

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007-2008
課題番号：19591846
研究課題名 (和文) ナノ複合体ベクターによる受容体ターゲティングを利用した膀胱特異的遺伝子治療法

研究課題名 (英文) Receptor mediated gene therapy targetting to bladder upon nanoscale vector complex

研究代表者

兼松 明弘 (KANEMATSU AKIHIRO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号:90437202

研究成果の概要:本研究目的は、膀胱に効率良く薬剤を局所投与する方法の開発である。まず、薬剤の効果をマウスで判定できる新たな排尿評価方法を確立した。受容体に結合するベクター (遺伝子の担体) の開発に取り組んだが、導入効率の上昇は認めなかった。そこで、ゼラチンを直接添付して薬剤を徐放する方法を採用した。下部尿路閉塞時に産生される増殖因子 **bFGF** (塩基性線維芽細胞増殖因子) が、平滑筋の刺激性の増強を介して、過活動膀胱を誘導することを示した。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・泌尿器科学・排尿学

キーワード:膀胱特異的、新規遺伝子ベクター、経尿道的遺伝子導入、オキシブチニン

1. 研究開始当初の背景

膀胱は経尿道的に膀胱内に抗ガン剤や抗コリン剤を注入する治療方法が臨床的に用いられているが、強力なバリアー機能をもつ正常尿路上皮から薬剤が吸収される機序は十分解明されていない。

また、膀胱内に効率的に遺伝子、薬剤を投与する方法として、各種ウイルスベクターの安全性が必ずしも保証されていないのが大きな問題となっている現在、高い遺伝子導入効率を持ち、安全性の高い非ウイルスベクターの開発が期待

されていた。

我々は、プルラン、スペルミンによる多糖ベクターが糖鎖受容体を介して膀胱癌細胞、平滑筋培養細胞に遺伝子導入可能である非ウイルスベクターを開発していた。しかし、膀胱内投与ではその効果は認めていなかった。

また、マウスの排尿評価系は確立しておらず、薬剤局所投与による排尿機能評価は困難な状況であった。

2. 研究の目的

膀胱に対する効率的な薬剤局所投与の開発を目的としている。

(1) 膀胱に対する新規局所投与方法

膀胱に広く発現するムスカリン受容体と親和性のある抗コリン剤(オキシブチニン)と多糖ベクター(プルランスペルミン)の複合体を形成させることで、受容体を介しての細胞内取り込みを促進させ、膀胱機能を調節する遺伝子や薬剤の導入効率の向上を目指した。

(2) 新たな排尿評価系の確立

膀胱機能を調節する薬剤の評価方法として、従来困難であったマウスの利用を可能とするために、新たな排尿評価方法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 膀胱に対する新規局所投与方法について

- ① オキシブチニン/プルランスペルミン/プラスミドによるナノベクター複合体の形成
- ② ナノベクター複合体による遺伝子導入効率の評価
- ③ ゼラチンによる増殖因子(bFGF)徐放による膀胱機能評価

(2) 新たな排尿評価系の確立

マウスの排出尿を濾紙で受け、浸透部の面積を測定することで、排尿頻度および一回排尿量を評価した。

4. 研究成果

(1) 膀胱に対する新規局所投与方法について

① ナノベクター複合体の形成

プルランスペルミンのアミノ基とリン酸基の比率、オキシブチニンの濃度を変化させ、さまざまな複合体を形成した。

また、市販の遺伝子導入薬 Lipofectamine 2000、ムスカリン受容体アゴニストであるカルバコールも使用し、複合体を形成した。

② ナノベクター複合体による遺伝子導入効率の評価

膀胱癌細胞(T24, TCCsup, 尿路上皮細胞)を使用し、上記複合体の遺伝子導入を施行したが、導入効率の上昇は認めなかった。

原因として、複合体はオキシブチニンのムスカリン受容体に対する親和性を有する部位を隠すような構造をとると考えられた。そこでオキシブチニンの水酸基とスペルミンのN末端を反応させることで、オキシブチニンのムスカリン受容体反応

部位を保持した新たな化合物を合成した。

新たな化合物を用いて同様に遺伝子導入を施行したが、効率の上昇を認めず、またオキシブチニン同時投与による阻害もかからなかった。ムスカリン受容体に結合しても、エンドサイトーシスされないことなどが原因として考えられた。

そこで、方針を転換し、ゼラチンにより徐放化した増殖因子を直接膀胱に投与する方法を試みた。

その結果、下部尿路閉塞時に尿路上皮より産生されるbFGFが、筋層のコネキシン43の産生を通してギャップジャンクションを増加させ、頻尿症状を誘導することが認められた。(雑誌文献②)

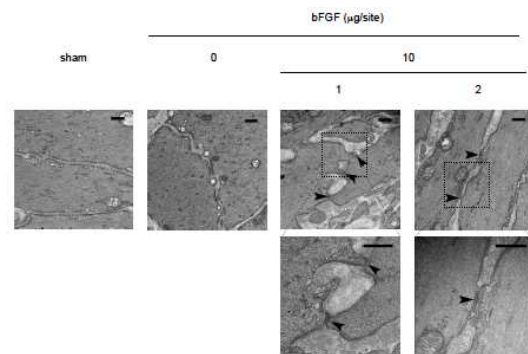


図1 bFGF 徐放ゼラチンハイドロゲル膀胱貼付ラット(以下 bFGF 添付ラット)における膀胱平滑筋のギャップジャンクション発現像(透過型電子顕微鏡)

bFGF 貼付ラットにてギャップジャンクション(矢印)の発現上昇を認める。

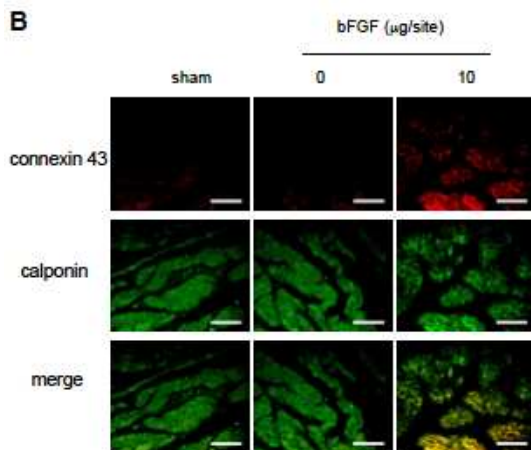


図2 bFGF 貼付ラットにおける膀胱のコネキシン発現像(免疫染色)

bFGF 貼付ラットの膀胱平滑筋にてコネキシンの発現上昇を認める。

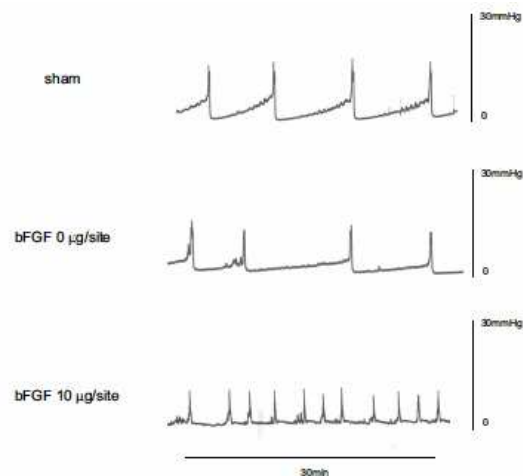


図3 bFGF 貼付ラットにおけるシストメリーの結果
bFGF ラットにて頻尿を認める。

また、bFGF による膀胱平滑筋の刺激性の亢進は、ギャップジャンクション阻害剤であるαグリチルリチン酸(aGA)の投与により抑制されるが、膀胱収縮力の低下は認めなかった。

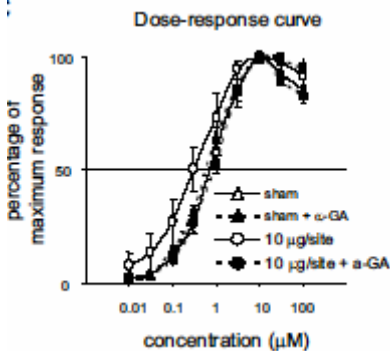


図4 bFGF 貼付ラットの膀胱切除片におけるコリン作動薬、カルバコール刺激によるマッスルストリップテストの結果

bFGF 貼付ラットではカルバコールに対する易刺激性を認めるが、その効果は aGA にて抑制されている。

下部尿路閉塞時に誘発される過活動膀胱では、従来の治療薬である抗コリン剤では収縮力の低下が問題となっていたが、今回の実験結果から、ギャップジャンクション阻害剤である aGA が膀胱収縮力を低下させずに頻尿を改善させ得る新たな薬剤として特許出願した。

(2) 新たな排尿評価系の確立

マウスの尿を直接濾紙で受け止めることにより、正確に一回排尿量を測定する手法(Voided Stein on Paper Method VSOP 法)を見出した。(雑誌文献①)

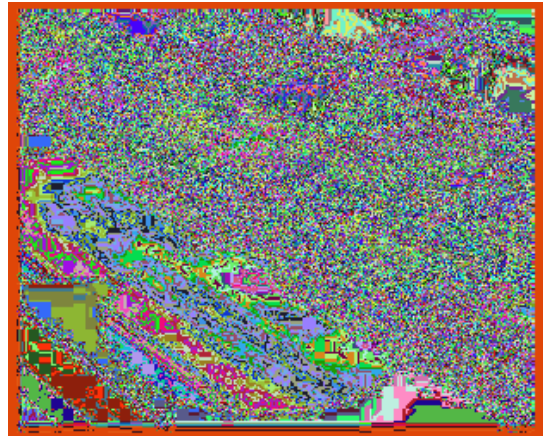


図5 VSOP 法の実験風景

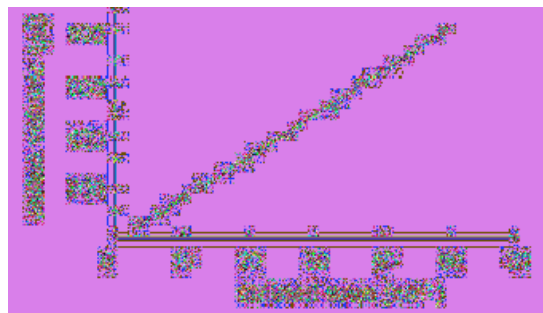


図6 VSOP 法による濾紙の面積と液量の相関図 ($R^2=0.998$)

この方法の開発により、薬剤のマウスの膀胱機能への影響はもとより、形質転換マウス、ノックアウトマウスなどの膀胱機能の測定が可能となり、今後、排尿障害の遺伝子レベルでの病態解明の一助となるのは間違いないであろう。

また、現在 VSOP 法をさら生理的な状況で施行すべく、24時間自動測定できる装置を開発中である。

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2件)

① Sugino Y, Kanematsu A, Hayashi Y, Haga H, Yoshimura N, Yoshimura K, Ogawa O
Voided stain on paper method for analysis of mouse urination. *Neurourol Urodyn* 27:548-552 2008 (査読有り)

② Imamura M, Negoro H, Kanematsu A, Yamamoto S, Kimura Y, Nagane K, Yamasaki T, Kanatani I, Ito N, Tabata Y, and Ogawa O
Basic fibroblast growth factor causes urinary bladder overactivity through gap junction generation in the smooth muscle. *Am J Physiol Renal Physiol* in press (査読有り)

[学会発表] (計5件)

- ① 杉野 善雄 他 Novel Quantification Method using Voided Stain on Paper Technique for Voiding Analysis in the Mouse 第 37 回国際尿禁制学会(ICS) (2007.8 オランダ ロッテルダム)
- ② 杉野 善雄 他 Novel Quantification Method using Voided Stain on Paper Technique for Voiding Analysis in the Mouse 第 29 回国際泌尿器科学会(SIU) (2007.9 フランス パリ)
- ③ 杉野 善雄 他 VSOP 法を用いたマウスの排尿解析の検討 第 95 回日本泌尿器科学会総会 (2008.4 横浜)
- ④ 根来 宏光 他 Basic fibroblast growth factor causes urinary bladder overactivity through gap junction generation in the smooth muscle 第9回アジア泌尿器科学会 (2008.10 インド ニューデリー)
- ⑤ 根来 宏光 他 bFGF による平滑筋 gap junction 発現を介した過活動膀胱発症機序の解明 第96回日本泌尿器科学会総会 (2009.4 岡山)

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称:過活動膀胱治療剤

発明者:兼松 明弘 他

権利者:小川 修

番号:2008-150937

出願年月日:2008年6月9日

国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

兼松 明弘 (KANEMATSU AKIHIRO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号:90437202

(2)研究分担者

小川 修 (OGAWA OSAMU)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号 90260611

西山 博之 (NISHIYAMA HIROYUKI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号:20324642

中村 英二郎 (NAKAMURA EIJIRO)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号:90293878

吉村 耕治 (OGAWA OSAMU)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号:40397542

(3)連携研究者

田畑 泰彦 (TABATA YASUHIKO)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号:50211371