

## 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：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791640

研究課題名(和文)膀胱上皮における新規メカノセンサー Piezo の発現と機能の解明

研究課題名(英文) The mechanosensor Piezo1 is expressed in the urothelium and has a crucial function in the urine storage phase in the bladder.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：膀胱上皮細胞にPiezo1が発現しており、膀胱伸展刺激を感知し、尿意や蓄尿機能の調節を担っているのではないかと考え、研究を行った。マウス膀胱上皮にはPiezo1が発現していた。またPiezo1は伸展刺激に反応して細胞内にCa<sup>2+</sup>の流入させることが分かった。またPiezo1阻害薬であるGsMTx4は、膀胱上皮におけるPiezo1を阻害し、伸展刺激反応を鈍化させ、蓄尿に有利に働くことが分かった。

研究成果の概要(英文)：We provide evidence for a critical role of the Piezo1 channel in bladder function. We performed a systematic analysis of the molecular and functional expression of Piezo1 channels in the urothelium. Immunofluorescence demonstrated that Piezo1 was abundantly expressed in mouse urothelium. Intracellular Ca<sup>2+</sup> measurements in urothelial cells isolated from mice revealed a Piezo1-dependent response to mechanical stretch stimuli. GsMTx4, a known inhibitor of stretch-activated channels, attenuated the response to Ca<sup>2+</sup> influx in urothelial cells upon stretch stimulation experiments. Behavioral studies demonstrated that GsMTx4-treated mice exhibited increased bladder capacity and reduced micturition frequency compared with the vehicle-treated group. These results suggested that Piezo1 sensed distention of the bladder urothelium during urine storage. Furthermore, inhibition of Piezo1 may 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：piezo1

## 1. 研究開始当初の背景

今までに、下部尿路症状の研究・治療は盛んに行われてきた。その中心は前立腺肥大症などの尿排出症状から、膀胱機能などに関する蓄尿症状へと変化してきた。さらには膀胱機能に関する研究は、膀胱平滑筋から膀胱上皮の機能解明に移り変わってきた。

そのような中で、新たな概念として過活動膀胱が非常に注目されている。過活動膀胱の原因は、排尿筋の過活動状態であり、その機序は中枢における排尿反射抑制の低下、もしくは膀胱からの求心性神経伝達の亢進である。近年、膀胱(尿路)上皮は、尿中侵害性物質などの膀胱壁内への侵入を阻止する防御機構としての働き以外に、伸展刺激や侵害刺激を感知して、求心性伝達を担う役割を果たしていると考えられている。膀胱の蓄尿期においては、尿貯留による膀胱伸展が膀胱上皮を刺激し、膀胱上皮から情報伝達物質である ATP、ACh、NO、PGE などが放出されることが分かっている。

一方、膀胱上皮における刺激感知のメカノセンサーとしては、温度感受性チャネルである TRPA1 や TRPM8、温度感受性のみならずカプサイシン感受性をもつ TRPV1、酸感受性チャネルである ASIC などが報告されており、上皮型ナトリウムチャネルである ENaC が膀胱伸展による

ATP 放出に関与している可能性も報告されている。しかし、膀胱機能の根幹をなす蓄尿時における膀胱伸展刺激に対するメカノセンサーについてはいまだ十分に明らかにされていない。Mochizuki らは、TRP ファミリーの一つである TRPV4 チャネルが膀胱上皮細胞において、伸展刺激に対して応答し細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させ、ATP 放出に関わることを実証した。(JBC, 2009)しかし、TRPV4 チャネルを介さない Ca イオンの流入が大きな割合を占めていること、また TRPV4 チャネルの開口には、単純な伸展刺激とは別にその上流にシグナルカスケードがあることより、TRPV4 とは異なる、真の伸展刺激メカノセンサーの存在が想定されている。

