

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462521

研究課題名(和文) 過活動膀胱におけるKit受容体を標的とした新規分子標的治療薬の開発

研究課題名(英文) A Kit Ligand, Stem Cell Factor as a Possible Mediator Inducing Overactive Bladder

研究代表者

窪田 泰江 (Kubota, Yasue)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00381830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：消化管平滑筋の自動運動の発生には、カハール間質細胞が重要な役割を担っている。我々は同じ平滑筋細胞からなる膀胱にもこの細胞に似た間質細胞が存在し、膀胱の自動運動に係わっていると考えた。カハールの間質細胞の特徴は、c-kit遺伝子によりコードされるレセプター型チロシンキナーゼ活性をもつことである。膀胱においてもKit陽性の細胞が存在し、その役割について、免疫染色、電気生理学的手法を用いて検討した。次いで、Kit陽性間質細胞を活性化するとして、Kitのリガンドである幹細胞因子(SCF)に着目し、SCFが尿路上皮から分泌されること、過活動膀胱患者の尿中でSCF濃度が高いことを見出した。

研究成果の概要(英文)：In the gastrointestinal tract, interstitial cells of Cajal (ICCs) act as primary pacemaker cells to generate slow wave activity, and play a fundamental role in the transmission of signals from enteric neurons to smooth muscle cells. ICCs have been also identified in the urinary bladder. KIT is used as an identification marker of ICCs, and KIT-positive ICCs are located throughout the bladder wall.

They may be involved in signal transmission between smooth muscle bundles, from efferent nerves to smooth muscles, and from urothelium to afferent nerves. Not only disturbance of spontaneous contractility caused by the altered detrusor ICC signal transduction between nerves and smooth muscle cells but also disturbance of signal transduction between urothelial cells and sensory nerves via suburethelial ICC may induce overactive bladder (OAB).

The blockage of c-kit receptor may offer a new therapeutic strategy for OAB treatment, although further study will be needed.

研究分野：排尿障害

キーワード：過活動膀胱 Kit 幹細胞因子 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

超高齢化が進み、脳血管障害、糖尿病、前立腺肥大症などを基礎疾患として、頻尿・尿失禁などの下部尿路症状を呈する患者はさらに増えると予想される。わが国において、尿失禁や頻尿の原因である過活動膀胱 (OAB) 患者は 800 万人を数えている。OAB は、患者自身の QOL を損なうだけでなく、介護負担も増すことから、OAB の治療法の確立は、医学的のみならず社会的な課題である。

現在行なわれている OAB の薬物治療は、膀胱平滑筋に対する興奮性神経筋伝達を抑制するムスカリン受容体遮断薬が主体であるが、無効例や口渇などの副作用のため治療を続けられない症例が多い。最近、 α_1 刺激剤が認可され、過活動膀胱に対する選択肢が増えたが、これら 2 剤だけで本疾患すべてが解決できるとは考えにくい。また膀胱平滑筋自体の収縮を抑制する目的で、電位依存性カルシウムチャネル阻害薬やカリウムチャネル開口薬の適応も検討されてきたが、循環器系などへの副作用のため臨床応用には至っていない。このような OAB 治療の現状を考えると、OAB に対する治療法を確立するためには、初心に戻り、OAB の病態を解明する必要があると考えた。

2. 研究の目的

そこで着目したのは、膀胱と同じく自動運動を有する消化管平滑筋においては、カハールの間質細胞と呼ばれる細胞群が自発興奮の発生、伝達に重要な役割をしていることである。そしてこの細胞に似た間質細胞の存在が尿管、膀胱、前立腺で報告されており、特に膀胱平滑筋の自動運動や粘膜下層における C 線維を介したシグナル伝達に関与し、過活動膀胱の発症に中心的役割を担っている可能性が示唆されている。この間質細胞の特徴は、c-kit 遺伝子によりコードされるレセプター型チロシナーゼ活性をもつことから、治療薬の開発に応用できないかと考えた。

