

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591886

研究課題名（和文） K I T陽性間質細胞情報伝達機構の解明と過活動膀胱に対する新規分子標的治療の開発

研究課題名（英文） Research for signal mechanism of the KIT-positive interstitial cells and development of the new molecular target treatment for the over active bladder

研究代表者

佐々木 昌一（SASAKI SHOICHI）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50225869

研究成果の概要（和文）：

モルモットを用いてB00モデルを作成し、過活動膀胱の発症機序について検討したところ、Kit陽性ICC様細胞は、B00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SCFは尿路上皮を中心に発現が増加していた。B00モデル動物ならびに膀胱炎も出るラットにイマチニブを投与したところ、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ICC様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。

研究成果の概要（英文）：

KIT is not only a detection marker of these cells, but also may play a crucial role in the control of bladder function. Research into the effect of c-kit receptor inhibitor, imatinib mesylate, on bladder function implies that KIT-positive ICCs may be therapeutic target cells to reduce bladder overactivity and that the blockage of c-kit receptor may offer a new therapeutic strategy for OAB treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：K I T陽性間質細胞、細胞増殖、Glivec、Bcr-Abl、マウス、B00(膀胱流出路閉塞)モデル、過活動膀胱、KIT変異ラット

1. 研究開始当初の背景

過活動膀胱（OAB）発症のメカニズムのひとつに、尿路上皮からのプロスタグランジンやATP放出、NO産生低下などによる球心性C線維の興奮という神経因性メカニズムと、これがトリガーになり排尿筋における受容体感受性の増大、筋細胞の興奮性亢進、筋細胞間のcouplingの増

強が言われている（文献1）。さらに、最近消化管自動運動のペースメーカーではないかと言われているカハール間質細胞（interstitial cell of Cajal; ICC）が膀胱にも存在し、膀胱の自発活動への関与が指摘されはじめてきた。

ICCは細胞膜にc-kit遺伝子によりコードされるKit（膜結合型チロシンキナ

一ゼ)を発現しており、膀胱においても Kit 陽性間質細胞が発見された。しかしながら ICC がどのように平滑筋収縮に関与するかについては十分解明されていない。

近年、ICC の Ca^{2+} 濃度上昇が平滑筋細胞のそのトリガーになることや、一部の ICC は神経細胞と平滑筋細胞との間に介在して、神経伝達 (コリン作動性および NO 作動性神経伝達) による収縮抑制をしているという報告もある。私達はこれまで KIT 陽性 ICC に着目し、膀胱生理学的機能を検討してきた (文献 3-5)。特に ICC は膀胱平滑筋の自発収縮運動をコントロールするのみならず C 線維を介して知覚をコントロールしている可能性を報告してきた。

私たちは過活動膀胱の発症のメカニズムがこの KIT 陽性 ICC の過剰なシグナル伝達に起因していると仮説し、本研究を開始した。

2. 研究の目的

過活動膀胱に対する治療法や予防法を開発するためにはその成因と病態を解明する必要がある。これを解明することにより従来の薬剤とは異なる薬理作用を持つ薬物が開発・応用できる可能性がある。同じく自動運動を有する消化管平滑筋においては、カハールの間質細胞と呼ばれる細胞群が自発興奮の発生、伝達に重要な役割をしていることが明らかになっている。最近この細胞に似た間質細胞の存在が尿管、膀胱、前立腺で報告されており、自発活動への関与が考えられている。また最近では膀胱知覚神経の神経終末に存在する受容体を介した排尿反射が亢進することが、過活動膀胱発症の一因であると考えられている。そのため過活動膀胱治療薬として、膀胱求心性神経を抑制する薬剤が注目されている。また膀胱粘膜上皮も機械的刺激に対するセンサー機能と情報伝達物質の分泌機能を有し、求心性神経の活性化に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。私たちはこれまでにモルモット尿流出路閉塞モデルの膀胱において、頻尿になるとともに Kit 陽性間質細胞が増加することも報告してきた。また過活動膀胱患者の膀胱では Kit 陽性間質細胞が増加することも知られている。

そこで今回の研究では、粘膜上皮から放出される SCF が粘膜下層に存在する間質細胞の Kit 受容体を介し、知覚神経を刺激して排尿反射を亢進させ過活動膀胱を起こす可能性を考え、膀胱における SCF・間質細胞の役割につき検討し、新た

