

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670705

研究課題名(和文)低活動膀胱はダウンレギュレーションなのか

研究課題名(英文)Is underactive bladder really downregulation of bladder contractility?

研究代表者

橋谷 光 (HASHITANI, Hikaru)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10315905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：排尿筋および粘膜筋板の自発収縮制御における膀胱の内在性弛緩機構の役割を調べた。伸展により排尿筋から放出されるPTHrPは粘膜筋板よりも排尿筋で強い抑制を示した。カルシウム透過性伸展活性化TRPV4チャネルは排尿筋および粘膜筋板に発現し、TRPV4からのカルシウム流入はBKチャネルを選択的に活性化して自己制御システムとして機能していることが示唆された。SKチャネル開口薬は排尿筋、粘膜筋板で活動電位の後過分極を延長したことから、SKチャネルはPDGFR陽性細胞のみならず平滑筋にも発現していると考えられた。これら内在性弛緩機構のアップレギュレーションは低活動膀胱を来しうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Role of intrinsic relaxation mechanisms of the bladder in regulating spontaneous contractility was investigated in smooth muscles of detrusor and muscularis mucosae. PTHrP, an endogenous muscle relaxant released from detrusor upon bladder wall distension, had a more pronounced inhibitory effects on spontaneous contractions of detrusor than those of muscularis mucosae. TRPV4, a Ca<sup>2+</sup>-permeable stretch-activated cation channels expressed in both detrusor and muscularis mucosae. Ca<sup>2+</sup> influx through TRPV4 appears to activate BK channels to suppress spontaneous contractions, and thus a functional coupling of TRPV4 with BK channels may act as a self-limiting mechanism for bladder contractility. SK channel openers prolonged the after-hyperpolarization in both detrusor and muscularis mucosae, indicating the SK channels expression in not only PDGFR (+) cells but also detrusor. Upregulation of these intrinsic relaxation mechanisms may result in underactive bladder.

研究分野：平滑筋生理学

キーワード：低活動膀胱 平滑筋 粘膜筋板 副甲状腺ホルモン関連ペプチド TRPV4チャネル 血小板由来成長因子受容体 SK3チャネル

## 1. 研究開始当初の背景

下部尿路症状 (LUTS) の排尿症状としての低活動膀胱に対する現状の治療法は、蓄尿症状である過活動膀胱 (OAB) に比べて極めて限定的であり、十分な有効性が得られていない。

低活動膀胱はしばしば OAB の経過中に続発し、膀胱収縮能の「疲弊」として理解される。すなわち排尿筋平滑筋や自律神経の「ダウンレギュレーション」であると考えられており、現状の薬物治療は副交感神経-排尿筋伝達を促進するコリンエステラーゼ阻害薬が中心であるが、有効性および副作用いずれにも問題がある。そうした「ダウンレギュレーション」による低活動膀胱が存在する一方で、内因性抑制系の機能亢進についても考慮する必要がある。

交感神経は排尿筋収縮を直接抑制するとされているが、実際にはヒトを含む多くの動物種では排尿筋にはほとんど分布していないことから、排尿筋平滑筋への直接的な抑制作用については懐疑的である。最近膀胱に存在する血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR) 陽性間質細胞が小コンダクタンス  $Ca^{2+}$  感受性  $K^{+}$  (SK3) チャンネルを機能的に発現し、過分極シグナルを伝達することにより排尿筋平滑筋の興奮性を抑制することが示唆されている。また我々は、排尿筋平滑筋が伸展刺激により副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) を分泌し、自己分泌により自らの収縮性を低下させることを報告した。低活動膀胱発症における、これら内因性抑制系の過剰な「アップレギュレーション」の関与を理解することを目的とする。

## 2. 研究の目的

低活動膀胱は排尿筋平滑筋や自律神経の「ダウンレギュレーション」であるとする従来の発想を 180 度転換し、内因性抑制系の「アップレギュレーション」という視点から低活動膀胱の病態機序を見直す。最近報告された膀胱収縮能に対する内因性抑制系の生理機能と病態への関与を考察する。一般に低下した情報伝達系の賦活化よりは亢進した系の抑制の方が薬理的には容易であるケースが多く、今後 LUTS 患者の増加に伴い、より重要かつ深刻な問題となる低活動膀胱治療への新たな戦略を構築するための基盤となる情報を得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞内電位記録

モルモット膀胱から排尿筋平滑筋および粘膜筋板の組織標本を作成し、細胞内電位記録法により膜電位計測を行った。SK3 チャンネル阻害薬、新鮮単離 PDGFR 陽性間質細胞では過分極を生じるが平滑筋細胞では過分極を生じないとされる SK3 チャンネル開口薬の効果調べた。また大コンダクタンス  $Ca^{2+}$  活

