandre L, Giuliano F. (2007) Supraspinal site of action for the inhibition of ejaculatory reflex by dapoxetine. *Eur. Urol.* 51:825-832.

- Clement P, Giuliano F. (2016) Physiology and pharmacology of ejaculation. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 119 (Suppl. 3):18-25.
- Conway DA, Kamo I, Yoshimura N, Chancellor MB, Cannon TW. (2005) Comparison of leak point pressure methods in an animal model of stress urinary incontinence. *Int. Urogynecol. J. Pelvic Floor Dysfunct.* 16:359-363.
- Coolen LM, Olivier B, Peters HJ, Veening JG. (1997) Demonstration of ejaculation-induced neural activity in the male rat brain using 5-HT<sub>1A</sub> agonist 8-OH-DPAT. *Physiol. Behav.* 62:881-891.
- Czaja K, Sienkiewicz W, Vittoria A, Costagliola A, Cecio A. (1996) Neuroendocrine cells in the female urogenital tract of the pig, and their immunohistochemical characterization. *Acta Anat.* (Basel) 157:11-19.
- Delancey JO, Ashton-Miller JA. (2004) Pathophysiology of adult urinary incontinence. *Gastroenterology* 126:S23-32.
- de Groat WC, Griffiths D, Yoshimura N. (2015) Neural control of the lower urinary tract. *Compr. Physiol.* 5:327-396.
- de Jong TR, Pattij T, Veening JG, Dederen PJ, Waldinger MD, Cools AR, Olivier B. (2005a) Citalopram combined with WAY 100635 inhibits ejaculation and ejaculation-related Fos immunoreactivity. *Eur. J. Pharmacol.* 509:49-59.

- de Jong TR, Pattij T, Veening JG, Waldinger MD, Cools AR, Olivier B. (2005b) Effects of chronic selective serotonin reuptake inhibitors on 8-OH-DPAT-induced facilitation of ejaculation in rats: comparison of fluvoxamine and paroxetine. *Psychopharmacology* (Berl) 179:509-515.
- de Jong TR, Veening JG, Waldinger MD, Cools AR, Olivier B. (2006) Serotonin and the neurobiology of the ejaculatory threshold. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30:893-907.
- de Vries AM, Venema PL, Heesakkers JPFA. (2018) Midurethral support is also necessary for reflex closure of the urethra. *Neurourol. Urodyn.* 37:2965-2972.
- Di Giovanni G. (2013) Serotonin in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *Exp. Brain. Res.* 230:371-373.
- Donatucci CF. (2006) Etiology of ejaculation and pathophysiology of premature ejaculation. *J. Sex. Med.* 3 (Suppl. 4):303-308.
- Educational Committee of the ESSM. (2015) The ESSM Manual of Sexual Medicine. 2nd updated ed: Medix.
- Feige AM, Pinsky MR, Hellstrom WJ. (2011) Dapoxetine for premature ejaculation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 89:125-128.
- Fernandez-Guasti A, Escalante A. (1991) Role of presynaptic serotonergic receptors

on the mechanism of action of 5-HT1A and 5-HT1B agonists on masculine sexual behaviour: physiological and pharmacological implications. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* 85:95-107.

Fernandez-Guasti A, Escalante A, Agmo A. (1989) Inhibitory action of various 5-HT1B receptor agonists on rat masculine sexual behaviour. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 34:811-816.

Fernandez-Guasti A, Escalante AL, Ahlenius S, Hillegaart V, Larsson K. (1992) Stimulation of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in brain regions and its effects on male rat sexual behaviour. *Eur. J. Pharmacol.* 210:121-129.

Fernandez-Guasti A, Hansen S, Archer T, Jonsson G. (1986) Noradrenaline-serotonin interactions in the control of sexual behavior in the male rat: DSP4-induced noradrenaline depletion antagonizes the facilitatory effect of serotonin receptor agonists, 5-MeODMT and lisuride. *Brain Res.* 377:112-118.

Fernandez-Guasti A, Rodriguez-Manzo G. (1992) Further evidence showing that the inhibitory action of serotonin on rat masculine sexual behavior is mediated after the stimulation of 5-HT1B receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 42:529-533.

