

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20390425

研究課題名 (和文) 尿路上皮を中心とした膀胱機能調節の分子機構の研究

研究課題名 (英文) Molecular mechanism of urothelium regulating bladder function

研究代表者

西山 博之 (Hiroyuki Nishiyama)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20324642

研究成果の概要 (和文)：

本研究は尿路上皮への刺激入力により産生される物質による膀胱機能調節機構の解明を目的とした。従来中心とされてきた薬理生理学的手法に加え分子細胞生物学的方法論およびマウスの排尿行動解析を導入することで、尿路上皮の生理的役割および尿路上皮の機能異常に関連した膀胱疾患の病態を解明した。

研究成果の概要 (英文)：

In this project, we engaged in clarification of the mechanism underlying change in bladder function with the molecules secreted from urothelium under stimuli. We demonstrated the physiological role of urothelium and the clinical condition of the bladder disease related with dysfunctional urothelium with combination of conventional pharmacological analysis, molecular biological analysis and new voiding behavior analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2009 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	13,420,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：泌尿器科学

科研費の分科・細目：排尿学

キーワード：排尿障害、膀胱機能、尿路上皮、分子生物学

1. 研究開始当初の背景

膀胱の機能は尿を一定時間低圧で保持すること (蓄尿) と、排尿命令にしたがって排出すること (排尿) である。古典的な膀胱機能の概念では、尿に対するバリアーである尿路上皮と、蓄排尿機能を司る平滑筋層は別個の機能単位として捉えられており、両者間の機能的相互作用についての認識は乏しかった。しかし、近年尿路上皮が ATP の産生を通じて筋肉の収縮調節に一定の役割を果たしていることが指摘され、上皮の蓄排尿機能へ

の関与が注目を集めている。

我々は人工材料による膀胱再生モデルについて、尿路上皮が平滑筋とは全く異なる増殖因子環境を形成し、なかでも上皮が産生する bFGF が間葉系細胞に対して特異的な分化調節をもつことを示し、さらにより生理的な文脈で、bFGF は下部尿路閉塞状態で尿路上皮から産生され、筋層でのマトリクスリモデリングを誘導していることを示した。これらの知見は上皮が産生する bFGF が下部尿路閉塞患者の初期病像である収縮力増加と過活動性に paracrine シグナルとして関与している

可能性を示しており、尿路上皮と平滑筋などの間葉系組織の間には未知の膀胱機能調節メカニズムが存在し、前立腺肥大症による下部尿路閉塞や過活動膀胱など頻度の高い排尿症状の原因となっている可能性が想定される。

一方、上皮への刺激として、蓄尿による伸展刺激と炎症性サイトカインがあり、それに反応して尿路上皮が産生する物質は1)尿路上皮そのものに autocrine に作用するか、2)平滑筋や粘膜下層の線維芽細胞に paracrine に作用し、3) その一部は尿路に放出されて膀胱の病的状態のバイオマーカーとなることが予想される。

以上の背景から、以下の作業仮説を得た。

尿路上皮への刺激入力と産生物質の分子の解析により、膀胱機能の未知の調節機序を解明しうる

2. 研究の目的

本研究の特徴は、従来中心となっていた生理実験の短所を補完しうる分子細胞生物学的方法論を主軸とした還元論的膀胱機能研究である。我々は、培養膀胱細胞を用いた *in vitro* 実験系を国内でいち早く確立し国際的に独自の業績をあげるとともに、*in vivo* でも標準的な生理学的手法に加えて、遺伝子改変マウスの微量尿についての排尿解析方法を確立しており、この方向性を発展させる方法論を蓄積している。

発生における上皮-間葉相互作用は有名だが、上皮による間葉系組織の発生後の機能調節についての分子レベルの研究は少なく、本研究はこの未知の分野を新たに切り開くものである

3. 研究の方法

以下の3つの具体的検討項目を達成する。

(1) 過活動膀胱モデルにおける上皮産生増殖因子 (bFGF) の機能解析

上皮産生物質である bFGF が paracrine に平滑筋に作用し、過活動膀胱を誘導するという仮説を、培養膀胱平滑筋細胞を用いた実験系とラット下部尿路閉塞モデルを用いて解明した。さらに bFGF 徐放モデルを用いて bFGF の生体内への影響についても検討した。

さらに、

(2) 間質性膀胱炎モデルにおける尿路上皮への炎症性刺激 (TNF α) の機能解析

我々は現在、次の2つの知見を見出している。

- ① Fc γ RIIB、PD-1 ダブル KO マウス (以下 DKO マウス) では機能的膀胱容量が有意に減少している
- ② 同 DKO マウスでは、炎症性サイトカイン TNF α の発現が増加している。