な薬物治療に結びつけることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) FACS による KIT 陽性間質細胞の分離培養

マウス膀胱を摘出し、膀胱筋層と粘膜層 + 粘膜下層を分離。粘膜層 + 粘膜下層を用いる。蛍光色素を FITC、モノクローナル抗体として c-kit、vimentin、connexin 43 抗体を用いた。ハイパフォーマーセルソーターを用いてセルソーティングを行い、KIT 陽性間質細胞を分離し培養。免疫組織化学染色を c-kit、vimentin、connexin 43 抗体を用いて行い、分離純度を確認した。

(2) KIT 陽性間質培養細胞の刺激と KIT 陽性細胞の細胞シグナル伝達系の変化

SCF および Glivec による KIT 陽性間質細胞の刺激と細胞シグナル伝達系の変化 (1) で分離した KIT 陽性間質培養細胞を用いる。KIT の ligand である Stem cell factor を濃度をふって投与。KIT 陽性間質細胞の細胞増殖能を MTT assay により行う。また KIT シグナル伝達系 Bcr-Abl の発現の変化について定量的 RT-PCR さらに Western Blotting を行った。

さらに Glivec を投与して KIT 陽性間質培養細胞の増殖能の変化、KIT シグナル伝達系の変化について検討し、KIT 陽性間質細胞の特徴を検討した。

(3) 膀胱流出路閉塞 (BOO) およびサイクロフォスファミド膀胱炎モデルの作成

尿道から 20G のサーフローを留置し 3-0 silk で結さつし膀胱流出路閉塞モデルラットを作成。サイクロフォスファミド 100mg/kg を腹腔内投与し、膀胱炎モデルラットを作製。術後経時的に尿量計測装置を用いて排尿記録を取り、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ら膀胱内圧測定を行った。

(4) Kit mutant rat を用いた Kit 陽性間質細胞情報伝達機構の解明

12 週齢の Kit mutant mouse (WsRCWs/Ws) と wild type (WsRC+/+) において、まず c-kit の mRNA の検出を行った。次に膀胱の電子顕微鏡解析と、サイクロフォスファミドとプロタミン投与によって過活動膀胱の状態を作成し、膀胱内圧測定を行った。

4. 研究成果

(1) FACS による KIT 陽性間質細胞の分離培養

マウス膀胱を摘出し、膀胱筋層と粘膜層

+粘膜下層を分離。粘膜層+粘膜下層を用いる。蛍光色素をFITC、モノクローナル抗体としてc-kit、vimentin、connexin 43抗体を用い、ハイパフォーマーセルソーターにてセルソーティングを行い、KIT陽性間質細胞を分離し培養することができた。これを免疫組織化学染色

(c-kit、vimentin、connexin43抗体)たところ、分離純度は約70%であった。

(2) KIT陽性間質培養細胞の刺激とKIT陽性細胞の細胞シグナル伝達系の変化

KITのligandであるStem cell factorを投与し、KIT陽性間質細胞の細胞増殖能をMTAssayにより行ったところ、細胞増殖が確認された。またKITシグナル伝達系Bcr-Ablの発現の変化について定量的RT-PCRを行ったところ、Bcr-Ablの発現は有意に増加していた。

KIT陽性間質細胞はGlivecを投与することによって増殖能が強く抑制された。以上の結果から、マウス膀胱におけるKIT陽性間質培養細胞は細胞増殖に関与していると考えられた。

(3) 膀胱流出路閉塞(B00)およびサイクロフォスファミド膀胱炎モデルの作成

(4) Kit陽性間質細胞が、膀胱粘膜下層および漿膜即を中心に、閉塞膀胱モデルおよび膀胱炎モデルラットにおいて正常コントロールより増加していた。またこれは閉塞期間に比例して増加する傾向にあった。また閉塞膀胱では1回排尿量がコントロールと比べ有意に減少しており、膀胱内圧測定ではnon-contraction voiding(排尿前収縮)も異常に増加していた。Kit抑制因子であるグリベックの投与により、B00モデルおよび膀胱炎モデルラットにおいて排尿圧を変化させることなくnon-contraction voidingを抑制し、排尿間隔を延長させた。

(5) 以上からKit陽性間質細胞は細胞間情報伝達の経路として、また神経筋伝達の介在細胞として働いており、過活動膀胱の病態では尿路上皮から求心性知覚神経へのシグナル伝達に関与している可能性が考えられた。