Fernandez-Guasti A, Rodriguez-Manzo G. (1997) 8-OH-DPAT and male rat sexual behavior: partial blockade by noradrenergic lesion and sexual exhaustion. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 56:111-116.



- Filip M, Bader M. (2009) Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacol. Rep.* 61:761-777.
- Fonseca MI, Ni YG, Dunning DD, Miledi R. (2001) Distribution of serotonin 2A, 2C and 3 receptor mRNA in spinal cord and medulla oblongata. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 89:11-19.
- Foreman MM, Hall JL, Love RL. (1989) The role of the 5-HT<sub>2</sub> receptor in the regulation of sexual performance of male rats. *Life Sci.* 45:1263-1270.
- Fry CH, Meng E, Young JS. (2010) The physiological function of lower urinary tract smooth muscle. *Auton. Neurosci.* 154:3-13.
- Fuller RW, Kurz KD, Mason NR, Cohen ML. (1986) Antagonism of a peripheral vascular but not an apparently central serotonergic response by xylamidine and BW 501C67. *Eur. J. Pharmacol.* 125:71-77.
- Gershon MD. (2004) Review article: serotonin receptors and transporters - roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment Pharmacol. Ther.* 20 (Suppl. 7):3-14.
- Giuliano F. (2011) Neurophysiology of erection and ejaculation. *J. Sex. Med.* 8 (Suppl. 4):310-315.
- Giuliano F, Clement P. (2005a) Neuroanatomy and physiology of ejaculation. *Ann.*

*Rev. Sex Res.* 16:190-216.

Giuliano F, Clement P. (2005b) Physiology of ejaculation: emphasis on serotonergic control. *Eur. Urol.* 48:408-417.

Giuliano F, Clement P. (2006) Serotonin and premature ejaculation: from physiology to patient management. *Eur. Urol.* 50:454-466.

Gordon JA, Hen R. (2004) The serotonergic system and anxiety. *Neuromolecular Med.* 5:27-40.

Gorzalka BB, Mendelson SD, Watson NV. (1990) Serotonin receptor subtypes and sexual behavior. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 600:435-446.

Gorzalka BB, Hanson LA, Hong JJ. (2001) Ketanserin attenuates the behavioural effects of corticosterone: implications for 5-HT(2A) receptor regulation. *Eur. J. Pharmacol.* 428:235-240.

Hanyu S, Iwanaga T, Kano K, Fujita T. (1987) Distribution of serotonin-immunoreactive paraneurons in the lower urinary tract of dogs. *Am. J. Anat.* 180:349-356.

Hedlund PB, Kelly L, Mazur C, Lovenberg T, Sutcliffe JG, Bonaventure P. (2004) 8-OH-DPAT acts on both 5-HT1A and 5-HT7 receptors to induce hypothermia in rodents. *Eur. J. Pharmacol.* 487:125-132.

Hillegaart V, Ahlenius S. (1998) Facilitation and inhibition of male rat ejaculatory behaviour by the respective 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonists 8-OH-DPAT and anpirtoline, as evidenced by use of the corresponding new and selective receptor antagonists NAD-299 and NAS-181. *Br. J. Pharmacol.* 125:1733-1743.

Hillegaart V, Ahlenius S, Larsson K. (1989) Effects of local application of 5-HT into the median and dorsal raphe nuclei on male rat sexual and motor behavior. *Behav. Brain Res.* 33:279-286.

Hillegaart V, Ahlenius S, Larsson K. (1991) Region-selective inhibition of male rat sexual behavior and motor performance by localized forebrain 5-HT injections: a comparison with effects produced by 8-OH-DPAT. *Behav. Brain Res.* 42:169-180.

Hoyer D, Clarke D, Fozard J, Hartig P, Martin G, Mylecharane E, Saxena P, Humphrey P. (1994) International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.* 46:157-203.

Hsieh JT, Liu SP, Chang HC, Tsai VF, Chien CT, Yu HJ, Ho CH. (2011) The activation of peripheral 5-HT<sub>1A</sub> receptors can inhibit seminal vesicle contraction: an *in vivo* animal study. *Urology* 78:376-379.