以上の所見はこのモデルマウスが自己免疫性の間質性膀胱炎の所見を呈している。さらに炎症性サイトカイン TNF α が外的因子として病態を制御している可能性を示唆している。

in vivo 動物実験における排尿行動解析は前述の我々が確立した方法で行う。また、遊走細胞の起源は知られていない。我々は、骨髓移植モデルにおいて、粘膜下に多数の骨髄由来細胞の存在を報告しており、これらの細胞の誘導における chemokine の役割を同一の動物モデルで検討した。

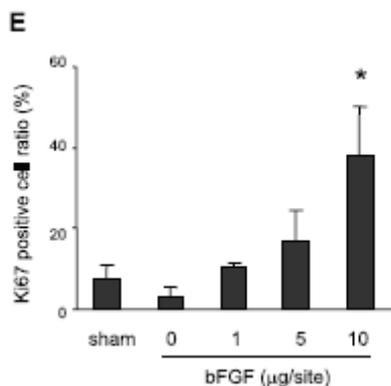
(3) 臨床検体の上皮由来物質の病態生理学的意義の解析

(1), (2) で同定された尿路上皮産生物質の尿中マーカーとしての有用性を検討する。過活動膀胱患者および間質性膀胱炎患者の尿検体を 100 例を目標に解析を行い、これらの疾患での尿路上皮の関与を臨床疫学的に検討する。

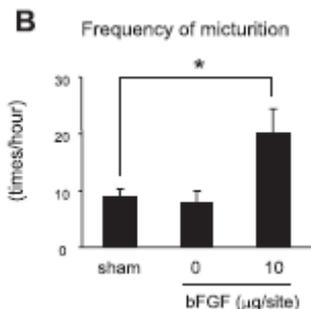
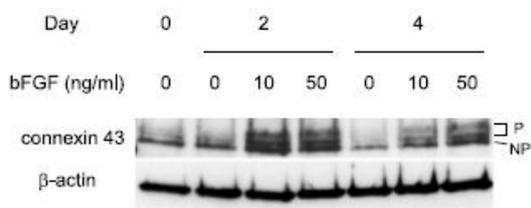
4. 研究成果

(1) 過活動膀胱モデルにおける上皮産生増殖因子 (bFGF) の機能解析

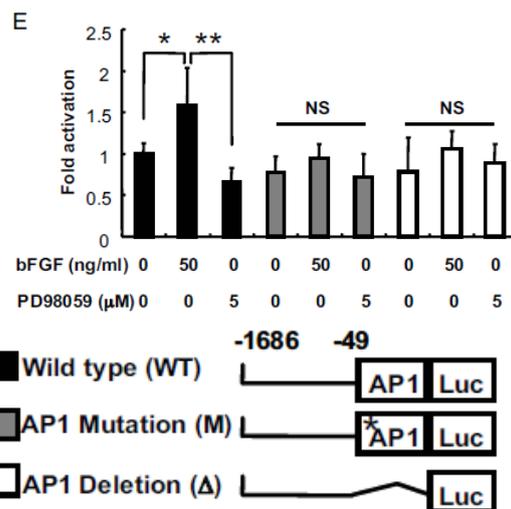
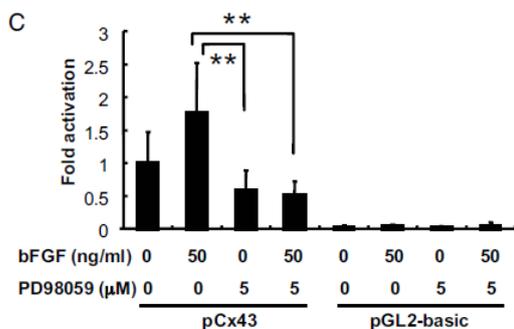
ラット下部尿路閉塞モデルは、頻尿、機能的膀胱容量の減少という過活動膀胱のモデルでもあるが、我々は本モデルの膀胱上皮で bFGF の発現が増強していることを報告している。そこで、bFGF が過活動状態の発生に果たす役割を解析するために bFGF 徐放モデルを用い、尿路上皮由来の bFGF が paracrine シグナルとして平滑筋に作用して増殖、間質の増生に関与することで、下部尿路閉塞における膀胱平滑筋の肥大および一回排尿量の減少や排尿回数の増加といった下部尿路閉塞に伴う排尿行動における変化を誘導することを証明した。



さらに、bFGF は、平滑筋の connexin43 の発現亢進を介して膀胱のアセチルコリンへの感受性の亢進を来し、さらに動物モデルにおいて頻尿および一回排尿量の減少という過活動膀胱に典型的な所見を来すことを証明した。



そして bFGF が RNA レベルで connexin43 の発現亢進に関与している事を確認した上で、ERK 経路および転写因子 AP-1 を介して connexin43 の発現調節に関与していることを証明した。