2010 年、新しい mechanically activated Cation channel として Piezo が報告された (SCIENCE, 2010)。Piezo は touch や pressure などの機械刺激を感知するメカノセンサーとして考えられており、機械刺激感知における有力かつ中心的役割を果たしているのではないかと考えられており、その機能の解明が期待されている。また Piezo は膀胱においても発現していることが報告されており、我々は、膀胱における伸展刺激の感知、すなわち尿意という膀胱知覚に対するメカノセンサーとして Piezo が機能しているのではないかと考えている。

いままで長きに渡って未解明であった膀胱伸展刺激感知、尿意の知覚メカニズムを Piezo を切り口として解明することができれば、尿意知覚異常によって引き起こされる過活動膀胱や、間質性膀胱炎といった難治性の疾患に対する病態の解明、治療にも貢献できるものと思われる。

多くの下部尿路症状を有する患者にとって、大きな期待となりうる研究であると思われる。

## 2. 研究の目的

過活動膀胱は、QOL を著しく低下させる症候群であり、高齢化に伴い患者数は急激に増加している。そのため、過活動膀胱による頻尿、尿意切迫感などの蓄尿症状が非常に注目されている。今までの過活動膀胱の研究・治療においては、膀胱排尿筋収縮の抑制が主なターゲットとされてきたが、そもそも膀胱がどのように伸展刺激を感知しているかはいまだ明らかにされていない。最近の研究により、膀胱上皮が分泌機能を有し、情報伝達機能に関与していることが明らかとされた。そこで我々は、新たなメカノセンサーの機能を解明し、いかにして膀胱上皮が伸展刺激を感知し、尿意として伝えているかを明らかにしたいと考えている。

## 3. 研究の方法

### (1) in vitro 実験

我々は、マウス膀胱上皮、初代培養細胞において Piezo が膀胱上皮に強く発現していることを mRNA レベル、タンパクレベルで証明している。膀胱上皮初代培養細胞を用いて、Piezo knock down (siRNA) を作成し、これを用いて伸展刺激実験を行う。Piezo KD による伸展刺激時の細胞内 Ca<sup>2+</sup>の流入の減少を Ca imaging 法を用いて証明し、Piezo が伸展刺激を感知していることを明らかにする。さらには同様の伸展実験を行い、その際の ATP Release の減少を ATP Photon Imaging 法により証明する。

mRNA 定量 RT-PCR In situ hybridization

タンパク実験 免疫染色 Western blot  
生理実験 Piezo を KD することにより、loss of function での実験系での機能解析  
RNA 干渉法による Piezo の Knock down 条件の検討  
膀胱上皮伸展実験 KD 群 VS control 群での比較

) Ca imaging 法 ) ATP 測定

### (2) vivo 実験

Piezo KO マウスが入手可能となれば、マウス排尿代謝ケージを用いた排尿行動解析、な

らびにマウス膀胱内圧測定実験により、WT と PiezoK0 マウスでの差異 (Piezo K0 マウスでは排尿間隔が延長すると予想される) を検討する。これらの実験により個体レベルでの Piezo の機能を明らかにする。

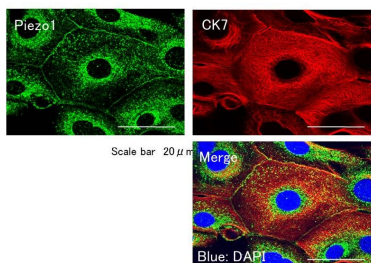
行動実験 マウス排尿代謝ケージを用いた、Piezo1 阻害薬を用いたマウスの排尿行動解析

#### 4. 研究成果

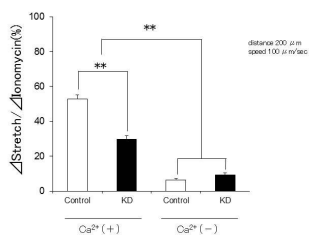
##### ① m-RNAレベルでの確認 (定量RT-PCR)



