

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592361

研究課題名(和文) 下部尿路におけるTRPV4を介した伸展刺激による尿意のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Involvements of TRPV1 and TRPV4 channels in regulatory function to maintain bladder stability during urine storage: integrated analysis of behavior and reflex

研究代表者

望月 勉(MOCHIZUKI, Tsutomu)

山梨大学・医学工学総合研究部・医学研究員

研究者番号：50377496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：下部尿路機能異常についてTRPチャネルの関与を解明すべく、各種ノックアウトマウスを用い、様々な角度から検証を行った。排尿代謝ケージシステムを用いた実験ではTRPV4ノックアウトマウスは頻尿を呈することが明らかとなった。また除脳を施した膀胱内圧測定では野生型マウスと比べnon-voiding contraction(不随意収縮)の回数が多いことが判明した。以上の結果より、TRPチャネルは下部尿路機能、とりわけ蓄尿機能の維持に重要な働きをなしていることが示唆された。各種TRPチャネルのコントロールが今後の過活動膀胱の治療のターゲットとして期待される。

研究成果の概要(英文)：These studies using transient receptor potential vanilloid (TRPV)1-knock out (KO) mice and TRPV4-KO mice were conducted to examine functional roles of TRPV1 and TRPV4 channels in regulation of lower urinary tract activity. Analysis of voiding behavior with novel metabolic cages showed that TRPV4-KO mice have markedly higher voiding frequency and TRPV1-KO mice exhibit similar VFD. Evaluation of reflex micturition under decerebrate unanesthetized conditions using in vivo cystometrograms revealed that both TRPV1-KO and TRPV4-KO mice exhibit a large number of non-voiding bladder contractions (NVCs) whereas WT hardly show NVCs. These results suggested the possibilities that TRPV1 and TRPV4 channels are involved in modulation to stabilize detrusor activity during urine storage and that conscious TRPV4-KO mice are more vulnerable to NVCs, which are transient but repeatedly-bothering events, than TRPV1-KO mice, therefore leading to urinary incontinence more easily.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：膀胱上皮 TRPV4 ATP

### 1. 研究開始当初の背景

(1)近年、膀胱上皮は単なる防御機構としての機能のみならず、伸展刺激や侵害刺激を感知し、求心性伝達を担う役割を果たしていると考えられている。一方、transient receptor potential チャンネル (以下 TRP チャンネル) が昨今、泌尿器科領域でも注目されており、2002年 L.A.Birder らが TRPV1KO マウスが排尿異常を示す報告 (排尿筋過活動に対するカプサイシン膀胱内注入療法を裏付ける根拠となった)を提唱して以来、膀胱における TRP チャンネルの sub-family に関する研究が盛んに行われるようになってきた。

最近では thermo-TRP のひとつである TRPV4 が低浸透圧刺激や機械伸展刺激の候補とされ、TRPV4 が膀胱上皮に多く発現しているといった論文が見られるようになった。

(2)当教室では 2007 度よりマウス膀胱上皮初代培養細胞の実験系を確立させ、*in vitro* における WT マウスと TRPV4KO マウスとの比較・検討を行っており、膀胱上皮細胞が伸展刺激に対し TRPV4 を介し  $Ca^{2+}$  流入の応答を行い、ATP 放出することを JBC 誌上で発表した。

(Mochizuki T. et al, J.Biol.Chem.2009) 今回の研究では、“膀胱上皮に発現する各種 TRP チャンネルが伸展刺激でカルシウム流入を引き起こす ATP などの神経伝達物質を放出し尿意としての CNS へのシグナル伝達、さらには排尿筋への収縮・弛緩に作用” という仮説をたて、個体レベルでの排尿・蓄尿パラメータを採取し、検証を行った。

### 2. 研究の目的

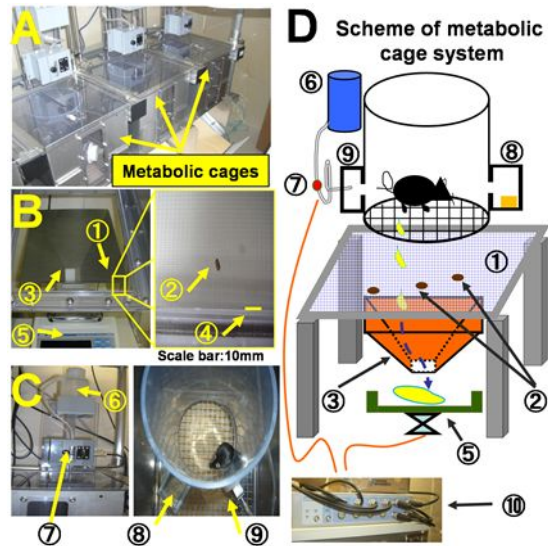
今回、新規にマウス用排尿代謝ケージシステムを構築し、1日排尿量や飲水量、1回排尿量や排尿回数などの各種パラメータを計測。これまでの *in vitro* で得られた結果が個体実験で反映されるか否かを、野生型マウスならびに各種ノックアウトマウスで比較検討する。さらに、各種マウスに除脳を施し、無麻酔下における膀胱内圧測定を実施し、下部尿路における個体間での排尿反射の違いについても検討する。これらを比較・検討することにより下部尿路における TRPV1、TRPV4 チャンネルの役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 温度・湿度を一定に保った防音室内にマウス排尿用代謝ケージを構築し、12時間ごとで明・暗が切り替わるよう設定。排尿量については精密天秤を設置し、飲水量もモニターリング。これらを72時間連続で記録。得られたデータを蓄・排尿における各種パラメータ (1日排尿量や飲水量、1回排尿量や排尿回数など) として解析する。WT と TRPV1KO および TRPV4KO マウスにおける相違について検証し、また既報の研究結果 (TRPV1KO マウス :