Iwanaga T, Han H, Hoshi O, Kanazawa H, Adachi I, Fujita T. (1994) Topographical

relation between serotonin-containing paraneurons and peptidergic neurons in the intestine and urethra. *Biol. Signals* 3:259-270.

Jiang HH, Pan HQ, Gustilo-Ashby MA, Gill B, Glaab J, Zaszczurynski P, Damaser M. (2009) Dual simulated childbirth injuries result in slowed recovery of pudendal nerve and urethral function. *Neurourol. Urodyn.* 28:229-235.

Jiang HH, Salcedo LB, Damaser MS. (2011) Quantification of neurological and other contributors to continence in female rats. *Brain Res.* 1382:198-205.

Johnson KW, Nelson DL, Dieckman DK, Wainscott DB, Lucaites VL, Audia JE, Owton WM, Phebus LA. (2003) Neurogenic dural protein extravasation induced by meta-chlorophenylpiperazine (mCPP) involves nitric oxide and 5-HT<sub>2B</sub> receptor activation. *Cephalgia* 23:117-123.

Kamo I, Cannon TW, Conway DA, Torimoto K, Chancellor MB, de Groat WC, Yoshimura N. (2004) The role of bladder-to-urethral reflexes in urinary continence mechanisms in rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 287:F434-441.

Kamo I, Torimoto K, Chancellor MB, de Groat WC, Yoshimura N. (2003) Urethral closure mechanisms under sneeze-induced stress condition in rats: a new animal model for evaluation of stress urinary incontinence. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285:R356-365.

Kawamorita N, Kaiho Y, Miyazato M, Arai Y, Yoshimura N. (2015) Roles of the spinal

glutamatergic pathway activated through alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptors and its interactions with spinal noradrenergic and serotonergic pathways in the rat urethral continence mechanisms. *Neurourol. Urodyn.* 34:475-481.

Kilpatrick GJ, Bunce KT, Tyers MB. (1990) 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Med. Res. Rev.* 10:441-475.

Kim SC, Seo KK, Han JH, Lee MY. (2000) Inhibitory effect of serotonergic drugs on contractile response of the rat vas deferens to electrical nerve stimulation: *in vivo* study. *J. Urol.* 163:1988-1991.

Kim SW, Lee SH, Paick JS. (2004) *In vivo* rat model to measure hypogastric nerve stimulation-induced seminal vesicle and vasal pressure responses simultaneously. *Int. J. Impot. Res.* 16:427-432.

Klarskov P, Horby-Petersen J. (1986) Influence of serotonin on lower urinary tract smooth muscle *in vitro*. *Br. J. Urol.* 58:507-513.

Kerrebroeck P, Abrams P, Lange R, Slack M, Wyndaele J, Yalcin I, Bump R, Duloxetine Urinary Incontinence Study Group. (2004) Duloxetine versus placebo in the treatment of European and Canadian women with stress urinary incontinence. *BJOG* 111:249-257.

Krhut J, Gärtner M, Mokris J, Horcicka L, Svabik K, Zachoval R, Martan A, Zvara P.

(2018) Effect of severity of urinary incontinence on quality of life in women. *Neurourol. Urodyn.* 37:1925-1930.

Kullmann FA, Chang HH, Gauthier C, McDonnell BM, Yeh JC, Clayton DR, Kanai AJ, de Groat WC, Apodaca GL, Birder LA. (2018) Serotonergic paraneurons in the female mouse urethral epithelium and their potential role in peripheral sensory information processing. *Acta Physiol. (Oxf)*. 222: 10.1111/apha.12919.

Lagraauw HM, Kuiper J, Bot I. (2015) Acute and chronic psychological stress as risk factors for cardiovascular disease: Insights gained from epidemiological, clinical and experimental studies. *Brain Behav. Immun.* 50:18-30.

Lee RL, Smith ER, Mas M, Davidson JM. (1990) Effects of intrathecal administration of 8-OH-DPAT on genital reflexes and mating behavior in male rats. *Physiol. Behav.* 47:665-669.

Li Q, Muma NA, Battaglia G, Van de Kar LD. (1997) A desensitization of hypothalamic 5-HT<sub>1A</sub> receptors by repeated injections of paroxetine: reduction in the levels of G(i) and G(o) proteins and neuroendocrine responses, but not in the density of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282:1581-1590.