私たちはこれまでに、膀胱における自動運動発生機序について研究を行ってきた。特に消化管の自発興奮の発生・伝達および神経筋伝達を制御しているカハールの介在細胞 (Interstitial cells of Cajal: ICC) に着目し、膀胱においても ICC 様細胞が c-kit 遺伝子によりコードされるレセプター型チロシナーゼである Kit を発現し、細胞間情報伝達の経路、もしくは神経筋伝達の介在細胞として働いている可能性を報告してきた。

本研究助成報告では、これらの研究成果を基に尿路上皮から分泌される KIT の

リガンドである幹細胞因子 (Stem Cell Factor, SCF) に着目し、膀胱における SCF・Kit 陽性間質細胞の役割につき検討し、OAB 発症機序解明、OAB の新たな薬物治療に向けての取り組みを報告する。

3. 研究の方法

(1) モルモット膀胱組織における Kit 陽性間質細胞、Stem Cell Factor (SCF) 陽性細胞の局在の検討

間質細胞は c-kit 遺伝子によりコードされるレセプター型チロシナーゼである KIT を発現しているが、KIT を活性化するリガンドとして幹細胞因子 (Stem Cell Factor, SCF) が知られている。私たちはこの SCF を介した間質細胞の量的変化を考え、モルモット膀胱における Kit 陽性間質細胞および SCF 陽性細胞の局在を検討した。

(2) 過活動膀胱モデル動物に対する Kit 抑制因子 (メシル酸イマチニブ) および SCF の作用機序

KIT に対する抑制因子であるメシル酸イマチニブおよび KIT のリガンドである SCF の作用を調べ、OAB と KIT 陽性細胞の因果関係が確認された場合の将来的な分子標的治療のひとつの選択肢になりうるかどうか検討した。さらにモルモットを用いて下部尿路閉塞モデルを作成し、手術後 2 週目に排尿記録、膀胱内圧測定を行なった。下部尿路閉塞 OAB モデル動物に対し、膀胱内圧測定によりメシル酸イマチニブおよび SCF の影響を検討した。コントロール群でも同様に膀胱内圧測定を行ない、膀胱内圧変化のパターン、KIT 陽性細胞の分布、平滑筋機能などを比較検討した。

(3) 過活動膀胱における遺伝子多型解析

KIT 遺伝子は 4 番染色体の長腕に存在し、21 個のエクソンを含む全長 82.7kb の遺伝子である。これまでに 18 箇所に SNP が報告されている。健常者の variation が多い 2 つの SNP に着目して検討し、健常人 (n=23) および過活動膀胱患者 (n=156) のゲノム DNA を用いて real time PCR システムにより遺伝子多型 (SNP) タイピングと mutation 解析を行い、c-kit 遺伝子の遺伝子多型解析を行った。

(4) 尿中 SCF を用いた過活動膀胱診断・治療効果判定マーカーの確立

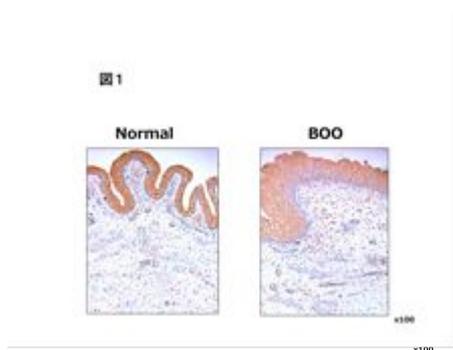
過活動膀胱患者および正常人の尿中 SCF を ELISA 法により測定し、新しい診断マーカーとしての可能性を検討した。尿中 SCF は酵素抗体法により測定した。まず健常人の尿を 10,000 g で 5 分間遠心し保存したのち、96 ウェルを持つ RayBio Human SCF ELISA kit 上に 100 μ l 滴下し抗原抗体反応させ 4 日 overnight で放置し、吸収波長の 450nm にて吸光度測定した。吸光度をもとに標準曲線を作成した。次に過活動膀胱症状のない成人男

女を母集団として本測定法をもちいて尿中 SCF を測定し、クレアチニン補正した後、平均値+2SD 以下を基準値として設定した。その上で過活動膀胱患者 (n=250) とコントロール患者 (n=200) で、尿中 SCF 値を測定した。また心因性頻尿・排尿困難などの疾患群での SCF 濃度の違いについても調べ、排尿状態や過活動膀胱の重症度との関連についても検討を加えた。

