

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592426

研究課題名(和文) A型ボツリヌス毒素は、尿路のTRPイオンチャネルを制御するか？

研究課題名(英文) Does Botulinum Toxin regulate TRP channel of the urinary bladder?

研究代表者

工藤 祥司 (KUDO, Shoji)

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号：10313800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：尿路上皮から分泌されたATPには初期尿意を引き起こし、膀胱コンプライアンスを増加させる。われわれは、尿路上皮が開口放出によってATPを細胞外に分泌していることを証明した。このようなATPの開口放出はVNUT (a vesicular nucleotide transporter) によって制御されている。たとえば、VNUT-KOマウスは初期尿意が欠如し、膀胱コンプライアンスが低いために頻尿であり、排尿する場所が一定しない。ヒトの膀胱内圧測定のパラメータのなかで、膀胱上皮でのVNUTmRNAの発現と相関関係のあるのは初期尿意のみで、負の相関を示した。

研究成果の概要(英文)：ATP produced from urothelial cells have 2 functions. The 1st is to induce initial sensation of fullness of the urinary bladder, and 2nd is to improve compliance of the urinary bladder. We proved that urothelial cells can release ATP by exocytosis. This form of ATP release is regulated by VNUT (a vesicular nucleotide transporter). For example, VNUT-KO mice lack the initial sensation of fullness of the urinary bladder, reveal urinary frequent due to lower compliance of the urinary bladder than wild type, and do not urinate at similar locations as wild type. Among all parameter of urodynamics examination, only initial sensation of fullness of the urinary bladder shows a statistically significant negative correlation with quantitative expression of the urothelial cells.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：下部尿路機能障害 過活動膀胱 排尿機能 TRPイオンチャネル VNUT

1. 研究開始当初の背景

ボツリヌス毒素はボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) 由来の毒素であり、コリン作動性神経終末前シナプス膜からのアセチルコリン小胞の開口放出を抑制し、SNARE 蛋白 SNAP-25 間隙における持続的神経伝達遮断を起こすことにより、その作用を発揮すると考えられている (Am J Physiol 289:F604, 2005)。ボツリヌス毒素には7種の血清型の存在が知られているが、医学的に利用されているのはA型毒素 (BTX-A、ボトックス®) であり、以前から眼科、神経内科、形成外科で使用されてきた。

泌尿器科領域では、脊髄損傷患者の排尿筋外尿道括約筋協調不全を対象に、BTX-A 尿道括約筋 (骨盤底筋) 内注入により尿道を弛緩させ、尿排出を促す目的で用いられた (J Urol 155:1023, 1996, J Neurol Neurosurg Psychiatry 63:474, 1997)。その後、排尿筋過活動に対する BTX-A 膀胱壁内注入が試みられ、まれに尿閉を起こす以外に重大な副作用はなく、優れた効果を示している (J Urol 176:177, 2006, Urology 68:1193, 2006)。

最近では、BTX-A の泌尿器科領域における臨床応用範囲が拡大し、前立腺肥大症による下部尿路症状患者に対する前立腺組織内注入が試みられ、予備的な臨床データによれば有用性が示されて確証はない。

2. 研究の目的

BTX の前立腺肥大症以外の新しい臨床応用として、間質性膀胱炎や慢性前立腺炎などの Painful bladder syndrome に対する使用がある。理論的には、BTX-A は求心性神経における神経伝達物質の開口放出に対しても阻害作用を示すはずであるが、臨床データはいまだ不十分である (Eur Urol 49:704, 2006, J Urol 177:42, 2007, J Urol 174:977, 2005, Eur Urol 49:644, 2006)。前述の文献 (J Urol 174:977, 2005) は、BTX-A の求心性神経に対する作用を調べることを目的とした研究である。この論文では、排尿筋内 BTX-A 注射によって臨床的にも尿流動態検査上でも16週後まで有効であった38例の排尿筋過活動 (DO) 患者 (22例神経因性、16例特発性) に対して、BTX-A 投与前、投与4週後、16週後に膀胱生検を行った。得られた膀胱粘膜検体に対して PGP9.5、AChE、TRPV1 (VR1)、P2X3 抗体を用いた免疫組織化学実験を行い、画像解析装置で陽性率を解析した。その結果、P2X3、TRPV1 陽性神経密度は DO 患者において対照群よりも有意に増加しており、BTX-A 投与後4週で有意に減少し、16週ではさらに減少した