Lin SY, Chang WJ, Lin CS, Huang CY, Wang HF, Sun WH. (2011) Serotonin receptor 5-HT<sub>2B</sub> mediates serotonin-induced mechanical hyperalgesia. *J. Neurosci.* 31:1410-1418.

Lindau ST, Schumm LP, Laumann EO, Levinson W, O'Muirheartaigh CA, Waite LJ. (2007) A study of sexuality and health among older adults in the United States. *N. Engl. J. Med.* 357:762-774.

Linton KD, Wylie KR. (2010) Recent advances in the treatment of premature ejaculation. *Drug Des. Devel. Ther.* 4:1-6.

Lorrain DS, Matuszewich L, Hull EM. (1998) 8-OH-DPAT influences extracellular levels of serotonin and dopamine in the medial preoptic area of male rats. *Brain Res.* 790:217-223.

Lorrain DS, Riolo JV, Matuszewich L, Hull EM. (1999) Lateral hypothalamic serotonin inhibits nucleus accumbens dopamine: implications for sexual satiety. *J. Neurosci.* 19:7648-7652.

Loyd DR, Henry MA, Hargreaves KM. (2013) Serotonergic neuromodulation of peripheral nociceptors. *Semin. Cell Dev. Biol.* 24:51-57.

Marson L, Gravitt K. (2004) Spinal neurons activated with the urethro-genital reflex in the male rat. *Brain Res.* 1026:108-115.

Marson L, McKenna KE. (1992) A role for 5-hydroxytryptamine in descending inhibition of spinal sexual reflexes. *Exp. Brain Res.* 88:313-320.

Maund E, Guski LS, and Gøtzsche PC. (2017) Considering benefits and harms of

duloxetine for treatment of stress urinary incontinence: a meta-analysis of clinical study reports. *CMAJ* 189:E194-203.

McMahon C. (2012) Dapoxetine: a new option in the medical management of premature ejaculation. *Ther. Adv. Urol.* 4:233-251.

McKenna KE, Chung SK, McVary KT. (1991a) A model for the study of sexual function in anesthetized male and female rats. *Am. J. Physiol.* 261:R1276-1285.

McKenna KE, Knight KC, Mayers R. (1991b) Modulation by peripheral serotonin of the threshold for sexual reflexes in female rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 40:151-156.

McMahon CG, Abdo C, Incrocci L, Perelman M, Rowland D, Waldinger M, Xin ZC. (2004) Disorders of orgasm and ejaculation in men. *J. Sex. Med.* 1:58-65.

McMahon CG, Jannini EA, Serefoglu EC, Hellstrom WJ. (2016) The pathophysiology of acquired premature ejaculation. *Transl. Androl. Urol.* 5:434-449.

Minassian VA, Sun H, Yan XS, Clarke DN, Stewart WF. (2015) The interaction of stress and urgency urinary incontinence and its effect on quality of life. *Int. Urogynecol. J.* 26:269-276.

Miyata K, Ito H, Fukudo S. (1998) Involvement of the 5-HT<sub>3</sub> receptor in CRH-



induce defecation in rats. *Am. J. Physiol.* 274:G827-831.

Miyazato M, Kaiho Y, Kamo I, Chancellor MB, Sugaya K, de Groat WC, Yoshimura N. (2008) Effect of duloxetine, a norepinephrine and serotonin reuptake inhibitor, on sneeze-induced urethral continence reflex in rats. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 295:F264-271.

Miyazato M, Kaiho Y, Kamo I, Kitta T, Chancellor MB, Sugaya K, Arai Y, de Groat WC, Yoshimura N. (2009) Role of spinal serotonergic pathways in sneeze-induced urethral continence reflex in rats. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 297: F1024-1031.

Miyazato M, Kitta T, Kaiho Y, Oshiro T, Saito S, Chancellor MB, de Groat WC, Yoshimura N. (2015) Effects of duloxetine on urethral continence reflex and bladder activity in rats with cerebral infarction. *J. Urol.* 194:842-847.

Montorsi F. (2005) Prevalence of premature ejaculation: a global and regional perspective. *J. Sex. Med.* 2 (Suppl. 2):96–102.