4. 研究成果

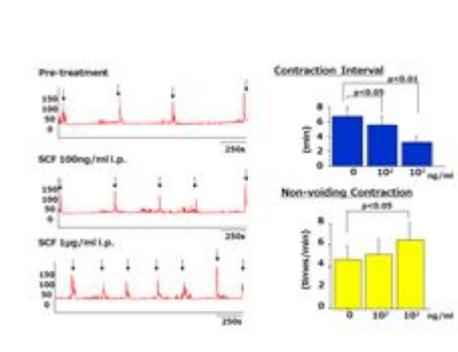
(1) モルモット膀胱における Kit および Stem Cell Factor(SCF)の発現

モルモットの膀胱において、Kit および Kit を活性化するリガンドである SCF の局在と量的変化につき検討したところ、Kit 陽性間質細胞は、膀胱粘膜下層を中心に膀胱全層に発現していた。また SCF は尿路上皮を中心に発現しており、下部尿路閉塞モデルモルモットの膀胱では発現が増加していた(下図)。



(2) 過活動膀胱モデル動物に対する Kit 抑制因子(グリベック®)および SCF の作用機序

メシル酸イマチニブ(グリベック®)は、Kit を抑制することにより元来慢性骨髄性白血病に対する治療薬として開発されたが、カハールの間質細胞由来の消化管間葉系腫瘍に対しても効果が確認されている。私たちはこの点に注目し、過活動膀胱モデル動物にグリベック(10 μ l, 100 μ l, 500 μ l)を投与したところ、排尿圧を変化させることなく、濃度依存的に non-voiding contraction を抑制し、排尿間隔を延長させることが判った。また、モルモット膀胱に SCF を投与すると non-voiding contraction が濃度依存的に増加し、排尿間隔を短縮させ、膀胱の過活動が誘発された(下図)。

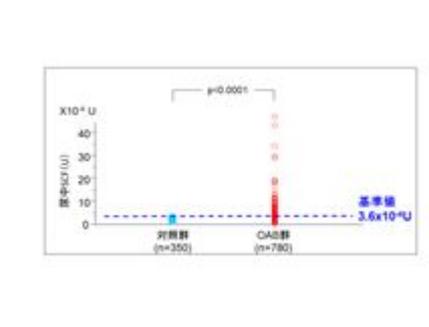


(3) 過活動膀胱における遺伝子多型解析

健常人 (n=23) および過活動膀胱患者 (n=156) のゲノム DNA を用いて c-kit 遺伝子の遺伝子多型解析を行った。健常者の variation が多い 2 つの SNP に着目して検討したところ、rs1947763 において、A から G への変異を有する患者において過活動膀胱の発症率が高い傾向が認められた。さらに症例を増やし、過活動膀胱発症との関連性につき言及できれば、過活動膀胱の病態解明に結びつく可能性が期待される。

(4) SCF を用いた過活動膀胱診断・治療効果判定マーカーの開発

尿中 SCF は酵素抗体法により測定し、吸光度をもとに標準曲線を作成した。次に過活動膀胱症状のない成人男女を母集団として本測定法をもちいて尿中 SCF を測定し、クレアチニン補正したところ、尿中 SCF はほぼ正規分布を認めた。平均値+2SD 以下を基準値として設定した。そこで過活動膀胱患者 (n=780) とコントロール患者 (n=350) で、尿中 SCF 値を測定したところ、過活動膀胱患者で優位に高値を認めた (下図)。本研究から、過活動膀胱患者において、尿路上皮からの尿中への SCF 排泄量は増加しており、尿中 SCF の測定は、過活動膀胱の診断と治療効果の簡便かつ有用な新規客観的のマーカーとなると考えられた。