(6) Kit mutant ratを用いたKit陽性間質細胞情報伝達機構の解明
野生型ラットではc-kitのmRNAが見られたが、変異ラットでは認められなかった。電子顕微鏡による観察ではinterstitial cells of Cajal (ICC)-like cellsはいずれのタイプも同様に認められた。

化学的に過活動膀胱を誘発したところ、膀胱内圧測定で野生型は排尿回数、非排

尿膀胱収縮回数の増加を認めたが、変異ラットではその変化は認められなかった。以上からKit陽性間質細胞は細胞間情報伝達の経路として、また神経筋伝達の介在細胞として働いており、過活動膀胱の病態では尿路上皮から求心性知覚神経へのシグナル伝達に関与している可能性が考えられた。

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10件)

- ① Shibata Yasuhiro, Ugawa Shinya, Imura Makoto, Kubota Yasue, Ueda Takashi, Kojima Yoshiyuki, Ishida Yusuke, Sasaki Shoichi, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro, Shimada Shoichi: TRPM8-expressing dorsal root ganglion neurons project dichotomizing axons to both skin and bladder in rats. NeuroReport, 185. 1053-57, 2011 (査読有)
- ② Kojima Yoshiyuki, Sasaki Shoichi, Imura Makoto, Kubota Yasue, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Correlation between expression of $\alpha 1$ -adrenoceptor subtype mRNA and severity of lower urinary tract symptoms or bladder outlet obstruction in benign prostatic hyperplasia patients. BJU International, 104. e-pub 2011 (査読有)
- ③ Sasaki S, Tomiyama Y, Kobayashi S, Kojima Y, Kubota Y, Kohri K: Characterization of $\alpha (1)$ -adrenoceptor Subtypes Mediating Contraction in Human Isolated Ureters. Urology, 762. e13-7, 2011. (査読有)
- ④ 窪田 泰江、佐々木 昌一、小島 祥敬、早瀬 麻沙、井村 誠、柴田 泰宏、郡 健二郎: 過活動膀胱患者に対するイミダフェナシンの早期治療効果の検討. 泌尿器外科, 23. 827-832, 2010. (査読有)
- ⑤ 矢内 良昌、佐々木 昌一、窪田 泰江、橋谷 光、郡 健二郎: 膀胱排尿筋収縮とNO. 排尿障害ブラクティス, 18. 21-24, 2010. (査読無)
- ⑥ Okada Shinsuke, Kojima Yoshiyuki, Hamamoto Shuzo, Mizuno Kentaro, Sasaki Shoichi, Kohri Kenjiro: Dietary soy isoflavone replacement improves detrusor overactivity of

ovariectomized rats with altered connexin-43 expression in the urinary bladder. BJU International, 103. 1429-1435, 2009. (査読有)

- ⑦ 佐々木 昌一、窪田 泰江、小島 祥敬、郡 健二郎: LUTSの遺伝子診断. Urology View, 17. 103-107, 2009. (査読無)
- ⑧ 窪田 泰江、佐々木 昌一、郡 健二郎: 中高年女性の尿失禁. 日本医師会雑誌, 138. 925, 2009. (査読無)
- ⑨ 佐々木 昌一、小島 祥敬、窪田 泰江: α_1 遮断薬の過活動膀胱への効果. 泌尿器外科, 22. 1512-1513, 2009. (査読有)
- ⑩ 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 (査読有)

[学会発表] (計 24 件)

- ① Shibata Yasuhiro, Imura Makoto, Hayase Masa, Kubota Yasue, Kojima Yoshiyuki, Sasaki Shoichi, Kohri Kenjiro: The role of T type Ca channel expressed in bladder primary sensory neurons in the rat. Nagoya Shinshu Forum 2010, 2010. 10. 1-2.
- ② 柴田 泰宏、小島 祥敬、井村 誠、早瀬 麻沙、窪田 泰江、佐々木 昌一、林 祐太郎、郡 健二郎: 膀胱支配一次知覚神経上のT型Caチャンネルの役割と過活動膀胱に対する新規治療ターゲットの可能性. 第17回日本排尿機能学会, 2010. 9. 29-10. 1. 甲府市
- ③ Shibata Yasuhiro, Kojima Yoshiyuki, Hamakawa Takashi, Imura Makoto, Hayase Masa, Kubota Yasue, Ueda T, Sasaki Shoichi, Ugawa S, Kohri Kenjiro: Convergence of bladder and skin primary sensory neuron expressing TRPM8. Annual Meeting of the International Continence Society, 2010. 8. 23-27. Toronto(Canada)
- ④ Sasaki Shoichi, Kojima Yoshiyuki,