Nakajima K, Obata H, Ito N, Goto F, Saito S. (2009) The nociceptive mechanism of 5-hydroxytryptamine released into the peripheral tissue in acute inflammatory pain in rats. *Eur. J. Pain* (London, England) 13:441-447.

Nakanishi N, Takatorige T, Suzuki K. (2004) Daily life activity and risk of developing impaired fasting glucose or type 2 diabetes in middle-aged Japanese men.

*Diabetologia* 47:1768-1775.

Nakanishi N, Suzuki K. (2005) Daily life activity and the risk of developing hypertension in middle-aged Japanese men. *Arch. Intern. Med.* 165:214-220.

Nascimento EB, Jr., Seniuk JG, Godin AM, Ferreira WC, Dutra MB, Oliveira AC, Bastos LF, Fiebich BL, Coelho MM. (2011) Peripheral 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors mediate the nociceptive response induced by 5-hydroxytryptamine in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99:598-603.

Nicholson R, Small J, Dixon AK, Spanswick D, Lee K. (2003) Serotonin receptor mRNA expression in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci. Lett.* 337:119-122.

Nitanda A, Yasunami N, Tokumo K, Fujii H, Hirai T, Nishio H. (2005) Contribution of the peripheral 5-HT<sub>2A</sub> receptor to mechanical hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain. *Neurochem. Int.* 47:394-400.

Ohta T, Ikemi Y, Murakami M, Imagawa T, Otsuguro K, Ito S. (2006) Potentiation of transient receptor potential v1 functions by the activation of metabotropic 5-HT receptors in rat primary sensory neurons. *J. Physiol.* 576:809-822.

Okamoto K, Imbe H, Morikawa Y, Itoh M, Sekimoto M, Nemoto K, Senba E. (2002) 5-HT<sub>2A</sub> receptor subtype in the peripheral branch of sensory fibers is involved in the potentiation of inflammatory pain in rats. *Pain* 99:133-143.

- Okamoto K, Imbe H, Tashiro A, Kumabe S, Senba E. (2004) Blockade of peripheral 5HT3 receptor attenuates the formalin-induced nocifensive behavior in persistent temporomandibular joint inflammation of rat. *Neurosci. Lett.* 367:259-263.
- Ouchi M, Kitta T, Kanno Y, Higuchi M, Togo M, Moriya K, Shinohara N. (2018) Effect of a 5-HT2c receptor agonist on urethral closure mechanisms in female rats. *Neurourol. Urodyn.* 37:2382-2388.
- Patel K, Hellstrom WJ. (2009) Central regulation of ejaculation and the therapeutic role of serotonergic agents in premature ejaculation. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 10:681-690.
- Patrick DL, Althof SE, Pryor JL, Rosen R, Rowland DL, Ho KF, McNulty P, Rothman M, Jamieson C. (2005) Premature ejaculation: an observational study of men and their partners. *J. Sex. Med.* 2:358-367.
- Pauwels P. (2003) 5-HT receptors and their ligands. *Tocris Reviews* No. 25.
- Pehek EA, Bi Y. (1997) Ritanserin administration potentiates amphetamine-stimulated dopamine release in the rat prefrontal cortex. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 21:671-682.
- Pereira-Lourenço M, Brito DVE, Pereira BJ. (2019) Premature ejaculation: from

physiology to treatment. *J. Family Reprod. Health* 13:120-131.

Pierce PA, Xie GX, Levine JD, Peroutka SJ. (1996) 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study. *Neuroscience* 70:553-559.

Rodriguez-Manzo G, Lopez-Rubalcava C, Hen R, Fernandez-Guasti A. (2002) Participation of 5-HT(1B) receptors in the inhibitory actions of serotonin on masculine sexual behaviour of mice: pharmacological analysis in 5-HT(1B) receptor knockout mice. *Br. J. Pharmacol.* 136:1127-1134.

Rosen RC, Lane RM, Menza M. (1999) Effects of SSRIs on sexual function: a critical review. *J. Clin. Psychopharmacol.* 19:67-85.

Rowland D, McMahon CG, Abdo C, Chen J, Jannini E, Waldinger MD, Ahn TY. (2010) Disorders of orgasm and ejaculation in men. *J. Sex. Med.* 7:1668-1686.

