

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390381

研究課題名(和文) 下部尿路機能障害における求心性伝達機構と新たな治療法の開発に関する研究

研究課題名(英文) Research on the afferent transduction in the lower urinary tract

研究代表者

武田 正之 (TAKEDA, Masayuki)

山梨大学・医学工学総合研究部・教授

研究者番号：80197318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：尿失禁国際会議2012に委員として参加し、「細胞生物学」を担当した。尿禁制、尿失禁に関わる組織学、生理学、薬理学、分子神経薬理学的な内容をまとめて報告した。「尿失禁」最新版として2013年に発行され、全世界的な教科書として普及している「前立腺肥大症に関する国際会議」に委員として参加し、これからの大きな問題である「排尿筋低活動」を担当した。2013年に「男性下部尿路症状」の最新版として発行され、世界的に普及している。最近発見された巨大な機械センサーであるPiezo 1の膀胱知覚における役割を証明した。

研究成果の概要(英文)：We performed a systematic analysis of the molecular and functional expression of Piezo1 channels in the urothelium.

Immunofluorescence examination demonstrated abundant expression of Piezo1 in the mouse and human urothelium. Urothelial cells isolated from mice exhibited a Piezo1-dependent increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentrations in response to mechanical stretch stimuli, leading to potent ATP release; this response was suppressed in Piezo1-knockdown cells. In addition, Piezo1 and TRPV4 distinguished different intensities of mechanical stimulus.

Moreover, GsMTx4, an inhibitor of stretch-activated channels, attenuated the Ca<sup>2+</sup> influx into urothelial cells and decreased ATP release from them upon stretch stimulation. These results suggest that Piezo1 senses extension of the bladder urothelium, leading to production of an ATP signal. Thus, inhibition of Piezo1 might provide a promising means of treating bladder dysfunction.

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：Afferent nerve Urinary bladder Overactive bladder

## 1. 研究開始当初の背景

わが国は超高齢化社会を迎え、65歳以上の人口が全体の23.1%である(総務省、平成22年9月発表)。人口の高齢化とともに前立腺肥大症、尿失禁、過活動膀胱などの頻度も増加しており、老後のQOLを維持するために排尿障害治療に関して社会的必要性が高まるのは自明の理である。

過活動膀胱(OAB:Overactive bladder syndrome)は、2002年に国際尿禁制学会によって定義された症状症候群であり、尿意切迫感を必須症状とする蓄尿障害である。疫学調査によれば、欧米では成人人口の約17%、日本では約13%がOAB症状を有しているとされ、生活の質を悪化させる疾患である。この尿意切迫感を引き起こすメカニズムは不明であり、尿意を伝達する求心性伝達機構の異常であることが想定されている。

(1)膀胱の機械的受容体:尿意を伝達する機械的受容体の本体は不明であるが、脊髄損傷などの病的状態においてはパニロイド受容体(VR1, VRL1)を多く発現する無髄C繊維の役割が重要視されていた。最近、尿路上皮がATPなどの伝達物質を産生し、膀胱知覚の伝達に影響することが判明した(Fry, C.H.:Urology, 2004)。また、われわれはOAB症状を呈するヒト前立腺肥大症患者の膀胱上皮には、非閉塞状態のヒト膀胱上皮と比較して上皮型ナトリウムチャンネル(ENaC:Epithelial sodium channel)の発現が著明に亢進しており、これが過活動膀胱の発症機序に関係するらしいことを発見した(Urology, 2004)。また、膀胱壁の伸展や尿中の酸性どの変化などの刺激によってENaCの発現が亢進し、尿路上皮からのATPなどの伝達物質の産生を増加させていることを証明した(Urology, 2007)。われわれは、この物質に関して、特許を出願した(特開2005-218318、発明の名称:過活動膀胱症候群治療薬をスクリーニングするために用いる標的物質、及び過活動膀胱症候群治療薬)。

(2)TRP(Transient Receptor Potential)チャンネルファミリー:近年、知覚神経路におけるMechano-sensory Transductionを担うメカノセンサーの基礎的研究が精力的に行なわれており、その候補分子としてTRP(Transient Receptor Potential)チャンネルファミリーが注目されている(Gillespie & Walker, 2001; Kung, 2005)。TRPA1は、機械的刺激に感受性を有する陽イオンチャンネルで、尿路系においても、マウス膀胱粘膜下の知覚神経終末にその発現が報告された(Nagata et al, 2005)。われわれは、これまでのいくつかの予備実験において、ヒト膀

