

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20128

研究課題名(和文) 閉塞膀胱の病態における膀胱上皮Epacの役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of bladder epithelial Epac in the condition of the obstructed bladder

研究代表者

中込 宙史 (NAKAGOMI, Hiroshi)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：80418714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：セカンドメッセンジャーcAMPのターゲット分子の一つであるExchange protein directly activated by cAMP (Epac)の膀胱における発現を、蓄積された臨床データの利用可能なヒト組織にて比較検討した。閉塞膀胱および正常膀胱においてEpac1、Epac2ともに有意な差を認めなかった。Ussing chamberを使用し膀胱上皮表面積の測定も行ったが、正常膀胱と閉塞膀胱において信頼のおけるデータを採取することが不可能であった。以上よりEpacが膀胱に発現しているものの、病的状態でも発現に変化はなく、Epacをターゲットとした研究を進める意義は低いと思われた。

研究成果の概要(英文)：We studied the expression in the bladder of the Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) which was one of the target molecules of the second messenger cAMP in human available of accumulated clinical data. I did not recognize the difference of expression of Epac1 and Epac2 between the obstructed bladder and the normal bladder. The measurement of the bladder epithelium surface area using Ussing chamber, but it was impossible to gather trustworthy data in the normal bladder and the obstructed bladder. Thus we concluded that it is difficult to push forward the study that targeted Epac.

研究分野：医学

キーワード：Epac 膀胱上皮 閉塞膀胱

1. 研究開始当初の背景

OAB は尿意切迫感を主症状とし、頻尿、夜間頻尿などの蓄尿障害を呈することで QOL を著しく低下させる症候群であり、近年の高齢化に伴い患者数は激増している。その過活動膀胱の発生メカニズムのひとつとして重要なのは膀胱出口部閉塞であり、閉塞に伴い膀胱上皮、膀胱壁内神経、膀胱平滑筋に様々な機能や形態の変化がもたらされ、それが OAB の原因と考えられている。現状においては OAB 治療薬は主に抗コリン薬と β_3 受容体作動薬が用いられている。実際の臨床において、抗コリン薬/ β_3 受容体作動薬が著効する患者がいる一方で、そのような治療が無効な患者（難治性過活動膀胱）を経験することも少なくない。その一因として、尿意知覚に関わる情報伝達物質の過剰な放出が過活動膀胱の発症メカニズムのひとつである可能性が示唆されている。

近年、膀胱（尿路）上皮は、尿中侵害性物質などの侵入を阻止する防御機構としての働き以外に、伸展刺激や侵害刺激を感知して、種々の情報伝達物質を放出し、求心性伝達を担う役割を果たしていると考えられている。尿意伝達を担う情報伝達物質には、Ach 以外にもいくつか注目されている物質があるが、我々は ATP に着目して研究を行ってきた。伸展刺激による膀胱上皮からの ATP 放出には、伸展刺激活性化チャネルである Piezo1 や VNUT を介した開口放出が重要であることが分かった。またもう一つの膀胱上皮の機能として、上皮細胞内の discoidal/fusiform-shaped vesicles が伸展刺激などに応じて細胞壁へ fusion し膀胱上皮の内腔表面積の拡張に寄与している知見がある (Am J Physiol Renal Physiol 2009)。すなわち膀胱上皮拡張機能が膀胱蓄尿機能に関連している。

Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) は、様々な生物学的プロセスにおいて不可欠であるセカンドメッセンジャ

-cAMP のターゲット分子の一つである。Epac の発見により、cAMP の古典的なターゲットである PKA および cyclic nucleotide-gated ion channels だけでは説明することが出来なかった cAMP の様々な効果を説明することが可能になった。Epac はほぼ全身に発現しており、その機能の一つは低分子量 G タンパク質 Rap を介して働き、インスリン分泌から心臓の収縮および血管透過性に至るまでの様々な役割を担っている。また Epac は血管内皮細胞や気管上皮細胞など上皮系組織においても炎症性サイトカインからの保護機能や慢性閉塞性肺疾患などにおいても上皮のバリア機能維持などに寄与しているという報告がある。Epac は細胞分泌、細胞移動、細胞分化およびアポトーシスのあらゆる細胞活動に関連することが知られている (Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2008)。また Epac は膀胱上皮の表面積の拡張に寄与しているだけではなく、膀胱の障害や修復等あらゆる病態生理に関与している可能性が高い (Pharm Rev. 2013)。以上の点から我々は Epac が膀胱、特に膀胱上皮の病態生理に強く関連していると考えている。

2. 研究の目的

過活動膀胱 (overactive bladder : OAB) は尿意切迫感などの蓄尿障害を呈することで QOL を著しく低下させる。OAB の原因の一つとして膀胱上皮からの尿意知覚に関する伝達物質の過剰放出の可能性が示唆されている。近年、上皮組織の機能において新規 cAMP センサーである Epac の関与が注目されている。我々は OAB 発生メカニズムに膀胱上皮における Epac が関与していることを証明し、OAB の発症および予防機構を解明したいと考えている。また Epac の選択的作用薬である 8pCPT-AM の効果を OAB モデルにおいても実証し、OAB に対する新規治療薬の可能性を検証したいと考えている。

