

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09697

研究課題名（和文）膀胱平滑筋層間ASIC陽性細胞の膀胱伸展刺激受容における役割の検討

研究課題名（英文）Examination of the role of bladder ASIC-positive cells in receiving bladder stretch stimulation

研究代表者

柴田 泰宏 (Yasuhiro, Shibata)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・講師

研究者番号：10534745

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：過活動膀胱などの尿意の異常を伴う疾患の病態を理解するためには「尿意はどのように発生するか」を根本から知る必要がある。私たちは機械刺激受容体候補遺伝子であるASIC（Acid Sensing Ion Channel、酸感受性イオンチャネル）ファミリーに注目し、ASIC4遺伝子を中心に解析を行った。Void Spot Assayによって、ASIC4ノックアウトマウスが野生型マウスに比較して最大膀胱容量の低下傾向および膀胱の蓄尿機能の不安定さを示すsmall spotsの増加が観察された。これらよりASIC4が膀胱機能に何らかの生理的機能を有しているものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿意の異常、すなわち蓄尿量センサーとしての膀胱の知覚異常は尿意切迫感を特徴とする過活動膀胱、症状が激しい間質性膀胱炎、そして慢性感染などのリスクを伴う低活動膀胱など様々な病態を引き起こす。これらの病態を深く理解するためには尿意と膀胱の感覚受容機構を理解する必要がある。本研究はASIC4が膀胱の生理的機能に關与していることを示している。ASICファミリーは感覚神経に発現していることから、本研究の結果は膀胱の感覚受容機構、尿意発生を理解の一助となるとともに、上記尿意異常を示す疾患群の病態理解に新たな示唆をもたらすものであると考える。

研究成果の概要（英文）：To understand the pathology of conditions involving abnormal urinary urgency, such as overactive bladder, it is essential to fundamentally grasp how urinary urgency arises. We focused on the ASIC (Acid Sensing Ion Channel) family, a candidate gene for mechanoreceptors, and conducted analyses centered around the ASIC4 gene. Through Void Spot Assay, a tendency of decreased maximum bladder capacity and increased instability in bladder storage function, indicated by an increase in small spots, was observed in ASIC4 knockout mice compared to wild-type mice. From these findings, it was inferred that ASIC4 possesses some physiological function related to bladder function.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：acid sensing ion channel 膀胱 尿意 過活動膀胱

### 1. 研究開始当初の背景

下部尿路症状の1つである尿意切迫感を伴う病態として、過活動膀胱 (overactive bladder; OAB) の概念が広く認知されるようになった。過活動膀胱の患者数は推計で810万人とも1000万人を超すとも言われ、高齢化にともない更なる増加が予想される。また、OABはQOLや社会的活動度を著しく低下させることから健康長寿に向けて対策の重要性が叫ばれている。このように過度の尿意や尿意切迫感に悩む患者が多数存在し、その対応が迫られている一方で、尿意を受容する機構についての全体像は解明されていないのが現状である。

切迫性の尿意は、その発生機序から理論上は排尿筋過活動(detrusor overactivity)による膀胱平滑筋の急な収縮の結果と、膀胱の知覚そのものの過敏とに分類できる。しかし、現在臨床応用されている薬剤は遠心性神経/排尿筋接合部のアセチルコリンレセプターが主たる治療標的である。やはり遠心性神経終末をターゲットとした3刺激薬が臨床応用されるなど治療法が徐々に多様化しているものの、過活動膀胱が既存の薬剤で完全にコントロールできるようになり疾患を征圧したとは言い難い。このため、膀胱の知覚、すなわち、伸展刺激受容機構および尿意発生の根本の理解と、これを治療標的とした薬剤の開発が求められている。