胱およびラット膀胱および後根神経節

(L<sub>6</sub>-S<sub>2</sub>)におけるTRPA1mRNAの存在をRT-PCR法にて確認した。定量的real-time RT-PCRを用いた予備実験においては、ヒト閉塞膀胱においてTRPA1mRNAの発現が明らかに増加していた。ラットにて予備的なin vivo生理実験(膀胱内圧測定)を行なった結果では、TRPA1刺激薬であるtrans-cinnamaldehydeを膀胱内に還流することにより、排尿間隔が明らかに短縮した(Urology, 2007)。TRPV4は30度程度の温度と機械的刺激に対して反応性を有している。TRPV4は膀胱上皮細胞に発現しており、マウス膀胱上皮細胞は伸展刺激によって細胞内カルシウム濃度を上昇させ、さらにATPの放出を行うことを証明した。ヒト膀胱上皮細胞にも発現しており、mRNAの発現程度と国際前立腺指数による下部尿路症状との相関を認めた(J Urol, 2010)。TRPV4は、過活動膀胱に対する新たな標的分子と考えられている。

(3)ASICs(Acid-sensing ion channels)チャンネルファミリー:電位非依存性陽イオンチャンネルで、酸感受性、機械刺激受容、侵害受容などに関与するチャンネルである。人においても機械刺激の受容分子の候補として注目されている。ASICはASIC1, ASIC2, ASIC3, ASIC4に分類されており、炎症性疼痛における低pHがASICを活性化させて炎症を増強、痛みを増強させると考えられている。われわれは、膀胱上皮におけるASIC1の発現の性差(雄>雌)と、膀胱平滑筋におけるASIC2の発現の性差(雌>雄)を証明した(BJU Int, 2009)。マウス膀胱内酢酸還流実験に性差から、間質性膀胱炎の発症機序のひとつの可能性が考えられる。

(4)TREK(Transient Receptor Potential)チャンネルファミリー:直列ポアドメインカリウムチャンネルのひとつで、機械受容体の候補であり、膀胱にも発現している。最近、マウスの膀胱出口部閉塞で、排尿筋での発現が低下し、そのために排尿筋過活動が起こっていることが報告された(J Urol, 183:793-800, 2010)。ヒト膀胱における発現については、予備の実験ですでに確認している。

## 2. 研究の目的

(1)ラット、マウス、ヒト膀胱平滑筋、上皮、上皮下に存在する間質細胞の培養系の作成

(2)ラット、マウス、ヒト下部尿路における機械受容体候補の発現と機能の探求

最終的には、各種陽イオンチャンネルに対する選択的な治療法の開発の可能性を追求することが目的であるが、それは次の段階である。

### 3. 研究の方法

【要旨】 ラット、マウスおよびヒトにおいて、下部尿路の求心性神経伝達機構における上皮型ナトリウムチャンネル、TRP チャンネルファミリー、TREK ファミリー、ASIC ファミリーの役割を調べる。 そのために、膀胱上皮・平滑筋・上皮間質細胞の培養系を確立し、細胞レベルでの探求を行うとともに、丸ごとの膀胱や個体における *in vivo*、*in situ* レベルでの探求も行う。 また、*In vitro*、*in vivo* siRNA を用いた機能解析や k/o マウスを用いた機能解析も行う。

(1) ラット、マウス膀胱平滑筋細胞、上皮細胞培養系、上皮下に存在する間質細胞(筋繊維芽細胞)の培養系の作成

(2) ヒト膀胱平滑筋細胞、上皮細胞培養系、上皮下に存在する間質細胞(筋繊維芽細胞)の培養系の作成

(3) ヒトおよびラット、マウス下部尿路における ENaC、TRP、TREK、ASICs の局在と発現

(4) ヒトおよびラット、マウス下部尿路における ENaC、TRP、TREK、ASICs の機能解析

(5) ヒトおよびラット、マウス下部尿路における ENaC、TRP、TREK、ASICs の刺激(機械的刺激、温度、pH、各種受容体・イオンチャンネル活性化薬、遮断薬)に対する反応性の検討

