

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 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：26462438

研究課題名(和文) 閉塞膀胱の病態におけるコネキシンヘミチャネルの役割

研究課題名(英文) Role of connexin hemichannels in the bladder outlet obstruction

研究代表者

神家満 学 (KAMIYAMA, Manabu)

山梨大学・総合研究部・講師

研究者番号：90362061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：この研究の目的はコネキシンヘミチャネルが膀胱の収縮及び病態生理に寄与しているかどうかを解明することである。結果：1) 膀胱上皮細胞のヘミチャネルが機械的刺激によって活性化され、膀胱ATPの放出と関連していることが明らかになった；2) ヘミチャネルの活性化は酸化ストレス及びTRPV4活性化剤による膀胱上皮細胞のATPの放出及び細胞傷害にも重要な役割を果たすことを証明した；3) 体内ヘミチャネルの抑制を有する多チャネル阻害剤投与することで、cyclophosphamide膀胱炎の膀胱機能障害に対する改善作用を有することが明らかとなった。膀胱の機能障害にヘミチャネルが関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study is aimed to test the potential participation of connexin hemichannels in the control of bladder activity and pathological processes of bladder disorders. The results showed that mechanic stimulation of bladder with the increased volume of saline caused an abrupt release of ATP, which could be largely prevented by hemichannel inhibitors. In cultured urothelial cells, mechanical stimulation with glass beads or activation of TRPV4 channels with agonists caused a hemichannel-dependent release of ATP. Inhibition of hemichannels with CBX also largely prevented oxidative urothelial cells injury. In an in vivo mouse model of bladder cystitis induced by cyclophosphamide, CBX treatment attenuated bladder oxidative stress and inflammation, and improved bladder function. Our study suggests that connexin hemichannel might contribute to the regulation of bladder activity under both physiological and pathological conditions.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膀胱 ATP ギャップ結合 ヘミチャネル 酸化ストレス 機械的刺激 膀胱上皮細胞 膀胱炎

1. 研究開始当初の背景

(1) 正常の膀胱収縮はムスカリン受容体の刺激によって引き起こされる。しかし神経因性膀胱、膀胱出口部閉塞、特発性排尿筋過活動、間質性膀胱炎、加齢膀胱等の病的状態下では、非コリン受容体の伝達物質である ATP が過剰に分泌されることで、プリン受容体を活性化し異常な膀胱の収縮を引き起こす。こうした異常な収縮は、下部尿路障害の主要症状である頻尿や切迫性尿失禁を引き起こし、患者の生活の質(QOL)を著しく低下させるため、より深い分子病態の理解と新たな治療法の開発が期待されている。

(2) 膀胱の異常収縮に關与する非コリン受容体伝達物質ATPは、尿路上皮細胞から放出される。尿路上皮細胞は、外部環境の変化を感知しATPを含むあらゆる伝達物質を放出するとともに、尿路上皮下の間質細胞と緊密にクロストークすることで膀胱の機能を調節している。膀胱上皮細胞間及び上皮細胞と間質細胞間のコミュニケーションは、膀胱の機能調節に重要であると考えられる。

(3) ギャップジャンクション (gap junction, GJ) はコネキシン(connexins, Cx) という蛋白によって構成されており、細胞間でイオンやセカンドメッセンジャー、小分子を通過させる膜貫通型チャネルの集合体である。GJは細胞集団の協調の機能調節に重要な役割を果たしていることが知られている。過活動膀胱においてコネキシン43(Cx43)の発現や機能が亢進しており、さまざまな刺激に回答して細胞間の情報伝達や協調作用を促進することで膀胱平滑筋の収縮を高めることが知られているが、膀胱におけるコネキシンチャネルの作用やメカニズムは依然として不明な部分が多い。

(4) 近年、膀胱の異常収縮を引き起こす原因

とされる機械的ストレス及び虚血や酸化ストレスがコネキシンヘミチャネル(hemichannel)を活性化することが報告されており、われわれは、尿路上皮細胞のヘミチャネルが膀胱の機能調節に重要な役割を果たしていると予想している。

2. 研究の目的

この研究の目的は、尿路上皮細胞のコネキシンヘミチャネルが膀胱の収縮及び病態生理に寄与しているかどうかを解明することである。

具体的には以下の4点を明らかにする:

尿路上皮細胞にどのようなコネキシン蛋白が発現及び機能しているか; あらゆるストレス刺激により膀胱上皮細胞のヘミチャネルが活性化するか否か; 膀胱収縮の調節におけるヘミチャネルの役割とメカニズム; ヘミチャネルの調節による膀胱の異常収縮の病的プロセスへの影響。

3. 研究の方法

(1) 初代培養のマウス膀胱上皮及び平滑筋細胞は、10% fetal bovine serum (FBS) を含む D-MEM/F-12 培地を用いて培養した。

(2) 初代培養の上皮及び平滑筋細胞において Cx43 を発現していることをタンパクレベル (蛍光免疫染色法、Western blotting; WB) mRNA レベル (RT-PCR) で検索した。

(3) In vivo膀胱への機械的刺激をマウス膀胱還流液注入によって誘導した。刺激による膀胱上皮細胞からのATP量を、ATP測定キットを用いて測定した。In vitroにおいては、glass beads及びTRPV4チャネル活性化剤による培養膀胱上皮細胞のATP放出についても測定した。またギャップ結合ヘミチャネル阻害の有無によるATP放出量を比較した。

(4) 培養液に投与した蛍光色素の細胞内への拡散により、機能的ギャップ結合ヘミチャネルの活性を評価した。

(5) マウスの腹腔内に cyclophosphamide (CYP) を注入し膀胱炎モデルを作製した。膀胱の機能について、マウス排尿代謝ケージを用いて測定した。24 時間での総排尿量、総飲水量、一回排尿量、排尿回数を測定した。carbenoxolone (CBX) 投与による排尿行動の変化を検討した。

(6) CYP膀胱炎マウス膀胱の病理的な変化を観察した。Cx43タンパク、炎症メディエーター及びタンパク質のカルボニル化の変化を Western Blottingにより解析した。

4 . 研究成果

(1) マウス膀胱組織および初代培養尿路上皮細胞にコネキシン蛋白43が発現していることを、免疫染色、Western blot及びRT-PCRで明らかにした。

(2) In vivo膀胱への機械的ストレス刺激による膀胱ATPの放出量を測定した。マウス膀胱のATP放出は、マウス膀胱へ注入した還流液の量に依存していることを明らかにした。還流液中にヘミチャネル阻害剤であるheptanolおよびlindaneの添加によって、ATPの放出量が有意に抑えられた。In vitro培養上皮細胞へのglass beadsによる機械的刺激もATPの放出を誘導した。放出されたATPは、ヘミチャネル阻害剤によって抑えられた。以上の結果から、膀胱上皮細胞のヘミチャネルが機械的ストレスによって刺激され、膀胱ATPの放出と関連していることを明らかにした。

(3) 膀胱の病態生理に深く関わる酸化ストレス及びTRPV4活性化によって、培養膀胱上皮細胞のATPが放出された。放出されたATPの量は、

ヘミチャネル阻害剤投与により抑制された。酸化ストレス及びTRPV4活性剤により細胞死も、ヘミチャネル阻害によって抑えられた。従って、ヘミチャネルの活性化は酸化ストレス及びTRPV4活性剤による膀胱上皮細胞のATPの放出及び細胞傷害に重要な役割を果たすことが明らかになった。

(4) マウスの腹腔内にCYPを注入し膀胱炎モデルを作成し、膀胱の機能及び病理的な変化を検討した。CYPを用いた膀胱炎モデルにおいては、膀胱重量の増加、膀胱粘膜下から外膜にかけての出血・水腫及び炎症細胞の浸潤が認められた。Western Blottingによる解析ではCx43タンパク、炎症メディエーター及びタンパク質のカルボニル化が著しく増加した。機能的には、膀胱炎惹起により、膀胱の容量が低下し、排尿回数が増加した。コネキシンヘミチャネルを含む多チャンネルインヒビターであるCBXを膀胱炎惹起の前に腹腔内に投与することで、病理及び機能的な変化が著しく改善した。

以上、膀胱上皮細胞のヘミチャネルが様々の刺激によって活性化され、膀胱細胞の機能障害に関わっていることを明らかにした。ヘミチャネルの抑制を有する多チャンネル阻害剤は、CYP誘発膀胱炎モデルの膀胱機能障害の改善作用を有することが基礎的に明らかとなり、膀胱機能障害の発現機序にヘミチャネルが関与する可能性が示唆された。

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7件)

Zhang X, Gao S, Tanaka M, Zhang Z, Huang Y, Mitsui T, Kamiyama M, Koizumi S, Fan J, Takeda M, Yao J: Carbenoxolone inhibits TRPV4

channel-initiated oxidative urothelial injury and ameliorates cyclophosphamide-induced bladder dysfunction. *J Cell Mol Med*, 査読有, 2017 (in press)
doi: 10.1111/jcmm.13100.

