

機関番号：17102

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20599012

研究課題名 (和文) 過活動膀胱の分子生物学的・電気生理学的特性を解明し、新治療法の可能性を探る

研究課題名 (英文) The investigation into the molecular and electrophysiological properties of overactive bladder and the research for the novel consequent treatment

研究代表者

梶岡 俊一 (Kajioka Shunichi)

九州大学・医学研究院・泌尿器科学

研究者番号：90274472

研究成果の概要 (和文)：

ブタ膀胱排尿筋を用いた研究では、ATP 感受性 K チャネルの電気生理学的チャネル特性を明らかにし、さらに分子生物学的手法を用いて、このチャネルのサブユニットの構成を明らかにした (Kajioka et al. *J Pharmacol Exp Ther* 2008)。ヒトの膀胱排尿筋でも、世界で初めて、ヒト膀胱排尿筋の ATP 感受性 K チャネルのシングルチャネル電流の観察に成功し、さらに電子伝達系で重要な役割を果たす  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide ( $\beta$ NAD) が ATP 感受性 K チャネルを活性化する能力を有していることを発見した (Kajioka et al. *J Urol* 2011 *in press*)。

モルモットの正常膀胱と過活動膀胱モデルの比較検討においては、Western Blotting 法、免疫組織化学的染色法では定量的に、膀胱に発現する間質性細胞の発現量やギャップジャンクションの発達の差異を示すことはできなかったが、排尿筋層のムスカリン受容体のサブタイプである  $M_2$ 、 $M_3$  受容体の 2 種類のサブタイプの発現に関しては、免疫組織化学的手法で、この双方のサブタイプとも発現量が増加していることが示唆された。過活動膀胱では、Rho キナーゼ (ROK)、PKC による Ca 感受性の増加を確認し、過活動膀胱の収縮力の増加の一部を担っていることが示唆された。また、ヒト排尿筋においては、この二つの Ca 感受性の増加の経路は、主に  $M_3$  受容体の活性化によるが、 $M_2$  受容体は cAMP の down-regulation を介して、間接的に、ROK 経路を活性化して Ca 感受性に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

The molecular and electrophysiological properties of ATP-sensitive  $K^+$  channel were clarified in pig detrusor smooth muscle (Kajioka et al. *J Pharmacol Exp Ther* 2008). Also in human detrusor smooth muscle, the single channel current of ATP-sensitive  $K^+$  channel were successfully recorded and this channel was activated by  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide ( $\beta$ NAD) (Kajioka et al. *J Urol* 2011 *in press*).

Western Blotting and immunohistochemical staining failed to reveal the significant predominant increase of *ckit*-positive interstitial cell or gap junction in the outlet obstruction bladder of guinea pig. However, immunohistochemical staining demonstrated that the expression of both  $M_2$  and  $M_3$  muscarinic receptor subtypes were increased by the obstruction. As for  $Ca^{2+}$  sensitization in human detrusor, we concluded that  $M_3$  receptor had a predominant role and comparable contribution to ROK and PKC pathways while it  $M_2$  receptor mediated ROK pathway via the down regulation of cAMP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計

2008年度	1,600,000	0	1,600,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	540,000	3,940,000

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(7307-2B)

キーワード：(1) 膀胱排尿筋 (2) 過活動膀胱 (3) イオンチャネル(4) 特殊間質性細胞  
(5) カルシウムオシレーション

### 1. 研究開始当初の背景

我が国が超高齢化社会を迎えるにあたって、排尿障害なかでも過活動膀胱を伴う患者の増加が確実に予想される一方で、その治療法は薬物療法が中心となるが、その選択肢は少ない。確かに膀胱などに対して選択的な抗コリン薬の開発がすすみ、抗コリン薬に特徴的な口渇などといった副作用も少ない薬剤が認可され、一定の効果をあげている。しかしながら、必ずしも十分な効果の得られない難治症例、高齢化社会特有の前立腺肥大症や緑内障を合併する禁忌症例などを鑑みると、過活動膀胱のメカニズムを探り、その治療薬の選択の幅を開大することが急務である。

