

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462445

研究課題名(和文) 下部尿路における平滑筋の新規収縮弛緩調節機構の解明とその臨床応用

研究課題名(英文) The investigation into the novel smooth muscle contraction-relaxation mechanism of lower urinary tract and its clinical application

研究代表者

梶岡 俊一 (Kajioka, Shunichi)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：90274472

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)：本研究は、3つの大きな目標を掲げていた。一つ目は、新規cAMP関連蛋白であるEpacのCa感受性を、ヒト膀胱排尿平滑筋を用いた膜脱膜化標本で調べた。収縮張力に対して、Epac選択的cAMPである8-pCPT-2'-O-Me-cAMPは、弱い弛緩作用しか示さなかった。二つ目は、トロポニンシステムをTgマウスを作成し、平滑筋で構築する計画であったが、うまく奏功せず作成を断念した。三つ目は、尿道平滑筋の、細胞外Ca濃度依存性の収縮聴力の発生について検討した。この細胞外Ca濃度依存性の収縮張力は、温度依存性も有し、37℃付近で最大張力を発生することがわかった

研究成果の概要(英文)：This study was aiming at three main targets. Firstly, the contribution of Exchange Protein directly Activated by cAMP (Epac) has been investigated to Ca sensitization of detrusor smooth muscle. In alpha-toxin treated skinned muscle fiber used human detrusor smooth muscle, Epac selective agonist, 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP induced little relaxation in the contraction strip induced by 1 micromolar intracellular Ca. On the other hand, PKA selective cAMP, 6-Bnz-cAMP remarkably induced relaxation by approximately 50%. Taken together, cAMP-induced relaxation in human detrusor was mainly via PKA downstream but not via Epac system. Secondly, the troponin system had been tried to set up in smooth muscle. However, this project had not been successful due to the difficulty of designing transgenic mouse. The final project was to reveal the extracellular Ca and temperature dependency of contraction of urethral smooth muscle. The maximum tension force was obtained at 5mM [Ca]_{out} and 37 degrees Celsius.

研究分野：排尿機能生理学

キーワード：過活動膀胱 低活動膀胱 下部尿路症状

1. 研究開始当初の背景

下部尿路では、蓄尿時には膀胱は弛緩し、尿道は収縮し、排尿時には膀胱は収縮し、尿道は弛緩するといった巧妙な協調運動によって機能を発揮する。ゆえにその機能が障害されたり不全に陥った場合の治療は、特に薬物治療となると、ターゲットとなる神経や平滑筋に対して、興奮と同時に抑制というまったく逆の作用を同時に発揮させなければならないので、非常に困難である。本邦では、この領域では、確かに前立腺肥大症治療薬の $\alpha 1$ ブロッカー、過活動膀胱治療薬の各種抗コリン薬、最近では $\beta 3$ ブロッカーと、世界に先駆けてこの領域の治療薬が開発されて、治療成果をあげている一方で、薬剤による効果が得られない難治性の患者、副作用が強くでて薬剤が服用できない患者も少なくない。故に、膀胱排尿筋と尿道括約筋の各々の収縮弛緩機構の特徴を明らかにし、包括的に検討して、その相違点を見いだすことにあった。

2. 研究の目的

下部尿路平滑筋の特徴として、蓄尿時には、膀胱排尿筋は弛緩し、尿道平滑筋は収縮をしているのに対し、排尿時には、膀胱排尿筋は収縮し、尿道平滑筋は弛緩するといった相反する作業を協調的に行わなければならない。しかも、時間的には1日でも蓄尿時間は、99.7~99.8%、排尿時間は0.2~0.3%と各々の収縮と弛緩の占有時間が圧倒的に異なる。神経学的にも神経支配や、神経伝達物質は異なるのであろうが、排尿筋と尿道平滑筋の収縮弛緩機構に特徴があることは多いに予想されることである。今回は、この膀胱排尿筋と尿道平滑筋の収縮弛緩機構を包括的に検討し、近年報告されているCa sensing receptorやEpacを中心として、その各々の筋の特徴を明らかにし、新たな機序を有する治療薬開発の端緒としたいと考えている。