(paired t test ではそれぞれ $p=0.0004$ and $p=0.0008$)。P2X3 陽性神経密度は4週および16週で尿意切迫感の頻度と有意に相関した (4週; $p=0.0013$ 、16週; $p=0.02$) が、最大膀胱容量や排尿筋圧には変化はなかった。TRPV1 陽性神経も同様の結果を示した。神経密度全体を示す PGP9.5 陽性神経には優位な変化はなかった。尿路上皮における P2X3、TRPV1 の発現には変化はなかった。以上のデータからは、P2X3 および TRPV1 陽性知覚神経の減少は、DO に対する BTX-A の効果に関係するかもしれないとの結論であった。膀胱上皮、上皮下神経、および間質細胞には、機械的センサー機能を有する陽イオンチャネル (上皮型ナトリウムチャネル; ENaC、TRP イオンチャネルファミリーなど) が発現し、尿の貯留、温度変化、pH 変化などを求心性神経に伝達しており、その際、ATP などの伝達物質の分泌を介していることが想定されている (Du S, Urology 2004, Du S, Urology 2007, Birder, 2005 Amer J Physiol, Araki I et al: Roles of mechanosensitive ion channels in bladder sensory transduction and overactive bladder. Int J Urol, 15:681-687, 2008.)

(1) 研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか

BTX-A の膀胱壁内投与によって、膀胱上皮細胞、上皮下の神経細胞、および間質細胞の TRP イオンチャネルの発現が変化するか?

BTX-A の膀胱壁内投与によって、膀胱上皮細胞、上皮下の神経細胞、および間質細胞からの伝達物質の産生が変化するか?

(2) 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

BTX-A の作用機序に関する研究はこれまでは SNARE 蛋白 SNAP-25 が主体であったが、最近、SV2 受容体の関与が報告されている (Science 312:592, 2006)。また、BTX-A と求心性神経伝達機構との関連が報告され始め、BTX-A TRPV1、CGRP、P2X3、ATP 分泌の減少などが示唆されている (Eur Urol 49:644, 2006, Neurochem Int 47:291, 2005)。しかしながら、膀胱上皮、上皮下の知覚神経、そして上皮から知覚神経への情報伝達に重要な役割が有ると考えられつつある間質細胞 (筋繊維芽細胞) における機械的センサーである TRP イオンチャネル、ENaC などの発現との関連に関する報告はない。本研究によって、BTX-A の新しい作用機序の解明と、それに基づく新しい治療法の開発の可能性が広がる。

3. 研究の方法

A型ボツリヌス毒素 (BTX-A) によって、膀胱上皮細胞、上皮下の神経細胞、および間質細胞に発現する各種機械センサー分子群 (上

皮型ナトリウムチャンネル；ENaC、TRP イオンチャンネルファミリー - など)の発現と情報伝達物質産生機能がどのように変化するかを調べた。In vivo、in situレベルでは、ラット膀胱内局所注入による変化を調べ、in vitro では膀胱上皮・平滑筋・上皮下間質細胞の培養系を確立し、細胞レベルでの探求と、siRNA を用いた機能解析も行った。

多方面からの検討状況

研究内容

(1)BTX-A の膀胱壁内投与によって、膀胱上皮細胞、上皮下の神経細胞、および間質細胞の機械的センサー分子の発現が変化するか？

ラット膀胱平滑筋細胞、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： 教室代表者の平成20-22年度基盤研究(B)研究課題番号 20390423「下部尿路知覚神経伝達におけるイオンチャンネルの役割と新規治療応用に関する研究」(代表者 武田正之)によって、一部は施行済み。

