

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11176

研究課題名(和文) TRPV4とコネクシン・パネキシン相互作用に着目した間質性膀胱炎の病態解明

研究課題名(英文) Role of TRPV4/Connexin/Pannexin Interaction in Bladder Cystitis

研究代表者

姚建(YAO, Jian)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：50303128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：TRPV4及びCx43チャネルは、膀胱炎の機能亢進に関与している。なぜこれらの異なるチャネルが同じように膀胱の機能を調節しているのは不明である。我々は、これらチャネル間に密接な相互作用が存在することで膀胱の病態生理に関与していると考え検証した。マウス膀胱においてTRPV4及びCx43チャネルはシクロホスファミド刺激により高く発現し、酸化ストレス及びインフラマソームの活性化に関わっていた。培養上皮細胞においては両チャネル間に緊密な相互作用が存在し、酸化性細胞傷害に関与していた。以上の結果から病理状態においてTRPV4とCx43の相互作用は膀胱の機能異常に寄与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間質性膀胱炎とは、原因不明で、頻尿・尿意亢進・膀胱痛などの症状を呈する疾患である。患者の生活の質は膀胱刺激症状により大きく損なわれる。そのため、病態発症機序の解明、治療法の開発が望まれている。我々は、TRPV4及びCx43チャネルは膀胱の機能調節に重要であることから、両チャネル間の相互作用は膀胱炎の進展に寄与していることを想定し、研究を行った。動物及び細胞モデルにおいてTRPV4及びCx43チャネル間に緊密な相互作用が存在すること、また酸化ストレス及び炎症反応を調節していることを明らかにした。以上からTRPV4とCx43チャネル間の相互作用を標的とする治療法が有効であることを示している。

研究成果の概要(英文)：TRPV4 and Cx43 channels are involved in the control of bladder contractile response. Blockade of each of them attenuates bladder overactivity in cyclophosphamide (CYP)-induced cystitis. It is unclear why two different channels similarly regulate bladder activity. We speculated that there existed a close interaction between TRPV4 and Cx43 channels under pathological situations, which contributed to the initiation and development of bladder abnormality. The aim of this study was to test this hypothesis. In a mouse model of CYP cystitis, TRPV4 and Cx43 proteins were found to be markedly increased. Further analysis revealed that the interaction between TRPV4 and Cx43 channels contributed to the regulation of the intracellular redox status and inflammasome activation. Collectively, our study indicates that the interaction between TRPV4 and Cx43 underlies the bladder abnormality through mechanisms involving its actions on the intracellular oxidative status and inflammatory response.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：TRPV4 Connexin43 膀胱 間質性膀胱炎 酸化ストレス インフラマソーム活性化 相互作用

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 間質性膀胱炎とは、原因不明で、頻尿・尿意亢進・尿意切迫感・膀胱痛などの症状を呈する疾患である。患者の生活の質は膀胱刺激症状により大きく損なわれる。そのため、病態発症機序の解明、治療法の開発、疾患予防法の確立が望まれている。

(2) 正常の膀胱収縮はムスカリン受容体の刺激によって引き起こされる。しかし、膀胱出口部閉塞、特発性排尿筋過活動、間質性膀胱炎、加齢膀胱等の病的状態下では、非コリン受容体の伝達物質である ATP が過剰に分泌されることで、プリン受容体を活性化し異常な膀胱の収縮を引き起こす。ATP は、尿路上皮細胞から放出される。尿路上皮細胞は外部環境の変化を感知し、ATP を含むあらゆる伝達物質を放出するとともに、尿路上皮下の間質細胞と緊密にクロストークすることで膀胱の機能を調節している。細胞外環境に対する ATP の放出及び細胞間情報伝達は、膀胱上皮細胞での TRP チャンネル及び細胞間ギャップ結合と深く関わることで報告されている。

(3) TRPV4 は膀胱上皮細胞に発現する非選択的なカチオンチャンネルであり、様々な刺激に応答し、膀胱の生理機能を調節している。TRPV4 の活性化は、細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度を上昇し、ATP 放出を誘発する。TRPV4 ノックアウトマウスでは、シクロホスファミド誘発の急性膀胱炎に伴う排尿機能異常が有意に改善されることが報告されている。