3. 研究の方法

(1)材料

ヒト膀胱排尿筋

膀胱癌などにより膀胱摘出術を施行した患者より同意を得て提供された。九州大学病院倫理審査委員会承認済み

ブタ膀胱排尿筋

福岡食肉より購入

トロポニンI,及びCを組み込んだ平滑筋組織を有するTgマウスの作成

(2)実験方法

分子生物学的手法及び免疫組織化学

(i)RT-PCR法及びrealtime RT-PCR法

(ii)Western Blotting法

平滑筋の心筋型トロポニンのT,I,Cのサブユニット、あるいは平滑筋特異的な収縮関連蛋白であるカルデスモンやカルポニンの発現

の確認に適用

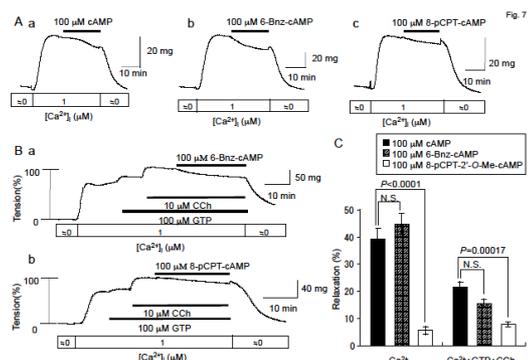
電気生理学的手法

等尺性収縮張力の測定及び膜脱膜化標本の作製

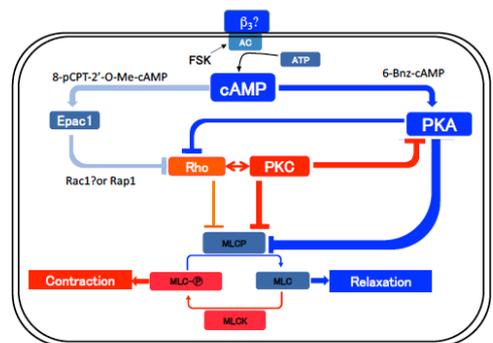
ヒト膀胱排尿筋、ブタ膀胱排尿筋、マウス膀胱排尿筋に適用した。膜脱膜化標本は、 α -toxin、を用いて標本を作製した。

4. 研究成果

(1)新規cAMP関連蛋白Epacの排尿平滑筋における役割



・上記図のように、ヒト膀胱排尿筋による細



→ : Agonistic action
—| : Inhibitory action

胞内でのcAMPの弛緩作用は、EpacよりもプロテインキナーゼAを主に介していることがわかった。

・cAMPはRhoキナーゼ活性化と拮抗作用を有するが、PKC活性化とは拮抗しなかった。

(2)ヒト膀胱排尿平滑筋のトロポニンサブユニットの包括的検討

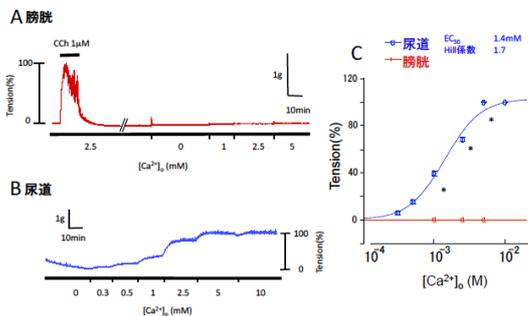
トロポニンとは、トロポニンT、I、Cのサブユニット3量体から形成され、各々に心筋型、骨格筋速筋型、骨格筋遅筋型がある(トロポニンCでは心筋型と骨格筋遅筋型を共有)ので、現在までに計8種類のサブユニットが報告されている。今までの研究で、平滑筋にも、心筋タイプのトロポニンが発現していることを確認したので、残りのTnI, TnTを発現させて、平滑筋でのトロポニンシステムの構築

を、Tg マウスを作成し検討したが、胎生期までの発現は、確認できたが、出生後は消失してしまい、何らかの強力なサプレッサーが出生時に遺伝子レベルで働いているものと思われた。