L.A.Birder Nature commun.2002; TRPV4KO マウス: Gevaert T. J.Clin.Inv.2007) とも比較・照合する。

( 下図 : 排尿代謝ケージシエマ )

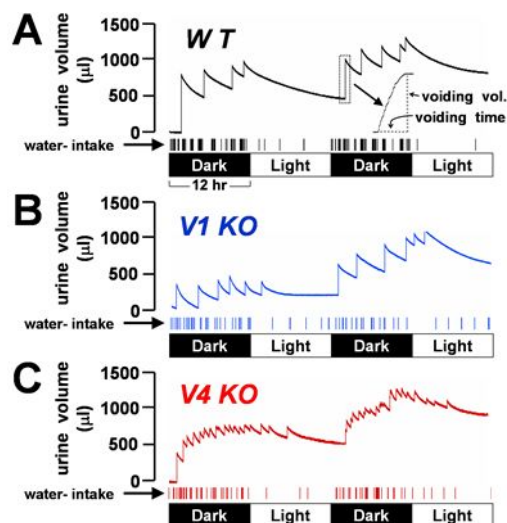


(2) 除脳モデルを用いた urodynamic study (cystometry など) 実験を行い、個体レベルでの蓄尿時における WT と TRPV4KO マウスでの差異や薬剤投与による変化も検証する。除脳を施すことにより、排尿反射は麻酔の影響を受けることなく、また、間脳レベル以上の CNS の影響もなく、正確な下部尿路の排尿反射の測定が可能となる。

### 4. 研究成果

( 1 ) 排尿代謝ケージを用いたマウスごとの各種パラメータ

排尿用代謝ケージを新規に構築し、野生型マウスならびに TRPV1 欠損マウス、TRPV4 欠損マウスでの各種排尿パラメータを採取し、3 郡間で比較検討を行った。1日飲水量は WT :  $2899 \pm 28$  ul, TRPV1KO:  $3001 \pm 18$  ul, TRPV4KO:  $3054 \pm 22$  ul であり 3 郡間に有意な差は認めなかった。1日排尿量については WT:  $1775 \pm 30$  ul, TRPV1KO:  $1790 \pm 48$  ul, TRPV4KO:  $1800 \pm 33$  ul と、同様に 3 郡間で有意差は認めなかった。一方、TRPV4KO マウスでは著明な頻尿を呈しており (TRPV4KO の排尿回数  $18 \pm 5.3$  回/day vs. WT 排尿回数  $4.9 \pm 1.3$  回/day; TRPV4KO の 1 回排尿量  $110 \pm 21$  ul vs. WT 1 回排尿量  $380 \pm 28$  ul ) TRPV4 分子の欠損が、蓄尿機能保持に影響を及ぼしていることが示唆された。一方、TRPV1KO マウスでは排尿パターンは WT に似ていたが、解析の結果、より排尿回数が多いことが分かった。以上より、TRPV4 ならびに TRPV1 は排尿行動に対し、重要な役割を担っていることが明らかとなった。( 図 1 )



(図1) 代謝ケージパラメーター

(2) TRP チャンネルは膀胱上皮のみならず、中枢神経系など、多臓器にも広く分布していることが広く知られている。そのため、CNS や麻酔の影響を受けないよう、マウスに除脳を施し、正確な下部尿路機能を CMG で評価した(図2)。評価項目として、排尿時最大圧・排尿後基底圧・排尿時間・排尿間隔時間・non-voiding contraction 回数を計測した。TRPV1 ならびに TRPV4 欠損マウスでは、野生型にくらべ、有意に non-voiding contraction の回数が多かった。(WT:  $1.1 \pm 0.3$ , TRPV4KO:  $3.2 \pm 1.4$ , TRPV1KO:  $2.9 \pm 1.4$ ) 一方、蓄尿以外(排尿パラメータ)については明らかな差を認めなかった。