(6) ヒトおよびラット、マウス下部尿路における ENaC、TRP、TREK、ASICs の機能解析

(7) 正常動物と下部尿路閉塞での比較検討

### 4. 研究成果

尿失禁国際会議 2012 に委員として参加し、「細胞生物学」を担当した。尿禁制、尿失禁に関わる組織学、生理学、薬理学、分子神経薬理学的な内容をまとめて報告した。「Incontinence」最新版として 2013 年に発行され、全世界的な教科書として普及している(Fry, C.H., Chako, S. Wacher S.de, Kanai, A.J., Takeda, M., Young, J.S.: Committee 2-Cell Biology, "Incontinence 5<sup>th</sup> ed.", Abrams, P., Cardozo, L., Khoury, S., Wein, A. ed. Health Publication Ltd., London, 109-178, (2013)。

「前立腺肥大症に関する国際会議」に委員として参加し、これからの大きな問題である「排尿筋低活動」を担当した。2013 年に「男性下部尿路症状」の最新版として発行され、世界的に普及している(Chapple, C., Dmochowski, R., Wein, A., Speakman, M., Artibani, A., Takeda, M., Lin, A.T, Sun, van Kerrebroek, P., Koelbl, H.: Committee 6, Detrusor Underactivity, "Male Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS), An International Consultation on Male LUTS Fukuoka, Japan, September 30-October 4, 2012.", Chapple, C., and Wein, A., ed. Published by SIU, (2013).)

2012 年に英国で開催された ICI-RS に委員として参加し、尿路上皮の役割についてまとめた(Birder, L.A., Ruggieri, M., Takeda, M., Koeveringe, G van, Veltkamp, S., Korstanje, C., Parson, B., Fry, C.H.: How does the urothelium affect bladder function in health and disease?: ICI-RS 2011. *Neurourol, Urodyn.*, 31:293-299, 2012.)

カテニン刺激が膀胱排尿筋における CX43 の発現に重要であることを証明した(Kai Li, Jian Yao, Norifumi Sawada, Masanori Kitamura, and Kar-Eric Andersson, and Masayuki Takeda: -Catenin-Signaling Contributes to Platelet Derived Growth Factor Elicited Bladder Smooth Muscle Cell Contraction Through Up-Regulation of Cx43 Expression. *J Urol*, 188:306-315, 2012.)

この CX43 の発現が、Connexin 43 hemichannel によって制御されていることを証明した(Kai Li, Yuan Chi, Qiaojian Yan, Kun Gao, Hiroyuki Matsue, Masayuki Takeda, Masanori Kitamura, Jian Yao: Connexin 43 hemichannel-Mediated regulation of connexin 43, *PLoS One*, 8:e58057, 2013.)

最近発見された巨大な機械センサーである Piezo 1 の膀胱知覚における役割を証明した(Miyamoto, T, Mochizuki, T, Nakagomi, H, Kira, S, Watanabe, M, Takayama, Y, Suzuki, Y, Schuichi Tatsuya Miyamoto, Tsutomu Mochizuki, Hiroshi Nakagomi, Satoru Kira, Watanabe, M, Takayama, Y, Suzuki, Y, Koizumi, S, Takeda M and Tominaga M: Functional role for Piezo1 in stretch-evoked Ca<sup>2+</sup> influx and ATP release in urothelial cell cultures, *J. Biol. Chem.*, 2014, (in press).)

### 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 38 件)

1. Masayuki Takeda, Osamu Nishizawa, Momokazu Gotoh, Masaki Yoshida, Satoru Takahashi, Naoya Masumori: Clinical Efficacy and Safety of Imidafenacin as Add-on Treatment for Persistent Overactive Bladder Symptoms Despite  $\alpha$ -Blocker Treatment in Patients with BPH: the ADDITION STUDY, *Urology*, 82:887-893, 2013.

2. Kai Li, Jian Yao, Yuan Chi, Norifumi

Sawada, Isao Araki, Masanori Kitamura, Masayuki Takeda: Eiprostat activates cAMP signaling pathway and suppresses bladder smooth muscle cell proliferation, Int. J. Mol. Sci., 14:12107-10122, 2013.

3. Birder, L.A., Ruggieri, M., Takeda, M., Koeveringe, G van, Veltkamp, S., Korstanje, C., Parson, B., Fry, C.H.: How does the urothelium affect bladder function in health and disease?: ICI-RS 2011. NeuroUrol, Urodyn., 31:293-299, 2012.