Zhang Z, Zhang X, Fang X, Niimi M, Huang Y, Piao H, Gao S, Fan J, Yao J: Glutathione inhibits antibody and complement-mediated immunologic cell injury via multiple mechanisms. *Redox Biol*, 査読有, Vol. 12, 2017, pp. 571-581
doi:10.1016/j.redox.2017.03.030

Chi Y, Zhang X, Zhang Z, Mitsui T, Kamiyama M, Takeda M, Yao J: Connexin43 hemichannels contributes to the disassembly of cell junctions through modulation of intracellular oxidative status. *Redox Biol*, 査読有, Vol. 9, 2016, pp. 198-209
doi: 10.1016/j.redox.2016.08.008,

Piao H, Chi Y, Zhang X, Zhang Z, Gao K, Niimi M, Kamiyama M, Zhang J, Takeda M, Yao J: Suramin inhibits antibody binding to cell surface antigens and disrupts complement-mediated mesangial cell lysis. *J Pharmacol Sci*, 査読有, 2016, Vol. 132, No. 4, pp. 224-234
doi: 10.1016/j.jphs.2016.03.011,

Zhang X, Yao J, Gao K, Chi Y, Mitsui T, Ihara T, Sawada N, Kamiyama M, Fan J, Takeda M: AMPK suppresses connexin43 expression in the bladder and ameliorates voiding dysfunction

in cyclophosphamide-induced mouse cystitis. *Sci Rep*, 査読有, Vol. 6, 2016, pp. 19708
doi: 10.1038/srep19708.

Li G, Gao K, Chi Y, Zhang X, Mitsui T, Yao J, Takeda M: Upregulation of connexin43 contributes to PX-12-induced oxidative cell death. *Tumor Biol*, 査読有, Vol. 37, No. 6, 2016, pp. 7535-7546
doi: 10.1007/s13277-015-4620-7

Gao K, Chi Y, Zhang X, Zhang H, Li G, Sun W, Takeda M, Yao J. A novel TXNIP-based mechanism for Cx43-mediated regulation of oxidative drug injury. *J Cell Mol Med*, 査読有, Vol. 19, No. 10, 2015, pp. 2469-2480.
doi: 10.1111/jcmm.12641,

[学会発表](計4件)

Xiling Zhang, Manabu Kamiyama, Zhen Zhang, Yanru Huang, Shan Gao, Xin Fang, Masayuki Takeda, Jian Yao. Connexin43 channel contributes to TRPV4 activation-elicited oxidative cell injury. 第39会日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2016年11月30日~2016年12月02日

Yanru Huang, Xiling Zhang, Zhen Zhang, Shan Gao, Xin Fang, Jian Yao. Pannexin channels contribute to air exposure-elicited oxidative injury in bronchial epithelial cells. 第39会日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2016年11月30日~2016年12月02日

姚 建: Pathophysiological roles of gap junction-mediated intercellular communication in kidney, 第38回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 2015年12月01日~2015年12月04日 Zhang X,

Yao J, Ihara T, Sawada N, Mitsui T, Takeda M: AMP-activated protein kinase suppresses connexin43 in bladder smooth muscle cells and ameliorates voiding dysfunction in cyclophosphamide-induced mouse cystitis. ICS2015 (International Continence society), Conventional Center (Montreal, Canada), 2015年10月06日~2015年10月09日

[その他]

ホームページ等

山梨大学 研究者総覧

http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_DisplInfo.Scholar/3_76/81EDF77BA86C42ED.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

神家満 学 (KAMIYAMA, Manabu)

山梨大学・総合研究部・講師

研究者番号 : 9 0 3 6 2 0 6 1

(2)研究分担者

姚 建 (YAO, Jian)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号 : 5 0 3 0 3 1 2 8

(3)連携研究者

澤田 智史 (SAWADA, Norifumi)

山梨大学・総合研究部・講師

研究者番号 : 7 0 4 0 2 0 5 5

羽根田 破 (HANEDA, Yaburu)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号 : 2 0 4 0 2 0 6 8

(2014年6月30日まで連携研究者)

武田 正之 (TAKEDA, Masayuki)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号 : 8 0 1 9 7 3 1 8