

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462437

研究課題名(和文) 伸展刺激における膀胱上皮から排尿筋・DRGへの細胞間シグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of intercellular signaling mechanism from urinary bladder epithelium to detrusor / DRG in stretching stimulation

研究代表者

望月 勉(MOCHIZUKI, Tsutomu)

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号：50377496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱上皮培養細胞を用いたin-vitroの実験系では、膀胱上皮がTRPV4を介して伸展刺激を感知し、改めてメカノセンサー分子であることを再確認した。また伸展刺激により膀胱上皮細胞が情報伝達物質としてATP放出し、求心路へシグナル伝達することを明らかとし、なかでも開口放出経路がそのATP放出に主に関与していることを発見した。

以上の研究結果により、蓄尿時において膀胱上皮はTRPV4分子などのセンサーを介して伸展刺激を感知し、ATPなどの神経伝達物質を放出することで排尿筋やDRGへシグナル伝達を行い、その結果、尿意としての知覚ならびに排尿筋の安定に寄与しているのではないかと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the in vitro experimental system using bladder epithelial cultured cells, the bladder epithelium sensed the extension stimulation via TRPV4 and reconfirmed that it is a mechanosensor molecule again. In addition, we found that bladder epithelial cells release ATP as an information transmitter by extension stimulation and signal transduction to afferent pathway, and in particular, the opening release pathway is mainly involved in ATP release. Based on the above findings, the urinary bladder epithelium senses stretching stimuli via sensors such as TRPV4 molecules during storage and releases neurotransmitters such as ATP, thereby signaling to detrusor muscle and DRG. It seems that it may contribute to perception as urine urination and stability of detrusor muscle.

研究分野：排尿生理学

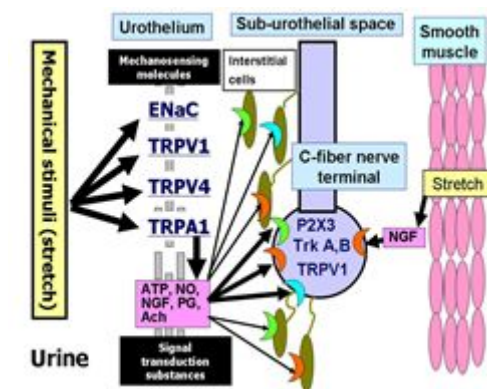
キーワード：過活動膀胱 尿意

## 1. 研究開始当初の背景

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ている (Ferguson et al.1997;Sun et al.,2001;Birder and de Groat et al.,2007)。これまで膀胱上皮が伸展刺激に应答し、ATP や NO、アセチルコリン、PGE などの mediator を放出しているとの報告が多数なされており (Yoshimura et al.,2002;Andersson et al.,2002;Lewin GR et al.,2004;Xu L et al.2008)。右図シエマのような伝達経路が提唱されているが、未だ確認たるものはなく、現在においても未解決のままである。

筆者らはこれまで、膀胱上皮細胞が機械伸展刺激に対し应答し細胞内カルシウム濃度を上昇させ、細胞外へ ATP 放出することを報告してきた (Mochizuki T, et al, J Biol. Chem. 2009)。

しかしながら、それら ATP をはじめとする膀胱上皮細胞からの各種情報伝達物質が、いかにして平滑筋や求心性神経末端に作用し、各々、排尿筋の収縮・弛緩あるいは尿意や痛みに関わるかといったことは分かっていない。当教室ではマウス膀胱上皮培養細胞・平滑筋培養細胞・DRG 神経培養細胞の作成に精通しており (下図参照)、今後は上皮から放出された伝達物質が直接的に平滑筋や DRG に対しどのように関与するかを、カルシウムイメージングやパッチクランプなど電気生理学的手法を用い、in vitro で検証・解明していきたいと考えている。



## 2. 研究の目的

これまでの研究でマウス膀胱上皮細胞は伸展刺激に应答し、ATP 放出を行うことが確認された。我々は「蓄尿時の膀胱伸展 膀胱上皮が伸展刺激を感知 ATP などの mediator を放出 求心性神経や排尿筋にシグナル伝達」という仮説を立て、尿意のメカニズムや排尿筋過活動の病態解明に向け精力的に研究を続けている。