(2) 間質性膀胱炎モデルにおける尿路上皮への炎症性刺激 (TNFα) の機能解析

我々は FcγRIIB、PD-1 ダブルノックアウトマウス (以下 DKO マウス) について、尿路上皮自己抗体を有する DKO マウスが野生型マウス、あるいは尿路上皮自己抗体を有さない DKO マウスに比べて機能的膀胱容量が小さいこと (fig. 1)、さらには尿路上皮自己抗体を含む血清を投与した野生型マウスで膀胱容量が減少すること (fig. 2) をマウス排尿行動解析法で確認した。これにより DKO マウスは自己免疫による間質性膀胱炎モデルであると証明した。

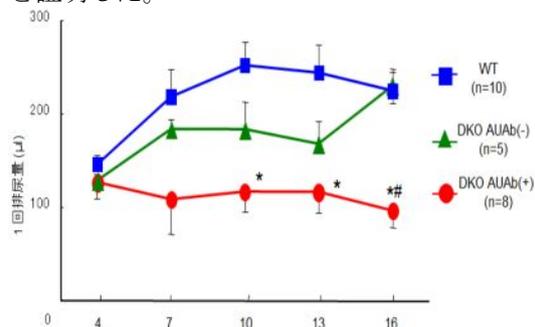


fig.1

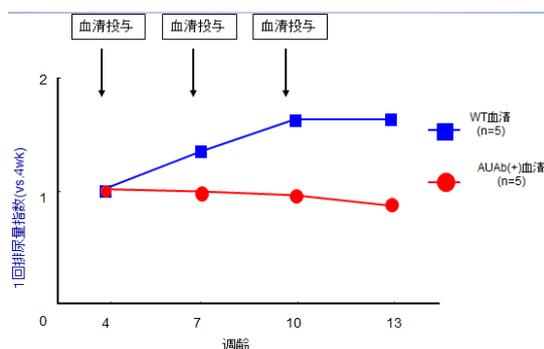


fig.2

さらにサイトカインアレイによる網羅的解析を行ったところ、尿路上皮におけるケモカイン産生性炎症刺激である TNF α の発現が膀胱で上昇していることを見いだした。このため TNF α ノックアウトマウスを入手し、排尿行動解析を施行した。以上の結果について現在解析を終了し投稿準備中である。

(3) 臨床検体の上皮由来物質の病態生理学的意義の解析

1-2) で上清から得られた情報に基づき、間質性膀胱炎および過活動膀胱患者の尿検体の解析を行い、これらの疾患での尿路上皮の関与を臨床疫学的に解明中である。

現在患者検体を継続して収集中であり、順調にその数を伸ばしている。これらの解析については今後の研究計画の範囲内となる。

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 3 件)

- ① Negoro H, Kanematsu A(2 番目), Ogawa O(8 番目) et al. (全 8 人) Regulation of Connexin 43 by Basic Fibroblast Growth Factor in the Bladder: Transcriptional and Behavioral Implications. J Urol. (185) 2398-2404, 2011 査読あり
- ② Imamura M, Kanematsu A (3 番目), Ogawa O (11 番目) et al. (全 11 人) Basic fibroblast growth factor causes urinary bladder overactivity through gap junction generation in the smooth muscle. Am J Physiol Renal Physiol (297) F46-F54, 2009 査読あり
- ③ Imamura M, Kanematsu A (2 番目), Ogawa O (8 番目) et al. (全 8 人) Basic fibroblast growth factor modulates proliferation and collagen expression in urinary bladder smooth muscle cells. Am J Physiol Renal Physiol (293) F1007-F1017, 2007 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

- ① Imamura M, Kanematsu A, Ogawa O, et al. Basic fibroblast growth factor (bFGF) promotes bladder smooth muscle cell proliferation and matrix remodeling through ERK1/2 pathway. American Urological Association annual meeting, May 2007, Anaheim California
- ② Imamura M, Kanematsu A, Ogawa O, et al.

Basic fibroblast growth factor (bFGF) could be a key regulator of matrix remodeling and hypersensitivity in obstructed bladder.

American Academy of Pediatrics annual meeting, October 2008, Boston Massachusetts

- ③ Sugino Y, Kanematsu A, Yoshimura K, Ogawa O, et al. BALB/c-Fcgr2b^{-/-}-Pdcd1^{-/-} mouse expressing anti-urothelial antibody is a model of autoimmune cystitis. American Urological Association annual meeting April 2009, Chicago
- ④ Imamura M, Kanematsu A, Ogawa O, et al. Basic fibroblast growth factor (bFGF) could be a key regulator for myogenic bladder overactivity through gap junction generation in the smooth muscle. International Continence Society annual meeting, August 2010, Toronto Ontario

[その他]

ホームページ等

<http://www.urology.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 博之 (Hiroyuki Nishiyama)

京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：20324642

(2) 研究分担者

小川 修 (Osamu Ogawa)

京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：90260611

中村 英二郎 (Eijiro Nakamura)

京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：90293878

兼松 明弘 (Akihiro Kanematsu)

京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：90437202

吉村 耕治 (Kouji Yoshimura)

京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：40397542

宗田 武 (Takeshi Soda)

京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：50422928