Kubota Yasue, Okada Shinsuke, Imura Makoto, Hayase Masa, Shibata Yasuhiro, Hamakawa Takashi, Kohri Kenjiro: Attenuation of bladder overactivity in kit (WS/ WS) mutant rats. Annual Meeting of the International Continence Society, 2010. 8. 23-27. Toronto(Canada)

- ⑤ Sasaki Shoichi, Kojima Yoshiyuki, Okada Shinsuke, Shibata Yasuhiro, Imura Makoto, Hayase Masa, Kubota Yasue: Attenuation fo the bladder overactivity in kit(WS/WS) mutant rats. AUA 2010 Annual Meeting, 2010. 5. 29-6. 3. San Francisco, USA
- ⑥ Kubota Yasue, Kojima Yoshiyuki, Hayase Masa, Sasaki Shoichi, Kohri Kenjiro: A kit ligan, stem cell inducing overactive bladder. AUA 2010 Annual Meeting, 2010. 5. 29-6. 3. San Francisco, USA
- ⑦ 柴田 泰宏、小島 祥敬、水野 健太郎、井村 誠、最上 徹、佐々木 昌一、林 祐太郎、郡 健二郎: 膀胱支配一次知覚神経上のT型Caチャンネルの発現. 第98回日本泌尿器科学会総会, 2010. 4. 27-30. 盛岡市
- ⑧ Kubota Yasue, Hashitani Hikaru, Kojima Yoshiyuki, Sasaki Shoichi, Hayase Masa, Suzuki Hikaru, Kohri Kenjiro: Altered distribution of interstitial cells in the guinea pig bladder following bladder outlet obstruction. The 6th International Symposium on ICC, 2010. 2. 8-10. Miyazaki
- ⑨ 早瀬 麻沙、橋谷 光、柴田 泰宏、井村 誠、窪田 泰江、小島 祥敬、伊藤 恭典、佐々木 昌一、鈴木 光、郡 健二郎: マウス膀胱平滑筋の自発活動におけるK channelの役割. 第16回日本排尿機能学会, 2009. 9. 10-12. 福岡市
- ⑩ 窪田 泰江、小島 祥敬、早瀬 麻沙、佐々木 昌一、橋谷 光、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. 第51回日本平滑筋学会総会, 2009. 7. 22-23. 名古屋市
- ⑪ 早瀬 麻沙、橋谷 光、山田 健司、窪田 泰江、小島 祥敬、伊藤 恭典、佐々木 昌一、郡 健二郎、鈴木 光: マウス膀胱平滑筋の自発活動制御におけるK channelの役割. 第51回日本平滑筋学会総会, 2009. 7. 22-23. 名古屋市