4. Kai Li, Jian Yao, Norifumi Sawada, Masanori Kitamura, and Kar-Eric Andersson, and Masayuki Takeda :

Beta-Catenin-Signaling Contributes to Platelet Derived Growth Factor Elicited Bladder Smooth Muscle Cell Contraction Through Up-Regulation of Cx43 Expression. J Urol, 188:306-315, 2012.

5. Masayuki Takeda, Osamu Nishizawa, Takeshi Imaoka, Yoji Morisaki and Lars Viktrup: Tadalafil for the Treatment of Lower Urinary Tract Symptoms in Japanese Men with Benign Prostatic Hyperplasia: Results from a 12-week Placebo-controlled Dose-finding Study with a 42-week Open-label Extension, LUTS, 4: 110-119, 2012.

6. Mary H. P Anastasios Athanasopoulos, Kyu-Sung Lee, Masayuki Takeda, Jean Jacques Wyndaele: Sociocultural and environmental influences on bladder health, International Journal of Clinical Practice, 66:1132-1138, 2012.

7. Kai Li, Jian Yao, Liye Shi, Norifumi Sawada, Yuan Chi, Qiaojing Yan, Hiroyuki Matsue, Masanori Kitamura, and Masayuki Takeda.: Reciprocal regulation between proinflammatory cytokine- induced iNOS and connexin43 in bladder smooth muscle cells. J Biol Chem, 286:41552-41562, 2011.

〔図書〕(計 25 件)

1. Fry, C.H., Chako, S. Wachter S.de, Kanai, A.J., Takeda, M., Young, J.S.: Committee 2-Cell Biology, " Incontinence 5th ed. ", Abrams, P., Cardozo, L., Khoury, S., Wein, A. ed. Health Publication Ltd., London, 109-178, (2013)

2. Chapple, C., Dmochowski, R., Wein, A., Speakman, M., Artibani, A., Takeda, M., Lin, A.T, Sun, van Kerrebroek, P., Koelbl,

H.: Committee 6, Detrusor Underactivity, Male Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS), An International Consultation on Male LUTS Fukuoka, Japan, September 30-October 4, 2012. ", Chapple, C., and Wein, A., ed. Published by SIU, (2013).

〔学会発表〕(計 125 件)

1. Mitsuharu Yoshiyama, Sachiko Tsuchiya, Masayuki Takeda: Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 5 Antagonist Facilitates Urinary Storage Without Impairing Micturition in Mice. American Urological Association 2013 Annual meeting at San-Diego, CA May 4-8, 2013.

2. Shouji K, Hidenori Z, Masayuki T: Comparative Effectiveness of Gemcitabine/Paclitaxel versus Best Supportive Care in Patients with Metastatic Urothelial Carcinoma Who are Resistant to Previous Platinum-Based Chemotherapy. American Urological Association 2013 Annual meeting at San-Diego, CA May 4-8, 2013.

3. Satoru Takahashi, Masayuki Takeda, Osamu Nishizawa, Momokazu Gotoh, Masaki Yoshida, Naoya Masumori: The Combination Therapy of Imidafenacin and Tamsulosin is Effective and Safe in Benign Prostatic Hyperplasia Patients with Overactive Bladder; The One Year Results from ADDITION Study. The 43th Annual Meeting of International Continence Society(ICS) August, 2013

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 新規頻尿治療薬としての GsMTX4 の効果

発明者: 宮本達也、武田正之、小泉修一、中込宙史

権利者: 国立大学法人 山梨大学

種類: 特許

番号: 2012-232440

出願年月日: 平成 24 年 10 月 19 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 正之 (TAKEDA Masayuki)

山梨大学・医学工学総合研究部・教授

研究者番号：80197318

(2)研究分担者

富永 真琴 (TOMINAGA Makoto)  
大学共同利用機関法人自然科学研究機構・細胞生理部門・教授  
研究者番号：90260041

小泉 修一 (KOIZUMI Syuichi)  
山梨大学 医学工学総合研究部 教授  
研究者番号：10280752

望月 勉 (MOCHIDUKI Tsutomu)  
山梨大学・医学工学総合研究部・医学研究員  
研究者番号：50377496

宮本 達也 (MIYAMOTO Tatsuya)  
山梨大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：80456459

(3)連携研究者

中込 宙史 (NAKAGOMI Hiroshi)  
山梨大学・医学工学総合研究部・助教  
研究者番号：80418714

吉良 聡 (KIRA Satoru)  
山梨大学・医学部附属病院・病院助教  
研究者番号：10530115