

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861264

研究課題名(和文) P2Y受容体の膀胱における役割の解明および過活動膀胱治療標的としての可能性

研究課題名(英文) Investigation of the role in the bladder of the P2Y receptor

研究代表者

吉良 聡 (KIRA, Satoru)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：10530115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：P2Y6受容体特異的Knock outマウス(P2Y6K0マウス)と野生型マウス(WT)の下部尿路機能を比較・検討した。P2Y6K0マウスでは、代謝ケージにおける排尿行動の検討で有意に頻尿を呈していた。また、膀胱内圧測定において、有意に膀胱容量が少なく、膀胱コンプライアンスが低い結果であった。オルガンバスにおける膀胱切片を用いた各種収縮・弛緩実験において両群に差を認めなかった。これらの結果から、P2Y6受容体は排尿制御に重要な役割を果たしており、膀胱より上位の神経経路にその責任部位がある可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated lower urinary tract function of P2Y6R knockout (P2Y6K0) mice and compared to that of the wild-type mice. In micturition behaviors, P2Y6K0 mice exhibited higher voiding frequency and smaller urine volume/void. In cystometrogram study, P2Y6K0 mice had smaller bladder capacity with lower compliance. In organ bath study, there was no significant difference in contraction and/or relaxation of the bladder smooth muscles. These results suggested that the P2Y6R regulated bladder storage function.

研究分野：泌尿器科学、排尿学

キーワード：排尿障害 P2Y受容体 膀胱 知覚神経伝達 過活動膀胱

1. 研究開始当初の背景

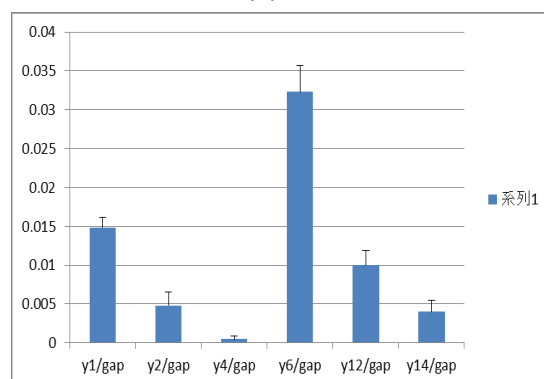
健康な状態ではヒト膀胱では、主にムスカリン性副交感神経伝達、及びアドレナリン性交感神経伝達が蓄尿時の排尿筋弛緩作用、排尿時の排尿筋収縮作用を担っている。このことから、蓄尿機能障害（過活動膀胱；40歳以上の成人の内800万人以上推定されている）に対して、膀胱に対する異常もしくは過剰な入力を防ぐ目的で、これまで膀胱に選択性の高いムスカリン受容体拮抗薬が種々開発されているが、治療効果（症状改善）・有害事象（口内、眼乾燥等）の両面において未だ満足すべき評価は得られておらず、未だ困窮している患者が多い。また、治療効果の少ない原因の1つとして以前から非アドレナリン非コリン（NANC）性の未知の物質がさまざまな病的な状態（過活動膀胱、加齢等）では膀胱平滑筋収縮・弛緩に対して関与していると示唆されていた。（Andersson et al. 2006）そこで我々は、その候補のひとつである ATP とその代謝産物などのプリン系に注目した。これまでの膀胱生理機能におけるプリン受容体の研究において、Burnstock et al が1972年に膀胱平滑筋に存在する P2X1 受容体を介した NANC 性の平滑筋収縮作用を報告して以降、積極的に P2X1 受容体に関する研究が行われており、さらに膀胱組織内に存在する求心性神経終末における P2X2/3 受容体が、膀胱における蓄尿等の感覚神経伝達機構に大きな役割を担っているとの報告がある（Cockayne et al. 2000）。前述してきたようにこれまでは、主に膀胱を始めとする下部尿路におけるプリン受容体に関して、P2X 受容体系中心とした研究が数多くなされてきた。それと比較して、プリン受容体系の内、もう一つの P2Y 受容体系に関する報告はほとんどなされていない。その先鞭となる代表的な研究として、膀胱平滑筋において P2Y 受容

