

# 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791754

研究課題名（和文）

膀胱上皮に発現する尿意センサー分子の同定と機能解析

研究課題名（英文）

Clarification of urination sensor system of the mouse bladder epithelia

研究代表者

山田 貴博（YAMADA TAKAHIRO）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40601597

研究成果の概要（和文）：既知の尿意センサーには、1. カルシウムイオンチャネル、2. 酸感受性 という共通点がある。我々はこれらのチャネルを抑制した状態で膀胱上皮細胞に酸刺激を与えてみたところ、pH<5 の酸刺激で細胞内のカルシウム濃度が上昇し、この現象はカルシウムイオンチャネルを介した細胞外からのカルシウム流入によることが分かった。この膀胱上皮細胞の酸応答は、食道上皮細胞では観察されず、すなわち膀胱上皮細胞の酸応答機構は膀胱に特異的なものであることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Common characters of known urination sensors are calcium channels and acid sensitivity. We gave acid stimuli to the mouse bladder epithelia under the condition that these channels were inhibited completely, and found calcium concentration increase of the cell inside by the stimulation pH < 5. It was suggested that this phenomenon was caused by the calcium entry from out of cells via calcium channel(s). The bladder epithelial cell response to acid stimuli was not observed in esophagus epithelial cells, that is, these findings indicated that the response mechanism to acid is specific to bladder epithelial cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：尿意センサー、膀胱上皮細胞、カルシウムイオンチャネル、酸感受性

## 1. 研究開始当初の背景

排尿行動は、まず膀胱内の尿貯留を知覚することから始まる。すなわち、尿意である。尿貯留に伴って、膀胱の壁が伸展すると、膀胱上皮に存在する機械／化学受容器（尿意センサー）が活性化し、末梢神経にシグナルを伝えることで尿意が起こると考えられている。

こうした背景のもと、2001年に尿意センサーの候補分子としてTRPV1（Transient Receptor Potential Vanilloid type 1）が報告

されたのを皮切りに、その後TRPV4（Vanilloid type 4）、ASIC（Acid-Sensing Ion Channel）など複数の分子の関与が指摘されている。

我々は以前からこれらの候補分子に注目しながら、膀胱上皮の機能、特に尿意知覚に関する研究を行ってきた。そして我々は2009年に、これまで尿意センサーの中心として考えられていたTRPV1がマウス膀胱上皮細胞にはほとんど発現しておらず、生理学的機能が認められないことを明らかにした

(T.Yamada, Y.Ishida, S.Shimada et al. J Hystochem Cytochem.57(3):277-87 (2009)). それ以後国外の複数の研究グループが他の哺乳類でも同様の結果を報告している。これにより、TRPV1がこれまで担っていると考えられてきた生理学的機能は、別の分子の働きである可能性が浮上し、さらに我々の予備実験によって、実際に既知の候補分子だけでは説明が出来ない生理学的現象があることが明らかになった。

予備実験は、既知の尿意センサーの共通点に着目し、カルシウムイメージング法を用いて行った。既知の尿意センサーには、1. カルシウムイオンチャンネルであり、2. 酸感受性がある、という共通点があるが（逆に、これら以外に酸感受性のカルシウムイオンチャンネルはどの組織でも同定されていない）、我々は既知の尿意センサーのノックアウトマウスや拮抗薬を用いて、これらのチャンネル全てを抑制した状態で膀胱上皮細胞に酸刺激を与えてみた。すると興味深いことに、pH<5の酸刺激で細胞内のカルシウム濃度が上昇し、この現象はカルシウムイオンチャンネルを介した細胞外からのカルシウム流入によることが分かった。こうした結果は既知の尿意センサーと特徴が酷似した、未だ同定されていない新規尿意センサーの存在を示唆するものであった。

## 2. 研究の目的

我々は排尿機能、特に尿意についての研究を行っているが、膀胱上皮でこれまでに知られている分子とは別に、新規の尿意センサーが存在していることを示唆するデータを得た。

本研究は新規尿意センサー遺伝子のクローニングとその機能解析を通じて、尿意知覚機構の解明に迫ることが目的であった。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規尿意センサーのクローニング

#### ① マウス膀胱上皮細胞のcDNAライブラリーの作製

新規尿意センサーの発現クローニングに先だって、膀胱上皮細胞のcDNAライブラリーが必要となった。我々はこれまでにマウスを用いた予備実験を行っているため、cDNAライブラリー作製においても動物種はマウスを選択した。マウス数十匹から膀胱を摘出し、適切な酵素処理のもとで粘膜上皮と筋層を分けた後に、さらに酵素処理を行って膀胱上皮細胞を採取した。回収した膀胱上皮細胞から全RNAを抽出した後、mRNAの精製を行い、さらに逆転写反応を経てcDNAの精製を行った。この時点でサイズ分画を行い、500bp以下の短いcDNAを取り除き、完全長cDNAが濃縮されたライブラリー作製を目指した。その