対象と方法：ラット；摘出組織を用いて、通常の explant culture 法によって作成する。上皮下に存在する間質細胞(筋繊維芽細胞)の培養系の作成は、レーザー顕微鏡システム等を用いて行う。平滑筋細胞、上皮細胞培養系の作成は既に成功している。使用器具：クリオスタット、レーザー顕微鏡システム

(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： 上記平成20-22年度基盤研究(B)研究課題番号 20390423(代表者 武田正之)によって、施行中である。

対象と方法：ヒト組織；インフォームドコンセントを得た上で、手術の際に摘出した下部尿路組織を用いる。通常の explant culture 法によって作成する。上皮下に存在する間質細胞(筋繊維芽細胞)の培養系の作成は、レーザー顕微鏡システムを用いて行う。使用器具：クリオスタット、レーザー顕微鏡システム

(3)ヒトおよびラット下部尿路におけるENaC、TRPチャンネルファミリー(TRPV1,TRPV4,TRPM8,TRPA1)のBTX-Aに対する反応に関する検討：

対象と方法：

ヒト組織；インフォームドコンセントを得た上で、手術の際に摘出した下部尿路組織を用いる。In vitro で、寒冷刺激によって上皮から放出される伝達物質(ATP、アセチルコリン)の測定、BTX-Aによる各種イオンチャンネル(mRNA、蛋白質)の発現の変化を測定する。

ヒト培養細胞；培養細胞に対するBTX-Aによる放出物質の測定、遺伝子・蛋白質発現の

検討。

使用器具：ノーザンブロットング装置一式、ウエスタンブロットング装置一式、定量PCR、HPLC

ラット；丸ごとラット摘出組織を用いる膀胱内圧測定、代謝ケージによる排尿回数、排尿量の測定による行動評価。

ラット培養細胞；培養細胞に対するBTX-Aによる放出物質の測定、遺伝子・蛋白質発現の検討。

使用器具：小動物手術器具、動物用膀胱内圧測定装置、代謝ケージ、ノーザンブロットング装置、HPLC、オーガンパス装置、定量PCR装置、DNAマイクロアレイシステム

4. 研究成果

尿路上皮に発現するTRPV4が伸展刺激に対して強く反応し、求心性伝達機構に重要と考えられるATPの分泌に關与することを証明した。

尿路上皮がATPを分泌し、様々な膀胱機能を制御する。尿路上皮から分泌されたATPには2つの機能があり、いわゆる初期尿意を引き起こすこととおよび膀胱コンプライアンスを増加させるように尿路上皮に作用している。しかしながら、このATPの分泌機序は不明である。われわれは、尿路上皮が開口放出によってATPを細胞外に分泌していることを証明した。このようなATPの開口放出はVNUT(a vesicular nucleotide transporter)によって制御されている。たとえば、VNUT-KOマウスは初期尿意が欠如し、膀胱コンプライアンスが低いために頻尿であり、排尿する場所が一定しない。ヒトの膀胱内圧測定のパラメータのなかで、膀胱上皮でのVNUT mRNAの発現と相関関係のあるのは初期尿意のみで、負の相関を示した。

結論として、尿路上皮由来のVNUT依存性のATP分泌は、蓄尿相初期において膀胱機能を独立して制御する因子であると考えられる。マウス膀胱組織において発現するATP受容体P2Y受容体各サブタイプmRNAはP2Y1.2.6.12.14であった。P2Y6KOマウスは著しい頻尿を認めた。また膀胱内圧測定上、WTと比較して膀胱容量、膀胱コンプライアンスは共に有意に少なかった(p<0.05)。P2Y6受容体は蓄尿・排尿機能に関して、重要な役割を担っていることが示唆された。

Piezo1は細胞膜を30回以上貫通する構造を有する陽イオンチャンネルであり、マウス膀胱に発現する新たな機械的刺激感受性チャンネルの候補である。膀胱上皮にはPiezo1が発現しており、伸展刺激に反応して細胞内Ca²⁺濃度調節行い、情報伝達物質であるATP放出に關与することを実証した。以上の研究結果からPiezo1は膀胱上皮細胞におけるメカノセンサーとして機能し、求心性シグナル伝達のkey molecularのひとつであると考えられる。