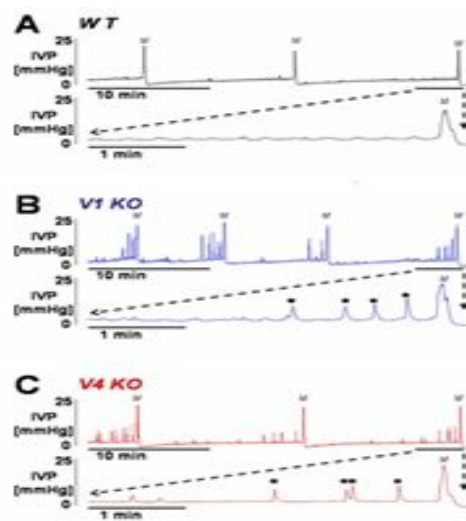
以上より、下部尿路において、TRP チャンネルが重要な蓄尿機能をコントロールしていることが明らかとなった。

#### (考察)

TRPV1、TRPV4 チャンネルは機械伸展刺激におけるメカノセンサーの候補分子である。いずれも尿路とりわけ尿路上皮に強く発現していることが知られている。本研究では、膀胱蓄尿時すなわち膀胱伸展時におけるシグナル伝達の解明を目的としていたが、当初の予想では TRPV4KO マウスでは WT に比べ、排尿間隔は延長するものと考えていた。しかしながら、実際には TRPV4KO マウスではむしろ頻

尿を呈する結果となり、伸展刺激に伴い膀胱上皮から放出された ATP が膀胱排尿筋に対し収縮させるのではなく、むしろ定期的に弛緩させる方向へ働いているのではないかと推測された。このことは今回の CMG 実験で得られた TRPV4KO マウスで non-voiding contraction が多かったこととも関連する。排尿筋に存在する P2Y レセプターへの作用により平滑筋は弛緩方向へシフトし、そのため、TRPV4KO マウスでは排尿筋レベルでの以上発火が起こり、結果として urgency phenotype を呈するのかもしれない。

本研究では下部尿路における TRP チャンネルの役割について検討を行い、特に蓄尿レベルでの関与があることを明らかとした。今後は各種 TRP チャンネルのアゴニスト・アンタゴニストを用い、過活動膀胱などの蓄尿異常疾患の解明に取り組んでいく。



(図2: 膀胱内圧測定)

#### 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. Functional role for Piezo1 in stretch-evoked  $Ca^{2+}$  influx and ATP release in urothelial cell cultures

Tatsuya Miyamoto, Tsutomu Mochizuki, Hiroshi Nakagomi, Satoru Kira, Masaki Watanabe, Yasunori Takayama, Yoshiro Suzuki, Schuichi Koizumi, Masayuki Takeda and Makoto Tominaga

J Biol Chem. 2014 Apr 23. [Epub ahead of print]

2. 膀胱上皮における TRPV チャンネルと ATP 放出メカニズム

中込宙史、望月 勉、武田正之  
排尿障害フラクティス vol.20, No.1, 7-14,  
2012 (査読有)

3.VNUT(Vesicular Nucleotide Transporter)  
を介する膀胱上皮からのATP放出メカニ  
ズム

中込宙史、望月 勉、芳山充晴、宮本達也  
吉良 聡、川原和也、荒木勇雄、小泉修一  
森山芳則、武田正之  
日本排尿機能学会誌、Vol.22(1)121、2011  
(査読有)

[学会発表](計 4件)

1.望月 勉

腎平滑筋種の1例  
第78回日本泌尿器科学会山梨地方会  
2011年11月  
山梨

2.望月 勉

新規のマウス用排尿代謝ケージ構築ならび  
に各種パラメーターについて~野生型マウ  
スとTRPV4ノックアウトマウスとの比較~  
第18回日本排尿機能学会  
2011年9月  
福井

3.Tsutomu Mochizuki

TRPV4-DEFICIENT MICE EXHIBIT INCREASED  
FREQUENCY OF VOIDING: ~EVALUATION OF  
MICTURITION BEHAVIOUR USING NOVEL  
METABOLIC CAGE SYSTEM~  
International Continence Society  
2011年9月  
イギリス

4.望月 勉

新規デバイス排尿用代謝ケージを用いた  
マウス排尿における各種パラメーターにつ  
いて~野生型マウスとTRPVノックアウトマ  
ウスとの比較~  
第99回日本泌尿器科学会総会  
2011年4月  
名古屋

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

望月 勉 (MOCHIDUKI, Tsutomu)  
山梨大学・医学工学総合研究部・医学研究  
員  
研究者番号: 50377496

(2)研究分担者

芳山 充晴 (YOSHIYAMA, Mitsuharu)  
山梨大学・医学工学総合研究部・教授  
研究者番号: 20422694

武田 正之 (TAKEDA, Masayuki)  
山梨大学・医学工学総合研究部・教授  
研究者番号: 80197318

中込 宙史 (NAKAGOMI, Hiroshi)  
山梨大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 80418714  
(平成25年度より削除)