化 (BK) および電位依存性 (KV7) カリウムチャンネルの開口薬、阻害薬の効果も調べた。PTHrP, TRPV4 チャンネル活性化薬の膜電位変化に対する効果についても検討した。

### (2) 細胞内カルシウムイメージング

細胞内  $Ca^{2+}$  蛍光指示薬 (CaI-520) を負荷したモルモット排尿筋および粘膜筋板の組織標本において細胞内  $Ca^{2+}$  変動およびその細胞間、筋線維束間伝播を可視化した。TRPV4 活性化薬および PTHrP の自発細胞内カルシウム濃度上昇に対する効果を検討した。

### (3) 蛍光免疫染色

PDGFR 遺伝子の制御下に GFP 蛍光蛋白を発現する PDGFR -eGFP マウスを用いて SK3 抗体による免疫組織染色を行い、若年マウスと加齢マウスでの比較を行った。また膀胱壁内における PTHrP 受容体、TRPV4 チャンネルの発現について、特に排尿筋と粘膜筋板における分布の違いに着目して検討した。

### (4) 加齢マウスを用いた検討

PDGFR -eGFP マウスの若年群と加齢群において PDGFR 陽性間質細胞の分布や密度の違いを調べた。また Voided stain on paper (VSOP) 法による排尿行動解析により膀胱機能を評価し、加齢に伴う粘膜血管の形態及び機能変化についても調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 排尿筋における SK チャンネル機能

モルモット膀胱排尿筋平滑筋は自発活動電位を発生し、SK チャンネル開口薬は後過分極の持続時間を著明に延長させ、膜の過分極を生じて活動電位を消失させた。BK および KV7 カリウムチャンネル開口薬は活動電位の形状を変化させず、過分極を伴わずに活動電位を消失させた。各種カリウムチャンネル開口薬の抑制作用は対応するカリウムチャンネル阻害薬により拮抗された。

SK チャンネル開口薬が過分極を生じるのみならず後過分極を変化させたことから、SK チャンネル開口薬の作用点は PDGFR 陽性細胞に限定せず、排尿筋平滑筋にも SK チャンネルが存在すると考えられた。

### (2) 排尿筋と粘膜筋板の電気活動の比較

膀胱粘膜筋板は群発型の活動電位を発生し、SK チャンネル開口薬は後過分極の持続時間を延長させることにより単発型の活動電位に変化させた。この現象に対応して SK チャンネル開口薬により粘膜筋板の自発収縮の振幅の著減と頻度の増加が認められた。BK および電位依存性 KV7 カリウムチャンネル開口薬は過分極を生じることなく自発活動電位を消失させた。粘膜筋板においては SK チャンネルの活性化の度合いが低いことにより群発型

の自発活動電位を発生し、排尿筋よりも大きな単位断面積当りの自発収縮を発生する一因となっていると考えられた。

### (3) 排尿筋と粘膜筋板における液性および神経性制御の比較

蛍光免疫染色により、平滑筋アクチン陽性の粘膜筋板は粘膜下血管と並走して密な網目状構造を形成し、血管の少ない部位では粘膜筋板の分布も粗であることが示された。粘膜筋板と粘膜血管の位置関係から、粘膜筋板は膀胱充満時に血管が長軸方向に伸展されて血流抵抗が増加することを防ぐ機能を有することが示唆された。

モルモット排尿筋平滑筋では PTHrP 受容体の強い発現を認め、一方粘膜筋板における PTHrP 受容体発現の程度は軽度であった。この所見に一致して、PTHrP は 1nM で排尿筋平滑筋の自発収縮を抑制したが、粘膜筋板の自発収縮の抑制には 100nM を要した。この結果から、自己分泌により排尿筋収縮を抑制する PTHrP は粘膜筋板の収縮性には影響を及ぼさないと考えられた。排尿筋および粘膜筋板いずれにおいても PTHrP (100nM) は自発活動電位および細胞内カルシウム濃度上昇を抑制した。またカプサイシンによる感覚神経刺激により、排尿筋では自発収縮増強を、一方粘膜筋板では自発収縮抑制を生じた。粘膜筋板におけるカプサイシン誘発収縮抑制は CGRP 受容体阻害薬により拮抗され、また外因性 CGRP による自発収縮抑制も CGRP 受容体阻害薬により拮抗された。