後pCDNA3ベクターとのライゲーションを行った。

#### ② カルシウムイメージング法を用いた発現クローニング

我々の予備実験の結果から、新規尿意センサーは、酸感受性のカルシウムイオンチャンネルであることが見いだされていた。この生理学的特徴を利用し、カルシウムイメージング法を用いた発現クローニングを行った。作製したcDNAライブラリーにはおよそ $2 \times 10^6$ 程度の独立したクローンが含まれていると予想された。これらを200程度のプールに分けた後に、それぞれのプールをさらに10程度のウェルに分けてHEK293T培養細胞にトランスフェクションし、カルシウムイメージング法を用いて発現クローニングを行った。カルシウムイメージング法では酸刺激を与えた際の細胞毎の応答の大きさを観察することで、目的とする遺伝子がどのプールに含まれているのかを絞り込んでいった。また、酸刺激に既知の尿意センサーの拮抗薬を併せて使用することも検討した。このカルシウムイメージング法を用いた絞り込みを繰り返すことにより、目的とする遺伝子の同定を目指した。

#### (2) 新規尿意センサーの尿路系での発現・分布調査

クローニングされた新規尿意センサーが膀胱を含む尿路系のどこに発現しているかを明らかにすることは、その生理学的機能を議論する上で非常に重要な情報であり、mRNAレベル・タンパクレベルで発現・分布を調査する必要がある。

#### ① mRNAレベルでの組織学的分布の検証

既知の酸感受性のイオンチャンネルであるASICファミリーの膀胱上皮細胞における発現をRT-PCR法を用いて検討した。

#### ② タンパクレベルでの組織学的分布の検証

その分布パターンから情報が得られることを期待して、既存の尿意センサー特異的抗体を入手し、免疫組織化学法を用いて既知の尿意センサーの蛋白レベルでの組織学的分布を調査した。

#### (3) 新規尿意センサーの機能解析～機械受容器としての可能性の検討～

#### ① 機械受容器としての可能性の検討

尿貯留に伴う膀胱の壁伸展が機械受容器を活性化することで、尿意が発生すると考えられている。

尿意センサー遺伝子を強制発現させた培養細胞をチャンバー上で伸展させ、カルシウムイメージング法を用いて細胞内カルシウム濃度の変化を観察することで、機械受容器としての働きを検証する。

#### ② 生理学・薬理学的特徴の解析

尿意センサーがカルシウムイオンチャネル

ルとして、どのような生理学・薬理学的特徴を持っているかを調査することは、尿意知覚機構の解明にとどまらず、創薬にも関連した重要な点である。クローニングした尿意センサー遺伝子を、CHO、HEK293T細胞などの培養細胞に強制発現させ、カルシウムイメージング法を用いて、このチャネルの特徴を解析した。

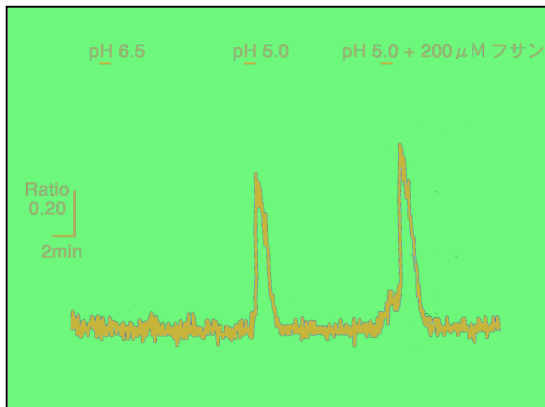
#### 4. 研究成果

排尿行動は、まず膀胱内の尿貯留を知覚することから始まる。すなわち、尿意である。

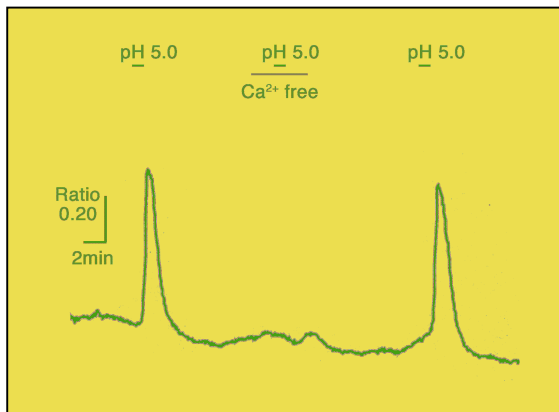
尿貯留に伴って、膀胱の壁が伸展すると、膀胱上皮に存在する機械/化学受容器（尿意センサー）が活性化し、末梢神経にシグナルを伝えることで尿意が起こると考えられている。既知の尿意センサーには、

1. カルシウムイオンチャネルであり、2. 酸感受性がある、という共通点があるが、我々はこれらのチャネルすべてを抑制した状態で膀胱上皮細胞に酸刺激を与えてみたところ、pH < 5 の酸刺激で細胞内のカルシウム濃度が上昇し、この現象はカルシウムイオンチャネルを介した細胞外からのカルシウム流入によることが分かった。