体が cAMP 依存性に PKA 活性を介して筋弛緩に関与していることを示唆する報告がある。（Mcmurray G et al 1998）しかし、この報告以後、年を追うごとに計8つの存在が確認された P2Y 受容体サブタイプの内、どのサブタイプが膀胱の収縮・弛緩反応に関与しているのか、またそのことで膀胱の蓄尿、排尿という膀胱生理機能に関して中心的な役割を担っているかは未だ明らかではない。そこで我々はこの P2Y 受容体を研究の中心に置き、その膀胱組織、特に平滑筋内における役割を解明することを目的とした。本研究は、最終的に膀胱平滑筋における P2Y 受容体をターゲットとし、制御することで蓄尿・排尿障害に対する新規薬剤の開発につながる可能性を秘めている。現在の治療薬では改善しない症状を持つ患者の QOL Up につながる可能性を秘めた創薬が期待される。

2. 研究の目的

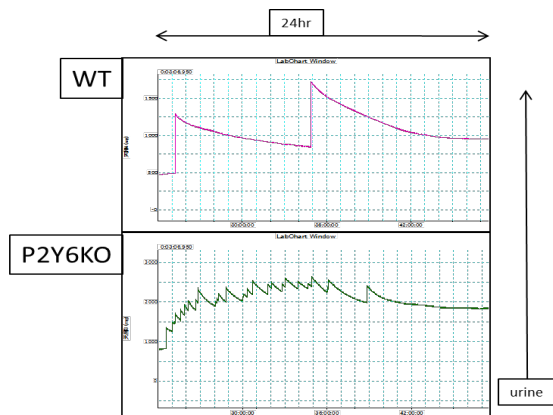
これまでの我々の研究でマウス膀胱平滑筋組織内に P2Y 受容体の各サブタイプの発現を、mRNA レベルで確認した。（図1参照）

図 1



また、このサブタイプの中で入手可能であった P2Y6 受容体を特異的に KO したマウス（P2Y6KO マウス）に関して、当講座の排尿代謝ケージにおいて、その排尿行動を調べた所、WT と比較して著しい頻尿であることを確認した。（図2参照）

図 2



今後は、発現を認めた P2Y 受容体サブタイプの内 1 つである P2Y6 受容体に着目して、膀胱組織、特に平滑筋における役割を調べていくと同時に、この P2Y6KO マウスの特異な排尿行動の解析を膀胱に視点を置いて行うことで、P2Y6 受容体の蓄尿・排尿機能における膀胱での役割を明らかにしていく。

3. 研究の方法

(1) WT マウスの膀胱を含む排尿反射経路を司る各組織における P2Y6 受容体の発現の確認

(2) Ca イメージング法における WT マウス膀胱平滑筋培養細胞内の P2Y6 受容体の機能的発現の確認

(3) WT および P2Y6KO マウスの膀胱組織切片における等尺張力実験 オルガンバス装置を用いた収縮、弛緩反応の計測

(4) 代謝ケージを用いた in situ における下部尿路機能の検討: P2Y6 受容体特異的阻害薬剤投与マウスとプラセボ投与マウスとの比較、検討

(5) Urodynamic study (Cystometry) での in vivo での下部尿路機能の検討: 除脳モデルマウスを用いた WT マウスと P2Y6KO マウスとの比較、及び薬剤投与マウスとプラセボ投与マウスとの比較・検討

4. 研究成果

(1) WT マウス各組織における P2Y6 受容体の発現の確認

WT マウスを用いて、膀胱、尿道から脊髄や

脳といった中枢神経系を含む排尿反射経路全体において、P2Y6 受容体は mRNA レベルで発現していることを確認した。また、膀胱組織を膀胱上皮、粘膜下層、筋層に分けて P2Y6 受容体の mRNA レベルでの発現を確認したところ各組織全てにその発現を確認した。