Saitz T, Serefoglu E. (2015) Advances in understanding and treating premature ejaculation. *Nat. Rev. Urol.* 12:629-640.

Sawaqed F, Al Kharabsheh A, Tout M, Zaidan M, Khashram H, AlShunaigat N. (2020) Prevalence of stress urinary incontinence and its impact on quality of life among women in Jordan: a correlational study. *J. Int. Med. Res.* 48:300060520925651.

- Schuessler B. (2006) What do we know about duloxetine's mode of action? Evidence from animals to humans. *BJOG* 113 (Suppl. 1):5-9.
- Segelcke D, Messlinger K. (2017) Putative role of 5-HT<sub>2B</sub> receptors in migraine pathophysiology. *Cephalalgia* 37:365-371.
- Shafik A, El-Sibai O. (2000) Mechanism of ejection during ejaculation: identification of a urethrocavernosus reflex. *Arch. Androl.* 44:77-83.
- Shafik A, Shafik AA, El Sibai O, Shafik IA. (2009) Electromyographic study of ejaculatory mechanism. *Int. J. Androl.* 32:212-217.
- Sharlip ID, Hellstrom WJG, Broderick GA. (2008) The ISSM definition of premature ejaculation: a contemporary, evidence-based definition. *J. Urol.* 179 (Suppl. 4):340.
- Smith BM, Smith JM, Tsai JH, Schultz JA, Gilson CA, Estrada SA, Chen RR, Park DM, Prieto EB, Gallardo CS, Sengupta D, Dosa PI, Covell JA, Ren A, Webb RR, Beeley NR, Martin M, Morgan M, Espitia S, Saldana HR, Bjenning C, Whelan KT, Grottick AJ, Menzaghi F, Thomsen WJ. (2008) Discovery and structure-activity relationship of (1R)-8-chloro-2,3,4,5-tetrahydro-1-methyl-1H-3-benzazepine (Lorcaserin), a selective serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist for the treatment of obesity. *J. Med. Chem.* 51:305-313.
- Sprouse J, Reynolds L, Li X, Braselton J, Schmidt A. (2004) 8-OH-DPAT as a 5-HT<sub>7</sub>

agonist: phase shifts of the circadian biological clock through increases in cAMP production. *Neuropharmacology* 46:52-62.

Staudt MD, de Oliveira CV, Lehman MN, McKenna KE, Coolen LM. (2010) Activation of MAP kinase in lumbar spinothalamic cells is required for ejaculation. *J. Sex. Med.* 7:2445-2457.

Staudt MD, Truitt WA, McKenna KE, de Oliveira CV, Lehman MN, Coolen LM. (2012) A pivotal role of lumbar spinothalamic cells in the regulation of ejaculation via intraspinal connections. *J. Sex. Med.* 9:2256-2265.

Stojanovich L, Marisavljevich D. (2008) Stress as a trigger of autoimmune disease. *Autoimmun. Rev.* 7:209-213.

Sun-Edelstein C, Tepper SJ, Shapiro RE. (2008) Drug-induced serotonin syndrome: a review. *Expert Opin. Drug Saf.* 7:587-596.

Suzuki T, Shimizu T, Kwon J, Takaoka E, Yoshikawa S, Sumino Y, Kitta T, Miyazato M, Miyake H, Yoshimura N. (2018) Role of the serotonergic system in urethral continence reflexes during sneezing in rats. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 315:F79-85.

Tanahashi M, Karicheti V, Thor KB, Marson L. (2012) Characterization of bulbospongiosus muscle reflexes activated by urethral distension in male rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 303:R737-747.

Thomsen WJ, Grottick AJ, Menzaghi F, Reyes-Saldana H, Espitia S, Yuskin D, Whelan K, Martin M, Morgan M, Chen W, Al-Shamma H, Smith B, Chalmers D, Behan D. (2008) Lorcaserin, a novel selective human 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> agonist: *in vitro* and *in vivo* pharmacological characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 325:577-587.

Thor KB. (2003) Serotonin and norepinephrine involvement in efferent pathways to the urethral rhabdosphincter: implications for treating stress urinary incontinence. *Urology* 62:3-9.