A



B

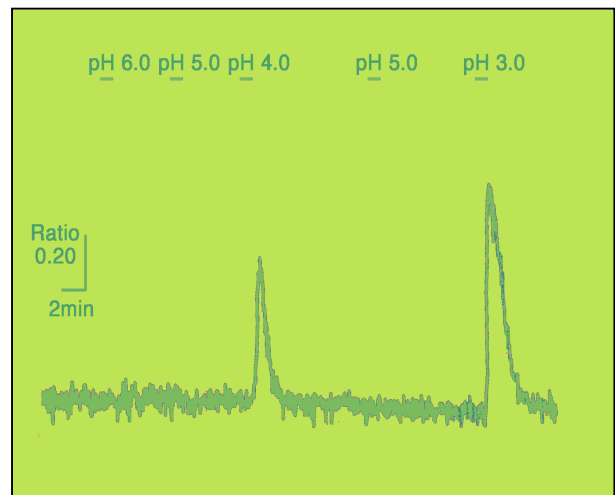


#### 図1. <我々の実験データ>

TRPV1ノックアウトマウスの膀胱上皮細胞を用いたカルシウムイメージング法

(A)TRPV1がノックアウトされた膀胱上皮細胞でもpH 5の酸刺激は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を引き起こし、これはASICの拮抗薬（フサン）を用いても抑制できない。(B)細胞外カルシウム濃度を0にすると、酸刺激に対する応答が抑制される。これらから、膀胱上皮細胞には既知の酸受容体（尿意センサーの共通した特徴）とは異なる、未知のカルシウムイオンチャネルが存在していることが伺われる。

図2



#### 図2. <我々の実験データ>

ASIC1aノックアウトマウスの膀胱上皮細胞を用いたカルシウムイメージング法

ASIC1aがノックアウトされた膀胱上皮細胞でもpH < 5の酸刺激によって細胞内カルシウムイオン濃度が上昇している。

こうした結果は既知の尿意センサーと特徴が酷似した、未だ同定されていない新規尿意センサーの存在を示唆するものであった。

膀胱上皮細胞における酸応答機構の詳細な検討を行った結果、1. 既知の酸感受性

のイオンチャネルである ASIC ファミリーの膀胱上皮細胞における発現を分子生物学的、組織学的手法を用いて検証したが、どのチャネルの発現も認められなかった。2. 膀胱上皮細胞で観察される酸応答は、他組織においても同じように見られるかを食道上皮細胞を用いて観察したところ、食道上皮細胞では pH < 3 の酸刺激で細胞内カルシウムストアを介したカルシウムシグナルが認められ、膀胱上皮細胞の応答機構は組織特異的なものである可能性が示唆された。

しかしながら今回の研究期間において発現クローニング法を用いた探索で新規尿意センサー候補のイオンチャネルを単離するには至らなかった。強制発現に用いた細胞株自身が酸応答をしたり、蛍光試薬に対する酸の影響が大きな問題であった。新規尿意センサーのクローニングには至らなかったが、我々はその性質に関して検討した。

尿意知覚機構の解明は排尿障害の病態理解の基盤となる点で非常に重要である。既知の尿意センサーと過活動膀胱や間質性膀胱炎との関連性を示した報告が最近散見されるようになってきているが、直接的な因果関係までは明らかにされていない。

新規尿意センサーの機能に関する検討は、尿意知覚機構の解明にとっても、排尿障害の病態生理の理解にとっても、非常に特色のある研究であると思われる。また、創薬のターゲットとしても十二分な可能性を秘めている。排尿調節を担う薬剤の多くは膀胱平滑筋をターゲットにしており、膀胱上皮の尿意センサーを対象とした創薬には新たな期待が持てると考えている。

## 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)

[学会発表] (計4件)

① 山田 貴博、TRPC3チャネルを介した食道上皮細胞の胆汁酸応答とGERDとの関連性、日本解剖学会、2013. 3. 30、香川大学

② 山田 貴博、STIM1が誘導するストア作動性Ca<sup>2+</sup>流入は食道上皮細胞の炎症性サイトカイン/メディエーター産生を制御する、ORIGIN神経科学研究会、2012. 9. 1、金沢大学

③ 山田 貴博、酸・胆汁酸刺激に対する食道上皮細胞の応答機構、日本解剖学会、2012. 3. 27、山梨大学

④ 山田 貴博、食道上皮細胞の酸・胆汁酸

受容とカルシウムシグナル、ORIGIN神経科学研究会、2011. 8. 20、兵庫医科大学

[図書] (計1件)

① 山田 貴博、先端医学社、分子消化器病 ASICsについて何がわかっているか、(2011)、322-327

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 貴博 (YAMADA TAKAHIRO)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40601597

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：