(4) ギャップジャンクション (gap junction, GJ) はコネキシン (connexins, Cx) という蛋白によって構成されており、細胞間でイオンやセカンドメッセンジャー、小分子を通過させる膜貫通型チャンネルの集合体である。ギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションは、細胞の分化・増殖を制御し、ホメオスタシスを維持している。GJ は細胞集団の協調の機能調節に重要な役割を果たしていることが知られている。過活動膀胱においてコネキシン43 (Cx43) の発現や機能が亢進しており、さまざまな刺激に応答して細胞間の情報伝達や協調作用を促進することで膀胱平滑筋の収縮を高めることが知られている。

(5) TRPV4 及び Cx43 チャンネルは、膀胱の機能調節に重要な役割を果たしている。これらのチャンネルはシクロホスファミド (cyclophosphamide, CYP) による膀胱炎の機能亢進に関与しており、これらを阻害することで過活動膀胱症状が緩和されることが報告されている。しかし、なぜ、二つの異なるチャンネルが同じように膀胱の機能を調節しているか不明である。

### 2. 研究の目的

我々は、TRPV4 と Cx43 チャンネル間に密接な相互作用が存在することにより膀胱の病態生理に寄与していると考えている。本研究は、この仮説を検証することを目的としている。具体的には、以下の三つの点について検討することである。(1) 膀胱における Cx43 および TRPV4 チャンネル間の相互作用が存在すること；(2) 膀胱の病態生理におけるチャンネル間相互作用の役割及びメカニズムの解明；(3) チャンネル間相互作用をターゲットとした新規治療法の可能性について。

### 3. 研究の方法

(1) マウス膀胱上皮細胞及び腎尿細管細胞株 NRK 細胞は、10% fetal bovine serum (FBS) を含む D-MEM/F-12 培地を用いて培養した。

(2) 培養細胞においてTRPV4及びCx43を発現していることをタンパクレベル（蛍光免疫染色法、Western blotting; WB）、mRNA レベル（RT-PCR）で検索した。

(3) 培養細胞におけるCx43チャネルの機能は、培養液に投与した蛍光色素の隣接細胞への拡散試験により評価した。

(4) 細胞傷害は、細胞形態の変化、LDHの放出、Calcein-AM/Propidium Iodide染色、Cell Counting Kit-8 assay及びカスパーゼ3活性化を用いて評価した。

(5) Ca<sup>2+</sup> imaging法で、TRPV4 agonistによる細胞内カルシウム濃度の変化及びGJ阻害剤によるCa<sup>2+</sup>濃度への影響を観察した。

(5) 培養細胞の蛋白を抽出し、SDS-PAGEにて分離し、PVDF membraneへの転写後、一次、二次抗体を反応させ、化学発光法を用いて検出した。

(6) 上皮細胞を培養し、TRPV4 agonist刺激により細胞内ROS、TXNIP、P38などの変化及びこれらの変化に対するCx43チャネル阻害剤の影響を評価した。

(7) マウスの腹腔内にCYPを注入し膀胱炎モデルを作製した。膀胱の機能について、マウス排尿代謝ケージを用いて測定した。24時間での総排尿量、総飲水量、一回の排尿量および排尿回数を測定した。Inflammasome及びギャップ結合インヒビター投与による排尿行動の変化を検討した。

(8) CYP膀胱炎マウス膀胱の病理的な変化を観察した。TRPV4, Cx43, pannexinタンパク、炎症メディエーター及びタンパク質のカルボニル化の変化をWestern Blottingにより解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 正常マウス膀胱にCx43及びTRPV4チャネルが存在することを、免疫染色およびウェスタンblotで明らかにした。CYPを腹腔内に投与することで間質膀胱炎モデルマウスを作成し、膀胱組織中のCx43及びTRPV4の時間的および空間的な変化を観察した。CYPによる間質膀胱炎の組織にTRPV4、Panx1、Cx43タンパク質の発現レベルが増加していることが確認できた。以上のことから、CYPによる膀胱炎の発症における病態生理にこれらのチャネルが関わっていることが示唆された。

(2) CYPの代謝産物であるアクロレイン及びTRPV4 agonistによる細胞傷害の分子メカニズムを解析することにより、Cx43チャネルの役割を明らかにした。尿細管培養上皮細胞において、アクロレイン及びTRPV4 agonistによる細胞傷害は、酸化ストレスとP38伝達経路と関係していることを明らかにした。TRPV4 agonistは、酸化ストレスを誘導し、Cx43の発現及び機能を刺激した結果、細胞傷害を引き起こしたことが明らかになった。GJ阻害剤を添加することで、酸化ストレスによるP38の活性化および細胞傷害が抑制された。