### 2. 研究の目的

排尿障害、特に過活動膀胱に焦点をあてながら、その病態に関わる膀胱排尿筋の生理学的特性を明らかにしつつ、その特性を鑑みた治療法を提案する基盤を築くことにある。

### 3. 研究の方法

#### (1)材料

##### ①ヒト膀胱排尿筋

膀胱癌などにより膀胱摘出術を施行した患者より同意を得て提供された。九州大学病院倫理審査委員会承認済み

##### ②ブタ膀胱排尿筋

福岡食肉より購入

##### ③モルモット膀胱排尿筋及び、膀胱出口閉塞(過活動膀胱)モデル

生後4週目のモルモットを麻酔下にて開腹し、尿道に銀リング(2.2mm)を装着して、6～8週飼育後に、膀胱を摘出して使用

#### (2)実験方法

##### ①分子生物学的手法及び免疫組織化学

###### (i)RT-PCR法及びrealtime RT-PCR法

ATP感受性Kチャネルのサブユニット発現や、平滑筋の心筋型トロポニンのT, I, Cのサブユニット発現の確認に適用

###### (ii)Western Blotting法

蛋白レベルでのATP感受性Kチャネルのサブユニット発現や、平滑筋の心筋型トロポニンのT, I, Cのサブユニット発現の確認に適用  
また、Ca感受性のRho KinaseやPKC経路の蛋白を定量的に測定した。

##### (iii)免疫組織化学

cKit陽性特殊間質性細胞の同定、ムスカリン受容体M2, M3レセプターの同定、心筋型トロポニンサブユニット(T, I, C)の同定

#### ②電気生理学的手法

##### (i)パッチクランプ法

ATP感受性Kチャネルの同定にブタ膀胱排尿筋、ヒト膀胱排尿筋に適用

##### (ii)等尺性収縮張力の測定及び膜脱膜化標本の作製

ヒト膀胱排尿筋、ブタ膀胱排尿筋、モルモット正常膀胱排尿筋及び過活動膀胱モデルの排尿筋に適用した。膜脱膜化標本は、 $\alpha$ -toxinを用いて標本を作製した。

### 4. 研究成果

#### ①イオンチャネルの検討

本研究では、過活動膀胱に対する新規治療薬として可能性のあるKチャネルオープナーの標的チャネルであるATP感受性Kチャネルに焦点をおいて、パッチクランプ法、RT-PCR法を適用した。膀胱排尿筋を用いた研究では、ATP感受性Kチャネルの電気生理学的チャネル特性を明らかにし、さらに分子生物学的手法を用いて、このチャネルのサブユニットの構成を明らかにした(Kajioka et al. J Pharmacol Exp Ther 2008)。ヒトの膀胱排尿筋でも、世界で初めて、ヒト膀胱排尿筋のATP感受性Kチャネルのシングルチャネル電流の観察に成功し、さらに電子伝達系で重要な役割を果たす $\beta$ -nicotine amide adenine diphosphate( $\beta$ NAD)がATP感受性Kチャネルを活性化する能力を有していることを発見した(Kajioka et al. J Urol in press)。

#### ②モルモット過活動膀胱モデル

(i)特殊間質性細胞とギャップジャンクション

モルモットの正常膀胱と過活動膀胱モデルの比較検討においては、特殊間質性細胞やギャップジャンクションの発現に関して Western Blotting 法、免疫組織化学的染色法では定量的に、膀胱に発現する間質性細胞の発現量やギャップジャンクションの発達の差異を示すことはできなかった。

(ii) Ca 感受性

平滑筋の収縮力は細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に比例するが、 $Ca^{2+}$  濃度によらず収縮力が増加する経路があり主に、ROK と PKC の活性化が提唱されている。過活動膀胱モデルでは、その双方の経路とも、各々に選択的阻害剤 (ROK: Y-27632, PKC: GF-109203X) を膜脱膜化標本に適用し増強されていることが、を用いて確認できた(図 1)。

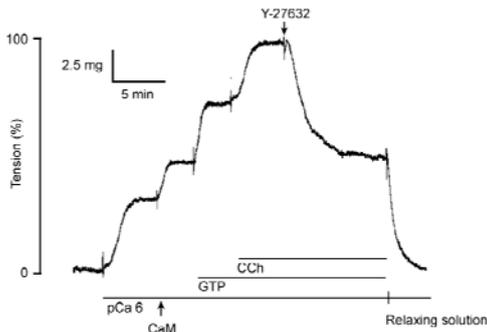
図 1. カルバコール刺激に対する Y-27632 の影響

(iii) ムスカリン受容体のサブタイプ

排尿筋層のムスカリン受容体のサブタイプである  $M_2$ 、 $M_3$  受容体の 2 種類のサブタイプの発現に関しては、免疫組織化学的手法で、この双方のサブタイプとも発現量が増加していることが示唆された。これらのサブタイプと Ca 感受性との関係は、上述の Ca 感受性選択的阻害剤 (ROK: Y-27632, PKC: GF-109203X) と  $M_2$ 、 $M_3$  レセプター選択的阻害剤 ( $M_2$ : AX-DX116,  $M_3$ : 4-DAMP) を膜脱膜化標本に適用することにより、明らかにできた(図 2)。