## 3. 研究の方法

初年度は各種培養細胞 (膀胱上皮初代培養・膀胱平滑筋培養細胞・DRG 神経培養細胞) の

新規立ち上げ、および形態的・機能的な確認のための molecular work を主体とした予備実験を行う。また膀胱上皮培養細胞を伸展刺激させた後の伝達物質について HPLC を用いて解析・定量化する。

次年度以降は、本実験として平滑筋培養細胞ならびに DRG 培養細胞が、上皮から放出された mediator にどのように应答するかを電気生理学的解析により検証する。また、前年度までに得られた予備実験でのデータを参考にし、予想された mediator に対しノックダウン法や各種 inhibitor を適宜用いて、それらの効果についても同様に検討していき、最終的には上皮から放出された伝達物質のうち、平滑筋や DRG に対してそれぞれ何が最も重要な役割を担っているのかを明らかにする。

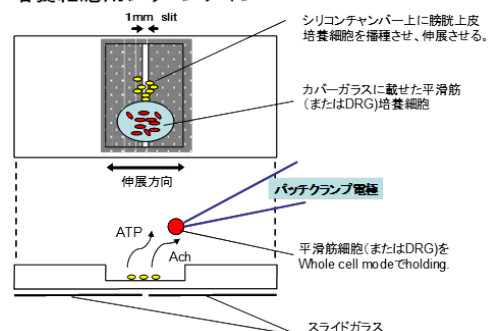
(1) マウスから膀胱上皮細胞・平滑筋細胞・DRG 細胞をそれぞれ酵素処理にて単離し、培養細胞系を樹立。膀胱上皮細胞および DRG 細胞は初代培養細胞のみをその都度作成し、以後の実験に用いる。膀胱平滑筋細胞については継代が可能のため、cell line として用いる (passage 20 まで property が変化していないことを当教室で既の実証済み)。

(2) 各種培養細胞に対し形態的ならびに機能的な発現に問題がないかどうかを遺伝子レベル・タンパクレベルで再確認。具体的には CK7(上皮マーカー)・ $\alpha$ -SMA (筋性マーカー)・S-100(神経マーカー)を各々 RT-PCR 法や免疫染色 (蛍光抗体法) でそれらの発現を確認する。

(3) ストレッチチャンバー上に膀胱上皮培養細胞を播種させ、伸展刺激を加える前と後でのチャンバー内 solution に含まれる物質について、液体クロマトグラフィー (HPLC) で成分分析を実施し、定量化する。

(4) ATP に関しては、膀胱上皮培養細胞での伸展刺激実験系で、1 回の伸展刺激あたり 500 ~ 1200nM の ATP が放出されることが分かっている (Mochizuki et al. JBC 2009)。一方、筆者らは膀胱平滑筋培養細胞 (BSMC) に対し 1  $\mu$ M (1000 nM) の ATP を添加させ、カルシウムイメージング下での細胞応答を最近確認し、この結果は少なくとも ATP については BSMCs に対し、何らかの影響を及ぼしていることを示している。今後はこれらの preliminary data を更に積み重ねる。

### 培養細胞用シリコンチャンバー



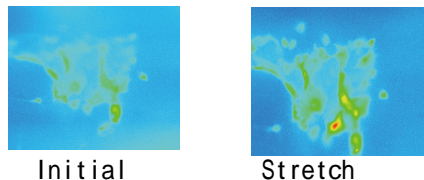
#### 4. 研究成果

膀胱上皮培養細胞を用いた in-vitro の実験系では、膀胱上皮が TRPV4 を介して伸展刺激を感知し、改めてメカノセンサー分子であることを再確認した。また伸展刺激により膀胱上皮細胞が情報伝達物質として ATP 放出し、求心路へシグナル伝達することを明らかにし、なかでも開口放出経路がその ATP 放出に主に関与していることを発見し、十分なデータが得られた。

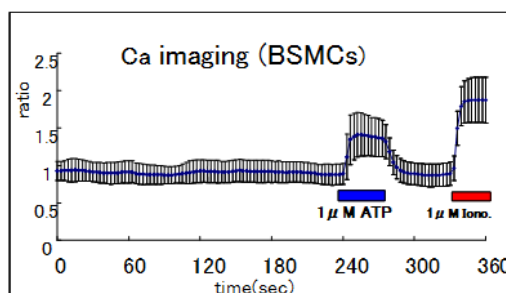
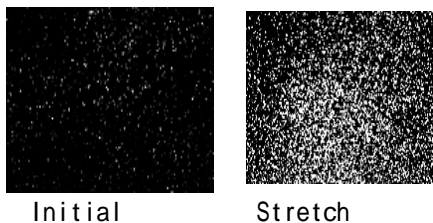
動物個体実験（野生型と TRPV4-KO マウスを比較）では、排尿行動実験ならびに排尿反射実験を行うことで、TRPV4 が下部尿路において重要な役割を担っていることを見出した。