(3) TRPV4 agonistは細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を刺激し、上昇したCa<sup>2+</sup>がチオレドキシシン結合タンパ

ク質 (TXNIP) を誘導したことを明らかにした。ギャップ結合を抑えることで、TRPV4 agonistによるCa<sup>2+</sup>の上昇、TXNIPの発現及び細胞傷害を抑えた。以上のことからTRPV4とCx43チャネル間に緊密な相互作用が存在すること、またTRPV4チャネルによる細胞傷害はCx43を介していたことを見出した。

(4) CYPによるマウス間質膀胱炎は、inflammasome活性化と深く関係している。InflammasomeインヒビターBHBを体内投与することで、CYPが引き起こした膀胱刺激症状を軽減した。培養尿細管細胞においてTRPV4 agonistはinflammasomeの活性化を誘導した。Inflammasome活性化を抑えることで細胞傷害が抑制された。

(5) GJ 結合タンパク Cx43 は inflammasome 活性化に参加している。マウス腹腔マクロファージ及びRAW 264.7 細胞においてLPS 及びATP 刺激による inflammasome の活性化は、GJ タンパク質 Cx43 の上昇を伴っていた。Cx43 siRNA 及びGJ インヒビター処理することで、マクロファージの inflammasome の活性化を軽減した。更に inflammasome 活性化は、細胞内酸化ストレスと深く関わっていた。LPS 及びATP 刺激は細胞内NADPH oxidase のレベルを上昇し、ROS の産生を誘導した。抗酸化物質GSH 及びNOX2 インヒビター処理によって inflammasome 活性化が抑えられた。GJ 結合タンパク Cx43 は、細胞内NADPH oxidase レベル及びROS の産生の調節に参加していた。Cx43 タンパクをダウンレギュレーションすることで、酸化ストレスを解消し、inflammasome の活性化を抑制した。以上のことから TRPV4 及び Cx43 チャネルの相互作用は酸化ストレス及び inflammasome の活性化を介して膀胱炎の発生・発展に関与していることが示唆された。