### 2. 研究の目的

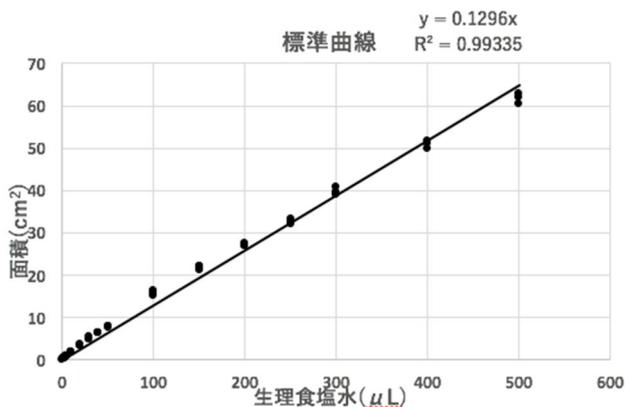
尿意の異常、すなわち蓄尿量センサーとしての膀胱の知覚異常は複数のベクトルに分類される。具体的には尿意切迫感を特徴とする過活動膀胱、症状が激しい間質性膀胱炎、そして慢性感染などのリスクを伴う低活動膀胱などである。これらの病態を深く理解するためには「尿意とは何か」「尿意はどのように発生するか」を根本から知る必要がある。しかし、この問に対する明確な答えは未だに無い。

私たちはこれまでに機械刺激受容体候補遺伝子であるASIC (Acid Sensing Ion Channel、酸感受性イオンチャネル) ファミリーを中心に解析を行ってきた。そのなかで、ASIC4 遺伝子が膀胱平滑筋層に発現していること、および、アフリカツメガエル卵母細胞をもちいた発現系で機械刺激の一種である浸透圧変化によってASIC4を介した流入電流が増減することを見いだした。このことからASIC4が膀胱における機械刺激受容に何らかの役割を果たしていることが推察される。これらより、ASICファミリー、特にASIC4を主なターゲットとした膀胱の機械刺激受容機構、尿意発生機構の解明を目指すことを目標とした。

### 3. 研究の方法

ASICファミリーの発現分布、形態学的解析のためにASIC1a, 1b, 3, 4についてタグタンパク質融合ノックインマウスを設計、作出した。また、機能解析のためにKOMPからASIC4ノックアウトマウスを購入しVoid Spot Assay (VSA)<sup>1)</sup>を用いて膀胱機能の測定を行った。ASIC4ノックアウトマウスは、The Jackson LaboratoryのKnockout Mouse Project (KOMP)より入手した。10-12週齢の雄マウスを使用した。VSAの条件は、まず自由飲水下で1時間の慣らし時間をおいた後に、無給水環境でフリームービング下に2時間の排尿行動観察期間を設けた。底面に強いたる紙に形成された尿スポットを紫外線照射により可視化し、image Jを用いてその面積を測定した。ろ紙上のスポット面積と滴下液体量は右図の如く強い相関がある。これを利用し、スポット面積から排尿量を解析した。

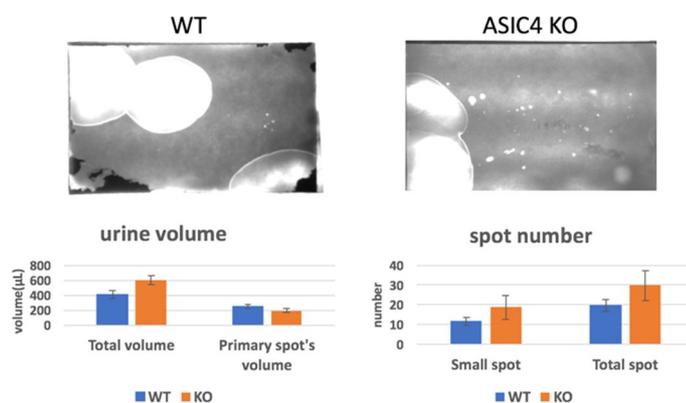
生理的条件下および3% Dextran Sulfate Sodium (DSS) 5日間自由飲水投与による大腸炎からのCross-Organ Sensitizationによる排尿動態への影響を観察した。