### (4) TRPV4-BK チャネルの機能連関

伸展により活性化される  $Ca^{2+}$ 透過性チャネルである TRPV4 の活性化薬はモルモット膀胱排尿筋および粘膜筋板において持続的な収縮を生じるとともに自発収縮を消失させた。自発収縮は BK チャネル阻害薬により回復したが SK チャネル阻害薬では回復せず、TRPV4 チャネルを介した  $Ca^{2+}$ 流入は選択的に BK チャネルを活性化して自発収縮を抑制することが示唆された。TRPV4 の活性化薬は自発細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇を消失させた後に持続的な  $Ca^{2+}$ 濃度上昇を生じ、また自発活動電位を消失させた後に過分極を引き起こした。BK チャネル阻害薬により過分極がキャンセルされ自発活動電位が回復し、また自発  $Ca^{2+}$ 上昇も回復したことから TRPV4-BK チャネルの機能的連関が確認された。この機構は蓄尿に伴う膀胱伸展時に、自己分泌により排尿筋を弛緩させる PTHrP とともに蓄尿機能の維持に関与していると考えられた。

### (5) 加齢マウスにおける粘膜血管および PDGFR 陽性間質細胞の変化

加齢マウスでは頻尿と一回排尿量減少を認め、粘膜下細静脈における自発収縮振幅の低下を認めた。しかし自発一過性脱分極には

明らかな変化を認めなかったことから、自発収縮の現弱は電気現象に依存しない収縮経路の変化によると考えられた。また蛍光免疫染色によりデスミン陽性のペリサイトの増殖と被覆率の上昇を認め、血管透過性が低下していることが示唆された。

PDGFR -eGFP マウスを用いた SK3 チャネル蛍光免疫染色の結果、排尿筋層 PDGFR (+) 細胞の多くは SK3 を発現していたが粘膜下層 PDGFR (+)細胞は SK3 を発現していなかった。消化管において PDGFR (+)細胞は SK3 チャネルを発現し、自発およびプリン作動性神経刺激によるカルシウム濃度上昇に伴う過分極信号を伝播させることにより、平滑筋収縮を抑制するとされている。しかし 3 ヶ月齢と 13 および 24 ヶ月齢マウスの比較では PDGFR および SK3(+)細胞の分布や密度に変化を認めず、この細胞が加齢に伴う排尿筋収縮性の変化に関わる可能性を示唆する結果は得られなかった。

## 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9件)

van HELDEN DF, KAMIYA A, KELSEY S, LAVER DR, JOBLING P, MITSUI R, HASHITANI H. Nerve-induced responses of mouse vaginal smooth muscle. Pflugers Arch - Eur J Physiol doi:10.1007/s00424-017-1995-x.、査読有、2017.

HASHITANI H, NGUYEN MJ, NODA H, MITSUI R, HIGASHI R, OHTA K, NAKAMURA KI, LANG RJ. Interstitial cell modulation of pyeloureteric peristalsis in the mouse renal pelvis examined using FIBSEM tomography and calcium indicators. Pflugers Arch - Eur J Physiol 469:797-813.、査読有、2017.

TAKEYA M, HASHITANI H, HAYASHI H, HIGASHI R, NAKAMURA K, TAKANO M. Role of mucosa in generating spontaneous activity in the guinea pig seminal vesicle. J Physiol. doi: 10.1113/JP273872.、査読有、2017.

HASHITANI H.

'Excitation-contraction coupling in bladder smooth muscle' in 'Cell Biology', INCONTINENCE, the 6<sup>th</sup> edition 2017, Paul Abrams, Linda Cardozo, Adrian Wagg and Alan Wein (eds.), The International Consultation on Urological Diseases, pp7-21.、査読有、2017.

MITSUI R, HASHITANI H. (2017). Properties of synchronous spontaneous  $Ca^{2+}$  transients in the mural cells of rat rectal arterioles. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. doi: 10.1007/s00424-017-1978-y.、査読有、2017.

NGUYEN MJ, HASHITANI H, LANG RJ. Angiotensin receptor-1A knockout leads to hydronephrosis not associated with a loss of pyeloureteric peristalsis in the mouse renal pelvis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 43:535-542, doi: 10.1111/1440-1681.12560.、査読有、2017.

TAKAGI H, HASHITANI H. Effects of  $K^+$  channel openers on spontaneous action potentials in detrusor smooth muscle of the guinea-pig urinary bladder. *Eur J Pharmacol*. 789:179-186, doi: 10.1016/j.ejphar.2016.07.041.、査読有、2016.