(iv) 心筋型トロポニン T の発見

上述のブタ排尿筋の ATP 感受性 K チャネルが、排尿筋由来であることを証明するために、陰性マーカーとして心筋特異的な心筋タイプのトロポニン T (cTnT) を指標と



して RT-PCR 法を施行したところ、驚くべきことに、cTnT の発現を平滑筋で認めた(図 3) ことで、cTnT の平滑筋における存

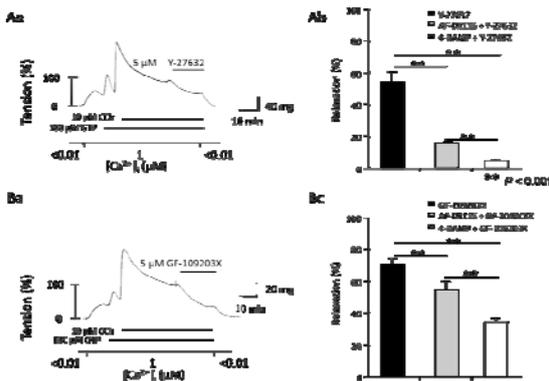


図 2. ヒト膀胱排尿筋の  $M_2$  および  $M_3$  受容体を介したカルバコール刺激に対する Y-27632 及び GF-109203X の影響

在を詳細に検討した。リアルタイム PCR 法をヒトの各種平滑筋臓器に適応したところ、膀胱排尿筋に



図 3. ブタ排尿筋 RT-PCR

cTnT は最も多く発現していることがわかった(図 4)。

また蛍光免疫染色では、組織レベルでは、

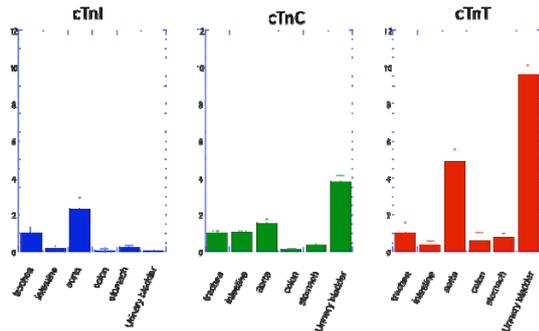


図 4. ヒト各種平滑筋 Quantitative RT-PCR

排尿平滑筋の筋束と血管平滑筋に発現しているのを確認し、ヒト膀胱排尿筋培養細胞では、細胞の長軸方向に走るトロポミオンに沿って cTnT が発現しているのを確認した(図 5)。

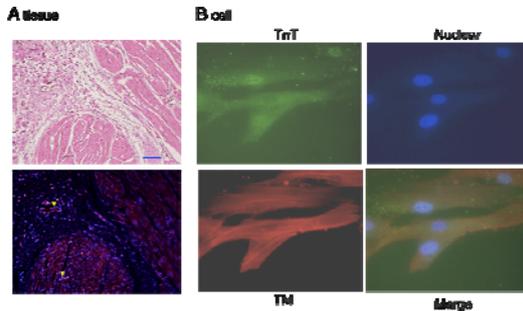


図 5. ヒト膀胱平滑筋蛍光免疫染色

(v) まとめ

本研究により、排尿障害特に過活動膀胱に対する治療の可能性のある試薬を定義し、基礎的データを収集することができた。過分極により筋弛緩をもたらす K チャネルオープナー、Ca 感受性を抑制する Rho キナーゼ阻害剤と PKC 阻害剤、また、将来に画期的な展開をもたらす可能性のある平滑筋における心筋型トロポニン T の発見は、今後の排尿障害治療薬にとって、非常に有用な礎となった。

## 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 4 件)

- ① Kajioka S, Shahab N, Asano H, Morita H, Sugihara M, Takahashi-Yanaga F, Yoshihara T, Nakayama S, Seki N, Brading F, Naito S Diphosphate regulation of ATP-sensitive potassium channel in human urinary bladder smooth muscle cells. 2011 J Urol in press (査読有)
- ② Kajioka S, Seki N, Shahab N, Yunoki T, Naito S. Etiology of overactive bladder and its therapeutic perspective--focusing on a myogenic basis for the overactive bladder. 2010 Fukuoka Igaku Zasshi. May;101(5):94-100 (review) (査読無)
- ③ Shahab N, Seki N, Takahashi R, Kajioka S, Takei M, Yamaguchi A, Naito S. The profiles and patterns of detrusor overactivity and their association with overactive bladder symptoms in men with benign prostatic enlargement associated with detrusor overactivity. (2009) Neurourol Urodyn 28(8):953-958(査読有)
- ④ Kajioka S, Nakayama S, Asano H, Seki N, Naito S, Brading AF Levromakalim and MgGDP activate small conductance ATP-sensitive  $K^+$  channels of  $K^+$  channel pore 6.1/sulfonylurea receptor 2A in pig detrusor smooth muscle cells: uncoupling of cAMP signal pathways. (2008) J Pharmacol Exp Ther. 327(1):114-123(査読有)