### 4. 研究成果

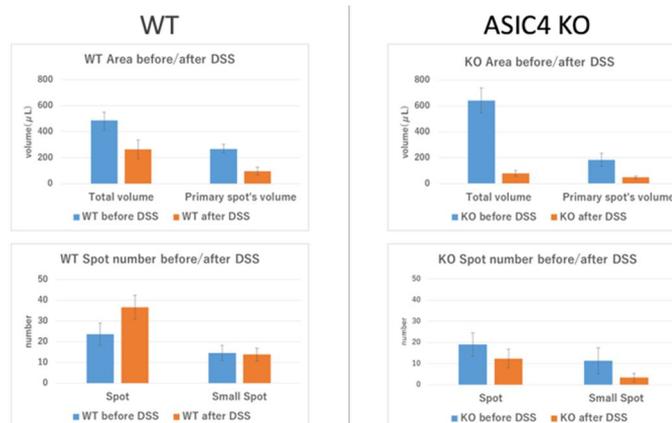
経験上、挿入部位や融合タンパク質との相性などによりタグ分子が報告通りの特異度、感度を示さないことが予測されたため、各ASICには2種のtag分子を融合させることとした。具体的にはASIC1aにtag-RFPとV5を、ASIC1bにはtag-BFP2とHAを、ASIC3にFlagとEGFPをASIC4に3xFlagとAU1を融合させたfusionタンパクを設計しノックイン配列およびgRNA配列を決定した。得られた各ノックインマウスを材料にウエスタンブロット法を用いて抗体の感度および特異度を検討した。その結果、V5-tag, HA-tag, EGFP, AU1がタグとして十分な感度、特異度を有していることが明らかとなった。ただし、抗体により複数のバンドが検出される、もしくはポジコンとなるべきサンプルにおいて全くバンドが検出されないなどの結

果となった。タグ分子といえども用いる抗体によってはその特異度および感度に十分な注意が必要であることが再認識された。ASICファミリーのうち、ASIC2について、その共通領域のノックアウトマウスをKOMPから購入し、バッククロス中である。また、ASIC2aおよびASIC2bのそれぞれのタグノックインマウスの作出を行っている。ノックインマウスの作出にはCRISPR/Cas9システムを用いる予定である。また、その際にindelの発生によってASIC2a, 2bノックアウトマウスが副産物として作出されることが期待され、同時に確保する計画である。



VSAを用いたASIC4ノックアウトマウスと野生型マウスの排尿動態を比較した結果、ASIC4マウスは小スポット数およびトータルの尿スポット数が増加するとともに、最大排尿量を示すプライマリースポット面積は減少していた。これらの結果から、ASIC4ノックアウトマウスは最大膀胱容量が野生型マウスと比較して少量であることが示され頻尿の傾向であると考えられた。

また、DSS誘発製大腸炎モデルを用いた検討では、野生型マウスにおいてはDSS飲水前と比較して尿量やPrimary Spot面積の低下や総スポット数の増加が見られた。ラットを用いたTNGS誘発性大腸炎モデルと共通の結果<sup>2)</sup>であり、膀胱は周辺臓器の炎症からCross-Organ Sensitizationを受けることが確認された。ASIC4ノックアウトマウスにおいてDSSを同様に投与した結果、大腸炎は膀胱機能に間接的な影響をおよぼすと考えられる。これに対してASIC4ノックアウトマウスではDSS誘発性大腸炎モデルにおいてPrimary Spot面積の減少が認められた。野生型マウスとASIC4ノックアウトマウスの間に大腸炎によって引き起こされる膀胱機能に差が見られたことから、大腸-膀胱間でのCross-Organ Sensitizationの表出に対してASIC4が関与している可能性が示唆された。ただし、今回の結果においてDSS投与有無の間で観察期間における排尿量に大きな差があったことが結果に影響を与えた可能性について考慮を要すると共に、今後さらなる検討が必要である。



膀胱の感覚を司る分子に対する知見の蓄積は近年増加しつつある。ノーベル医学生理学賞を受賞した皮膚の触覚受容機構の中心分子Piezo1及びPiezo2の報告は膀胱にも応用され<sup>2)</sup>、これらの分子が膀胱の感覚神経を介して膀胱機能に影響を与えることが明らかとなった。しかし、Piezo2ノックアウトマウスでは尿閉は発生せず、排尿サイクルは野生型と比較し乱れるものの一定量の尿が溜まった後に排尿するという膀胱の基本的な機能は保たれていた。Piezo2ノックアウトマウスのVSAにおいてsmall spotが増加するという結果はASIC4ノックアウトマウスと共通の結果であり、今後Piezo分子とASICファミリーとの機能的相互関係についても検討が必要であると考えられる。