- ⑫ Okada Shinsuke, Kojima Yoshiyuki, Hamamoto Shuzo, Mizuno Kentaro, Kubota Yasue, Sasaki Shoichi, Tsugaya Masayuki, Kohri Kenjiro: Dietary soy isoflavone replacement improves detrusor overactivity of ovariectomized rats with alteration of connexin-43 expression in the urinary bladder. AUA 2009 Annual Meeting, 2009. 4. 25-30. Chicago (USA)
- ⑬ 岡田 真介, 小島 祥敬, 濱川 隆, 伊藤 尊一郎, 柴田 泰宏, 井村 誠, 早瀬 麻沙, 窪田 泰江, 佐々木 昌一, 津ヶ谷 正行, 郡 健二郎: cyclophosphamide 誘発膀胱炎モデルラットにおける KIT 陽性間質細胞の役割. 第 97 回日本泌尿器科学会総会, 2009. 4. 16-19. 岡山市
- ⑭ 早瀬 麻沙, 橋谷 光, 窪田 泰江, 小島 祥敬, 加藤 誠, 佐々木 昌一, 鈴木 光, 郡 健二郎: マウス膀胱平滑筋の自発活動制御における K channel の役割. 第 97 回日本泌尿器科学会総会, 2009. 4. 16-19. 岡山市
- ⑮ 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. 第 59 回名古屋市立大学医学会総会, 2008. 12. 7. 名古屋市
- ⑯ 岡田 真介, 小島 祥敬, 濱川 隆, 伊藤 尊一郎, 柴田 泰宏, 井村 誠, 早瀬 麻沙, 濱本 周造, 水野 健太郎, 窪田 泰江, 佐々木 昌一, 津ヶ谷 正行, 郡 健二郎: 卵巣摘除ラットの排尿状態における isoflavone 投与の影響. 第 58 回日本泌尿器科学会中部総会, 2008. 11. 15. 大津市
- ⑰ 窪田 泰江, 佐々木 昌一, 小島 祥敬, 早瀬 麻沙, 池内 隆人, 山田 泰之, 石黒 良彦, 新美 明達, 田貫 浩之, 河合 徹也, 平尾 寛昭, 郡 健二郎: 過活動膀胱におけるイミダフェナシンの有用性の検討. 第 58 回日本泌尿器科学会中部総会, 2008. 11. 15. 大津市
- ⑱ 早瀬 麻沙, 橋谷 光, 矢内 良昌, 窪田 泰江, 小島 祥敬, 加藤 誠, 佐々木 昌一, 鈴木 光, 郡 健二郎: クエン酸アルペリンのモルモット膀胱平滑筋に対する作用. 第 58 回日本泌尿器科学会中部総会, 2008. 11. 15. 大津市
- ⑲ 岡田 真介, 小島 祥敬, 濱川 隆, 柴田 泰宏, 井村 誠, 早瀬 麻沙, 水野 健太郎, 窪田 泰江, 伊藤 尊一郎, 佐々木 昌一, 津ヶ谷 正行, 郡 健二郎: 卵巣摘除ラット膀胱における isoflavone 投与の影響と connexin-43 発現の変化. 第 15 回日本排尿機能学会, 2008. 9. 12. 東京都
- ⑳ Sasaki Shoichi, Itoh Yasunori, Kojima Yoshiyuki, Kubota Yasue, Hayase Masa, Tomiyama Yoshitaka, Kobayashi Shinya, Hoyano Yuji, Yamazaki Yoshinobu, Kohri Kenjiro: Expression level and role in ureteral contraction of α 1-adrenoceptor subtypes in human ureter. AUA 2008 Annual Meeting, 2008. 5. 20. Orland (Florida USA)
- ㉑ Kubota Yasue, Kojima Yoshiyuki, Sasaki Shoichi, Hayase Masa, Okada Shinsuke, Kohri Kenjiro: Altered distribution of interstitial cells in the guinea pig bladder following bladder outlet obstruction. AUA 2008 Annual Meeting, 2008. 5. 20. Orland (Florida USA)
- ㉒ 早瀬 麻沙, 橋谷 光, 矢内 良昌, 池内 隆人, 佐々木 昌一, 鈴木 光, 郡 健二郎: モルモット膀胱平滑筋におけるクエン酸アルペリンの作用機序の検討. 第 96 回日本泌尿器科学会総会, 2008. 4. 26. 横浜市
- ㉓ 佐々木 昌一, 伊藤 恭典, 小島 祥敬, 早瀬 麻沙, 窪田 泰江, 富山 愛隆, 小林 真也, 保屋野 雄志, 山崎 芳伸, 郡 健二郎: ヒト尿管における部位別に見た収縮力と α 1-アドレナリン受容体遮断薬の効果. 第 96 回日本泌尿器科学会総会, 2008. 4. 26. 横浜市
- ㉔ 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. 26. 横浜市

〔図書〕 (計 1 件)

- ① Kojima Yoshiyuki, Sasaki Shoichi, Kubota Yasue, Hayashi Yutarou, Kohri Kenjiro: New Insights into α 1-Adrenoceptor subtypes and pharmacogenomics of benign prostatic hyperplasia. Morrison EP(eds) In: Horizons in Cancer Research. Nova Science Publishers,

Inc. 66-101, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 昌一 (SASAKI SHOICHI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：50225869

(2) 研究分担者

窪田 泰江 (KUBOTA YASUE)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：00381830

小島 祥敬 (KOJIMA YOSHIYUKI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：60305539

岡田 真介 (OKADA SHINSUKE)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：40381818

高田 麻沙 (TAKADA MASA)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：60468254

郡 健二郎 (KOHRI KENJIRO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30122047