3. 研究の方法

ヒト膀胱上皮サンプルを用いて、正常群と閉塞膀胱群における Epac、Rap、R-Ras、Rim の発現量を定量的 RT-PCR、Western Blot を用いて比較を行う。また免疫染色法にて上記分子の局在を評価する。次にラット BOO モデルを作成し、control 群と BOO 群における上記分子の発現を確認し、特殊改良した Ussing chamber を用いて伸展時の膀胱上皮組織の表面積の変化を検討する。また Epac agonist の有効性を排尿代謝ケージを用いて control 群と BOO 群における排尿行動の変化（排尿回数、1回排尿量等）を測定する。同様に膀胱シストメトリーによる膀胱パラメータの比較（無抑制、収縮の有無、膀胱収縮圧、膀胱容量等）を行う。

(1) すでに採取してあるヒト膀胱上皮サンプル(正常群、閉塞群)を用いて、Epac、Rap、R-Ras、Rim の発現量の比較を行う。

定量的 RT-PCR による mRNA 発現量の比較

Western blotting を用いた蛋白発現量の比較

蛍光免疫化学組織染色による局在の確認

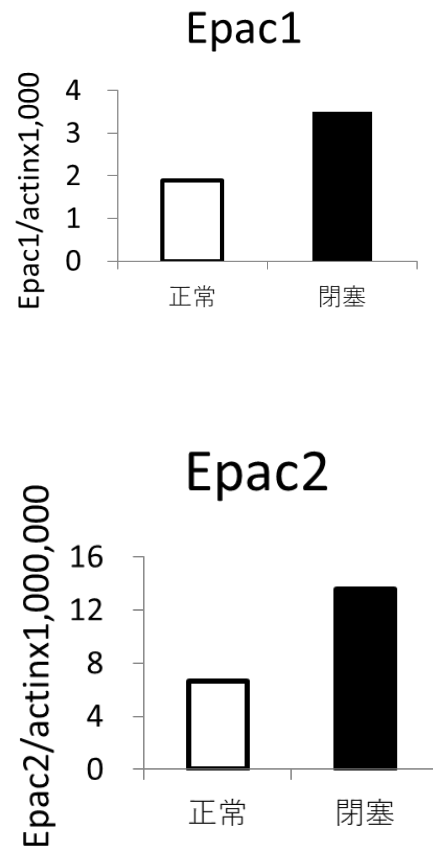
遺伝子の発現量と国際前立腺症状スコアやウロダイナミックスタディの結果など相関関係などを検討する。

(2) control ラットならびに BOO モデルの膀胱上皮組織を特殊改良した Ussing chamber (図 4) に設置し、伸展時の Transepithelial capacitance を様々な条件下(Epac antagonist, Rap antagonist などの存在下)で測定し膀胱上皮表面積の変化を比較検討する。

4. 研究成果

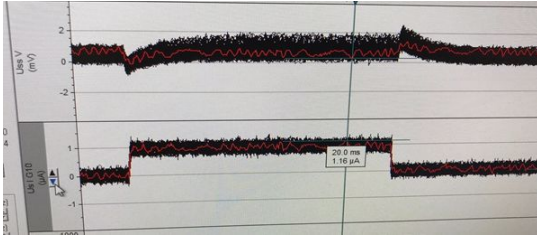
膀胱上皮組織の機能において新規 cAMP センサーである Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) の関与が注目されている。本研究において、様々な生物学的プロセスにおいて不可欠である、セカンドメッセンジャー cAMP のターゲット分子の一つ

である Epac の膀胱における発現を、蓄積された臨床データの利用可能なヒト組織にて比較検討した。閉塞膀胱(N=19)および正常膀胱(N=13)それぞれにつき膀胱上皮組織、膀胱平滑筋に分けて発現を比較したが、Epac1、Epac2 ともに有意な差を認めなかった(下図それぞれ Epac1;P=0.77, Epac2;P=0.091)。

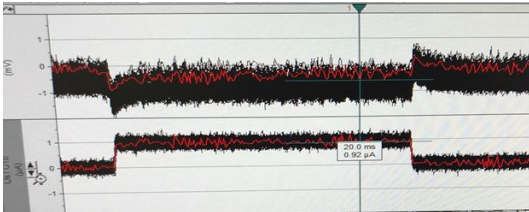


膀胱上皮機能の一つである上皮細胞内の discoidal/fusiform-shaped vesicles が伸展刺激などに応じて細胞壁へ fusion し膀胱上皮の内腔表面積の拡張を特殊改良した Ussing chamber を使用し膀胱上皮表面積の測定も行ったが、正常膀胱と閉塞膀胱において信頼のおけるデータを採取することが不可能であった。

(図3)



(図4)



(図3、4ともに正常膀胱)

以上より Epac が膀胱に発現し、Epac が膀胱上皮表面積の拡張に関係しているものの、前立腺肥大症などに伴う下部尿路症状を呈する病的状態においては発現に変化はなく今後のこの Epac をターゲットとした研究を拡大し治療薬の開発、ならびに臨床応用に直結する可能性は低いと思われた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中込 宙史 (NAKAGOMI, Hiroshi)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号: 80418714