[学会発表] (計 13 件)

- ① 梶岡俊一、他、亜硝酸薬による膀胱排尿筋の逆説的収縮機構の解明 第15回日本排尿機能学会 2008年9月東京
- ② Seki N, Kajioka S, et al. Comprehensive studies of ATP-sensitive potassium channels in pig and human detrusor smooth muscle cells. International Continence Society 2008 Oct. Cairo Egypt
- ③ 梶岡俊一、他、ヒト膀胱排尿筋のATP感受性 $K^+$ チャンネルは、 $\beta$ -nicotine amide adenine dinucleotide ( $\beta$ NAD) によって活性化される. 第97回日本泌尿器科学会総会 2009年4月 岡山
- ④ Kajioka S et al.  $\beta$ -nicotine amide adenine diphosphate activates an atp-sensitive potassium channel in the

- single channel study of human urinary bladder smooth muscle cells. The 104th Annual Meeting AUA 2009 Apr. Chicago USA
- ⑤ 梶岡俊一、他、多チャンネル同時記録測定微小電極アレイの導入によるモルモット膀胱排尿筋の自発活動電位の新しい評価法. 第16回日本排尿機能学会 2009年 9月 福岡
  - ⑥ Shahab Nouval, 梶岡俊一、他、Obstruction enhances rho-kinase pathway and diminishes protein kinase C pathway in carbachol-induced  $Ca^{2+}$  sensitization in alpha-toxin permeabilized guinea-pig detrusor smooth muscle. 第2回排尿障害モデル動物研究会 2009年11月 静岡
  - ⑦ Kajioka S, et al. The features of oscillating currents observed in detrusor smooth muscle. Smooth Muscle Rhythms ~The 6<sup>th</sup> International Symposium on ICC 2010 Feb. Miyazaki Japan
  - ⑧ Kajioka S, et al. Detection of cardiac troponin T in detrusor smooth muscle -Does troponin system work in smooth muscle?- 25th Annual EAU Congress 2010 Apr. Barcelona Spain
  - ⑨ Shahab N, Kajioka S et al. The enhancement of Rho kinase pathway and the decrement of protein kinase C pathway in carbachol-induced calcium sensitization in  $\alpha$  toxin permeabilized guinea pig detrusor smooth muscle following bladder outlet obstruction. 25th Annual EAU Congress 2010 Apr. Barcelona Spain
  - ⑩ Shahab N, Kajioka S et al. A novel inhibitory effects of 2-Aminoethoxydiphenyl borate on carbachol-induced  $Ca^{2+}$  sensitization in human urinary bladder smooth muscle. The 27th Japan-Korea Urological Congress 2010 Sep. Kyoto Japan
  - ⑪ 梶岡俊一、他、膀胱排尿筋の心筋型トロポニンT (cTnT) の発見とその生理学的意義を探る. 第17回日本排尿機能学会 2010年 10月 山梨
  - ⑫ Shahab N, Kajioka S et al. Bladder outlet obstruction modulates  $Ca^{2+}$  sensitization in  $\alpha$  toxin permeabilized

guinea pig detrusor smooth muscle. SIU  
World Meeting on Lower Urinary Tract  
Dysfunction 2010 Oct. Marrakech  
Morocco

- ⑬ Shahab Nouval, 梶岡俊一、他、Calcium  
Sensitization by Protein Kinase C  
Pathway in Contraction of Human and  
Guinea-Pig Detrusor Smooth Muscle  
following Partial Bladder Outlet  
Obstruction. 第3回排尿障害モデル動物研  
究会 2010年11月 静岡

[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 1 件)

名称：トロポニン含有医薬組成物  
発明者：梶岡俊一  
権利者：九州大学  
種類：特許  
番号：特願 2009-165881  
取得年月日：23 年 2 月 3 日  
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梶岡 俊一 (KAJIOKA SHUNICHI)  
九州大学・大学院医学研究院・特任准教授  
研究者番号： 90274472

### (2) 研究分担者

関 成人 (SEKI NARIHITO)  
九州大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号： 90294941

中山 晋介 (NAKAYAMA SHINSUKE)  
名古屋大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号： 30192230  
怡土 信一 (ITO SHINICHI)  
九州大学・大学院歯学研究院・助教  
研究者番号： 00315095