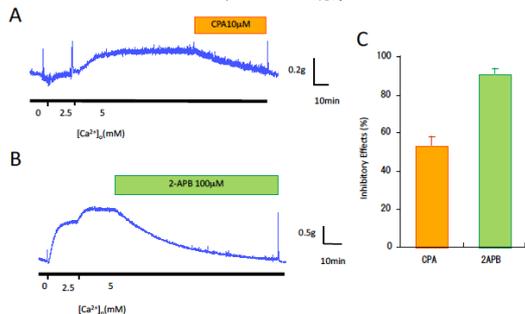
ヒト尿道平滑筋の細胞外 Ca²⁺濃度依存性の収縮能力の発生について

尿道平滑筋の細胞外 Ca²⁺濃度 5mM のときの収縮張力に対する N 型 Ca²⁺チャネル阻害薬である ω -conotoxin(1 μ M)、T 型 Ca²⁺チャネル阻害薬である mibefradil(10 μ M) による抑制はほとんど認められなかった。L 型 Ca²⁺チャネル阻害薬である nifedipine(10 μ M)、Ca²⁺活性化 Cl⁻チャネル阻害薬である niflumic acid(30 μ M)はこの収縮反応を完全ではないが 26.9 \pm 3.5%、22.0 \pm 4.7% (n = 12-13)に各々よく抑制した。

非脱膜化標本における細胞外 Ca²⁺濃度変化に対する反応

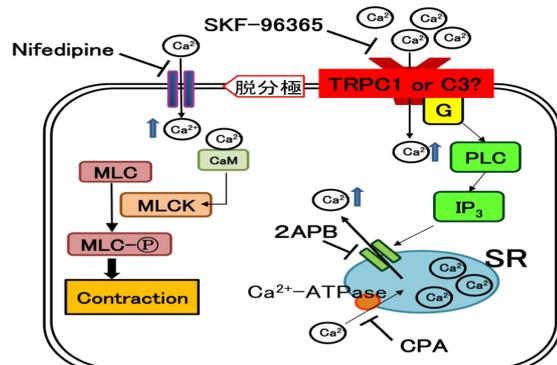
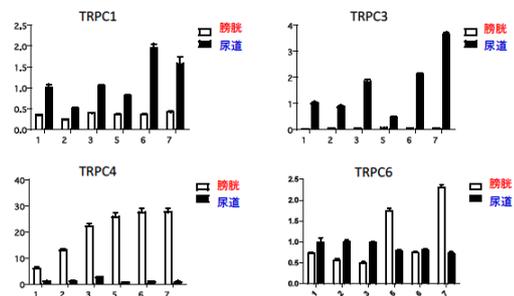


尿道平滑筋における Ca²⁺ストア関連薬剤 CPA, 2-APB の効果



Ca²⁺ストア関連薬剤である SKF96365(30 μ M)、CPA(10 μ M)、2-APB(100 μ M)は 5mM の細胞外 Ca²⁺による収縮張力をそれぞれ 65.7 \pm 4.2%、49.3 \pm 5.3%、20.7 \pm 3.7% (n = 7-10)に抑制し、10 μ M CPA と 10 mM caffeine を合わせて添加すると完全に抑えられた。(上図参照)

膀胱排尿筋・尿道平滑筋におけるTRPC channel の発現状況 (Q-PCR法)



Q-PCR 法では、細胞外カルシウム感知機構は、候補として、揚げた Ca sensing receptor や GPCR6A などは、選択的なアゴニスト、アンタゴニストが反応せず、候補として否定的である。しかしながら、Q-PCR 法で膀胱と比較して有意に遺伝子レベルで発現していた TRPC1 及び TRPC3 channel は、尿道の細胞外カルシウム感知機構としての可能性を秘めている。現在は、細胞外カルシウムのみならず、温度に対しても、収縮機構が反応することから、thermal biology も視野に入れた、広い範囲で、この尿道の細胞外カルシウム感知機構を明らかにしていきたいと考えている。