膀胱組織レベルでの本受容体の局在や蛋白レベルでの発現を確認するため、蛍光免疫染色法並びに Western Blotting 法を行うために、購入可能な P2Y6 受容体抗体を用いたところ、WT マウスのみならず P2Y6KO マウスにおいても、蛍光免疫染色法において染色の染まりを確認した。本実験の結論として、P2Y6 受容体抗体は特異性を欠いており、その局在や蛋白レベルでの発現は確認できないこととなった。

(2) Ca イメージング法における検討

マウス膀胱平滑筋培養細胞作製が非常に困難を極めたため、組織レベルでの Ca imaging 法を模索したがやはり困難であった。

(3) マウス膀胱組織切片における等尺張力実験 (オルガンバスを用いた実験)

主に WT マウス由来の組織切片と P2Y6KO マウス由来の組織切片とを用いて行った。

まずカルバコール刺激により惹起される収縮反応において、両群に差がないか調べたが有意な差を認めなかった。

次に、カルバコールを全投与して収縮させてから、b 受容体の刺激薬であるイソプレレノールと BRL37344 (b3 受容体刺激薬) を投与し、その弛緩反応を調べたが、両群に有意な差を認めなかった。これらのことから、膀胱組織における P2Y6 受容体はコリン作動性収縮および b アドレナリン作動性弛緩反応に寄与していない可能性が高いことが分かった。

(4) 代謝ケージを用いた実験

WT と P2Y6KO マウスとの間に、8-12 週齢では、行動パターンや性格の違いは認めなかった。また、P2Y6KO マウスは WT と比較して統

計学的に有意に頻尿であるが、1日飲水量や尿量は変わらないことを確認して、頻尿モデルマウスとしての可能性があることを確認した。

(5)UDSでの検討

膀胱内圧測定にてWTとP2Y6K0マウスとを比較した結果、P2Y6K0マウスでは有意に膀胱コンプライアンスが低く、膀胱容量が小さいことを確認した。また、残尿量は意義としては乏しいがWTの方が大きく、また最大排尿筋圧に有意な差がないことを確認した。

(6)まとめ

これらのIn Vitro並びにIn Vivo、ex Vivoでの結果を合わせて考察すると、P2Y6受容体が欠損することによりマウスは頻尿となり、さらに膀胱容量と膀胱コンプライアンスの低下を引き起こすことがわかった。この一連の排尿行動の異常をきたす部位としては、本研究上では膀胱のP2Y6受容体が担う可能性は低く、排尿反射経路における末梢から上位中枢神経経路におけるP2Y6受容体が担っている可能性が高いことが示唆された。

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6件)

1. Satoru Kira, Norifumi SAWADA, Tadashi Aoki, Hideki Kobayashi, Masayuki Takeda
Voiding Dysfunction Induced by Tetanus: A Case Report: Urology Case Report 2016 5:6-8 DOI:10.1016 査読有

2. Mitsuharu Yoshiyama, Tsutomu Mochizuki, Hiroshi Nakagomi, Tatsuya Miyamoto, Satoru Kira, Ryoji Mizumachi, Takaaki Sokabe, Yasunori Takayama, Makoto Tominaga
Functional roles of TRPV1 and TRPV4 in control of lower urinary tract activity: dual analysis of behavior and reflex during the micturition cycle: American Journal of Physiology Renal Physiology 2015 308(10):F1128-F1134 DOI:10.1152 査読有

3. Hidenori Zakoji, Tatsuya Miyamoto, Satoru Kira, Norifumi SAWADA, Yuko

Ohtake, Hiroshi Shimura, Takahiko Mitsui, Masayuki Takeda
Complete laparoscopic nephroureterectomy for the upper urinary tract urothelial carcinoma in a female patient with severe senile kyphosis: an initial case report: Journal of Endourology case reports 2015 1(1):56-58 DOI:10.1089 査読有

4. 小林 英樹, 羽根田 破, 大竹 裕子, 吉良 聡, 谷口 珠美, 荒木 勇雄, 武田 正之
膀胱瘤の重症度と排尿機能の関係に関する検討 日本女性骨盤底医学会誌 2015 12(1):107-110 査読無