##### ・マウス膀胱上皮培養細胞蛍光免疫染色

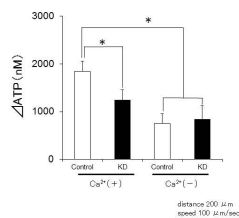


##### Control細胞とPiezo1KD細胞の伸展刺激に対する応答の比較 (1) Ca imaging法による細胞内Ca<sup>2+</sup>の変化

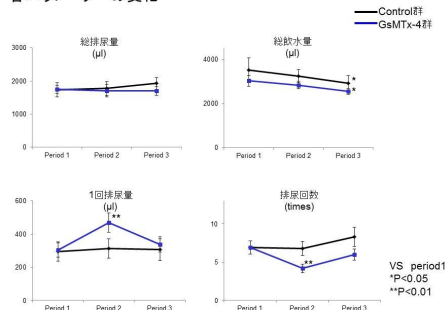


##### (2) ATP Photon countingによる細胞外ATP放出量測定

##### Control細胞とPiezo1KD細胞の伸展刺激に対する応答の比較



##### 各パラメーターの変化



上記研究結果より、Piezo1 はマウス膀胱上皮細胞において伸展刺激を感知し、尿意を伝えるメカノセンサーとして機能していること、また GsMTx4 など Piezo1 をターゲットとする薬剤は、新しい頻尿治療の開発につながる可能性がある。

これにより、今まで解明されていなかった尿意の伝達経路の一つが明らかとなり、新規の過活動膀胱治療薬など今後の創薬のターゲットと成りうる分子の同定がなされたと考えられる。

#### 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 1件)

Tatsuya Miyamoto  
Functional role for Piezo1 in stretch-evoked Ca<sup>2+</sup> influx and ATP release in urothelial cell cultures  
The Journal of Biological Chemistry  
査読あり  
Accepted April 23, 2014.  
doi:10.1074/jbc.M113.528638

[学会発表](計 9件)

宮本 達也  
膀胱上皮における伸展刺激センサーPiezo1とTRPV4の関係性  
第20回日本排尿機能学会  
2013/09  
静岡市

Tatsuya Miyamoto  
Inhibition of Piezo1 in bladder urothelium: a potential therapy for overactive bladder  
The 43th Annual Meeting of International Continence Society(ICS)  
2013/08  
Barcelona

宮本 達也

膀胱上皮における新規メカノセンサー  
“Piezo1”の解明  
第101回日本泌尿器科学会総会  
2013/04  
札幌市

宮本 達也  
膀胱上皮細胞におけるPiezo1の機能の解明  
第86回日本薬理学学会年会  
2013/03  
福岡

Tatsuya Miyamoto  
Piezo1, a novel mechanosensor in the  
bladder urothelium, transmits signals of  
bladder secsation  
28th Annual EAU Congress  
2013/03  
Milan, Italy

宮本 達也  
マウスの排尿に対する機械刺激活性化チャ  
ネル阻害剤GsMTX-4の効果の検討  
第5回排尿障害モデル動物研究会  
2012/11  
静岡

Tatsuya Miyamoto  
PIEZO1, A NOVEL MECHANOSENSOR IN THE  
BLADDER UROTHELIUM  
42nd Annual Meeting of the International  
Continenence Society(ICS)  
2012/10  
Beijing, China

宮本 達也  
膀胱上皮における新規メカノセンサー  
Piezo1の解明  
第14回応用薬理シンポジウム  
2012/09  
甲府

宮本 達也  
膀胱上皮に依存する“Piezo”は、尿意を伝え  
る新しいメカノセンサーである  
第19回日本排尿機能学会  
2012/08  
名古屋市

〔図書〕(計 0件)

〔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

発明者：宮本 達也  
権利者：宮本 達也  
種類：特許  
番号：2012-232440  
出願年月日：2012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  
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

(2)連携研究者  
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

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