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. Hamakawa Takashi, Sasaki Shoichi, Shibata Yasuhiro, Imura Makoto, Kubota Yasue, Kojima Yoshiyuki, Kohri Kenjiro. Interleukin-18 may lead to benign prostatic hyperplasia via thrombospondin-1 production in prostatic smooth muscle cells. Prostate. 査読有 May;74(6):590-601, 2014 (doi: 10.1002/pros.22773)
2. Hamamoto Shuzo, Yasui Takahiro, Okada Atsushi, Taguchi Kazumi, Kawai Noriyasu, Ando Ryosuke, Mizuno Kentaro, Kubota Yasue, Tozawa Keiichi, Kohri Kejiro: Endoscopic combined intrarenal surgery for large calculi: Simultaneous use of flexible ureteroscopy and mini-percutaneous nephrolithotomy overcomes the disadvantageous of percutaneous nephrolithotomy monotherapy. Journal of Endourology, 査読有 28:28-33, 2014 (doi: 10.1089/end.2013.0361)
3. Yasui Takahiro, Kobayashi Takahiro, Okada Atsushi, Hamamoto Shuzo, Hirose Masahito, Kubota Yasue, Umemoto Yukihiro, Kawai Noriyasu, Tozawa Keiichi, Bing Gao, Kohri Kenjiro: Long-term follow-up of nephrotoxicity in rats administered both melamine and cyanuric acid. BMC Research Notes, 査読有7:87, 2014 (doi: 10.1186/1756-0500-7-87)
4. Niimi Kazuhiro, Yasui Takahiro, Okada Atsushi, Hirose Yasuhiko, Kubota Yasue, Umemoto Yukihiro, Kawai Noriyasu, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Novel effect of the inhibitor of mitochondrial cyclophilinD activation, N-methyl-4-isoleucine cyclosporine, on renal calcium crystallization. International Journal of Urology, 査読有 2014 Jul;21(7):707-13 (doi: 10.1111/iju.12425)
5. 窪田 泰江、濱川 隆、佐々木 昌一、郡 健二郎: 膀胱瘤(膀胱脱)の手術。臨床泌尿器科、2014、68:307-312

6. 窪田 泰江、濱川 隆、佐々木 昌一: 特集:泌尿器科医のためのクリニカル・パール(2)助成泌尿器科疾患のクリニカル・パール。臨床泌尿器科、2014、68:924-928

[学会発表](計 28 件)

1. 濱川 隆、佐々木 昌一、野崎 哲史、高田 麻沙、窪田 泰江、安井 孝周: 複雑性女子尿道憩室術後に腹圧性失禁を生じた1例。第21回東海排尿障害研究会、2016.2.11、名鉄ニューグランドホテル(愛知県名古屋市)
2. 永井 隆、水野 健太郎、加藤 大貴、西尾 英紀、内木 拓、窪田 泰江、梅本 幸裕、佐々木 昌一、林 祐太郎、安井 孝周: 右公叉性精巣転位の1例。第271回日本泌尿器科学会東海地方会、2016.3.19、KDX 桜通ビル(愛知県名古屋市)
3. 窪田 泰江: 女性に多い排尿障害。第9回加齢と下部尿路疾患を考える会、2015.7.29、ANA クラウンプラザホテルグランコート名古屋(愛知県名古屋市)
4. Sasaki Shoichi, Takashi Hamakawa, Yukihiro Umemoto, Iwatsuki Shoichiro, Mizuno Kentaro, Kubota Yasue, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Incidence of overactive bladder after robot-assisted laparoscopic radical prostatectomy and assessment of the associated risk factors. The 38th ASMIUA (The 5th APPS2015/The 10th JACMHA 2015), 2015.11.4-7, Bali (Indonesia)
5. 窪田 泰江、濱川 隆、佐々木 昌一、安井 孝周: 過活動膀胱治療における服薬状況および患者の満足度に関するアンケート調査。第65回日本泌尿器科学会中部総会、2015.10.23-25、長良川国際会議場 他(岐阜県岐阜市)
6. 武田 知樹、永井 隆、梅本 幸裕、岩月 正一郎、窪田 泰江、神谷 浩行、窪田 裕樹、阪野 里花、佐々木 昌一、林 祐太郎、郡 健二郎、安井 孝周: 高度乏精子症における精子採取の検討。第65回日本泌尿器科学会中部総会、2015.10.23-25、長良川国際会議場 他(岐阜県岐阜市)
7. 濱川 隆、佐々木 昌一、高田 麻沙、窪田 泰江、河合 憲康、戸澤 啓一、郡 健二郎、安井 孝周: ロボット支援前立腺全摘除術が及ぼす夜間頻尿への影響。第22回日本排尿機能学会、2015.9.9-11、京王プラザホテル札幌(北海道札幌市)

8. Hamakawa Takashi, Sasaki Shoichi, Kubota Yasue, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Interleukin 18 may induce changes in the prostatic stromal components via thrombospondin 1 production in a newly developed rat benign prostatic hyperplasia model. ICS 2015, 2015.10.6-9, Montreal (Canada)
9. Iwatsuki Shoichiro, Sasaki Shoichi, Kubota Yasue, Kubota Hiroki, Kamiya Hiroyuki, Umemoto Yukihiro, Kohri Kenjiro: Influence of radical prostatectomy on serum bioavailable testosterone level in Japanese patients with localized prostate cancer: a longitudinal study. American Urological Association Annual Meeting 2015, 2015.5.15-19, New Orleans (USA)
10. Umemoto Yukihiro, Sasaki Shoichi, Iwatsuki Shoichiro, Kubota Yasue, Kubota Hiroki, Kamiya Hiroyuki, Hayashi Yutaro, Kohri Kenjiro: Can sperm be retrieved in men with an FSH level less than 10 mIU/mL? A study of aspermic patients with an FSH level less than 10mIU/mL. IFFS/JSRM International Meeting 2015, 2015.4.26-29, Yokohama (Japan)
11. Iwatsuki Shoichiro, Sasaki Shoichi, Kubota Yasue, Kubota Hiroki, Umemoto Yukihiro, Kohri Kenjiro: Sperm retrieval rate and sertoli cell maturity in azoospermic men with a history of cryptorchidism. IFFS/JSRM International Meeting 2015, 2015.4.26-29, Yokohama (Japan)
12. Sasaki Shoichi, Iwatsuki Shoichiro, Kubota Yasue, Kubota Hiroki, Umemoto Yukihiro, Kohri Kenjiro: Accuracy of percutaneous measurement of testicular volume using caliper in Japanese infertile men. IFFS/JSRM International Meeting 2015, 2015.4.26-29, Yokohama (Japan)
13. 梅本 幸裕, 佐々木 昌一, 窪田 裕樹, 窪田 泰江, 杉浦 真弓, 郡 健二郎: 男性不妊症患者における精索静脈瘤手術の検討。第 59 回日本生殖医学会学術講演会・総会、2014.12.4-5、京王プラザホテル (東京都新宿区)
14. 濱川 隆, 佐々木 昌一, 窪田 泰江, 林 祐太郎, 郡 健二郎: 当院における前立腺癌術後の尿失禁に対する人口尿道括約筋埋込術の経験。第 64 回日本泌尿器科学会中部総会、2014.10.17-19、アクロシティ浜松 他 (静岡県浜松市)
15. 濱川 隆, 佐々木 昌一, 柴田 泰宏, 窪田 泰江, 小島 祥敬, 郡 健二郎: ロボット支援腹腔鏡下前立腺全摘除術の OAB 発症頻度の解析とその発症に關与するリスク因子の評価。第 21 回日本排尿機能学会、2014.9.17-20、岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市)
16. 濱川 隆, 佐々木 昌一, 柴田 泰宏, 窪田 泰江, 郡 健二郎: 炎症性サイトカイン IL-18 が前立腺肥大の間質過形成を誘導する。第 158 回名古屋市立大学医学学会例会、2014.6.16、名古屋市立大学 (愛知県名古屋市)
17. Umemoto Yukihiro, Yasui Takahiro, Kubota Yasue, Hamakawa Takashi, Sasaki Shoichi, Kohri Kenjiro: The factors of urinary incontinence in robot-assisted laparoscopic radical prostatectomy. The 9th Japan-ASEAN Conference on Men's Health and Aging, 2014.5.30-6.1, Ulaanbaatar (Mongolia)
18. Iwatsuki Shoichiro, Sasaki Shoichi, Kubota Yasue, Kubota Hiroki, Kohri Kenjiro: Prevalence of sexual dysfunction in Japanese azoospermic men. The 9th Japan-ASEAN Conference on Men's Health and Aging, 2014.5.30-6.1, Ulaanbaatar (Mongolia)
19. Hamakawa Takashi, Sasaki Shoichi, Kubota Yasue, Kohri Kenjiro: Interleukin-18 may lead to stromal hyperplasia via thrombospondin-1 production in prostatic smooth muscle cells. American Urological Association Annual Meeting, 2014.5.16-21, Orlando (USA)
20. Hirose Yasuhiko, Taguchi Kazumi, Kubota Yasue, Yasui Takahiro, Kohri Kenjiro: Oxygen nano-bubble water exerts inhibitory effects on kidney stone formation by inhibiting renal tubular cell injury. AUA Annual Meeting, 2014.5.16-21, Orlando (USA)
21. 新美 和寛, 藤井 泰普, 岡田 淳志, 窪田 泰江, 郡 健二郎: ミトコンドリア cyclophilin D をターゲットとした尿路結石に対する新規治療薬と尿中バイオマーカーの開発。第 102 回日本泌尿器科学会総会、2014.4.24-27、神戸国際会議場 他 (兵庫県神戸市)
22. 安藤 亮介, 飯田 啓太郎, 恵谷 俊紀, 内木 拓, 窪田 泰江, 佐々木 昌一,

郡 健二郎：転移性腎細胞がんに対するスニチニブ治療効果と有害事象との関連。第 102 回日本泌尿器科学会総会、2014.4.24-27、神戸国際会議場 他（兵庫県神戸市）

23. 岩月 正一郎、佐々木 昌一、濱川 隆、窪田 泰江、郡 健二郎：男性不妊症診療におけるノギスを用いた精巣容量測定の正確性。第 102 回日本泌尿器科学会総会、2014.4.24-27、神戸国際会議場 他（兵庫県神戸市）
24. 梅本 幸裕、戸澤 啓一、安井 孝周、濱川 隆、岩月 正一郎、窪田 泰江、佐々木 昌一、郡 健二郎：ロボット支援腹腔鏡下前立腺全摘術における尿失禁の関連因子。第 102 回日本泌尿器科学会総会、2014.4.24-27、神戸国際会議場 他（兵庫県神戸市）
25. 濱川 隆、佐々木 昌一、岩月 正一郎、窪田 泰江、安井 孝周、郡 健二郎：ロボット支援腹腔鏡下前立腺全摘除術後の OAB 発症とそのリスク因子の評価。第 102 回日本泌尿器科学会総会、2014.4.24-27、神戸国際会議場 他（兵庫県神戸市）
26. 窪田 泰江：過活動膀胱における SCF-Kit シグナル伝達系の機能解析と新しいバイオマーカーの開発。第 14 回 AKUA 学術集会、2014.2.28、グランドプリンスホテル高輪（東京都港区）

〔図書〕(計 2 件)

1. 窪田 泰江：医学書院、今日の治療指針 2014、2014、1050-1052
2. 窪田 泰江：日本医師会、DOCTORASE、2014、2-3

〔その他〕

ホームページ等

www.med.nagoya-cu.ac.jp/uro.dir/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪田 泰江 (KUBOTA Yasue)
名古屋市立大学大学院医学研究科・講師
研究者番号：00381830

(2) 研究分担者

佐々木 昌一 (SASAKI Shoichi)
名古屋市立大学大学院医学研究科・准教授
研究者番号：50225869

濱川 隆 (HAMAKAWA Takashi)
名古屋市立大学大学院医学研究科・助教
研究者番号：40595394

柴田 泰宏 (SIBATA Yasuhiro)
名古屋市立大学大学院医学研究科・助教
研究者番号：10534745

井村 誠 (IMURA Makoto)
名古屋市立大学大学院医学研究科・研究員
研究者番号：00551269

高田 麻沙 (TAKADA Masa)
名古屋市立大学大学院医学研究科・研究員
研究者番号：60468254

郡 健二郎 (KOHRI Kenjiro)
名古屋市立大学大学・学長
研究者番号：30122047