5. Tatsuya Miyamoto, Tsutomu Mochizuki, Hiroshi Nakagomi, Satoru Kira, Masaki Watanabe, Yasunori Takayama, Yoshiro Suzuki, Schuichi KOIZUMI, Masayuki Takeda, Makoto Tominaga
Functional Role for Piezo1 in Stretch-evoked Ca²⁺ Influx and ATP Release in Urothelial Cell Cultures: The Journal of Biological Chemistry, 2014 289(23):16565-16575 DOI:10.1074 査読有

6. 小林 英樹, 羽根田 破, 大竹 裕子, 吉良 聡, 井上 千尋, 土田 孝之, 荒木 勇雄, 武田 正之
腹圧性尿失禁に対するミラベグロンの効果: 日本女性骨盤底医学会誌, 2014 11(1):106-109 査読無

[学会発表](計8件)

1. Tatsuya Ihara, Satoru Kira, Tatsuya Miyamoto, Norifumi SAWADA, Hiroshi Nakagomi, Takahiko Mitsui, Hideki Kobayashi, Mitsuharu Yoshiyama, Masayuki Takeda, Yuki NAKAMURA, Atsuhito NAKAO, Eiji SHIGETOMI, Keisuke Shibata, Youichi SHINOZAKI, Schuichi KOIZUMI
Clock genes regulate circadian rhythm of Piezo1 and TRPV4 expressions and intracellular Ca²⁺influx after stretch simulation in the cultured urothelial cells: 31st Annual EAU Congress Munich, Germany 2016/3/13

2. Takahiko Mitsui, Sachiko Tsuchiya, Norifumi SAWADA, Tatsuya Miyamoto, Hiroshi Nakagomi, Satoru Kira, Masayuki Takeda
Increased mRNA expression of connexins in the urothelium of patients with interstitial cystitis: Possible biomarkers: 31st Annual EAU Congress Munich, Germany 2016/3/13

3. Satoru Kira, Hideki Kobayashi, Yaburu Haneda, Norifumi SAWADA, Takahiko Mitsui, Masayuki Takeda

Is detrusor contraction really necessary for female micturition?: 31st Annual EAU Congress ,Munich, Germany 2016/3/12

4. 吉良 聡, 芳山 充晴, 宮本 達也, 井原 達矢, 中込 宙史, 望月 勉, 澤田 智史, 柴田 圭輔, 繁富 英治, 小泉 修一, 武田 正之

マウス膀胱平滑筋・上皮における P2Y6 受容体機能の検討 第 103 回日本泌尿器科学会総会 石川県立音楽堂(石川県金沢市) 2015/4/19

5. 吉良 聡, 芳山 充晴, 宮本 達也, 井原 達矢, 中込 宙史, 望月 勉, 柴田 圭輔, 繁富 英治, 小泉 修一, 武田 正之

P2Y6 受容体の膀胱機能に関する研究 第 21 回日本排尿機能学会 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市) 2014/9/19

6. 吉良 聡, 芳山 充晴, 宮本 達也, 中込 宙史, 望月 勉, 小泉 修一, 武田 正之

膀胱における P2Y 受容体系の発現と機能的役割に関する検討 第 102 回日本泌尿器科学会総会 神戸国際会議場(兵庫県神戸市) 2014/4/25

7. Tatsuya Miyamoto, Hiroshi Nakagomi, Tatsuya Ihara, Satoru Kira, Tsutomu Mochizuki, Makoto Tominaga, Masayuki Takeda

Inhibition of Piezo1 in bladder urothelium: A potential therapy for overactive bladder. 29th Annual EAU Congress,Stockholm 2014/4/13

8. Satoru Kira, Mitsuharu Yoshiyama, Tatsuya Miyamoto, Hiroshi Nakagomi, Tsutomu Mochizuki, Eiji SHIGETOMI, Schuichi KOIZUMI, Masayuki Takeda

Purinergic transmission via P2Y6 receptor plays an essential role in bladder storage function in mice. 29th Annual EAU Congress Stockholm 2014/4/13

〔その他〕

ホームページ等

<http://www/uro-yamanashi.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉良 聡 (KIRA, Satoru)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号: 10530115