ISOGAI A, LEE K, MITSUI R, HASHITANI H. Functional coupling of TRPV4 channels and BK channels in regulating spontaneous contractions of the guinea pig urinary bladder. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 468:1573-1585、doi: 10.1007/s00424-016-1863-0.、査読有、2016.

LEE K, MITSUI R, KAJIOKA S, NAITO S, HASHITANI H. Role of PTHrP and sensory nerve peptides in regulating contractility of muscularis mucosa and detrusor smooth muscle in the guinea pig bladder. *J Urol*. 196:1287-1294、doi: 10.1016/j.juro.2016.04.082.、査読有、2016.

[学会発表](計13件)

橋谷光、磯貝有優、李賢、三井烈、TRPV4チャンネルとBKチャンネルの機能的連関による膀胱収縮抑制～新たな蓄尿促進機構～、第23回日本排尿機能学会、東京国際フォーラム(東京都・千代田区)、2016年12月6日～2016年12月8日

Lee K, Isogai A, Mitsui R, Kajioka S, Eto M, Hashitani H., Functional coupling of TRPV channel and BK channel in regulating detrusor spontaneous contractions in the guinea-pig bladder. ICS2016 Tokyo(第

46回国際禁制学会)、東京国際フォーラム(東京都・千代田区)、2016年9月13日～2016年9月16日

磯貝有優、李賢、三井烈、橋谷光、モルモット膀胱におけるTRPV4チャンネルとBKチャンネルの機能的連関、第58回日本平滑筋学会総会、東北医科薬科大学(宮城県・仙台市)、2016年8月17日～2016年8月19日

Lee K, Mitsui R, Hashitani H., Properties of spontaneous activity in the muscularis mucosae of the guinea pig bladder. *European Congress of Urology (EAU) - Munich (Germany)*, 2016年3月11日～2016年3月16日

李賢、三井烈、橋谷光、梶岡俊一、関成人、膀胱排尿筋と粘膜筋板における神経性液性制御の比較特性、第8回排尿障害モデル動物研究会、グランディエールブケトーカイ(静岡県・静岡市)、2015年12月4日～2015年12月4日

李賢、三井烈、橋谷光、過活動膀胱に対する新規治療標的としての副甲状腺ホルモン関連ペプチド受容体の可能性 - 膀胱排尿筋と粘膜筋板に対する作用の相違、第22回日本排尿機能学会、京王プラザホテル札幌(北海道・札幌市)、2015年9月9日～2015年9月11日

橋谷光、ミシェル・ラム、三井烈、膀胱粘膜下血管ペリサイトの機能と形態の可視化～新たな膀胱循環障害の考え方～第22回日本排尿機能学会、京王プラザホテル札幌(北海道・札幌市)、2015年9月9日～2015年9月11日

李賢、三井烈、橋谷光、モルモット膀胱粘膜筋板の自発活動制御に対するカリウムチャンネル作動薬の効果、第57回日本平滑筋学会総会、山口大学(山口県・山口市)、2015年8月25日～2015年8月27日

Hashitani H, Pacemaker role of pericytes in generating synchronized spontaneous  $Ca^{2+}$  transients in the myenteric microvasculature of the guinea - pig gastric antrum. *Symposium on Multicellular Inputs Regulating Muscle Excitability*. Tahoe City (USA), 2015年6月14日～2015年6月17日

李賢、橋谷光、三井烈、内藤誠二、モルモット膀胱粘膜筋板における自発活動電位の特性、第103回日本泌尿器科学会総会、石川県音楽堂他(石川県・金沢市)、2015年4月18日～2015年4月21日

李賢、橋谷光、三井烈、モルモット膀胱粘膜筋板における自発活動電位の特性、第120回日本解剖学会総会・全国学

術集会、第 92 回日本生理学会大会、神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）2015 年 03 月 21 日～ 2015 年 3 月 23 日

李賢、橋谷光、三井烈、関成人、梶岡俊一、モルモット膀胱粘膜筋板における自発活動電位の特性、第 7 回排尿障害モデル研究会、グランディエール ブケトーカイ（静岡県・静岡市）2014 年 12 月 5 日～2014 年 12 月 5 日

高木裕昭、橋谷光、モルモット膀胱排尿筋の自発活動電位に対する K チャネル開口薬の作用、第 56 回日本平滑筋学会総会、新横浜プリンスホテル（神奈川県・横浜市）2014 年 8 月 6 日～2014 年 8 月 8 日

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋谷 光 (HASHITANI, Hikaru)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10315905

### (2) 研究分担者

三井 烈 (MITSUI, Retsu)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90434092

西川 信之 (NOBUYUKI, Nishikawa)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：30722748