

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11056

研究課題名（和文）尿意の発生に関与する機械刺激受容チャネルASICの包括的機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of mechanical stimulus reception channel ASIC involved in the development of desire for urination

研究代表者

柴田 泰宏（Shibata, Yasuhiro）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：10534745

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：過活動膀胱に悩む患者が多数存在する一方で、尿意を受容する機構についての全体像は未解明の部分が多い。私たちは機械刺激受容体候補遺伝子である酸感受性イオンチャネルファミリーを中心に解析を行ってきた。そのなかで、ASIC4 遺伝子が膀胱平滑筋層に発現していること、および、アフリカツメガエル卵母細胞をもちいた発現系で機械刺激の一種である浸透圧変化によってASIC4を介した流入電流が増減することを見いだした。このことからASIC4が膀胱における機械刺激受容に何らかの役割を果たしていることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化が加速している現代において、膀胱機能障害は単にADLやQOLを低下させるだけではなく、死亡率にも影響を与えることが明らかとなっている。現在の治療薬で効果が不十分な症例のため、今後膀胱機能のさらなる理解と新規治療薬の開発が求められている。本研究では機械刺激受容体候補遺伝子であるASICファミリーのうちASIC4が膀胱平滑筋に存在することを明かとし、伸展刺激受容に関与している可能性を示した。今後、今回得られた知見を膀胱の感覚入力そのものを標的とした過活動膀胱治療に対する新規の治療戦略へとつなげることが求められている。

研究成果の概要（英文）：There are many patients suffering from overactive bladder, and the overall picture of the mechanism of acceptance of urination is largely unknown. We have focused on the acid-sensitive ion channel family, which is a mechanostimulatory receptor candidate gene. Among them, the ASIC4 gene is expressed in the bladder smooth muscle layer, and the ASIC4 mediated influx current is calibrated by an osmotic pressure change, which is a kind of mechanical stimulation in the expression system using *Xenopus* oocytes. I found a thing. From this, it was speculated that ASIC4 plays a some sort of role in mechanical stimulation reception in the bladder.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：過活動膀胱 機械刺激受容体 酸感受性イオンチャネル

## 1. 研究開始当初の背景

高齢者人口の増加が加速している昨今、頻尿や尿意切迫感といった下部尿路症状を呈する患者も同様に増加傾向にある。特に、尿意切迫感を伴う病態として、過活動膀胱 (OAB: overactive bladder) と呼ばれる概念が広く知られるようになってきている。頻尿や尿意切迫感 は QOL や社会的活動度を著しく低下させる。また、夜間頻尿と高齢者の寝たきり率や死亡率には相関関係が報告されている。このように、膀胱機能障害は健康長寿にとって解決しなければならない課題である。

切迫性の尿意は、尿意の発生機序から考えて理論上は排尿筋過活動による急な膀胱排尿筋の収縮の結果と、膀胱の知覚そのものの過敏とに分類できる。しかし、現在臨床応用されている薬物は、いずれも遠心性神経/排尿筋接合部が主たる治療標的であり、治療薬の作用機序も多様化してきてはいるが、万人に満足のいく効果をあげているとは言えないのが現状である。このため、尿意発生の根本の理解と、膀胱の求心性神経を治療標的とした薬剤の開発が求められている。

また、激しい膀胱痛を主訴とする原因不明の難治性疾患として間質性膀胱炎がある。患者はほんのわずかの蓄尿量の増加で激しい膀胱痛を生じ、これを避けるために頻回にトイレに行かざるを得ない。また、間質性膀胱炎の患者は膀胱内圧が上昇すると膀胱粘膜が裂けて激痛と共に出血を生じる。これまでに生検組織を用いた様々な組織学的検討がなされ報告されているが、その病態の解明には未だ至っていないのが現状である。膀胱壁の知覚過敏や局所の免疫、サイトカインの異常が根本にあることが示唆されているが、膀胱の機械刺激受容のメカニズムの詳細が未解明であることがこの疾患の理解を妨げていると考えられる。

## 2. 研究の目的

これまでに様々な分子が膀胱において研究されてきたが、尿意の発生に直接的に関与する分子は未確定というのが一般的な見解である。その中で私たちは、機械刺激受容体候補遺伝子である ASIC (Acid Sensing Ion Channel) ファミリーを中心に解析を行ってきた。ASIC ファミリーは2回膜貫通型のイオンチャンネルであり、線虫において機械刺激受容体として同定された degenerin の哺乳類相同遺伝子であることが報告されている<sup>1)</sup> ことから、哺乳類において機

械刺激受容体候補遺伝子と考えられている。これらを詳細に検討することにより、膀胱における尿意発生のメカニズムを解明すると共に、膀胱の感覚入力そのものを標的とした新しい機序の過活動膀胱、間質性膀胱炎の治療薬開発のヒントとなる知見を得ることを目的とした

## 3. 研究の方法

本研究においては、酸感受性イオンチャンネル (ASIC) 遺伝子ファミリーのサブユニットがマウスの膀胱で機械刺激受容機能に関与している可能性を包括的に探るため、遺伝子改変動物を用いて形態学的および機能的解析を行った。

ASIC の局在の検討 現在当教室では ASIC4-ガラクトシダーゼレポーターマウスが利用可能であり、また、ASIC4 ノックインマウスを作出しつつある段階であったため、これらを材料として膀胱組織内の ASIC4 の局在を詳細に検討した。対照群として野生型マウスを使用した。

二電極膜電位固定方を用いた ASIC4 の電気生理学的解析 膀胱における ASIC4 の発現、局在、共局在する分子の検討などと平行して、ASIC4 の電気生理学的特徴についての検討を行う。具体的には、ASIC4 と MET チャンネルとの間に共通の性質があるか検討を行うため、MET チャンネルの阻害薬の1つであるガドリニウムイオンへの応答を確認するとともに、機械刺激の1つであるズリ応力に対する反応を確認する。電気生理学的解析の材料として、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を利用する。

## 4. 研究成果

### (1) 膀胱における ASIC4 蛋白質の分布

まず、ガラクトシダーゼを利用したレポーターマウスにより、ASIC4 を発現する細胞のスクリーニングを行った。ゲノム上で ASIC4 遺伝子をコードしている部分にスプライシングアクセプターおよびその下流領域にベータガラクトシダーゼを挿入した配列をノックインすることで、ASIC4 を発現している細胞で特異的にベータガラクトシダーゼを発現するマウスを作出した。このマウスを用いて内耳の薄切切片を作製し、X-gal にて発色を行うことで ASIC4 を発現する細胞を青色に標識した。その結果、膀胱筋層に ASIC4 陽性細胞を確認した。興味深いことに、生直後と比較して成獣、老齢となるにした

がって徐々に ASIC4 陽性細胞密度が低下する傾向が見られたことから、老化にともなう膀胱機能の低下に ASIC4 陽性細胞の減少が関与している可能性が示唆された。

## (2) ASIC4-tag ノックインマウスの作出

これまで、免疫組織化学に使用できる抗 ASIC4 抗体の作製を試みたが、良質の抗体は得られなかった。また、市販抗体も全て試したが、どれも満足のいく感度、特異度を示さなかった。このため、ASIC4 の正確な細胞内局在を明らかにするために ノックインマウスを作出した。得られたノックインマウスのタグの機能を確認するため western blotting 法を用いて抗体への反応性を確認したところ、抗 AU1 タグ抗体にて野生型と明確な差を認め、ノックインタグが機能している事が確認された。

## (3)2 電極膜電位固定方を用いた ASIC4 の電気生理学的解析

アフリカツメガエル卵母細胞系を用いて ASIC4 の機械刺激への感受性を検討した。低浸透圧刺激は細胞を膨張させ細胞膜に張力を発生させることから、低浸透圧刺激を機械刺激の代替として用いた。低浸透圧刺激としてスクロース浸透圧調整バッファーを使用した。また、ASIC4 による流入電流は亜鉛により阻害されることから、亜鉛感受性成分のみを ASIC4 特異的な電流として算出した。

ASIC4 の定常流入電流は、等張圧バッファーと比較して、スクロース調整低浸透圧刺激を加えた場合に増加した。この結果から、ASIC4 は機械刺激によって流入電流が増大する性質を持つことが示された。

今後、パッチクランプを用いて細胞レベルで浸透圧受容特性を検討したり、ノックアウトマウスを用いた膀胱内圧測定などの検討を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hoshikawa M, Kato A, Hojo H, Shibata Y, Kumamoto N, Watanabe M, Ugawa S	4. 巻 651
2. 論文標題 Distribution of ASIC4 transcripts in the adult wild-type mouse brain	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurosci Lett.	6. 最初と最後の頁 57-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2017.03.054.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto S, Hotta Y, Maeda K, Kataoka T, Maeda Y, Hamakawa T, Shibata Y, Sasaki S, Ugawa S, Yasui T, Kimura K.	4. 巻 135(3)
2. 論文標題 High salt loading induces urinary storage dysfunction via upregulation of epithelial sodium channel alpha in the bladder epithelium in Dahl salt-sensitive rats	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pharmacol Sci.	6. 最初と最後の頁 121-125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2017.10.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 熊本奈都子、柴田泰宏、植田高史、鶴川眞也
2. 発表標題 成体脳海馬神経新生における酸感受性イオンチャネルASIC1aの役割
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横井雄斗、柴田泰宏、熊本奈都子、植田高史、鶴川眞也
2. 発表標題 酸感受性イオンチャネル3（ASIC3）の痒みへの関与
3. 学会等名 第79回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊本奈都子、柴田泰宏、植田高史、鶴川眞也
2. 発表標題 マウス味蕾における酸感受性イオンチャネルの発現
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会合同大会(NEWRO2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊本奈都子、柴田泰宏、植田高史、鶴川眞也
2. 発表標題 マウス味蕾における酸感受性イオンチャネルの発現
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊本奈都子、柴田泰宏、植田高史、鶴川眞也
2. 発表標題 成体脳神経新生における酸感受性イオンチャネルASIC1aの役割
3. 学会等名 日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴田泰宏 熊本奈都子 植田高史 鶴川眞也
2. 発表標題 浸透圧センサーとしてのASIC4の可能性
3. 学会等名 第19回ORIGIN神経科学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊本奈都子 柴田泰宏 植田高史 鶴川眞也
2. 発表標題 成体脳海馬神経新生における酸感受性イオンチャネルASIC1aの役割
3. 学会等名 第19回ORIGIN神経科学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊本奈都子 柴田泰宏 植田高史 鶴川眞也
2. 発表標題 成体脳神経新生における酸感受性イオンチャネルASIC1aの役割
3. 学会等名 解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊本奈都子 柴田泰宏 植田高史 鶴川眞也
2. 発表標題 マウス味蕾における酸感受性イオンチャネルの発現
3. 学会等名 第124回日本解剖学会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田泰宏 星川真理子 熊本奈都子 植田高史 鶴川眞也
2. 発表標題 マウス前庭系におけるASIC1bの発現と分布
3. 学会等名 第18回ORIGIN神経科学研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 本奈都子 星川真理子 柴田泰宏 植田高史 鶴川眞也
2. 発表標題 成体脳海馬神経新生における酸感受性イオンチャネルASIC1aの役割
3. 学会等名 第18回ORIGIN神経科学研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柴田泰宏 星川真理子 熊本奈都子 植田高史 鶴川眞也
2. 発表標題 マウス前庭器官におけるASIC1bの発現と分布
3. 学会等名 第77回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柴田泰宏 星川真理子 熊本奈都子 植田高史 鶴川眞也
2. 発表標題 浸透圧変化がASIC4の電流に与える影響
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊本奈都子 星川真理子 柴田泰宏 植田高史 鶴川眞也
2. 発表標題 成体脳海馬神経新生への酸感受性イオンチャネルASIC1aの関与
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴田泰宏 星川真理子 熊本奈都子 植田高史 鶴川眞也
2. 発表標題 免疫電顕法を用いたマウス前提におけるASIC1bの発現と分布
3. 学会等名 第122会日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柴田泰宏 星川真理子 熊本奈都子 植田高史 鶴川眞也
2. 発表標題 マウス前庭系におけるASIC1bの発現と分布
3. 学会等名 第17回ORIGIN神経科学研究会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鶴川 眞也  (Ugawa Shinya)  (20326135)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授   (23903)	
研究分担者	佐々木 昌一  (Sasaki Shoichi)  (50225869)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員   (23903)	