過去から現在に至るまで様々な分子が膀胱機能や尿意感覚に影響することを報告されてきたが、その全容の解明にはほど遠く、本領域は未だにフロンティアである。生理的条件下における膀胱の感覚機能の理解は、病的状態である間質性膀胱炎の病態理解を理解する前提条件として本質的課題であり、膀胱の感覚機能の研究は今後ますます重要になると考える。

## 参考文献

- 1) Hill WG et al. Void spot assay: recommendations on the use of a simple micturition assay for mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018 Nov 1;315(5):F1422-F1429.
- 2) Marshall KL et al. PIEZO2 in sensory neurons and urothelial cells coordinates urination. *Nature*. 2020 Dec;588(7837):290-295.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shibata Yasuhiro, Kumamoto Natsuko, Sakuma Eisuke, Ishida Yusuke, Ueda Takashi, Shimada Shoichi, Ugawa Shinya	4. 巻 610
2. 論文標題 A gain-of-function mutation in the acid-sensing ion channel 2a induces marked cerebellar maldevelopment in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 77 ~ 84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.04.030	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 Yoshihara Hiroyuki, Sugiura-Ogasawara Mayumi, Ozawa Fumiko, Kitaori Tamao, Ozaki Yasuhiko, Aoki Koji, Shibata Yasuhiro, Ugawa Shinya, Nishiyama Takeshi, Omae Yosuke, Tokunaga Katsushi	4. 巻 7
2. 論文標題 Polo-like kinase 4 and Stromal antigen 3 are not associated with recurrent pregnancy loss caused by embryonic aneuploidy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 open access
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-020-0106-2	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柴田泰宏、熊本奈都子、植田高史、鶴川眞也
2. 発表標題 Generation and phenotype of ASIC2a transgenic rat with gain-of-function point mutation
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 / 第65回日本神経化学会大会 / 第32回日本神経回路学会大会 合同大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田泰宏、熊本奈都子、植田高史、鶴川眞也
2. 発表標題 ASIC2a 点変異トランスジェニックラットに認められた小脳変性症の解析
3. 学会等名 日本解剖学会 第82回中部支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 熊本奈都子 柴田泰宏 植田高史 鶴川眞也
2. 発表標題 成体脳海馬神経新生における酸感受性イオンチャネルASIC1aの役割
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柴田泰宏、熊本奈都子、植田高史、鶴川眞也
2. 発表標題 「内耳有毛細胞におけるASIC4の発現分布」
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田泰宏、横井雄斗、熊本奈都子、植田高史、鶴川眞也
2. 発表標題 内耳におけるチャンネルXの発言と機能解析
3. 学会等名 日本解剖学会 第80回中部支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田泰宏、横井雄斗、熊本奈都子、植田高史、鶴川眞也
2. 発表標題 内耳における新規リークチャネルの解析
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊本奈都子 柴田泰宏 植田高史 鶴川眞也
2. 発表標題 マウス味蕾における酸感受性イオンチャネルの発現
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横井雄斗、柴田泰宏、熊本奈都子、植田高史、鶴川眞也
2. 発表標題 酸感受性イオンチャネル3 (ASIC3) の痒みへの関与
3. 学会等名 第79回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊本奈都子 柴田泰宏 植田高史 鶴川眞也
2. 発表標題 成体脳海馬神経新生における酸感受性イオンチャネルASIC1aの役割
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担 者	鶴川 眞也  (Ugawa Shinya)  (20326135)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授   (23903)	研究デザインに対する助言、統計学的処理の妥当性の検討、免疫組織化学的検討、ASICファミリータグノックイン遺伝子改変動物の作出についてのデザインの監修などを担当。

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	窪田 泰江  (Kubota Yasue)  (00381830)	名古屋市立大学・大学院看護学研究科・教授    (23903)	マウスにおける排尿機能の測定方法についての助言と、その確からしさについての監修などを担当。
研究分担者	太田 裕也  (Ohta Yuuya)  (20814255)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員    (23903)	マウスの維持管理、遺伝学的系統の掛け合わせと保存。マウスにおける排尿機能の測定と統計学的解析などを担当。

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関