以上の研究結果により、蓄尿時において膀胱上皮は TRPV4 分子を介して伸展刺激を感知し、ATP などの神経伝達物質を放出することで、尿意としての知覚ならびに排尿筋の安定に寄与しているのではないかと考えられた。

（膀胱上皮伸展刺激によるカルシウム流入）



（伸展刺激時の ATP 放出）



我々は、膀胱上皮 求心性神経や排尿筋へのシグナル伝達の異常・破綻こそが、OAB の原因であると考えている。事実、臨床において、間質性膀胱炎（interstitial cystitis, 以下 I.C.）の患者では膀胱上皮の潰瘍化や間質の炎症所見を認め、さらには健常者と比較し尿中 ATP や PGE が有意に増加していることが報告されており（Sun et al. J urol. 2004, Palea et al. J urol. 1993）これらが蓄尿時の膀胱痛や排尿筋過活動による尿意切迫感を引

き起こすと考えられている。

膀胱上皮細胞や膀胱平滑筋細胞ならびに DRG 神経細胞での互いの inter-action・求心性伝達機構を各々末梢細胞レベルで解明することは、OAB や I.C. など蓄尿機能障害の pathology 解決の決め手となるであろう。

#### 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) P2Y6-deficiency increases micturition frequency and attenuates sustained contractility of the urinary bladder in mice.

Kira S, Yoshiyama M, Tsuchiya S, Shigetomi E, Miyamoto T, Nakagomi H, Shibata K, Mochizuki T, Takeda M, Koizumi S.

Sci Rep. 2017 Apr 10;7(1):771. doi: 10.1038/s41598-017-00824-2.

PMID: 28396595. 査読有

(2) Urothelial ATP exocytosis: regulation of bladder compliance in the urine storage phase.

Nakagomi H, Yoshiyama M, Mochizuki T, Miyamoto T, Komatsu R, Imura Y, Morizawa Y, Hiasa M, Miyaji T, Kira S, Araki I, Fujishita K, Shibata K, Shigetomi E, Shinozaki Y, Ichikawa R, Uneyama H, Iwatsuki K, Nomura M, de Groat WC, Moriyama Y, Takeda M, Koizumi S.

Sci Rep. 2016 Jul 14;6:29761. doi: 10.1038/srep29761. 査読有

(3) Functional roles of TRPV1 and TRPV4 in control of lower urinary tract activity: dual analysis of behavior and reflex during the micturition cycle.

PMID: 27412485

Yoshiyama M, Mochizuki T, Nakagomi H, Miyamoto T, Kira S, Mizumachi R, Sokabe T, Takayama Y, Tominaga M, Takeda M.

Am J Physiol Renal Physiol. 2015 May 15;308(10):F1128-34.

doi: 10.1152/ajprenal.00016.2015. Epub 2015 Mar 11. PMID: 25761879. 査読有

(4) Functional role for Piezo1 in stretch-evoked  $Ca^{2+}$  influx and ATP release in urothelial cell cultures.

Miyamoto T, Mochizuki T, Nakagomi H, Kira S, Watanabe M, Takayama Y, Suzuki Y, Koizumi S, Takeda M, Tominaga M.

J Biol Chem. 2014 Jun 6;289(23):16565-75. doi: 10.1074/jbc.M113.528638. Epub 2014

Apr 23. PMID: 24759099. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

吉良 聡、芳山充晴、宮本達也、中込宙史、  
望月 勉、繁富英治、武田正之、小泉修一、  
P2Y6 受容体は膀胱蓄尿機能に關与している  
(ポスター) P2Y6 receptors plays a critical  
role in bladder storage function in mice. 第  
87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19 日、  
仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

望月 勉 (MOCHIZUKI, Tsutomu)  
山梨大学・総合研究部・医学研究員  
研究者番号: 50377496

(3) 連携研究者

武田 正之 (TAKEDA, Masayuki)  
山梨大学・総合研究部・教授  
研究者番号: 80197318

吉良 聡 (KIRA, Satoru)  
山梨大学・総合研究部・助教  
研究者番号: 10530115