(6) 以上の結果から動物及び細胞モデルにおいて TRPV4 及び Cx43 チャネル間には緊密な相互作用が存在すること、またこの相互作用が膀胱疾患の発生発展に深く関わる分子メカニズムである酸化ストレス及び炎症反応を調節していることを明らかにした。TRPV4 と Cx43 チャネル間の相互作用を阻止することで膀胱疾患の新たな治療法としての可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Huang Yanru, Mao Zhimin, Zhang Zhen, Obata Fumiko, Yang Xiawen, Zhang Xiling, Huang Yong, Mitsui Takahiko, Fan Jianglin, Takeda Masayuki, Yao Jian	4. 巻 31
2. 論文標題 Connexin43 Contributes to Inflammasome Activation and Lipopolysaccharide-Initiated Acute Renal Injury via Modulation of Intracellular Oxidative Status	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antioxidants & Redox Signaling	6. 最初と最後の頁 1194 ~ 1212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ars.2018.7636	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zhang Zhen, Fang Xin, Yang Xiawen, Mitsui Takahiko, Huang Yanru, Mao Zhimin, Huang Yong, Takeda Masayuki, Yao Jian	4. 巻 73
2. 論文標題 Hydrogen sulfide donor NaHS alters antibody structure and function via sulfhydration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 491 ~ 501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2019.05.052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mao Zhimin, Yang Xiawen, Mizutani Sayumi, Huang Yanru, Zhang Zhen, Shinmori Hideyuki, Gao Kun, Yao Jian	4. 巻 10
2. 論文標題 Hydrogen Sulfide Mediates Tumor Cell Resistance to Thioredoxin Inhibitor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2020.00252	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Huang Yanru, Mao Zhimin, Zhang Xiling, Yang Xiawen, Sawada Norifumi, Takeda Masayuki, Yao Jian	4. 巻 20
2. 論文標題 Connexin43 Is Required for the Effective Activation of Spleen Cells and Immunoglobulin Production	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5789 ~ 5789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20225789	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Huang Y, Zhang Z, Huang Y, Mao Z, Yang X, Nakamura Y, Sawada N, Mitsui T, Takeda M, Yao J	4. 巻 501
2. 論文標題 Induction of inactive TGF- 1 monomer formation by hydrogen sulfide contributes to its suppressive effects on Ang II- and TGF- 1-induced EMT in renal tubular epithelial cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 534-540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.05.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mao Z, Huang Y, Zhang Z, Yang X, Zhang X, Huang Y, Sawada N, Mitsui T, Takeda M, Yao J	4. 巻 11
2. 論文標題 Pharmacological levels of hydrogen sulfide inhibit oxidative cell injury through regulating the redox state of thioredoxin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Free Radic Biol Med	6. 最初と最後の頁 190-199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gao S, Zhang X, Gao K, Zhang Z, Huang Y, Yoda R, Yao J	4. 巻 38
2. 論文標題 The pivotal role of extracellular signal-regulated kinase in gap junction-mediated regulation of TXNIP	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Signal	6. 最初と最後の頁 116-126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: j.cellsig.2017.07.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhang Z, Zhang X, Fang X, Niimi M, Huang Y, Piao H, Gao S, Fan J, Yao J.	4. 巻 12
2. 論文標題 Glutathione inhibits antibody and complement-mediated imogic cell injury via multiple mechanisms	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Redox Biol	6. 最初と最後の頁 571-581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.redox.2017.03.030.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Zhang X, Gao S, Tanaka M, Zhang Z, Huang Y, Mitsui T, Kamiyama M, Koizumi S, Fan J, Takeda M, Yao J.	4. 巻 21(9)
2. 論文標題 Carbenoxolone inhibits TRPV4 channel-initiated oxidative urothelial injury and ameliorates cyclophosphamide-induced bladder dysfunction	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Cell Mol Med	6. 最初と最後の頁 1791-1802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/jcmm.13100.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Jian Yao
2. 発表標題 Hydrogen sulfide inhibits adramycin-initiated glomerular podocyte injury via interference of Trx/ASK1/P38 signaling
3. 学会等名 ISN world conference of nephrology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yanru Huang and Jian Yao
2. 発表標題 Connexin43 regulates inflammasome activation and inflammatory cell injury through modulation of NADPH Oxidase-dependent redox signaling pathway
3. 学会等名 International Gap Junction Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jian Yao
2. 発表標題 Role of Gap junctions in inflammasome activation and inflammatory renal diseases
3. 学会等名 第1回中国大連医科大学免疫及び代謝性疾患研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Zhimin Mao and Jian Yao
2. 発表標題 Hydrogen Sulfide Determines Tumor Cell Sensitivity to Thioredoxin Inhibitor PX-12
3. 学会等名 SfRBM2019 ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Zhen Zhang, Jian Yao
2. 発表標題 Hydrogen sulfide counteracts angiotensin II-stimulated glomerular mesangial proliferation and matrix production via multiple mechanisms
3. 学会等名 25th annual conference of SFRBM (society for free radical and biological medicine) ( 国際学会 )
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 Zhimin Mao, Jian Yao
2. 発表標題 Hydrogen sulfide protects cells against oxidative stress through modifying the redox status of thioredoxin
3. 学会等名 25th annual conference of SFRBM (society for free radical and biological medicine) ( 国際学会 )
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 Yanru Huang, Jian Yao
2. 発表標題 Connexin43 regulates inflammasome activation and LPS-initiated acute renal injury via modulation of cellular oxidative status
3. 学会等名 25th annual conference of SFRBM (society for free radical and biological medicine) ( 国際学会 )
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 Yao Jian
2. 発表標題 Gap junction-mediated regulation of redox signaling and oxidative cellular responses
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Zhen Zhang, Xiawen Yang, and Jian Yao
2. 発表標題 Hydrogen sulfide inhibits antibody- and complement-mediated immune responses via S-sulfhydration
3. 学会等名 24th Annual Meeting of Free Radical Biology & Medicine (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Zhen Zhang, Jian Yao
2. 発表標題 Glutathione inhibits antibody-initiated and complement-dependent lysis of glomerular mesangial cells via multiple mechanisms
3. 学会等名 第60回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Xiling Zhang, Jian Yao
2. 発表標題 The pivotal role of TRPV4 and Connexin43 channel transactivation in mediation of aminoglycoside-elicited renal tubular cell injury
3. 学会等名 第60回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学 研究者総覧  
<http://nerdb-re.yamanashi.ac.jp/Profiles/322/0032110/profile.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----