4.まとめ

本研究において、新規 cAMP 関連蛋白である exchange protein directly activated by cAMP (Epac)は、膀胱の収縮弛緩機構においては、主たる役割を果たしておらず cAMP は PKA を介して、弛緩を導いていることが明らかとなった。しかしながら、病理学の見地から見てみると、Epac は膀胱上皮には正常に発現しているのに対し、膀胱上皮がんには有意にその発現が少ないことがわかった。現在この、現象を検証しつつ、そのメカニズムを明らかにして、膀胱がんの治療の礎としたいと考えている。トロポニンシステムの平滑筋のでの構築は奏功しなかったが、未だに釈然としない、平滑筋の収縮関連蛋白である、カルデスモンやカルポニンなどの平滑筋に特徴的な蛋白の収縮弛緩機構における役割

を明らかにしていきたいと考えている。また、尿道において発見した細胞外カルシウム感知機構は、本研究の期間では明らかにできなかったが、諸平滑筋臓器にもこのシステムがあることを発見したので、今後は、包括的に検討していくことで、平滑筋の細胞外カルシウム感知機構を明らかにしていきたいと考えている。

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6件)

Morishita H, Iwata N, Takai C, Mochizuki N, Kaji N, Hori M, Kajioka S, Nakayama S. Micro-Coordination of Pacemaker Potentials in the Intestine of the Mouse. *Gastroenterology*. 2017 Jun;152(8):1831-1833. (査読有)

Shiota M, Fujimoto N, Itsumi M, Takeuchi A, Inokuchi J, Tatsugami K, Yokomizo A, Kajioka S, Uchiumi T, Eto M. Gene polymorphisms in antioxidant enzymes correlate with the efficacy of androgen-deprivation therapy for prostate cancer with implications of oxidative stress. *Ann Oncol*. 2017 Mar 1;28(3):569-575. (査読有)

Lee K, Mitsui R, Kajioka S, Naito S, Hashitani H. Role of PTHrP and Sensory Nerve Peptides in Regulating Contractility of Muscularis Mucosae and Detrusor Smooth Muscle in the Guinea Pig Bladder. *J Urol*. 2016 196(4):1287-1294. Itsumi M, Shiota M, Takeuchi A, Kashiwagi E, Inokuchi J, Tatsugami K, Kajioka S, Uchiumi T, Naito S, Eto M, Yokomizo A. Equol inhibits prostate cancer growth through degradation of androgen receptor by S-phase kinase-associated protein 2. *Cancer Sci*. 2016 Jul;107(7):1022-8. (査読有)

Yoshimoto S, Morita H, Matsubara R, Mitsuyasu T, Imai Y, Kajioka S, Yoneda M, Ito Y, Hirofujii T, Nakamura S, Hirata M. Surface vacuolar ATPase in ameloblastoma contributes to tumor invasion of the jaw bone. *Int J Oncol*. 2016 Mar;48(3):1258-70. (査読有)

Hayashi M, Kajioka S, Itsumi M, Takahashi R, Shahab N, Ishigami T, Takeda M, Masuda N, Yamaguchi A, Naito S. Actions of cAMP on calcium sensitization in human detrusor smooth muscle contraction. *BJU Int*. 2016 Jan;117(1):179-91. (査読有)

[学会発表](計19件)

李 賢、梶岡俊一、牧 知子、高橋良輔、江藤正俊、ヒト膀胱平滑筋における冷却刺激による収縮機構. 第94回日本生理学会大会 2017年3月 浜松

Kajioka S, Maki T, Lee K, Takahashi R, Eto M, Does TRP channel play a role in cooling-induced contraction of human detrusor smooth muscle? 32st Annual EAU Congress 2017 London

Lee K, Isogai A, Mitsui R, Kajioka S, Eto M, Hashitani H, Functional coupling of TRPV4 channels and BK channels in regulating detrusor spontaneous contractions in the guinea-pig bladder. 46th Annual Meeting International Continence Society 2016 Tokyo

高橋良輔、木元康介、梶岡俊一、李 賢、牧 知子、江藤正俊、排尿筋過活動から排尿筋低活動へ - 経尿道的括約筋切開術の術後経過 - . 第23回日本排尿機能学会 2016年12月 東京

Tatsugami K, Inokuchi J, kiyoshima K Takahashi R, Kajioka S, Yokomizo A, Naito S, The influence of tumor location on postoperative renal function after laparoscopic partial nephrectomy. 33rd World Congress of Endourology meeting 2016 London

Itsumi M, Shiota M, Takeuchi A, Kashiwagi E, Inokuchi J, Tatsugami K Kajioka S, Uchiumi T, Naito S, Yokomizo A, Eto M, Serotonin receptor antagonist inhibits prostate cancer progression. 第75回日本癌学会学術総会 2016年10月 横浜

牧 知子、梶岡俊一、李 賢、高橋良輔、江藤正俊、An extracellular calcium induces tension force development in pig urethral smooth muscle but not in detrusor. 第93回日本生理学会大会 2016年3月 札幌

Kajioka S, Hayashi M, Takahashi R, Maki T, Namitome R, Naito S, novel extracellular calcium-sensing system in pig urethral smooth muscle cells. 45th Annual Meeting International Continence Society 2015, Montreal, Canada

林 摩耶、梶岡俊一、高橋良輔、内藤誠二、ブタ尿道平滑筋における細胞外 Ca²⁺ 感知機能についての検討。第 22 回日本排尿機能学会 2015 年 10 月 札幌

逸見百江、塩田真己、武内在雄、柏木英志、猪口淳一、立神勝則、梶岡俊一、内海健、内藤誠二、横溝 晃、エクオールは Skp2 を介したアンドロゲン受容体の分解を促進することで前立腺がんにおける細胞増殖を抑制する。第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 名古屋

林 摩耶、梶岡俊一、高橋良輔、尾畑紘史、内藤誠二、尿道平滑筋持続収縮に対する Ca²⁺感受性の関与。第 103 回日本泌尿器科学会総会 2015 年 4 月 金沢 石川

高橋良輔、梶岡俊一、内藤誠二、膀胱平滑筋の細胞内情報伝達の立場から。第 103 回日本泌尿器科学会総会 2015 年 4 月 金沢 石川

尾畑紘史、高橋良輔、柚木貴和、友田稔久、梶岡俊一、林摩耶、内藤誠二、夜間頻尿に対するメラトニン受容体アゴニストの有用性と安全性に関する研究。第 21 回日本排尿機能学会 2014 年 9 月 岡山

逸見百江、塩田真己、横溝 晃、柏木英志、武内在雄、今田憲二郎、立神勝則、猪口淳一、内海 健、梶岡俊一、内藤誠二、イソフラボンは前立腺がんのアンドロゲン受容体発現を調節することで抗腫瘍効果をもたらす。第 73 回日本癌学会学術集会 2014 年 9 月 横浜

尾畑紘史、高橋良輔、柚木貴和、友田稔久、梶岡俊一、林 摩耶、内藤誠二、夜間頻尿に対するメラトニン受容体アゴニストの有用性と安全性に関する研究。第 27 回日本老年泌尿器科学会 2014 年 6 月 山形

梶岡俊一、林 摩耶、高橋良輔、内藤誠二下部尿路平滑筋の Epac 関連蛋白の分布の検討。第 102 回日本泌尿器科学会総会 2014 年 4 月 神戸

高橋良輔、木元康介、梶岡俊一、林 摩耶、尾畑紘史、内藤誠二、オキシブチニン膀胱内注入療法を長期継続している脊髄損傷症例に関する検討。第 102 回日本泌尿器科学会総会 2014 年 4 月 神戸

高橋良輔、木元康介、梶岡俊一、林 摩耶、尾畑紘史、内藤誠二、オキシブチニン

膀胱内注入療法を長期継続している脊髄損傷症例に関する検討。第 102 回日本泌尿器科学会総会 2014 年 4 月 神戸

林 摩耶、梶岡俊一、高橋良輔、内藤誠二、ブタ膀胱排尿筋と尿道平滑筋の収縮弛緩機構の特徴を探る。第 102 回日本泌尿器科学会総会 2014 年 4 月 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶岡 俊一 (KAJIOKA SHUNICHI)

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：90274472

(2) 研究分担者

高橋 良輔 (TAKAHASHI RYOSUKE)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：30529805

松田 美穂 (ITO SHINICHI)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号：40291520

逸見 百江 (ITSUMI MOMOE)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40585809

中山 晋介 (NAKAYAMA SHINSUKE)

名古屋大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30192230