時計遺伝子のうちClockをコードする遺伝子

に突然変異をきたしたマウスで、野生型と比較し夜間頻尿・夜間多尿の表現型を示す事を初めて見出した。

変異マウスは野生型と比較し体重などの身体的特徴・昼夜の行動パターン、総尿量などに変化がないにも関わらず、ヒトと類似した夜間頻尿・夜間多尿パターンを呈する。本発明のマウスを用いる事により、夜間頻尿・夜間多尿の病態解明の一助となり、治療薬の評価系にも適している。

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42件)

1. Osamu N, Masaki Y, Masayuki T, Osamu Y, Yoji M, Masahiro M, Lars V:

Tadalafil 5 mg once daily for the treatment of Asian men with lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia: analyses of data pooled from three randomized, double-blind, placebo-controlled studies, DOI: 10.1111 Int J Urol vol.22 378-384,2015 査読有

2. Masayuki T, Osamu Y, Sung WL, Masahiro M, Yoji M, Lars V

Tadalafil 5 mg once-daily therapy for men with lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia: Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial performed in Japan and the Republic of Korea, DOI: 10.1111 Int J of Urol vol.21 670-675,2014 査読有

3. Yuan C, Kun G, Hui Z, Masayuki T Jian Y

Suppression of cell membrane permeability by suramin: involvement of its inhibitory actions on connexin 43 hemichannels. Brit J Pharmacol, vol.171 3448-3462,2014 査読有 DOI: 10.1111

4. Yuan C, Kun G, Kai L, Shotaro N, Satoru K, Masayuki T, Jian Y

Purinergic control of AMPK activation by ATP released through connexin 43 hemichannels pivotal roles in hemichannel mediated cell injury. J Cell Sci, vol.127 1487-1499,2014 査読有 DOI:10.1242.

5. Tatsuya M, Tsutomu M, Hiroshi N, Satoru K, Masaki W, Yasunori T, Yoshiro S, Schuichi K, Masayuki T, Makoto T

Functional Role for Piezo1 in Stretch-evoked Ca²⁺-influx and ATP Release in Urothelial Cell Cultures J Biol Chem vol.289(23) 16565-16575,2014

査読有 DOI: 10.1074

6. Akira Y, Shiori K, Yoshiki I, Takashi O, Yoshiharu D, Atsushi O, Seiichiro O, Masayuki T, Isao A, Shizuo Y

Muscarinic Binding of the Novel Radioligand, [³H] Imidafenacin in the Human Bladder and Prostatic Gland J Pharmacol Sci vol.124(1) 40-46, 2014. 査読有 DOI:10.1254

7. Yamaguchi O, Marui H, Kakizaki H, Homma Y, Igawa Y, Takeda M, Nishizawa O, Gotoh M, Yoshida Y, Yokoyama O, Seki N, Ikeda Y, Ohkawa S

A phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study of the 3-adrenoceptor agonist, mirabegron 50 mg once-daily, in Japanese patients with overactive bladder DOI: 10.1111 BJU Int vol.113 951-960,2014. 査読有

8. Masayuki T, Osamu N, Momokazu G, Masaki Y, Satoru T, Naoya M

Clinical Efficacy and Safety of Imidafenacin as Add-on Treatment for Persistent Overactive Bladder Symptoms Despite α -Blocker Treatment in Patients with BPH: the ADDITION STUDY, Urology vol.82 887-893, 2013. 査読有 DOI: 10.1111

9. Kai L, Jian Y, Yuan C, Norifumi S, Isao A, Masanori K, Masayuki T

Eviprost activates cAMP signaling pathway and suppresses bladder smooth muscle cell proliferation, Int. J. Mol. Sci vol.14 12107-10122, 2013 査読有 DOI: 10.3390

10. Kai L, Yuan C, Qiaojian Y, Kun G, Hiroyuki M, Masayuki T, Masanori K,

Jian Y Connexin 43 hemichannel-mediated regulation of connexin 43 DOI: 10.1371 Plos One vol.8(2) e58057 2013 査読有

