

平成 21 年 3 月 30 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19791117

研究課題名（和文） 過活動膀胱の膀胱興奮性における Kit 陽性細胞の役割

研究課題名（英文） The role of Kit positive interstitial cells in overactive bladder

研究代表者

窪田 泰江 (KUBOTA YASUE)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00381830

研究成果の概要：

今回の研究結果から過活動膀胱の発症機序として、以下のことが考えられた。膀胱伸展時や刺激時に粘膜上皮から放出される伝達物質が、膀胱粘膜下層に存在する Kit 陽性間質細胞を介し、膀胱知覚神経（おもにC線維）に伝えられることにより、膀胱の知覚過敏が生じ、尿意切迫感や膀胱容量の減少といった症状を引き起こしている可能性が示唆された。また Kit 抑制因子により、異常な情報伝達を抑制することができれば新たな治療法の開発につながると期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

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

キーワード：過活動膀胱、間質細胞

## 1. 研究開始当初の背景

私たちはこれまでに、膀胱における自動運動発生機序について研究を行ってきた。特に消化管の自発興奮の発生・伝達および神経筋伝達を制御しているカハールの介在細胞 (Interstitial cells of Cajal: ICC) の存在に着目し、膀胱においても ICC 様細胞が *c-kit* 遺伝子によりコードされるレセプター型チロシンキナーゼである Kit を発現し、細胞間情報伝達の経路、もしくは神経筋伝達の介在細胞として働いている可能性を報告してきた。本研究報告では、これらの研究成果

を基に、Kit を介した過活動膀胱の病態解明に取り組んだので紹介する。

## 2. 研究の目的

消化管の自動運動の源はカハールの間質細胞 (interstitial cells of Cajal: ICC) であると考えられており、ICC が欠損すると消化管運動が低下すると言われている。最近同様に自動運動を有する膀胱平滑筋においても、同様の形態学的特徴を持つ Kit 陽性の間質細胞が発見され、膀胱における自発活動の発生機序と間質細胞との関係が注

目されている。現在我が国でも多くの患者数を持つ過活動膀胱の病態においても、間質細胞が関わっている可能性が高く、その役割を検討することは新たな治療法を確立する上でも非常に重要と思われる。

私達は過活動膀胱 (OAB) の発症に、Kit 陽性細胞および Kit リガンドである Stem Cell Factor (SCF) が関与している可能性を推察した。尿路上皮から求心性知覚神経へのシグナル伝達には粘膜下層に存在する Kit 陽性細胞が関与している可能性を考えた。そのメカニズムとして、膀胱上皮から Kit リガンドである SCF の過剰発現により、レセプターである c-kit を介して膀胱粘膜下に存在する Kit 陽性細胞を刺激し、知覚神経 (C-fiber) を介する膀胱の興奮性が高まることを予想している。今回の研究ではヒトにおける過活動膀胱発症と c-kit の関与について検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 閉塞膀胱モデルにおける Kit 陽性細胞の検討

間質細胞は c-kit 遺伝子によりコードされるレセプター型チロシンキナーゼである KIT を発現しているため、KIT に対する特異抗体である c-kit により認識される。したがって、免疫抗体法により組織内に分布する間質細胞を同定できる。また分子生物学的手法により、KIT 発現量も測定することにより、排尿機能と間質細胞の分布について比較検討する。

消化管組織においては閉塞による Kit 陽性細胞の数の減少や消化管切除、再吻合時の一時的な間質細胞の消失とその後の隣接部位からの分化、再生が知られている。このことは生体内で起こる様々な刺激により、おそらく間質細胞の増殖をうながす幹細胞因子などの変化を通じて間質細胞の分布が制御されていることを示唆する。過活動膀胱のうち特に前立腺肥大症による尿流閉塞にともなう症例においては消化管閉塞に類似した状態であると思われるので、Kit 陽性細胞を介した平滑筋間ネットワークの亢進により、内圧上昇を伴う筋原性収縮が起こっている可能性がある。モルモットを用いて排尿可能な程度の尿流閉塞を起こしたモデル動物を作成し、術後経時的に排尿回数、一回排尿量などをモニターする。具体的には術後 1・2・4 週後に経時的尿量計測装置を用いて排尿記録を取りながら名古屋市立大学医学部動物実験施設で飼育する。