Van Steenwinckel J, Noghero A, Thibault K, Brisorgueil MJ, Fischer J, Conrath M. (2009) The 5-HT<sub>2A</sub> receptor is mainly expressed in nociceptive sensory neurons in rat lumbar dorsal root ganglia. *Neuroscience* 161:838-846.

Vathy I, Marson L. (1998) Effects of prenatal morphine and cocaine exposure on spinal sexual reflexes in male and female rats. *Physiol. Behav.* 63:445-450.

Verma S, Chhina GS, Mohan Kumar V, Singh B. (1989) Inhibition of male sexual behavior by serotonin application in the medial preoptic area. *Physiol. Behav.* 46:327-330.

Villalon CM, Centurion D. (2007) Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch.*

*Pharmacol.* 376:45-63.

Watson NV, Gorzalka BB. (1991) DOI-induced inhibition of copulatory behavior in male rats: reversal by 5-HT<sub>2</sub> antagonists. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 39:605-612.

Wyllie MG, Hellstrom WJ. (2011) The link between penile hypersensitivity and premature ejaculation. *BJU Int.* 107:452-457.

Xin ZC, Choi YD, Rha KH, Choi HK. (1997) Somatosensory evoked potentials in patients with primary premature ejaculation. *J. Urol.* 158:451-455.

Xu C, Giuliano F, Sun XQ, Brisorgueil MJ, Leclerc P, Verge D, Conrath M. (2007) Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>5A</sub> receptors are expressed by different motoneuron populations in rat Onuf's nucleus. *J. Comp. Neurol.* 502:620-634.

Yanai-Inamura H, Ohashi R, Ishigami T, Hirata T, Kumakura F, Kono G, Yokono M, Takeda M, Miyata K. (2017) Urethral function and histopathology in aged female rats as a stress urinary incontinence model. *Low. Urin. Tract Symptoms* 11:O186-192.

Yohn CN, Gergues MM, Samuels BA. (2017) The role of 5-HT receptors in depression. *Mol. Brain* 10:28.

Yokoyama T, Saino T, Nakamuta N, Yamamoto Y. (2017) Topographic distribution



of serotonin-immunoreactive urethral endocrine cells and their relationship with calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves in male rats. *Acta Histochem.* 119:78-83.

Zhou C, Jiang X, Xu Z, Guo L, Chen J, Wang H, Zhang D, Shi B. (2010) Bulbocavernosus reflex to stimulation of prostatic urethra in patients with lifelong premature ejaculation. *J. Sex. Med.* 7:3750-3757.

## 謝辞

本論文の作成にあたり、終始御懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました筑波大学生命環境系 繁森 英幸 教授、臼井 健郎 教授、山田 小須弥 准教授、宮前 友策 准教授に心より厚く御礼申し上げます。

アステラス製薬在職中、創薬研究への多大なご指導ご助言をいただきましたアステラス製薬株式会社 増田 典之 博士、武田 全弘 博士に心より感謝致します。

本研究を行うに際し、多大なご助言ご指導をいただきました旧 Urogenix Inc. の Lesley Marson 博士、Venkateswarlu Karicheti 博士に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、共同研究者として終始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 上島 浩二 博士、鶴飼 政志 博士、横野 真典 博士、高松 肇 博士、吉岡 克郎 博士、朝井 範夫 研究員に深謝いたします。

さらに、本論文の作成の機会を与えていただきました大正製薬株式会社 藤波 秀次 医薬渉外部長、矢野 孝彦 博士、ならびに事業開発 1 グループ員の皆様に心より御礼申し上げます。

## 発表論文目録

Takao Ishigami, Katsuro Yoshioka, Venkateswarlu Karicheti, Lesley Marson. (2013)  
A role for peripheral 5-HT<sub>2</sub> receptors in serotonin-induced facilitation of the  
expulsion phase of ejaculation in male rats. *J. Sex. Med.* 10:2688-2702.

Takao Ishigami, Koji Ueshima, Masashi Ukai, Norio Asai, Hajime Takamatsu,  
Masanori Yokono, Masahiro Takeda, Noriyuki Masuda. (2019) Effect of ASP2205  
fumarate, a novel 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist, on urethral closure function in rats. *J.*  
*Pharmacol. Sci.* 139:333-339.