11. Mitsuharu Y, Roppolo JR, Masayuki T, William C. de Groat

Effects of Urethane on reflex activity of lower urinary tract in decerebrate unanesthetized rats. Am J Physiol Renal Physiol vol.304(4) F390-396 2013 査読有 DOI: 10.1152

12. Noboru H, Hisashi S, Kota T

Masayuki T
Lower urinary tract symptoms in patients with Niigata Minamata disease. A case-control study 50 years after methyl mercury pollution, DOI: 10.1111

Int J Urol vol.20 610-615 2013 査読有

13. Akira Y, Yusuke F, Shiori K, Ayaka O, Atsushi O, Seiichiro O, Masayuki T, Keisuke M, Isao A, Shizuo Y

Fesoterodine, its active metabolite and tolterodine bind selectively to muscarinic receptors in human bladder mucosa and detrusor muscle. DOI: 10.1016

Urology vol.81(4) 920 2013 査読有

14. Birder LA, Ruggieri M, Takeda M, Koevinge G, Veltkamp S, Korstanje C, Parson B, Fry CH

How does the urothelium affect bladder function in health and disease?:

Neurourol Urodyn vol.31 293-299 2012

査読有 DOI: 10.1002

15. Kai L, Jian Y, Norifumi S, Masanori K, Kar-Eric A, Masayuki T

-Catenin-Signaling Contributes to Platelet Derived Growth Factor Elicited Bladder Smooth Muscle Cell Contraction Through Up-Regulation of Cx43 Expression. DOI: 10.1016

J Urol vol.188(1) 306-315 2012 査読有

16. Mary HP, Anastasios A, Kyu-Sung L, Masayuki T, Jean J W

Sociocultural and environmental influences on bladder health.

International Journal of Clinical Practice, vol.66(12) 1132-1138 2012 査読有

DOI: 10.1111

〔学会発表〕(計34件)

1. Norifumi S, Satoru K, Tatsuya I, Yuki I, Nobuhiro T, Hidenori Z, Masanori N, Masayuki T

The beneficial effect of resveratrol on bladder function in a rat model of chronic bladder ischemia.

The 111th Annual Meeting of The American Urological Association.

2015/05/17 New Orleans, USA

2. Mitsuharu Y, Tsutomu M, Masayuki T:

Functional roles of metabotropic glutamate receptor subtype 1A in control of lower urinary tract activity in mice.

The 111th Annual Meeting of The American Urological Association.

2015/05/16 New Orleans, USA

3. Nobuhiro T, Shoji K, Hideki K, Satoshi A, Tatsuya M, Hidenori Z, Masayuki T

A novel laparoscopic surgical method for

coexistence of testicular varicocele and ipsilateral hydrocele.

The 111th Annual Meeting of The American Urological Association.

2015/05/16 New Orleans, USA

〔図書〕(計15件)

1. Fry CH, Chako S, Wachter S, Kanai, AJ, Takeda M, Young JS

Committee 2- Cell Biology, Incontinence 5th edition

Health Publication Ltd London, 109-178, 2013

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 排尿障害治療薬 Piezo

発明者: 宮本達也

権利者: 国立大学法人山梨大学

種類: 特開

番号: 2014 - 84283

出願年月日: 2014年5月12日

国内外の別: 国内

取得状況(計1件)

名称:

発明者: 宮本達也

権利者: 国立大学法人山梨大学

種類: 特開

番号: 2014 - 84283

出願年月日: 2014年5月12日

取得年月日: 2014年9月30日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://yamanashiuro.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 祥司 (KUDO, Shoji)

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号: 10313800

(2) 研究分担者

武田 正之 (TAKEDA, Masayuki)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号: 80197318

宮本 達也 (MIYAMOTO, Tatsuya)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号: 80456459

吉良 聡 (KIRA, Satoru)

山梨大学・総合研究部・診療助教

研究者番号: 10530115

羽根田 破: (HANEDA, Yaburu)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：20402068

小林 英樹：(KOBAYASHI,Hideki)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：50402053