現在の過活動膀胱の診断基準に合致する排尿記録上の変化が現れた後、膀胱内圧測定を行ない、排尿前収縮などの所見の変化を観察する。その後膀胱を摘出して Kit 陽

性細胞の量的変化を免疫抗体法により検討する。また細胞内カルシウム測定により平滑筋線維束間のカルシウム信号の伝達に変化が起こっているかどうかを調べ、筋張力を測定して自発収縮のパターンを観察する。得られた結果は週齢を一致させたコントロール群および尿道周囲の手術操作のみを行い閉塞を与えなかった群との結果と比較する。

#### (2) 閉塞膀胱モデルにおける Stem Cell Factor (SCF) 陽性細胞の検討

間質細胞は c-kit 遺伝子によりコードされるレセプター型チロシンキナーゼである KIT を発現しているが、KIT を活性化するリガンドとして幹細胞因子 (Stem Cell Factor: SCF) が知られている。私たちはこの幹細胞因子 (SCF) を介した間質細胞の量的変化を考え、SCF の抗体を用いて SCF 陽性細胞の局在、術後の経時的な変化につき検討する。また定量的 RT-PCR、Western blotting 法などの分子生物学的手法により、SCF 発現量も測定することにより、Kit 陽性細胞との相関について検討する。

(1)、(2) とも手術などにより条件に一致するヒト膀胱組織が入手できたときは、ヒトにおいても同様に平滑筋機能と間質細胞の分布を検討する。この際は手術前の膀胱機能についても検討する。

#### (3) 透過型電子顕微鏡によるモルモット膀胱の超微細構造

膀胱における Kit 陽性細胞は、光頭レベルでは紡錘系をしているのが特徴とされる。しかし消化管のペースメーカー細胞であり、同じく Kit 陽性であるカハールの介在細胞は多数の枝をもち、互いに連絡している所見も確認されている。膀胱における電子顕微鏡学的検討はこれまでほとんどされていないのが実情だが、今回正常・尿流閉塞膀胱における超微細構造につき、特に Kit 陽性細胞の形態学的特徴・変化、また神経や筋細胞との位置関係などにつき検討する。

#### (4) 尿流閉塞モデル動物の膀胱における KIT 抑制因子 (グリベック) の影響

尿流閉塞モデル作成により過活動膀胱における Kit 陽性細胞役割を調べる一方で、KIT に対する抑制因子であるメシル酸イマチニブ (グリベック) の作用を検討する。メシル酸イマチニブは元来慢性骨髄性白血病に対する治療薬として開発されたが、消化管の間質細胞から起こる腫瘍に対しても効果が確認されている。そこで過活動膀胱と Kit 陽性細胞の因果関係が確認された場合の将来的な分子標的治療のひとつの選択肢になりうると考えられる。この実験には

モルモットを用いてコントロール群、メシル酸イマチニブ投与群を設定し、2～4週間程度の期間を経た後、各群間で排尿記録のパターン、Kit陽性細胞の分布、平滑筋機能などを比較検討するが必要に応じて設定期間は延長する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 閉塞モデル膀胱におけるKit陽性細胞の検討

モルモット尿流出路閉塞モデルを作成し、Kitの局在と量的変化につき術後1, 2, 4週目に膀胱を摘出して免疫組織化学的に検討したところ、Kit陽性間質細胞は、閉塞期間に比例して閉塞モデルの膀胱粘膜下層および漿膜側を中心に、正常膀胱に比べ増加していた。また膀胱摘出前には膀胱内圧測定を行い、閉塞膀胱の機能的な変化を検討した。閉塞膀胱では1回排尿量が正常と比べ、有意に減少しており、non-voiding contraction (排尿前収縮) も異常に増加していた。したがって、閉塞モデルモルモットでは過活動膀胱の状態になっていると考えた。

##### (2) 閉塞膀胱モデルにおけるStem Cell Factor (SCF)陽性細胞の検討

モルモット尿流出路閉塞モデルにおいて、Kitを活性化するリガンドであるSCFの局在と量的変化につき免疫組織化学的に検討した。術後1, 2, 4週目に染色したところ、時間経過とともに、尿路上皮を中心に発現が増加していた。またOAB症状を有する患者とOAB症状のない患者の尿中SCF濃度を比較したところ、OAB症状のある患者で有意にSCF濃度が高かった。

##### (3) 透過型電子顕微鏡によるモルモット膀胱の超微細構造

正常膀胱に紡錘形をしたICC様細胞の細胞質にはミトコンドリアや粗面小胞体が豊富に存在し、細胞同士が互いに連絡しあって、神経・平滑筋とも密接している像を観察した。BOO膀胱においては間質細胞が一部変形しており、これらの微細構造の変化が過活動膀胱の発症につながっているものと推察された。

##### (4) 尿流出路閉塞モデル動物の膀胱におけるKIT抑制因子(グリベック)の影響

Kitを抑制因子であるグリベック®は、BOOモデルにおいて排尿圧を変化させることなく、non-voiding contractionを抑制し、排尿間隔を延長させることが判った。この結果からKitが間質細胞を介して過活動膀胱の発症機序に関与している可能性が示唆された。

#### 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2件)

- ① Kubota Yasue, Hashitani Hikaru, Shirasawa Nobuyuki, Kojima Yoshiyuki, Sasaki Shoichi, Mabuchi Yoshio, Soji Tsuyoshi, Suzuki Hikaru, Kohri Kenjiro: Altered distribution of interstitial cells in the guinea pig bladder following bladder outlet obstruction. *Neurourol Urodyn.* 27: 330-340, 2008 査読あり
- ② 窪田 泰江、佐々木 昌一、小島 祥敬、早瀬 麻沙、郡 健二郎: 女性過活動膀胱の特性とこれからのStrategy. *泌尿器科紀要* 53: 435-39, 2007 査読なし

[学会発表] (計7件)

- ① 窪田 泰江、橋谷 光、小島祥敬、早瀬 麻沙、佐々木昌一、鈴木 光、郡 健二郎: 過活動膀胱におけるKit陽性間質細胞の役割: 名古屋市立大学医学会総会, 2008.12.8, 名古屋市
- ② Kubota Yasue, Kojima Yoshiyuki, Hayase Masa, Sasaki Shoichi, Kenjiro: Altered distribution of interstitial cells in the guinea pig bladder following bladder outlet obstruction. *American Urological Association Annual Meeting*, 2008.5.17-22, Orland
- ③ 窪田 泰江: 過活動膀胱におけるSCF-Kitシグナル伝達系の機能解析と遺伝子多型解析。第96回日本泌尿器科学会総会、2008.4.25 (ヤングリサーチ報告) 横浜市
- ④ 窪田 泰江、岡田 淳志、佐々木 昌一、郡 健二郎: 過活動膀胱に対するKitチロシンキナーゼ阻害薬の作用機序の解明と治療薬への可能性: 第96回日本泌尿器科学会総会、2008.4.25, 横浜市
- ⑤ 窪田 泰江、佐々木 昌一、小島 祥敬、郡 健二郎: (シンポジウムVI) 過活動膀胱メカニズムにおけるKit陽性間質細胞の関与と新しい治療戦略。第14回日本排尿機能学会、2007.10.4-6、福島市
- ⑥ 窪田 泰江、小島 祥敬、佐々木 昌一、郡 健二郎: (シンポジウム) 過活動膀胱におけるKit陽性細胞の役割。第49回日本平滑筋学会、2007.7.5-6、樫原市
- ⑦ Kubota Yasue, Kojima Yoshiyuki, Hayase Masa, Sasaki Shoichi, Kenjiro: Association between bladder overactivity and increased numbers of interstitial cells in the guinea pigs

with partial bladder outlet  
obstruction. American Urological  
Association Annual Meeting,  
2007. 5. 19-24, Anaheim

[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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

窪田 泰江 ( KUBOTA YASUE )

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 00381830

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし