

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791749

研究課題名（和文） 伸展刺激に対する膀胱上皮細胞における ATP 放出メカニズムの解明

研究課題名（英文） The elucidation of ATP releasing pathway of bladder epithelial cell upon stretch stimulation

研究代表者

中込 宙史（NAKAGOMI HIROSHI）

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80418714

研究成果の概要（和文）：

マウス膀胱上皮細胞の伸展刺激時における ATP 放出に関して、小胞型ヌクレオチドトランスポーター（VNUT）の関わりについて評価した。VNUT は、膀胱上皮に強く局在しており、また培養細胞においても VNUT は変わらず発現していた。RNA 干渉法によって VNUT の発現を抑え、伸展刺激時の ATP 放出に VNUT が大きく関与していることを証明した。さらに開口放出阻害剤の処置によっても ATP 放出が抑制されたことが示され膀胱上皮における ATP 放出メカニズムとして VNUT / 開口放出の経路が重要な役割を担っていると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We have investigated exocytotic release of ATP from urothelium, especially focusing on vesicular nucleotide transporter (VNUT). VNUT gene and protein was highly expressed in the epithelial layer of mouse bladder tissue and primary urothelial cell culture. The stretch-evoked ATP release was significantly reduced by the treatment of VNUT siRNA or several inhibitors of vesicular exocytosis. These findings suggest that VNUT plays an important role in stretch-elicited ATP release from urothelium.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：シグナル伝達・生理学・神経科学

1. 研究開始当初の背景

人口の高齢化とともに尿失禁、頻尿、排尿障害などの患者数も増加の一途をたどっている。尿失禁、頻尿、排尿障害などの原因の一つとして過活動膀胱など蓄尿障害が挙げられる。日本排尿機能学会の推定では、40 歳以上の過活動膀胱患者は推定で 810 万人いると報告されている（Honma et al.2003）。尿失禁、頻尿などの症状は特に高齢者の QOL を損う大きな原因の一つにな

っており、今後その症状を呈する多数の高齢者の QOL の改善・維持するため、また元気な高齢者を支えていくためにも排尿障害の治療は大きな役割を担っていくものと思われる。

今日、過活動膀胱や排尿筋過活動といった蓄尿障害疾患に対し抗コリン剤の投与が一般的に行われている、しかし、その薬理学的作用部位が膀胱以外の他の部位にもあるため、副作用として口渇・便秘・眩目・尿閉な

どが問題となり、治療効果・有害事象の両面において未だ満足すべき評価は得られていない。そのため蓄尿時における求心路の生理的メカニズムを解明し、蓄尿障害疾患の治療につなげていくことは急務であり、蓄尿障害に苦しんでいる患者からも切望されている。

近年、膀胱上皮は単なる防御機構としての機能のみならず、伸展刺激や侵害刺激を感知し、求心性伝達を担う役割を果たしていると考えられ (Ferguson et al.1997;Sun et al.,2001;Birder and de Groat et al.,2007)、精力的な研究が行われ知見が報告されてきた。膀胱上皮が伸展刺激に応答し、ATP や NO、アセチルコリン、PG などの mediator を放していることが多数報告されているが (Yoshimura et al.,2002;Andersson et al.,2002;Lewin GR et al.,2004;Xu L et al.2008)、未だ確証たるものはなく、現在においても未解決のままである。特に ATP に関しては、知覚神経の神経終末に存在するプリン受容体を刺激し知覚神経活動を促進性に働かせる中心的な役割があると考えられている。刺激による ATP 放出の経路としては、connexin hemichannels、anion channels、nucleoside transporter、exocytosis などと考えられてきた (Sabirov et al.,2005; Coco et al.,2003)。しかし、どのような経路を通して ATP が放出されるのかについては未だに結論が得られていない。2008 年、画期的発見がされた。それは VNUT (vesicular nucleotide transporter) という細胞内の分泌小胞に ATP を能動輸送するトランスポーターが同定された (Sawada et al., PNAS 2008)。神経、副腎などで細胞からの ATP 放出の経路として VNUT を介して ATP を分泌小胞に蓄積させ開口放出するシステムが確立されたのである。

2. 研究の目的

過活動膀胱などの蓄尿障害疾患に対し、抗コリン剤を中心に治療しているが治療効果・有害事象の両面において未だ満足すべき結果は得られていない。そのため蓄尿時の求心路の生理的機構を解明することが蓄尿障害疾患の解決につながると考えられている。今回、我々は 2008 年に発表され、画期的な発見である小胞型ヌクレオチドトランスポーター (VNUT) が膀胱上皮にも局在していることを確認した。この VNUT を研究の中心に置き、ATP 放出機構を通して排尿生理のメカニズムを解明することを目的とした。この研究は、今まで中心的に行われていた受容体の研究ではなく、その伝達物質自体の放出システムを解明することであり、画期的な治療法につながり得る。マウスの膀胱上皮において、特に伸展刺激における ATP 放出システムの中で VNUT が主な役割を果たしているかどうかを検討している。膀胱上皮の伸展を

感知し Ca 流入から ATP 放出に至る分子機構を、VNUT を介した細胞内小胞への ATP 蓄積ならびに開口放出の視点から解明する。

今回の神経伝達物質の放出メカニズムに焦点を当てた研究により、これまでの情報を受け取る側の受容体への研究を中心に進められていたが解明できなかった病態を ATP など神経伝達物質の放出メカニズムを通じて解明することができ、新たな生理的機構の確立、画期的な治療法への道を開く可能性を秘めている。

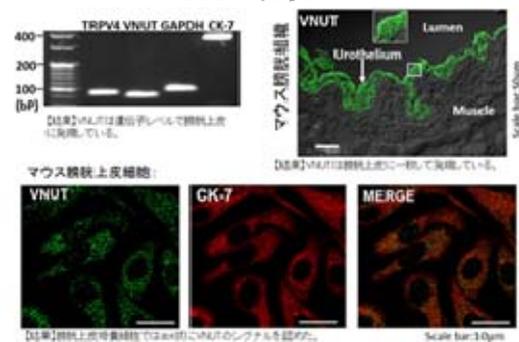
3. 研究の方法

雄マウス (C57BL/6Cr) を使用し膀胱上皮初代培養細胞を作成した。RT-PCR 法による VNUT 遺伝子の発現、免疫蛍光染色法による培養上皮細胞と膀胱組織における蛋白局在の確認、蛍光標識した VNUT・ATP・分泌小胞の共局在の確認、機械刺激時の開口放出現象の視覚化を行った。機械伸展刺激による膀胱上皮培養細胞からの微量 ATP 放出量の測定を、ルシフェリン・ルシフェラーゼ法とフォトン顕微鏡を用いてリアルタイムに行った。同様の手法で RNA 干渉法による VNUT ノックダウンや各種開口放出阻害剤の使用による ATP 放出抑制効果を比較検討した。

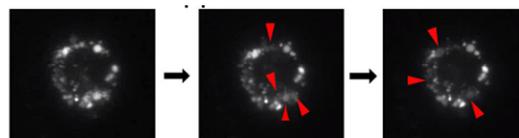
4. 研究成果

マウス膀胱上皮において遺伝子レベル・蛋白レベルでそれぞれ VNUT が発現していた。VNUT は ATP 含有小胞ならびに酸性小胞に局在していた。機械刺激に対して、ラベルされた ATP 分泌小胞の開口放出様動態の視覚化に成功した。RNA 干渉法にて VNUT ノックダウンされた膀胱上皮細胞では、伸展刺激時の ATP の放出量が有意に低下した。また開口放出阻害剤の使用でも、伸展刺激時の ATP の放出量が有意に低下した。

< VNUT の発現 >

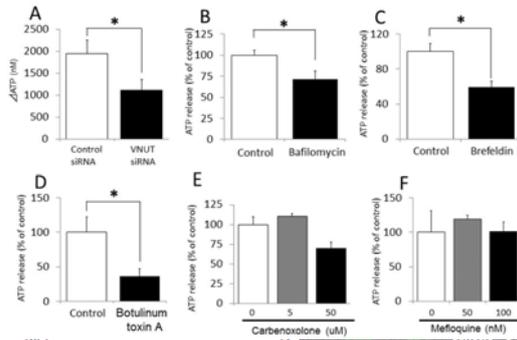


< 開口放出様動態 >

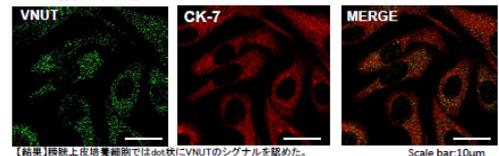


【結果】膀胱上皮細胞内の Quinacrine 標識された小胞が Ca^{2+} による機械刺激に対して開口放出に反応する動態が観察できた。Red arrowhead: vanishing or weakening Quinacrine signals.

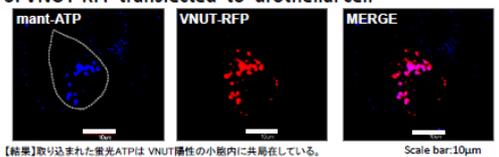
<伸展刺激時のATPの放出量>



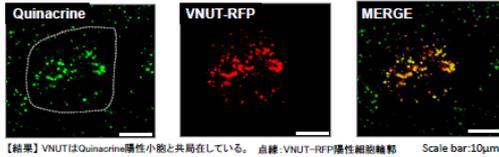
【結果】VNUTは遺伝子レベルで膀胱上皮に発現している。
【結果】VNUTは膀胱上皮に一致して発現している。



マウス膀胱上皮細胞: 【結果】膀胱上皮培養細胞ではdot状にVNUTのシグナルを認めた。 Scale bar:10µm



3. VNUT-RFP transfected to urothelial cell
【結果】取り込まれた蛍光ATPはVNUT陽性の小胞内に共局在している。点線:VNUT-RFP陽性細胞輪郭 Scale bar:10µm



【結果】VNUTはQuinacrine陽性小胞と共局在している。点線:VNUT-RFP陽性細胞輪郭 Scale bar:10µm

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 6 件)

- (1) 武田正之、荒木勇雄、澤田智史、中込宙史、望月勉、小林英樹、座光寺秀典、芳山充晴. 医薬ジャーナル 新薬展望 2013 Vol. 49 S-1: 308(514)-319(525), 2013年. 査読無
- (2) 武田正之、中込宙史、芳山充晴、荒木勇雄. 排尿障害におけるβ3受容体刺激(作動)薬. 診断と治療 第100巻・第8号: 1379-1385, 2012年. 査読無
- (3) 武田正之、中込宙史、芳山充晴、荒木勇雄. 排尿障害におけるβ3受容体作動薬. Progress in Medicine Vol. 32 (No. 4): 37-42, 2012年. 査読無
- (4) 武田正之、中込宙史、宮本達也、吉良聡、芳山充晴. 第4回国際尿失禁会議からの報告 Committee3 Cell Biology 「細胞生物学」. 排尿障害プラクティス Vol. 19(1): 66-88, 2011年. 査読無
- (5) Takeda M, Mochizuki T, Yoshiyama M, Nakagomi H, Kobayashi H, Sawada N, Zakohji H, Du S, Araki I. Sensor

mechanism and afferent signal transduction of the urinary bladder: special focus on transient receptor potential ion channels. LUTS (Lower Urinary Tract Symptoms) 2:51-60, 2010. 査読有

- (6) 荒木勇雄、中込宙史、望月勉、小林英樹、芳山充晴、武田正之. 尿路上皮と排尿. 臨床検査 Vol. 54(7): 726-730, 2010年. 査読無

[学会発表] (計 16 件)

- (1) Nakagomi H, Mochizuki T, Miyamoto T, Kira S, Yoshiyama M, Kawahara K, Moriyama Y, Koizumi S, Takeda M. Vesicular nucleotide transporter (VNUT) is a key molecule for mechanosensing in the human urinary bladder: negative correlation between VNUT expression in human bladder mucosa and first desire to void. (Abstract No. 12) International Continence Society 42nd Annual meeting, China National Convention Centre, Beijing, China, October 15-18, 2012.
- (2) 芳山充晴、土屋幸子、望月勉、中込宙史、宮本達也、吉良聡、武田正之. 代謝型グルタミン酸受容体サブタイプ5を介する神経伝達の遮断は膀胱収縮性及び排尿を損ねずに蓄尿を促す. 第19回日本排尿機能学会(愛知県名古屋市・名古屋国際会議場), 2012年8月30日.
- (3) Nakagomi H, Mochizuki T, Miyamoto T, Yoshiyama M, Araki I, Moriyama Y, Koizumi S, Takeda M. VNUT (vesicular nucleotide transporter) plays a crucial role in stretch-evoked ATP release from urothelium. (Abstract No. 495, May 20, 2012) American Urological Association Annual Meeting, Georgia World Congress Center, Atlanta, Georgia, U.S.A., May 19-23, 2012.
- (4) Yoshiyama M, Mochizuki T, Nakagomi H, Miyamoto T, Takeda M. Evaluation of increased voiding frequency in mice with type 2 diabetes mellitus. (Abstract No. 256, May 20, 2012) American Urological Association Annual Meeting, Georgia World Congress Center, Atlanta, Georgia, U.S.A., May 19-23, 2012.
- (5) 望月勉, 中込宙史, 芳山充晴, 高山靖規, 富永真琴, 水町涼治, 武田正之. 新規のマウス用排尿代謝ケージ構築ならびに各種パラメーターについて~野生型マウスとTRPV4ノックアウトマウスとの比

- 較～. 第 18 回日本排尿機能学会 (福井県福井市). 2011 年.
- (6) 芳山充晴, 望月勉, 中込宙史, 宮本達也, 武田正之. 遺伝性発症 2 型糖尿病マウスの若年期における頻尿の病態解析. 第 18 回日本排尿機能学会 (福井県福井市). 2011 年.
- (7) 中込宙史, 望月勉, 芳山充晴, 宮本達也, 吉良聡, 川原和也, 荒木勇雄, 小泉修一, 森山芳則, 武田正之. VNUT (Vesicular Nucleotide Transporter) を介する膀胱上皮からの ATP 放出メカニズムの解明. 第 18 回日本排尿機能学会 (福井県福井市). 2011 年.
- (8) Yoshiyama M, Mochizuki T, Nakagomi H, Kobayashi H, Miyamoto T, Zakoji H, Takeda M. Comparisons between voluntary behaviour and reflex response in control of the lower urinary tract function of mice. (Abstract No. 453) International Continence Society Meeting 41st, Glasgow, U.K., 29 August - September 2, 2011.
- (9) Mochizuki T, Yoshiyama M, Nakagomi H, Miyamoto T, Takeda M. TRPV4-deficient mice exhibit increased frequency of voiding ~evaluation of micturition behaviour using novel metabolic cage system~. (Abstract No. 411) International Continence Society Meeting 41st, Glasgow, U.K., 29 August - September 2, 2011.
- (10) Imamura N, Yoda Y, Nakagomi H, Miyamoto T, Tsuchida T, Fukazawa M, Araki I, Yoshiyama M, Takeda M. Risk factors of nocturia and assessment of nocturia-related quality of life in Japanese population. (Abstract No. 375) International Continence Society Meeting 41st, Glasgow, U.K., 29 August - September 2, 2011.
- (11) Nakagomi H, Mochizuki T, Miyamoto T, Kira S, Yoshiyama M, Araki I, Koizumi S, Moriyama Y, Takeda M. VNUT plays an important role in vesicular storage and subsequent exocytosis of ATP from bladder epithelium upon mechanical stretch stimulation. (Abstract No. 278) International Continence Society Meeting 41st, Glasgow, U.K., 29 August - September 2, 2011.
- (12) Yoshiyama M, Mochizuki T, Nakagomi H, Miyamoto T, Kobayashi H, Zakoji H, Takeda M. Evaluations of increased voiding frequency in mice with diabetes mellitus at early stage. (Abstract No. 182) International Continence Society Meeting 41st, Glasgow, U.K., 29 August - September 2, 2011.
- (13) 望月勉, 中込宙史, 芳山充晴, 水町涼治, 武田正之. 新規デバイス排尿用代謝ケージを用いたマウス排尿測定～野生型マウスの各種排尿パラメーターにおける雌雄差について. 第 17 回日本排尿機能学会 (山梨県甲府市). 2010 年.
- (14) Kobayashi H, Yoshiyama M, Inuzuka H, Kira S, Nakagomi H, Miyamoto T, Haneda Y, Sawada N, Zakoji H, Tsuchida T, Araki I, Takeda M. Gene expression patterns of acid-sensing ion channels (ASICs) families in mammalian bladder. (Abstract No. 520) International Continence Society 40th/International Uro-Gynecology Association Joint Meeting, Toronto, Canada, 23 August - 27 August, 2010.
- (15) Imamura N, Nakagomi H, Yoda Y, Zakoji H, Kobayashi H, Tsuchida T, Fukazawa M, Yoshiyama M, Araki I, Takeda M. Hypertension and type 2 diabetes mellitus are highly associated with nocturia than metabolic syndrome in Japanese population. (Abstract No. 381) International Continence Society 40th /International Uro-Gynecology Association Joint Meeting, Toronto, Canada, 23 August - 27 August, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中込 宙史 (NAKAGOMI HIROSHI)
山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80418714

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし